



Leidimas  
lietuvių kalba

Teisės aktai

61 metai

2018 m. sausio 31 d.

Turinys

## II Ne teisėkūros procedūra priimami aktai

### TARPTAUTINIAI SUSITARIMAI

- ★ 2017 m. spalio 9 d. Tarybos sprendimas (ES) 2018/145 dėl Europos bendrijos bei jos valstybių narių, Albanijos Respublikos, Bosnijos ir Hercegovinos, Bulgarijos Respublikos, buvusiosios Jugoslavijos Respublikos Makedonijos, Islandijos Respublikos, Juodkalnijos Respublikos, Kroatijos Respublikos, Norvegijos Karalystės, Rumunijos, Serbijos Respublikos ir Jungtinių Tautų laikinosios administracijos misijos Kosove\* daugiašalio susitarimo dėl Europos bendrosios aviacijos erdvės (EBAE) sukūrimo sudarymo Sąjungos vardu ..... 1
- ★ 2018 m. sausio 22 d. Tarybos sprendimas (ES) 2018/146 dėl Europos bendrijos bei jos valstybių narių ir Maroko Karalystės Europos ir Viduržemio jūros regiono šalių susitarimo dėl oro susisiekimo sudarymo Sąjungos vardu ..... 4

### REGLAMENTAI

- ★ 2018 m. sausio 29 d. Tarybos reglamentas (ES) 2018/147, kuriuo dėl nugriebto pieno miltelių supirkimo kiekybinio apribojimo iš dalies keičiamas Reglamentas (ES) Nr. 1370/2013 ..... 6
- ★ 2017 m. rugsėjo 27 d. Komisijos deleguotasis reglamentas (ES) 2018/148, kuriuo iš dalies keičiami Europos Parlamento ir Tarybos reglamento (ES) Nr. 978/2012, kuriuo taikoma bendrųjų muitų tarifų lengvatų sistema, II, III ir IV priedai ..... 8
- ★ 2017 m. lapkričio 15 d. Komisijos deleguotasis reglamentas (ES) 2018/149, kuriuo dėl pieno ir pieno produktų, atitinkančių valstybės intervencijos ir paramos privačiam sandėliavimui reikalavimus, sudėties reikalavimų ir kokybės charakteristikų iš dalies keičiamas Deleguotasis reglamentas (ES) 2016/1238 ..... 11

\* Šis pavadinimas nekeičia pozicijų dėl statuso ir atitinka JT Saugumo Tarybos rezoliuciją 1244(1999) bei Tarptautinio Teisingumo Teismo nuomonę dėl Kosovo nepriklausomybės deklaracijos.

# LT

Aktai, kurių pavadinimai spausdinami paprastu šriftu, yra susiję su kasdieniu žemės ūkio reikalų valdymu ir paprastai galioja ribotą laikotarpį.

Visų kitų aktų pavadinimai spausdinami ryškesniu šriftu ir prieš juos dedama žvaigždutė.

- ★ 2018 m. sausio 30 d. Komisijos įgyvendinimo reglamentas (ES) 2018/150, kuriuo dėl pieno ir pieno produktų, atitinkančių valstybės intervencijos ir paramos privačiam sandėliavimui reikalavimus, analizės ir kokybės vertinimo metodų iš dalies keičiamas Įgyvendinimo reglamentas (ES) 2016/1240 ..... 14
- ★ 2018 m. sausio 30 d. Komisijos įgyvendinimo reglamentas (ES) 2018/151, kuriuo nustatomos Europos Parlamento ir Tarybos direktyvos (ES) 2016/1148 taikymo taisyklės, kuriomis patikslinami elementai, į kuriuos turi atsižvelgti skaitmeninių paslaugų teikėjai, kad galėtų valdyti tinklų ir informacinių sistemų saugumui kylančią riziką, ir parametrai, pagal kuriuos nustatoma, ar incidentas daro didelį poveikį ..... 48

#### SPRENDIMAI

- ★ 2018 m. sausio 29 d. Tarybos sprendimas (ES) 2018/152, kuriuo skiriamas Regionų komiteto Vokietijos Federacinės Respublikos pasiūlytas pakaitinis narys ..... 52

#### Klaidų ištaisymas

- ★ 2017 m. birželio 14 d. Komisijos reglamento (ES) Nr. 2017/1084, kuriuo dėl pagalbos uostų ir oro uostų infrastruktūrai, dėl pranešimo apie pagalbą kultūrai ir paveldo išsaugojimui ir pagalbą sporto ir daugiavilkiams laisvalaikio infrastruktūroms ribų ir dėl atokiausiems regionams skirtų regioninės veiklos pagalbos schemų iš dalies keičiamas Reglamentas (ES) Nr. 651/2014 ir dėl tinkamų finansuoti išlaidų apskaičiavimo iš dalies keičiamas Reglamentas (ES) Nr. 702/2014, klaidų ištaisymas (OL L 156, 2017 6 20) ..... 53

## II

(Ne teisėkūros procedūra priimami aktai)

## TARPTAUTINIAI SUSITARIMAI

## TARYBOS SPRENDIMAS (ES) 2018/145

2017 m. spalio 9 d.

**dėl Europos bendrijos bei jos valstybių narių, Albanijos Respublikos, Bosnijos ir Hercegovinos, Bulgarijos Respublikos, buvusiosios Jugoslavijos Respublikos Makedonijos, Islandijos Respublikos, Juodkalnijos Respublikos, Kroatijos Respublikos, Norvegijos Karalystės, Rumunijos, Serbijos Respublikos ir Jungtinių Tautų laikinosios administracijos misijos Kosove \* daugiašalio susitarimo dėl Europos bendrosios aviacijos erdvės (EBAE) sukūrimo sudarymo Sąjungos vardu**

EUROPOS SĄJUNGOS TARYBA,

atsižvelgdama į Sutartį dėl Europos Sąjungos veikimo, ypač į jos 100 straipsnio 2 dalį kartu su 218 straipsnio 6 dalies a punktu,

atsižvelgdama į Europos Komisijos pasiūlymą,

atsižvelgdama į Europos Parlamento pritarimą <sup>(1)</sup>,

kadangi:

- (1) Komisija Europos bendrijos ir jos valstybių narių vardu susitarė dėl Europos bendrijos bei jos valstybių narių, Albanijos Respublikos, Bosnijos ir Hercegovinos, Bulgarijos Respublikos, buvusiosios Jugoslavijos Respublikos Makedonijos, Islandijos Respublikos, Juodkalnijos Respublikos, Kroatijos Respublikos, Norvegijos Karalystės, Rumunijos, Serbijos Respublikos ir Jungtinių Tautų laikinosios administracijos misijos Kosove daugiašalio susitarimo dėl Europos bendrosios aviacijos erdvės (EBAE) sukūrimo (toliau – Susitarimas);
- (2) 2006 m. birželio 9 d., remiantis Tarybos ir Taryboje posėdžiavusių Europos Sąjungos valstybių narių atstovų sprendimu 2006/682/EB <sup>(2)</sup>, Susitarimas buvo pasirašytas Bendrijos vardu atsižvelgiant į tai, kad jis bus sudarytas vėliau;
- (3) Susitarimą ratifikavo visos valstybės narės;
- (4) įstojusios į Sąjungą, Bulgarijos Respublika, Kroatijos Respublika ir Rumunija tapo valstybėmis narėmis, todėl, remiantis Susitarimo 31 straipsnio 2 dalimi, jos automatiškai prarado asocijuotųjų šalių statusą pagal Susitarimą. Šis faktas turėtų būti pakartotas pranešime, kuris turi būti padarytas deponuojant Susitarimo patvirtinimo dokumentą;

\* Šis pavadinimas nekeičia pozicijų dėl statuso ir atitinka JT Saugumo Tarybos rezoliuciją 1244(1999) bei Tarptautinio Teisingumo Teismo nuomonę dėl Kosovo nepriklausomybės deklaracijos.

<sup>(1)</sup> OL C 81 E, 2011 3 15, p. 5.

<sup>(2)</sup> 2006 m. birželio 9 d. Tarybos ir Taryboje posėdžiavusių Europos Sąjungos valstybių narių atstovų sprendimas 2006/682/EB dėl Europos bendrijos bei jos valstybių narių, Albanijos Respublikos, Bosnijos ir Hercegovinos, Bulgarijos Respublikos, buvusiosios Jugoslavijos Respublikos Makedonijos, Islandijos Respublikos, Juodkalnijos Respublikos, Kroatijos Respublikos, Norvegijos Karalystės, Rumunijos, Serbijos Respublikos ir Jungtinių Tautų laikinosios administracijos misijos Kosove daugiašalio susitarimo dėl Europos bendrosios aviacijos erdvės (EBAE) sukūrimo pasirašymo ir laikino taikymo (OL L 285, 2006 10 16, p. 1).

- (5) kalbant apie Susitarimo I priedo pakeitimus, kuriais į tą priedą tik įrašomi Sąjungos teisės aktai ir kuriuos turės priimti pagal Susitarimo 18 straipsnį įsteigtas Jungtinis komitetas, įgaliojimai patvirtinti tokius pakeitimus Sąjungos vardu turėtų būti suteikti Komisijai, pasikonsultavus su Tarybos paskirtu specialiu komitetu;
- (6) visais kitais atvejais pozicija, kurios Sąjungos vardu turi būti laikomasi Jungtiniame komitete dėl Sąjungos kompetencijai priklausančių klausimų, turėtų būti nustatyta kiekvienu konkrečiu atveju pagal atitinkamas Sutarties dėl Europos Sąjungos veikimo (toliau – SESV) nuostatas;
- (7) atsižvelgiant į tai, kad ir Sąjunga, ir valstybės narės yra Susitarimo šalys, būtinas jų glaudus tarpusavio bendradarbiavimas. Siekiant užtikrinti tokį glaudų bendradarbiavimą ir sutarimą Jungtiniame komitete atstovaujant Sąjungai išorės lygmeniu ir nedarant poveikio Sutartims, visų pirma Europos Sąjungos sutarties 16 straipsnio 1 daliai ir SESV 218 straipsnio 9 daliai, pozicijos, kurių Europos Sąjungos ir valstybių narių vardu turi būti laikomasi Jungtiniame komitete dėl ir valstybių narių, ir Sąjungos kompetencijai priklausančių klausimų, turėtų būti suderintos prieš Jungtinio komiteto posėdį, kuriame toks klausimas nagrinėjamas;
- (8) Sprendimo 2006/682/EB 2 straipsnyje pateikiamos nuostatos dėl pozicijų, kurių turi būti laikomasi Jungtiniame komitete Susitarimo laikino taikymo metu, nustatymo. Atsižvelgiant į Teisingumo Teismo 2015 m. balandžio 28 d. sprendimą byloje C-28/12, *Komisija prieš Tarybą* <sup>(1)</sup>, tos nuostatos turėtų nebebūti taikomos nuo šio sprendimo įsigaliojimo dienos;
- (9) Susitarimas turėtų būti patvirtintas,

PRIĖMĖ ŠĮ SPRENDIMĄ:

#### 1 straipsnis

1. Sąjungos vardu patvirtinamas Europos bendrijos bei jos valstybių narių, Albanijos Respublikos, Bosnijos ir Hercegovinos, Bulgarijos Respublikos, buvusiosios Jugoslavijos Respublikos Makedonijos, Islandijos Respublikos, Juodkalnijos Respublikos, Kroatijos Respublikos, Norvegijos Karalystės, Rumunijos, Serbijos Respublikos ir Jungtinių Tautų laikinosios administracijos misijos Kosove daugiašalis susitarimas dėl Europos bendrosios aviacijos erdvės (EBAE) sukūrimo <sup>(2)</sup>.

2. Tarybos pirmininkas paskiria asmenį (-is), įgaliotą (-us) Sąjungos vardu deponuoti Susitarimo 29 straipsnio 2 dalyje nurodytą patvirtinimo dokumentą <sup>(3)</sup> ir pateikia šį pranešimą:

„1. 2009 m. gruodžio 1 d. įsigaliojus Lisabonos sutarčiai, Europos Sąjunga pakeitė Europos bendriją ir ją perėmė ir nuo tos datos naudojami visomis Europos bendrijos teisėmis ir perima visas jos pareigas. Todėl nuorodos į „Europos bendriją“ Susitarimo tekste atitinkamai skaitomos kaip nuorodos į „Europos Sąjungą“.

2. Įstojusios į Europos Sąjungą, Bulgarijos Respublika, Kroatijos Respublika ir Rumunija tapo Europos Sąjungos valstybėmis narėmis, todėl, remiantis Susitarimo 31 straipsnio 2 dalimi, jos prarado asocijuotųjų šalių statusą pagal Susitarimą.“

#### 2 straipsnis

Poziciją, kurios Sąjunga turi laikytis dėl Jungtinio komiteto pagal Susitarimo 17 straipsnį sprendimų, susijusių tik su Sąjungos teisės aktų įtraukimu į Susitarimo I priedą, atlikus reikiamus techninius patikslinimus, nustato Komisija, pasikonsultavusi su Tarybos paskirtu specialiu komitetu.

#### 3 straipsnis

Sprendimo 2006/682/EB 2 straipsnis nebetaikomas nuo šio sprendimo įsigaliojimo dienos.

<sup>(1)</sup> ECLI:EU:C:2015:282.

<sup>(2)</sup> Susitarimas buvo paskelbtas *Europos Sąjungos oficialiajame leidinyje* (OL L 285, 2006 10 16, p. 3) kartu su sprendimu dėl pasirašymo ir laikino taikymo.

<sup>(3)</sup> Susitarimo įsigaliojimo datą *Europos Sąjungos oficialiajame leidinyje* paskelbs Tarybos Generalinis sekretoriatas.

## 4 straipsnis

Šis sprendimas įsigalioja jo priėmimo dieną.

Priimta Liuksemburge 2017 m. spalio 9 d.

*Tarybos vardu*

*Pirmininkas*

S. KIISLER

---

**TARYBOS SPRENDIMAS (ES) 2018/146****2018 m. sausio 22 d.****dėl Europos bendrijos bei jos valstybių narių ir Maroko Karalystės Europos ir Viduržemio jūros regiono šalių susitarimo dėl oro susisiekimo sudarymo Sąjungos vardu**

EUROPOS SAJUNGOS TARYBA,

atsižvelgdama į Sutartį dėl Europos Sąjungos veikimo, ypač į jos 100 straipsnio 2 dalį kartu su 218 straipsnio 6 dalies a punktu,

atsižvelgdama į Europos Komisijos pasiūlymą,

atsižvelgdama į Europos Parlamento pritarimą <sup>(1)</sup>,

kadangi:

- (1) Komisija Sąjungos bei valstybių narių vardu vedė derybas su Maroko Karalyste dėl Europos ir Viduržemio jūros regiono šalių susitarimo dėl oro susisiekimo (toliau – Susitarimas) vadovaudamasi Tarybos sprendimu, kuriuo Komisija įgaliojama pradėti derybas;
- (2) Susitarimas buvo pasirašytas 2006 m. gruodžio 12 d. pagal Tarybos ir Taryboje posėdžiavusių valstybių narių Vyriausybės atstovų sprendimą 2006/959/EB <sup>(2)</sup>. Susitarimą ratifikavo visos valstybės narės, išskyrus Bulgariją, Rumuniją ir Kroatiją. Planuojama, kad pastarosios valstybės narės prie Susitarimo prisijungs pagal atitinkamų savo stojimo aktų 6 straipsnio 2 dalį;
- (3) kalbant apie tam tikrų Susitarimo priedų pakeitimus, kuriuos turės priimti pagal Susitarimo 22 straipsnį įsteigtas Jungtinis komitetas, įgaliojimai patvirtinti tokius pakeitimus Sąjungos vardu turėtų būti suteikti Komisijai, pasikonsultavusiai su Tarybos paskirtu specialiu komitetu;
- (4) visais kitais atvejais pozicijos, kurių Sąjungos vardu turi būti laikomasi Jungtiniame komitete dėl Sąjungos kompetencijai priklausančių klausimų, turėtų būti nustatytos kiekvienu konkrečiu atveju pagal atitinkamas Sutarties dėl Europos Sąjungos veikimo (toliau – SESV) nuostatas;
- (5) atsižvelgiant į tai, kad tiek Sąjunga, tiek jos valstybės narės yra Susitarimo šalys, būtinas jų glaudus tarpusavio bendradarbiavimas. Siekiant užtikrinti glaudų bendradarbiavimą ir sutarimą Jungtiniame komitete atstovaujant Sąjungai išorės lygmeniu ir nedarant poveikio Sutartims, visų pirma Europos Sąjungos sutarties 16 straipsnio 1 daliai ir SESV 218 straipsnio 9 daliai, pozicijos, kurių Europos Sąjungos ir valstybių narių vardu turi būti laikomasi Jungtiniame komitete dėl ir valstybių narių, ir Sąjungos kompetencijai priklausančių klausimų, turėtų būti suderintos prieš Jungtinio komiteto posėdį, kuriame toks klausimas nagrinėjamas;
- (6) Sprendimo 2006/959/EB 2–5 straipsniuose išdėstytos nuostatos dėl sprendimų priėmimo Taryboje įvairiais Susitarime išdėstytais klausimais, įskaitant pozicijų, kurių turi būti laikomasi Jungtiniame komitete, nustatymą ir valstybėms narėms taikomą pareigą teikti informaciją Susitarimo laikino taikymo metu. Tos nuostatos nėra būtinos arba jų taikymas turėtų būti nutrauktas atsižvelgiant į 2015 m. balandžio 28 d. Teisingumo Teismo sprendimą byloje C-28/12, *Komisija prieš Tarybą* <sup>(3)</sup>. Todėl tikslinga, kad visos tos nuostatos nebebūtų taikomos nuo šio sprendimo įsigaliojimo dienos;
- (7) Susitarimas turėtų būti patvirtintas,

<sup>(1)</sup> OL C 81 E, 2011 3 15, p. 5.

<sup>(2)</sup> 2006 m. gruodžio 4 d. Tarybos ir Taryboje posėdžiavusių valstybių narių Vyriausybės atstovų sprendimas 2006/959/EB dėl Europos bendrijos bei jos valstybių narių ir Maroko Karalystės Europos ir Viduržemio jūros regiono šalių susitarimo dėl oro susisiekimo pasirašymo ir laikino taikymo (OL L 386, 2006 12 29, p. 55).

<sup>(3)</sup> ECLI:EU:C:2015:282.

PRIĖMĖ ŠĮ SPRENDIMĄ:

*1 straipsnis*

1. Europos bendrijos bei jos valstybių narių ir Maroko Karalystės Europos ir Viduržemio jūros regiono šalių susitarimas dėl oro susisieki­mo patvirtinamas Sąjungos vardu <sup>(1)</sup>.
2. Tarybos pirmininkas įgaliojamas paskirti asmenį (-is), įgaliotą (-us) Maroko Karalystei perduoti Susitarimo 30 straipsnyje numatytas diplomatines notas <sup>(2)</sup> ir pateikti šį pranešimą:

„2009 m. gruodžio 1 d. įsigaliojus Lisabonos sutarčiai, Europos Sąjunga pakeitė Europos bendriją ir ją perėmė ir nuo tos datos naudo­jasi visomis Europos bendrijos teisėmis ir perima visas jos pareigas. Todėl nuorodos į „Europos bendriją“ Susitarimo tekste atitinkamai skaitomos kaip nuorodos į „Europos Sąjungą“.“

*2 straipsnis*

Susitarimo priedų, išskyrus I priedą (Reguliariosios oro susisieki­mo paslaugos ir nustatyti maršrutai) ir IV priedą (Pereinamojo laikotarpio nuostatos), pakeitimų klausimais Sąjungos poziciją Jungtiniame komitete, įsteigtame pagal Susitarimo 22 straipsnį, priima Komisija, pasikonsultavusi su Tarybos paskirtu specialiu komitetu.

*3 straipsnis*

Sprendimo 2006/959/EB 2–5 straipsniai nebetaikomi nuo šio sprendimo įsigaliojimo dienos.

*4 straipsnis*

Šis sprendimas įsigalioja jo priėmimo dieną.

Priimta Briuselyje 2018 m. sausio 22 d.

*Tarybos vardu*  
*Pirmininkė*  
F. MOGHERINI

<sup>(1)</sup> Susitarimas buvo paskelbtas *Europos Sąjungos oficialiajame leidinyje* (OL L 386, 2006 12 29, p. 57) kartu su sprendimu dėl pasirašymo ir laikino taikymo.

<sup>(2)</sup> Susitarimo įsigaliojimo datą *Europos Sąjungos oficialiajame leidinyje* paskelbs Tarybos Generalinis sekretoriatas.

# REGLAMENTAI

## TARYBOS REGLAMENTAS (ES) 2018/147

2018 m. sausio 29 d.

