



(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)



1-0051507

(51)^{2020.01} G01N 27/447; G01N 27/27

(13) B

(21) 1-2021-00522

(22) 20/06/2019

(86) PCT/JP2019/024482 20/06/2019

(87) WO 2020/004216 A 02/01/2020

(30) 2018-124971 29/06/2018 JP; 2018-203804 30/10/2018 JP

(45) 25/09/2025 450

(43) 26/04/2021 397A

(73) SUNTORY HOLDINGS LIMITED (JP)

1-40, Dojimahama 2-chome, Kita-ku, Osaka-shi, Osaka 5308203, Japan

(72) KASAJIMA, Naoki (JP); FUNAKI, Ayuta (JP).

(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH AXIT MUCOPOLYSACARIT HOẶC MUỐI CỦA NÓ CÓ TRONG MẪU THÍ NGHIỆM, PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH ĐỊNH LƯỢNG CHONDROITIN SULFAT HOẶC MUỐI CỦA NÓ VÀ PHƯƠNG PHÁP KIỂM TRA KIỂM SOÁT CHẤT LƯỢNG SẢN PHẨM

(21) 1-2021-00522

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp phân tích axit mucopolysacarit hoặc muối của nó có trong mẫu thí nghiệm, bao gồm thực hiện kiểm tra định tính và kiểm tra định lượng mẫu thí nghiệm chứa axit mucopolysacarit hoặc muối của nó, kiểm tra định tính bao gồm: bước điện di là bước đưa mẫu thí nghiệm đi điện di sử dụng màng; bước nhuộm là bước nhuộm màng sau khi điện di với xanh Alcian; và bước phát hiện là bước xác định loại axit mucopolysacarit hoặc muối của nó trong mẫu thí nghiệm từ mẫu vạch tạo thành từ bước nhuộm, kiểm tra định lượng bao gồm bước định lượng đo màu là bước phân tích định lượng axit mucopolysacarit hoặc muối của nó trong mẫu thí nghiệm bằng phương pháp đo màu sử dụng thuốc nhuộm có thể phát hiện axit mucopolysacarit hoặc muối của nó.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp phân tích axit mucopolysacarit hoặc muối của nó có trong mẫu thí nghiệm. Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp phân tích định lượng chondroitin sulfat hoặc muối của nó có trong mẫu thí nghiệm. Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp kiểm tra kiểm soát chất lượng cho sản phẩm chứa axit mucopolysacarit hoặc muối của nó.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Axit mucopolysacarit là mucopolysacarit có nhóm axit trong cấu trúc của chúng chẳng hạn như axit carboxylic. Axit mucopolysacarit được phân loại thành ví dụ như chondroitin sulfat, axit hyaluronic và dermatan sulfat, theo loại và sự kết hợp của axit uronic (hoặc galactosa) với đường amino cấu thành nên các đơn vị disacarit của nó. Nghiên cứu định tính và định lượng về axit mucopolysacarit, là chất có hoạt tính sinh học in vivo, rất hữu ích trong các trường hợp chẳng hạn như đánh giá hoặc xác định ảnh hưởng mong đợi của thực phẩm tự nhiên hoặc thuốc và kiểm soát chất lượng sản phẩm.

Chondroitin sulfat là axit mucopolysacarit chứa các đơn vị lặp lại disacarit của axit D-glucuronic và N-acetyl-D-galactosamin trong đó nhóm hydroxit bị sulfat hóa ở một số vị trí.

Phương pháp phân tích định lượng chondroitin sulfat đã biết là HPLC trong đó chondroitin sulfat bị thủy phân bởi chondroitinaza ABC và lượng disacarit không bão hòa tạo thành được xác định bằng HPLC. Phương pháp phân tích định lượng lượng chondroitin sulfat ngoài HPLC bao gồm phương pháp trọng lượng sử dụng bari sulfat

để phát hiện hợp chất chứa nhóm sulfat, phương pháp sử dụng carbazol-axit sulfuric để phát hiện axit glucuronic và hợp chất khử lưu huỳnh và phương pháp đo màu xanh Alcian để phát hiện axit mucopolysacarit.

Điện di màng đã được sử dụng làm phương pháp phân tách axit mucopolysacarit. Tài liệu phi sáng chế 1 báo cáo điện di mẫu chứa axit mucopolysacarit chẳng hạn như chondroitin sulfat trên màng nitroxenlulaza Immobilon (tên sản phẩm, Millipore) để phân tách và nhận diện axit mucopolysacarit bằng cách nhuộm xanh Alcian. Màng được sử dụng trong tài liệu phi sáng chế 1 là màng kết hợp của nitroxenluloza và xenluloza axetat.

