



(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)



1-0027437

(51)⁷

G01N 30/88; G01N 30/86; G01N 30/06; (13) B
G01N 30/26

(21) 1-2016-01529

(22) 26/09/2014

(86) PCT/JP2014/075718 26/09/2014

(87) WO 2015/046463 A1 02/04/2015

(30) 2013-205503 30/09/2013 JP

(45) 25/02/2021 395

(43) 27/06/2016 339A

(73) KABUSHIKI KAISHA YAKULT HONSHA (JP)

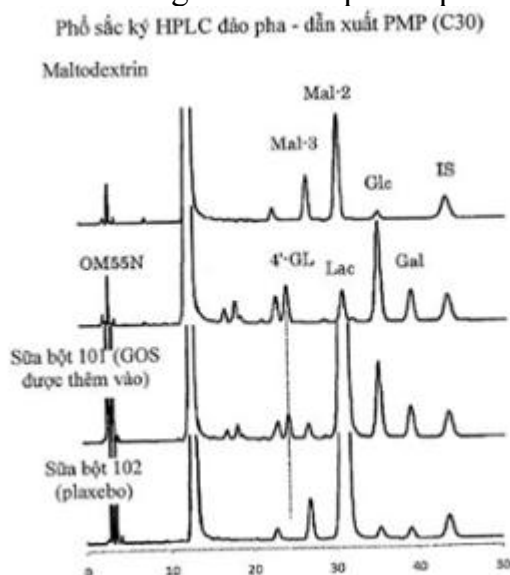
1-19, Higashi-Shinbashi 1-chome, Minato-ku, Tokyo 105-8660, Japan

(72) MIZUKOSHI Harumi (JP); KIMURA Kazumasa (JP).

(74) Công ty TNHH Sở hữu trí tuệ WINCO (WINCO CO., LTD.)

(54) PHƯƠNG PHÁP PHÁT HIỆN GALACTO-OLIGOSACARIT

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp phát hiện và định lượng galacto-oligosacarit trong mẫu chứa galacto-oligosacarit và dextrin, khác biệt ở chỗ, mẫu nêu trên được cho phản ứng với chất phản ứng dẫn xuất hóa để tạo dẫn xuất dextrin và galacto-oligosacarit trong mẫu này, sau đó thành phần galacto-oligosacarit trong mẫu được tách ra bằng cách sắc ký lỏng hiệu năng cao sử dụng cột sắc ký đảo pha C30, nhờ đó phát hiện và định lượng chính xác galacto-oligosacarit theo cách dễ dàng và với chi phí thấp.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp phát hiện và định lượng galacto-oligosacarit trong mẫu chứa galacto-oligosacarit và dextrin.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Galacto-oligosacarit là hỗn hợp của các oligosacarit, mỗi oligosacarit được tạo thành bởi galactose làm thành phần chính và có kiểu liên kết khác nhau, và thường được sản xuất bằng cách cho lactose tham gia phản ứng chuyển tiếp sử dụng β -galactosidase. Galacto-oligosacarit đã được thông báo là có các lợi ích về mặt sinh lý như làm tăng lượng vi khuẩn bifidus trong ruột non để điều hòa môi trường bên trong ruột, và làm giảm lượng mỡ ở mạc treo ruột và nhờ đó góp phần vào việc phòng ngừa các bệnh ở người trưởng thành, và đôi khi, được phát hiện là hữu ích làm thực phẩm dùng cho mục đích sức khỏe cụ thể, thực phẩm chức năng, hoặc nguyên liệu cho thực phẩm này. Nếu galacto-oligosacarit được sử dụng làm thành phần của thực phẩm dùng cho mục đích sức khỏe cụ thể, v.v., dữ liệu phân tích định lượng phải được thể hiện để đảm bảo chất lượng của nó, sự tuân thủ các tiêu chuẩn, và việc sử dụng làm thành phần chức năng, và theo đó, vẫn có nhu cầu về việc thiết lập phương pháp định lượng với độ chính xác cao.

Một phương pháp định lượng các galacto-oligosacarit trong đồ uống hoặc thực phẩm là bổ sung β -galactosidase vào để tác dụng với galacto-oligosacarit, định lượng galactose được tạo ra do quá trình phân hủy bằng enzym, và tính toán lượng oligosacarit (tài liệu phi sáng chế 1). Tuy nhiên, việc phát hiện galactose được tạo ra cần phải sử dụng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao có sự trao đổi anion được lắp thiết bị phát hiện điện hóa kiểu xung đất tiền, điều này làm cho tính hữu dụng chung của phương pháp này thấp. Ngoài ra, nếu đồ uống hoặc thực phẩm chứa lactose hoặc các thành phần dinh dưỡng khác, không thể phân biệt được galactose được tạo ra bằng cách xử lý bằng enzym với galactose tách ra từ lactose, do đó làm giảm độ chính xác của quá trình định lượng galacto-oligosacarit.

Phương pháp khác hiện đang được sử dụng mà nhờ đó thành phần đặc trưng trong galacto-oligosacarit, như 4'-galactosyl lactose (4'-GL; Gal β 1-4Gal β 1-4Glc), được định lượng và tổng lượng galacto-oligosacarit được tính toán dựa trên lượng 4'-GL. Phương

pháp này đặc biệt hữu hiệu nếu hàm lượng 4'-GL trong galacto-oligosacarit được sử dụng là đã biết và hàm lượng này ổn định giữa các mẻ phân tích. Để định lượng 4'-GL trong mẫu đồ uống hoặc thực phẩm, thông thường, phương pháp tách các thành phần khác trong đồ uống hoặc thực phẩm này ra khỏi 4'-GL bằng cách sắc ký lọc gel dựa trên kích thước phân tử được sử dụng chủ yếu.

Tuy nhiên, như đã nêu trên đây, galacto-oligosacarit thường được sử dụng làm nguyên liệu chức năng trong đồ uống và thực phẩm giàu dinh dưỡng như sữa bột công thức dùng cho trẻ nhỏ và các sản phẩm sữa lên men, và trong nhiều trường hợp, các đồ uống và thực phẩm này chứa các nguồn đường có phân tử tương đương về kích thước với 4'-GL, trong trường hợp này, không thể tách các nguồn đường này ra khỏi 4'-GL bằng cách sắc ký lọc gel. Ví dụ, nỗ lực để tách và định lượng 4'-GL trong đồ uống hoặc thực phẩm chứa maltotriosa, là một loại đường có mặt trong dextrin, bằng cách sắc ký lọc gel sẽ tạo ra các đỉnh chồng lên nhau từ hai chất đã được rửa giải ra khỏi cột, do maltotriosa có kích cỡ phân tử giống với 4'-GL, do đó ảnh hưởng đến việc định lượng 4'-GL hoặc cụ thể là việc định lượng galacto-oligosacarit.

Trong số các phương pháp phát hiện oligosacarit bằng cách sắc ký đảo pha, phương pháp sử dụng cột sắc ký đảo pha C8 hoặc C18 là đã biết (tài liệu sáng chế 1). Tuy nhiên, nỗ lực để tách galacto-oligosacarit trong đồ uống hoặc thực phẩm bằng cách sử dụng cột này sẽ không tách được thành phần galacto-oligosacarit ra khỏi các thành phần khác trong đồ uống hoặc thực phẩm.

Tài liệu sáng chế

Tài liệu sáng chế 1: Bản dịch ra tiếng Nhật Bản đã được công bố của đơn sáng chế quốc tế PCT số 2007-523352

Tài liệu phi sáng chế

Tài liệu phi sáng chế 1: Journal of AOAC International, Volume 85, Number 2, March 2002, pp. 417-423(7)

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo đó, mục đích của sáng chế là đề xuất phương pháp định lượng chính xác 4'-GL và galacto-oligosacarit bằng cách tách 4'-GL theo cách dễ dàng và với chi phí thấp ra khỏi mẫu chứa galacto-oligosacarit và dextrin.

Sau khi nghiên cứu kỹ lưỡng để đạt được mục đích nêu trên, các tác giả sáng chế

đã hoàn thành sáng chế sau khi phát hiện được rằng, bằng cách cho mẫu chứa galacto-oligosacarit và dextrin phản ứng với chất phản ứng dẫn xuất hóa để tạo dẫn xuất dextrin và galacto-oligosacarit trong mẫu này, và tiếp đó, tiến hành sắc ký lỏng hiệu năng cao sản phẩm tạo thành bằng cách sử dụng cột sắc ký đảo pha C30, thành phần galacto-oligosacarit trong mẫu có thể được tách ra hoàn toàn.

Nói theo cách khác, sáng chế đề xuất phương pháp phát hiện và định lượng galacto-oligosacarit, cụ thể là đề xuất phương pháp phát hiện và định lượng galacto-oligosacarit trong mẫu chứa galacto-oligosacarit và dextrin, khác biệt ở chỗ, mẫu này được cho phản ứng với chất phản ứng dẫn xuất hóa để tạo dẫn xuất dextrin và galacto-oligosacarit trong mẫu, sau đó thành phần galacto-oligosacarit trong mẫu này được tách ra bằng cách sắc ký lỏng hiệu năng cao sử dụng cột sắc ký đảo pha C30.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Theo phương pháp phát hiện và định lượng được đề xuất bởi sáng chế, thành phần galacto-oligosacarit và các thành phần khác trong mẫu có thể được tách ra một cách dễ dàng với chi phí thấp để cho phép định lượng chính xác galacto-oligosacarit. Bằng cách sử dụng phương pháp được đề xuất bởi sáng chế để phát hiện và định lượng galacto-oligosacarit trong đồ uống, thực phẩm, v.v., lượng galacto-oligosacarit có mặt trong đồ uống, thực phẩm, v.v., có thể được kiểm soát một cách chính xác để cho phép đảm bảo về chất lượng, trong khi cũng cho phép thu được và thể hiện các dữ liệu thử nghiệm hiệu quả khác nhau, v.v..

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là phổ sắc ký HPLC bằng cách sử dụng cột lọc gel.

Fig.2 là phổ sắc ký HPLC đảo pha - dẫn xuất PMP (C30).

Fig.3 là phổ sắc ký HPLC đảo pha - dẫn xuất PMP (cột đảo pha C18).

Fig.4 là phổ sắc ký HPLC đảo pha - dẫn xuất PMP (cột đảo pha C8).

Fig.5 là phổ sắc ký HPLC đảo pha - dẫn xuất PMP (C30), dung dịch đệm kali phosphat (độ pH = 4)/CH₃CN (78/22).

Fig.6 là phổ sắc ký HPLC đảo pha - dẫn xuất PMP (C30), dung dịch đệm kali phosphat (độ pH = 5)/CH₃CN (79/21).

Fig.7 là phổ sắc ký HPLC đảo pha - dẫn xuất PMP (C30), dung dịch đệm kali phosphat (độ pH = 7)/CH₃CN (81/19).

Fig.8 là phổ sắc ký HPLC đảo pha - dẫn xuất PMP (C30), dung dịch đệm kali phosphat (độ pH = 7)/CH₃CN (82/18).

Fig.9 là phổ sắc ký HPLC đảo pha - dẫn xuất PMP (C30), dung dịch đệm kali phosphat (độ pH = 8)/CH₃CN (82/18).

Fig.10 là phổ sắc ký HPLC đảo pha - dẫn xuất PMP (C30), dung dịch đệm kali phosphat (độ pH = 8)/CH₃CN (83/17).

Fig.11 là phổ sắc ký HPLC đảo pha - dẫn xuất PMP (C30).

Mô tả chi tiết sáng chế

Phương pháp phát hiện và định lượng được đề xuất bởi sáng chế là phương pháp làm cho galacto-oligosacarit có mặt trong mẫu đồ uống, thực phẩm, v.v., được tạo dẫn xuất và sau đó, sản phẩm tạo thành được sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) bằng cách sử dụng cột sắc ký đảo pha C30, nhờ đó tách galacto-oligosacarit ra khỏi các thành phần khác trong mẫu và định lượng galacto-oligosacarit tách được. Galacto-oligosacarit là hỗn hợp của các hợp chất từ disacarit đến hexasacarit có phân tử chứa một hoặc nhiều phân tử galactosa, được thể hiện bằng công thức chung Gal-(Gal)_n-Glc (trong đó Gal là nhóm galactosa dư, Glc là nhóm glucoza dư, và n là số nguyên nằm trong khoảng từ 0 đến 4). Cần lưu ý rằng lactoza không có mặt trong galacto-oligosacarit.