### **kuriuo dėl nugriebto pieno miltelių supirkimo kiekybinio apribojimo iš dalies keičiamas Reglamentas (ES) Nr. 1370/2013**

EUROPOS SAJUNGOS TARYBA,

atsižvelgdama į Sutartį dėl Europos Sąjungos veikimo, ypač į jos 43 straipsnio 3 dalį,

atsižvelgdama į Europos Komisijos pasiūlymą,

kadangi:

- (1) pranešta, kad 2017 m. liepos mėn. pabaigoje nugriebto pieno miltelių viešosios intervencijos atsargos Sąjungoje sudarė 357 359 tonas. Be to, iki intervencijos laikotarpio pabaigos 2017 m. rugsėjo 30 d. nustatyta kaina papildomai pasiūlyta supirkti 22 710 tonų nugriebto pieno miltelių;
- (2) dėl itin didelės sviesto paklausos pieno ir pieno produktų sektoriuje šiuo metu pastebimas precedento neturintis riebalų ir baltymų kainų atotrūkis;
- (3) 2018 m. pieno tiekimo mastas Sąjungoje turėtų padidėti, todėl bus pagaminta daugiau sviesto ir nugriebto pieno miltelių;
- (4) tikėtina, kad dėl didelės dabartinės sviesto ir sūrio paklausos ūkininkams mokamos žalio pieno supirkimo kainos 2018 m. išliks pakankamo lygio, kad pienininkystė būtų pelninga, nepaisant santykinai mažos pieno baltymų kainos;
- (5) dėl tų rinkos veiksnių 2018 m. susidarys ypatinga padėtis, į kurią reikia tinkamai atsižvelgti, turint omenyje pieno produktų viešosios intervencijos mechanizmo taikymą;
- (6) Tarybos reglamento (ES) Nr. 1370/2013 <sup>(1)</sup> 3 straipsnyje nustatyta nugriebto pieno miltelių supirkimo nustatyta kaina, kuri nurodyta to reglamento 2 straipsnyje, kiekybinis apribojimas. Pasiekus tą ribą, produktai turi būti superkami konkurso tvarka siekiant nustatyti didžiausią supirkimo kainą;
- (7) kad nugriebto pieno milteliai nebūtų superkami nustatyta kaina susidarius padėčiai, kai toks supirkimas neatitinka apsaugos priemonių tikslo, visa nugriebto pieno milteliams taikoma viešoji intervencija turėtų būti vykdoma konkurso tvarka. Tuo tikslu turėtų būti nustatyta, kad 2018 m. nugriebto pieno miltelių supirkimo nustatyta kaina kiekybinis apribojimas yra lygus nuliui;
- (8) todėl Reglamentas (ES) Nr. 1370/2013 turėtų būti atitinkamai iš dalies pakeistas;
- (9) siekiant užtikrinti, kad šiame reglamente nustatyta laikinoji priemonė iš karto padarytų poveikį rinkai ir kad rinkos dalyviai būtų informuoti tinkamu laiku prieš prasidedant kitai intervencijos kampanijai, šis reglamentas turėtų įsigaliooti kitą dieną po jo paskelbimo,

<sup>(1)</sup> 2013 m. gruodžio 16 d. Tarybos reglamentas (ES) Nr. 1370/2013, kuriuo nustatomos su bendru žemės ūkio produktų rinkų organizavimu susijusios tam tikros pagalbos ir grąžinamųjų išmokų nustatymo priemonės (OL L 346, 2013 12 20, p. 12).



PRIĖMĖ ŠĮ REGLAMENTĄ:

*1 straipsnis*

Reglamento (ES) Nr. 1370/2013 3 straipsnio 1 dalis yra papildoma šia pastraipa:

„Nukrypstant nuo pirmos pastraipos, 2018 m. nugriebto pieno miltelių supirkimo nustatyta kaina kiekybinis apribojimas yra 0 tonų.“

*2 straipsnis*

Šis reglamentas įsigalioja kitą dieną po jo paskelbimo *Europos Sąjungos oficialiajame leidinyje*.

Šis reglamentas privalomas visas ir tiesiogiai taikomas visose valstybėse narėse.

Priimta Briuselyje 2018 m. sausio 29 d.

*Tarybos vardu*  
*Pirmininkas*  
R. PORODZANOV

---

**KOMISIJOS DELEGUOTASIS REGLAMENTAS (ES) 2018/148****2017 m. rugsėjo 27 d.****kuriuo iš dalies keičiami Europos Parlamento ir Tarybos reglamento (ES) Nr. 978/2012, kuriuo taikoma bendrųjų muitų tarifų lengvatų sistema, II, III ir IV priedai**

EUROPOS KOMISIJA,

atsižvelgdama į Sutartį dėl Europos Sąjungos veikimo,

atsižvelgdama į 2012 m. spalio 25 d. Europos Parlamento ir Tarybos reglamentą (ES) Nr. 978/2012, kuriuo taikoma bendrųjų muitų tarifų lengvatų sistema ir panaikinamas Tarybos reglamentas (EB) Nr. 732/2008 <sup>(1)</sup>, ypač į jo 5 straipsnio 3 dalį, 10 straipsnio 5 dalį ir 17 straipsnio 2 dalį,

kadangi:

- (1) Reglamento (ES) Nr. 978/2012 4 straipsnyje nustatyti kriterijai, kuriais remiantis taikomos muitų tarifų lengvatos pagal Bendrosios lengvatų sistemos (toliau – BLS) bendrąją priemonę;
- (2) Reglamento (ES) Nr. 978/2012 4 straipsnio 1 dalies a ir b punktuose nustatyta, kad atitinkamai šalis, kurią Pasaulio bankas trejus metus iš eilės priskiria dideles arba didesnes nei vidutines pajamas gaunančioms šalims, arba šalis, kuriai taikoma lengvatinio patekimo į rinką priemonė, pagal kurią iš esmės visai prekybai taikomos tokios pačios muitų tarifų lengvatos kaip pagal BLS arba didesnės, neturėtų naudotis BLS;
- (3) Reglamento (ES) Nr. 978/2012 II priede nustatytas BLS lengvatomis besinaudojančių šalių sąrašas, nurodytas to reglamento 1 straipsnio 2 dalies a punkte. Reglamento (ES) Nr. 978/2012 5 straipsnio 2 dalyje nustatyta, kad II priedas turi būti peržiūrimas iki kiekvienų metų sausio 1 d. Atliekant peržiūrą reikėtų atsižvelgti į lengvatomis besinaudojančių šalių ekonominių, vystymosi ar prekybos sąlygų pokyčius, susijusius su 4 straipsnyje nustatytais kriterijais;
- (4) remiantis Reglamento (ES) Nr. 978/2012 5 straipsnio 2 dalimi, BLS lengvatomis besinaudojančiai šaliai ir ekonominės veiklos vykdytojams reikėtų suteikti pakankamai laiko tinkamai prisitaikyti prie šaliai taikomo BLS statuso pakeitimo. Todėl BLS priemonė turi būti toliau taikoma vienus metus po šalies statuso pasikeitimo įsigaliojimo datos, kaip nurodyta 4 straipsnio 1 dalies a punkte, ir dvejus metus po lengvatinio patekimo į rinką priemonės taikymo datos, kaip nurodyta 4 straipsnio 1 dalies b punkte;
- (5) Paragvajų Pasaulio bankas 2015, 2016 ir 2017 m. priskyrė didesnes nei vidutines pajamas gaunančioms šalims. Todėl Paragvajus nebeatitinka BLS lengvatomis besinaudojančios šalies statuso reikalavimų pagal Reglamento (ES) Nr. 978/2012 4 straipsnio 1 dalies a punktą ir turėtų būti išbrauktas iš to reglamento II priede pateikto BLS lengvatomis besinaudojančių šalių sąrašo nuo 2019 m. sausio 1 d.;
- (6) lengvatinio patekimo į rinką priemonės pradėtos taikyti Dramblio Kaulo Krantui 2016 m. rugsėjo 3 d., Svazilandui – 2016 m. spalio 10 d., o Ganai – 2016 m. gruodžio 15 d. Todėl, remiantis 4 straipsnio 1 dalies b punktu, Dramblio Kaulo Krantas, Svazilandas ir Gana taip pat turėtų būti išbraukti iš Reglamento (ES) Nr. 978/2012 II priedo nuo 2019 m. sausio 1 d.;
- (7) Reglamento (ES) Nr. 978/2012 9 straipsnio 1 dalyje nustatyti specialūs kriterijai, kuriuos atitinkančioms BLS lengvatomis besinaudojančioms šalims galima suteikti muitų lengvatas pagal specialią tvaraus vystymosi ir gero valdymo skatinamąją priemonę (BLS+). Reglamento (ES) Nr. 978/2012 III priede pateiktas BLS+ lengvatomis besinaudojančių šalių sąrašas;
- (8) nuo 2019 m. sausio 1 d. Paragvajus netenka BLS lengvatomis besinaudojančios šalies statuso, dėl to jis taip pat netenka BLS + lengvatomis besinaudojančios šalies statuso pagal Reglamento (ES) Nr. 978/2012 9 straipsnio 1 dalį. Todėl Paragvajus taip pat turėtų būti išbrauktas iš to reglamento III priedo nuo 2019 m. sausio 1 d.;

<sup>(1)</sup> O L L 303, 2012 10 31, p. 1.

- (9) Reglamento (ES) Nr. 978/2012 17 straipsnio 1 dalyje nustatyta, kad šalims, kurias Jungtinės Tautos (JT) priskiria mažiausiai išsivysčiusiems šalims, turėtų būti taikomos muitų tarifų lengvatos, kurios suteikiamos pagal specialią priemonę mažiausiai išsivysčiusiems šalims („Viskas, išskyrus ginklus“ (VIG)). VIG lengvatomis besinaudojančių šalių sąrašas pateiktas minėto reglamento IV priede;
- (10) 2017 m. birželio 4 d. JT panaikino Pusiaujo Gvinėjos kaip mažiausiai išsivysčiusios šalies statusą. Todėl Pusiaujo Gvinėja nebeatitinka VIG lengvatomis besinaudojančios šalies statuso reikalavimų pagal Reglamento (ES) Nr. 978/2012 17 straipsnio 1 dalį ir turėtų būti išbraukta iš to reglamento IV priedo. Vadovaujantis Reglamento (ES) Nr. 978/2012 17 straipsnio 2 dalimi, Pusiaujo Gvinėjos išbraukimas iš VIG lengvatomis besinaudojančių šalių sąrašo turėtų įsigaliooti praėjus trejų metų pereinamajam laikotarpiui nuo šio reglamento įsigaliojimo datos, t. y. nuo 2021 m. sausio 1 d.;
- (11) be to, Pusiaujo Gvinėją Pasaulio bankas 2015 m. priskyrė dideles pajamas gaunančiomis šalimis, o 2016 ir 2017 m. – didesnes nei vidutines pajamas gaunančioms šalims. Todėl Pusiaujo Gvinėja nebeatitinka BLS lengvatomis besinaudojančios šalies statuso reikalavimų pagal Reglamento (ES) Nr. 978/2012 4 straipsnio 1 dalies a punktą ir taip pat turėtų būti išbraukta iš to reglamento II priede pateikto BLS lengvatomis besinaudojančių šalių sąrašo nuo 2021 m. sausio 1 d.,

PRIĖMĖ ŠĮ REGLAMENTĄ:

*1 straipsnis*

**Reglamento (ES) Nr. 978/2012 pakeitimai**

Reglamentas (ES) Nr. 978/2012 iš dalies keičiamas taip:

1. Iš II priedo A ir B skilčių išbraukiami šie raidiniai kodai ir atitinkamos šalys:

CI Dramblio Kaulo Krantas

GH Gana

PY Paragvajus

SZ Svazilandas

2. Iš III priedo A ir B skilčių išbraukiamas šis raidinis kodas ir atitinkama šalis:

PY Paragvajus

3. Iš II ir IV priedų A ir B skilčių išbraukiamas šis raidinis kodas ir atitinkama šalis:

GQ Pusiaujo Gvinėja

*2 straipsnis*

**Įsigaliojimas ir taikymas**

Šis reglamentas įsigalioja 2018 m. sausio 1 d.

1 straipsnio 1 ir 2 dalys taikomos nuo 2019 m. sausio 1 d.

1 straipsnio 3 dalis taikoma nuo 2021 m. sausio 1 d.

Šis reglamentas privalomas visas ir tiesiogiai taikomas visose valstybėse narėse.

Priimta Briuselyje 2017 m. rugsėjo 27 d.

*Komisijos vardu*  
*Pirmininkas*  
Jean-Claude JUNCKER

---

**KOMISIJOS DELEGUOTASIS REGLAMENTAS (ES) 2018/149****2017 m. lapkričio 15 d.****kuriuo dėl pieno ir pieno produktų, atitinkančių valstybės intervencijos ir paramos privačiam sandėliavimui reikalavimus, sudėties reikalavimų ir kokybės charakteristikų iš dalies keičiamas Deleguotasis reglamentas (ES) 2016/1238**

EUROPOS KOMISIJA,

atsižvelgdama į Sutartį dėl Europos Sąjungos veikimo,

atsižvelgdama į 2013 m. gruodžio 17 d. Europos Parlamento ir Tarybos reglamentą (ES) Nr. 1308/2013, kuriuo nustatomas bendras žemės ūkio produktų rinkų organizavimas ir panaikinami Tarybos reglamentai (EEB) Nr. 922/72, (EEB) Nr. 234/79, (EB) Nr. 1037/2001 ir (EB) Nr. 1234/2007 <sup>(1)</sup>, visų pirma į jo 19 straipsnio 1 dalies a punktą,

kadangi:

- (1) Komisijos deleguotajame reglamente (ES) 2016/1238 <sup>(2)</sup> nustatyti pieno ir pieno produktų, kurie atitinka valstybės intervencijos ir paramos privačiam sandėliavimui reikalavimus, sudėties reikalavimai ir kokybės charakteristikos;
- (2) techniškai patobulinus pieno ir pieno produktų tyrimui taikomą metodiką, būtina peržiūrėti ir atnaujinti tam tikriems pieno produktams, atitinkantiems valstybės intervencijos ir paramos privačiam sandėliavimui reikalavimus, sudėties reikalavimų rodiklius ir kokybės charakteristikas, ir suderinti su higienos reikalavimais susijusias esamas Sąjungos taisykles;
- (3) Deleguotojo reglamento (ES) 2016/1238 IV ir V priedai turėtų būti atitinkamai iš dalies pakeisti,

PRIĖMĖ ŠĮ REGLAMENTĄ:

*1 straipsnis*

Deleguotojo reglamento (ES) 2016/1238 priedai iš dalies keičiami taip:

- a) IV priedo II dalis pakeičiama šio reglamento I priedo tekstu;
- b) V priedo II dalis pakeičiama šio reglamento II priedo tekstu.

*2 straipsnis*Šis reglamentas įsigalioja septintą dieną po jo paskelbimo *Europos Sąjungos oficialiajame leidinyje*.

Šis reglamentas privalomas visas ir tiesiogiai taikomas visose valstybėse narėse.

Priimta Briuselyje 2017 m. lapkričio 15 d.

*Komisijos vardu*  
*Pirmininkas*  
Jean-Claude JUNCKER

<sup>(1)</sup> OL L 347, 2013 12 20, p. 671.

<sup>(2)</sup> 2016 m. gegužės 18 d. Komisijos deleguotasis reglamentas (ES) 2016/1238, kuriuo papildomos Europos Parlamento ir Tarybos reglamento (ES) Nr. 1308/2013 nuostatos dėl valstybės intervencijos ir paramos privačiam sandėliavimui (OL L 206, 2016 7 30, p. 15).

## I PRIEDAS

## „II DALIS

**Sudėties reikalavimai ir kokybės charakteristikos**

Sviestas – vienalytė, daugiausia vandens riebaluose tipo emulsija, kuriai būdingos šios sudėties ir kokybės charakteristikos:

Parametrai	Sudėtis ir kokybės charakteristikos
Riebalai	Ne mažiau kaip 82 %
Vanduo	Ne daugiau kaip 16 %
Sausoji neriebalinė medžiaga	Ne daugiau kaip 2 %
Riebalų rūgštingumas	Ne daugiau kaip 1,2 mmole/100 g riebalų
Peroksidų skaičius	Ne daugiau kaip 0,3 meq deguonies/1 000 g riebalų
Ne pieno riebalai	Neaptinkami atliekant trigliceridų analizę
Juslinės savybės	Mažiausiai keturi iš penkių balų vertinant išvaizdą, skonį ir konsistenciją“

## II PRIEDAS

## „II DALIS

## Sudėties reikalavimai ir kokybės charakteristikos

Parametrai	Sudėtis ir kokybės charakteristikos
Baltymai	Ne mažiau kaip 34,0 % sausosios neriebalinės medžiagos
Riebalai	Ne daugiau kaip 1,00 %
Vanduo	Ne daugiau kaip 3,5 %
Titruojamas rūgštingumas 1 ml dešimtosios normos natrio chlorido tirpalo	Ne daugiau kaip 19,5 ml
Laktatai	Ne daugiau kaip 150 mg/100 g
Fosfatazės testas	Neigiamas, t. y. ne daugiau kaip 350 mU fosfatazinio aktyvumo viename litre regeneruoto pieno
Netirpumo indeksas	Ne daugiau kaip 0,5 ml (24 °C)
Suskrudusios dalelės	Ne daugiau kaip 15,0 mg, t. y. mažiausiai B diskas
Mikroorganizmų kiekis	Ne daugiau kaip 40 000 kolonijų sudarančių vienetų grame (ksv/g)
Pasukos <sup>(1)</sup>	Nėra <sup>(2)</sup>
Fermentinės išrūgos <sup>(3)</sup>	Nėra
Rūgščių išrūgos <sup>(3)</sup>	Nėra <sup>(4)</sup> arba ne daugiau kaip 150 mg/100 g <sup>(5)</sup>
Skonis ir kvapas	Grynas
Išvaizda	Baltos ar šiek tiek gelsvos spalvos, be priemaišų ar spalvotųjų dalelių

<sup>(1)</sup> Pasukos – sviesto gamybos šalutinis produktas, gaunamas sumušus grietinę ir atskyrus grynus riebalus.

<sup>(2)</sup> Pasukų nebuvimą galima patikrinti per gamybos cecho patikrinimą vietoje, atliekamą be išankstinio perspėjimo bent kartą per savaitę, arba atliekant laboratorinę galutinio produkto analizę, kurios didžiausias rezultatas gali būti 69,31 mg FEDP (fosfatidiletanolamino dipalmitoilo) 100 g.

<sup>(3)</sup> Išrūgos – sūrio arba kazeino gamybos šalutinis produktas, gaunamas veikiant rūgštims, šliužo fermentui ir (arba) vykstant cheminiams fizikiniams procesams.

<sup>(4)</sup> Kai atliekami patikrinimai vietoje.

<sup>(5)</sup> Kai taikomas ISO 8069.“

**KOMISIJOS ĮGYVENDINIMO REGLAMENTAS (ES) 2018/150****2018 m. sausio 30 d.****kuriuo dėl pieno ir pieno produktų, atitinkančių valstybės intervencijos ir paramos privačiam sandėliavimui reikalavimus, analizės ir kokybės vertinimo metodų iš dalies keičiamas Įgyvendinimo reglamentas (ES) 2016/1240**

EUROPOS KOMISIJA,

atsižvelgdama į Sutartį dėl Europos Sąjungos veikimo,

atsižvelgdama į 2013 m. gruodžio 17 d. Europos Parlamento ir Tarybos reglamentą (ES) Nr. 1306/2013 dėl bendros žemės ūkio politikos finansavimo, valdymo ir stebėsenos, kuriuo panaikinami Tarybos reglamentai (EEB) Nr. 352/78, (EB) Nr. 165/94, (EB) Nr. 2799/98, (EB) Nr. 814/2000, (EB) Nr. 1290/2005 ir (EB) Nr. 485/2008 <sup>(1)</sup>, ypač į jo 62 straipsnio 2 dalies i punktą,

kadangi:

- (1) Komisijos deleguotajame reglamente (ES) 2016/1238 <sup>(2)</sup> ir Komisijos įgyvendinimo reglamente (ES) 2016/1240 <sup>(3)</sup> nustatytos valstybės intervencijos ir paramos privačiam sandėliavimui taisyklės. Komisijos reglamente (EB) Nr. 273/2008 <sup>(4)</sup> nustatyti metodai, taikytini vertinant, ar pienas ir pieno produktai atitinka tuose reglamentuose dėl valstybės intervencijos ir privačiam sandėliavimui taikomai paramai nustatytus atitiktus reikalavimus;
- (2) atsižvelgiant į pieno ir pieno produktų analizei ir kokybės vertinimui taikomos metodikos techninę pažangą, taip pat siekiant supaprastinti nuostatas ir pateikti atnaujintas nuorodas į ISO standartus, reikėtų padaryti reikšmingų pakeitimų. Siekiant aiškumo ir veiksmingumo ir atsižvelgiant į Reglamento (EB) Nr. 273/2008 nuostatų pakeitimų mastą ir techninį pobūdį, atitinkamos to reglamento nuostatos turėtų būti ištrauktos iš Įgyvendinimo reglamentą (ES) 2016/1240;
- (3) siekiant užtikrinti, kad naujų standartų ir metodų būtų vienodai laikomasi visose valstybėse narėse, laboratorijoms turėtų būti suteikta pakankamai laiko, kad jos galėtų peržiūrėti procedūras ir pradėti taikyti atnaujintus metodus;
- (4) Įgyvendinimo reglamentas (ES) 2016/1240 turėtų būti atitinkamai iš dalies pakeistas;
- (5) siekiant teisinio aiškumo Reglamentas (EB) Nr. 273/2008 turėtų būti panaikintas;
- (6) šiame reglamente nustatytos priemonės atitinka Bendro žemės ūkio rinkų organizavimo komiteto nuomonę,

PRIĖMĖ ŠĮ REGLAMENTĄ:

*1 straipsnis*

Įgyvendinimo reglamentas (ES) 2016/1240 iš dalies keičiamas taip:

1) 4 straipsnis iš dalies keičiamas taip:

a) 1 dalis iš dalies keičiama taip:

i) d punktas pakeičiamas taip:

„d) sviesto: šio reglamento IV priedo I ir Ia dalyse;“;

ii) e punktas pakeičiamas taip:

„e) nugriebto pieno miltelių: šio reglamento V priedo I ir Ia dalyse.“;

<sup>(1)</sup> OL L 347, 2013 12 20, p. 549.<sup>(2)</sup> 2016 m. gegužės 18 d. Komisijos deleguotasis reglamentas (ES) 2016/1238, kuriuo papildomos Europos Parlamento ir Tarybos reglamento (ES) Nr. 1308/2013 nuostatos dėl valstybės intervencijos ir paramos privačiam sandėliavimui (OL L 206, 2016 7 30, p. 15).<sup>(3)</sup> 2016 m. gegužės 18 d. Komisijos įgyvendinimo reglamentas (ES) 2016/1240, kuriuo nustatomos Europos Parlamento ir Tarybos reglamento (ES) Nr. 1308/2013 nuostatų dėl valstybės intervencijos ir paramos privačiam sandėliavimui taikymo taisyklės (OL L 206, 2016 7 30, p. 71).<sup>(4)</sup> 2008 m. kovo 5 d. Komisijos reglamentas (EB) Nr. 273/2008, nustatantis išsamias Tarybos reglamento (EB) Nr. 1255/1999 taikymo taisyklės, susijusias su pieno ir pieno produktų analizės bei kokybės vertinimo metodais (OL L 88, 2008 3 29, p. 1).



b) 2 dalis pakeičiama taip:

„2. Metodai, naudojami siekiant nustatyti atitinkamai I, IV ir V prieduose nurodytos valstybės intervencijos reikalavimus atitinkančių grūdų, sviesto ir nugriebto pieno miltelių kokybę, turi būti atitinkamų Europos arba tarptautinių standartų naujausiose redakcijose nustatyti atitinkami metodai, galiojantys ne trumpiau kaip 6 mėnesius iki pirmosios valstybės intervencijos laikotarpio, apibrėžto Reglamento (ES) Nr. 1308/2013 12 straipsnyje, dienos.“

2) Įterpiamas 60a straipsnis:

„60a straipsnis

**Specialios nuostatos dėl patikrų, susijusių su pieno ir pieno produktų valstybės intervencija ir parama privačiam sandėliavimui**

1. Sviesto, nugriebto pieno miltelių ir sūrio atitiktis paramos privačiam sandėliavimui reikalavimams nustatoma remiantis atitinkamai VI, VII ir VIII prieduose nustatytais metodais.