Danh mục tài liệu trích dẫn

- Tài liệu phi sáng chế

Tài liệu phi sáng chế 1: Volpi N., Anal. Biochem., 240, 114-118 (1996)

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

- Vấn đề kỹ thuật

Trong trường hợp bổ sung axit mucopolysacarit vào thực phẩm tự nhiên hoặc thuốc làm thành phần hoạt tính, việc xác định loại và lượng của axit mucopolysacarit cần được bổ sung vào sản phẩm là rất quan trọng. Tuy nhiên, axit mucopolysacarit là một trong các thành phần khó phân tích bởi vì chúng có cấu trúc đơn vị cấu thành tương tự nhau và do đó có tính đặc hiệu tương tự nhau. Mặc dù HPLC được biết là phương pháp phân tích định lượng chondroitin sulfat như đã mô tả ở trên, việc phân tích sản phẩm hoặc chất tương tự bằng HPLC không may là nhạy với tá dược và các thành phần khác được bổ sung vào sản phẩm (ví dụ, polyphenol hoạt động như một chất ức chế enzyme). Ngoài ra, ví dụ là, HPLC yêu cầu thiết bị HPLC đắt và công kênh và hydrolaza được sử dụng để phân giải chondroitin sulfat và mẫu chuẩn tham chiếu được sử dụng để nhận biết chondroitin sulfat là đắt. Mẫu chuẩn tham chiếu thích hợp có thể không có bán trên thị trường mà phụ thuộc vào nguồn chondroitin sulfat. Do đó,

cần có phương pháp có thể phân tích axit mucopolysacarit hoặc muối của nó một cách đơn giản với giá thành thấp hơn mà không cần đến thiết bị công kênh như vậy. Trong các phương pháp phân tích định lượng ngoài HPLC được mô tả ở trên, phương pháp trọng lượng sử dụng bari sulfat gặp phải vấn đề về tính đặc hiệu do nó phân tích định lượng nhóm sulfat cũng có trong các hợp chất khác axit mucopolysacarit. Ngoài ra, phân tích định lượng bằng phương pháp sử dụng carbazol-axit sulfuric hoặc phương pháp đo màu xanh Alcian không thể xác định loại axit mucopolysacarit có trong mẫu. Tài liệu phi sáng chế 1 đề cập đến việc chạy điện di để phân tách một số loại axit mucopolysacarit và xác định mật độ vạch trên màng bằng tỷ trọng kế. Tuy nhiên, việc xác định mật độ vạch đường như không cho phép phân tích định lượng axit mucopolysacarit trong các sản phẩm chẳng hạn như thực phẩm tự nhiên với độ chính xác cao.

Mục đích của sáng chế này là đề xuất phương pháp phân tích cho phép xác định loại và phân tích định lượng axit mucopolysacarit hoặc muối của nó có trong mẫu thông qua các bước đơn giản.

- Giải pháp kỹ thuật

Thông qua các nghiên cứu chuyên sâu để giải quyết vấn đề này, các tác giả sáng chế tập trung vào phương pháp đo màu (phương pháp định lượng đo màu) bao gồm phương pháp đo màu xanh Alcian là một trong các phương pháp phân tích định lượng axit mucopolysacarit. Các tác giả sáng chế sau đó đã tiến đến sử dụng kết hợp giữa kiểm tra định tính bao gồm làm hiện mẫu kiểm tra chứa axit mucopolysacarit hoặc muối của nó trên màng điện di, nhuộm màng với xanh Alcian và xác định loại axit mucopolysacarit hoặc muối của nó trong mẫu từ mẫu vạch tạo thành và kiểm tra định lượng bao gồm phân tích một cách định tính axit mucopolysacarit hoặc muối của nó trong mẫu thí nghiệm bằng phương pháp đo màu. Việc sử dụng kết hợp được phát hiện là cho phép đánh giá tổng lượng và chất lượng (loại) axit mucopolysacarit hoặc

muối của nó trong mẫu thí nghiệm thông qua các bước đơn giản. Phương pháp phân tích này kết hợp kiểm tra định tính và kiểm tra định lượng có thể được sử dụng để phân tích định lượng axit mucopolysacarit hoặc muối của nó trong trường hợp một loại axit mucopolysacarit hoặc muối của nó có trong mẫu thí nghiệm. Chưa có báo cáo nào về phương pháp kết hợp kiểm tra định tính và kiểm tra định lượng bằng phương pháp định lượng đo màu để phân tích axit mucopolysacarit hoặc muối của nó trong mẫu thí nghiệm.

