



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)  
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0026310

(51)<sup>7</sup> A23L 2/52; A23C 23/00

(13) B

(21) 1-2015-00457

(22) 31/07/2012

(86) PCT/JP2012/069393 31/07/2012

(87) WO 2014/020677 A1 06/02/2014

(45) 25/11/2020 392

(43) 25/05/2015 326A

(73) MEGMILK SNOW BRAND Co., Ltd. (JP)

1-1, Naechocho 6-chome, Higashi-ku, Sapporo-shi, Hokkaido 065-0043 Japan

(72) OHMACHI, Aiko (JP); MATSUYAMA, Hiroaki (JP); MORITA, Yoshikazu (JP);  
ISHIDA, Yuko (JP); NARA, Takayuki (JP); KATO, Ken (JP); SERIZAWA, Atsushi  
(JP); UENO, Hiroshi (JP); URAZONO, Hiroshi (JP).

(74) Công ty TNHH một thành viên Sở hữu trí tuệ VCCI (VCCI-IP CO.,LTD)

(54) ĐỒ UỐNG VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT ĐỒ UỐNG NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến đồ uống hữu dụng trong phòng ngừa và điều trị các bệnh về xương như bệnh loãng xương, gãy xương, bệnh thấp khớp và viêm khớp bằng cách sử dụng hàng ngày. Đồ uống chứa angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin với lượng cao hơn 0,8mg/100ml và không cao hơn 150mg/100ml và xystatin và/hoặc sản phẩm thủy phân của xystatin theo tỷ lệ khối lượng so với angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin nằm trong khoảng từ 0,006 đến 1,7. Xương có thể được tăng cường độ bền và các bệnh về xương như bệnh loãng xương, gãy xương, bệnh thấp khớp và viêm khớp có thể được phòng ngừa hoặc điều trị bằng việc sử dụng đồ uống. Sáng chế cũng đề cập đến các phương pháp sản xuất đồ uống này.

### **Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập**

Sáng chế đề cập đến đồ uống và phương pháp sản xuất đồ uống. Đồ uống này chứa thành phần sữa đặc trưng và có thể hữu dụng trong phòng ngừa và điều trị các bệnh về xương như bệnh loãng xương, gãy xương, bệnh thấp khớp và viêm khớp.

### **Tình trạng kỹ thuật của sáng chế**

Trong những năm gần đây, các bệnh về xương như bệnh loãng xương, gãy xương và đau lưng gia tăng trên toàn cầu cùng với sự lão hóa trong xã hội và tương tự và trở thành một vấn đề xã hội nghiêm trọng. Nguyên nhân gây ra những căn bệnh này là do sự hấp thu canxi không đầy đủ, suy giảm khả năng hấp thu canxi, mất cân bằng hoocmon sau khi mãn kinh và tương tự. Xét thấy rằng, gia tăng khối lượng xương cơ thể nhiều nhất có thể bằng cách kích hoạt tạo cốt bào và quá trình hình thành xương từ giai đoạn sớm trong cuộc đời và sự gia tăng khối lượng xương cực đại và độ bền chắc của xương (mật độ xương + chất lượng xương) là hữu hiệu trong việc phòng ngừa các bệnh về xương như bệnh loãng xương, gãy xương và đau lưng. Lưu ý rằng, thuật ngữ “chất lượng xương” dùng để chỉ vi cấu trúc xương, quá trình quay vòng chuyển hóa, gãy xương vi thể và quá trình vôi hóa. Có thể thấy rằng, các bệnh về xương như bệnh loãng xương, gãy xương và đau lưng có thể được phòng ngừa bằng cách ngăn chặn quá trình tiêu xương do hủy cốt bào. Quá trình tiêu xương và hình thành xương thường được lặp đi lặp lại theo cách cân bằng (quá trình tái tạo xương). Tuy nhiên, các bệnh về xương như bệnh loãng xương, gãy xương và đau lưng có thể xuất hiện khi quá trình tiêu xương vượt trội hơn quá trình tạo xương do sự thay đổi về cân bằng hoocmon sau khi mãn kinh và tương tự. Do đó, xương có thể được tăng cường củng cố bằng cách ngăn chặn quá trình tiêu xương do hủy cốt bào và duy trì độ bền chắc của xương ở mức độ hằng định.

