|  |
| --- |
| **ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО****ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ** |
| http://refdb.ru/images/1063/2125524/3def6793.jpg | **Н А Ц И О Н А Л Ь Н Ы Й****С Т А Н Д А Р Т****Р О С С И Й С К О Й** **Ф Е Д Е Р А Ц И И** | **ГОСТ Р***(проект, RU,* *первая редакция)* |

**Продукция пищевая специализированная. Консервы мясные стерилизованные фаршевые биокоррегирующего действия**

**Технические условия**

**Настоящий проект стандарта не подлежит применению до его утверждения**

**Москва**

**Стандартинформ**

**2016**

**Предисловие**

**Сведения о стандарте**

 1 РАЗРАБОТАН Федеральным государственным бюджетным научным учреждением «Всероссийский научно-исследовательский институт мясной промышленности имени В.М. Горбатова» (ФГБНУ «ВНИИМП им. В.М. Горбатова»)

2 ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 36

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 201 г. №

4 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

*Правила применения настоящего стандарта установлены ГОСТ Р 1.0– 2012 (раздел 8). Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодном (по состоянию на 1 января текущего года) информационном указателе «Национальные стандарты», а официальный текст изменений и поправок – в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ежемесячно издаваемом информационном указателе «Национальные стандарты». Соответствующая информация, уведомление и тексты размещаются также в информационной системе общего пользования – на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет (gost.ru)*

© Стандартинформ, 2016

Настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

**Содержание**

1 Область применения

2 Нормативные ссылки

3 Термины и определения

4 Технические требования

 4.2 Характеристики

 4.3 Требования к сырью и материалам

 4.4 Маркировка

 4.5 Упаковка

5 Правила приемки

6 Методы контроля

7 Методы подтверждения соответствия продукции

8 Транспортирование и хранение

Приложение А (справочное) Информационные сведения о пищевой ценности 100 г консервов

Приложение Б (обязательное) Метод идентификации Апо А-1

Приложение В (обязательное) Метод идентификации тканеспецифических пептидов

Библиография

**НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**Продукция пищевая специализированная. Консервы мясные стерилизованные фаршевые биокоррегирующего действия.**

**Технические условия**

Specialized foods. Sterilized canned meat with biocorrective action

**\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_**

**1 Область применения**

Настоящий стандарт распространяется на пищевые специализированные мясные консервы стерилизованные фаршевые биокоррегирующего действия «Здоровое сердце» (далее – консервы), предназначенные для диетического профилактического питания с целью снижения риска развития гиперлипидемий и атеросклероза.

Требования, обеспечивающие безопасность и качество продукции изложены в 4.2.1, 4.2.2, 4.2.3, к маркировке – в 4.4.

**2 Нормативные ссылки**

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ 8.579–2002 Государственная система обеспечения единства измерений. Требования к количеству фасованных товаров в упаковках любого вида при их производстве, расфасовке, продаже и импорте

ГОСТ 61–75 Реактивы. Кислота уксусная. Технические условия

ГОСТ 1341–97 Пергамент растительный. Технические условия

ГОСТ 1760–2014 Подпергамент. Технические условия

ГОСТ 1770–74 Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия

ГОСТ 2184-2013 Кислота серная техническая. Технические условия

ГОСТ 4025–95 Мясорубки бытовые. Технические условия

ГОСТ 4328–77 Реактивы. Натрия гидроокись. Технические условия

ГОСТ 5962-2013 Спирт этиловый ректификованный из пищевого сырья. Технические условия

ГОСТ 6709–72 Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ 7269–79 Мясо. Методы отбора образцов и органолептические методы определения свежести

ГОСТ 8273–75 Бумага оберточная. Технические условия

ГОСТ 8756.0–70 Продукты пищевые консервированные. Отбор проб и подготовка их к испытанию

ГОСТ 8756.1–79 Продукты пищевые консервированные. Методы определения органолептических показателей, массы нетто или объема массовой доли составных частей

ГОСТ 8756.18–70 Продукты пищевые консервированные. Метод определения внешнего вида, герметичности тары и состояния внутренней поверхности металлической тары

ГОСТ 9142–2014 Ящики из гофрированного картона. Общие технические условия

ГОСТ 9805–84 Спирт изопропиловый. Технические условия

ГОСТ 9959–91 Продукты мясные. Общие условия проведения органолептической оценки

ГОСТ 10444.7–86 Продукты пищевые. Методы выявления ботулинических токсинов и Сlostridium botulinum

ГОСТ 10444.8-2013 Продукты пищевые. Метод определения Bacillus cereus

ГОСТ 10444.9–88 Продукты пищевые. Метод определения Сlostridium perfringens

ГОСТ 10444.12-88 Продукты пищевые. Метод определения дрожжей и плесневых грибов

ГОСТ 10444.15–94 Продукты пищевые. Методы определения количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов

ГОСТ 10574–91 Продукты мясные. Методы определения крахмала

ГОСТ 10652–73 Реактивы. Соль динатриевая этилендиамин-N,N,N',N'- тетрауксусной кислоты 2-водная. Технические условия

ГОСТ 13534-89 Консервы мясные и мясорастительные. Упаковка, маркировка и транспортирование

ГОСТ 14192–96 Маркировка грузов

ГОСТ 15846–2002 Продукция, отправляемая в районы Крайнего Севера и приравненные к ним местности. Упаковка, маркировка, транспортирование и хранение

ГОСТ 19496–2013 Мясо. Метод гистологического исследования

ГОСТ 20469–95 Электромясорубки бытовые. Технические условия

ГОСТ 21240–89 Скальпели и ножи медицинские. Общие технические требования и методы испытаний

ГОСТ 21241–89 Пинцеты медицинские. Общие технические требования и методы испытаний

ГОСТ 21650–76 Средства скрепления тарно-штучных грузов в транспортных пакетах. Общие требования

ГОСТ 23392–78 Мясо. Методы химического и микроскопического анализа свежести

ГОСТ 23932–90 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Общие технические условия

ГОСТ 24297–2013 Верификация закупленной продукции. Организация проведения и методы контроля.

ГОСТ 24597–81 Пакеты тарно-штучных грузов. Основные параметры и размеры

ГОСТ 25011–81 Мясо и мясные продукты. Методы определения белка

ГОСТ 25336–82 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры

ГОСТ 25951–83 Пленка полиэтиленовая термоусадочная. Технические условия

ГОСТ 26183–84 Продукты переработки плодов и овощей, консервы мясные и мясорастительные. Метод определения жира

ГОСТ 26186–84 Продукты переработки плодов и овощей, консервы мясные и мясорастительные. Методы определения хлоридов

ГОСТ 26663–85 Пакеты транспортные. Формирование с применением средств пакетирования. Общие технические требования

ГОСТ 26669–85 Продукты пищевые и вкусовые. Подготовка проб для микробиологических анализов

ГОСТ 26671–2014 Продукты переработки фруктов и овощей, консервы мясные и мясорастительные. Подготовка проб для лабораторных анализов

ГОСТ 26678-85 Холодильники и морозильники, бытовые электрические компрессионные параметрического ряда. Общие технические условия

ГОСТ 26927–86 Сырье и продукты пищевые. Методы определения ртути

ГОСТ 26929–94 Сырье и продукты пищевые. Подготовка проб. Минерализация для определения содержания токсичных элементов

ГОСТ 26930–86 Сырье и продукты пищевые. Метод определения мышьяка

ГОСТ 26932–86 Сырье и продукты пищевые. Методы определения свинца

ГОСТ 26933–86 Сырье и продукты пищевые. Методы определения кадмия

ГОСТ 26935–86 Продукты пищевые консервированные. Метод определения олова

ГОСТ 28560–90 Продукты пищевые. Метод выявления бактерий родов Рrоtеus, Моrgаnеllа, Рrоvidеnсiа

ГОСТ 29185–2014 Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества сульфитредуцирующих клостридий

ГОСТ 29301–92 Продукты мясные. Метод определения крахмала

ГОСТ 30178–96 Сырье и продукты пищевые. Атомно-абсорбционный метод определения токсичных элементов

ГОСТ 30538-97 Продукты пищевые. Методика определения токсичных элементов атомно-эмиссионным методом

ГОСТ 31479–2012 Мясо и мясные продукты. Метод гистологической идентификации состава