Thành phần chính của galacto-oligosacarit là trisacarit 4'-galactosyl lactoza (4'-GL), chứa lactoza và một galactosa được liên kết với đầu không khử của nó. Các thành phần cụ thể khác bao gồm Galβ1-3Glc, Galβ1-2Glc, Galβ1-6Glc, Galβ1-6Galβ1-4Glc, Galβ1-6Galβ1-4Galβ1-4Glc, và Galβ1-4Galβ1-4Galβ1-4Glc, hoặc các thành phần tương tự. Trong phương pháp phát hiện và định lượng được đề xuất bởi sáng chế, galacto-oligosacarit có thể được phát hiện và định lượng dưới dạng hỗn hợp, hoặc thành phần galacto-oligosacarit riêng biệt có thể được phát hiện và định lượng; tuy nhiên, theo quan điểm về độ chính xác định lượng, tốt hơn nếu 4'-GL được tách ra và sau đó được phát hiện và định lượng, tiếp đó tính toán dựa trên lượng thu được để xác định tổng lượng galacto-oligosacarit.

Có thể thu được galacto-oligosacarit theo cách bất kỳ; ví dụ, galacto-oligosacarit được tạo ra bằng phản ứng chuyển tiếp bằng cách sử dụng lactoza làm nguyên liệu, và enzym phân hủy lactoza (β-galactosidaza), có thể được sử dụng. Trong quá trình phản ứng chuyển tiếp, vi sinh vật sản sinh ra enzym có thể được bổ sung để tác dụng với

nguyên liệu này. Ví dụ về các nguyên liệu chứa lactoza bao gồm lactoza có bán trên thị trường, sữa, sữa bột, nước sữa pho mát, hoặc nguyên liệu tương tự. Không có giới hạn theo cách bất kỳ đối với enzym được sử dụng và enzym bất kỳ có thể được sử dụng miễn là enzym này có thể tạo dẫn xuất galacto-oligosacarit, trong đó các ví dụ bao gồm các enzym có thể thủy phân lactoza trong nguyên liệu và làm cho galactoza được tạo ra bởi quá trình phân hủy chuyển tiếp thành lactoza hoặc glucoza, cụ thể là β -galactosidaza hoặc α -galactosidaza. Các enzym này có thể được sử dụng một mình hoặc hai hay nhiều enzym trong số chúng có thể được kết hợp để sử dụng. Không có giới hạn theo bất kỳ về các điều kiện xử lý bằng enzym, và thông thường, khoảng nồng độ thích hợp của nguyên liệu là nằm trong khoảng từ 10 đến 70%, có độ pH nằm trong khoảng từ 3 đến 8, nồng độ enzym nằm trong khoảng từ 0,01 đến 100 đơn vị/ml, nhiệt độ nằm trong khoảng từ 20 đến 70°C, và thời gian phản ứng là từ 2 giờ đến 3 ngày. Đường galacto-oligosacarit dạng lỏng có bán trên thị trường cũng có thể được sử dụng, như Oligomate 55N (Yakult Pharmaceutical Industry). Cũng có thể sử dụng galacto-oligosacarit được tách từ nguồn tự nhiên chứa galacto-oligosacarit và tinh chế bằng phương pháp thông thường. Không có giới hạn theo cách bất kỳ về nguồn tự nhiên chứa galacto-oligosacarit, ví dụ, sữa của các động vật có vú có thể được sử dụng.

Trong sáng chế này, không có giới hạn theo cách bất kỳ về mẫu được sử dụng để phát hiện và định lượng galacto-oligosacarit, miễn là nó chứa galacto-oligosacarit và dextrin, và các ví dụ bao gồm thực phẩm dùng cho mục đích sức khỏe cụ thể, thực phẩm chức năng, thực phẩm tăng cường sức khỏe, thực phẩm bổ sung dinh dưỡng, thực phẩm đặc biệt dùng cho trẻ nhỏ/trẻ em/phụ nữ mang thai/người ốm, thực phẩm dùng cho người gặp khó khăn khi nuốt, sữa bột công thức dùng cho trẻ nhỏ hoặc các đồ uống, thực phẩm khác hoặc nguyên liệu của chúng, và các sản phẩm dược phẩm, ngoài các loại khác. Trong số các loại này, tốt hơn nếu phương pháp được đề xuất bởi sáng chế được sử dụng cho sữa bột công thức dùng cho trẻ nhỏ chứa hàm lượng các thành phần đường cao, do nó cho phép phát hiện và định lượng galacto-oligosacarit với độ chính xác cao. Dextrin là thuật ngữ chung để chỉ các chất chứa ba hoặc nhiều phân tử glucoza được polyme hóa với nhau. Một loại dextrin là maltodextrin, loại này là polyme của các D-glucoza được polyme hóa với nhau bởi liên kết α -1,4, có trọng lượng dextroza tương đương nhỏ hơn 20, và thu được bằng cách thủy phân tinh bột.

Maltodextrin bao gồm maltotriosa chứa ba phân tử glucoza, tetrasacarit chứa bốn

phân tử glucoza được polyme hóa với nhau, và polysacarit chứa nhiều phân tử glucoza được polyme hóa với nhau. Maltotrioza, chứa ba phân tử glucoza được polyme hóa với nhau, có kích thước và trọng lượng phân tử giống như 4'-GL, ngoại trừ cấu trúc của nhóm hydroxyl dạng rắn của nó có khác biệt một phần. Trong trường hợp các phân tử có cùng kích thước với 4'-GL có mặt trong mẫu đồ uống, thực phẩm, v.v., các phương pháp thông thường như sắc ký lọc gel có thể không tách được 4'-GL và maltotrioza để định lượng galacto-oligosacarit; tuy nhiên, bằng cách sử dụng phương pháp được đề xuất bởi sáng chế, hai chất này có thể được tách ra hoàn toàn. Trọng lượng đương lượng dextroza là dấu hiệu thể hiện của đường khử trong mẫu dưới dạng glucoza, thu được dưới dạng theo tỷ lệ % hàm lượng chất rắn. Giá trị lớn nhất của trọng lượng đương lượng dextroza là 100, điều này cho thấy rằng toàn bộ hàm lượng chất rắn là glucoza. Trọng lượng đương lượng dextroza là dấu hiệu chỉ báo về tỷ lệ thủy phân từ tinh bột, trong đó dextrin có trọng lượng đương lượng dextroza nhỏ hơn, hoặc cụ thể là tỷ lệ thủy phân thấp hơn, chứa thành phần polysacarit nhiều hơn. Mặt khác, dextrin có trọng lượng đương lượng dextroza lớn hơn, hoặc cụ thể là tỷ lệ thủy phân cao hơn, chứa thành phần oligosacarit nhiều hơn.

Trong phương pháp phát hiện và định lượng được đề xuất bởi sáng chế, trước tiên, chất phản ứng dẫn xuất hóa được cho phản ứng với mẫu để tạo dẫn xuất đường trong mẫu. Không có giới hạn theo cách bất kỳ về chất phản ứng dẫn xuất hóa, miễn là chất này có thể tạo dẫn xuất galacto-oligosacarit, trong đó các ví dụ bao gồm các dẫn xuất kỵ nước có khả năng hấp thụ ánh sáng tử ngoại hoặc ánh sáng trông thấy hoặc phát hiện ánh sáng huỳnh quang, hoặc cụ thể là hợp chất 1-phenyl-3-metyl-5-pyrazolon (PMP), 2-aminopyridin, 2-aminobenzamit, 3-aminoquinon, etyl 4-amino benzoat, butyl 4-amino benzoat, và 4-trimetyl amoni anilin, và một loại dẫn xuất bất kỳ được chọn từ nhóm nêu trên có thể được sử dụng. Cụ thể, tốt hơn là PMP được sử dụng để tách hoàn toàn các thành phần galacto-oligosacarit.

Trong trường hợp dẫn xuất hóa bằng PMP, quá trình dẫn xuất hóa có thể được thực hiện bằng cách, ví dụ, bổ sung dung dịch metanol PMP 0,5M và dung dịch NaOH 0,6M vào mẫu để cho phản ứng xảy ra trong thời gian 30 phút ở nhiệt độ 70°C, và tiếp đó bổ sung dung dịch axit clohydric 0,1M và clorofom vào chất lỏng phản ứng để khuấy hỗn hợp, sau đó loại bỏ clorofom tạo ra lớp ở đáy. Mặc dù đường như galacto-oligosacarit có tính ưa nước, việc tạo dẫn xuất của nó bằng chất phản ứng dẫn xuất hóa kỵ nước làm cho

phần được dẫn xuất hóa của đường kỵ nước vẫn còn lại trong cột lâu hơn nếu nó được nạp vào cột sắc ký lỏng hiệu năng cao chứa các nhóm alkyl trong pha tĩnh, so với thành phần ưa nước.

Sau khi xử lý dẫn xuất hóa, mẫu được sắc ký lỏng hiệu năng cao để tách thành phần galacto-oligosacarit trong mẫu này. Trong sáng chế này, cột được sử dụng để sắc ký lỏng hiệu năng cao là cột sắc ký đảo pha C30, hoặc cụ thể hơn là cột chứa các nhóm alkyl (các nhóm triacontyl) có 30 nguyên tử cacbon trong pha tĩnh. Điều này là do cột có 30 nguyên tử cacbon phải được sử dụng để tách hoàn toàn galacto-oligosacarit trong mẫu. Các ví dụ cụ thể hơn bao gồm Develosil RPAQUEOUS (Nomura Chemical), Develosil C30-UG (Nomura Chemical) và Inertosil C30 S-Select (GL Sciences). Trong số các cột này, cột có pha tĩnh chứa các nhóm cis alkyl có các liên kết đôi được ưu tiên, hoặc cụ thể là Develosil RPAQUEOUS (Nomura Chemical) là được ưu tiên, theo quan điểm về khả năng tách galacto-oligosacarit. Các cột sắc ký đảo pha C30 là thích hợp để phân tách galacto-oligosacarit, điều này chắc chắn là do chiều dài và cấu trúc dạng rắn của các nhóm alkyl sẽ làm cho thời gian lưu của galacto-oligosacarit, maltotriosa, v.v., thay đổi.

Không có giới hạn theo cách bất kỳ đối với dung môi rửa giải có thể được sử dụng làm pha động của phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao, miễn là dung môi này không làm ảnh hưởng bất lợi đến cột hoặc thiết bị, và các ví dụ bao gồm dung môi rửa giải chỉ được tạo thành từ nước, dung môi rửa giải chỉ được tạo thành từ dung dịch đệm, và chất lỏng hỗn hợp của nước hoặc dung dịch đệm và dung môi hữu cơ phân cực, trong đó việc sử dụng chất lỏng hỗn hợp chứa dung dịch đệm và dung môi hữu cơ phân cực là được ưu tiên. Không có giới hạn theo cách bất kỳ về tỷ lệ trộn (theo thể tích, tất cả các tỷ lệ trộn sau đây được thể hiện bằng đơn vị tính theo thể tích) của dung dịch đệm và dung môi hữu cơ phân cực, nhưng tốt hơn là tỷ lệ dung dịch đệm/dung môi hữu cơ phân cực nằm trong khoảng từ 79/21 đến 80/20. Điều này là do khi sử dụng dung môi rửa giải trong khoảng này, galacto-oligosacarit được tách một cách hoàn toàn và có thể thu được phổ sắc ký tốt. Với lý do tương tự, tốt hơn nếu độ pH của dung dịch đệm nằm trong khoảng từ 4 đến 8, hoặc đặc biệt tốt hơn là nằm trong khoảng từ 5 đến 6.

Ngoài ra, để làm dung dịch đệm, tốt hơn nếu dung dịch hỗn hợp được sử dụng chứa ít nhất một loại dung dịch được chọn từ dung dịch đệm kali phosphat, dung dịch đệm kali xitrat, dung dịch đệm amoni format, và dung dịch đệm kali axetat, và để làm dung môi hữu cơ phân cực, ít nhất một loại dung môi được chọn từ axetonitril, metanol,

etanol, propanol, và butanol, trong đó việc sử dụng dung dịch hỗn hợp của dung dịch đậm kali phosphat và axetonitril được đặc biệt ưu tiên, tốt hơn nếu độ pH của dung dịch đậm kali phosphat nằm trong khoảng từ 5 đến 6, và tốt hơn là tỷ lệ trộn của dung dịch đậm kali phosphat và axetonitril nằm trong khoảng từ 79/21 đến 80/20, tính theo tỷ lệ dung dịch đậm kali phosphat/axetonitril.

Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao có thể được thực hiện bằng cách sử dụng thiết bị HPLC có bán trên thị trường, và sự làm cân bằng cột, tốc độ dòng, và các điều kiện khác nhau khác có thể được thiết lập đường như là thích hợp, dựa vào thể tích của mẫu, v.v.. Sau khi sắc ký lỏng hiệu năng cao, phân đoạn thu được có thể được phát hiện và định lượng bằng cách sử dụng các bộ phát hiện khác nhau. Ví dụ, bộ phát hiện sự hấp thụ ánh sáng tử ngoại, bộ phát hiện sự hấp thụ ánh sáng hồng ngoại, hoặc bộ phát hiện sự hấp thụ khác, bộ phát hiện bất kỳ trong các bộ phát hiện sự quay quang, hoặc bộ phát hiện ánh sáng huỳnh quang, v.v., có thể được sử dụng. Trong sáng chế này, việc sử dụng bộ phát hiện sự hấp thụ tử ngoại cho phép định lượng đơn giản và cũng chính xác.

Để làm phương pháp phát hiện và định lượng galacto-oligosacarit trong mẫu, ví dụ, các phương pháp được mô tả dưới đây có thể được sử dụng. Trước tiên, nước hoặc dung môi khác được cho thêm vào mẫu chứa galacto-oligosacarit có hàm lượng 4'-GL đã biết, để hòa tan mẫu, và tiếp đó lượng thích hợp của chất tham chiếu nội được cho thêm vào để điều chế dung dịch mẫu. Theo cách riêng biệt, galacto-oligosacarit và chất tham chiếu nội giống nhau được hòa tan trong nước, v.v., để điều chế dung dịch thử nghiệm chất chuẩn. Dung dịch thử nghiệm chất chuẩn này được pha loãng theo bậc để điều chế, ví dụ, dung dịch pha loãng 10 lần, dung dịch pha loãng 20 lần và dung dịch pha loãng 40 lần. Tiếp đó, dung dịch mẫu và dung dịch thử nghiệm chất chuẩn được tạo dẫn xuất bằng chất phản ứng dẫn xuất hóa là PMP, v.v.. Dung dịch mẫu đã tạo dẫn xuất và dung dịch thử nghiệm chất chuẩn được sắc ký lỏng hiệu năng cao tương ứng để thu được các phổ sắc ký bằng cách sử dụng bộ phát hiện. Các điều kiện của phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao là như đã nêu trên đây.

Kết quả thu được của dung dịch thử nghiệm chất chuẩn được dùng để tạo ra đường cong hiệu chỉnh. Đối với mỗi dung dịch thử nghiệm chất chuẩn được pha loãng bậc, đường cong hiệu chỉnh thu được dựa trên phương pháp bình phương tối thiểu, với trục nằm ngang thể hiện hàm lượng của galacto-oligosacarit và trục thẳng đứng thể hiện tỷ lệ diện tích của 4'-GL và chất tham chiếu nội, dựa vào công thức sau (đường cong hiệu

chính):

Tỷ lệ diện tích (y) = Hằng số (a) x Hàm lượng galacto-oligosacarit (x)

Tiếp đó, tỷ lệ diện tích của 4'-GL và chất tham chiếu nội được tính toán từ kết quả của dung dịch mẫu và tỷ lệ diện tích được phân định cho đường cong hiệu chỉnh trên đây sao cho hàm lượng của galacto-oligosacarit trong mẫu có thể được tính toán. Bằng cách tính toán bổ sung kết quả tính toán được, nếu cần, dựa vào tỷ lệ pha loãng, v.v., của mẫu ở giai đoạn xử lý sơ bộ, hàm lượng galacto-oligosacarit chính xác được định lượng.

Sáng chế được mô tả chi tiết hơn dưới đây bằng cách dựa vào các ví dụ, nhưng cần lưu ý rằng sáng chế không bị giới hạn bởi các ví dụ này theo cách bất kỳ.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ so sánh 1: Định lượng 4'-GL bằng cách sử dụng phương pháp sắc ký lọc gel

(1) Điều chế dung dịch mẫu

Sữa bột công thức dùng cho trẻ nhỏ chứa đường galacto-oligosacarit dạng lỏng (Oligomate 55N: Yakult Chemical Industry) với tỷ lệ 2,3g/100g, tính theo hàm lượng galacto-oligosacarit cũng như maltodextrin với tỷ lệ 1,5g/100g được cân và 2,6g của nó được cân và hòa tan bằng cách cho thêm một lượng nhỏ nước ấm, sau đó, sữa bột công thức đã hòa tan được để yên cho đến khi nó nguội đến nhiệt trong phòng và tiếp đó nước cất được thêm vào để thu được 20ml sữa hòa tan. Cho 4ml sữa hòa tan vào bình định lượng và tiếp đó cho thêm chính xác 2ml dung dịch nước chứa chất tham chiếu nội nồng độ 0,1%, sau đó nước cất được thêm vào để tạo ra tổng thể tích 20ml, để thu được dung dịch mẫu (sữa bột 101 (GOS được thêm vào)). Hàm lượng galacto-oligosacarit trong mỗi 20ml sữa hòa tan là $2,6g \times 2,3/100 = 0,0598g$, nghĩa là hàm lượng trong 100ml là 0,299g.

Để làm nguyên liệu, sữa bột công thức dùng cho trẻ nhỏ chứa lactoza, protein nước sữa tiêu hóa được, dầu cọ, sữa bột toàn phần, dầu hạt cọ đã được cắt phân đoạn, dầu đậu nành đã tinh chế, đường galacto-oligosacarit dạng lỏng, canxi casein, maltodextrin (tinh bột được sacarit hóa), dầu cá đã tinh chế, canxi cacbonat, magie clorua, lecithin, kali phosphat, kali clorua, natri phosphat, kali hydroxit, lactoferin, vitamin C, canxi clorua, sắt pyrophosphat, taurin, vitamin E, kẽm sulfat, xystin, natri xytylat, niacin, canxi pantothenat, vitamin A, đồng sulfat, natri inosinat, natri uridyat, natri guanylat, vitamin B1, 5'-AMP, vitamin B6, vitamin B2, axit folic, caroten, vitamin D, và vitamin B12, và các thành phần dinh dưỡng của sữa bột công thức dùng cho trẻ nhỏ được thể hiện

trong bảng 1. Trong bảng 1, hydrat cacbon bao gồm lactoza, galacto-oligosacarit, dextrin, và các monosacarit.

Bảng 1

Các thành phần dinh dưỡng của sữa bột công thức dùng cho trẻ nhỏ (trong 100g)					
Năng lượng	515kcal	Vitamin K	13µg	Axit α-linolenic	0,4g
Protein	11,9g	Niixin	4mg	Axit docosahexaenoic (DHA)	80mg
Chất béo	27,7g	Axit folic	60µg	Phospholipit	230mg
Hydrat cacbon	55,6g	Axit pantothenic	4mg	Xystin	190mg
Natri	140mg	β-caroten	40µg	Taurin	25mg
Tro	2,4g	Axit linoleic	3,3g	Nucleotit	8mg
Vitamin A	420µg	Canxi	380mg	Lactoferin	100mg
Vitamin B1	0,4mg	Phospho	210mg	β-lactoglobulin	0,2 đến 0,8g
Vitamin B2	0,6mg	Sắt	7mg	Nước	2,4g
Vitamin B6	0,3mg	Kali	480mg		
Vitamin B12	1,5µg	Magie	40mg		
Vitamin C	60mg	Clo	320mg		
Vitamin D	7µg	Kẽm	3mg		
Vitamin E	4,5mg	Đồng	320µg		
Galacto-oligosacarit 2,3g (các đường có mặt được liệt kê dưới đây)					
Disacarit Galβ1-3Glc, Galβ1-2Glc, Galβ1-6Glc,					
Trisacarit Galβ1-6 Galβ1-4Glc, Galβ1-4 Galβ1-4Glc					
Tetrasacarit và đường cao hơn Galβ1-6 Galβ1-4 Galβ1-4Glc, Galβ1-4 Galβ1-4 Galβ1-4Glc					

(2) Điều chế dung dịch mẫu plaxebo

Để làm sữa bột công thức dùng cho trẻ nhỏ không chứa galacto-oligosacarit, quy trình điều chế tương tự với quy trình tạo ra sữa bột 101 (GOS được thêm vào) được thực

hiện để điều chế dung dịch mẫu plaxebo (sữa bột 102 (plaxebo)). Sữa bột công thức dùng cho trẻ nhỏ được sử dụng trong quá trình điều chế này có thành phần nguyên liệu giống với thành phần nguyên liệu của sữa bột công thức dùng cho trẻ nhỏ mà từ đó dung dịch mẫu (sữa bột 101 (GOS được thêm vào)) được điều chế, ngoại trừ việc nó không chứa galacto-oligosacarit và chứa maltodextrin với tỷ lệ 6,2g/100g. Sữa bột 101 (GOS được thêm vào) chứa lactoza có nguồn gốc từ đường galacto-oligosacarit dạng lỏng, galacto-oligosacarit và các monosacarit với tổng trọng lượng bằng 4,7g/100g, và sữa bột 101 (GOS được thêm vào) và sữa bột 102 (plaxebo) chứa lượng hydrat cacbon giống nhau.

(3) Điều chế dung dịch thử nghiệm chất chuẩn galacto-oligosacarit

Đường galacto-oligosacarit dạng lỏng (Oligomate 55N: Yakult Chemical Industry) được cân và cho vào bình định lượng có dung tích 50ml sao cho hàm lượng của đường galacto-oligosacarit dạng lỏng là 2,0mg/100ml, sau đó cho thêm chính xác 1ml dung dịch nước chứa chất tham chiếu nội với nồng độ 1% và tiếp đó nước cất được thêm vào để làm cho tổng thể tích là 50ml, để thu được dung dịch thử nghiệm chất chuẩn (OM55N).

(4) Điều chế dung dịch thử nghiệm chất chuẩn maltodextrin

Đường maltodextrin dạng lỏng được sử dụng để sản xuất sữa bột công thức dùng cho trẻ nhỏ nêu trên (xirô chứa maltoza với hàm lượng cao) được cân và cho vào bình định lượng có dung tích 50ml sao cho hàm lượng của dung dịch maltodextrin là 2,0mg/100ml, sau đó cho thêm chính xác 1ml dung dịch nước chứa chất tham chiếu nội với nồng độ 1% và tiếp đó nước cất được thêm vào để làm cho tổng thể tích là 50ml, để thu được dung dịch thử nghiệm chất chuẩn (maltodextrin).

(5) Lọc

Dung dịch thử nghiệm, dung dịch thử nghiệm plaxebo, dung dịch thử nghiệm chất chuẩn galacto-oligosacarit và dung dịch thử nghiệm chất chuẩn maltodextrin được lọc qua bộ lọc cỡ 0,45µm và dung dịch đã lọc được phân tích trong các điều kiện HPLC như dưới đây.

(6) Phân tích HPLC

Cột: GPC (KS-802) (8,0 × 300mm)

Dung môi rửa giải: nước cất

Tốc độ dòng: 0,5ml/phút

Bộ phát hiện: Bộ phát hiện RI (Shodex SE-201)

Nhiệt độ cột: 80°C

Các kết quả thu được được thể hiện trên Fig.1, trisacarit (maltotriosa: Mal-3) có mặt trong maltodextrin và trisacarit 4'-GL có mặt trong dung dịch thử nghiệm chất chuẩn (OM55N) được rửa giải từ cột sau thời gian lưu giống nhau, và phương pháp sắc ký lọc gel cho thấy các đỉnh của maltotriosa trong maltodextrin và 4'-GL trong galacto-oligosacarit chồng lên nhau và không định lượng được 4'-GL.