Theo quan điểm mô tả ở trên, thuốc, thức ăn, đồ uống, thực phẩm hoặc tương tự, trong đó muối canxi như canxi cacbonat, canxi phosphat hoặc canxi lactat hoặc sản phẩm canxi tự nhiên như canxi trong nước sữa, bột xương bò

hoặc vỏ trứng được bổ sung một cách riêng biệt, đã được dùng để tăng cường độ bền chắc xương. Thuốc, thức ăn, đồ uống, thực phẩm hoặc tương tự chứa sản phẩm canxi như vậy cùng với chất có tác dụng tăng cường hấp thu canxi như casein phosphopeptit hoặc oligosacarit cũng đã được sử dụng để tăng cường độ bền chắc xương. Tuy nhiên, tốc độ hấp thu canxi bằng 50% hoặc thấp hơn khi sử dụng thức ăn hoặc đồ uống chứa muối canxi hoặc sản phẩm canxi tự nhiên và phần lớn lượng canxi đã dùng có thể được thải ra khỏi cơ thể mà không được hấp thu. Hơn nữa, ngay cả khi canxi được hấp thu vào trong cơ thể, nó không nhất thiết thể hiện tác dụng cải thiện sự chuyển hóa xương hoặc tác dụng tăng cường độ bền chắc xương, vì ái lực đối với xương có thể tùy theo dạng xương hoặc loại thành phần dinh dưỡng được sử dụng. Sản phẩm estrogen, sản phẩm vitamin D<sub>3</sub> hoạt tính, sản phẩm vitamin K<sub>2</sub>, sản phẩm bisphosphonat, sản phẩm canxitonin và sản phẩm tương tự đã được biết ở dạng thuốc để điều trị bệnh loãng xương hoặc tăng cường độ bền chắc xương và các thuốc mới như kháng thể kháng RANKL cũng đã được phát triển. Tuy nhiên, các thuốc này có thể có tác dụng phụ như gây ù tai, đau đầu hoặc mất cảm giác ngon miệng. Hơn nữa, hiện tại các chất nêu trên ở trong tình trạng không thể bổ sung được vào thức ăn hoặc đồ uống theo quan điểm về độ an toàn, chi phí và yếu tố tương tự. Do đó, xét theo bản chất của các bệnh về xương như bệnh loãng xương, gãy xương và đau lưng, việc phát triển thức ăn hoặc đồ uống như vậy mà chúng có thể được dùng theo đường miệng trong thời gian dài làm gia tăng độ bền chắc của xương bằng cách thúc đẩy quá trình hình thành xương và ngăn chặn quá trình tiêu xương và có thể được kỳ vọng có tác dụng phòng ngừa hoặc điều trị các bệnh về xương được mong đợi.

Tài liệu nêu trong phần tình trạng kỹ thuật

Tài liệu sáng chế

Tài liệu sáng chế 1: JP-A-H08-151331

Tài liệu sáng chế 2: JP-A-H10-7585

Tài liệu sáng chế 3: JP-A-2000-281587

**Bản chất kỹ thuật của sáng chế**

Vấn đề được giải quyết bởi sáng chế

Mục đích của sáng chế là nhằm đề xuất đồ uống có thể hữu dụng trong phòng ngừa và điều trị các bệnh về xương như bệnh loãng xương, gãy xương, bệnh thấp khớp và viêm khớp.

Cách thức giải quyết vấn đề

Các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng, mật độ xương có thể được tăng lên một cách hiệu quả bằng cách sử dụng đồ uống chứa angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin và chứa xystatin và/hoặc sản phẩm thủy phân của xystatin theo tỷ lệ khối lượng cụ thể so với angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin. Phát hiện này đã dẫn đến việc hoàn thành sáng chế.

Cụ thể, sáng chế đề cập đến các khía cạnh sau:

(1) Đồ uống chứa angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin với lượng cao hơn 0,8mg/100ml và không cao hơn 150mg/100ml và xystatin và/hoặc sản phẩm thủy phân của xystatin theo tỷ lệ khối lượng so với angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin nằm trong khoảng từ 0,006 đến 1,7.

(2) Phương pháp phòng ngừa các bệnh về xương bao gồm bước sử dụng đồ uống theo mục (1) với lượng 200ml/ngày hoặc cao hơn.

(3) Phương pháp sản xuất đồ uống theo mục (1), bao gồm bước bổ sung angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin và xystatin và/hoặc sản phẩm thủy phân của xystatin vào nguyên liệu đồ uống thô và vô trùng hỗn hợp.

(4) Phương pháp sản xuất đồ uống theo mục (1), bao gồm bước bổ sung angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin và xystatin và/hoặc sản phẩm thủy phân của xystatin vào nguyên liệu đồ uống thô vô trùng.

Hiệu quả có lợi của sáng chế

Đồ uống theo sáng chế thể hiện tác dụng tăng cường độ bền chắc xương và có thể hữu dụng trong phòng ngừa và điều trị các bệnh về xương như bệnh loãng xương, gãy xương, bệnh thấp khớp và viêm khớp.

### **Mô tả chi tiết sáng chế**

Đồ uống theo sáng chế khác biệt ở chỗ, đồ uống chứa angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin với lượng cụ thể và còn chứa thêm xystatin và/hoặc sản phẩm thủy phân của xystatin theo tỷ lệ khối lượng cụ thể so với angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin.