Nói cách khác, sáng chế đề xuất các phương pháp phân tích sau đây và các phương pháp tương tự.

(1) Phương pháp phân tích axit mucopolysacarit hoặc muối của nó có trong mẫu thí nghiệm bao gồm thực hiện kiểm tra định tính và kiểm tra định lượng mẫu thí nghiệm chứa axit mucopolysacarit hoặc muối của nó, kiểm tra định tính bao gồm: bước điện di là bước đưa mẫu thí nghiệm đi điện di sử dụng màng; bước nhuộm là bước nhuộm màng sau khi điện di với xanh Alcian; và bước phát hiện là bước xác định loại axit mucopolysacarit hoặc muối của nó trong mẫu thí nghiệm từ mẫu vạch tạo thành từ bước nhuộm, kiểm tra định lượng bao gồm bước định lượng đo màu là bước phân tích định lượng axit mucopolysacarit hoặc muối của nó trong mẫu thí nghiệm bằng phương pháp đo màu sử dụng thuốc nhuộm có thể phát hiện axit mucopolysacarit hoặc muối của nó.

(2) Phương pháp phân tích theo mục (1) nêu trên, trong đó axit mucopolysacarit là một hay nhiều chất được chọn từ nhóm bao gồm chondroitin sulfat, axit hyaluronic, dermatan sulfat, heparin và heparan sulfat.

(3) Phương pháp phân tích theo mục (1) hoặc (2) nêu trên, trong đó axit mucopolysacarit là chondroitin sulfat.

(4) Phương pháp phân tích theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (3) nêu trên, trong đó thuốc nhuộm có thể phát hiện axit mucopolysacarit hoặc muối của nó là

xanh Alcian hoặc carbazol.

(5) Phương pháp phân tích theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (4) nêu trên, trong đó thuốc nhuộm có thể phát hiện axit mucopolysacarit hoặc muối của nó là xanh Alcian.

(6) Phương pháp phân tích theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (5) nêu trên, trong đó khi một loại axit mucopolysacarit hoặc muối của nó được xác định là có trong mẫu thí nghiệm trong kiểm tra định tính, kết quả phân tích định lượng từ kiểm tra định lượng được coi là lượng axit mucopolysacarit hoặc muối của nó.

(7) Phương pháp phân tích theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (6) nêu trên, trong đó màng là màng nitroxenlulaza, màng xenluloza axetat, hoặc màng kết hợp của nitroxenluloza và xenluloza axetat.

(8) Phương pháp phân tích theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (7) nêu trên, trong đó màng là màng nitroxenlulaza hoặc màng xenluloza axetat.

(9) Phương pháp phân tích định lượng chondroitin sulfat hoặc muối của nó có trong mẫu thí nghiệm, bao gồm thực hiện kiểm tra định tính và kiểm tra định lượng mẫu thí nghiệm chứa chondroitin sulfat hoặc muối của nó, kiểm tra định tính bao gồm: bước điện di là bước đưa mẫu thí nghiệm đi điện di sử dụng màng; bước nhuộm là bước nhuộm màng sau khi điện di với xanh Alcian; và bước phát hiện là bước xác định loại axit mucopolysacarit hoặc muối của nó trong mẫu thí nghiệm từ mẫu vạch tạo thành từ bước nhuộm, kiểm tra định lượng bao gồm bước định lượng đo màu là bước phân tích định lượng axit mucopolysacarit hoặc muối của nó trong mẫu thí nghiệm bằng phương pháp đo màu sử dụng thuốc nhuộm có thể phát hiện axit mucopolysacarit hoặc muối của nó, trong đó khi axit mucopolysacarit hoặc muối của nó trong mẫu thí nghiệm được xác định chỉ là chondroitin sulfat hoặc muối của nó trong kiểm tra định lượng, kết quả phân tích định lượng từ kiểm tra định lượng được coi là lượng chondroitin sulfat hoặc muối của nó.