ГОСТ 31628–2012 Продукты пищевые и продовольственное сырье. Инверсионно-вольтамперометрический метод определения массовой концентрации мышьяка

ГОСТ 31659–2012 Продукты пищевые. Метод выявления бактерий рода Salmonella

ГОСТ 31694–2012 Продукты пищевые, продовольственное сырье. Метод определения остаточного содержания антибиотиков тетрациклиновой группы с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором

ГОСТ 31719–2012 Продукты пищевые и корма. Экспресс-метод определения сырьевого состава (молекулярный)

ГОСТ 31746–2012 Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества коагулазоположительных стафилококков и Staphylococcus aureus

ГОСТ 31747–2012 Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества бактерий группы кишечных палочек (колиформных бактерий)

ГОСТ 31796–2012 Мясо и мясные продукты. Ускоренный гистологический метод определения структурных компонентов состава

ГОСТ 31903–2012 Продукты пищевые. Экспресс-метод определения антибиотиков

ГОСТ 31904–2012 Продукты пищевые. Методы отбора проб для микробиологических испытаний

ГОСТ 32161–2013 Продукты пищевые. Метод определения содержания цезия Cs-137

ГОСТ 32163–2013 Продукты пищевые. Метод определения содержания стронция Sr-90

ГОСТ 32164–2013 Продукты пищевые. Метод отбора проб для определения стронция Sr-90 и цезия Cs-137

ГОСТ 32308–2013 Мясо и мясные продукты. Определение содержания хлорорганических пестицидов методом газожидкостной хроматографии

ГОСТ 33422–2015 Мясо и мясные продукты. Определение массовой доли йодтирозинов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором

ГОСТ ISO 1841-2-2013 Мясо и мясные продукты. Потенциометрический метод определения массовой доли хлоридов

ГОСТ ISO 7218–2011 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Общие требования и рекомендации по микробиологическим исследованиям

ГОСТ Р 51074-2003 Продукты пищевые. Информация для потребителя. Общие требования

ГОСТ Р 51232–98 Вода питьевая. Общие требования к организации и методам контроля качества

ГОСТ Р 51289–99 Ящики полимерные многооборотные. Общие технические условия

ГОСТ Р 51301-99 Продукты пищевые и продовольственное сырье. Инверсионно-вольтамперометрические методы определения содержания токсичных элементов (кадмия, свинца, меди и цинка)

ГОСТ Р 51447–99 Мясо и мясные продукты. Методы отбора проб

ГОСТ Р 51448–99 Мясо и мясные продукты. Методы подготовки проб для микробиологических исследований

ГОСТ Р 51480–99 Мясо и мясные продукты. Определение массовой доли хлоридов. Метод Фольгарда

ГОСТ Р 51574–2000 Соль поваренная пищевая. Технические условия

ГОСТ Р 51766–2001 Сырье и продукты пищевые. Атомно-абсорбционный метод определения мышьяка

ГОСТ Р 52501–2005 Вода для лабораторного анализа. Технические условия

ГОСТ Р 53228–2008 Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования. Испытания

ГОСТ Р 53876–2010 Крахмал картофельный. Технические условия

ГОСТ Р 54366–2011 Блоки из субпродуктов замороженные. Технические условия

ГОСТ Р 54463–2011 Тара из картона и комбинированных материалов для пищевой продукции. Технические условия

ГОСТ Р 55480–2013 Мясо и мясные продукты. Метод определения кислотного числа

 П р и м е ч а н и е – При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов в информационной системе общего пользования – на официальном сайте Федерального агенства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет или по ежегодно издаваемому указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по соответствующим ежемесячно издаваемым информационным указателям, опубликованным в текущем году. Если ссылочный стандарт заменен (изменен), то при пользовании настоящим стандартом следует руководствоваться замененным (измененным) стандартом. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка не него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

**3 Термины и определения**

В настоящем стандарте применены термины по [1], [2] и [3], а также следующие с соответствующими определениями:

3.1 **пищевые продукты биокорригирующего действия:** Пищевые продукты и пищевые добавки, применяемые для профилактики, коррекции и поддержания в физиологических границах функциональной активности органов и систем человека за счет направленной in vitro или in vivo модификации.

3.2. **функциональный маркер:** Вещество белковой или пептидной природы, обеспечивающее заявленное биологическое действие продукта.

3.3 **тканеспецифичный пептид:** Вещество пептидной природы, содержащееся в определенной ткани и обладающее направленным биологический действием.

3.4 **Апо 1:** Основной белок в составе липопротеинов высокой плотности, обеспечивает все транспортные функции липопротеидов.

3.5 **пре-Апо А-1:** Белок-предшественник Апо 1.

**4 Технические требования**

4.1 Консервы должны соответствовать требованиям [2], [3] и настоящего стандарта и вырабатываться по технологической инструкции по производству специализированных мясных фаршевых консервов биокоррегирующего действия, с соблюдением требований, установленных нормативными правовыми актами, действующими на территории РФ.

**4.2 Характеристики**

4.2.1 По органолептическим и физико-химическим показателям консервы должны соответствовать требованиям, указанным в таблице.

Т а б л и ц а

|  |  |
| --- | --- |
| Наименованиепоказателя | Характеристика и значение показателя для консервов |
| Внешний вид | Однородная гомогенная масса, без серых пятен, пустот, без видимых включений соединительной ткани. Допускается незначительное количество выделившегося бульона |
| Цвет | От светло-коричневого до коричневого цвета |
| Запах и вкус | Приятные, с выраженным мясным вкусом, слабосоленый, без посторонних запаха и привкуса |
| Консистенция | Сочная, некрошливая, плотная |
| Массовая доля белка, % | От 16,5 до 18,0 |
| Массовая доля поваренной соли\*, %  | От 0,3 до 0,5 включ. |
| Кислотное число, мг КОН/г | От 1,5 до 3,0 включ. |
| Тканеспецифические пептиды, молекулярные массы, Да | 809,4±1,0  | присутствует |
| 776,5±1,0 | присутствует |
| 765,6±1,0 | присутствует |
| 739,2±1,0 | присутствует |
| 710,8±1,0 | присутствует |
| 229,2±1,0 | присутствует |
| 162,1±1,0 | присутствует |
| 156,0±1,0 | присутствует |
| 148,1±1,0 | присутствует |
| 140,2±1,0 | присутствует |
| 133,1±1,0 | присутствует |
| Функциональные маркеры | Апо 1 пре-Апо А-1 |
| \* Допускается выпуск консервов без добавления поваренной соли. |

4.2.2 Микробиологические показатели, содержание токсичных элементов, антибиотиков, пестицидов, радионуклидов и диоксинов в консервах не должны превышать норм, установленных [2] и [3].

4.2.3 Консервы должны быть герметично укупорены и стерилизованы.

**4.3 Требования к сырью и материалам**

4.3.1 Для производства консервов применяют:

– сердца свиные, замороженные в блоках – по ГОСТ Р 54366;

– аорты свиные, замороженные;

– соль поваренную пищевую выварочную или каменную, самосадочную, садочную помолов № 0 и 1 не ниже первого сорта - по ГОСТ Р 51574;

– крахмал картофельный не ниже второго сорта - по ГОСТ Р 53876;

– воду питьевую – по ГОСТ Р 51232.

4.3.2 Используемое при производстве консервов:

- сырье животного происхождения подлежит ветеринарно-санитарной экспертизе и должно соответствовать требованиям [1] и [2], а также соответствовать требованиям, установленным на территории РФ;

- прочее сырье (ингредиенты) должно соответствовать требованиям [1] и [3].

4.3.3 Не допускается применение: мясного сырья, замороженного более одного раза или сырья в замороженном состоянии со сроком годности более 6 мес., с признаками окислительной порчи; генетически модифицированных сырьевых компонентов; компонентов, не разрешенных к применению для производства мясных продуктов.

4.3.4 В случае разногласий в отношении свежести используемого сырья определяют свежесть мясных ингредиентов, использованных при производстве:

- органолептическим методом по ГОСТ 7269;

- химическим и микроскопическим анализом по ГОСТ 23392.