Tie metodai nustatomi atsižvelgiant į konkrečiu atveju (ne trumpiau kaip 6 mėnesius iki pirmosios valstybės intervencijos laikotarpio, dienos, kaip apibrėžta Reglamento (ES) Nr. 1308/2013 12 straipsnyje) galiojančias naujausias atitinkamų Europos arba tarptautinių standartų versijas.

2. Patikrų, atliktų taikant šiame reglamente nustatytus metodus, rezultatai vertinami remiantis IX priedu.“

3) Priedai iš dalies keičiami pagal šio reglamento priedą.

2 straipsnis

Reglamentas (EB) Nr. 273/2008 panaikinamas.

3 straipsnis

Šis reglamentas įsigalioja septintą dieną po jo paskelbimo *Europos Sąjungos oficialiajame leidinyje*.

Šis reglamentas privalomas visas ir tiesiogiai taikomas visose valstybėse narėse.

Priimta Briuselyje 2018 m. sausio 30 d.

Komisijos vardu  
Pirmininkas  
Jean-Claude JUNCKER

## PRIEDAS

Igyvendinimo reglamento (ES) 2016/1240 priedai iš dalies keičiami taip:

1) IV priedas iš dalies keičiamas taip:

a) I dalies 2 punkto antroji pastraipa pakeičiama taip:

„Kiekvienas mėginys vertinamas atskirai. Mėginių ėmimo ir vertinimo kartoti negalima.“;

b) įterpiama ši Ia dalis:

„IA DALIS

**Valstybės intervencijai pateikiamo nesūdyto sviesto analizės metodai**

Parametras	Metodas
Riebalai <sup>(1)</sup>	ISO 17189 arba ISO 3727 3 dalis
Vanduo	ISO 3727 1 dalis
Sausosios neriebalinės medžiagos	ISO 3727 2 dalis
Riebalų rūgštingumas	ISO 1740
Peroksidų skaičius	ISO 3976
Ne pieno riebalai	ISO 17678
Juslinės charakteristikos	ISO 22935 2 ir 3 dalys ir toliau pateikta balų lentelė.

<sup>(1)</sup> Taikytiną metodą turi patvirtinti mokėjimo agentūra.

**Balų lentelė**

Išvaizda		Konsistencija		Kvapas ir skonis	
Balai	Pastabos	Balai	Pastabos	Balai	Pastabos
5	<i>Labai gera</i> Puiki Aukščiausios kokybės (vienodai sausa)	5	<i>Labai gera</i> Puiki Aukščiausios kokybės (teposi tolydžiai)	5	<i>Labai geras</i> Puikus Aukščiausios kokybės (absoliučiai grynas, puikus kvapas)
4	<i>Gera</i> (be akivaizdžių defektų)	4	<i>Gera</i> (be akivaizdžių defektų)	4	<i>Geras</i> (be akivaizdžių defektų)
1, 2 arba 3	Yra defektų	1, 2 arba 3	Yra defektų	1, 2 arba 3	Yra defektų“

2) V priede įterpiama ši 1a dalis:

„IA DALIS

**Valstybės intervencijai pateikiamų nugriebto pieno miltelių analizės metodai**

Parametras	Metodas
Baltymai	ISO 8968 1 dalis
Riebalai	ISO 1736
Vanduo	ISO 5537
Rūgštingumas	ISO 6091
Laktatai	ISO 8069
Fosfazės tyrimas	ISO 11816 1 dalis
Netirpumo indeksas	ISO 8156
Suskrudusios dalelės <sup>(1)</sup>	ADPI (Amerikos pienininkystės institutas)
Mikroorganizmai	ISO 4833 1 dalis
Pasukos	I priedėlis
Fermentinės išrūgos <sup>(2)</sup>	II ir III priedėliai
Rūgščiosios išrūgos <sup>(3)</sup>	ISO 8069 arba patikros vietoje
Jutiminės patikros <sup>(4)</sup>	ISO 22935 2 ir 3 dalys

<sup>(1)</sup> Suskrudusių dalelių analizę galima vykdyti sistemingai. Tačiau tokią analizę būtina atlikti, jei neatliekamos jutiminės patikros.

<sup>(2)</sup> Taikytiną metodą turi patvirtinti mokėjimo agentūra (vieną arba abu metodus).

<sup>(3)</sup> Taikytiną metodą turi patvirtinti mokėjimo agentūra.

<sup>(4)</sup> Jutiminės patikros atliekamos, jei atlikus mokėjimo agentūros patvirtintą rizikos analizę manoma, kad tai būtina.

## I priedėlis

NUGRIEBTO PIENO MILTELIALI KIEKYBINIS FOSFATIDILSERINO IR FOSFATIDILETANOLAMINO  
NUSTATYMAS**Metodas – atvirkštinių fazių efektyvioji skysčių chromatografija (HPLC)**

## 1. TIKSLAS IR TAIKYMO SRITIS

Šio metodo apraše apibūdinama fosfatidilserino (FS) ir fosfatidiletanolamino (FE) kiekybinio nustatymo nugriebto pieno milteliuose (NPM) procedūra, kuri tinka NPM esančioms pasukų sausosioms medžiagoms nustatyti.

## 2. APIBRĖŽTIS

FS + FE kiekis – medžiagos masės dalis, nustatoma taikant čia aprašytą procedūrą. Rezultatas išreiškiamas dipalmitoilfosfatidiletanolamino (DPFE) miligramais 100 gramų miltelių.

## 3. METODO ESMĖ

Aminofosfolipidai, esantys iš pieno miltelių gautame piene, ekstrahuojami metanoliu. FS ir FE, kaip *o*-ftalio rūgšties dialdehido (OFA) dariniai, aptinkami atvirkštinių fazių (RP) HPLC, naudojant fluorescencinį detektorių. FS ir FE kiekis mėginyje nustatomas pagal etaloninį mėginį, kuriame yra žinomas DPFE kiekis.

## 4. REAGENTAI

Naudojami tik patvirtinti analiziškai grynai reagentai. Jei nenurodyta kitaip, naudojamas distiliuotas arba bent tokio pat grynumo vanduo.

4.1. **Etaloninė medžiaga – DPFE, ne mažesnio kaip 99 % grynumo**

*Pastaba.* Etaloninė medžiaga laikoma – 18 °C temperatūroje.

4.2. **Reagentai etaloniniam ir tiriamajam mėginiam ruošti**

4.2.1. HPLC grynumo metanolis

4.2.2. HPLC grynumo chloroformas

4.2.3. Triptamino monohidrochloridas

4.3. **Reagentai *o*-ftalio rūgšties dialdehido dariniams gauti**

4.3.1. Natrio hidroksidas, 12 mol/l vandeninis tirpalas

4.3.2. Boro rūgštis, 0,4 mol/l vandeninis tirpalas, natrio hidroksidu pašarmintas iki pH 10,0 (4.3.1)

4.3.3. 2-merkaptoetanolis

4.3.4. *o*-ftalio rūgšties dialdehidas (OFA)

4.4. **HPLC eliuavimo tirpikliai**

4.4.1. Eliuavimo tirpikliai ruošiami naudojant HPLC grynumo reagentus.

4.4.2. HPLC grynumo vanduo

4.4.3. Fluorimetriniu detektoriumi patikrinto grynumo metanolis

4.4.4. Tetrahidrofuranas

4.4.5. Natrio dihidrofosfatas

4.4.6. Natrio acetatas

4.4.7. Acto rūgštis.

**5. APARATŪRA**

- 5.1. **Analizinės svarstyklės, kuriomis galima sverti 1 mg tikslumu ir mažiausias skaitomas rodmuo 0,1 mg.**
- 5.2. **Cheminės stiklinės, 25 ir 100 ml talpos**
- 5.3. **Pipetės, 1 ir 10 ml**
- 5.4. **Magnetinė maišyklė**
- 5.5. **Graduotos pipetės, 0,2, 0,5 ir 5 ml**
- 5.6. **Matavimo kolbos, 10, 50 ir 100 ml talpos**
- 5.7. **Švirkštai, 20 ir 100 µl talpos**
- 5.8. **Ultragarsinė vonelė**
- 5.9. **Centrifuga, galinti išvystyti 27 000 g išcentrinę jėgą**
- 5.10. **Stikliniai buteliukai, maždaug 5 ml talpos**
- 5.11. **Graduotas cilindras, 25 ml talpos**
- 5.12. **pH-metras, kurio tikslumas 0,1 pH vieneto**
- 5.13. **HPLC įranga**
  - 5.13.1. *Judančiosios fazės gradiento formavimo sistema, kurios našumas 1,0 ml/min., esant 200 barų slėgiui*
  - 5.13.2. *Automatinis ėmiklis, kuriame galima sintetinti darinius*
  - 5.13.3. *Kolonėlės šildytuvai, kuriuo galima palaikyti 30 °C ± 1 °C kolonėlės temperatūrą*
  - 5.13.4. *Fluorescencinis detektorius, galintis veikti esant 330 nm sužadavimo bangos ilgiui ir 440 nm emisijos bangos ilgiui*
  - 5.13.5. *Integratorius arba duomenų apdorojimo programinė įranga smailės plotui išmatuoti*
  - 5.13.6. *Kolonėlė „LiChrospher® – 100“ (250 × 4,6 mm) arba lygiavertė kolonėlė, įkrova – oktadecilsilanas (C 18), dalelių dydis – 5 µm.*

**6. MĖGINIŲ ĖMIMAS**

Mėginiai imami laikantis ISO 707 standarto.

**7. PROCEDŪRA****7.1. Vidinio etaloninio tirpalo ruošimas**

- 7.1.1. Į 100 ml matavimo kolbą (5.6) pasverama 30,0 ± 0,1 mg triptamino monohidrochlorido (4.2.3) ir praskiedžiama metanolium (4.2.1) iki žymės.
- 7.1.2. 0,15 mmol/l koncentracijos triptamino tirpalui gauti, 1 ml šio tirpalo pipete (5.3) įpilama į 10 ml matavimo kolbą (5.6) ir praskiedžiama metanolium (4.2.1) iki žymės.

**7.2. Tiriamojo mėginio tirpalo ruošimas**

- 7.2.1. Į 25 ml cheminę stiklinę (5.2) pasverama 1,000 g ± 0,001 g NPM mėginio. Pipete (5.3) įpilama 10 ml iki 40 °C ± 1 °C pašildyto distiliuoto vandens ir 30 min. maišoma magnetine maišykle (5.4), kad neliktų jokių neištirpusių gumuliukų.
- 7.2.2. Į 10 ml matavimo kolbą (5.6) pipete (5.5) įlašinama 0,2 ml iš miltelių gauto pieno, švirkštu (5.7) įšvirkščijama 100 µl 0,15 mmol/l triptamino tirpalo (7.1) ir skiedžiama metanolium (4.2.1) iki žymės. Kruopščiai sumaišoma, vartant kolbą, ir 15 min. apdorojama ultragarsu (5.8).
- 7.2.3. Centrifuguojama (5.9) 10 min., esant 27 000 g, ir supernatantas supilamas į stiklinį buteliuką (5.10).

Pastaba. Tiriamojo mėginio tirpalas iki HPLC analizės turi būti laikomas 4 °C temperatūroje.

**7.3. Išorinio etaloninio tirpalo ruošimas**

7.3.1. Į 50 ml matavimo kolbą (5.6) pasveriamą 55,4 mg DPFE (4.1) ir graduotu cilindru (5.11) įpilama apie 25 ml chloroformo (4.2.2). Kolba užkemšama kamščiu ir pašildoma iki 50 °C ± 1 °C, tada atsargiai maišoma tol, kol ištirpsta DPFE. Kolba atvėsinama iki 20 °C, įpilama metanolio (4.2.1) iki žymės ir, vartant kolbą, sumaišoma.

7.3.2. 1 ml šio tirpalo pipete (5.3) įpilama į 100 ml matavimo kolbą (5.6) ir skiedžiama metanolio (4.2.1) iki žymės. 1 ml šio tirpalo pipete (5.3) įpilama į 10 ml matavimo kolbą (5.6), įšvirškčiama (5.7) 100 µl 0,15 mmol/l triptamino tirpalo (7.1) ir skiedžiama metanolio (4.2.1) iki žymės. Vartant kolbą, tirpalas sumaišomas.

Pastaba. Iki HPLC analizės etaloninis tirpalas turi būti laikomas 4 °C temperatūroje.

**7.4. Reagento dariniui gauti ruošimas**

Į 10 ml matavimo kolbą (5.6) pasveriamą 25,0 ± 0,1 mg OFA (4.3.4), pipete (5.5) įlašinama 0,5 ml metanolio (4.2.1) ir atsargiai maišoma tol, kol OFA ištirpsta. Skiedžiama iki žymės boro rūgšties tirpalu (4.3.2) ir švirškštu (5.7) įšvirškčiama 20 µl 2-merkaptioetanolio (4.3.3).

Pastaba. Reagentas dariniui gauti turėtų būti laikomas rudo stiklo butelyje 4 °C temperatūroje ir išlieka stabilus vieną savaitę.

**7.5. Nustatymas HPLC metodu****7.5.1. Eliuavimo tirpikliai (4.4)**

Tirpiklis A: 0,3 mmol/l natrio dihidrofosfato ir 3 mmol/l natrio acetato tirpalas (acto rūgštimi parūgštintas iki pH 6,5 ± 0,1); metanolis: tetrahidrofuranas = 558: 440: 2 (tūrio dalimis).

Tirpiklis B: metanolis.

**7.5.2. Rekomenduojamas išplovimo gradientas:**

Laikas (min)	Tirpiklis A (%)	Tirpiklis B (%)	Srautas (ml/min.)
Pradinis	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

Pastaba. Norint gauti 1 paveiksle pavaizduotą skyrą, išplovimo gradientą gali tekti šiek tiek pakeisti.

Kolonėlės temperatūra: 30 °C.

7.5.3. Įpurškiamas tūris: 50 µl reagento dariniui gauti ir 50 µl mėginio tirpalo.

7.5.4. Kolonėlės išlyginimas

Kasdien paleidžiant sistemą kolonėlė 15 min. plaunama grynu tirpikliu B, tada nustatomas A:B = 40:60 santykis ir lyginama 15 min. (srautas – 1 ml/min.). Atliekamas tuščiasis bandymas įšvirksčiant metanolio (4.2.1).

*Pastaba.* Jei kolonėlė nebus naudojama ilgesnį laiką, ji 30 min. plaunama metanolio ir chloroformo mišiniu, kurio santykis 80: 20 (tūrio dalimis).

7.5.5. FS + FE kiekio nustatymas tiriamajame mėginyje

7.5.6. Vienodai sulaikymo trukmei gauti vienodais laiko tarpais atliekamos kelios chromatografinės analizės iš eilės. Kas 5–10 tiriamųjų mėginių tirpalų švirksčių įšvirksčiamas išorinio etalono tirpalas (7.3) atsako koeficientui apskaičiuoti.

*Pastaba.* Atlikus 20–25 analizes kolonėlė mažiausiai 30 min. plaunama grynu tirpikliu B (7.5.1).

7.6. **Integravimo būdas**

7.6.1. DPFE smailė

DPFE išplaunamas kaip viena smailė. Smailės plotas nustatomas integravimu tarp įdubų.

7.6.2. Triptamino smailė

Triptaminas išplaunamas kaip viena smailė (1 paveikslas). Smailės plotas nustatomas integravimu tarp įdubų.

7.6.3. FS ir FE smailių grupės

Aprašytais sąlygomis (1 paveikslas) FS išplaunamas kaip dvi iš dalies neatsiskyrusios smailės, prieš kurias yra mažesnė smailė. FE išplaunamas kaip trys iš dalies neatsiskyrusios smailės. Visas kiekvienos smailių grupės plotas nustatomas nubrėžus bazinę liniją, kaip pavaizduota 1 paveiksle.

8. SKAIČIAVIMAI IR REZULTATŲ PATEIKIMAS

FS ir FE kiekis tiriamajame mėginyje apskaičiuojamas pagal formulę:

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

čia:

C – FS arba FE kiekis tiriamajame mėginyje (mg/100 g miltelių),

A<sub>1</sub> – etaloninio tirpalo (7.3) DPFE smailės plotas,

A<sub>2</sub> – tiriamojo mėginio tirpalo (7.2) FS arba FE smailės plotas,

T<sub>1</sub> – etaloninio tirpalo (7.3) triptamino smailės plotas,

T<sub>2</sub> – tiriamojo mėginio tirpalo (7.2) triptamino smailės plotas.

9. METODO TIKSLUMAS

*Pastaba.* Pakartojamumo vertės apskaičiuotos pagal tarptautinį IDF standartą (\*).

9.1. **Pakartojamumas**

Santykinio standartinio pakartojamumo nuokrypio, kuris išreiškia nepriklausomų analizės rezultatų, kurie per trumpą laiką to paties analitiko, naudojant tą pačią aparatūrą tam pačiam mėginiui tirti, gaunami vienodomis sąlygomis toje pačioje laboratorijoje, kintamumą, santykinė vertė neturėtų būti didesnė kaip 2 %. Jei šiomis sąlygomis buvo gauti dviejų analizų rezultatai, santykinis jų skirtumas neturėtų būti didesnis kaip 6 % rezultatų aritmetinio vidurkio.

9.2. **Atkuriamumas**

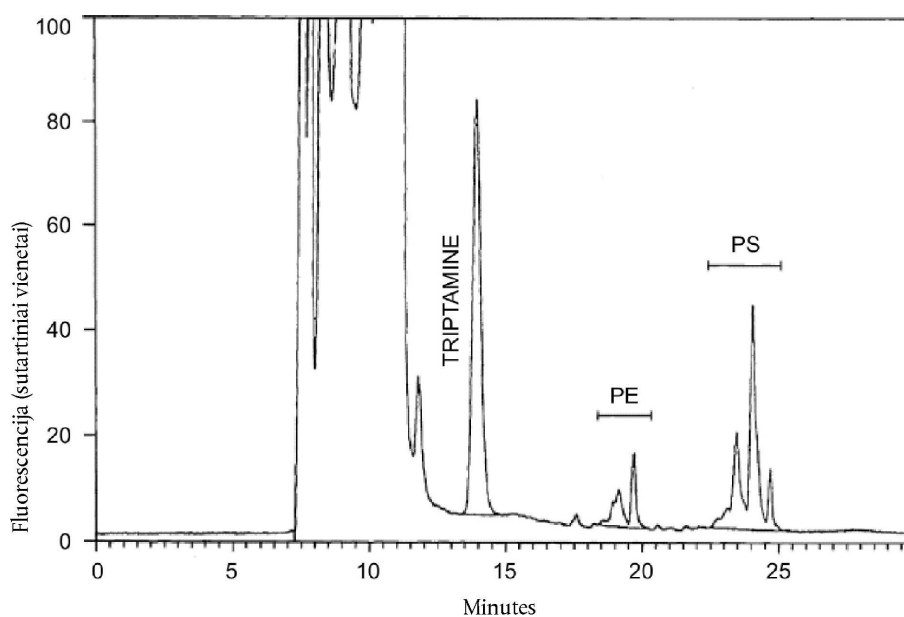
Jei skirtingose laboratorijose, naudodami skirtingą aparatūrą skirtingomis to paties mėginio analizės sąlygomis, analitikai gavo du rezultatus, santykinis jų skirtumas neturėtų būti didesnis kaip 11 % rezultatų aritmetinio vidurkio.