Sữa bò thường chứa angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin với lượng nằm trong khoảng từ 0,2 đến 0,8mg/100ml và xystatin và/hoặc sản phẩm thủy phân của xystatin với lượng nằm trong khoảng từ 0,4 đến 1mg/100ml.

Ngược lại, đồ uống theo sáng chế được bổ sung angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin và xystatin và/hoặc sản phẩm thủy phân của xystatin và đồ uống chứa angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin với lượng cao hơn 0,8mg/100ml và không cao hơn 150mg/100ml và xystatin và/hoặc sản phẩm thủy phân của xystatin với tỷ lệ so với angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin nằm trong khoảng từ 0,006 đến 1,7.

Phần chứa angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin được điều chế từ sữa của động vật có vú, như người, bò, trâu, dê hoặc cừu, phần chứa xystatin và/hoặc sản phẩm thủy phân của xystatin được điều chế từ sữa của động vật có vú, như người, bò, trâu, dê hoặc cừu, phần chứa angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin được tạo ra bằng công nghệ di truyền, phần chứa xystatin và/hoặc sản phẩm thủy phân của xystatin được tạo ra bằng công nghệ di truyền, angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin được tinh chế từ máu hoặc cơ quan, xystatin và/hoặc sản phẩm thủy phân của xystatin được tinh chế từ máu hoặc cơ quan hoặc tương tự có thể được sử dụng làm angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin và xystatin và/hoặc sản phẩm thủy phân của xystatin được bao gồm trong đồ uống theo sáng chế. Tác nhân phản ứng angiogenin hoặc xystatin tinh chế có sẵn trên thị trường cũng có thể được sử dụng.

Đồ uống theo sáng chế có thể chứa sản phẩm thủy phân của angiogenin hoặc sản phẩm thủy phân của xystatin thu được bằng cách phân hủy phần chứa

angiogenin, tác nhân phản ứng angiogenin, phần chứa xystatin, tác nhân phản ứng xystatin hoặc tương tự bằng cách sử dụng một hoặc nhiều proteaza.

Đồ uống theo sáng chế có thể chứa nguyên liệu protein được điều chế bằng cách chiết phần chứa angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin và xystatin và/hoặc sản phẩm thủy phân của xystatin trực tiếp từ sữa hoặc nguyên liệu thu được từ sữa, như sữa gầy hoặc nước sữa. Ví dụ, nguyên liệu protein như vậy có thể được điều chế như sau. Cụ thể, sữa hoặc nguyên liệu thu được từ sữa được cho tiếp xúc với nhựa trao đổi cation và các protein thu được từ sữa hấp phụ trên nhựa được rửa giải ở nồng độ muối nằm trong khoảng từ 0,1 đến 2,0M, được khử muối và được cô bằng cách sử dụng màng thẩm thấu ngược, màng thẩm tách bằng điện, màng siêu lọc, màng vi lọc hoặc màng tương tự và tùy ý được cho tiến hành phân giải protein tới phân tử lượng bằng 8000 hoặc thấp hơn bằng cách sử dụng proteaza, như trypsin, pancreatin, chymotrypsin, pepsin, papain, kalikrein, cathepsin, thermolysin hoặc V8 proteaza. Khi tiến hành phân giải protein bằng cách sử dụng proteaza, giới hạn dưới của phân tử lượng tốt hơn là bằng 500 hoặc cao hơn. Nguyên liệu protein thu được như vậy có thể được làm khô bằng phương pháp khô lạnh, sấy phun hoặc tương tự và sản phẩm khô có thể được bổ sung vào đồ uống.

Đồ uống theo sáng chế được sản xuất bằng cách bổ sung angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin và xystatin và/hoặc sản phẩm thủy phân của xystatin và nguyên liệu protein chứa angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin và xystatin và/hoặc sản phẩm thủy phân của xystatin hoặc tương tự vào nguyên liệu đồ uống thô sao cho đồ uống chứa angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin với lượng cao hơn 0,8mg và không cao hơn 150mg/100ml và chứa xystatin và/hoặc sản phẩm thủy phân của xystatin với tỷ lệ so với angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin nằm trong khoảng từ 0,006 đến 1,7.

Như được chứng minh trong các ví dụ thử nghiệm mô tả dưới đây, khi đồ uống chứa angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin và xystatin và/hoặc sản phẩm thủy phân của xystatin như được mô tả ở trên, tác dụng tăng cường độ bền chắc xương có thể đạt được hiệu quả hơn so với trường hợp sử

dụng angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin hoặc xystatin và/hoặc sản phẩm thủy phân của xystatin một cách riêng biệt.