Ví dụ 1: Phổ sắc ký đảo pha HPLC – dẫn xuất PMP bằng cách sử dụng cột C30

Dung dịch mẫu của sữa bột công thức dùng cho trẻ nhỏ, dung dịch mẫu placebo, dung dịch thử nghiệm chất chuẩn galacto-oligosacarit và dung dịch thử nghiệm chất chuẩn maltodextrin được điều chế theo cách giống như cách trong ví dụ so sánh 1. Dung dịch thử nghiệm chất chuẩn galacto-oligosacarit được pha loãng thêm bằng nước cất để điều chế dung dịch pha loãng 10 lần, dung dịch pha loãng 20 lần, và dung dịch pha loãng 40 lần. Nồng độ của đường galacto-oligosacarit dạng lỏng trong các dung dịch pha loãng lần lượt là 0,2g/100ml, 0,1g/100ml và 0,05g/100ml.

(1) Dẫn xuất hóa PMP

Cho 100µl của mỗi dung dịch thử nghiệm trong số dung dịch mẫu, dung dịch thử nghiệm chất chuẩn galacto-oligosacarit, và dung dịch thử nghiệm chất chuẩn maltodextrin vào ống thử nghiệm có ren ở miệng và tiếp đó 100µl dung dịch nước NaOH 0,6M được thêm vào và hỗn hợp được khuấy. Tiếp đó, 200µl dung dịch metanol PMP 0,5M được thêm vào và hỗn hợp được khuấy. Hỗn hợp khuấy này được đun nóng đến nhiệt độ 70°C trong thời gian 30 phút để được tạo dẫn xuất với PMP. Sau khi làm nguội đến nhiệt độ trong phòng, hỗn hợp được tạo độ axit nhẹ bằng cách cho thêm 0,7ml dung dịch nước HCl 0,1M, tiếp đó chiết trên cơ sở clorofom để loại bỏ chất phản ứng dư. Cụ thể, khoảng 1ml clorofom được thêm vào và hỗn hợp được khuấy trong thời gian ít nhất 30 giây và tiếp đó được ly tâm ở tốc độ 2500 vòng/phút trong thời gian 5 phút để loại bỏ clorofom tạo thành lớp ở đáy. Thao tác tương tự được lặp lại hai lần. Lớp nước được lọc qua bộ lọc cỡ 0,45µm và tiếp đó hỗn hợp đã lọc được phân tích trong các điều kiện HPLC dưới đây.

(2) Các điều kiện phân tích HPLC

Cột: Develosil RPAQUEOUS (4,6 × 250mm) (C30)

Dung môi rửa giải: Dung dịch đệm kali phosphat (độ pH = 6)/CH₃CN (80/20)

Tốc độ dòng: 1,0 ml/phút

Bước sóng phát hiện: UV245nm

Nhiệt độ cột: 35°C

Các kết quả thu được được thể hiện bằng đường chấm chấm trên Fig.2, đỉnh của 4'-GL phát hiện được trong dung dịch mẫu (sữa bột 101) không phát hiện được trong dung dịch mẫu placebo (sữa bột 102) và điều này khẳng định rằng khi dung dịch được tạo dẫn xuất với PMP được sắc ký lỏng hiệu năng cao bằng cách sử dụng sử dụng cột sắc ký đảo pha C30, 4'-GL và maltotriosa có thể được tách ra.

(3) Tính hàm lượng galacto-oligosacarit

Các dung dịch pha loãng được điều chế từ dung dịch thử nghiệm chất chuẩn galacto-oligosacarit được sắc ký HPLC trong cùng điều kiện như được thể hiện trên đây và bằng cách sử dụng tỷ lệ diện tích của chất tham chiếu nội và 4'-GL, thu được đường cong hiệu chỉnh của đường galacto-oligosacarit dạng lỏng. Các kết quả phân tích HPLC được thể hiện trong bảng 2.

Bảng 2

Tỷ lệ diện tích của chất tham chiếu nội và 4'-GL trong các dung dịch thử nghiệm chất chuẩn galacto-oligosacarit			
Đường galacto-oligosacarit dạng lỏng (g/100ml)	Diện tích		Tỷ lệ diện tích
	4'-GL	Chất tham chiếu nội	4'-GL/chất tham chiếu nội
0,05	170632	806079	0,212
0,10	325278	807574	0,403
0,20	634573	799116	0,794

Khi đường cong hiệu chỉnh thu được bằng phương pháp bình phương tối thiểu, với x là hàm lượng của đường galacto-oligosacarit dạng lỏng và y là tỷ lệ diện tích, đường cong hiệu chỉnh được thể hiện bằng công thức $y = 3,9909x$. Tỷ lệ diện tích của chất tham chiếu nội và 4'-GL trong dung dịch mẫu (0,5526) được gán cho giá trị y của đường cong hiệu chỉnh này và lượng galacto-oligosacarit trong mẫu được tính toán bằng cách xem xét tỷ lệ pha loãng, v.v., của các dung dịch mẫu (bảng 3). Cụ thể, gán giá trị $y = 0,5526$ cho đường cong hiệu chỉnh $y = 3,9909x$ thu được giá trị x (nồng độ của đường galacto-oligosacarit dạng lỏng trong dung dịch mẫu) bằng 0,138 (g/100ml). Do dung dịch mẫu

được điều chế bằng cách pha loãng sữa hòa tan năm lần, lượng đường galacto-oligosacarit dạng lỏng trong sữa hòa tan được tính như sau $0,138 \times 5 = 0,690$ (g/100ml). Do hàm lượng chất rắn trong đường dạng lỏng là 75% và hàm lượng galacto-oligosacarit trong các chất rắn là 56,4%, hàm lượng galacto-oligosacarit trong sữa hòa tan được tính như sau $0,690 \times 0,75 \times 0,564 = 0,292$ (g/100ml). Do nồng độ của sữa bột công thức dùng cho trẻ nhỏ trong sữa hòa tan là 2,6g/20ml, 100ml sữa hòa tan chứa 13g sữa bột công thức dùng cho trẻ nhỏ, nên sữa hòa tan sẽ chứa 0,292g galacto-oligosacarit/100ml, nghĩa là nồng độ galacto-oligosacarit có mặt là 2,25g/100g trong mỗi 100g sữa bột công thức dùng cho trẻ nhỏ, lượng này gần bằng lượng galacto-oligosacarit được trộn (2,3g/100g).

Bảng 3

Hàm lượng galacto-oligosacarit được tính toán bằng cách sử dụng đường cong hiệu chỉnh						
Diện tích		Tỷ lệ diện tích của 4'-GL/ chất tham chiếu nội	Lượng đường galacto-oligosacarit dạng lỏng		Lượng galacto-oligosacarit	
4'-GL	Chất tham chiếu nội	chất tham chiếu nội	Dung dịch mẫu	Sữa hòa tan	Sữa hòa tan	Sữa bột
434894	786975	0,5526	0,138g/100ml	0,690g/100ml	0,292g/100ml	2,25g/100g

Ví dụ so sánh 2: Phổ sắc ký HPLC đảo pha – dẫn xuất PMP bằng cách sử dụng các cột C8, C18

Sữa bột công thức dùng cho trẻ nhỏ chứa đường galacto-oligosacarit dạng lỏng (Oligomate 55N: Yakult Chemical Industry) với tỷ lệ 2,3g/100g tính theo hàm lượng galacto-oligosacarit cũng như maltodextrin với tỷ lệ 1,5g/100g được cân và 5g sữa này được cân chính xác và hòa tan bằng cách cho thêm một lượng nhỏ nước ấm, sau đó sữa bột công thức đã hòa tan được để yên cho đến khi sữa này nguội đến nhiệt độ trong phòng. Cho thêm chính xác 1ml dung dịch nước chứa chất tham chiếu nội nồng độ 1%, sau đó nước cất được thêm vào để tạo ra tổng thể tích 50ml để thu được dung dịch mẫu (sữa bột 101 (GOS được thêm vào)).

Ngoài ra, để làm sữa bột công thức dùng cho trẻ nhỏ không chứa galacto-oligosacarit, quy trình điều chế tương tự với sữa bột 101 (GOS được thêm vào) được thực

hiện để điều chế dung dịch mẫu plaxebo (sữa bột 102 (plaxebo)). Sữa bột công thức dùng cho trẻ nhỏ được sử dụng trong quá trình điều chế này có thành phần nguyên liệu giống với thành phần nguyên liệu của sữa bột công thức dùng cho trẻ nhỏ mà từ đó dung dịch mẫu (sữa bột 101 (GOS được thêm vào)) được điều chế, ngoại trừ việc nó không chứa galacto-oligosacarit và chứa maltodextrin với tỷ lệ 6,2g/100g.

Đường galacto-oligosacarit dạng lỏng được cân và cho vào bình định lượng có dung tích 50ml sao cho hàm lượng của galacto-oligosacarit là 3,0g/100ml, sau đó cho thêm chính xác 1ml dung dịch nước chứa chất tham chiếu nội với nồng độ 1% và tiếp đó nước cất được thêm vào để làm cho tổng thể tích là 50ml, để thu được dung dịch thử nghiệm chất chuẩn galacto-oligosacarit.

Đường maltodextrin dạng lỏng được dùng để sản xuất sữa bột công thức dùng cho trẻ nhỏ nêu trên (sirô chứa maltoza với hàm lượng cao) được cân và cho vào bình định lượng có dung tích 50ml sao cho hàm lượng dung dịch maltodextrin là 2,0mg/100ml, sau đó cho thêm chính xác 1ml dung dịch nước chứa chất tham chiếu nội với nồng độ 1% và tiếp đó nước cất được thêm vào để làm cho tổng thể tích là 50ml, để thu được dung dịch thử nghiệm chất chuẩn (maltodextrin).

Dẫn xuất hóa PMP

Cho 100 μ l của mỗi dung dịch mẫu, dung dịch thử nghiệm chất chuẩn galacto-oligosacarit, và dung dịch thử nghiệm chất chuẩn maltodextrin được định lượng cho vào ống thử nghiệm có ren ở miệng và tiếp đó 100 μ l dung dịch nước NaOH 0,6M được thêm vào và hỗn hợp được khuấy. Tiếp đó, 200 μ l dung dịch metanol PMP 0,5M được thêm vào và hỗn hợp này được khuấy. Hỗn hợp đã khuấy được đun nóng đến nhiệt độ 70°C trong thời gian 30 phút để được tạo dẫn xuất với PMP. Sau khi được làm nguội đến nhiệt độ trong phòng, hỗn hợp được tạo độ axit nhẹ bằng cách cho thêm 0,7ml dung dịch nước HCl 0,1M, tiếp đó chiết trên cơ sở clorofom để loại bỏ chất phản ứng dư. Cụ thể, khoảng 1ml clorofom được thêm vào và hỗn hợp được khuấy trong thời gian ít nhất 30 giây và tiếp đó được ly tâm ở tốc độ 2500 vòng/phút trong thời gian 5 phút để loại bỏ clorofom có trong lớp ở đáy. Thao tác tương tự được lặp lại hai lần. Lớp nước được lọc qua bộ lọc cỡ 0,45 μ m và hỗn hợp đã lọc được phân tích trong hai điều kiện HPLC được thể hiện dưới đây.

Các điều kiện phân tích HPLC

- (1) HPLC sử dụng cột C18

Cột: Inertasil ODS-3 (4,6 × 250mm) (Cột đảo pha C18)

Dung môi rửa giải: Dung dịch đệm kali phosphat (độ pH = 6)/CH₃CN
(80/20)

Tốc độ dòng: 1,0 ml/phút

Bước sóng phát hiện: UV245nm

Nhiệt độ cột: 35°C

(2) HPLC sử dụng cột C8

Cột: Imtakt UK-8 (4,6 × 150mm) (Cột đảo pha C8)

Dung môi rửa giải: Dung dịch đệm kali phosphat (độ pH = 6)/CH₃CN
(80/20)

Tốc độ dòng: 1,0 ml/phút

Bước sóng phát hiện: UV245nm

Nhiệt độ cột: 35°C

Kết quả là mặc dù 4'-GL và maltotriosa (Mal-3) đã được tách ra trong cột sắc ký đảo pha C18, các đỉnh của 4'-GL và các thành phần galacto-oligosacarit khác chồng lên nhau và không thể tách được 4'-GL. Cụ thể, như được thể hiện trên Fig.3, các kết quả của dung dịch thử nghiệm chất chuẩn galacto-oligosacarit (OM55N) và dung dịch mẫu (sữa bột 101) là đỉnh của 4'-GL chồng lên đỉnh của các chất khác ở phía bên trái, cho thấy đỉnh gối nhau.