## 10. NUORODOS

- 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).

1 paveikslas

**Fosfatidilserino (FS) ir fosfatidiletanolamino (FE), esančių iš nugriebto pieno miltelių gauto pieno metanoliniame ekstrakte, OFA darinių HPLC vaizdas. Pateiktas FS, FE ir triptamino (vidinio etalono) smailių integravimo būdas.**





## II priedėlis

**FERMENTINIŲ IŠRŪGŲ APTIKIMAS VIEŠAJAM SANDĖLIAVIMUI SKIRTUOSE NUGRIEBTO PIENO MILTELIUOSE NUSTATANT KAZEINO MAKROPEPTIDŲ KIEKĮ EFEKTYVIOSIOS SKYSČIŲ CHROMATOGRAFIJOS (HPLC) METODU**

## 1. TAIKYMO SRITIS

Šiuo metodu nustatant kazeino makropeptidų kiekį galima aptikti fermentines išrūgas viešajam sandėliavimui skirtuose nugriebto pieno milteliuose.

## 2. NUORODA

Tarptautinis standartas ISO 707 „Pienas ir pieno produktai. Mėginių ėmimo nurodymai“.

## 3. APIBRĖŽTIS

Fermentinių išrūgų sausųjų medžiagų kiekis – masės procentais išreikštas kazeino makropeptidų kiekis, nustatytas taikant aprašytą procedūrą.

## 4. METODO ESMĖ

— Nugriebto pieno miltelių ištirpinimas, riebalų ir baltymų nusodinimas trichloracto rūgštimi ir atskyrimas centrifuguojant arba filtruojant.

— Kazeino makropeptidų (CMP) kiekio nustatymas supernatante efektyviosios skysčių chromatografijos metodu (HPLC).

— Tiriant mėginius gautų rezultatų įvertinimas, lyginant juos su etaloniniais mėginiais, gautais iš nugriebto pieno miltelių pridedant žinomą procentinę kiekį išrūgų miltelių arba jų nepridedant.

## 5. REAGENTAI

Naudojami tik patvirtinti analiziškai grynai reagentai. Naudojamas distiliuotas ar bent tokio paties grynumo vanduo.

5.1. **Trichloracto rūgšties tirpalas**

240 g trichloracto rūgšties ( $\text{CCl}_3\text{COOH}$ ) ištirpinama vandenyje ir skiedžiama iki 1 000 ml. Tirpalas turėtų būti skaidrus ir bespalvis.

5.2. **Eliuento tirpalas, pH 6,0**

1,74 g dikalio hidrofosfato ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), 12,37 g kalio dihidrofosfato ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) ir 21,41 g natrio sulfato ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) ištirpinama maždaug 700 ml vandens. Jei reikia, fosforo rūgšties arba kalio hidroksido tirpalu pH sureguliuojamas iki 6,0.

Skiedžiama vandeniu iki 1 000 ml ir sumaišoma.

*Pastaba.* Eliuento sudėtis gali būti keičiama, kad atitiktų standartų sertifikatą arba kolonėlės įkrovos medžiagos gamintojo rekomendacijas.

Prieš naudojimą eliuentų tirpalai filtruojami per membranių filtrą, kurio porų skersmuo 0,45  $\mu\text{m}$ .

5.3. **Plovimo tirpiklis**

Maišoma viena acetonitrilo ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ) tūrio dalis ir devynios vandens tūrio dalys. Prieš naudojant mišinys filtruojamas per membranių filtrą, kurio porų skersmuo – 0,45  $\mu\text{m}$ .

*Pastaba.* Gali būti naudojamas ir kitas baktericidinis plovimo tirpiklis, jei jis neblogina kolonėlės skiriamosios gebos.

5.4. **Etaloniniai mėginiai**

5.4.1. *Nugriebto pieno milteliai, atitinkantys šiame reglamente nustatytus reikalavimus (t. y. [0])*

5.4.2. *Tie patys nugriebto pieno milteliai, falsifikuoti 5 % (masės) etaloniškos sudėties fermentinių išrūgų miltelių (t. y. [5])*

6. APARATŪRA
- 6.1. **Analizinės svarstyklės**
- 6.2. **Bet kokio tipo centrifuga, kuria galima išvystyti 2 200 g išcentrinę jėgą, su maždaug 50 ml talpos centrifugavimo mėgintuvėliais su kamšteliais arba dangteliais**
- 6.3. **Mechaninė purtyklė**
- 6.4. **Magnetinė maišyklė**
- 6.5. **Stikliniai piltuvai, skersmuo – apie 7 cm**
- 6.6. **Filtravimo popierius, vidutinio tankio, skersmuo – apie 12,5 cm**
- 6.7. **Filtravimo per stiklinį filtrą įrangą su 0,45 µm porų skersmens membraniniu filtru**
- 6.8. **10 ml talpos graduotos pipetės (ISO 648 A klasė arba ISO/R 835) arba dozavimo sistema, galinti tiekti 10,0 ml per dvi minutes**
- 6.9. **Dozavimo sistema, galinti tiekti 20,0 ml maždaug 50 °C temperatūros vandens**
- 6.10. **Termostatinė vandens vonelė, palaikanti 25 ± 0,5 °C temperatūrą**
- 6.11. **HPLC įranga, kurią sudaro:**
  - 6.11.1. Siurblys
  - 6.11.2. Injektorius, rankinis arba automatinis, 15–30 µl talpos
  - 6.11.3. Dvi nuosekliai sujungtos kolonėlės TSK 2 000-SW (ilgis – 30 cm, vidinis skersmuo – 0,75 cm) arba lygiavertės kolonėlės (pvz., viena „TSK 2 000-SWxl“, viena „Agilent Technologies Zorbax GF 250“) ir prieškolonėlė (3 cm × 0,3 cm), užpildytos I 125 arba tokio paties veiksmingumo medžiaga
  - 6.11.4. Termostatinė kolonelių krosnis, palaikanti 35 ± 1 °C temperatūrą
  - 6.11.5. Keičiamo bangos ilgio UV detektorius, kuriuo galima matuoti esant 205 nm bangos ilgiui ir 0,008 Å jautriui
  - 6.11.6. Integratorius, kuriuo galima integruoti tarp įdubų

Pastaba. Dirbti su kolonėlėmis, kurios laikomos kambario temperatūroje, galima, tačiau jų skiriamoji geba bus šiek tiek mažesnė. Tokiu atveju atliekant bet kurią analizę seriją, temperatūra neturėtų svyruoti daugiau kaip ± 5 °C.
7. MĖGINIŲ ĖMIMAS
- 7.1. Mėginiai imami laikantis tarptautiniame standarte ISO 707 nustatytos procedūros. Tačiau valstybės narės gali taikyti kitą mėginių ėmimo metodą, jei jis atitinka nurodyto standarto principus.
- 7.2. Mėginiai laikomi tokiomis sąlygomis, kuriomis jie nebūtų sugadinti arba nepakistų jų sudėtis.
8. PROCEDŪRA
- 8.1. **Tiriamąjo mėginio ruošimas**

Pieno milteliai suberiami į maždaug dvigubai didesnio tūrio nei miltelių tūris indą su orui sandariu dangčiu. Dangtis tuoj pat uždaromas. Pieno milteliai gerai sumaišomi kelis kartus apverčiant indą.
- 8.2. **Tiriamoji mėginio dalis**

Į centrifugavimo mėgintuvėlį (6.2) arba tinkamą užkemšamą kolbą (50 ml) pasveriami 2,000 ± 0,001 g tiriamojo mėginio.
- 8.3. **Riebalų ir baltymų pašalinimas**
  - 8.3.1. Į tiriamąjį mėginį įpilama 20,0 ml šilto (50 °C) vandens. Milteliai ištirpinami purtant penkias minutes mechanine purtykle (6.3). Mėgintuvėlis dedamas į vandens vonelę (6.10) 25 °C pusiausvyrinei temperatūrai pasiekti.

8.3.2. Per dvi minutes supilama 10,0 ml maždaug 25 °C temperatūros trichloracto rūgšties tirpalo (5.1), stipriai maišant magnetine maišykle (6.4). Mėgintuvėlis dedamas į vandens vonelę (6.10) ir paliekamas 60 min.

8.3.3. Centrifuguojama (6.2) esant 2 200 g išcentrinei jėgai 10 minučių arba filtruojama per filtravimo popierių (6.6). Pirmieji 5 ml filtrato išpilami.

#### 8.4. Chromatografinis nustatymas

8.4.1. Nuo 15 iki 30  $\mu$ l tiksliai išmatuoto supernatanto arba filtrato (8.3.3) įšvirškčiama į HPLC aparatą (6.11), kuris veikia esant 1,0 ml per minutę eliuento tirpalo (5.2) srautui.

1 pastaba. Atsižvelgiant į naudojamų kolonelių vidinį skersmenį arba į kolonėlės gamintojo instrukcijas gali būti nustatomas kitoks srautas.

2 pastaba. Darant pertrauką, kolonėlės reikia praplauti vandeniu. Jokiu būdu negalima palikti jose eliuento tirpalo (5.2).

Darant ilgesnę nei 24 valandų pertrauką, kolonėlės reikia praplauti vandeniu, po to mažiausiai tris valandas plauti plovimo tirpalu (5.3), nustačius 0,2 ml per minutę srautą.

8.4.2. Mėginio [E] chromatografinės analizės rezultatai užrašomi kaip chromatograma, kurios kiekviena smailė identifikuojama pagal sulaikymo trukmę RT taip:

II smailė:	antroji chromatogramos smailė, kurios RT yra apie 12,5 min.
III smailė:	trečioji chromatogramos smailė, atitinkanti CMP, kurios RT yra 15,5 min.

Pasirinkta (-os) kolonėlė (-ės) gali labai paveikti atskirų smailių sulaikymo trukmės vertes.

Integratorius (6.11.6) automatiškai apskaičiuoja kiekvienos smailės plotą A:

$A_{II}$ –	II smailės plotas,
$A_{III}$ –	III smailės plotas.

Prieš atliekant kiekybinį duomenų įvertinimą labai svarbu išnagrinėti kiekvienos chromatogramos išvaizdą, kad būtų galima aptikti visus neįprastus rezultatus dėl netinkamo aparatūros arba kolonelių veikimo arba analizuojamo ėminio kilmės ir tipo.

Jei kyla abejonių, analizė kartojama.

#### 8.5. Kalibravimas

8.5.1. Etaloniniams mėginiams (5.4) tiksliai taikoma 8.2–8.4.2 punktuose aprašyta procedūra.

Naudojami tik ką paruošti tirpalai, nes būdami 8 % trichloracto rūgšties tirpale CMP skyla. Esant 30 °C temperatūrai, skilimo sparta yra 0,2 % per valandą.

8.5.2. Prieš mėginių chromatografinę analizę kolonėlės kondicionuojamos, kelis kartus įšvirškčiant etaloninio mėginio (5.4.2) tirpalą (8.5.1) tol, kol gaunamas pastovus CMP atitinkančios smailės plotas ir sulaikymo trukmė.

8.5.3. Atsako koeficientai R nustatomi įšvirškčiant tokį pat tūrį filtratų (8.5.1), kaip ir naudotas mėginių tūris.

#### 9. REZULTATŲ PATEIKIMAS

##### 9.1. Apskaičiavimo metodas ir formulės

9.1.1. Atsako koeficientų R apskaičiavimas:

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

čia:

$R_{II}$  – II smailių atsako koeficientai,

$A_{II}[0]$  – etaloninio mėginio [0] II smailių plotai, gauti vykdant 8.5.3. punktą.

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

čia:

- $R_{III}$  – III smailės atsako koeficientai,  
 $A_{III}[0]$  ir  $A_{III}[5]$  – etaloninių mėginių [0] ir [5] III smailės plotai, gauti vykdant 8.5.3 punktą,  
 $W$  – išrūgų kiekis etaloniniame mėginyje [5], t. y. 5.

9.1.2. *Mėginio [E] smailių santykinio ploto apskaičiavimas*

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

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

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

čia:

- $S_{II}[E]$ ,  $S_{III}[E]$ ,  $S_{IV}[E]$  – mėginio [E] atitinkamų II, III ir IV smailių santykiniai plotai,  
 $A_{II}[E]$ ,  $A_{III}[E]$  – mėginio [E] atitinkamų II ir III smailių plotai, gauti vykdant 8.4.2 punktą,  
 $R_{II}$ ,  $R_{III}$  – atsako koeficientai, apskaičiuoti pagal 9.1.1 punktą.

9.1.3. *Mėginio [E] III smailės santykinės sulaikymo trukmės apskaičiavimas:*

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

čia:

- $RRT_{III}[E]$  – mėginio [E] III smailės santykinė sulaikymo trukmė,  
 $RT_{III}[E]$  – mėginio [E] III smailės sulaikymo trukmė, gauta vykdant 8.4.2 punktą,  
 $RT_{III}[5]$  – kontrolinio mėginio [5] III smailės sulaikymo trukmė, gauta vykdant 8.5.3 punktą.

9.1.4. *Tyrimais nustatyta, kad III smailės santykinę sulaikymo trukmę, t. y.  $RRT_{III}[E]$ , ir išrūgų miltelių, kurių įdėta ne daugiau kaip 10 %, kiekį sieja tiesinė priklausomybė*

—  $RRT_{III}[E]$  yra  $< 1,000$ , kai išrūgų kiekis  $> 5$  %,

—  $RRT_{III}[E]$  yra  $\geq 1,000$ , kai išrūgų kiekis  $\leq 5$  %.

$RRT_{III}$  vertėms leidžiama neapibrėžtis yra  $\pm 0,002$ .

Paprastai  $RRT_{III}[0]$  vertė nedaug skiriasi nuo 1,034. Atsižvelgiant į kolonėlių būklę, ši vertė gali priartėti prie 1,000, tačiau ji visuomet turi būti didesnė už vienetą.

9.2. **Fermentinių išrūgų miltelių procentinio kiekio mėginyje apskaičiavimas:**

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

čia:

- $W$  – fermentinių išrūgų kiekis mėginyje [E] masės procentais,  
 $S_{III}[E]$  – mėginio [E] III smailės santykinis plotas, gautas vykdant 9.1.2 punktą,  
1,3 – atitinka vidutinį santykinį II smailės plotą, išreikštą fermentinių išrūgų gramais 100 g miltelių ir nustatytą įvairios kilmės nefalsifikuotiems nugriebto pieno milteliams. Šis skaičius nustatytas bandymais,  
 $S_{III}[0]$  – atitinka III smailės santykinį plotą, kuris yra lygus  $R_{III} \times A_{III}[0]$ . Šios vertės gaunamos vykdant atitinkamai 9.1.1 ir 8.5.3 punktus,  
 $(S_{III}[0] - 0,9)$  – atitinka pataisą, kuri turi būti padaryta santykiniam vidutiniam plotui 1,3, kai  $S_{III}[0]$  nėra lygus 0,9. Bandymais nustatyta, kad vidutinis santykinis kontrolinio mėginio [0] III smailės plotas lygus 0,9.

### 9.3. Procedūros tikslumas

#### 9.3.1. Pakartojamumas

Dviejų analizių rezultatų, kuriuos vienas analitikas gavo vienu metu arba per trumpą laiką ta pačia aparatūra tirdamas tą pačią bandomąją medžiagą, skirtumas neturi būti didesnis kaip 0,2 % (masės).

#### 9.3.2. Atkuriamumas

Dviejų atskirų nepriklausomų rezultatų, gautų tą pačią bandomąją medžiagą tiriant dviejose skirtingose laboratorijose, skirtumas neturi būti didesnis kaip 0,4 % (masės).

### 9.4. Aiškinimas

- 9.4.1. Jei III smailės santykinis plotas  $S_{III}$  [E], išreikštas fermentinių išrūgų gramais 100 g produkto, yra  $\leq 2,0 + (S_{III}[0] - 0,9)$ , daroma prielaida, kad išrūgų nėra.

Čia:

2,0	didžiausias galimas santykinis III smailės plotas, atsižvelgiant į santykinį vidutinį III smailės plotą, t. y. 1,3, neapibrėžtumą dėl nugriebto pieno miltelių sudėties kitimo ir metodo atkuriamumą (9.3.2),
$(S_{III}[0] - 0,9)$	pataisa, kuri daroma, kai plotas $S_{III}[0]$ nėra lygus 0,9 (žr. 9.2 punktą).

- 9.4.2. Jei III smailės santykinis plotas  $S_{III}$  [E] yra  $> 2,0 + (S_{III}[0] - 0,9)$  ir II smailės santykinis plotas  $S_{II}$  [E]  $\leq 160$ , fermentinių išrūgų kiekis nustatomas taip, kaip nurodyta 9.2 punkte.

- 9.4.3. Jei III smailės santykinis plotas  $S_{III}$  [E] yra  $> 2,0 + (S_{III}[0] - 0,9)$  ir II smailės santykinis plotas  $S_{II}$  [E]  $\leq 160$ , nustatomas suminis baltymų kiekis (P %); vėliau nagrinėjami 1 ir 2 grafikai.

- 9.4.3.1. 1 ir 2 grafikuose apibendrinti duomenys, gauti išanalizavus nefalsifikuotus didelį suminį baltymų kiekį turinčių nugriebto pieno miltelių mėginius.

Ištisine linija pavaizduota tiesinė regresija, kurios koeficientai apskaičiuoti mažiausių kvadratų metodu.

Punktyrinė tiesi linija žymi viršutinę III smailės santykinio ploto ribą, kuri 90 % atvejų nebus viršyta.

1 ir 2 grafikuose punktyrinės tiesios linijos nubrėžtos pagal šias formules:

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

čia atitinkamai:

$S_{III}$  – III smailės santykinis plotas, apskaičiuotas pagal suminį baltymų kiekį arba pagal santykinį smailės  $S_{II}$  [E] plotą,

P % – suminis baltymų kiekis masės procentais,

$S_{II}$  [E] – mėginio smailės santykinis plotas, apskaičiuotas pagal 9.1.2 punktą.

Šios formulės atitinka 9.2 punkte aptartą skaičių 1,3.

Nustatyto santykinio ploto  $S_{III}$  [E] ir santykinio ploto  $S_{III}$  skirtumas ( $T_1$  ir  $T_2$ ) išreiškiamas formulėmis:  $T_1 = S_{III}$  [E] - [(0,376 P% - 10,7) + (S<sub>III</sub>[0] - 0,9)]  $T_2 = S_{III}$  [E] - [(0,0123 S<sub>II</sub>[E] + 0,93) + (S<sub>III</sub>[0] - 0,9)]

9.4.3.2. Jei  $T_1$  ir (arba)  $T_2$  yra lygūs nuliui arba mažesni už nulį, fermentinių išrūgų buvimo nustatyti negalima.

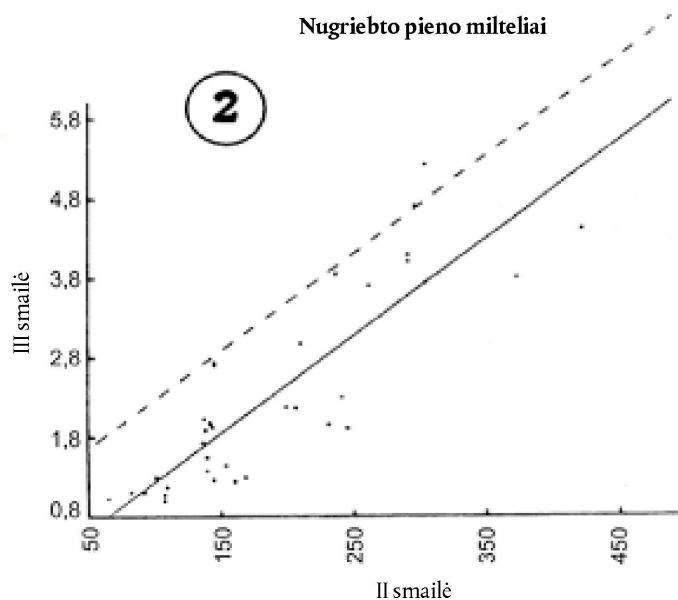
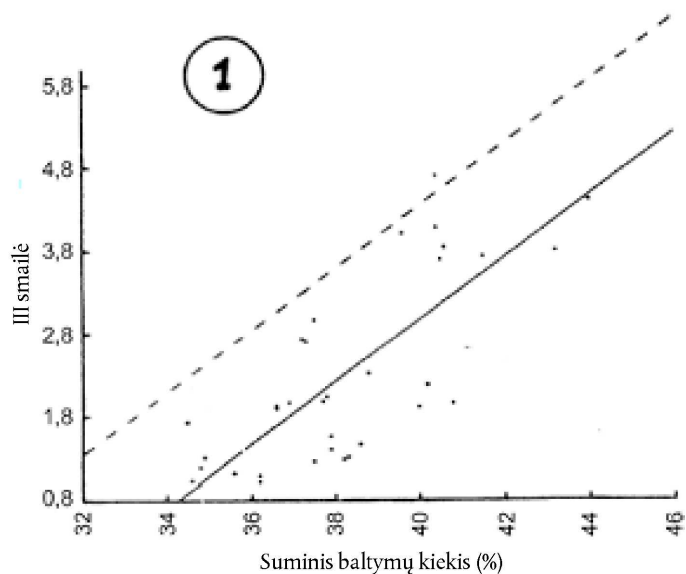
Jei  $T_1$  ir  $T_2$  yra didesni už nulį, fermentinių išrūgų yra.