(10) Phương pháp kiểm tra kiểm soát chất lượng cho sản phẩm chứa axit mucopolysacarit hoặc muối của nó, bao gồm: bước phân tích mẫu thí nghiệm là bước phân tích sản phẩm là mẫu thí nghiệm bằng phương pháp phân tích theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (8) nêu trên; bước phân tích mẫu đối chứng là bước phân tích bằng phương pháp phân tích mẫu đối chứng chứa axit mucopolysacarit hoặc muối của nó trong đó đã biết nồng độ và loại; và bước đánh giá là bước đánh giá chất lượng sản phẩm bằng cách so sánh kết quả kiểm tra định tính và kết quả kiểm tra định lượng của mẫu thí nghiệm với kết quả kiểm tra định tính và kết quả kiểm tra định lượng của mẫu đối chứng từ các bước phân tích tương ứng.

- Hiệu quả có lợi của sáng chế

Sáng chế đề xuất phương pháp phân tích cho phép xác định loại và phân tích định lượng axit mucopolysacarit hoặc muối của nó có trong mẫu thông qua các bước đơn giản. Phương pháp phân tích theo sáng chế hữu ích trong, ví dụ, phân tích axit mucopolysacarit hoặc muối của nó có trong sản phẩm chẳng hạn như thực phẩm hoặc thuốc, và kiểm soát chất lượng sản phẩm chứa axit mucopolysacarit hoặc muối của nó.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 bao gồm các hình ảnh mẫu vạch của mẫu chuẩn tham chiếu chứa axit mucopolysacarit và nguyên liệu thô sụn cá mập (I) thu được bằng cách điện di sử dụng màng xenluloza axetat.

Fig.2 bao gồm các hình ảnh mẫu vạch của mẫu chuẩn tham chiếu chứa axit mucopolysacarit và nguyên liệu thô sụn cá mập (II) thu được bằng cách điện di sử dụng màng xenluloza axetat.

Fig.3 bao gồm các hình ảnh mẫu vạch của mẫu chuẩn tham chiếu chứa axit mucopolysacarit và nguyên liệu thô sụn cá mập (I) thu được bằng cách điện di sử dụng màng nitroxenlulaza.

Fig.4 bao gồm các hình ảnh mẫu vạch của mẫu chuẩn tham chiếu chứa axit

mucopolysacarit và nguyên liệu thô sụn cá mập (II) thu được bằng cách điện di sử dụng màng nitroxenlulaza.

Fig.5 bao gồm các hình ảnh mẫu vạch của nguyên liệu thô sụn cá mập được xử lý với enzym và mẫu chuẩn tham chiếu chứa axit mucopolysacarit được xử lý với enzym thu được bằng cách điện di sử dụng màng xenluloza axetat hoặc màng nitroxenlulaza ((a): màng xenluloza axetat, (b): màng nitroxenlulaza).

Fig.6 là hình ảnh mẫu vạch thu được bằng cách đưa mẫu không được xử lý với enzym, mẫu được xử lý với actinaza và mẫu được xử lý với actinaza E và chondroitinaza ABC của nguyên liệu thô sụn cá mập và muối natri chondroitin sulfat C vào điện di sử dụng màng xenluloza axetat.

Fig.7 bao gồm các hình ảnh giản lược của mẫu vạch trong các hình vẽ tương ứng của Fig.1 ((a): hình ảnh giản lược của Fig.1(a), (b): hình ảnh giản lược của Fig.1(b)).

Fig.8 bao gồm các hình ảnh giản lược của mẫu vạch trong các hình vẽ tương ứng của Fig.2 ((a): hình ảnh giản lược của Fig.2(a), (b): hình ảnh giản lược của Fig.2(b)).

Fig.9 bao gồm các hình ảnh giản lược của mẫu vạch trong các hình vẽ tương ứng của Fig.3 ((a): hình ảnh giản lược của Fig.3(a), (b): hình ảnh giản lược của Fig.3(b)).

Fig.10 bao gồm các hình ảnh giản lược của mẫu vạch trong các hình vẽ tương ứng của Fig.4 ((a): hình ảnh giản lược của Fig.4(a), (b): hình ảnh giản lược của Fig.4(b)).

Fig.11 bao gồm các hình ảnh giản lược của mẫu vạch trong các hình vẽ tương ứng của Fig.5 ((a): hình ảnh giản lược của Fig.5(a), (b): hình ảnh giản lược của Fig.5(b)).

Fig.12 là hình ảnh giản lược của mẫu vạch trong hình vẽ của Fig.6.