Khi cột sắc ký đảo pha C8 được sử dụng, 4'-GL và maltotriosa (Mal-3) được tách ra nhưng các đỉnh của 4'-GL và các thành phần galacto-oligosacarit khác chồng lên nhau và không thực hiện được việc tách ra (Fig.4). Cụ thể, so sánh với kết quả phân tích bằng cách sử dụng cột sắc ký đảo pha C30 (Fig.2) cho thấy rằng trong khi đỉnh của các thành phần galacto-oligosacarit khác có mặt ngay bên trái của đỉnh 4'-GL trên Fig.2, đỉnh này chồng lên đỉnh của 4'-GL để tạo ra đỉnh kết hợp cao hơn trên Fig.4. Các kết quả này gợi ý rằng không thể tách hoặc định lượng 4'-GL bằng cách sử dụng cột C18 hoặc cột C8.

Ví dụ 2: Nghiên cứu về dung môi rửa giải trong phương pháp HPLC

Các dung dịch mẫu (sữa bột 101 (GOS được thêm vào), sữa bột 102 (plaxebo)), dung dịch thử nghiệm chất chuẩn galacto-oligosacarit và dung dịch thử nghiệm chất chuẩn maltodextrin được điều chế theo cách tương tự trong ví dụ so sánh 2 và tiếp đó được tạo dẫn xuất bằng PMP theo cách tương tự như trong ví dụ so sánh 2 và được phân tích trong sáu điều kiện HPLC như được thể hiện tương ứng dưới đây.

- (1) Các điều kiện HPLC với dung dịch đệm có độ pH = 4
Cột: Develosil RPAQUEOUS (4,6 × 250mm)
Dung môi rửa giải: Dung dịch đệm kali phosphat (độ pH = 4)/CH₃CN
(78/22)
Tốc độ dòng: 1,0 ml/phút
Bước sóng phát hiện: UV245nm
Nhiệt độ cột: 35°C
- (2) Các điều kiện HPLC với dung dịch đệm có độ pH = 5
Cột: Develosil RPAQUEOUS (4,6 × 250mm)
Dung môi rửa giải: Dung dịch đệm kali phosphat (độ pH = 5)/CH₃CN
(79/21)
Tốc độ dòng: 1,0 ml/phút
Bước sóng phát hiện: UV245nm
Nhiệt độ cột: 35°C
- (3) Các điều kiện HPLC với dung dịch đệm có độ pH = 7
Cột: Develosil RPAQUEOUS (4,6 × 250mm)
Dung môi rửa giải: Dung dịch đệm kali phosphat (độ pH = 7)/CH₃CN
(81/19)
Tốc độ dòng: 1,0 ml/phút
Bước sóng phát hiện: UV245nm
Nhiệt độ cột: 35°C
- (4) Các điều kiện HPLC với dung dịch đệm có độ pH = 7
Cột: Develosil RPAQUEOUS (4,6 × 250mm)
Dung môi rửa giải: Dung dịch đệm kali phosphat (độ pH = 7)/CH₃CN
(82/18)
Tốc độ dòng: 1,0 ml/phút
Bước sóng phát hiện: UV245nm
Nhiệt độ cột: 35°C
- (5) Các điều kiện HPLC với dung dịch đệm có độ pH = 8
Cột: Develosil RPAQUEOUS (4,6 × 250mm)
Dung môi rửa giải: Dung dịch đệm kali phosphat (độ pH = 8)/CH₃CN
(82/18)

Tốc độ dòng: 1,0 ml/phút

Bước sóng phát hiện: UV245nm

Nhiệt độ cột: 35°C

(6) Các điều kiện HPLC ở dung dịch đệm có độ pH = 8

Cột: Develosil RPAQUEOUS (4,6 × 250mm)

Dung môi rửa giải: Dung dịch đệm kali phosphat (độ pH = 8)/CH₃CN

(83/17)

Tốc độ dòng: 1,0 ml/phút

Bước sóng phát hiện: UV245nm

Nhiệt độ cột: 35°C

Các kết quả của ví dụ 1 đã cho thấy rằng khi dung dịch đệm kali phosphat có độ pH = 6 được sử dụng, 4'-GL có thể được tách ra và galacto-oligosacarit có thể được định lượng. Mặt khác, như được thể hiện trên Fig.5, các hình vẽ từ Fig.7 đến Fig.10, việc sử dụng các dung dịch đệm kali phosphat có độ pH = 4, 7 và 8 làm cho các đỉnh của 4'-GL và các thành phần galacto-oligosacarit khác chồng lên nhau và kết quả là không thể tách hoặc định lượng 4'-GL. Cụ thể, trong khi đỉnh của các thành phần galacto-oligosacarit khác có mặt ngay bên trái của đỉnh 4'-GL trên Fig.2, việc sử dụng dung dịch đệm kali phosphat có độ pH = 4 tạo ra đỉnh duy nhất như được thể hiện trên phổ sắc ký của OM55N, điều này cho thấy rằng không thể tách được 4'-GL (Fig.5).

Ngoài ra, khi dung môi rửa giải chứa dung dịch đệm kali phosphat (độ pH = 7) và CH₃CN với tỷ lệ 81/19 (Fig.7) được sử dụng, đỉnh của các thành phần galacto-oligosacarit khác chồng lên đỉnh của 4'-GL ở phía bên phải nó, như được thể hiện trên phổ sắc ký của OM55N, do đó làm cho diện tích đỉnh của 4'-GL lớn hơn.

Khi dung môi rửa giải chứa dung dịch đệm kali phosphat (độ pH = 7) và CH₃CN với tỷ lệ 82/18 được sử dụng (Fig.8), phổ sắc ký thu được của OM55N không cho thấy đỉnh có mặt ngay phía bên trái của đỉnh 4'-GL mà ở đó nó phải được phát hiện, mà thay vào đó đỉnh này chồng lên đỉnh của 4'-GL.

Khi dung môi rửa giải chứa dung dịch đệm kali phosphat (độ pH = 8) và CH₃CN với tỷ lệ 82/18 được sử dụng (Fig.9) hoặc với tỷ lệ 83/17 được sử dụng (Fig.10), so sánh phổ sắc ký của OM55N và phổ sắc ký của maltodextrin thấy rằng 4'-GL có thể được tách ra khỏi maltotriosa và các thành phần oligosacarit khác; tuy nhiên, so sánh phổ sắc ký của OM55N và phổ sắc ký của dung dịch mẫu placebo (sữa bột 102) thấy rằng đỉnh của

4'-GL khớp với đỉnh của các thành phần khác trong sữa bột 102, do đó ngăn cản việc tách 4'-GL riêng rẽ.

Mặt khác, khi dung môi rửa giải chứa dung dịch đệm kali phosphat (độ pH = 5) và CH₃CN với tỷ lệ 79/21 được sử dụng (Fig.6), 4'-GL có thể được tách ra khỏi maltotriosa và các thành phần galacto-oligosacarit khác.

Ví dụ 3: Phổ sắc ký HPLC đảo pha – dẫn xuất PMP (C30) của mẫu thực phẩm dinh dưỡng

Các nguyên liệu được thể hiện trong bảng 4 được trộn lẫn để tạo ra thực phẩm dinh dưỡng. Nước cất được cho thêm vào 10g thực phẩm dinh dưỡng này để tạo ra thể tích tổng là 50ml, sau đó hỗn hợp được ly tâm ở tốc độ 20000 g (200000 m/s²) trong thời gian 30 phút và ly tâm lại ở tốc độ 20000 g (200000m/s²) trong thời gian 30 phút. Thực phẩm dinh dưỡng đã ly tâm được tách thành ba lớp bao gồm lớp đáy, lớp giữa và lớp trên cùng. Lớp giữa được tách ra và mẫu tách ra được lọc qua bộ lọc cỡ 0,45µm. Theo cách riêng biệt, để làm mẫu chuẩn, dung dịch thử nghiệm chất chuẩn galacto-oligosacarit được điều chế bằng cách sử dụng Oligomat 55 (Yakult Chemical Industry) theo cách giống như trong ví dụ so sánh 1. Cho 100µl mỗi mẫu đã lọc vào vào ống thử nghiệm có ren ở miệng và dung dịch thử nghiệm chất chuẩn galacto-oligosacarit được định lượng và sau đó được làm khô và hóa rắn dưới áp suất giảm. 100µl dung dịch nước chứa chất tham chiếu nội nồng độ 0,02% được thêm vào và tiếp đó 200µl dung dịch metanol PMP 0,5M được thêm vào và hỗn hợp được khuấy. Sau đó, hỗn hợp được đun nóng đến nhiệt độ 70°C trong thời gian 30 phút để được tạo dẫn xuất với PMP, và phân tích trong các điều kiện HPLC được thể hiện dưới đây.

Bảng 4

Thành phần của thực phẩm dinh dưỡng	
	Lượng được trộn trong mỗi 100ml (g)
Canxi caseinat	3,4409
Natri caseinat	2,5806
Dầu hỗn hợp	0,2151
Maltodextrin	10,1075

Đường được tạo hạt	2,4731
Dextrin không tiêu hóa được	0,6000
Oligomat 55	0,4086
Hỗn hợp vitamin	0,1000
Muối natri của axit ascorbic	0,0630
Magie sulfat (dạng tinh thể heptahydrat)	0,2495
Kali clorua (khan)	0,2043
Natri cacbonat (khan)	0,1290
Dikali hydro phosphat (khan)	0,0400
Hỗn hợp nấm men vô cơ	0,0418
Chất nhũ hóa (Sunsoft)	0,2000
Caragenan	0,0400
Xenluloza tinh thể	0,0301
Silic khử bột	0,0140
Chất tạo hương vị	0,7633
Nước khoáng	83,4624
Tổng	106,9913

Các điều kiện phân tích HPLC

Cột: Develosil RPAQUEOUS (4,6 × 250mm)

Dung môi rửa giải: Dung dịch đệm kali phosphat (độ pH = 6)/CH₃CN (80/20)

Tốc độ dòng: 1,0 ml/phút

Bước sóng phát hiện: UV245nm

Nhiệt độ cột: 35°C

Các kết quả như được thể hiện trên Fig.11, đỉnh của 4'-GL xuất hiện sau thời gian lưu 24,324 phút, điều này cho thấy rằng nó được tách ra khỏi các thành phần khác có mặt trong mẫu. Cần lưu ý rằng sự xuất hiện của đỉnh 4'-GL sau thời gian lưu 24,324 phút được khẳng định bằng cách phân tích dung dịch thử nghiệm chất chuẩn galacto-oligosacarit trong các điều kiện phân tích HPLC tương tự.

Khả năng ứng dụng trong công nghiệp

Theo phương pháp phát hiện và định lượng được đề xuất bởi sáng chế, galacto-oligosacarit và các thành phần khác trong mẫu có thể được tách ra dễ dàng và với chi phí thấp để cho phép định lượng chính xác galacto-oligosacarit, để cho phép kiểm soát chính xác lượng galacto-oligosacarit trong mẫu cũng như thu được và hiển thị chính xác các dữ liệu thử nghiệm hiệu quả khác nhau, v.v..

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp phát hiện galacto-oligosacarit, trong đó phương pháp này là phương pháp phát hiện galacto-oligosacarit trong mẫu chứa galacto-oligosacarit và dextrin, phương pháp này bao gồm các bước:
cho mẫu nêu trên phản ứng với chất phản ứng dẫn xuất hóa để tạo dẫn xuất dextrin và galacto-oligosacarit trong mẫu này, và sau đó
tách và phát hiện các thành phần galacto-oligosacarit trong mẫu này bằng cách sắc ký lỏng hiệu năng cao sử dụng cột sắc ký đảo pha C30.
2. Phương pháp phát hiện galacto-oligosacarit theo điểm 1, trong đó chất lỏng hỗn hợp chứa dung dịch đệm và dung môi hữu cơ phân cực được sử dụng làm dung môi rửa giải của quá trình sắc ký lỏng hiệu năng cao.
3. Phương pháp phát hiện galacto-oligosacarit theo điểm 2, trong đó dung dịch đệm có độ pH nằm trong khoảng từ 5 đến 6 được sử dụng làm dung dịch đệm.
4. Phương pháp phát hiện galacto-oligosacarit theo điểm 2, trong đó tỷ lệ trộn (theo thể tích) của dung dịch đệm và dung môi hữu cơ phân cực trong chất lỏng hỗn hợp nằm trong khoảng từ 79/21 đến 80/20, tính theo dung dịch đệm/dung môi hữu cơ phân cực.
5. Phương pháp phát hiện galacto-oligosacarit theo điểm 2, trong đó ít nhất một dung dịch được chọn từ dung dịch đệm kali phosphat, dung dịch đệm kali xitrat, dung dịch đệm amoni format, và dung dịch đệm kali axetat được sử dụng làm dung dịch đệm để điều chế chất lỏng hỗn hợp, và ít nhất một chất được chọn từ axetonitril, metanol, etanol, propanol, và butanol được sử dụng làm dung môi hữu cơ phân cực.
6. Phương pháp phát hiện galacto-oligosacarit theo điểm 1, trong đó mẫu chứa galacto-oligosacarit và dextrin là đồ uống hoặc thực phẩm.
7. Phương pháp phát hiện galacto-oligosacarit theo điểm 1, trong đó các thành phần galacto-oligosacarit cần được tách ra là 4'-galactosyl lactoza.
8. Phương pháp phát hiện galacto-oligosacarit theo điểm 1, trong đó một chất phản ứng

được chọn từ 1-phenyl-3-metyl-5-pyrazolon, 2-aminopyridin, 2-aminobenzamit, 3-aminoquinon, etyl 4-amino benzoat, butyl 4-amino benzoat, và 4-trimetyl amoni anilin được sử dụng làm chất phản ứng dẫn xuất hóa.