Đồ uống theo sáng chế có thể được sản xuất theo cách thông thường, miễn là đồ uống chứa angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin và xystatin và/hoặc sản phẩm thủy phân của xystatin với lượng cụ thể một cách riêng biệt. Ví dụ, đồ uống theo sáng chế được sản xuất bằng cách bổ sung angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin vào nguyên liệu đồ uống thô, như nguyên liệu thu được từ sữa sao cho đồ uống chứa angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin với lượng cụ thể và bổ sung xystatin và/hoặc sản phẩm thủy phân của xystatin vào hỗn hợp sao cho tỷ lệ khối lượng của xystatin và/hoặc sản phẩm thủy phân của xystatin so với angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin nằm trong phạm vi cụ thể. Lưu ý rằng, đối với nguyên liệu đồ uống thô, như nguyên liệu thu được từ sữa, sữa bò, sữa gầy cô đặc, bột sữa gầy, nước sữa, bơ, kem, sữa lên men, đồ uống chứa vi khuẩn sinh axit lactic trong sữa, đồ uống chứa vi khuẩn sinh axit lactic hoặc tương tự có thể được sử dụng, ngoài ra, đồ uống sữa trộn trong đó khi thích hợp, ví dụ sữa chế biến, sữa được cải biến thành phần, sữa ít béo, sữa không béo hoặc tương tự có thể được sử dụng.

Khi bổ sung angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin và xystatin và/hoặc sản phẩm thủy phân của xystatin vào nguyên liệu đồ uống thô, như nguyên liệu thu được từ sữa, angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin và xystatin và/hoặc sản phẩm thủy phân của xystatin có thể được bổ sung vào nguyên liệu đồ uống thô chưa tiệt trùng hoặc nguyên liệu đồ uống thô vô trùng. Khi bổ sung vào nguyên liệu đồ uống thô chưa tiệt trùng, việc tiệt trùng có thể được tiến hành thực hiện sau khi bổ sung. Trong trường hợp này, tốt hơn là tiệt trùng bằng nhiệt. Ví dụ, bản thân nguyên liệu đồ uống thô hoặc nguyên liệu đồ uống thô mà angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin và xystatin và/hoặc sản phẩm thủy phân của xystatin được bổ sung vào trong đó có thể được gia nhiệt tới nhiệt độ 70°C, được đồng nhất hóa bằng cách sử dụng thiết bị đồng nhất hóa tại áp suất bằng 15MPa, được vô trùng ở nhiệt độ 130°C trong thời gian 2 giây và được làm lạnh xuống nhiệt độ 5°C. Khi

tiệt trùng hỗn hợp được điều chế bằng cách bổ sung angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin và xystatin và/hoặc sản phẩm thủy phân của xystatin vào nguyên liệu đồ uống thô, tốt hơn là tiệt trùng ở nhiệt độ 130°C trong thời gian 2 giây hoặc ít hơn.

Có thể là, đồ uống theo sáng chế có thể được bổ sung nguyên liệu thô hoặc nguyên liệu tương tự thông thường được sử dụng trong thức ăn hoặc đồ uống, như sacarit, lipit, protein, vitamin, khoáng chất hoặc hương vị, ngoài angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin, xystatin và/hoặc sản phẩm thủy phân của xystatin, khác với nguyên liệu đồ uống thô nêu trên và cũng có thể được bổ sung thành phần tăng cường độ bền chắc xương khác như canxi, vitamin D, vitamin K hoặc isoflavin.

Đồ uống theo sáng chế có thể tăng cường độ bền chắc xương khi được dùng theo đường miệng với lượng 200ml hoặc lớn hơn trên mỗi kg thể trọng, như được thể hiện trong các thử nghiệm trên động vật mô tả dưới đây. Vì lượng sử dụng cho động vật thử nghiệm tương đương với lượng sử dụng cho người trưởng thành về nồng độ thuốc trong máu (xem trong Mitsuyoshi Nakajima (1993), “Yakkou Hyoka Vol. 8”, Hirokawa-Shoten Ltd., pp. 2-18), hy vọng rằng, xương có thể được tăng cường độ bền và đặc biệt là các bệnh về xương như bệnh loãng xương, gãy xương, bệnh thấp khớp và viêm khớp có thể được phòng ngừa hoặc điều trị bằng cách sử dụng đồ uống theo sáng chế với lượng 200ml/ngày hoặc cao hơn cho mỗi người trưởng thành.

### **Ví dụ thực hiện sáng chế**

Sáng chế được mô tả thêm dưới đây một cách chi tiết hơn thông qua các ví dụ tham khảo, ví dụ và ví dụ thử nghiệm. Lưu ý rằng, các ví dụ sau đây chỉ nhằm mục đích minh họa và không được xem là giới hạn sáng chế.