Fermentinių išrūgų kiekis apskaičiuojamas pagal šią formulę:  $W = T_2 + 0,91$ .

Čia:

0,91 – atstumas vertikaloje ašyje tarp ištisinės ir punktyrinės linijų.

#### Nugriebto pieno milteliai



## III priedėlis

**FERMENTINIŲ IŠRŪGŲ SAUSŪJŲ MEDŽIAGŲ KIEKIO NUSTATYMAS NUGRIEBTO PIENO MILTELIUOSE**

1. TIKSLAS: APTIKTI, AR Į NUGRIEBTO PIENO MILTELIUS BUVO PRIDĖTA FERMENTINIŲ IŠRŪGŲ SAUSŪJŲ MEDŽIAGŲ
2. NUORODOS: TARPTAUTINIS STANDARTAS ISO 707
3. APIBRĖŽTIS  
Fermentinių išrūgų sausųjų medžiagų kiekis – kazeino makropeptidų kiekis masės procentais, nustatytas taikant aprašytą procedūrą.
4. METODO ESMĖ  
Mėginiai analizuojami taikant atvirkštinių fazių efektyviosios skysčių chromatografijos procedūrą (HPLC procedūrą), siekiant nustatyti kazeino makropeptido A kiekį. Rezultatai vertinami lyginant su etaloniniais mėginiais, kuriuos sudaro vien tik nugriebto pieno milteliai, kuriuose yra žinomas ir nežinomas procentinis išrūgų miltelių kiekis. Didesnis kaip 1 % (masės) rezultatas rodo, kad produkte yra fermentinių išrūgų sausųjų medžiagų.
5. REAGENTAI  
Naudojami tik patvirtinti analiziškai grynai reagentai. Naudojamas distiliuotas ar bent tokio paties grynumo vanduo. Acetonitrilas turėtų būti spektroskopijai arba HPLC tinkamo grynumo.
- 5.1. **Trichloracto rūgšties tirpalas**  
240 g trichloracto rūgšties ( $\text{CCl}_3\text{COOH}$ ) ištirpinama vandenyje ir skiedžiama iki 1 000 ml. Tirpalas turėtų būti skaidrus ir bespalvis.
- 5.2. **A ir B eliuantai**  
Eliuentas A: į 1 000 ml matavimo kolbą įpilama 150 ml acetonitrilo ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ), 20 ml izopropilo alkoholio ( $\text{CH}_3\text{CHOHCH}_3$ ) ir 1,00 ml trifluoracto rūgšties (TFA,  $\text{CF}_3\text{COOH}$ ). Skiedžiama vandeniu iki 1 000 ml.  
Eliuentas B: į 1 000 ml matavimo kolbą įpilama 550 ml acetonitrilo, 20 ml izopropilo alkoholio ir 1,00 ml TFA. Skiedžiama vandeniu iki 1 000 ml. Prieš naudojimą eliuentų tirpalai filtruojami per membraninį filtrą, kurio porų skersmuo 0,45  $\mu\text{m}$ .
- 5.3. **Kolonėlės laikymas**  
Baigus analizę, kolonėlė praplaunama eliuentu B (naudojant gradientą) ir po to plaunama acetonitrilu (30 minučių naudojant gradientą). Kolonėlė laikoma acetonitrile.
- 5.4. **Etaloniniai mėginiai**
  - 5.4.1. *Viešojo sandėliavimo reikalavimus atitinkantys nugriebto pieno milteliai (t. y. [0]).*
  - 5.4.2. *Tokie patys nugriebto pieno milteliai, falsifikuoti 5 % (masės) etaloninės sudėties fermentinių išrūgų miltelių (t. y. [5]).*
  - 5.4.3. *Tokie patys nugriebto pieno milteliai, falsifikuoti 50 % (masės) etaloninės sudėties fermentinių išrūgų miltelių (t. y. [50]).*
6. APARATŪRA
  - 6.1. **Analizinės svarstyklės**
  - 6.2. **Bet kokio tipo centrifuga, kuria galima išvystyti 2 200 g išcentrinę jėgą, su maždaug 50 ml talpos centrifugavimo mėgintuvėliais su kamšteliais arba dangteliais**
  - 6.3. **Mechaninė purtyklė**
  - 6.4. **Magnetinė maišyklė**
  - 6.5. **Stikliniai piltuvai, skersmuo – apie 7 cm**

- 6.6. **Filtravimo popierius, vidutinio tankio, skersmuo – apie 12,5 cm**
- 6.7. **Filtravimo per stiklinį filtrą įranga su 0,45 µm porų skersmens membraniniu filtru**
- 6.8. **10 ml talpos graduotos pipetės (ISO 648 A klasės arba ISO/R 835) arba dozavimo sistema, galinti tiekti 10,0 ml per dvi minutes**
- 6.9. **Dozavimo sistema, galinti tiekti 20,0 ml maždaug 50 °C temperatūros vandens**
- 6.10. **Termostatinė vandens vonelė, nustatyta palaikyti 25 ± 0,5 °C temperatūrą**
- 6.11. **HPLC įranga, kurią sudaro:**
  - 6.11.1. *Dviejų tirpiklių gradientinė siurbimo sistema*
  - 6.11.2. *Injektorius, rankinio arba automatinio valdymo, 100 µl talpos*
  - 6.11.3. *Kolonėlė „Agilent Technologies Zorbax 300 SB-C3“ (ilgis – 25 cm, vidinis skersmuo – 0,46 cm) arba lygiavertė atvirkštinių fazių kolonėlė su stambiaporio silikagelio įkrova*
  - 6.11.4. *Termostatinė kolonėlių krosnis, nustatyta palaikyti 35 ± 1 °C temperatūrą*
  - 6.11.5. *Keičiamo bangos ilgio UV detektorius, kuriuo būtų galima matuoti esant 210 nm bangos ilgiui (prireikus galima naudoti didesnį bangos ilgį iki 220 nm) ir 0,02 Å jautriui*
  - 6.11.6. *Integratorius, kuriuo galima integruoti pagal bendrąją bazinę liniją arba tarp įdubų*

*Pastaba.* Kolonėlę galima naudoti kambario temperatūroje, jeigu ji nesvyruoja daugiau kaip 1 °C, kitaip gaunami per dideli  $CMP_A$  sulaikymo trukmės svyravimai.

## 7. MĖGINIŲ ĖMIMAS

- 7.1. **Mėginiai imami laikantis tarptautiniame standarte ISO 707 nustatytos procedūros. Tačiau valstybės narės gali taikyti kitą mėginių ėmimo metodą, jei jis atitinka nurodyto standarto principus.**
- 7.2. **Mėginiai laikomi tokiomis sąlygomis, kuriomis jie nebūtų sugadinti arba nepakistų jų sudėtis.**

## 8. PROCEDŪRA

### 8.1. Tiriamojo mėginio ruošimas

Pieno milteliai suberiami į maždaug dvigubai didesnio tūrio nei miltelių tūris indą su orui sandariu dangčiu. Dangtis tuoj pat uždaromas. Pieno milteliai gerai sumaišomi kelis kartus apverčiant indą.

### 8.2. Tiriamoji mėginio dalis

Į centrifugavimo mėgintuvėlį (6.2) arba į tinkamą užkemšamą kolbą (50 ml) pasveriamas  $2,00 \pm 0,001$  g mėginio.

*Pastaba.* Jei analizuojami mišiniai, sveriamas toks mėginio kiekis, kad mėginio, iš kurio pašalinti riebalai, masė atitiktų 2,00 g.

### 8.3. Riebalų ir baltymų pašalinimas

- 8.3.1. *Į tiriamąjį mėginį įpilama 20,0 ml šilto (50 °C) vandens. Milteliai ištirpinami purtant penkias minutes mechanine purtykle (6.3). Mėgintuvėlis dedamas į vandens vonelę (6.10) 25 °C pusiausvyrinei temperatūrai pasiekti.*
- 8.3.2. *Per dvi minutes pastovia sparta supilama maždaug 25 °C temperatūros 10,0 ml trichloracto rūgšties tirpalo (5.1), stipriai maišant magnetine maišykle (6.4). Mėgintuvėlis dedamas į vandens vonelę (6.10) ir paliekamas 60 min.*
- 8.3.3. *Centrifuguojama (6.2) 10 min, esant 2 200 g išcentrinei jėgai, arba filtruojama per filtravimo popierių (6.6). Pirmieji 5 ml filtrato išpilami.*



#### 8.4. Chromatografinis nustatymas

8.4.1. Taikant atvirkštinių fazių HPLC, dėl sudėtyje esančių rūgščiųjų pasukų miltelių nėra galimybės gauti klaidingai teigiamų rezultatų.

8.4.2. Prieš atliekant atvirkštinių fazių HPLC analizę reikia nustatyti optimalias gradiento sąlygas. Gradientinio eliuavimo sistemoms, kurių neveikos tūris (tūris nuo tos vietos, kurioje tirpikliai tiekiami kartu, iki injektoriaus kilpos, įskaitant ir jos tūrį) yra apie 6 ml, optimali  $CMP_A$  sulaikymo trukmė yra  $26 \pm 2$  min. Mažesnio neveikos tūrio (pvz., 2 ml) gradientinių eliuavimo sistemų optimali sulaikymo trukmė turėtų būti 22 min.

Imami etaloninių mėginių (5.4) be fermentinių išrūgų ir su 50 % išrūgų tirpalai.

Į HPLC aparatą, veikiančią 1 lentelėje pateiktomis tiriamojo gradiento sąlygomis, išvirkščiamą 100  $\mu$ l supernatanto arba filtrato (8.3.3).

1 lentelė

#### Tiriamojo gradiento sąlygos chromatografiniai analizei optimizuoti

Trukmė (min.)	Srautas (ml/min.)	% A	% B	Kreivė
Pradinė	1,0	90	10	*
27	1,0	60	40	Tiesinė
32	1,0	10	90	Tiesinė
37	1,0	10	90	Tiesinė
42	1,0	90	10	Tiesinė

Lyginant abi chromatogramas turėtų paaiškėti  $CMP_A$  smailės vieta.

Pagal šią formulę galima apskaičiuoti naudotiną pradinio tirpalo sudėtį, kuri atitinka normalų gradientą (žr. 8.4.3):  $\% B = 10 - 2,5 + (13,5 + (RT_{cmpA} - 26) / 6) * 30 / 27$   $\% B = 7,5 + (13,5 + (RT_{cmpA} - 26) / 6) * 1,11$ .

Čia:

$RT_{cmpA}$  –  $CMP_A$  sulaikymo trukmė, atitinkanti paieškų gradientą

10 – pradinė % B dalis, atitinkanti paieškų gradientą

2,5 – normalaus gradiento viduriniojo taško % B dalis minus pradinė % B dalis

13,5 – vidurinių tašką atitinkanti trukmė, esant tiriamajam gradientui

26 – reikiama  $CMP_A$  sulaikymo trukmė

6 – tiriamojo ir normalaus gradiento nuolydžių santykis

30 – % B esant pradinei trukmei minus % B 27-ą tiriamojo gradiento minutę

27 – tiriamojo gradiento trukmė.

#### 8.4.3. Tiriamųjų mėginių tirpalų ėmimas

100  $\mu$ l tiksliai išmatuoto supernatanto arba filtrato (8.3.3) išvirkščiamą į HPLC aparatą, kuris veikia esant 1,0 ml per minutę eliuento tirpalo (5.2) srautui.

Analizės pradžios eliuento sudėtis gaunama pagal 8.4.2 punktą. Paprastai ji artima santykiui A:B=76:24 (5.2). Iškart po išvirkštimo nustatomas tiesinis gradientas; jam esant po 27 minučių procentinė B dalis padidėja 5 %. Tada nustatomas tiesinis gradientas, kuriam esant per 5 minutes eliuento sudėtyje B dalis padidėja iki 90 %. Ši sudėtis nekeičiama 5 minutes, vėliau, naudojant tiesinį gradientą, per 5 minutes grįžtama iki pradinės sudėties. Priklausomai nuo išsiurbimo sistemos vidinio tūrio kitas išvirkštimas gali būti atliekamas 15 minučių po to, kai pasiekiamos pradinės sąlygos.

1 pastaba.  $CMP_A$  sulaikymo trukmė turėtų būti  $26 \pm 2$  min. Tai gali būti pasiekama keičiant pradines ir galutines pirmojo gradiento sąlygas. Tačiau % B, esant pradinėms ir galutinėms pirmojo gradiento sąlygoms, skirtumas turi likti 5 % B.

2 pastaba. Iš eliuentų reikia pakankamai pašalinti dujas ir palaikyti tokią jų būseną. Tai svarbu siekiant, kad gradientinio eliuavimo siurbimo sistema tinkamai veiktų.  $CMP_A$  smailės sulaikymo trukmės standartinis nuokrypis turėtų būti mažesnis kaip 0,1 min. ( $n = 10$ ).

3 pastaba. Kas penkis mėginius turėtų būti išvirkščijama etaloninio mėginio [5] ir tuo pasinaudojant apskaičiuojamas naujas atsako koeficientas R (9.1.1).

- 8.4.4. Mėginio (E) chromatografinės analizės rezultatai gaunami kaip chromatograma, kurioje  $CMP_A$  smailė identifikuojama pagal maždaug 26 minučių sulaikymo trukmę.

Integratorius (6.11.6) automatiškai apskaičiuoja  $CMP_A$  smailės aukštį H. Reikia patikrinti kiekvienos chromatogramos bazinės linijos vietą. Jei bazinė linija nustatyta netinkamoje vietoje – analizę arba integravimą reikia pakartoti.

Pastaba. Jei  $CMP_A$  smailė yra pakankamai atsiskyrusi nuo kitų smailių, reikėtų naudoti bazinės linijos padėties nustatymą nuo įdubos iki įdubos, kitu atveju naudojami statmenys, nuleisti į bendrąją bazinę liniją, kurios pradžios taškas turėtų būti šalia  $CMP_A$  smailės (taigi ne taške  $t = 0$  min.). Etalonai ir mėginiai turi būti integruojami vienodu būdu ir bendrosios bazinės linijos atveju tikrinama jos atitiktis mėginiams ir etalonui.

Prieš atliekant kiekybinių duomenų įvertinimą labai svarbu išnagrinėti kiekvienos chromatogramos išvaizdą, kad būtų galima aptikti visus neįprastus rezultatus dėl netinkamo aparatūros arba kolonėlės veikimo arba analizuojamo mėginio kilmės ir tipo. Jei kyla abejonių, analizę kartojama.

## 8.5. Kalibravimas

- 8.5.1. Etaloniniams mėginiams (5.4.1 ir 5.4.2 punktai) taikoma 8.2–8.4.4 punktuose aprašyta metodika. Naudojami tik kę paruošti tirpalai, nes kambario temperatūroje, 8 % trichloracto rūgšties tirpale esantys CMP skykla. 4 °C temperatūroje tirpalas išlieka stabilus 24 valandas. Atliekant labai daug analizių, automatiniame injektoriuje pageidautina naudoti šaldomą mėginių laikiklį.

Pastaba. 8.4.2. punktą galima praleisti, jeigu % B pradinėmis sąlygomis yra žinomas iš anksčiau atliktų analizių.

Etaloninio mėginio [5] chromatograma turi atitikti pavaizduotąją 1 paveiksle. Šiame paveiksle prieš  $CMP_A$  smailę yra dvi mažos smailės. Svarbu gauti panašų atskyrimą.

- 8.5.2. Prieš tiriant mėginius chromatografijos būdu išvirkščijama 100 µl etaloninio mėginio be fermentinių išrūgų [0] (5.4.1)

Chromatogramoje neturėtų būti smailės, kurios sulaikymo trukmė atitiktų  $CMP_A$  smailės trukmę.

- 8.5.3. Išvirkščijant tokį pat tūrį filtrato (8.5.1), kaip ir naudotas mėginių tūris, nustatomi atsako koeficientai R.

## 9. REZULTATŲ PATEIKIMAS

### 9.1. Apskaičiavimo metodas ir formulės

- 9.1.1. Atsako koeficiento R apskaičiavimas:

$$CMP_A \text{ smailė: } R = W/H$$

Čia:

R –  $CMP_A$  smailės atsako koeficientas,

H –  $CMP_A$  smailės aukštis,

W – išrūgų kiekis etaloniniame mėginyje [5].

## 9.2. Fermentinių išrūgų miltelių procentinio kiekio mėginyje apskaičiavimas

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

Čia:

$W(E)$  – fermentinių išrūgų kiekis mėginyje (E) masės procentais,

$R$  –  $CMP_A$  smailės atsako koeficientas (9.1.1),

$H(E)$  – mėginio (E)  $CMP_A$  smailės aukštis.

Jeigu  $W(E)$  yra didesnis nei 1 %, o skirtumas tarp mėginio ir etaloninio mėginio [5] sulaikymo trukmės yra mažesnis nei 0,2 minutės, vadinasi fermentinių išrūgų sausųjų medžiagų mėginyje yra.

## 9.3. Procedūros tikslumas

### 9.3.1. Pakartojamumas

Dviejų analizių rezultatų, kuriuos vienas analitikas gavo vienu metu arba per trumpą laiką ta pačia aparatūra tirdamas tą pačią bandomąją medžiagą, skirtumas neturi būti didesnis kaip 0,2 % (masės).

### 9.3.2. Atkuriamumas

Nenustatytas.

### 9.3.3. Tiesiškumas

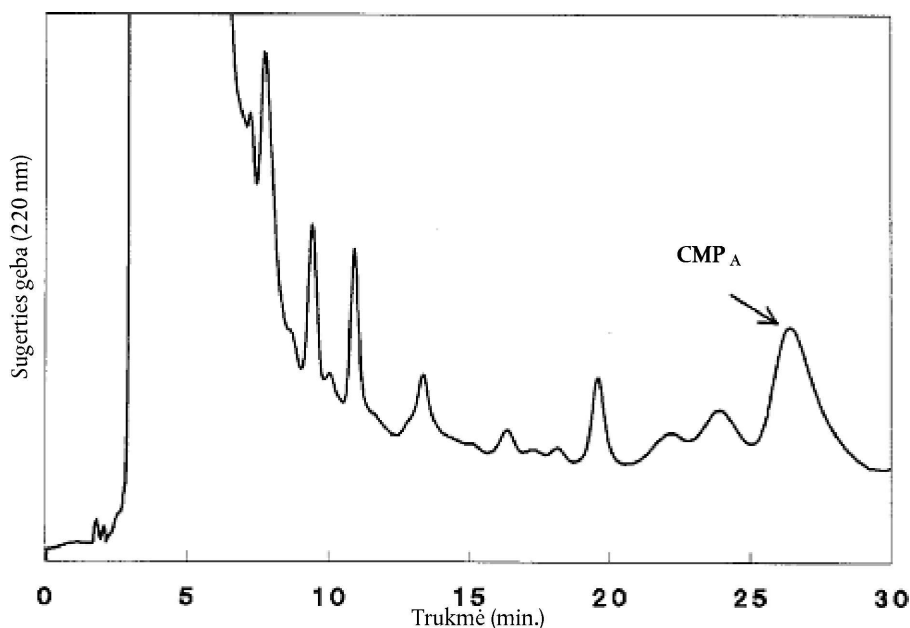
Kai fermentinių išrūgų yra nuo 0 iki 16 procentų, turėtų būti gaunama tiesinė priklausomybė, kurios koreliacijos koeficientas > 0,99.

## 9.4. Aiškinimas

Į 1 % ribinę vertę įeina neapibrėžtis dėl atkuriamumo.

1 paveikslas

Etalonas Ni-4.6



(\*) Tarptautinis IDF standartas 135B/1991. Pienas ir pieno produktai. Analizės metodų preciziškumo charakteristikos. Tarplaboratorinių lyginamųjų tyrimų procedūros apžvalga.

3) Pridedami šie priedai:

„VI PRIEDAS

**Pagal privačiojo sandėliavimo sutartis sandėliuojamo sviesto analizės metodai**

Parametras	Metodas
Riebalai <sup>(1)</sup>	ISO 17189 arba ISO 3727 3 dalis
Vanduo	ISO 3727 1 dalis
Sausosios neriebalinės medžiagos (išskyrus druską)	ISO 3727 2 dalis
Druska	ISO 15648

<sup>(1)</sup> Taikytiną metodą turi patvirtinti mokėjimo agentūra.

VII PRIEDAS

**Pagal privačiojo sandėliavimo sutartis sandėliuojamų nugriebto pieno miltelių analizės metodai**

Parametras	Metodas
Riebalai	ISO 1736
Baltymai	ISO 8968 1 dalis
Vanduo	ISO 5537

## VIII PRIEDAS

**Pagal privačiojo sandėliavimo sutartis sandėliuojamo sūrio analizės metodai**

1. Priedėlyje aprašytas analizės metodas taikomas siekiant užtikrinti, kad sūryje, pagamintame tik iš avių, ožkų ar buivolių pieno arba iš avių, ožkų ir buivolių pieno mišinio, nebūtų karvių pieno kazeino.

Laikoma, kad karvių pieno kazeino yra, jei jo kiekis analizuojamame mėginyje yra lygus priedėlyje nurodytame etaloniniame mėginyje, kuriame yra 1 % karvių pieno, esančiam kiekiui arba už jį didesnis.