**4.4 Маркировка**

4.4.1 Консервы в потребительской таре должны иметь маркировку, характеризующую продукцию и отвечающую требованиям [1], [3], [4], ГОСТ Р 51074, ГОСТ 13534, или нормативными правовыми актами, действующими на территории РФ.

Маркировка должна содержать следующую информацию:

- наименование консервов;

- наименование и местонахождение изготовителя [юридический адрес, включая страну, и, при несовпадении с юридическим адресом, адрес(а) производств(а)] и организации в Российской Федерации, уполномоченной изготовителем на принятие претензий от потребителей на ее территории (при наличии);

- товарный знак изготовителя (при наличии);

- массу нетто;

- состав продукта;

- пищевую ценность на 100 г продукта (приложение А);

- срок годности и условия хранения до вскрытия потребительской тары;

- срок годности и условия хранения после вскрытия потребительской тары;

- код предприятия (при наличии);

- рекомендации по применению продукта;

- дату изготовления (число, месяц и год) консервов;

- информацию о подтверждении соответствия;

- обозначение настоящего стандарта.

Дополнительные информационные данные при маркировке потребительской тары:

- без консервантов;

- без добавления соли (в консервах без добавления соли);

- без содержания ГМО.

Способ и место нанесения даты изготовления на каждую единицу продукции выбирает изготовитель.

Пример маркировки**:**

«Продукция пищевая диетического профилактического питания. Мясные консервы стерилизованные фаршевые биокоррегирующего действия «Здоровое сердце». Перед употреблением рекомендуется разогреть».

4.4.2 Маркировка транспортной упаковки – по [4], ГОСТ 13534, ГОСТ 14192 или нормативными правовыми актами, действующими на территории РФ, с нанесением манипуляционных знаков: «Беречь от влаги», «Ограничение температуры», «Верх» и информационной надписи о сроке годности и условиях хранения.

4.4.3 При маркировке консервов должна быть указана следующая дополнительная информация:

а) Маркировочные надписи:

- наименование консервов;

- обозначение документа, по которому изготовлена продукция;

- условия хранения после вскрытия упаковки (после вскрытия потребительской упаковки консервы хранить в холодильнике не более 24 ч при температуре от 2°С до 6°С);

б) Маркировочные знаки:

- дата изготовления;

- номер смены;

-ассортиментный номер консервов;

- индекс вида экономической деятельности;

- номер предприятия- изготовителя.

При односменном режиме работы предприятия допускается номер смены не выносить в маркировочные знаки.

4.4.4 Маркировка консервов, отправляемых в районы Крайнего Севера и приравненные к ним местности, ― по ГОСТ 15846.

**4.5 Упаковка**

4.5.1 Потребительская и транспортная упаковка, упаковочные материалы и скрепляющие средства должны соответствовать требованиям [5] или нормативным правовым актам, действующим на территории РФ, обеспечивать сохранность и качество консервов при транспортировании и хранении в течение всего срока годности.

4.5.2 В качестве потребительской упаковки используют упаковочные материалы: пленочные многослойные, полимерные многослойные пленки (ламинаты), многослойную термоформуемую пленку, пакеты из многослойной термоусадочной пленки, многослойные пакеты для вакуумной упаковки, пакеты из ламинатов [2], [5].

4.5.3 Консервы в потребительской упаковке помещают в транспортную упаковку – ящики из гофрированного картона по ГОСТ Р 54463, ГОСТ 9142, полимерные многооборотные ящики по ГОСТ Р 51289 или в термоусадочную пленку по ГОСТ 25951.

4.5.4 Многооборотная упаковка должна иметь крышку. При отсутствии крышки допускается для местной реализации тару накрывать подпергаментом по ГОСТ 1760, пергаментом по ГОСТ 1341, оберточной бумагой по ГОСТ 8273 или полимерной пленкой.

4.5.5 Допускается использовать другие виды упаковки, соответствующие требованиям, изложенным в 4.5.1.

4.5.6 В каждую единицу транспортной упаковки упаковывают консервы одной даты выработки и одного вида упаковки.

4.5.7 Масса нетто консервов в одной потребительской упаковочной единице должна соответствовать номинальной, указанной в маркировке продукта в потребительской упаковке, с учетом допустимых отклонений.

Пределы допускаемых отрицательных отклонений массы нетто одной упаковочной единицы от номинальной – по ГОСТ 8.579.

4.5.8 Масса нетто консервов в ящиках из гофрированного картона должна быть не более 20 кг, в контейнерах и таре-оборудовании - не более 250 кг; масса брутто продукции в многооборотной таре - не более 30 кг.

4.5.9 Упаковка консервов, отправляемого в районы Крайнего Севера и приравненные к ним местности, ― по ГОСТ 15846.

**5 Правила приемки**

5.1 Правила приемки по ГОСТ 8756.0, ГОСТ 24297 и настоящему стандарту.

5.2 Продукты принимают партиями.

Партией считают определенное количество продукции одного наименования, одинаково упакованной, произведенной (изготовленной) одним изготовителем в определенный промежуток времени, сопровождаемое товаросопроводительной документацией, обеспечивающей прослеживаемость продукции.

5.3 При отрицательных результатах испытаний хотя бы по одному показателю качества партия консервов приемке не подлежит.

5.4 Органолептические показатели консервов определяются в каждой партии.

5.5 Порядок и периодичность контроля физико-химических показателей, микробиологических показателей, содержания токсичных элементов, антибиотиков, пестицидов и радионуклидов устанавливает изготовитель продукции в программе производственного контроля.

5.6 Контроль за содержанием диоксинов проводят в случаях ухудшения экологической ситуации, связанной с авариями, техногенными и природными катастрофами, приводящими к образованию и попаданию диоксинов в окружающую среду, в случае обоснованного предположения о возможном их наличии в продовольственном сырье.

5.7 В случае разногласия по составу и видовой принадлежности используемого сырья проводят идентификацию сырьевого состава консервов:

- молекулярным методом по ГОСТ 31719;

- гистологическим методом по ГОСТ 31479, ГОСТ 19496, ГОСТ 31796.

**6 Методы контроля**

6.1 Отбор проб – по ГОСТ Р 51447, ГОСТ 31904, ГОСТ 8756.0, ГОСТ 32164.

6.2 Подготовка проб для определения токсичных элементов – по ГОСТ 26929, ГОСТ 26671.

6.3 Подготовка проб к микробиологическим исследованиям по – ГОСТ Р 51448, ГОСТ 26669.

Общие требования проведения микробиологического контроля – по ГОСТ ISO 7218.

6.4 Определение органолептических показателей – по ГОСТ 7269, ГОСТ 8756.1, ГОСТ 9959.

6.5 Определение внешнего вида, герметичности тары и состояния внутренней поверхности металлической тары – по ГОСТ 8756.18.

6.6 Определение физико-химических показателей:

- массовой доли жира – по ГОСТ 26183;

- массовой доли белка – по ГОСТ 25011;

- массовой доли крахмала – по ГОСТ 10574, ГОСТ 29301;

- массовой доли поваренной соли – по ГОСТ Р 51480, ГОСТ ISO 1841-2, ГОСТ 26186;

- кислотное число – по ГОСТ Р 55480.

6.7 Определение микробиологических показателей:

- количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов – по ГОСТ 10444.15;

 - бактерий группы кишечных палочек (колиформ) – по ГОСТ 31747;

- бактерий рода Proteus – ГОСТ 28560;

- Staphylococcus aureus – по ГОСТ 31746;

- сульфитредуцирующих клостридий - по ГОСТ 29185, ГОСТ 10444.7, ГОСТ 10444.9;

- Bacillus cereus – по ГОСТ 10444.8;

- патогенных микроорганизмов, в том числе:

 Salmonella – по ГОСТ 31659;

- дрожжей, плесневых грибов – по ГОСТ 10444.12.

6.8 Определение содержания токсичных элементов по ГОСТ Р 51301, ГОСТ 30178 и ГОСТ 30538:

- ртути – по ГОСТ 26927;

- мышьяка – по ГОСТ Р 51766, ГОСТ 26930, ГОСТ 31628;

- свинца – по ГОСТ 26932;

- кадмия – по ГОСТ 26933;

 - олова – по ГОСТ 26935.

6.9 Определение антибиотиков – по ГОСТ 31903, ГОСТ 31694 и нормативным документам, действующим на территории РФ.