Mô tả chi tiết sáng chế

Phương pháp phân tích axit mucopolysacarit hoặc muối của nó

Phương pháp phân tích theo sáng chế là dùng cho axit mucopolysacarit hoặc muối của nó có trong mẫu thí nghiệm, bao gồm thực hiện kiểm tra định tính và kiểm tra định lượng mẫu thí nghiệm chứa axit mucopolysacarit hoặc muối của nó. Kiểm tra định tính theo sáng chế bao gồm bước điện di là bước đưa mẫu thí nghiệm đi điện di sử dụng màng; bước nhuộm là bước nhuộm màng sau khi điện di với xanh Alcian; và bước phát hiện là bước xác định loại axit mucopolysacarit hoặc muối của nó trong mẫu thí nghiệm từ mẫu vạch tạo thành từ bước nhuộm. Kiểm tra định lượng bao gồm bước định lượng đo màu là bước phân tích định lượng axit mucopolysacarit hoặc muối của nó trong mẫu thí nghiệm bằng phương pháp đo màu sử dụng thuốc nhuộm có thể phát hiện axit mucopolysacarit hoặc muối của nó.

“Thuốc nhuộm có thể phát hiện axit mucopolysacarit hoặc muối của nó” như được sử dụng trong bản mô tả này được gọi đơn giản là thuốc nhuộm.

Axit mucopolysacarit là axit polysacarit có các đơn vị lặp lại disacarit của axit uronic (axit diuronic hoặc axit glucuronic) hoặc galactosa cùng với đường amino và chứa nhóm axit (nhóm carboxyl, nhóm sulfat) trong cấu trúc của nó. Axit mucopolysacarit thường có khung mạch thẳng không phân nhánh. Ví dụ về axit mucopolysacarit bao gồm chondroitin sulfat, axit hyaluronic, dermatan sulfat, heparin, heparan sulfat và keratan sulfat. Mẫu thí nghiệm được sử dụng trong phương pháp phân tích theo sáng chế có chứa một hoặc nhiều hơn một loại axit mucopolysacarit hoặc muối của nó. Ví dụ không giới hạn về muối bao gồm muối của kim loại kiềm chẳng hạn như natri và kali; và muối của kim loại kiềm thổ chẳng hạn như canxi và magie. Muối tốt hơn là muối kim loại kiềm, tốt hơn nữa là muối natri.

Axit mucopolysacarit theo sáng chế tốt hơn là một hoặc nhiều chất bao gồm: chondroitin sulfat, axit hyaluronic, dermatan sulfat, heparin và heparan sulfat. Phương

pháp phân tích theo sáng chế thích hợp để phân tích mẫu thí nghiệm chứa một hoặc hai hoặc nhiều axit mucopolysacarit hoặc muối của nó. Axit mucopolysacarit tốt hơn nữa là chondroitin sulfat hoặc axit hyaluronic, vẫn tốt hơn nữa là chondroitin sulfat. Phương pháp phân tích theo sáng chế thích hợp hơn để phân tích mẫu thí nghiệm chứa chondroitin sulfat hoặc muối của nó. Chondroitin sulfat theo sáng chế chỉ một trong số chondroitin sulfat A, chondroitin sulfat C, chondroitin sulfat D và chondroitin sulfat E, hoặc hai hoặc nhiều loại này. Dermatan sulfat (chondroitin sulfat B) không được xem là loại chondroitin sulfat theo sáng chế. Chondroitin sulfat tốt hơn là chondroitin sulfat C. Theo sáng chế, chondroitin sulfat C có thể chứa chondroitin sulfat C là thành phần chính và một hoặc nhiều loại chondroitin sulfat khác.

Ví dụ về mẫu thí nghiệm chứa axit mucopolysacarit hoặc muối của nó bao gồm thực phẩm (bao gồm thực phẩm tự nhiên), thuốc, mỹ phẩm và nguyên liệu thô được sử dụng cho chúng (ví dụ, chiết sụn cá mập, chiết sụn lợn, chiết sụn mực, chiết sụn cá hồi).

Liên quan đến việc kết hợp kiểm tra định tính và kiểm tra định lượng, phương pháp phân tích theo sáng chế cho phép xác định loại và phân tích định lượng axit mucopolysacarit hoặc muối của nó có trong mẫu thí nghiệm thông qua các bước đơn giản. “Loại axit mucopolysacarit hoặc muối của nó” như được sử dụng trong bản mô tả này chỉ (các) loại axit mucopolysacarit có trong axit mucopolysacarit hoặc muối của nó.