2. Karvių pieno kazeino aptikimo 1 dalyje nurodytuose sūriuose metodai gali būti taikomi tik jei atitinkamos visos šios sąlygos:
  - a) aptikimo riba yra ne didesnė kaip 0,5 %;
  - b) nėra klaidingai teigiamų rezultatų;
  - c) karvių pieno kazeinas aptinkamas esant reikiamam jautrumui netgi po ilgų brandinimo laikotarpių, kaip gali pasitaikyti įprastinėmis prekybos sąlygomis.

Jei kuri nors iš pirmiau nurodytų sąlygų neišpildoma, taikomi priedėlyje nurodyti metodai.

---

## Priedėlis

**KARVIŲ PIENO IR KAZEINATO APTIKIMO SŪRIUOSE, PAGAMINTUOSE IŠ AVIŲ, OŽKŲ ARBA BUIVOLIŲ PIENO ARBA AVIŲ, OŽKŲ IR BUIVOLIŲ PIENO MIŠINIŲ, METODAS**

## 1. ESMĖ

Karvių pieno ir kazeinato aptikimas sūriuose, pagamintuose iš avių pieno, ožkų pieno ir buivolių pieno arba avių, ožkų ir buivolių pieno mišinių, taikant izoelektrinį  $\gamma$ -kazeinų fokusavimą po skaidymo plazminu.

## 2. TAIKYMO SRITIS

Metodas tinka, kai reikia jautraus ir specifinio metodo natūraliam ir termiškai apdorotam karvių pienui ir kazeinatui aptikti šviežiuose ir brandintuose sūriuose, pagamintuose iš avių, ožkų ir buivolių pieno arba avių, ožkų ir buivolių pieno mišinių. Jis netinka norint nustatyti, ar falsifikuojant į pieną ir sūrį yra pridėta termiškai apdorotų karvių pieno išrūgų baltymų koncentratų.

## 3. METODO ESMĖ

3.1. **Kazeinų išskyrimas iš sūrio ir pamatinių etalonų**3.2. **Gautų kazeinų tirpinimas ir skaidymas plazminu (EC.3.4.21.7)**3.3. **Plazminu apdorotų kazeinų izoelektrinis fokusavimas karbamido aplinkoje ir baltymų dažymas**3.4. **Nudažytų  $\gamma_3$  ir  $\gamma_2$  kazeinų frakcijų elektroforegramų įvertinimas (karvių pieno buvimo mėginyje įrodymas), lyginant tame pačiame gelyje gautas tiriamojo mėginio ir pamatinių etalonų, kuriuose yra 0 % ir 1 % karvių pieno, elektroforegramas.**

## 4. REAGENTAI

Jei nenurodyta kitaip, naudojamos analiziškai grynos cheminės medžiagos. Vanduo turi būti du kartus distiliuotas arba tokio paties grynumo.

*Pastaba.* Šie duomenys taikomi laboratorijoje pagamintiems poliakrilamido geliams su karbamiu, kurių matmenys  $265 \times 125 \times 0,25$  mm. Jei naudojamas kito tipo ir dydžio gelis, atskyrimo sąlygas gali tekti reguliuoti.

**Izoelektrinis fokusavimas**4.1. **Reagentai poliakrilamido geliams su karbamiu gaminti**4.1.1. *Pradinis gelio tirpalas*

Vandenyje ištirpinama

4,85 g akrilamido,

0,15 g N,N'-metilen-bis-akrilamido (BIS),

48,05 g karbamido,

15,00 g glicerolio (87 % masės)

skiedžiama iki 100 ml ir laikoma tamsaus stiklo butelyje šaldytuve.

*Pastaba.* Vietoje nurodytos masės neurotoksinių akrilamidų galima naudoti iš anksto sumaišytą akrilamido (BIS) tirpalą, kurio galima nusipirkti. Vietoj nurodytos masės akrilamido galima naudoti 16,2 ml jo tirpalo, jei jame yra 30 % (masės pagal tūrį) akrilamido ir 0,8 % (masės pagal tūrį) BIS. Pradinio tirpalo galiojimo trukmė – ne daugiau kaip 10 dienų; jeigu jo laidumas didesnis nei  $5 \mu\text{S}$ , tirpalą reikia naujai dejonizuoti 30 min. maišant su 2 g Amberlite MB-3, po to filtruojant per  $0,45 \mu\text{m}$  membraną.

#### 4.1.2. *Gelio tirpalas*

Gelio tirpalas ruošiamas pradinį gelio tirpalą (žr. 4.1.1) maišant su priedais ir amfolitais (\*).

9,0 ml pradinio tirpalo

24 mg  $\beta$ -alanino

500  $\mu$ l amfolito, pH 3,5–9,5

250  $\mu$ l amfolito, pH 5–7

250  $\mu$ l amfolito, pH 6–8

Gelio tirpalas sumaišomas ir dvi tris minutes ultragarso vonelėje arba vakuume iš jo šalinamos dujos.

*Pastaba.* Gelio tirpalas ruošiamas prieš pat jį liejant (žr. 6.2 punktą).

#### 4.1.3. *Katalizatorių tirpalai*

##### 4.1.3.1. *N,N,N',N'*-tetrametiletilendiaminas (*Temed*)

##### 4.1.3.2. 40 % (masės pagal tūrį) amonio peroksosulfatas (PER):

800 mg PER ištirpinama vandenyje ir atskiedžiama iki 2 ml.

*Pastaba.* Visada naudojamas ką tik pagamintas PER tirpalas.

#### 4.2. **Kontaktinis skystis**

Žibalas arba skystas parafinas

#### 4.3. **Anodo tirpalas**

5,77 g fosforo rūgšties (85 % masės) ištirpinama vandenyje ir atskiedžiama iki 100 ml.

#### 4.4. **Katodo tirpalas**

2,00 g natrio hidroksido ištirpinama vandenyje ir atskiedžiama vandeniu iki 100 ml.

#### ***Mėginio ruošimas***

#### 4.5. **Reagentai baltymams išskirti**

##### 4.5.1. *Praskiesta acto rūgštis (25,0 ml ledinės acto rūgšties atskiedžiama vandeniu iki 100 ml).*

##### 4.5.2. *Dichlormetanas*

##### 4.5.3. *Acetonas*

#### 4.6. **Buferinis tirpalas baltymams tirpinti**

Vandenyje ištirpinama

5,75 g glicerolio (87 % masės),

24,03 g karbamido,

250 mg ditiotreitolio

ir atskiedžiama iki 50 ml.

*Pastaba.* Laikoma šaldytuve, maksimali laikymo trukmė – 1 savaitė.

**4.7. Reagentai kazeinui skaidyti plazminu****4.7.1. Buferinis amonio karbonato tirpalas**

0,2 mol/l amonio hidrokarbonato tirpalas (1,58 g/100 ml vandens), kuriame yra 0,05 mol/l etilendiamintetraacto rūgštis (EDTA, 1,46 g/100 ml), titruojamas 0,2 mol/l amonio karbonato tirpalu (1,92 g/100 ml vandens), kuriame yra 0,05 mol/l EDTA, kol jo pH pasiekia 8.

**4.7.2. Galvijų plazminas (E.C.3.4.21.7), kurio aktyvumas ne mažesnis kaip 5 U/ml****4.7.3.  $\epsilon$ -aminoheksano rūgštis tirpalas fermentams slopinti**

2,624 g  $\epsilon$ -aminoheksano rūgštis (6 amino-n-heksano rūgštis) ištirpinama 100 ml 40 % (tūrio) etanolio.

**4.8. Etalonai****4.8.1. Sertifikuotus pamatinius sutraukto nugriebto avių ir ožkų pieno mišinių, kuriuose yra 0 % ir 1 % karvių pieno, etalonus galima gauti Komisijos etalonių medžiagų ir matavimų institute (Commission's Institute for Reference Materials and Measurements, B-2440, Geel, Belgija).****4.8.2. Laboratorinių etalonių traukinto buivolių pieno tirpalų, kuriuose yra 0 % ir 1 % karvių pieno, paruošimas**

Nugriebtam pienui gauti žalias surinktinis buivolių arba karvių pienas 20 min., esant 2 500 g išscentrinei jėgai, centrifuguojamas 37 °C temperatūroje. Greitai atšaldžius mėgintuvėlį su jo turiniu iki 6–8 °C temperatūros, visiškai nuimamas viršutinis riebalų sluoksnis. 1 % etaloniniam tirpalui paruošti į 1 l talpos cheminę stiklinę įpilama 5,00 ml nugriebto karvių pieno, 495 ml nugriebto buivolių pieno ir praskiesta pieno rūgštimi (10 % masės) parūgštinama iki pH 6,4. Mišinys šildomas iki 35 °C, įpilama 100  $\mu$ l šliužo fermento (fermento aktyvumas 1:10 000, koncentracija 3 000 U/ml), maišoma 1 min. ir aliuminio folija uždengta stiklinė paliekama stovėti 35 °C temperatūroje vieną valandą, kad pienas susitrauktų. Susidarius varškei, visas sutrauktas pienas liofilizuojamas prieš tai jo nesumaišant ir nenupilant išrūgų. Po liofilizacijos produktas sumalamas į homogeniškus miltelius. 0 % etaloniškas tirpalas ruošiamas atliekant tą pačią procedūrą su grynu nugriebtu buivolių pienu. Etaloniški tirpalai laikomi – 20 °C temperatūroje.

*Pastaba.* Prieš gaminant etaloniškus tirpalus patartina patikrinti buivolių pieno grynumą, izoelektriškai fokusuojant plazminu suskaldytus kazeinus.

**Reagentai baltymams dažyti****4.9. Fiksavimo tirpalas**

150 g trichloracto rūgštis ištirpinama vandenyje ir skiedžiama iki 1 000 ml.

**4.10. Blukinimo tirpalas**

500 ml metanolio ir 200 ml ledinės acto rūgštis atskiedžiama distiliuotu vandeniu iki 2 000 ml.

*Pastaba.* Kiekvieną dieną gaminamas šviežias blukinimo tirpalas; jį galima gaminti lygiomis dalimis sumaišant pradinius 50 % (tūrio) metanolio ir 20 % (tūrio) ledinės acto rūgštis tirpalus.

**4.11. Dažymo tirpalai****4.11.1. Dažymo tirpalas (1-asis pradinis tirpalas)**

3,0 g dažo *Coomassie Brilliant Blue G-250* (C.I. 42655) ištirpinama 1 000 ml 90 % (tūrio) metanolio, naudojant magnetinę maišyklę (apie 45 min.), ir išfiltruojama per du vidutinio tankumo sulankstytus filtrus.

**4.11.2. Dažymo tirpalas (2-asis pradinis tirpalas)**

5,0 g vario sulfato pentahidrato ištirpinama 1 000 ml 20 % (tūrio) acto rūgštis.

**4.11.3. Dažymo tirpalas (darbinis tirpalas)**

Prieš pat dažymą sumaišoma po 125 ml abiejų pradinių tirpalų (4.11.1, 4.11.2).

*Pastaba.* Dažymo tirpalus reikėtų ruošti naudojimo dieną.



5. ĮRANGA
- 5.1. Stiklinės plokštelės (265 × 125 × 4 mm); guminis volelis (15 cm pločio); lyginamasis stalas.
- 5.2. Gelio nešiklio lapas (265 × 125 mm)
- 5.3. Dengiamasis lapas (280 × 125 mm). Ant kiekvieno išilginio lapo krašto priklijuojama lipni juostelė (280 × 6 × 0,25 mm) (žr. 1 paveikslą)
- 5.4. Elektrofokusavimo kamera su šaldomąja plokšte (pvz., 265 × 125 mm) ir tinkamas maitinimo šaltinis (≥ 2,5 kV) arba automatinis elektroforezės prietaisas
- 5.5. Reguliuojamos temperatūros cirkuliacinis kriostatas, nustatytas 12 ± 0,5 °C temperatūrai palaikyti
- 5.6. Centrifuga, reguliuojama iki 3 000 g
- 5.7. Elektrodo juostos (≥ 265 mm ilgio)
- 5.8. Plastikiniai anodo ir katodo tirpalų lašintuvai
- 5.9. Mėginių aplikatoriai (10 × 5 mm, viskozė arba filtravimo popierius, mažai adsorbuojantis baltymus)
- 5.10. Nerūdijančiojo plieno arba stikliniai dažymo ir blukinimo indai (pvz., 280 × 150 mm įrankių padėklai)
- 5.12. Reguliuojamas rotacinis maišiklis (veleno skersmuo – 10 mm), kurio greičių intervalas – 8 000–20 000 aps./min.
- 5.13. Magnetinė maišyklė
- 5.14. Ultragarstinė vonelė
- 5.15. Plėvelės sulydymo įtaisas
- 5.16. 25 μl mikropipetės
- 5.17. Vakuuminis koncentratorius arba sublimacinė džiovykla
- 5.18. Termostatinė vandens vonelė, kurioje galima nustatyti 35 ir 40 ± 1 °C temperatūrą, su purtytuvu
- 5.19. Densitometras, rodmenų skaitymo bangos ilgis λ = 634 nm
6. PROCEDŪRA
- 6.1. Mėginių ruošimas
- 6.1.1. Kazeinų išskyrimas

Į 100 ml talpos centrifugavimo mėgintuvėlį pasveriamas 5 g sausos masės atitinkantis sūrio arba pamatinio etalono kiekis, įpilama 60 ml distiliuoto vandens ir homogenizuojama rotaciniu maišikliu (8 000–10 000 aps./min.). Praskiesta acto rūgštimi (4.5.1) parūgštinama iki pH 4,6 ir centrifuguojama (5 min., 3 000 g). Riebalai ir išrūgos dekantuojami, likutis homogenizuojamas (20 000 aps./min.) su 40 ml distiliuoto vandens, parūgštinto praskiesta acto rūgštimi (4.5.1) iki pH 4,5, įpilama 20 ml dichlormetano (4.5.2), dar kartą homogenizuojama ir centrifuguojama (5 min., 3 000 g). Tarp vandens ir organinio tirpiklio fazių susidaręs kazeino sluoksnis (žr. 2 paveikslą) nuimamas mentele, abi fazės dekantuojamos. Kazeinas vėl homogenizuojamas su 40 ml distiliuoto vandens (žr. pirmiau) ir 20 ml dichlormetano (4.5.2), vėl centrifuguojama. Ši procedūra kartojama tol, kol abi ekstrakto fazės tampa bespalvės (2–3 kartus). Baltymų likutis homogenizuojamas su 50 ml acetono (4.5.3) ir filtruojamas per sulankstytą vidutinio tankumo filtravimo popierių. Likutis du kartus, naudojant po 25 ml acetono, plaunamas ant filtro, paliekamas džiūti ore arba išdžiovinamas azoto srove ir sumalamas į miltelius grūstuvėje.

*Pastaba.* Išdžiovinti kazeino izoliatai turėtų būti laikomi – 20 °C temperatūroje.

- 6.1.2. β-kazeinų skaidymas plazminu γ-kazeinų intensyvumui padidinti

25 mg išskirtų kazeinų (6.1.1) ištirpinami 0,5 ml buferinio amonio karbonato tirpalo (4.7.1) ir homogenizuojami 20 min., pvz., ultragarsu. Gautas tirpalas pašildomas iki 40 °C temperatūros ir į jį pridedama 10 ml plazmino (4.7.2), sumaišoma ir laikoma 1 valandą 40 °C temperatūroje nuolat purtant. Fermentui slopinti įpilama 20 μl ε-aminokaprono rūgšties tirpalo (4.7.3), tada dedama 200 ml kieto karbamido ir 2 mg ditiotreitolio.

*Pastaba.* Norint gauti simetriškesnes fokusuoto kazeino juosteles, patartina, pridėjus ε-aminokaprono rūgšties, tirpalą liofilizuoti ir gautus likučius ištirpinti 0,5 ml baltymų tirpinimo buferio (4.6).

## 6.2. Poliakrilamido gelių su karbamide ruošimas

Keliais vandens lašais suvilgytas gelio nešiklio lapas (5.2) išlyginamas ant stiklinės plokštės (5.1), visą perteklinį vandenį pašalinant popieriniu rankšluosčiu arba servetėle. Tokiu pačiu būdu ant kitos stiklinės plokštės dedamas dengiamasis lapas (5.3) su tarpikliais (0,25 mm). Plokštė dedama horizontaliai ant lyginamojo stalo.

Į paruoštą gelio tirpalą (4.1.2), iš kurio pašalintos dujos, įpilama 10  $\mu$ l *Temed* (4.1.3.1), maišoma ir įpilama 10  $\mu$ l PER tirpalo (4.1.3.2), gerai sumaišoma ir iš karto išpilama tolygiai dengiamojo lapo viduryje. Plokštė su gelio nešiklio lapu vienu kraštu (lapu į apačią) padedama ant plokštės su dengiamuoju lapu ir lėtai nuleidžiama taip, kad tarp lapų susidarytų vienodai pasklidusi gelio plėvelė be oro burbuliukų (3 paveikslas). Naudojant ploną mentelę, plokštė su gelio nešiklio lapu iš lėto visiškai nuleidžiama ir prispaudžiama ant jos viršaus uždedant dar tris stiklines plokštes. Pasibaigus polimerizacijai (po maždaug 60 min.) ant gelio nešiklio lapo susipolimerizavęs gelis nuimamas kartu su dengiančiu lapu, paverčiant stiklines plokšteles. Nuo gelio nešiklio lapo išorinės pusės gelio ir karbamide likučiai gerai nuvalomi. Daugiasluoksnis gelis sulydomas į plėvelės vamzdį ir laikomas šaldytuve (ne ilgiau kaip šešias savaites).

*Pastaba.* Dengiantysis lapas su tarpikliais gali būti naudojamas dar kartą. Poliakrilamido gelių galima supjaustyti į mažesnius gabaliukus ir taip daryti rekomenduojama, jei yra keli mėginiai arba jei naudojamas automatinis elektroforezės įrenginys (du geliai, kurių dydis 4,5 × 5 cm).

## 6.3. Izoelektrinis fokusavimas

Šaldymo termostate nustatoma 12 °C temperatūra. Gelio nešiklio lapo išorinė pusė nuvaloma žibalu, keli žibalo lašai (4.2) užlašinami ant šaldymo bloko vidurio. Ant jo išvyniojamas gelis (gelio nešiklio puse žemyn), saugant, kad nesudarytų oro burbuliukų. Žibalo perteklius nuvalomas ir nuimamas dengiamasis lapas. Elektrodo juostelės suvilgomos anodo ir katodo tirpalais (4.3, 4.4), juostelės atpjaunamos pagal gelio ilgį ir dedamos į numatytas vietas (atstumas tarp elektrodų 9,5 cm).

### Izoelektrinio fokusavimo sąlygos:

#### 6.3.1. Gelio matmenys 265 × 125 × 0,25 mm

Veiksmas	Trukmė (min.)	Įtampa (V)	Srovė (mA)	Galia (W)	Voltvalandės (Vh)
1. Parengiamasis fokusavimas	30	maks. 2 500	maks. 15	pastovi 4	apie 300
2. Mėginio fokusavimas <sup>(1)</sup>	60	maks. 2 500	maks. 15	pastovi 4	apie 1 000
3. Galutinis fokusavimas	60	maks. 2 500	maks. 5	maks. 20	apie 3 000
	40	maks. 2 500	maks. 6	maks. 20	apie 3 000
	30	maks. 2 500	maks. 7	maks. 25	apie 3 000

<sup>(1)</sup> Mėginio įvedimas. Po parengiamojo fokusavimo (1 veiksmas), ant mėginio aplikatorių (10 × 5 mm) pipete užlašinama po 18  $\mu$ l mėginio ir etaloninio tirpalų, aplikatoriai dedami ant gelio 1 mm atstumu vienas nuo kito ir 5 mm išilginiu atstumu nuo anodo ir švelniai prispaudžiami. Fokusuojama pirmiau nurodytomis sąlygomis; praėjus 60 min. nuo mėginio fokusavimo pradžios, mėginio aplikatoriai atsargiai nuimami.

*Pastaba.* Jei keičiamas gelių storis arba plotis, reikia tinkamai pakoreguoti srovės ir galios reikšmes (pvz., jei naudojamas 265 × 125 × 0,5 mm matmenų gelis, elektros srovės ir galios vertės dvigubinamos).

- 6.3.2. *Automatinio elektroforezės įtaiso įtampos programos pavyzdys (2 geliai, kurių dydžiai  $5,0 \times 4,5$  cm), elektrodai be juostų dedami tiesiai ant gelio.*

Veiksmas	Įtampa	Srovė	Galia	Temp.	Voltvalandės
1. Parengiamasis fokusavimas	1 000 V	10,0 mA	3,5 W	8 °C	85 Vh
2. Mėginio fokusavimas	250 V	5,0 mA	2,5 W	8 °C	30 Vh
3. Fokusavimas	1 200 V	10,0 mA	3,5 W	8 °C	80 Vh
4. Fokusavimas	1 500 V	5,0 mA	7,0 W	8 °C	570 Vh

Atliekant 2 veiksmą, mėginio aplikatorius uždedamas esant 0 Vh.

Atliekant 2 veiksmą, mėginio aplikatorius nuimamas esant 30 Vh.

#### 6.4. Baltymų dažymas

##### 6.4.1. Baltymų fiksavimas

Išjungus elektros srovę, elektrodo juostelės tuoj pat nuimamos ir gelis greitai įdedamas į dažymo / blukinimo indą, į kurį įpilta 200 ml fiksatyvo (4.9); laikoma 15 min., nuolat purtant.