#### **Ví dụ tham khảo 1**

##### **Điều chế (1) phần angiogenin**

Cột đã nạp 30kg nhựa trao đổi cation (Chitopearl sulfonat hóa; do Fuji Spinning Co., Ltd. sản xuất) được rửa kỹ bằng nước khử ion và sau đó, 1000 lít

sữa gầy chưa tiệt trùng ( $\text{pH} = 6,7$ ) được đưa lên cột. Sau khi rửa cột hoàn toàn bằng nước khử ion, protein hấp thụ được rửa giải bằng gradien tuyến tính của natri clorua từ 0,1 đến 2,0M. Phần rửa giải chứa angiogenin được cắt phân đoạn sử dụng phương pháp sắc ký trao đổi cation S-Sepharosa (do công ty Amersham Bioscientific sản xuất) và phần chứa angiogenin tạo ra được xử lý bằng nhiệt ở nhiệt độ  $90^{\circ}\text{C}$  trong thời gian 10 phút và được ly tâm để loại bỏ chất kết tủa. Phần chứa angiogenin được cho tiến hành thêm sắc ký lọc gel (cột: Superose 12). Dịch rửa giải thu được được khử muối bằng cách sử dụng màng thẩm thấu ngược và dịch rửa giải đã khử muối được làm khô lạnh để thu được 16,5g phần angiogenin có độ tinh khiết angiogenin bằng 90%. Các thao tác liên tục này được lặp lại 30 lần.

Ví dụ tham khảo 2

Điều chế (2) phần angiogenin

Cột đã nạp 10kg Heparin Sepharosa (do GE Healthcare sản xuất) được rửa kỹ bằng nước khử ion và sau đó, 500 lít sữa gầy chưa tiệt trùng ( $\text{pH} = 6,7$ ) được đưa lên cột. Sau khi rửa sạch cột hoàn toàn bằng dung dịch natri clorua 0,5M, cột được rửa giải bằng dung dịch natri clorua 1,5M. Dịch rửa giải được khử muối bằng cách sử dụng màng thẩm thấu ngược và dịch rửa giải đã khử muối được làm khô lạnh để thu được 18g phần angiogenin có độ tinh khiết angiogenin bằng 5%. Các thao tác liên tục nêu trên được lặp lại 50 lần.

Ví dụ tham khảo 3

Điều chế phần xystatin

Tiến hành xử lý bằng nhiệt 100000 lít dung dịch protein nước sữa 5% ở nhiệt độ  $90^{\circ}\text{C}$  trong thời gian 10 phút và chất kết tủa được loại bỏ bằng cách ly tâm. Cột được nạp chất mang điều chế bằng cách gắn kết cacboxymetyl hóa papain vào Tresyl-Toyopearl (do Tosoh Corporation sản xuất). Sau khi làm cân bằng bằng dung dịch natri clorua 0,5M, dung dịch protein nước sữa nêu trên được đưa lên cột. Sau đó, cột được rửa lần lượt bằng dung dịch natri clorua 0,5M và dung dịch natri clorua 0,5M chứa Tween 20 (0,1%). Sau đó, phần chứa xystatin được rửa giải bằng axit axetic 20mM - dung dịch natri clorua 0,5M.

Phần đã rửa giải được trung hòa ngay bằng dung dịch natri hydroxit 1M. Dịch rửa giải thu được sau đó được khử muối bằng cách sử dụng màng thẩm thấu ngược và dịch rửa giải đã khử muối được làm khô lạnh để thu được 9,6g phần xystatin có độ tinh khiết xystatin bằng 90%. Các thao tác liên tục nêu trên được lặp lại 20 lần.

Xác định angiogenin và xystatin chứa trong đồ uống

Hàm lượng của angiogenin, sản phẩm thủy phân của angiogenin, xystatin và sản phẩm thủy phân của xystatin trong đồ uống được xác định theo phương pháp mô tả trong tài liệu JP-A-2008-164511 có cải biến. Cụ thể, 106µl đồ uống được bổ sung vào 5ml nước siêu tinh khiết và một lượng tương đương 1/1000 của axit formic được bổ sung vào hỗn hợp để điều chế dung dịch mẫu. Lượng 10µl dung dịch mẫu được làm khô và được hòa tan trong 20µl amoni bicacbonat 0,1M chứa 8M ure và tris(cacboxyetyl)phosphin 1mM (TCEP). Dung dịch được gia nhiệt ở nhiệt độ 56°C trong thời gian 30 phút. Sau khi đưa dung dịch trở lại nhiệt độ trong phòng, 5µl dung dịch iodoacetamid 100mM được bổ sung vào dung dịch và hỗn hợp được phản ứng trong thời gian 30 phút trong điều kiện tối. Sau khi bổ sung 54µl nước siêu tinh khiết, 10µl trypsin 0,1µg/ml và 10µl Lysyl Endopeptidaza 0,1µg/ml được bổ sung vào hỗn hợp. Hỗn hợp được phản ứng ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 16 giờ. Sau đó, phản ứng được kết thúc bằng cách bổ sung 3µl axit formic và được sử dụng làm dung dịch peptit mẫu để xác định. Dung dịch mẫu được pha loãng 6 lần bằng dung dịch peptit nội chuẩn 10fmol/µl chứa axit formic 0,1%, axit trifloaxetic 0,02% (TFA) và axetonitril 2% và 2,5µl dung dịch pha loãng được cho tiến hành phân tích LC/MS/MS.