6.10 Определение пестицидов – по ГОСТ 32308 и нормативным документам, действующим на территории РФ.

6.11 Определение радионуклидов – по ГОСТ 32164, ГОСТ 32163, ГОСТ 32161.

6.12 Определение диоксинов – по методикам, утвержденным в установленном порядке.

**7 Методы подтверждения соответствия продукции**

7.1 Метод идентификации Апо А-1 проводят по методике двумерного электрофореза.

7.1.1. Аппаратура, материалы, реактивы:

Камера для электрофореза PROTEAN® II xi Cell, фирмы BIO-RAD Cat. No. 165-1934 или аналогичное оборудование в составе с высоковольтным источником тока PowerPac Universal, фирмы BIO-RAD Cat. No. 164-5070, адаптером для проведения изофокусирования [Tube Gel Adaptor](http://www.bio-rad.com/ru-ru/sku/1651940-tube-gel-adaptor) Cat. No 1651940; стеклами для электрофореза фирмы BIO-RAD Cat. No 165-1823, 165-1824 и держателями для стекол PROTEAN II xi Plate Holder Cat. No 165-1992; градиент-формером (например, Gradient Former Model 395 фирмы BIO-RAD); гребенками для электрофореза PROTEAN II xi Comb 2-D, 1,0 мм, фирмы BIO-RAD Cat. No. 165-1897 и 1,5 мм, фирмы BIO-RAD Cat. No. 165-1898; спейсерами для электрофореза PROTEAN II xi Spacers, 1,0 мм, фирмы BIO-RAD Cat. No. 165-1848; стеклянными трубками для изофокусирования в амфолиновом градиенте, 180 см, фирма BIO-RAD Cat. No. 165-3136; рамами для сушки гелей (Gel drying frames size), размер 24 × 24 см, фирма «Sigma», Cat. No. Z377589; иглами для заливки геля в трубки [Tube Gel Loading Needles](http://www.bio-rad.com/ru-ru/sku/1651943-tube-gel-loading-needles) Cat. No 1651943; иглами для экструдии геля из трубки Tube Gel Extrusion Needles Cat. No 1651944.

MALDI-времяпролетно-времяпролетный масс-спектрометр Ultraflextreme, оснащенный УФ –лазером (Nd), фирмы «Bruker»

Целлофановые листы (Extra cellophane sheets), размер 24 × 24 см, фирма «Sigma», Cat. No. Z377600.

Стандарт белков PageRuler Unstained Protein Ladder, смесь 14 рекомбинантных белков от 10 кДа до 200 кДа.

Стандарт белков PageRuler Prestained Protein Ladder, смесь 10 - синий, оранжевый и зеленый – витражи рекомбинантных белков от 10 до 170 кДа.

Мясорубка бытовая по ГОСТ 4025 или электромясорубка бытовая по ГОСТ 20469 с отверстиями решетки диаметром от 3 до 4 мм.

Весы лабораторные по ГОСТ Р 53228 с пределом допускаемой абсолютной погрешности однократного взвешивания не более ± 0,1 мг

pH-метр со стеклянным и хлорсеребряным электродами (или комбинированным стеклянным электродом) с диапазоном измерений от 0 до 14 ед. MettlerToledo FE20 или аналогичное оборудование.

Стаканы по ГОСТ 23932 типа В, исполнения 1, номинальной вместимостью 50,100,200,400,800,1000 см3.

Колбы конические по ГОСТ 25336 с делениями, типа ТС, исполнения 1, вместимостью 50, 100 и 250 см3.

Цилиндры мерные по ГОСТ 1770, 2 класс точности, вместимостью 10, 25, 50, 100, 250, 500 и 1000 см3.

N,N,N’,N’-Тетраметилэтилендиамин (N,N,Ń,Ń – Tetramethylenediamine) (ТЕМЕД) для электрофореза, массовая доля основного вещества не менее 99,0 %,фирмы «Sigma», CAS 110-18-9.

Персульфат аммония (Ammoniumpersulfate) для электрофореза, массовая доля основного вещества не менее 98,0 %, фирмы «Sigma», CAS 7727-54-0.

N,Ń–Метилен-бис-акриламид (N,Ń–Methylenebis(acrylamide) (МБА), массовая доля основного вещества не менее 99,0 %, фирмы «Sigma», CAS 110-26-9.

Трис (гидроксиметил) аминометан (Tris(hydroxymethyl)aminomethane) (Трис) сверхчистый, массовая доля основного вещества не менее 99,9 %, фирмы «Sigma», CAS 77-86-1.

Додецилсульфат натрия (Sodiumdodecylsulfate) (SDS) для электрофореза, массовая доля основного вещества не менее 98,5 %, фирмы «Sigma», CAS 151-21-3.

2 – Меркаптоэтанол (2 – Mercaptoethanol), массовая доля основного вещества не менее 95,0 %, фирмы «Sigma», CAS 60-24-2.

Акриламид (АА) для электрофореза, массовая доля основного вещества не менее 99,0 %, фирмы «Sigma», CAS 79-06-1.

Глицерин (Glycerol) для электрофореза, массовая доля основного вещества не менее 99,0 %, фирмы «Sigma», CAS 56-81-5.

Глицин (Glycine) для электрофореза, массовая доля основного вещества не менее 99,0 %, фирмы «Sigma», CAS 56-40-6.

Фосфорная кислота (Phosphoric acid), массовая доля основного вещества не менее 85%, фирма «Sigma», CAS 7664-38-2.

Индикатор Бромфеноловый синий (Bromphenol Blue sodiumsalt), массовая доля основного вещества не менее 99,9 %, фирмы «Sigma», CAS 62625-28-9.

Кумасси G-250, особой чистоты (BrilliantBlue G-250) массовая доля основного вещества не менее 99,9 %, фирмы «Sigma», CAS 6104-58-1.

Мочевина для электрофореза (Urea), фирмы «Sigma», CAS 57-13-6

Амфолины для изофокусирования (SERVALYT™ 5-7, 2-11, 3-10), фирмы «Serva», Cat. No. 42905.02, 42900.02, 42940.02.

Тритон X-100 (Triton™ X-100), фирмы «Sigma», CAS 9002-93-1.

Ионообменная смола Амберлит (SERDOLIT MB-1), фирмы «Serva», Cat. No. 40701.03.

Агароза (Agarose for electrophoresis), фирмы «Sigma», CAS 9012-36-6.

Нитрат серебра (Silver nitrate), фирмы «Serva», Cat. No. 35110.02.

Тиосульфат натрия (Sodium Thiosulfate Pentahydrate), фирмы «Serva», Cat. No. 30218.01.

Гидрокарбонат натрия (Sodium carbonate anhydrous), фирмы «PanReac», Cat. No. A3900.1000RA.

Формальдегид (Formaldehyde - Solution 37 %), фирмы «PanReac», Cat. No. A0877.1000RA.

Ацетонитрил, фирмы «Sigma», CAS No. 75-05-8.

Модифицированный трипсин, фирмы «Promega», Cat. No. V5111

Трифторуксусная кислота (ТФУ), фирмы «Sigma», Cat. No. CAS 76-05-1.

2,5-дигидроксибензойная кислота, фирмы «Sigma», Cat. No. 490-79-9.

Гидрокарбонат аммония, фирмы «Sigma», Cat. No. 1066-33-7.

Спирт изопропиловый абсолютированный по ГОСТ 9805.

Кислота уксусная по ГОСТ 61.

Кислота серная по ГОСТ 2184.

Этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) по ГОСТ 10652.

Спирт этиловый ректификованный по ГОСТ 5962.

Натрия гидроокись по ГОСТ 4328.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709 или вода для лабораторного анализа по ГОСТ Р 52501.

Шприцы Хамильтон (Hamilton® syringe 10.0 μL, 50.0 μL, 100 μL), фирмы «Sigma».

Пробирки Эппендорф 1,5 мл с крышкой.

Пинцеты по ГОСТ 21241.

Скальпель по ГОСТ 21240.

Фильтровальная бумага 11 мм.

Центрифуга с регулируемой скоростью вращения 15000 об/мин, типа Sigma 3K30, фирмы «Sigma» или аналогичная.

Холодильник по ГОСТ 26678.