##### 6.4.2. Gelio plokštelės plovimas ir dažymas

Fiksavimo tirpalas gerai nusausinamas ir gelio plokštelė plaunama du kartus kiekvieną kartą po 30 sekundžių su 100 ml blukinimo tirpalo (4.10). Blukinimo tirpalas išpilamas ir į indą pripilama 250 ml dažymo tirpalo (4.11.3); dažoma 45 min., švelniai pakratant.

##### 6.4.3. Gelio plokštelės blukinimas

Dažymo tirpalas išpilamas, gelio plokštelė plaunama du kartus, kiekvieną kartą sunaudojant po 100 ml blukinimo tirpalo (4.10), paskui gelio plokštelė 15 min. purtoma su 200 ml blukinimo tirpalo; ši procedūra kartojama mažiausiai du tris kartus tol, kol pagrindas tampa švarus ir bespalvis. Po to plokštelė nuplaunama distiliuotu vandeniu (du kartus po 2 min.) ir džiovinama ore (2–3 val.) arba plaukų džiovintuvu (10–15 min.).

*1 pastaba.* Fiksuojama, plaunama, dažoma ir blukinama 20 °C temperatūroje. Aukštesnėje temperatūroje nedirbama.

*2 pastaba.* Jeigu naudojamas jautresnis dažymo tirpalas (pvz., *Silver Staining Kit, Protein, Pharmacia Biotech, Code No.17-1150-01*), plazminu apdoroti kazeino mėginiai turi būti atskiesti iki 5 mg/ml.

## 7. VERTINIMAS

Vertinama lyginant nežinimo mėginio ir pamatinio etalono baltymų elektroforegramas tame pačiame gelyje. Sūriuose iš avių, ožkų ir buivolių pieno ir iš avių, buivolių ir ožkų pieno mišinių esantis karvių pienas aptinkamas pagal  $\gamma_3$  ir  $\gamma_2$  kazeinus, kurių izoelektrinis taškas yra intervale nuo pH 6,5 iki pH 7,5 (4 a, b paveikslai ir 5 paveikslas). Aptikimo riba yra mažesnė kaip 0,5 %.

### 7.1. Vizualinis įvertinimas

Vizualiai įvertinant karvių pieno kiekį rekomenduojama pasirinkti tokias mėginių ir etaloninių tirpalų koncentracijas, kad avių, ožkų ir (arba) buivolių  $\gamma_2$  ir  $\gamma_3$  kazeinų frakcijų išsidėstymo juostelės būtų vienodo intensyvumo (žr. „ $\gamma_2$  E,G,B“ ir „ $\gamma_3$  E,G,B“ 4 a, b pav. ir 5 pav.). Tada karvių pieno kiekį (mažesnę ar didesnę už 1 % arba lygų 1 %) nežinomame mėginyje galima nustatyti iš karto, palyginant karvių pieno  $\gamma_3$  ir  $\gamma_2$  kazeinų juostelių intensyvumą (žr. „ $\gamma_3$  C“ ir „ $\gamma_2$  C“ 4 a, b pav. ir 5 pav.) su tų pačių kazeinų intensyvumu pamatiniuose etalonuose (avių, ožkų pieno) arba laikinuosiuose laboratoriniuose etaloniniuose tirpaluose (buivolių pieno), kuriuose yra 0 % ir 1 % karvių pieno.

## 7.2. Densitometrinis įvertinimas

Karvių pieno  $\gamma_2$  ir  $\gamma_3$  kazeinų smailės ploto santykį su ožkų, avių ir (arba) buivolių pieno  $\gamma_2$  ir  $\gamma_3$  kazeinų smailių plotais galima nustatyti densitometrijos būdu (5.19) (žr. 5 pav.). Gauta vertė palyginama su 1 % pamatiniu etalonu (ožkų, avių pieno) arba laikinuoju laboratoriniu etaloniniu tirpalu (buivolių pieno), analizuotų ant to paties gelio,  $\gamma_2$  ir  $\gamma_3$  kazeinų smailių ploto santykiu.

*Pastaba.* Šis metodas yra pakankamai tikslus, jeigu karvių pieno  $\gamma_2$  ir  $\gamma_3$  kazeinų signalas yra aiškiai teigiamas matavimą atliekant su 1 % pamatiniu etalonu, bet toks nėra matuojant su 0 % pamatiniu etalonu. Jei taip nėra, procedūra optimizuojama tiksliai laikantis metodo nurodymų.

Vertinama, kad mėginyje karvių pieno yra, jeigu abiejų karvių pieno  $\gamma_2$  ir  $\gamma_3$  kazeinų frakcijų juostelių intensyvumas arba atitinkami smailių plotų santykiai yra lygūs 1 % pamatinio etalono vertei arba už ją didesni.

## 8. NUORODOS

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  $\gamma_2$ -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).

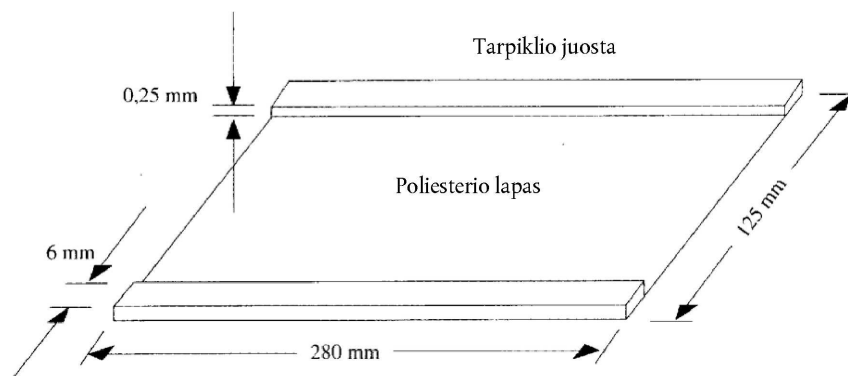
Krause I., Berner I., Klostermeyer H.: Sensitive detection of cow milk in ewe and goat milk and cheese by carrier ampholyte – and carrier ampholyte/immobilized pH gradient – isoelectric focusing of  $\gamma$ -caseins using plasmin as signal amplifier. in: *Electrophoresis-Forum 89* (B. J. Radola, ed.)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

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

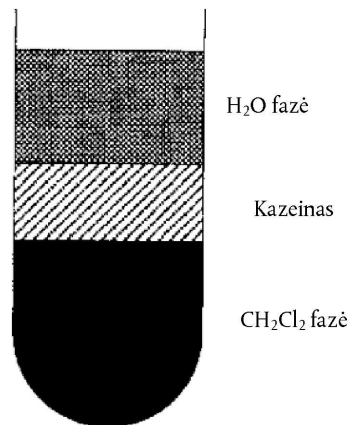
Radola B.J.: Ultrathin-layer isoelectric focusing in 50-100  $\mu$ m polyacrylamide gels on silanised glass plates or polyester films. *Electrophoresis* 1, 43-56 (1980).

1 paveikslas

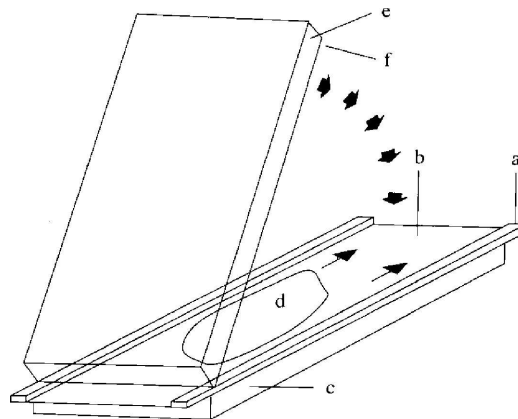
### Scheminis dengiamojo lapo vaizdas



## 2 paveikslas

**Kazeino sluoksnis, kuris plūduriuoja tarp vandeninės ir organinės fazių po centrifugavimo**

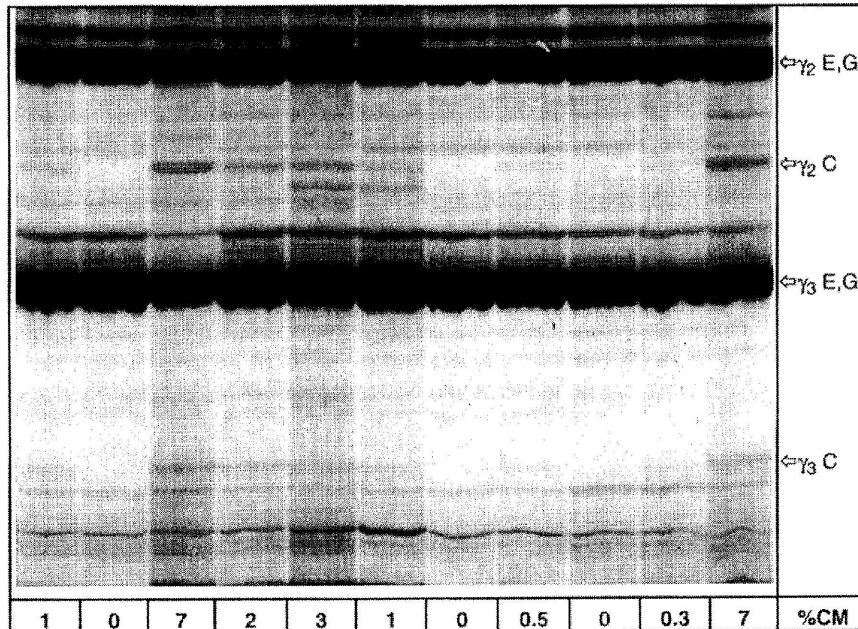
## 3 paveikslas

**Labai plono poliakrilamido gelio sluoksnio liejimo prispaudimu būdas**

a – tarpiklio juostelė (0,25 mm); b – dengiamasis lapas (5.3); c, e – stiklinės plokštelės (5.1); d – gelio tirpalas (4.1.2); f – gelio nešiklio lapas (5.2)

## 4a paveikslas

Plazminu apdorotų kazeinų, gautų iš avių ir ožkų pieno sūrių, kuriuose yra skirtingas karvių pieno kiekis, izoelektrinis fokusavimas

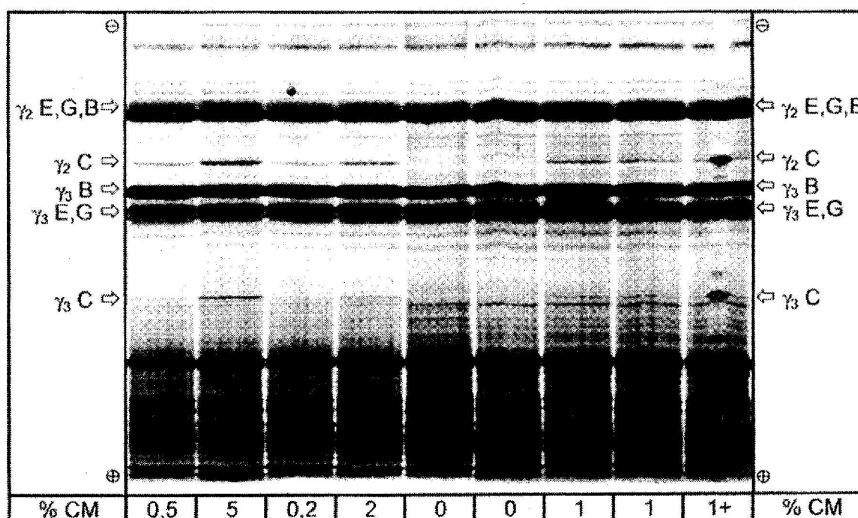


% CM – procentinis karvių pieno kiekis, C – karvių pienas, E – avių pienas, G – ožkų pienas

Pavaizduota viršutinė IEF gelio dalis.

## 4b paveikslas

Plazminu apdorotų kazeinų, gautų iš sūrių, pagamintų iš avių, ožkų ir buivolų pieno mišinių, kuriuose yra skirtingas karvių pieno kiekis, izoelektrinis fokusavimas

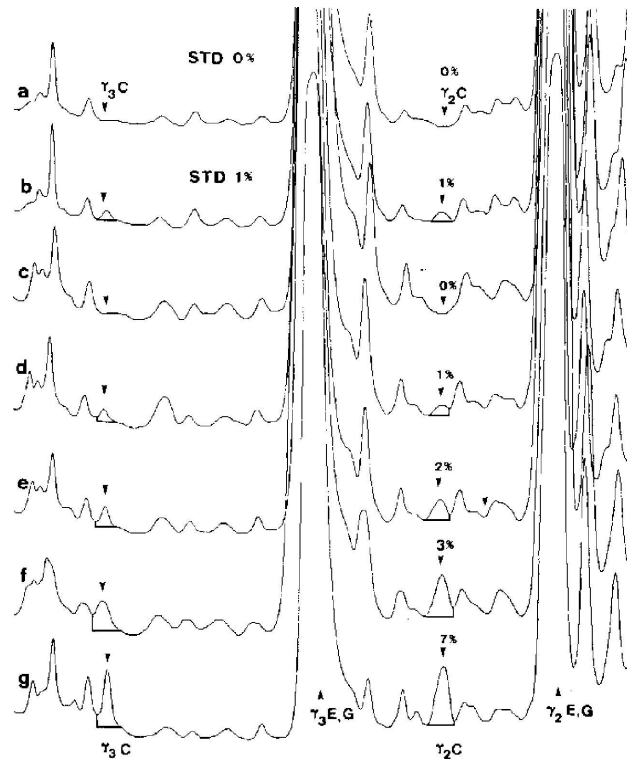


% CM – procentinis karvių pieno kiekis, 1+ – mėginys, kuriame yra 1 % karvių pieno ir kuris frakcijos juostelės viduryje pažymėtas grynu karvių kazeinu. C – karvių pienas, E – avių pienas, G – ožkų pienas, B – buivolų pienas.

Pavaizduotas visas atskyrimo ant IEF gelio atstumas.

## 5 paveikslas

Etaloninių tirpalų ir sūrio, pagaminto iš avių ir ožkų pieno mišinio, mėginių densitogramų po izoelektrinio fokusavimo sanklota



a, b – etaloniniai tirpalai, kuriuose yra 0 ir 1 % karvių pieno; c–g – sūrio mėginiai, kuriuose yra 0, 1, 2, 3 ir 7 % karvių pieno; C – karvių pienas, E – avių pienas; G – ožkų pienas.

Viršutinė IEF gelio dalis buvo skenuojama esant  $\lambda = 634$  nm bangos ilgiui.

## IX PRIEDAS

**Analizių vertinimas****1. Kokybės užtikrinimas**

Analizės atlieka pagal Reglamento (EB) Nr. 882/2004 (\*\*), 12 straipsnį arba valstybės narės kompetentingų institucijų paskirtos laboratorijos.

**2. Mėginių ėmimas ir ginčai dėl analizės rezultatų**

1. Mėginiai imami pagal atitinkamą nagrinėjamą produktą reglamentuojantį reglamentą. Jei jokių mėginių ėmimo nuostatų aiškiai nenurodyta, taikomos standarto ISO 707 „Pienas ir pieno gaminiai. Mėginių ėmimo nurodymai“ nuostatos.
2. Laboratorijos analizės rezultatų ataskaitose turi pakakti informacijos rezultatams pagal priedėlį įvertinti.
3. Pagal Sąjungos taisykles atliekant analizę imama po du mėginius.
4. Kilus ginčui dėl rezultatų, mokėjimo agentūra reikiamą produkto, dėl kurio ginčijamasi, analizę atlieka dar kartą, o išlaidas padengia pralaimėjusi šalis.

Pirmiau nurodyta analizė atliekama su sąlyga, kad turima užplombuotų kartotinių produkto mėginių, kuriuos tinkamai saugojo kompetentinga institucija. Prašymą atlikti analizę mokėjimo agentūrai gamintojas išsiunčia per 7 darbo dienas po pranešimo apie pirmosios analizės rezultatus. Mokėjimo agentūra analizę atlieka per 21 darbo dieną po prašymo gavimo.

5. Apeliacinės analizės rezultatai – galutiniai.
6. Jei per penkias darbo dienas nuo mėginių paėmimo gamintojas gali įrodyti, kad mėginiai buvo netinkamai paimti, jie paimami iš naujo, jei tai įmanoma. Jei pakartotinai paimti mėginių neįmanoma, siunta priimama.

---



## Priedėlis

**Siuntos atitikties teisės aktais nustatyta ribinei vertei įvertinimas****1. Metodo esmė**

Jei teisės aktuose dėl valstybės intervencijos ir privačiojo sandėliavimo yra nustatytos išsamios mėginių ėmimo procedūros, jų reikia laikytis. Visais kitais atvejais naudojamas mėginys, gautas iš 3 atsitiktinai paimtų kontrolei pateiktos siuntos ėminių. Galima paruošti sudėtinį mėginį. Gautas rezultatas lyginamas su teisės aktuose nustatyta ribine verte, 95 % pasiklovimo intervalą apskaičiuojant pagal formulę  $2 \times$  standartinis nuokrypis; čia atitinkamas standartinis nuokrypis priklauso nuo to, ar 1) metodas patvirtintas vykdant tarptautinį bendradarbiavimą, taikant  $\sigma_r$  ir  $\sigma_R$  vertes, ar 2) atliekant vidinį patvirtinimą buvo skaičiuojamas vidinis atkuriamumas. Šis pasiklovimo intervalas prilyginamas rezultato matavimo neapibrėžčiai.

**2. Metodo tinkamumas patvirtinamas vykdant tarptautinį bendradarbiavimą**

Šiuo atveju buvo nustatyti standartinis pakartojamumo nuokrypis  $\sigma_r$  ir standartinis atkuriamumo nuokrypis  $\sigma_R$ , ir laboratorija gali įrodyti, kad jos rezultatai atitinka patvirtinto metodo taikymo charakteristikas.

Apskaičiuojamas  $n$  kartotinių matavimų aritmetinis vidurkis  $\bar{x}$ .

$\bar{x}$  išplėstinė neapibrėžtis ( $k = 2$ ) apskaičiuojama taip:

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

Jei galutinis matavimo rezultatas  $x$  apskaičiuojamas taikant formules  $x = y_1 + y_2$ ,  $x = y_1 - y_2$ ,  $x = y_1 \cdot y_2$  arba  $x = y_1/y_2$  tokiais atvejais būtina laikytis standartinių nuokrypių jungimo procedūrų.

Laikoma, kad siunta neatitinka viršutinės teisės aktais nustatytos ribinės vertės UL, jei

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

kitaip laikoma, kad ji UL atitinka.

Laikoma, kad siunta neatitinka apatinės teisės aktais nustatytos ribinės vertės LL, jei

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

kitaip laikoma, kad ji LL atitinka.

**3. Vidinis tinkamumo patvirtinimas apskaičiuojant vidinio atkuriamumo standartinį nuokrypį**

Jei taikomi šiame reglamente nenurodyti metodai, o preciziškumo matai nebuvo nustatyti, atliekamas vidinis metodo tinkamumo patvirtinimas. Išplėstinės neapibrėžties  $U$  apskaičiavimo formulėse vietoj  $\sigma_r$  ir  $\sigma_R$  naudojami atitinkamai standartinis vidinio pakartojamumo nuokrypis  $s_r$  ir standartinis vidinio atkuriamumo nuokrypis  $s_{iR}$ .

Taisyklės, kurių reikia laikytis nustatant atitiktį teisės aktais nustatyta ribinei vertei, išdėstytos 1 punkte. Tačiau, jei nusprendžiama, kad siunta teisės aktais nustatytos ribinės vertės neatitinka, matavimai kartojami taikant šiame reglamente nurodytą metodą, o gautas rezultatas vertinamas pagal 1 punktą.

(\*) Reikiamam  $\gamma$ -kazeinų atskyrimui gauti ypač tiko *Ampholine*® (pH 3,5–9,5) (*Pharmacia*) ir *Resolyte*® (pH 5–7 bei pH 6–8) (*BDH, Merck*).