Phương pháp phân tích theo sáng chế cho phép, ví dụ, xác định một loại hoặc hai hoặc nhiều loại axit mucopolysacarit hoặc muối của nó có trong mẫu thí nghiệm và phân tích định lượng (các) axit mucopolysacarit hoặc (các) muối của chúng trong mẫu thí nghiệm. Cách biểu diễn “một loại (hoặc hai hoặc nhiều loại) axit mucopolysacarit hoặc (các) muối của chúng có trong” có nghĩa là loại axit mucopolysacarit có trong axit mucopolysacarit hoặc muối của nó là một (hoặc hai hoặc nhiều) loại. Ví dụ, khi

một loại axit mucopolysacarit hoặc muối của nó có trong mẫu thí nghiệm, phương pháp phân tích cho phép xác định (nhận diện) axit mucopolysacarit hoặc muối của nó và phân tích định lượng axit mucopolysacarit hoặc muối của nó trong mẫu thí nghiệm. Khi hai hoặc nhiều loại axit mucopolysacarit hoặc muối của nó có trong mẫu thí nghiệm, phương pháp phân tích theo sáng chế cho phép xác định loại axit mucopolysacarit hoặc muối của nó có trong mẫu thí nghiệm và phân tích định lượng tổng lượng của chúng.

Thứ tự chạy kiểm tra định tính và kiểm tra định lượng theo sáng chế không bị giới hạn. Xác định loại axit mucopolysacarit hoặc muối của nó bằng kiểm tra định tính có thể được theo sau là kiểm tra định lượng. Phân tích định lượng axit mucopolysacarit hoặc muối của nó trong mẫu thí nghiệm bằng kiểm tra định lượng có thể được theo sau là kiểm tra định tính. Tương tự, kiểm tra định tính và kiểm tra định lượng có thể chạy đồng thời. Theo một phương án, kiểm tra định tính tốt hơn là được theo sau là kiểm tra định lượng.

Kiểm tra định tính cho phép xác định loại axit mucopolysacarit hoặc muối của nó có trong mẫu thí nghiệm, các bước bao gồm theo thứ tự: bước điện di, bước nhuộm và bước phát hiện.

Trong bước điện di, mẫu thí nghiệm được thực hiện điện di sử dụng màng (điện di màng). Màng có thể là màng xốp có thể sử dụng cho điện di. Màng này có thể là màng nitroxenlulaza, màng xenluloza axetat, hoặc màng kết hợp của nitroxenluloza và xenluloza axetat. Theo một phương án, màng tốt hơn là màng nitroxenlulaza hoặc màng kết hợp của nitroxenluloza và xenluloza axetat. Các màng này làm cho hình dạng vạch axit mucopolysacarit hoặc muối của nó sắc nét trong mẫu vạch có thể thu được từ điện di và phân tách rõ ràng axit mucopolysacarit hoặc muối của nó. Cụ thể, màng nitroxenlulaza hoặc màng kết hợp của nitroxenluloza và xenluloza axetat phân tách rõ ràng chondroitin sulfat hoặc muối của nó từ (các) axit mucopolysacarit khác

hoặc (các) muối khác của chúng. Do đó, điện di sử dụng màng nitroxenlulaza hoặc màng kết hợp của nitroxenluloza và xenluloza axetat là có lợi trong việc phát hiện chondroitin sulfat hoặc muối của nó. Khi chondroitin sulfat hoặc muối của nó có trong mẫu thí nghiệm hoặc khi sự có mặt của chondroitin sulfat hoặc muối của nó trong mẫu thí nghiệm cần được xác định, màng nitroxenlulaza hoặc màng kết hợp của nitroxenluloza và xenluloza axetat được ưu tiên.

Theo một phương án khác, màng xenluloza axetat được ưu tiên. Màng xenluloza axetat phân tách rõ ràng axit hyaluronic hoặc muối của chúng từ (các) axit mucopolysacarit khác hoặc (các) muối khác của chúng. Ví dụ, khi axit hyaluronic hoặc muối của chúng có trong mẫu thí nghiệm hoặc khi sự có mặt của axit hyaluronic hoặc muối của chúng trong mẫu thí nghiệm cần được xác định, màng xenluloza axetat được ưu tiên. Màng xenluloza axetat cũng phân tách rõ ràng chondroitin sulfat hoặc muối của nó từ (các) axit mucopolysacarit khác hoặc (các) muối khác của chúng. Khi màng xenluloza axetat được sử dụng để phát hiện chondroitin sulfat hoặc muối của nó, ví dụ, tốt hơn là, mẫu thí nghiệm được xử lý với chondroitinaza ABC như được mô tả dưới đây và mẫu vạch của sản phẩm được xử lý với enzym tạo thành được so sánh với mẫu vạch của mẫu thí nghiệm không được xử lý với chondroitinaza ABC.