Дозатор пипеточный переменного объема дозирования 0,002 - 0,020 см3 с относительной погрешностью дозирования ±1 %.

Дозатор пипеточный переменного объема дозирования 0,020 - 0,200 см3 с относительной погрешностью дозирования ±1 %.

Дозатор пипеточный переменного объема дозирования 0,200 - 1,000 см3 с относительной погрешностью дозирования ±1 %.

Дозатор пипеточный переменного объема дозирования 1,000 - 5,000 см3 с относительной погрешностью дозирования ±1 %

Магнитная мешалка

7.1.2 Подготовка к проведению измерений

7.1.2.1 Приготовление растворов

Приготовление физиологического раствора

В мерную колбу вместимостью 1000 см3 вносят 9,0 г натрия хлористого и доводят объем колбы до метки дистиллированной водой. Содержимое колбы перемешивают. Раствор хранят при температуре 4 °С не более 30 суток.

Приготовление лизирующего раствора для гомогенизации ткани

В химическом мерном стакане вместимостью 100 см3 растворяют (57 ± 0,01) г мочевины, добавляют 5 см3 2-меркаптоэтанола; 2 см3 Тритона X-100 и 2 см3 смеси амфолинов с рН 3-10. Доводят полученный объем бидистиллированной водой до метки, перемешивают и переливают в коническую колбу вместимостью 100 см3 и плотно закрывают крышкой. Раствор хранят при температуре (4 ± 2) °С не более 30 суток.

Приготовление растворов мономеров (30% и 56%) для 1-го и 2-го направления

Для 1-го направления в химический мерный стакан на 100 см3 (для 30 %) вносят 30 г акриламида, 1,6 г МБА, доводят бидистиллированной водой до метки и перемешивают на магнитной мешалке до полного растворения. Для 2-го направления в химический мерный стакан на 500 см3 (для 56 %), вносят 280 г акриламида, 4 г МБА, доводят бидистиллированной водой до метки и перемешивают на магнитной мешалке до полного растворения. Полученные растворы фильтруют и переливают в конические колбы на 100 и 500 см3 и плотно закрывают крышкой. Раствор для 1-го направления хранят при температуре (4 ± 2)°С, , раствор для 2-го направления хранят при (20 ± 2)°С, не более 30 суток.

Приготовление буферного раствора для разделяющего геля 1,0 М Трис–НCl

В химический мерный стакан вместимостью 500 см3 вносят (60,75 ± 0,01) г трис-(гидрооксиметил)аминометана и 400 см3 бидистиллированной воды, доводят рН концентрированной серной кислотой до 8,8. Объем доводят бидистиллированной водой до метки, переливают в коническую колбу на 500 см3 и плотно закрывают крышкой. Раствор хранят при температуре (4 ± 2)°С, не более 30 суток.

Приготовление буферного раствора для концентрирующего геля 0,5 М Трис – НCl

В химический мерный стакан вместимостью вместимостью 500 см3 вносят (30,25 ± 0,01) г трис-(гидрооксиметил)аминометана и 400 см3 бидистиллированной воды, рН доводят концентрированной серной кислотой до 6,8. Объем доводят бидистиллированной водой до метки, переливают в коническую колбу на 500 см3 и плотно закрывают крышкой. Раствор хранят при температуре (4 ± 2)°С, не более 30 суток.

Приготовление раствора додецилсульфата натрия 10%

В химический мерный стакан вместимостью 100 см3 вносят (10,00 ± 0,01) г додецилсульфата натрия (SDS) и 70 см3 бидистиллированной воды, аккуратно перемешивают, доводят полученный объем до метки и фильтруют. Раствор переливают в коническую колбу на 100 см3 и закрывают притертой крышкой. Раствор хранят при температуре (20 ± 2)°С, 30 суток.

Приготовление раствора 10% аммония персульфата

В стеклянную пробирку вместимостью 10 см3 вносят (0,2 ± 0,01) г персульфата аммония и 2 см3 бидистиллированной воды, аккуратно перемешивают. Раствор должен быть свежеприготовленным.

Приготовление защитного раствора для полимеризационных трубок

В стеклянную пробирку вместимостью 10 см3 вносят 1 см3 лизирующего раствора и 1 см3 бидистиллированной воды, аккуратно перемешивают. Раствор должен быть свежеприготовленным.

Приготовление раствора 20 % Тритона x-100

В стеклянную пробирку вместимостью 10 см3 вносят 2 см3 Тритона x-100 и 8 см3 бидистиллированной воды, аккуратно перемешивают. Раствор хранят при температуре (4 ± 2)°С, не более 30 суток.

Приготовление переводного (белкового) буфера

В химический мерный стакан вместимостью 100 см3 вносят (30 ± 0,01) г мочевины; 12,5 см3 раствора 0,5 М трис-(гидрооксиметил)аминометана при рН = 6,8; 5 см3 2 – меркаптоэтанола и 20 см3 10% раствора додецилсульфата натрия. Объем доводят бидистиллированной водой до метки, тщательно перемешивают и переносят в коническую колбу вместимостью 100 см3 с притертой крышкой. Раствор хранят при температуре (4 ± 2)°С, не более 30 суток.

Приготовление электродного буфера pH 8,3

В химическом стакане вместимостью 1000 см3 вносят (18,00 ± 0,01) г трис-(гидрооксиметил)аминометана; (86,40 ± 0,01) г глицина; (6,00 ± 0,01) г додецилсульфата натрия и 500 см3 бидистиллированной воды. Полученный объем доводят бидистиллированной водой до 6000 см3, тщательно перемешивают и переносят в бутыль вместимостью 6000 см3, плотно закрывают. Раствор хранят при температуре (20± 2)°С, не более 30 суток.

Приготовление окрашивающего раствора

В коническую колбу вместимостью 500 см3 вносят (1,00 ± 0,01) г Кумасси G-250 бриллиантового голубого, добавляют 500 см3 пропанола, 200 см3 кислоты уксусной ледяной и доводят объем бидистиллированной водой до 400 см3. Содержимое тщательно перемешивают и переносят в бутыль вместимостью 2000 см3,закрывают. Раствор хранят при температуре (20 ± 2)°С, не более 30 суток в плотно закрытой бутылке под тягой.

Приготовление дегидратирующего раствора для сушки гелей

В коническую колбу вместимостью 500 см3 вносят 250 см3 этилового спирта и 15 см3 глицерина. Объем доводят бидистиллированной водой до 500 см3, тщательно перемешивают и переносят в бутыль вместимостью 500 см3. Раствор хранят при температуре (20 ± 2)°С, не более 30 суток в плотно закрытой бутылке под тягой.

Приготовление агарозы для фиксирования трубок

В химический мерный стакан вместимостью 100 см3 вносят (0,5 ± 0,01) г агарозы; (0,1 ± 0,01) г бромфенолового синего и добавляют 50 см3 электродного буфера. Переносят полученный раствор в коническую колбу на 100 см3. Раствор хранят при температуре (20 ± 2)°С, не более 90 суток.

Приготовление анодного буфера для изоэлектрофокусирования

В коническую мерную колбу вместимостью 200 см3 вносят 196 мг фосфорной кислоты и приливают дистиллированной воды до метки. Раствор должен быть свежеприготовленным.

Приготовление катодного буфера для изоэлектрофокусирования

В коническую мерную колбу вместимостью 200 см3 вносят160 мг натрия гидроокиси и приливают дистиллированной воды до метки. Раствор должен быть свежеприготовленным.

Приготовление полимеризационной смеси ПААГ-1

В химический мерный стакан или стеклянную пробирку вместимостью 50 см3 вносят 12 г мочевины, 6,75 см3 дистиллированной воды, 3 мл 30 % раствора мономеров для 1-го направления и 2,25 см3 20 % раствора Тритона Х-100. После полного растворения мочевины смесь обрабатывают ионообменной смолой амберлит МБ-1, фильтруют и добавляют 225 см3 амфолинов рН 3,5-10 и 0,9 см3 амфолинов рН 5-7. Затем смесь дегазируют и непосредственно перед заливкой в трубки к ней добавляют 0,0325 см3 10% персульфата аммония и 0,0225 см3 ТЕМЕД. Для составления 12-ти колонок ПААГ необходимо 20 см3 полимеризационной смеси. Раствор должен быть свежеприготовленным.