Peptit được tách riêng bằng dung dịch gradien bằng cách sử dụng hệ HPLC. Cụ thể hơn nữa, peptit được tách riêng bằng cách sử dụng cột (MAGIC C18, 0,2mm (ID) × 50mm) có trang bị dụng cụ thu hồi peptit 5µl trên hệ HPLC MAGIC 2002 với tốc độ dòng bằng 2µl/phút. Dung dịch A (axetonitril 2% - axit formic 0,05%) và dung dịch B (axetonitril 90% - axit formic 0,05%) được sử dụng làm chất rửa giải của HPLC. Dung dịch gradien được tiến hành trong điều kiện rửa giải nằm trong khoảng từ 2 đến 65% sử dụng dung dịch B trong thời

gian 20 phút.

Đối với các ion đối tượng để xác định xystatin, ion gốc là  $\text{NH}_2\text{-QVVSGMNYFLDVELGR-COOH}$  ( $m/z$  914,4) và ion đích MS/MS là  $\text{NH}_2\text{-FLDVELGR-COOH}$  ( $m/z$  948,7). Đối với các ion đối tượng để xác định angiogenin, ion gốc là  $\text{NH}_2\text{-YIHFLTQHYDAK-COOH}$  ( $m/z$  768,8) và ion đích MS/MS là  $\text{NH}_2\text{-FLTQHYDAK-COOH}$  ( $m/z$  1122,8). Liên quan đến peptit nội chuẩn, ion gốc là  $\text{NH}_2\text{-ETTVFENLPEK-COOH}$  (trong đó, P được đánh dấu bằng  $^{13}\text{C}$  và  $^{15}\text{N}$ ) ( $m/z$  656,9) và ion đích MS/MS là  $\text{NH}_2\text{-FENLPEK-COOH}$  (trong đó, P được đánh dấu bằng  $^{13}\text{C}$  và  $^{15}\text{N}$ ) ( $m/z$  882,4).

Hệ thống “LCQ Advantage” được sử dụng trong MS. Vùng đỉnh điểm của mỗi một protein được tính toán từ sắc phổ tạo ra và nồng độ được tính toán từ tỷ lệ đối với peptit nội chuẩn.

#### Ví dụ 1

Trộn 330mg phần angiogenin thu được trong ví dụ tham khảo 1 và 1mg phần xystatin thu được trong ví dụ tham khảo 3 với 200ml sữa bò. Hỗn hợp được vô trùng ở nhiệt độ  $130^\circ\text{C}$  trong thời gian 2 giây và được làm lạnh xuống nhiệt độ  $10^\circ\text{C}$  để thu được đồ uống (sản phẩm của ví dụ 1). Đồ uống tạo ra chứa angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin với lượng 150mg/100ml và tỷ lệ khối lượng của xystatin và/hoặc sản phẩm thủy phân của xystatin so với angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin trong đồ uống là 0,006.

#### Ví dụ 2

Trộn 24mg phần angiogenin thu được trong ví dụ tham khảo 2 và 2mg phần xystatin thu được trong ví dụ tham khảo 3 với 200ml sữa bò. Hỗn hợp được vô trùng ở nhiệt độ  $130^\circ\text{C}$  trong thời gian 2 giây và được làm lạnh xuống nhiệt độ  $10^\circ\text{C}$  để thu được đồ uống (sản phẩm của ví dụ 2). Đồ uống tạo ra chứa angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin với lượng 0,81mg/100ml và tỷ lệ khối lượng của xystatin và/hoặc sản phẩm thủy phân của xystatin so với angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin trong đồ uống là 1,7.

### Ví dụ 3

Trộn 24mg phần angiogenin thu được trong ví dụ tham khảo 1 và 2mg phần xystatin thu được trong ví dụ tham khảo 3 với 200ml sữa bò. Hỗn hợp được vô trùng ở nhiệt độ 130°C trong thời gian 2 giây và được làm lạnh xuống nhiệt độ 10°C để thu được đồ uống (sản phẩm của ví dụ 3). Đồ uống tạo ra chứa angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin với lượng 11mg/100ml và tỷ lệ khối lượng của xystatin và/hoặc sản phẩm thủy phân của xystatin so với angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin trong đồ uống là 0,12.

### Ví dụ so sánh 1

Trộn 22mg phần angiogenin thu được trong ví dụ tham khảo 2 và 4mg phần xystatin thu được trong ví dụ tham khảo 3 với 200ml sữa bò. Hỗn hợp được vô trùng ở nhiệt độ 130°C trong thời gian 2 giây và được làm lạnh xuống nhiệt độ 10°C để thu được đồ uống (sản phẩm của ví dụ so sánh 1). Đồ uống tạo ra chứa angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin với lượng 0,75mg/100ml và tỷ lệ khối lượng của xystatin và/hoặc sản phẩm thủy phân của xystatin so với angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin trong đồ uống là 3,0.