(\*\*) 2004 m. balandžio 29 d. Europos Parlamento ir Tarybos reglamentas (EB) Nr. 882/2004 dėl oficialios kontrolės, kuri atliekama siekiant užtikrinti, kad būtų įvertinama, ar laikomasi pašarus ir maistą reglamentuojančių teisės aktų, gyvūnų sveikatos ir gerovės taisyklių (OL L 165, 2004 4 30, p. 1).“

**KOMISIJOS ĮGYVENDINIMO REGLAMENTAS (ES) 2018/151****2018 m. sausio 30 d.**

**kuriuo nustatomos Europos Parlamento ir Tarybos direktyvos (ES) 2016/1148 taikymo taisyklės, kuriomis patikslinami elementai, į kuriuos turi atsižvelgti skaitmeninių paslaugų teikėjai, kad galėtų valdyti tinklų ir informacinių sistemų saugumui kylančią riziką, ir parametrai, pagal kuriuos nustatoma, ar incidentas daro didelį poveikį**

EUROPOS KOMISIJA,

atsižvelgdama į Sutartį dėl Europos Sąjungos veikimo,

atsižvelgdama į 2016 m. liepos 6 d. Europos Parlamento ir Tarybos direktyvą (ES) 2016/1148 dėl priemonių aukštam bendram tinklų ir informacinių sistemų saugumo lygiui visoje Sąjungoje užtikrinti <sup>(1)</sup>, ypač į jos 16 straipsnio 8 dalį,

kadangi:

- (1) pagal Direktyvą (ES) 2016/1148 skaitmeninių paslaugų teikėjai išlaiko teisę imtis techninių ir organizacinių priemonių, kurios, jų nuomone, yra tinkamos ir proporcingos siekiant valdyti jų tinklų ir informacinių sistemų saugumui kylančią riziką, jei jomis užtikrinamas tinkamas saugumo lygis ir atsižvelgiama į toje direktyvoje nustatytus elementus;
- (2) nustatydamas tinkamas ir proporcingas technines ir organizacines priemones skaitmeninių paslaugų teikėjas informacijos saugumą turėtų vertinti sistemingai ir jį grįsti rizikos vertinimu;
- (3) siekdami užtikrinti sistemų ir įrenginių saugumą, skaitmeninių paslaugų teikėjai turėtų atlikti vertinimo ir analizės procedūras. Jos turėtų apimti sistemingą tinklų ir informacinių sistemų valdymą, fizinį ir aplinkos saugumą, tiekimo saugumą ir prieigos kontrolę;
- (4) skaitmeninių paslaugų teikėjai, atlikdami su sistemingu tinklų ir informacinių sistemų valdymu susijusią rizikos analizę, turėtų visų pirma identifikuoti konkrečią riziką ir įvertinti jos dydį, pavyzdžiui, nustatyti grėsmę ypatingos svarbos objektams ir kaip ji gali paveikti jų veikimą, ir geriausius tos grėsmės mažinimo būdus remiantis turimu pajėgumu ir išteklių poreikiais;
- (5) žmogiškųjų išteklių politika galėtų būti orientuojama į įgūdžių valdymą, apimančią saugumui reikiamų įgūdžių ugdymą ir informuotumo didinimą. Skaitmeninių paslaugų teikėjai turėtų būti skatinami sprendžiant dėl tinkamų veiklos saugumo taisyklių atsižvelgti į pakeitimų valdymą, pažeidžiamumo valdymą, veiklos ir administravimo praktikos formalizavimą ir sistemų schemų sudarymą;
- (6) architektūros saugumo taisyklėse galėtų būti nustatytas visų pirma tinklų ir sistemų atskyrimas, taip pat konkrečios ypatingos svarbos operacijų, kaip antai administravimo operacijų, saugumo priemonės. Atskyręs tinklus ir sistemas skaitmeninių paslaugų teikėjas atskirtų vienus elementus nuo kitų, pavyzdžiui, duomenų srautus ir skaičiavimo išteklius, priklausančius klientui, klientų grupei, skaitmeninių paslaugų teikėjui arba trečiosioms šalims;
- (7) priemonėmis, kurių imamasi dėl fizinio ir aplinkos saugumo, organizacijos tinklų ir informacinės sistemos turėtų būti apsaugotos nuo žalos, kuria gali padaryti tokie incidentai, kaip vagystė, gaisras, potvynis ar kiti meteorologiniai reiškiniai, sutrikęs ryšys ar elektros energijos tiekimas;
- (8) tiekimo saugumas, kaip antai elektros energijos ar kuro tiekimo arba aušinimo išteklių saugumas, galėtų apimti tiekimo grandinės saugumą, visų pirma trečiųjų šalių rangovų ir subrangovų saugumą ir jų valdymą. Ypatingos svarbos išteklių atsekamumas yra skaitmeninių paslaugų teikėjo gebėjimas identifikuoti ir registruoti jų tiekimo šaltinius;
- (9) skaitmeninių paslaugų naudotojų sąvoka turėtų apimti fizinius ir juridinius asmenis, kurie yra elektroninės prekyvietės klientai ar debesijos kompiuterijos paslaugos abonentai arba lankosi interneto paieškos sistemos svetainėje norėdami atlikti paiešką pagal raktinius žodžius;

<sup>(1)</sup> OLL 194, 2016 7 19, p. 1.

- (10) nustatant, ar incidentas daro didelį poveikį, turėtų būti laikoma, kad šiame reglamente aptarti atvejai yra iš nebaigtinio didelių incidentų sąrašo. Reikėtų sukaupti patirties įgyvendinant šį reglamentą ir Bendradarbiavimo grupei atliekant darbą, nurodytą Direktyvos (ES) 2016/1148 11 straipsnio 3 dalies i ir m punktuose – renkant geriausios praktikos, susijusios su rizika ir incidentais, pavyzdžius ir aptariant pranešimų apie incidentus teikimo tvarką. Rezultatas galėtų būti išsamios gairės dėl parametrų kiekybinių ribų, kurias pasiekus skaitmeninių paslaugų teikėjai privalėtų pranešti apie incidentą pagal Direktyvos (ES) 2016/1148 16 straipsnio 3 dalį. Prireikus Komisija galėtų apsvarstyti galimybę peržiūrėti šiame reglamente nustatytas ribas;
- (11) kad kompetentingos institucijos žinotų apie galimą naują riziką, skaitmeninių paslaugų teikėjai turėtų būti skatinami savanoriškai pranešti apie incidentus, pasižyminčius savybėmis, apie kurias anksčiau nežinota, tokiomis kaip nauji brovimosi į sistemas būdai, išpuolių kryptys ar užpuolikai, pažeidžiamos vietos ir pavojai;
- (12) šis reglamentas turėtų būti taikomas nuo dienos, einančios po Direktyvos (ES) 2016/1148 perkėlimo į nacionalinę teisę termino;
- (13) šiame reglamente nustatytos priemonės atitinka Direktyvos (ES) 2016/1148 22 straipsnyje nurodyto Tinklų ir informacinių sistemų saugumo komiteto nuomonę,

PRIĖMĖ ŠĮ REGLAMENTĄ:

#### *1 straipsnis*

#### **Dalykas**

Šiame reglamente patikslinami elementai, į kuriuos turi atsižvelgti skaitmeninių paslaugų teikėjai, kai nustato ir taiko priemones, kad užtikrintų tinklų ir informacinių sistemų, kuriais naudodamiesi siūlo Direktyvos (ES) 2016/1148 III priede nurodytas paslaugas, tam tikrą saugumo lygį, ir parametrai, į kuriuos reikia atsižvelgti sprendžiant, ar incidentas daro didelį poveikį tų paslaugų teikimui.

#### *2 straipsnis*

#### **Saugumo elementai**

1. Direktyvos (ES) 2016/1148 16 straipsnio 1 dalies a punkte nurodytas sistemų ir įrenginių saugumas yra tinklų ir informacinių sistemų ir jų fizinės aplinkos saugumas, kurį sudaro šie elementai:
  - a) sistemingas tinklų ir informacinių sistemų valdymas, t. y. parengtos informacinių sistemų schemos ir nustatytos tinkamos taisyklės, kuriomis reglamentuojamas informacijos saugumo valdymas, įskaitant rizikos analizę, žmogiškuosius išteklius, operacijų saugumą, saugumo architektūrą, saugų viso duomenų ir sistemų ciklo valdymą ir, kai tinkama, šifravimą bei jo valdymą;
  - b) fizinis ir aplinkos saugumas, t. y. rinkinys priemonių, kuriomis skaitmeninių paslaugų teikėjų tinklų ir informacinės sistemos nuo žalos apsaugomos taikant visų pavojų rizikos vertinimu pagrįstą metodą, pavyzdžiui, saugantis nuo pavojų dėl sistemos gedimo, žmogaus klaidos, piktavališko veiksmo ar gamtos reiškinių;
  - c) tiekimo saugumas, t. y. nustatytos ir taikomos tinkamos taisyklės, kad būtų užtikrinamas paslaugoms teikti reikiamų ypatingos svarbos išteklių prieinamumas ir prireikus atsekamumas;
  - d) prieigos prie tinklų ir informacinių sistemų kontrolė, t. y. rinkinys priemonių, kuriomis užtikrinama, kad fizinė ir loginė prieiga prie tinklų ir informacinių sistemų, įskaitant tinklų ir informacinių sistemų administravimo saugumą, būtų leidžiama ir ribojama laikantis veiklos ir saugumo reikalavimų.
2. Direktyvos (ES) 2016/1148 16 straipsnio 1 dalies b punkte nurodyto incidentų valdymo priemonės, kurių imasi skaitmeninių paslaugų teikėjai, apima:
  - a) įvirtintus ir išbandytus incidentų nustatymo procesus ir procedūras, kad neiprasti įvykiai būtų laiku pastebėti ir apie juos būtų žinoma;
  - b) pranešimų apie incidentus teikimo ir informacinių sistemų silpnų ir pažeidžiamų vietų nustatymo procesus ir taisykles;

- c) reagavimą laikantis nustatytų procedūrų ir pranešimų apie priemonių taikymo rezultatus teikimą;
- d) incidento sunkumo įvertinimą, analizuojant incidentą sukauptų žinių dokumentavimą ir aktualios informacijos rinkimą siekiant gauti įrodymų ir nuolat tobulinti priemones.
3. Direktyvos (ES) 2016/1148 16 straipsnio 1 dalies c punkte nurodytas veiklos tęstinumo valdymas yra organizacijos gebėjimas užtikrinti nenutrūkstamą paslaugų teikimą arba prireikus atkurti tinkamą nustatytą jo lygį po veiklą sutrikdžiusio incidento ir apima:
- a) nenumatytų atvejų plano sudarymą remiantis poveikio veiklai analize ir taikymą siekiant užtikrinti skaitmeninių paslaugų teikėjų teikiamų paslaugų tęstinumą; planas reguliariai tikrinamas ir išbandomas, pavyzdžiui, per pratybas;
- b) veiklos atkūrimo po ekstremaliųjų įvykių pajėgumą, kuris reguliariai tikrinamas ir išbandomas, pavyzdžiui, per pratybas.
4. Direktyvos (ES) 2016/1148 16 straipsnio 1 dalies d punkte nurodyta stebėseną, auditas ir bandymai apima nustatytas ir taikomas taisykles, pagal kurias:
- a) suplanuota seka atliekamas stebėjimas arba matavimai siekiant įvertinti, ar tinklų ir informacinės sistemos veikia taip, kaip numatyta;
- b) inspektuojama ir tikrinama, ar laikomasi standarto arba gairių rinkinio, ar įrašai tikslūs, ar pasiekti veiksmingumo ir efektyvumo tikslai;
- c) vykdomas procesas tinklų ir informacinės sistemos saugumo mechanizmų, naudojamų duomenims apsaugoti ir funkcionalumui išlaikyti, ydoms išsiaiškinti. Toks procesas apima techninius procesus ir personalą, atliekantį operacijas.
5. Direktyvos (ES) 2016/1148 16 straipsnio 1 dalies e punkte nurodyti tarptautiniai standartai yra tarptautinės standartizacijos institucijos patvirtinti standartai, apibrėžti Europos Parlamento ir Tarybos reglamento (ES) Nr. 1025/2012 <sup>(1)</sup> 2 straipsnio 1 dalies a punkte. Vadovaujantis Direktyvos (ES) 2016/1148 19 straipsniu, galima taikyti ir europinius ar tarptautinius mastu pripažintus standartus ir specifikacijas, kurie yra svarbūs tinklų ir informacinių sistemų saugumui, taip pat esamus nacionalinius standartus.
6. Skaitmeninių paslaugų teikėjai užtikrina tinkamą dokumentaciją, kad kompetentinga institucija galėtų patikrinti, ar laikomasi 1, 2, 3, 4 ir 5 dalyse nustatytų saugumo elementų.

### 3 straipsnis

#### **Parametrai, į kuriuos turi būti atsižvelgiama siekiant nustatyti, ar incidentas daro didelį poveikį**

1. Nustatydamas Direktyvos (ES) 2016/1148 16 straipsnio 4 dalies a punkte nurodytą naudotojų, kuriuos paveikė incidentas, visų pirma naudotojų, kurių pačių paslaugų teikimas priklauso nuo tos paslaugos, skaičių skaitmeninių paslaugų teikėjas turi gebėti apytiksliai apskaičiuoti:
- a) paveiktų fizinių ir juridinių asmenų, su kuriais sudaryta paslaugos teikimo sutartis, skaičių arba
- b) paveiktų naudotojų, pasinaudojusių paslauga, skaičių, pagrįstą visų pirma ankstesniais srauto duomenimis.
2. Direktyvos (ES) 2016/1148 16 straipsnio 4 dalies b punkte nurodyta incidento trukmė yra laikotarpis nuo tinkamo paslaugos teikimo, apibrėžiamo prieinamumo, autentiškumo, vientisumo ir konfidencialumo savybėmis, sutrikdymo iki atkūrimo momento.
3. Išnagrinėjęs Direktyvos (ES) 2016/1148 16 straipsnio 4 dalies c punkte nurodytą geografinę teritoriją, kurią paveikė incidentas, aprėpti, skaitmeninių paslaugų teikėjai turi galėti nustatyti, ar incidentas paveikė jo paslaugų teikimą konkrečiose valstybėse narėse.
4. Direktyvos (ES) 2016/1148 16 straipsnio 4 dalies d punkte nurodytas paslaugos veikimo sutrikdymo mastas išmatuojamas pagal vieną ar kelias toliau nurodytas savybes, kurios pablogėjo dėl incidento: duomenų arba susijusių paslaugų prieinamumas, autentiškumas, vientisumas arba konfidencialumas.

<sup>(1)</sup> 2012 m. spalio 25 d. Europos Parlamento ir Tarybos reglamentas (ES) Nr. 1025/2012 dėl Europos standartizacijos, kuriuo iš dalies keičiamos Tarybos direktyvos 89/686/EEB ir 93/15/EEB ir Europos Parlamento ir Tarybos direktyvos 94/9/EB, 94/25/EB, 95/16/EB, 97/23/EB, 98/34/EB, 2004/22/EB, 2007/23/EB, 2009/23/EB ir 2009/105/EB ir panaikinamas Tarybos sprendimas 87/95/EEB ir Europos Parlamento ir Tarybos sprendimas Nr. 1673/2006/EB (OL L 316, 2012 11 14, p. 12).

5. Nustatydamas Direktyvos (ES) 2016/1148 16 straipsnio 4 dalies e punkte nurodytą poveikio ekonominei ir visuomeninei veiklai mastą, skaitmeninių paslaugų teikėjas, remdamasis tokiais rodikliais, kaip sutartinių santykių su klientais pobūdis arba, kai tinkama, potencialus paveiktų naudotojų skaičius, turi galėti padaryti išvadą, ar dėl incidento naudotojai patyrė didelių materialių arba nematerialių nuostolių, susijusių su sveikata, viešuoju saugumu arba turtine žala.

6. Taikant 1, 2, 3, 4 ir 5 dalis, iš skaitmeninių paslaugų teikėjų nereikalaujama rinkti papildomos informacijos, prie kurios jie neturi prieigos.

#### 4 straipsnis

### Didelis incidento poveikis

1. Laikoma, kad incidentas daro didelį poveikį, jei susiklosto bent viena iš šių situacijų:
  - a) skaitmeninių paslaugų teikėjo teikiama paslauga buvo neprieinama ilgiau nei 5 000 000 naudotojo valandų, o naudotojo valanda yra šešiasdešimt minučių paslauga negalėjusių naudotis naudotojų Sąjungoje skaičius;
  - b) dėl incidento nukentėjo saugomų, perduodamų ar tvarkomų duomenų arba atitinkamų paslaugų, teikiamų skaitmeninių paslaugų teikėjo ar gaunamų per jo tinklą ir informacinę sistemą, prieinamumas, autentiškumas, vientisumas ar konfidencialumas ir tai paveikė daugiau kaip 100 000 naudotojų Sąjungoje;
  - c) dėl incidento kilo rizika viešajam saugumui ir saugai arba gyvybei;
  - d) incidentas padarė turtinę žalą bent vienam naudotojui Sąjungoje, jeigu tam naudotojui padaryta žala viršija 1 000 000 EUR.
2. Remdamasi geriausios praktikos pavyzdžiais, kuriuos Bendradarbiavimo grupė sukaupė vykdydama savo užduotis pagal Direktyvos (ES) 2016/1148 11 straipsnio 3 dalį, ir diskusijomis pagal tos direktyvos 11 straipsnio 3 dalies m punktą, Komisija gali peržiūrėti 1 dalyje nustatytas ribas.

#### 5 straipsnis

### Įsigaliojimas

1. Šis reglamentas įsigalioja dvidešimtą dieną po jo paskelbimo *Europos Sąjungos oficialiajame leidinyje*.
2. Jis taikomas nuo 2018 m. gegužės 10 d.

Šis reglamentas privalomas visas ir tiesiogiai taikomas visose valstybėse narėse.

Priimta Briuselyje 2018 m. sausio 30 d.

*Komisijos vardu*  
*Pirmininkas*  
Jean-Claude JUNCKER

# SPRENDIMAI

## TARYBOS SPRENDIMAS (ES) 2018/152

2018 m. sausio 29 d.

### kuriuo skiriamas Regionų komiteto Vokietijos Federacinės Respublikos pasiūlytas pakaitinis narys

EUROPOS SAJUNGOS TARYBA,

atsižvelgdama į Sutartį dėl Europos Sąjungos veikimo, ypač į jos 305 straipsnį,

atsižvelgdama į Vokietijos vyriausybės pasiūlymą,

kadangi:

- (1) 2015 m. sausio 26 d., 2015 m. vasario 5 d. ir 2015 m. birželio 23 d. Taryba priėmė sprendimus (ES) 2015/116 <sup>(1)</sup>, (ES) 2015/190 <sup>(2)</sup> ir (ES) 2015/994 <sup>(3)</sup>, kuriais skiriami Regionų komiteto nariai ir pakaitiniai nariai laikotarpiui nuo 2015 m. sausio 26 d. iki 2020 m. sausio 25 d.;
- (2) pasibaigus Anke SPOORENDONK kadencijai tapo laisva Regionų komiteto pakaitinio nario vieta,

PRIĖMĖ ŠĮ SPRENDIMĄ:

#### 1 straipsnis

Likusiam dabartinės kadencijos laikui iki 2020 m. sausio 25 d. Regionų komiteto pakaitine nare skiriama:

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

#### 2 straipsnis

Šis sprendimas įsigalioja jo priėmimo dieną.

Priimta Briuselyje 2018 m. sausio 29 d.

Tarybos vardu

Pirmininkas

R. PORODZANOV

<sup>(1)</sup> 2015 m. sausio 26 d. Tarybos sprendimas (ES) 2015/116, kuriuo skiriami Regionų komiteto nariai ir pakaitiniai nariai laikotarpiui nuo 2015 m. sausio 26 d. iki 2020 m. sausio 25 d. (OL L 20, 2015 1 27, p. 42).

<sup>(2)</sup> 2015 m. vasario 5 d. Tarybos sprendimas (ES) 2015/190, kuriuo skiriami Regionų komiteto nariai ir pakaitiniai nariai laikotarpiui nuo 2015 m. sausio 26 d. iki 2020 m. sausio 25 d. (OL L 31, 2015 2 7, p. 25).

<sup>(3)</sup> 2015 m. birželio 23 d. Tarybos sprendimas (ES) 2015/994, kuriuo skiriami Regionų komiteto nariai ir pakaitiniai nariai laikotarpiui nuo 2015 m. sausio 26 d. iki 2020 m. sausio 25 d. (OL L 159, 2015 6 25, p. 70).

**KLaidų ištaisymas**

**2017 m. birželio 14 d. Komisijos reglamento (ES) Nr. 2017/1084, kuriuo dėl pagalbos uostų ir oro uostų infrastruktūrai, dėl pranešimo apie pagalbą kultūrai ir paveldo išsaugojimui ir pagalbą sporto ir daugiafunkcems laisvalaikio infrastruktūroms ribų ir dėl atokiausiems regionams skirtų regioninės veiklos pagalbos schemų iš dalies keičiamas Reglamentas (ES) Nr. 651/2014 ir dėl tinkamų finansuoti išlaidų apskaičiavimo iš dalies keičiamas Reglamentas (ES) Nr. 702/2014, klaidų ištaisymas**

*(Europos Sąjungos oficialusis leidinys L 156, 2017 m. birželio 20 d.)*

1 straipsnio 11 dalyje pakeistojo 15 straipsnio 4 dalies įžanginėje formuluotėje:

- yra:* „Atokiausiuose regionuose veiklos pagalbos schemomis kompensuojamos papildomos veiklos išlaidos, susidariusios tuose regionuose dėl tiesioginio vienos ar kelių nuolatinių kliūčių, nurodytų Sutarties 349 straipsnyje, poveikio, jeigu pagalbos gavėjai vykdo ekonominę veiklą atokiausiame regione, su sąlyga, kad skiriama metinė pagalbos suma vienam pagalbos gavėjui pagal visas veiklos pagalbos schemas, įgyvendinamas pagal šį reglamentą, neviršija nė vieno iš šių procentinių dydžių:“;
- turi būti:* „Atokiausiuose regionuose veiklos pagalbos schemomis kompensuojamos papildomos veiklos išlaidos, susidariusios tuose regionuose dėl tiesioginio vienos ar kelių nuolatinių kliūčių, nurodytų Sutarties 349 straipsnyje, poveikio, jeigu pagalbos gavėjai vykdo ekonominę veiklą atokiausiame regione, su sąlyga, kad skiriama metinė pagalbos suma vienam pagalbos gavėjui pagal visas veiklos pagalbos schemas, įgyvendinamas pagal šį reglamentą, neviršija vieno iš šių procentinių dydžių:“.
-











ISSN 1977-0723 (elektroninis leidimas)  
ISSN 1725-5120 (popierinis leidimas)



**Europos Sąjungos leidinių biuras**  
2985 Liuksemburgas  
LIUKSEMBURGAS

**LT**