Màng có thể có kích thước lỗ bất kỳ. Ví dụ, màng có kích thước lỗ nằm trong khoảng từ 0,1 đến 0,6 μm có thể được sử dụng. Màng có lớp phủ kỵ nước tốt hơn là được rửa với dung môi ưa nước trước khi sử dụng.

Mẫu thí nghiệm có thể được thực hiện điện di màng ở dạng dung dịch mẫu thí nghiệm bằng cách hòa tan hoặc tạo huyền phù trong dung môi nếu muốn. Dung môi được sử dụng để chuẩn bị dung dịch mẫu thí nghiệm không giới hạn, và ví dụ, có thể là nước hoặc đệm. Điều kiện điện di của bước điện di là không giới hạn và phương pháp thông thường có thể được sử dụng. Đệm và điều kiện tạo năng lượng cho điện di tốt hơn là được thiết đặt thích hợp căn cứ vào độ phân giải hoặc căn cứ tương tự cho

mẫu vạch tạo thành. Điện di có thể được chạy bằng phương pháp dòng điện không đổi hoặc phương pháp điện thế không đổi, tốt hơn là bằng phương pháp điện thế không đổi. Dòng điện khi điện di có thể là, ví dụ, nằm trong khoảng từ 5 đến 100 mA. Thời gian dịch chuyển có thể được thiết đặt thích hợp theo cường độ dòng điện hoặc tương tự.

Xét đến sự phân tách axit mucopolysacarit hoặc muối của nó, đệm tốt hơn là dung dịch đệm có độ pH nằm trong khoảng từ 3 đến 7. Ví dụ về dung dịch đệm có thể sử dụng làm đệm bao gồm dung dịch đệm bari axetat và dung dịch đệm axit axetic-pyridin. Để phân tách rõ ràng axit mucopolysacarit hoặc muối của nó, dung dịch đệm bari axetat được ưu tiên khi màng nitroxenluloza hoặc màng kết hợp của nitroxenluloza và xenluloza axetat được sử dụng, và dung dịch đệm axit axetic-pyridin được ưu tiên khi màng xenluloza axetat được sử dụng. Độ pH có thể được đo bằng pH kế có bán trên thị trường.

Để làm ổn định thêm mẫu dịch chuyển, điện di theo một phương án tốt hơn là được chạy ở nhiệt độ thấp hơn 10°C, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 0°C đến 7°C, vẫn tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 0°C đến 5°C. Điện di tốt hơn là được chạy bằng buồng dịch chuyển được thiết đặt đến nhiệt độ nằm trong khoảng nêu trên.

Màng sau khi điện di được nhuộm với xanh Alcian (bước nhuộm). Xanh Alcian liên kết với axit mucopolysacarit hoặc muối của nó, và do đó có thể phát hiện axit mucopolysacarit hoặc muối của nó có trong mẫu thí nghiệm với độ nhạy cao. Bước nhuộm với xanh Alcian cũng có ưu điểm khi xét đến thao tác dễ dàng. Khi xanh Alcian được sử dụng để phát hiện axit mucopolysacarit hoặc muối của nó trong kiểm tra định tính và sau đó kiểm tra định lượng được mô tả sau đây được chạy bằng phương pháp đo màu sử dụng xanh Alcian (phương pháp đo màu xanh Alcian), kết quả phân tích định lượng phản ánh lượng axit mucopolysacarit hoặc muối của nó được xác định trong kiểm tra định tính.

Màng có thể được nhuộm bằng cách ngâm màng trong dung dịch xanh Alcian trong thời gian nhất định, ví dụ, trong khoảng từ 5 đến 60 phút.

Màng đã nhuộm được làm mất màu bằng dung dịch làm mất màu. Dung dịch làm mất màu có thể là dung dịch làm mất màu thông thường và tốt hơn là dung dịch axit có nước. Ví dụ về dung dịch axit có nước bao gồm dung dịch axit axetic có nước và dung dịch axit formic có nước. Màng đã làm mất màu thể hiện mẫu vạch (cũng được gọi là mẫu điện di) cấu thành từ một hoặc hai hoặc nhiều vạch mà có độ di động (cũng được gọi là khoảng cách dịch chuyển) khác nhau phụ thuộc vào axit mucopolysacarit hoặc muối của nó. Khi không có axit mucopolysacarit hoặc muối của nó trong mẫu thí nghiệm, thông thường, không có vạch nào được phát hiện.