### Ví dụ so sánh 2

Trộn 330mg phần angiogenin thu được trong ví dụ tham khảo 1 và 0,25mg phần xystatin thu được trong ví dụ tham khảo 3 với 200ml sữa bò. Hỗn hợp được vô trùng ở nhiệt độ 130°C trong thời gian 2 giây và được làm lạnh xuống nhiệt độ 10°C để thu được đồ uống (sản phẩm của ví dụ so sánh 2). Đồ uống tạo ra chứa angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin với lượng 150mg/100ml và tỷ lệ khối lượng của xystatin và/hoặc sản phẩm thủy phân của xystatin so với angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin trong đồ uống là 0,004.

### Ví dụ thử nghiệm 1

Tác dụng tăng cường độ bền chắc xương của mỗi trong số các sản phẩm của ví dụ từ 1 đến 3 và sản phẩm của ví dụ so sánh 1 và 2 được xác định bằng

các thử nghiệm trên động vật. Chuột C3H/HeJ (5 tuần tuổi, giới tính đực) được sử dụng cho các thử nghiệm trên động vật. Sau khi làm cho thích nghi trong 1 tuần, chuột được phân thành 6 nhóm (10 chuột/nhóm). Chuột được dùng theo đường miệng mỗi một sản phẩm trong số các sản phẩm của ví dụ từ 1 đến 3 và sản phẩm của ví dụ so sánh 1 và 2 với lượng 200ml trên 1kg thể trọng chuột mỗi ngày một lần trong thời gian 2 tuần bằng cách sử dụng ống thông. Nhóm đối chứng không được sử dụng bất kỳ sản phẩm nào trong ví dụ từ 1 đến 3 và sản phẩm của ví dụ so sánh 1 và 2 không được sử dụng. Sau khi hoàn thành việc sử dụng (tuần thứ hai), mật độ xương của xương ống bên phải của mỗi một chuột được đo bằng cách sử dụng thiết bị chụp vi cắt lớp (do Rigaku Corporation sản xuất). Kết quả được thể hiện trong bảng 1. Như được thể hiện trong bảng 1, các nhóm được dùng sản phẩm của ví dụ từ 1 đến 3 theo đường miệng thể hiện sự gia tăng đáng kể về mật độ xương so với nhóm đối chứng và các nhóm dùng sản phẩm trong ví dụ so sánh được dùng sản phẩm của ví dụ so sánh 1 hoặc 2 theo đường miệng.

Bảng 1

|                              | Mật độ xương<br>(mg/cm <sup>3</sup> ) |
|------------------------------|---------------------------------------|
| Nhóm đối chứng               | 1238 ± 9                              |
| Sản phẩm của ví dụ 1         | 1265 ± 11                             |
| Sản phẩm của ví dụ 2         | 1270 ± 13                             |
| Sản phẩm của ví dụ 3         | 1268 ± 12                             |
| Sản phẩm của ví dụ so sánh 1 | 1244 ± 5                              |
| Sản phẩm của ví dụ so sánh 2 | 1243 ± 7                              |

#### Ví dụ tham khảo 4

Cột (đường kính: 4cm, chiều cao: 30cm) đã nạp 400g nhựa trao đổi cation (Chitopearl sulfonat hóa; do Fuji Spinning Co., Ltd. sản xuất) được rửa kỹ bằng nước khử ion và 40 lít sữa gầy chưa tiệt trùng (pH = 6,7) được đưa lên cột với tốc độ dòng bằng 25ml/phút. Sau khi rửa kỹ cột bằng nước khử ion, protein hấp phụ trên nhựa được rửa giải bằng cách sử dụng dung dịch đệm cacbonat 0,02M (pH = 7,0) chứa natri clorua 0,78M. Dịch rửa giải được khử muối bằng cách sử dụng màng thẩm thấu ngược và dịch rửa giải đã khử muối được làm khô lạnh để

thu được 18g nguyên liệu protein dạng bột (sản phẩm của ví dụ tham khảo 4).

Ví dụ tham khảo 5

Hòa tan 4g nguyên liệu protein của sản phẩm của ví dụ tham khảo 4 được hòa tan trong 800ml nước. Sau khi bổ sung trypsin (do Sigma sản xuất) là proteaza để thu được nồng độ cuối bằng 0,03% khối lượng, hỗn hợp được cho tiến hành xử lý enzym ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 8 giờ. Sau khi bất hoạt proteaza bằng phương thức xử lý nhiệt ở nhiệt độ 90°C trong thời gian 5 phút, hỗn hợp được sấy đông lạnh để thu được 3,0g nguyên liệu protein dạng bột (sản phẩm của ví dụ tham khảo 5).