9. Phương pháp phát hiện galacto-oligosacarit theo điểm 1, trong đó cột sắc ký đảo pha C30 có pha tĩnh chứa các nhóm cis alkyl có các liên kết đôi.

Fig.1

Phổ sắc ký HPLC bằng cách sử dụng cột lọc gel

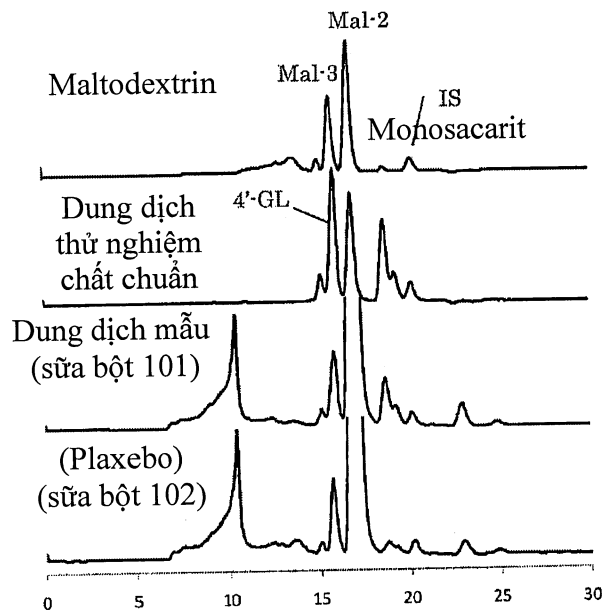


Fig.2

Phổ sắc ký HPLC đảo pha - dẫn xuất PMP (C30)

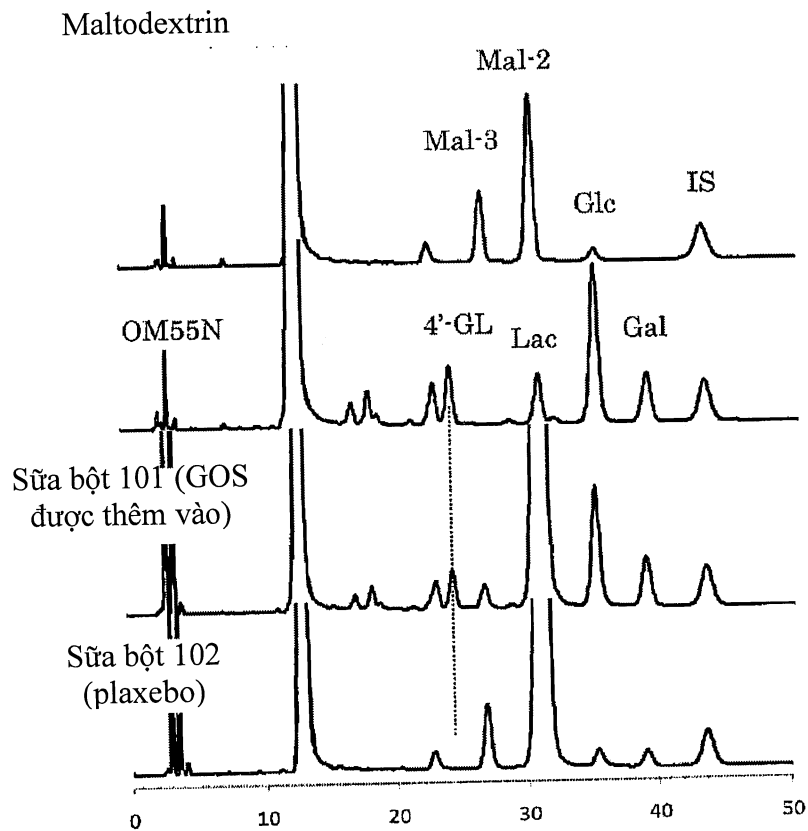


Fig.3

Phổ sắc ký HPLC đảo pha - dẫn xuất PMP (Cột đảo pha C18)

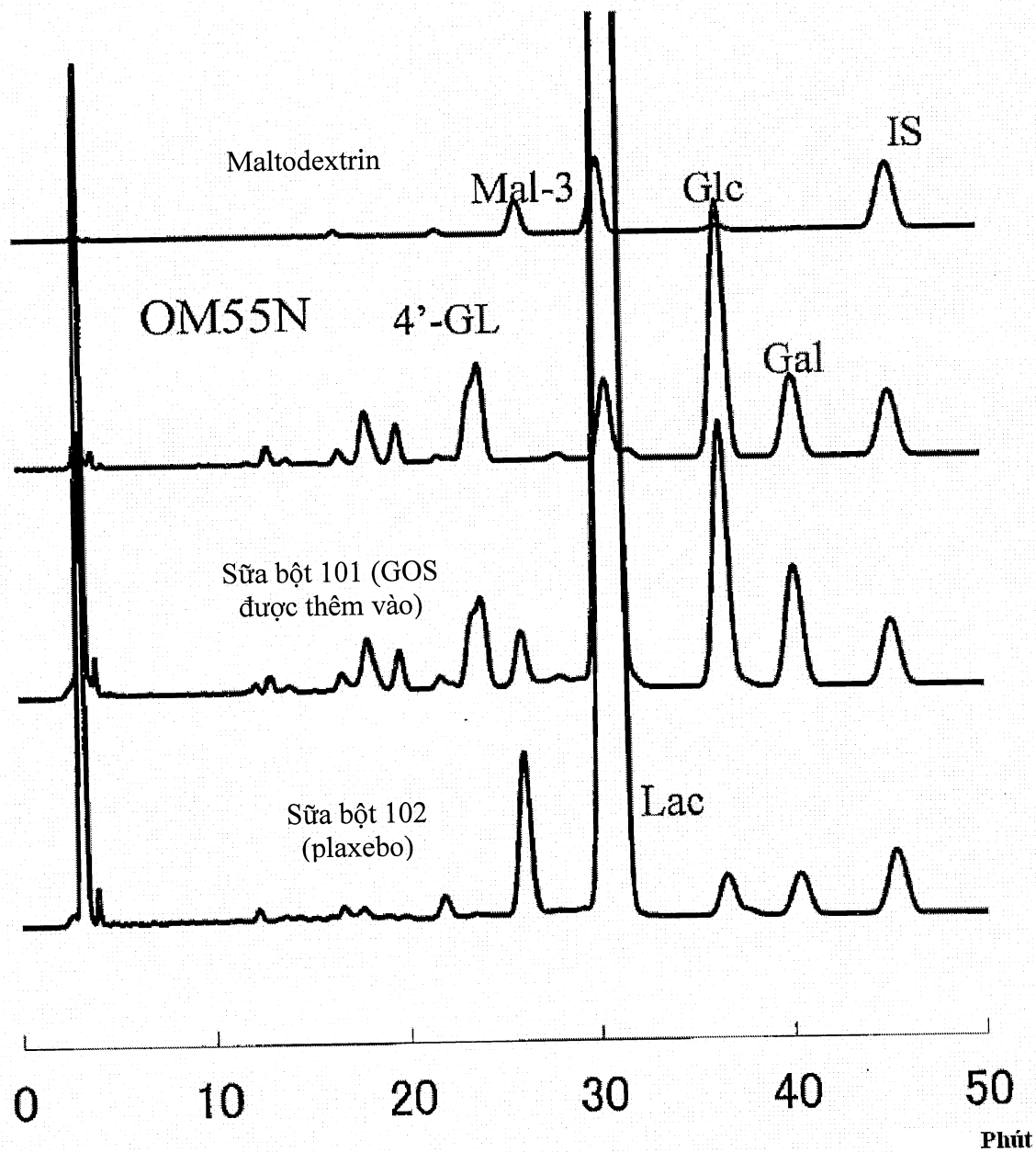


Fig.4

Phổ sắc ký HPLC đảo pha - dẫn xuất PMP (Cột đảo pha C8)

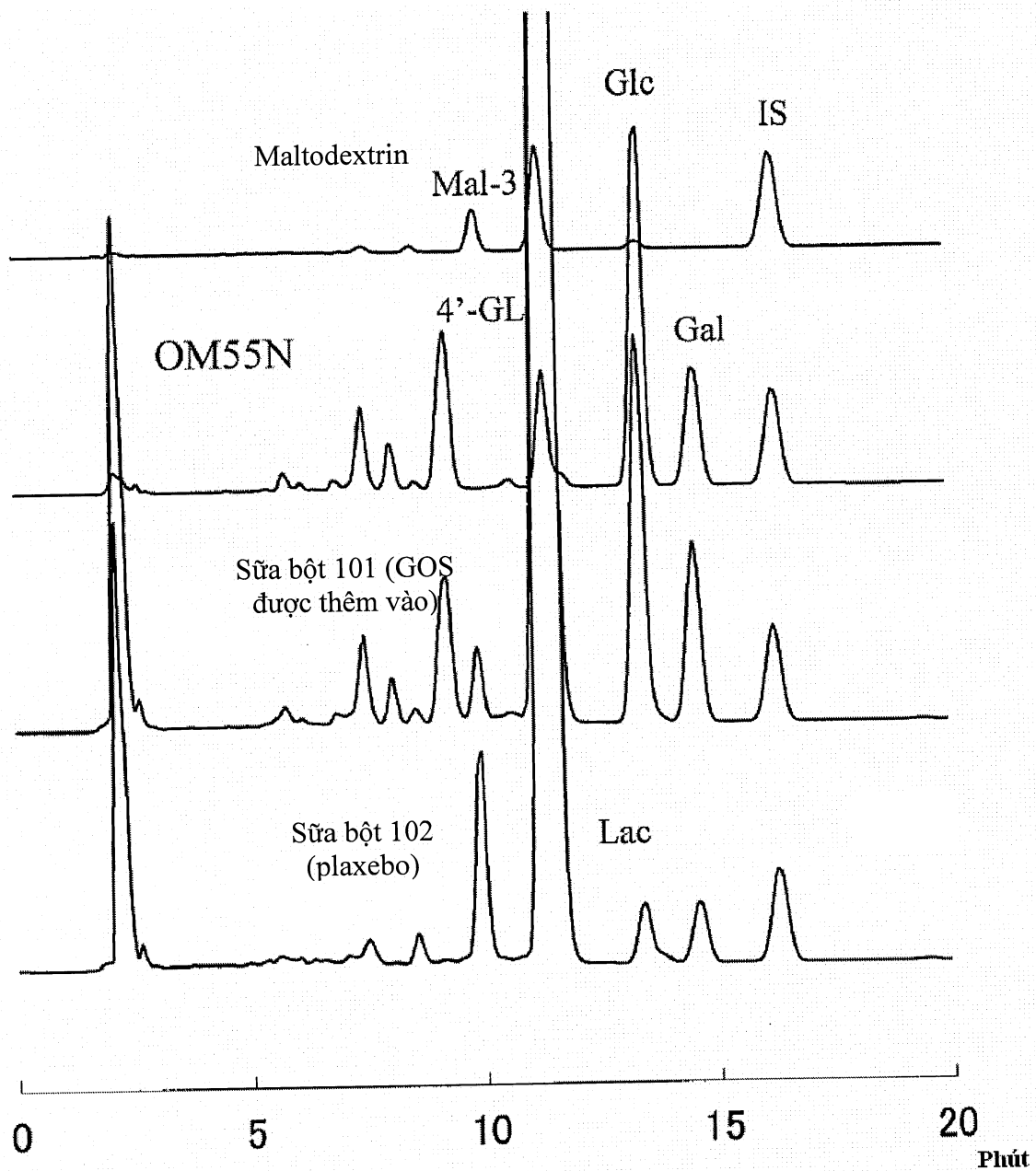


Fig.5

Phổ sắc ký HPLC đảo pha - dẫn xuất PMP (C30)