Приготовление «легкого» раствора для ПААГ-2 (концентрация АА 7,5%)

В коническую мерную колбу вместимостью 200 см3 для получения 109 см3 готового раствора вносят 39,6 см3 1 М Трис-HCl буфера (рН 8,8); 1,1 см3 10% раствора SDS, 0,058 см3 ТЕМЕД, 13,8 см3 60% раствора мономеров для 2-го направления, 54,2 см3 дистиллированной воды и 0,264 см3 10% раствора персульфата аммония. Раствор должен быть свежеприготовленным.

Приготовление «тяжелого» раствора для ПААГ-2 (концентрация АА 25%)

В коническую мерную колбу вместимостью 200 см3 для получения 109 см3 готового раствора вносят 39,6 см3 1 М Трис-HCl буфера (рН 8,8); 1,1 см3 10% раствора SDS, 0,058 см3 ТЕМЕД, 46 см3 60% раствора мономеров для 2-го направления, 22,5 см3 бидистиллированной воды и 0,264 см3 10% раствора персульфата аммония. Раствор должен быть свежеприготовленным.

Приготовление 20% раствора ацеонитрила

В стеклянную пробирку вносят 79 мг гидрокарбоната аммония и 10 см3 бидистилированной воды, отбираем 6 см3 полученного раствора и добавляем 4 г ацетонитрила. Раствор должен быть свежеприготовленным.

Приготовление раствора модифицированного трипсина

В коническую мерную колбу вместимостью 1000 см3 вносят 3,95 г гидрокарбоната аммония и доводят объем до метки дисстилированной водой. В полученный раствор добавляют 15 мг модифицированного трипсина.

Приготовление 0,5% ТФУ в 50% растворе водного ацетонитрила

В стеклянную пробирку вместимостью 10 см3 вносят 5 см3 бидистиллированной воды, 5 г ацетонитрила и 0,05 см3 ТФУ. Тщательно перемешивают. Раствор должен быть свежеприготовленным.

Приготовление фиксирующего раствора

В стеклянную пробирку вместимостью 10 см3 вносят 7,9 см3 бидистиллированной воды, 2 г ацетонитрила, 0,01 см3 ТФУ и 0,2 см3 2,5-дигидроксибензойной кислоты. Тщательно перемешивают. Раствор должен быть свежеприготовленным.

7.1.2.2 Подготовка образца к испытанию

Навеску 100 г консервов количественно переносят в пластиковую центрифужную пробирку или стакан объемом 15 см3, перемешивают с помощью стеклянной палочки и трижды промывают холодным физиологическим раствором, после чего гомогенизируют в системе тефлон-стекло с 2 мл лизирующего раствора. Полученный гомогенат центрифугируют на центрифуге при 7000 об/мин в течение 10 мин. Надосадочную жидкость (белковый экстракт) сливают в мерный цилиндр и измеряют ее объем. Белковые экстракт наносят на трубку геля ИЭФ в количестве 50 или 75 мкл. Пробы хранят в холодильнике при температуре минус 30 °С, не более 7 суток.

8.1.2.3 Подготовка ПААГ для проведения измерений

Приготовление ПААГ-1 для фракционирования белков в первом направлении

Для фракционирования белков в первом направлении (изоэлектрофокусирование в градиенте рН, созданном амфолинами, IEF) приготовленную непосредственно перед измерением полимеризационную смесь ПААГ-1 в стеклянные трубки вносят шприцом, заполняя трубки снизу вверх до одинакового уровня на 2-3 см ниже верхнего края (высота колонки геля 13 см). Сверху наслаивают по 50 мкл дистиллированной воды. Через 30-40 минут по окончании полимеризации геля воду над его поверхностью удаляют и трубки устанавливали в гель-электрофоретическую камеру. В нижний резервуар камеры наливают катодный буфер. В трубки наносят пробы анализируемые белковых экстрактов в объеме 100 мкл (100 мкг белка). Сверху на пробы, по краям трубки, наслаивают защитный раствор, верхнюю камеру прибора заполняют анодным буфером.

Приготовление ПААГ-2 для фракционирования белков во втором направлении

Для фракционирования белков во втором направлении (электрофорез в присутствии SDS, SDS-PAGE) приготовленную непосредственно перед измерением полимеризационную смесь ПААГ-2 готовят в специальных блоках для полимеризации из двух стеклянных пластин размером 200х200х1 мм.

Подготовка блоков: у левого, правого и нижнего краев между пластинами устанавливают узкие пластиковые спейсеры (ширина 1 см, толщина 1 мм, длина должна соответствовать размерам пластин), плотно фиксируют пластины и спейсеры между собой и герметизируют блок. ПААГ-2 формируют в собранных блоках в виде гелевых пластин с градиентом концентрации акриламида 7,5-25%. Полимеризационную смесь составляют из двух растворов: «легкого» (концентрация АА 7,5%) и «тяжелого» (концентрация АА 25%).

Для составления полимеризационной смеси использовали «градиент – формер», представляющий собой два одинаковых по размерам сообщающихся сосуда, соединение между которыми перекрывается краном. При этом один из сосудов имеет внешний выход, также перекрывающийся краном. Перед началом работы (оба крана перекрыты) в сосуд с внешним выходом заливают 18 см3 «тяжелого» раствора, а в другой сосуд – 18 см3 «легкого» раствора. Затем в сосуд с внешним выходом устанавливают электромешалку и включают её, а к внешнему выходу подсоединяют перистальтический насос. Далее открывают оба крана, включают перистальтический насос и с его помощью заполняют формирующейся в сосуде с внешним выходом полимеризационной смесью (с линейно уменьшающейся концентрацией АА от 25% до 7,5%) пространство между двумя стеклянными пластинами в блоке для полимеризации. После заполнения блока на полимеризационную смесь для ПААГ-2 наслаивали воду. Через 30-40 минут по окончании полимеризации геля воду над его поверхностью удаляют и заливают раствор, формирующий концентрирующий ПААГ (ПААГ-К).

На 6 пластинах ПААГ-2 готовят 50 мл полимеризационной смеси для ПААГ-К, которая состояла из 3,3 см3 60% раствора мономеров для 2-го направления, 33,3 см3 дистиллированной воды, 12,7 см3 Tрис-HCl буфера (рН 6,8), 0,5 см3 10% раствора SDS, 0,0375 см3 ТЕМЕД и 0,375 см3 10% раствора персульфата аммония. Сверху осторожно наслаивают небольшое количество воды. Через 20-30 минут по окончании полимеризации ПААГ-К, сформированные в блоках пластины ПААГ-2 с линейным градиентом концентрации акриламида 7,5-25% готовы к проведению измерений.

7.1.3 Фракционирование белков по методике двумерного электрофореза.

7.1.3.1. Фракционирование белков в первом направлении – изоэлектрофокусирование в амфолиновом градиенте pH в тонких колонках ПААГ-1

В гель-электрофоретическую камеру устанавливают трубки, содержащие ПААГ-1, в нижний резервуар которой предварительно вносили катодный раствор. В каждую трубку на поверхность ПААГ-1 наносят 0,05-0,075 см3 анализируемого белкового экстракта. Затем сверху на каждую трубку до краев наслаивают защитный раствор. Верхнюю камеру прибора заполняют анодным раствором. Готовую к использованию гель-электрофоретическую камеру подсоединяют к источнику электроэнергии и выполняли изоэлектрофокусирование. Изоэлектрофокусирование проводят сначала 30 мин при напряжении 400 В (достигая 200 В/ч) и затем при напряжении 1000 В (до суммарного 3600 В/ч).

По окончании изоэлектрофокусирования колонки геля вынимают из трубок с помощью шприца с тонкой иглой, наполненного водой, вымачивают в 5 см3 «переводного» раствора в течение 10 мин при (20 ± 2)°С и используют для фракционирования во втором направлении. Колонки хранят в холодильнике при температуре минус 20 °С, не более 30 суток для последующего завершения анализа.