Ví dụ 4

Trộn 40mg sản phẩm của ví dụ tham khảo 4 với 200ml sữa bò tiệt trùng để thu được đồ uống (sản phẩm của ví dụ 4). Đồ uống tạo ra chứa angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin với lượng 1,2mg/100ml và tỷ lệ khối lượng của xystatin và/hoặc sản phẩm thủy phân của xystatin so với angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin trong đồ uống là 0,39.

Ví dụ 5

Trộn 40mg sản phẩm của ví dụ tham khảo 5 với 200ml sữa bò tiệt trùng để thu được đồ uống (sản phẩm của ví dụ 5). Đồ uống tạo ra chứa angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin với lượng 1,15mg/100ml và tỷ lệ khối lượng của xystatin và/hoặc sản phẩm thủy phân của xystatin so với angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin trong đồ uống là 0,4.

Ví dụ so sánh 3

Trộn 30mg sản phẩm của ví dụ tham khảo 4 và 10mg phần xystatin thu được trong ví dụ tham khảo 3 với 200ml sữa bò tiệt trùng để thu được đồ uống (sản phẩm của ví dụ so sánh 3). Đồ uống tạo ra chứa angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin với lượng 0,95mg/100ml và tỷ lệ khối lượng của xystatin và/hoặc sản phẩm thủy phân của xystatin so với angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin trong đồ uống là 5,2.

Ví dụ thử nghiệm 2

Tác dụng tăng cường độ bền chắc xương của các sản phẩm của ví dụ 4 và 5 và sản phẩm của ví dụ so sánh 3 được xác định bằng các thử nghiệm trên động vật. Sử dụng 40 chuột SD cái (51 tuần tuổi) cho các thử nghiệm trên động vật. Chuột được phân thành 5 nhóm (8 chuột/nhóm). Tiến hành thủ thuật cắt bỏ buồng trứng trên 4 nhóm và một nhóm còn lại được tiến hành phẫu thuật giả. Sau giai đoạn 4 tuần phục hồi, chuột cắt bỏ buồng trứng được dùng sản phẩm của ví dụ 4 hoặc 5 hoặc sản phẩm của ví dụ so sánh 3 theo đường miệng với lượng 200ml trên 1kg thể trọng chuột hàng ngày với liều lượng chia làm 6 lần trong thời gian 16 tuần bằng cách sử dụng ống thông. Nhóm đối chứng không được sử dụng bất kỳ sản phẩm nào trong ví dụ 4 và 5 và sản phẩm của ví dụ so sánh 3. Sau giai đoạn 4 tuần phục hồi, chuột trải qua phẫu thuật giả được nuôi trong thời gian 16 tuần theo cách tương tự như nhóm đối chứng. Sau khi hoàn thành việc sử dụng (tuần thứ 16), mật độ xương của xương ống bên phải của mỗi một chuột được đo bằng cách sử dụng thiết bị chụp vi cắt lớp (do Rigaku Corporation sản xuất).

Kết quả được thể hiện trong bảng 2. Như được thể hiện trong bảng 2, các nhóm được dùng sản phẩm của ví dụ 4 và 5 theo đường miệng thể hiện sự gia tăng đáng kể về mật độ xương khi so sánh với nhóm đối chứng và nhóm sử dụng sản phẩm của ví dụ so sánh 3 theo đường miệng. Ngoài ra, mật độ xương tiệm cận sát mật độ xương của nhóm phẫu thuật giả.

Bảng 2

|                              | Mật độ xương<br>(mg/cm <sup>3</sup> ) |
|------------------------------|---------------------------------------|
| Nhóm đối chứng               | 552 ± 10                              |
| Nhóm phẫu thuật giả          | 601 ± 8                               |
| Sản phẩm của ví dụ 4         | 596 ± 10                              |
| Sản phẩm của ví dụ 5         | 595 ± 9                               |
| Sản phẩm của ví dụ so sánh 3 | 555 ± 12                              |

### **YÊU CẦU BẢO HỘ**

1. Đồ uống chứa angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin với lượng cao hơn 0,8mg/100ml và không cao hơn 150mg/100ml và xystatin và/hoặc sản phẩm thủy phân của xystatin theo tỷ lệ khối lượng so với angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin nằm trong khoảng từ 0,006 đến 1,7.
2. Phương pháp sản xuất đồ uống theo điểm 1, bao gồm bước trộn angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin và xystatin và/hoặc sản phẩm thủy phân của xystatin với nguyên liệu đồ uống thô và tiệt trùng hỗn hợp thu được.
3. Phương pháp sản xuất đồ uống theo điểm 1, bao gồm bước bổ sung angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin và xystatin và/hoặc sản phẩm thủy phân của xystatin vào nguyên liệu đồ uống thô vô trùng.