Dung dịch đệm kali phosphat (độ pH = 4)/CH₃CN (78/22)

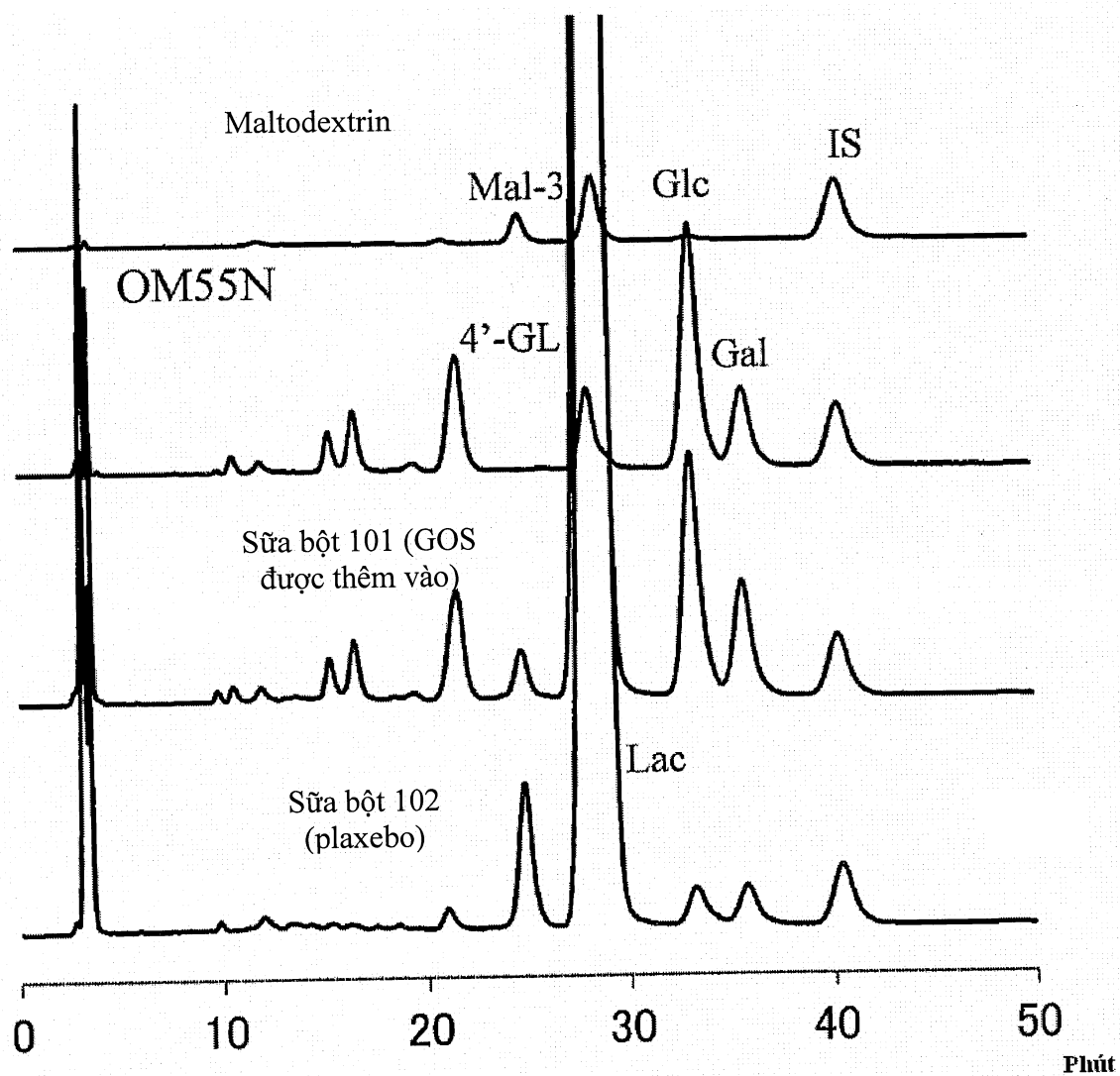


Fig.6

Phổ sắc ký HPLC đảo pha - dẫn xuất PMP (C30)

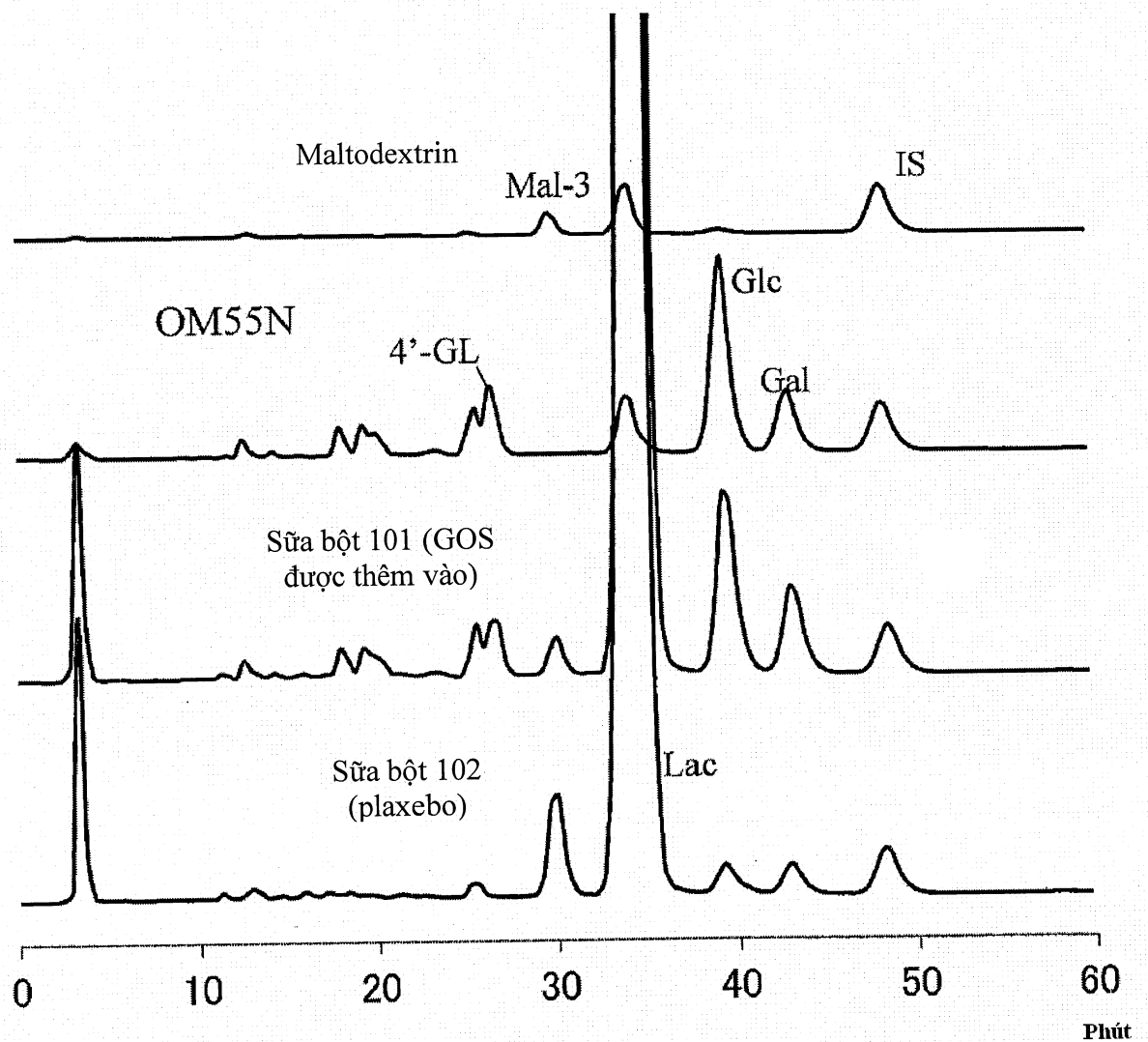
Dung dịch đệm kali phosphat (độ pH = 5)/CH₃CN (79/21)

Fig.7

Phổ sắc ký HPLC đảo pha - dẫn xuất PMP (C30)

Dung dịch đệm kali phosphat (độ pH = 7)/CH₃CN (81/19)

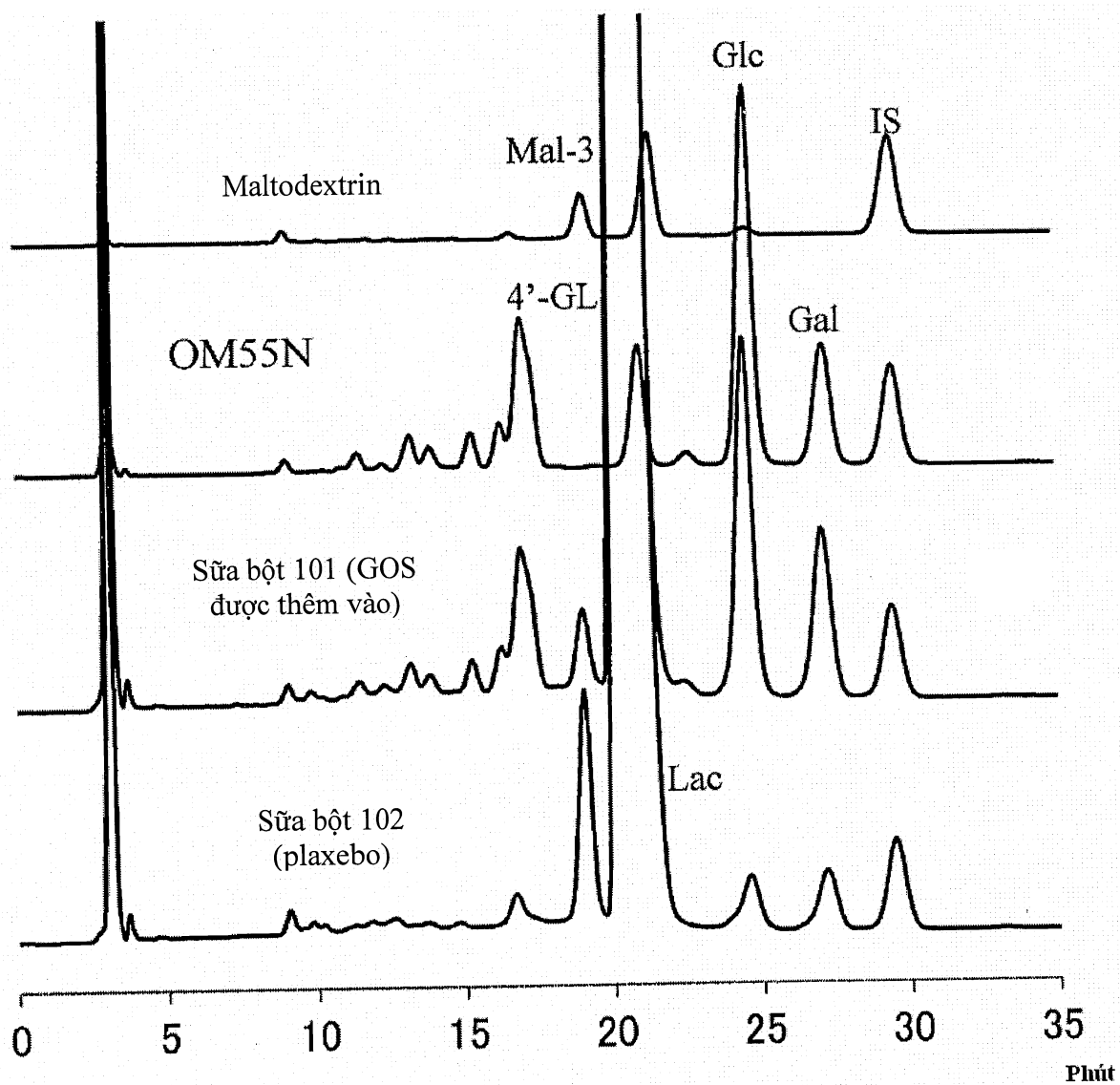


Fig.8

Phổ sắc ký HPLC đảo pha - dẫn xuất PMP (C30)