7.1.3.2 Фракционирование белков во втором направлении – электрофорез в пластинах ПААГ в присутствии SDS (SDS-PAGE)

Каждую колонку ПААГ-1, полученную после фракционирования в первом направлении, выкладывают на торец градиентной пластины ПААГ-2 и заливают расплавленным раствором агарозы для фиксации. Параллельно до образования геля агарозы на торце каждой градиентной пластины рядом с уложенной колонкой ПААГ-1 формируют лунку для нанесения образца, содержащего белки-маркеры (0,04 см3 в каждую лунку). Через 5 мин, по окончании затвердевания агарозного геля пластину помещают в прибор для вертикального электрофореза. SDS-PAGE проводят в течение 16-18 ч (сначала 1ч – 15 мА/гель; 15-17ч – 5 мА/гель), затем устанавливают завершающие параметры – 30 мА/гель (250 В, 13 Вт) и завершают фракционирование, когда маркерный краситель (бромфеноловый синий) достигает нижнего края гелевых пластин. Окраску полученных гелей производят с помощью раствора, содержащим Кумасси G-250, а затем, после отмывки 10 % уксусной кислотой, завершают окрашивание нитратом серебра.

7.1.4 Масс-спектрометрическая идентификация Апо А-1

7.1.4.1 Подготовка к масс-спектрометрии

На влажных гелях, полученных не позднее чем через 48 часов после завершения отмывки от несвязавшегося красителя, выбирают белковую фракцию Мм/pI (эксп.) = 25,0/4,95, Мм/pI (расчет.)= 30,3/5,38 (Приложение Б, Рисунок Б.1, номера веществ 14 и 13). Выбранные для идентификации белковые фракции, вырезают из гелевых пластин (фрагменты не более 3-4 мм3), дважды промывают для удаления красителя в 0,1 см3 раствора ацетонитрила в течение 20 мин при 37°С. После удаления раствора, для дегидратации геля добавляют 0,1 см3 ацетонитрила. Удалив ацетонитрил и высушив фрагмент геля, прибавляют к нему 0,035 см3 раствора модифицированного трипсина. Гидролиз проводят в течение 2 ч при 37°С, затем к раствору добавляют 0,00525 см3 раствора ТФУ и тщательно перемешивают. Надгелевый раствор – анализируемый образец (0,0005 см3) смешивают на мишени с эквивалентным объемом фиксирующего раствора, и высушивают на воздухе.

7.1.4.2 Проведение испытаний

Масс-спектры получают на MALDI-времяпролетно-времяпролетном масс-спектрометре в режиме положительных ионов c использованием рефлектрона; точность измеренных моноизотопных масс после докалибровки по пикам автолиза трипсина составляет 0,007% (70 ppm).

Спектры получают в диапазоне масс 500-6500 m/z; выбирая мощность лазера оптимальную для наилучшего разрешения и калибруют их, используя известные внутренние стандарты.

Для получения спектров фрагментации используют тандемный режим прибора при детекции положительных ионов. Фрагментацию ионов индуцируют подачей гелия в область начального участка траектории свободного дрейфа ионов (давление инертного газа 2 10-7 Па). Погрешность измерения масс фрагментов не должна превышать 0.05 %. На масс-спектре присутствуют только сигналы С-концевых фрагментов пептидов, претерпевших разрыв по пептидной связи (y-ионы).

7.1.5 Обработка полученных результатов

Итоговую идентификацию белков проводят с помощью программы Mascot, опция PeptideFingerprint («MatrixScience», США), с точностью определения массы МН+ равной 0.01% (допускается возможность модификации цистеинов акриламидом и окисления метионинов); по базам данных Национального центра биотехнологической информации США (NCBI). Кандидатные белки, имеющие параметр достоверности score>75 в базе данных NCBI считают определенными достоверно (P<0.05) (Приложение Б, Таблица Б.1).

7.2 Метод идентификации тканеспецифических пептидов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

7.2.1. Аппаратура, материалы, реактивы по ГОСТ 33422

7.2.2 Подготовка к испытанию

7.2.2.1.Приготовление растворов

Приготовление 20 % раствора ацетонитрила

В мерную коническую колбу вместимостью 100 см3 вносят 20 см3 ацетонитрила и доводят до метки дистиллированной водой

Приготовление буферного раствора трис-(гидроксиметил)-аминометана молярной концентрации 0,1 моль /дм3 (раствор ТрисHCl)

В мерную коническую колбу вместимостью 1000 см3 вносят 12,11 г трис-(гидроксиметил)-аминометана и доводят до метки дистиллированной водой, рН доводят концентрированной соляной кислотой до 8,0, контролируя рН-метром, переносят в бутыль вместимостью 1000 см3,закрывают. Раствор хранят при температуре (4 ± 2)°С, не более 30 суток в плотно закрытой бутылке.

Приготовление смеси ацетонитрила с раствором соляной кислоты молярной концентрации с(НCl) 0,1 моль /дм3 (4:1,8)

В мерную коническую колбу вместимостью 100 см3 вносят 70-80 см3 дистиллированной воды, с помощью механического дозатора приливают 0,85 см3 концентрированной соляной кислоты (р=1,188 г/см3) и доводят объем до метки дистиллированной водой. Ацетонитрил смешивают с раствором соляной кислоты молярной концентрации 0,1 моль/дм3 в соотношении 4:1,8. Раствор хранят при температуре (4 ± 2)°С, не более 30 суток в плотно закрытой бутылке.

Приготовление смеси бутанола с хлористым ацетилом (4:1)

В 4 объема бутанола по каплям прибавляют один объем ацетила. Приготовление раствора проводят под вытяжкой, с охлаждением раствора проточной водой или льдом. Раствор готовят в небольших колбах непосредственно перед испытанием.

Приготовление 1 % раствора муравьиной кислоты

В мерную коническую колбу вместимостью 1000 см3 вносят 900 см3 дистиллированной воды и 10 см3 муравьиной кислоты, тщательно перемешивают и доводят объем до метки дистиллированной водой. Раствор хранят при температуре (4 ± 2)°С, не более 30 суток в плотно закрытой бутылке.

Приготовление подвижной фазы хроматографической системы

Для проведения хроматографического анализа используют двухкомпонентную подвижную фазу:

- элюент А: ацетонитрил – метанол (1:1);

- элюент Б: 1 % раствор муравьиной кислоты.

Перед проведением испытаний элюенты дегазируют на ультразвуковой бане.

7.2.2.2 Подготовка образца к испытанию по ГОСТ 33422.

7.2.3 Проведение испытаний

7.2.3.1 Хроматографические условия измерений

Условия проведения ВЭЖХ-МС/МС анализа подбираются в зависимости от вида применяемого жидкостного хроматографа, масс-спектрометрического детектора и хроматографической колонки.

Разделение проводят в режиме градиентного элюирования, соотношение элюентов, скорость потока и температура указаны в Приложении В, таблице В.1. Объем вводимой пробы – 0,01 см3.

7.2.3.2 Параметры настройки масс-спектрометрического детектора

Для анализа подобраны следующие параметры масс-спектрометрического детектирования: температура источника – 100ºС; температура газа десольвации – 350ºС; скорость потока газа десольвации – 5 дм3/мин; давление иглы распылителя – 45 psi (3,1 Бар).

Условия регистрации аналитических сигналов в режиме селективного йонного детектирования (SIM) и мониторинга множественных реакций (MRM) представлены в Приложении В, таблице В.2.

Условия детектирования оптимизируют в ручном режиме используя растворы веществ различных концентраций (1000, 500, 100, 50 и 10 нг/см3), соотношение сигнал/шум (S/N) молекулярного иона должно быть не менее 1:10. Напряжение на фрагменторе оптимизируют с шагом 10 V по максимальному отклику протонированного молекулярного иона. Энергию диссоциации (CE) оптимизируют с шагом 5 V по максимальному отклику характерного дочернего иона.

7.2.3.3 Градуировка ВЭЖХ-МС/МС системы

Приготовленный градуировочные растворы подвергают ВЭЖХ-МС/МС анализу в условиях, выбранных в соответствии с 8.2.3.2. Для каждого уровня анализируют по три параллельные пробы. Полученные хроматограммы обрабатывают с использованием компьютерной системы обработки данных. Определяют абсолютное время удерживания целевых веществ. С использованием средств программного обеспечения строят градуировочную зависимость площади пика определяемых веществ от концентрации аналита в пробе. Коэффициент линейной корреляции полученной градуировочной зависимости должен быть не менее 0,99. При невыполнении этого условия выясняют причины, приводящие к неудовлетворительным результатам, и устраняют их. В случае необходимости готовят новые градуировочные растворы. Проведение градуировки обязательно при замене хроматографической колонки, а также при систематическом получении неудовлетворительных результатов контроля.