Dung dịch đệm kali phosphat (độ pH = 7)/CH₃CN (82/18)

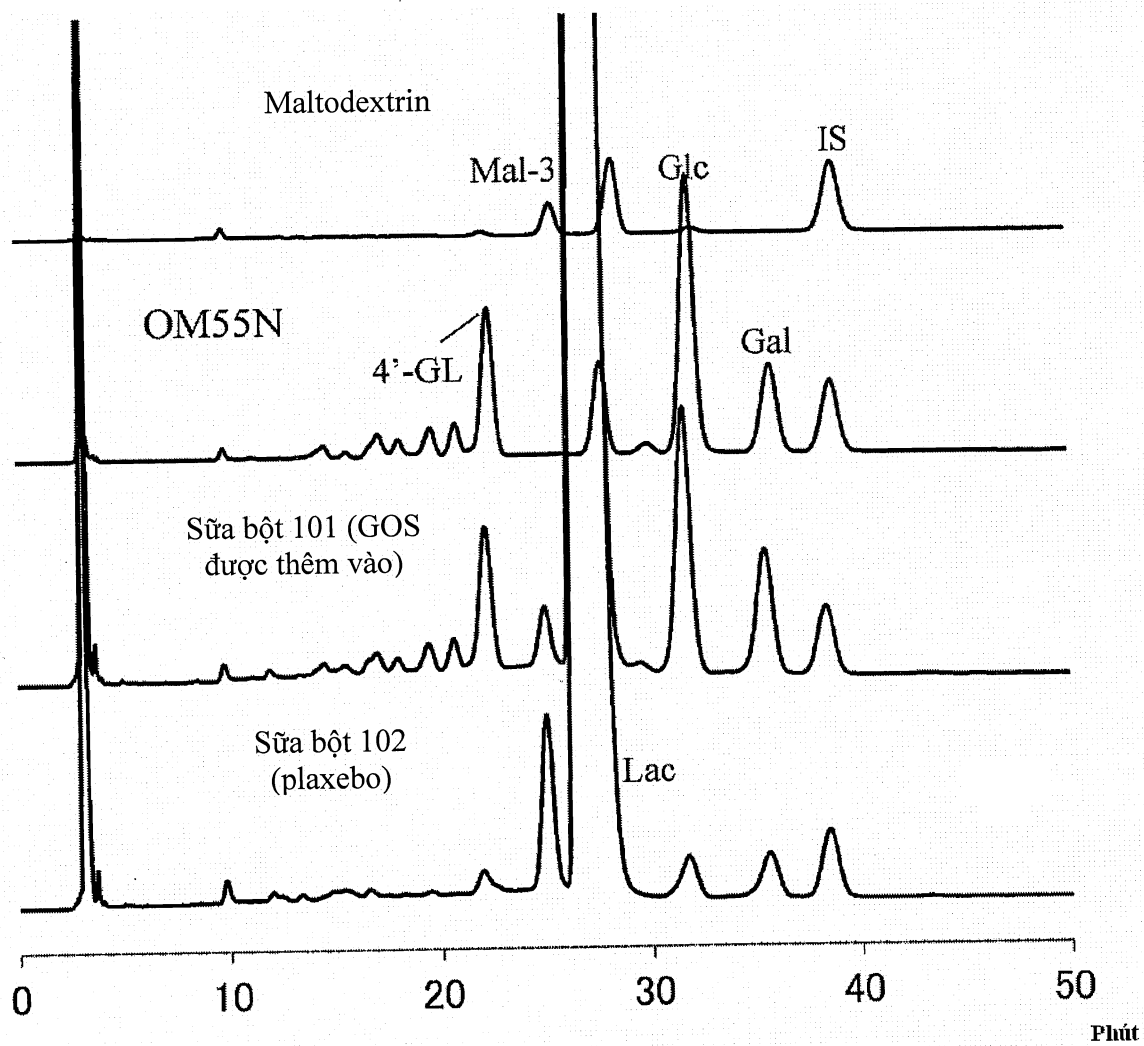


Fig.9

Phổ sắc ký HPLC đảo pha - dẫn xuất PMP (C30)

Dung dịch đệm kali phosphat (độ pH = 8)/CH₃CN (82/18)

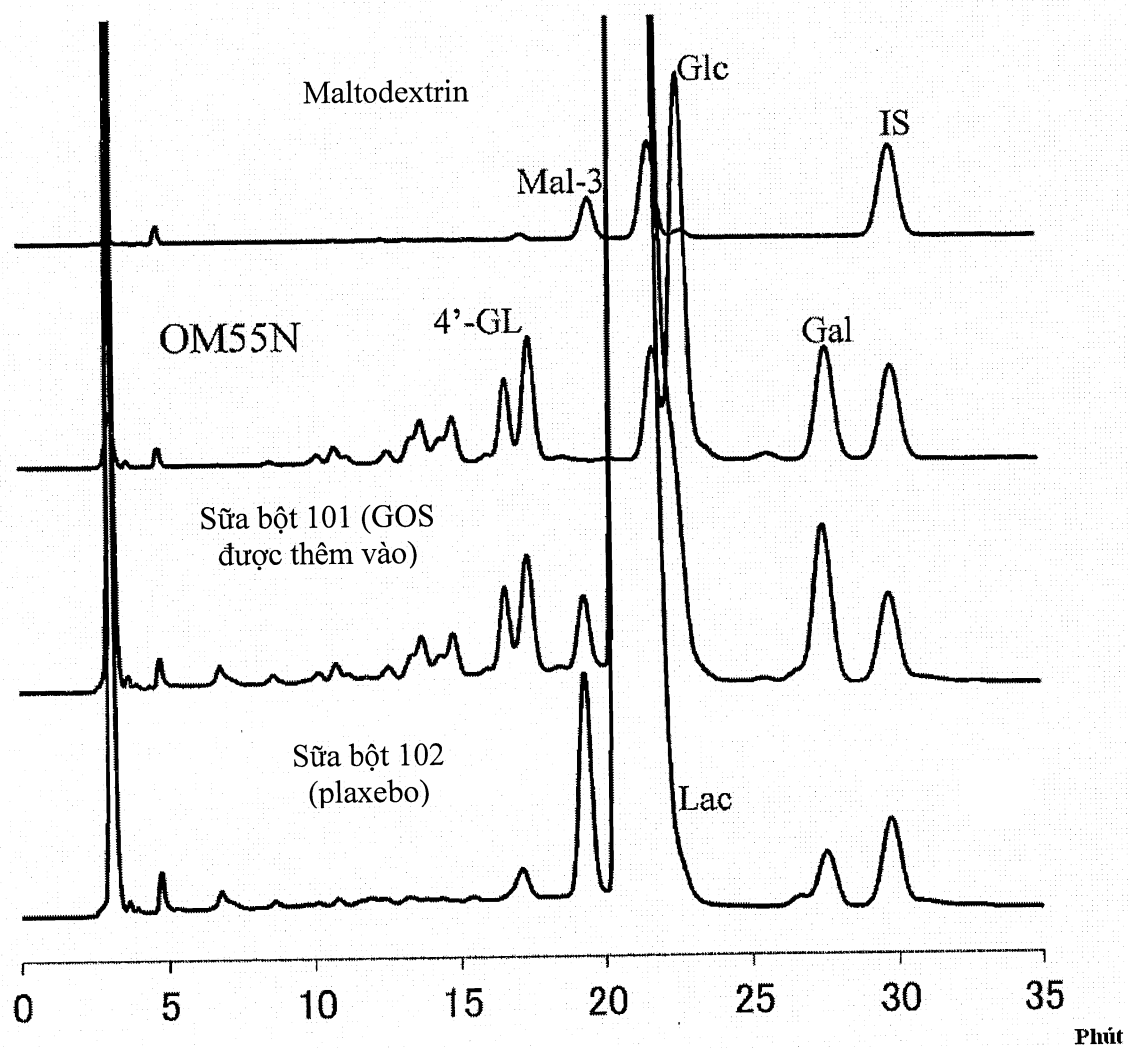


Fig.10

Phổ sắc ký HPLC đảo pha - dẫn xuất PMP (C30)

Dung dịch đệm kali phosphat (độ pH = 8)/CH₃CN (83/17)

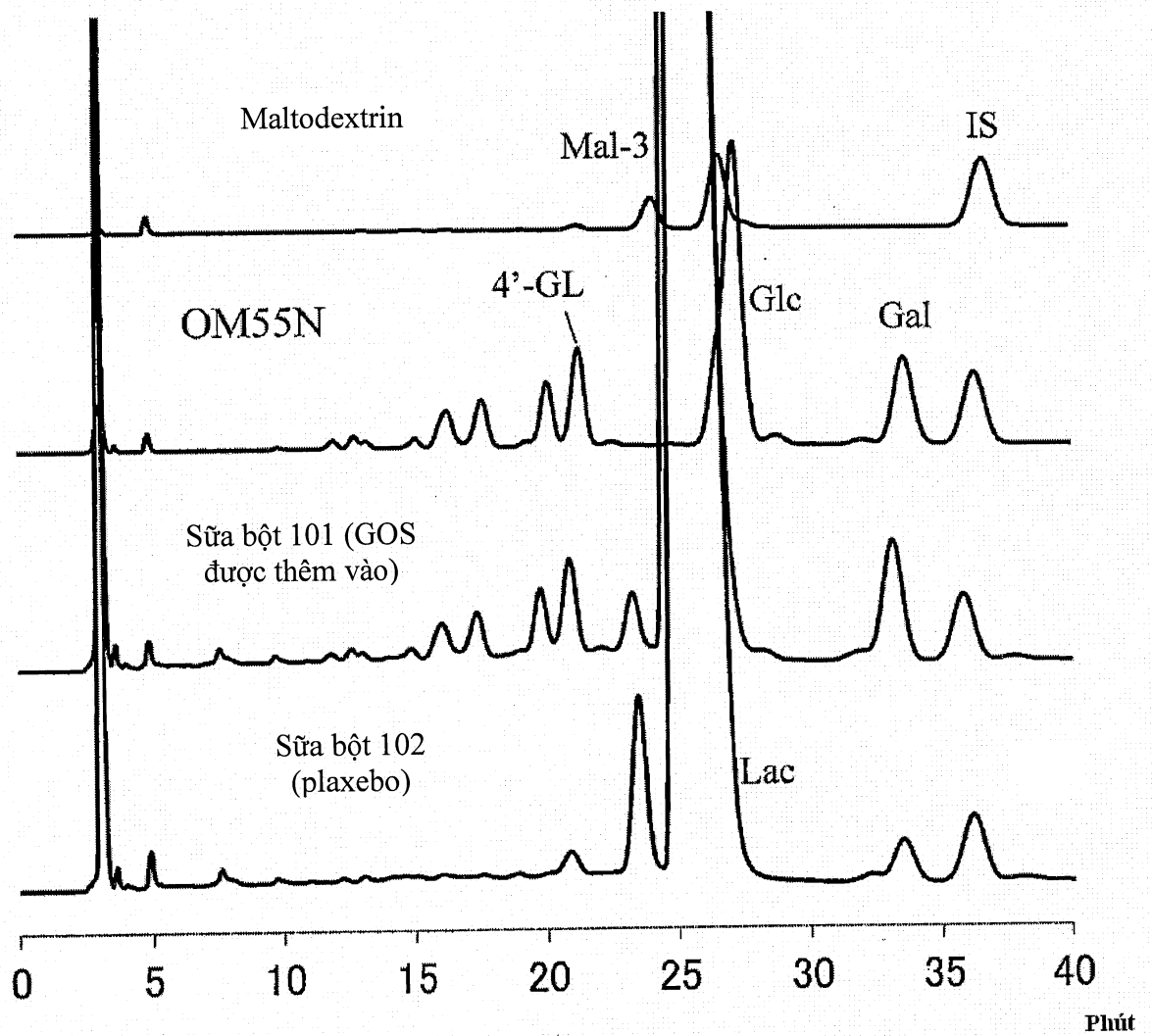


Fig.11

Phổ sắc ký HPLC đảo pha - dẫn xuất PMP (C30)