7.2.3.4 Контроль аналитической системы

Выполняют с использованием приготовленных градуировочных растворов. Полученный результат анализа не должен отличаться от действительного значения концентрации определяемых веществ в градуировочном растворе более чем на 3 %, относительное стандартное отклонение времени удерживания аналитов, не более чем на 5 %. В случае невыполнения указанного критерия стабильности градуировочной характеристики, проводят новую градуировку.

Контроль аналитической системы осуществляется при условиях, указанных в 8.2.3.2 перед началом проведения измерений, а также при смене хроматографической колонки, чистке блоков аналитического прибора и т.д.

7.2.3.5 Выполнение измерений

Для контроля фона прибора, перед началом серии измерений, между анализами проб в хроматограф вводят 0,002 см3 подвижной фазы (A-98%,В-2%).

В виалы вместимостью 2 см3 вносят подготовленную пробу (разведенную в 100 раз) и анализируют на системе ВЭЖХ-МС/МС при условиях, указанных в 8.2.3.2. По значению площади хроматографического пика с использованием установленной градуировочной характеристики и программы обработки данных находят массовую концентрацию веществ в анализируемом растворе.

Вычисление массовой доли веществ в анализируемой пробе экстракта проводят для каждого из двух параллельных определений. Отклонения относительных ионных интенсивностей в анализируемой пробе от относительных ионных интенсивностей, полученных при анализе градуировочных растворов, не должны превышать значений, указанных в Приложении В, таблице В.3.

7.2.3.6. Обработка полученных результатов

Полученные хроматограммы образцов сравнивают с хроматограммой фона прибора (подвижной фазы), удаляя совпадающие пики. Оставшиеся пики анализируют на наличие пиков, соответствующих пептидам с молекулярной массой 809,4±1,0 Да, 776,5±1,0 Да, 765,6±1,0 Да, 739,2±1,0 Да, 710,8±1,0 Да, 229,2±1,0 Да, 162,1±1,0 Да, 156,0 ±1,0 Да, 148,1±1,0 Да, 140,2±1,0 Да, 133,1±1,0 Да.

**8 Транспортирование и хранение**

8.1 Консервы транспортируют всеми видами транспорта в соответствии с правилами перевозок грузов, при температуре от 0 оС до 20 оС и относительной влажности воздуха не более 50 %. В пакетированном виде транспортируют по ГОСТ 26663. Средства скрепления в транспортные пакеты по ГОСТ 21650 с основными параметрами и размерами по ГОСТ 24597.

8.2 Консервы хранят в соответствии с правилами хранения при температуре от 0°С до 20°С и относительной влажности воздуха не более 75 %.

8.3 Хранение консервов на складах транспортных предприятий не допускается.

8.4 Срок годности консервов устанавливает изготовитель. Рекомендуемый срок годности – не более 180 сут.

8.5 Транспортирование и хранение консервов, отправляемого в районы Крайнего Севера и приравненные к ним местности, ― по ГОСТ 15846.

**Приложение А**

**(справочное)**

**Информационные сведения о пищевой**

**ценности 100 г консервов**

А.1 Информационные сведения о пищевой и энергетической ценности 100 г консервов «Здоровое сердце» приведены в таблице А.1.

Т а б л и ц а А.1

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Наименование продукта | Белок, г | Жир, г | Калорийность,ккал,  | Энергетическая ценность, кДж |
| Консервы «Здоровое сердце» | От 16, 5 до 18,0 | От 3,5 до 4,0 | От 96 до 108 | От 410 до 460 |

**Приложение Б**

**(обязательное)**

**Метод идентификации Апо А-1**



Р и с у н о к Б. 1 – 2-D электрофореграммы: замороженные аорты (А) и сердца (В) свиней (окраска серебром), консервы «Здоровое сердце» (Б) (окраска Кумасси). Квадрат сплошной линией – тропомиозин (33 кДа), квадрат прерывистой линией – легкие цепи миозина (18-19, 21-22 кДа), овал сплошной линией – Апо А-1 (23-24 кДа), овал прерывистой линией – пероксиредоксин в смеси с трансгелином (8,8кДа и 22 кДа).

Б.2 Параметры идентификации белков

Т а б л и ц а Б.2

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| № веществ | Наименование белка; (символ гена)  | Номера в ProteinNCBI/ UniProt или Blast | S / M/ C\* | Мм/pI (эксп.)\*\* | Мм/pI (расчет.)\*\* |
| 13 | apolipoprotein A-I preproprotein\*\*\*\* (APOA1) | 47523850 | 177/19/51 | 25,0/5,00 | 30,0/5,47 |
| 14 | apolipoprotein A-I (APOA1) | 164359 | 152/15/46 | 25,0/4,95 | 30,3/5,38 |

\* S / M/ C - традиционные показатели идентификации, принятые в англоязычной литературе: Score - показатель соответствия или «счет очков»; Matchpeptides - количество совпавших пептидов; Coverage - % покрытия полной аминокислотной последовательности белка выявленными пептидами.

\*\* Мм/pI (эксп.) – полученные оценки по результатам электрофоретической подвижности на ДЭ, а Мм/pI (расчет.) – расчетные оценки, сделанные из данных об аминокислотной последовательности с учетом удаления сигнального пептида, но без учета других постсинтетических модификаций с использованием программы ExPASyComputepI/Mwtool.

\*\*\*\* msms – указание на подтверждающую идентификацию с помощью тандемной масс-спектрометрии и количество секвенированныхтриптических пептидов.

**Приложение В**

**(обязательное)**

**Метод идентификации тканеспецифических пептидов**

**методом ВЭЖХ МС/MC**

В.1 Параметры и условия ВЭЖХ

Т а б л и ц а В. 1

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Время,мин | Соотношение компонентовподвижной фазы | Скоростьпотока,см3/мин | Температура колонки, ºС |
| А, % | В, % |
| 0 | 98 | 2 | 0,4 | 40 |
| 0,5 | 98 | 2 | 0,4 | 40 |
| 4 | 65 | 35 | 0,4 | 40 |
| 5 | 20 | 80 | 0,4 | 40 |
| 7 | 10 | 90 | 0,4 | 40 |
| 7,5 | 98 | 2 | 0,4 | 40 |
| 12 | 98 | 2 | 0,4 | 40 |

В.2 Параметры настройки масс-спектрометрического детектора

Т а б л и ц а В. 2

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Диапазон, m/z | Напряжение на фрагменторе (Frag), В | Энергия диссоциации (CE), В |
| 50-2000 | 70-150 | 0-40 |

В. 3 Градуировка ВЭЖХ-МС/МС системы. Допустимые отклонения относительных ионных интенсивностей

Т а б л и ц а В. 3

|  |  |
| --- | --- |
| Относительная ионная интенсивность, % от основного пика | Максимально допустимые отклонения для ВЭЖХ-МС/МС детектирования, % |
| Св. 50 | ± 20 |
| от 20 до 50 включ. | ± 25 |
| От 10 до 20 включ. | ± 30 |
| Менее 10 | ± 50 |

# Библиография

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| [1] | ТР ТС 034/2013 | Технический регламент Таможенного союза «О безопасности мяса и мясной продукции» |
| [2] | ТР ТС 021/2011 | Технический регламент Таможенного союза «О безопасности пищевой продукции**»** |
| [3] | ТР ТС 027/2012 | Технический регламент Таможенного союза «О безопасности отдельных видов специализированной пищевой продукции, в том числе диетического лечебного и диетического профилактического питания» |
| [4] | ТР ТС 022/2011 | Технический регламент Таможенного союза «Пищевая продукция в части ее маркировки» |
| [5] | ТР ТС 005/2011 | Технический регламент Таможенного союза «О безопасности упаковки» |

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

УДК …… МКС …..

Ключевые слова: консервы, «Здоровое сердце», пищевые продукты диетического профилактического питания, атеросклероз, технические требования, показатели безопасности,

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_