Trong bước phát hiện, loại axit mucopolysacarit hoặc muối của nó trong mẫu thí nghiệm được xác định từ mẫu vạch thu được từ bước nhuộm. Mẫu vạch có thể được nhận ra bằng mắt thường. Bước xác định loại axit mucopolysacarit hoặc muối của nó bao gồm bước xác định (nhận diện) loại axit mucopolysacarit hoặc muối của nó trong mẫu thí nghiệm và xác định liệu có một loại hoặc hai hoặc nhiều loại axit mucopolysacarit hoặc muối của nó có trong mẫu thí nghiệm. Theo một phương án, một loại hoặc hai hoặc nhiều loại axit mucopolysacarit hoặc muối của nó có trong mẫu thí nghiệm có thể được xác định dựa trên số lượng vạch.

Trong kiểm tra định tính, mẫu vạch tốt hơn là được thu được bằng cách sử dụng mẫu chuẩn tham chiếu (chất chuẩn tham chiếu) chứa axit mucopolysacarit hoặc muối của nó hoặc mẫu đối chứng chứa loại axit mucopolysacarit hoặc muối của nó đã biết, cũng như là mẫu thí nghiệm. Loại axit mucopolysacarit hoặc muối của nó có thể được xác định bằng cách, ví dụ, so sánh khoảng cách dịch chuyển của vạch tương ứng của chúng với khoảng cách dịch chuyển của vạch của mẫu chuẩn tham chiếu chứa axit mucopolysacarit hoặc muối của nó. Theo một phương án khác, loại axit mucopolysacarit hoặc muối của nó trong mẫu thí nghiệm có thể được xác định bằng

cách đưa mẫu đối chứng chứa loại axit mucopolysacarit hoặc muối của nó đã biết đi kiểm tra định tính bằng cùng phương pháp và so sánh mẫu vạch của mẫu đối chứng và mẫu vạch của mẫu thí nghiệm. Theo một phương án, khi nguồn axit mucopolysacarit hoặc muối của nó trong mẫu thí nghiệm là có thể đoán được, tốt hơn là, mẫu chuẩn tham chiếu chứa axit mucopolysacarit hoặc muối của nó có cùng nguồn gốc được sử dụng hoặc mẫu đối chứng chứa axit mucopolysacarit hoặc muối của nó có cùng nguồn gốc được sử dụng. Ví dụ, khi axit mucopolysacarit hoặc muối của nó trong mẫu thí nghiệm có thể đoán được có nguồn gốc từ sụn cá mập, tốt hơn là, mẫu chuẩn tham chiếu chứa axit mucopolysacarit hoặc muối của nó có nguồn gốc từ sụn cá mập được sử dụng hoặc mẫu đối chứng chứa axit mucopolysacarit hoặc muối của nó có nguồn gốc từ sụn cá mập được sử dụng.

Tương tự, loại axit mucopolysacarit hoặc muối của nó trong mẫu thí nghiệm có thể được xác định bằng cách chuẩn bị mẫu thí nghiệm và sản phẩm được xử lý với enzym của mẫu thí nghiệm như mô tả sau đây và so sánh mẫu vạch của mẫu thí nghiệm và sản phẩm được xử lý với enzym.

Phương pháp phân tích theo sáng chế theo một phương án thích hợp để phân tích chondroitin sulfat hoặc muối của nó có nguồn gốc từ sụn cá mập. Phương pháp điện di màng đã mô tả ở trên có thể phân tách rõ ràng chondroitin sulfat hoặc muối của nó có nguồn gốc từ sụn cá mập từ (các) axit mucopolysacarit hoặc (các) muối của chúng ngoài chondroitin sulfat. Do đó, kiểm tra định tính có ưu điểm trong việc phát hiện chondroitin sulfat hoặc muối của nó có nguồn gốc từ sụn cá mập. Phương pháp phân tích theo sáng chế đặc biệt thích hợp để phân tích chondroitin sulfat hoặc muối của nó có nguồn gốc từ sụn cá mập trong mẫu thí nghiệm. Cụ thể là, màng nitroxenlulaza hoặc màng kết hợp của nitroxenluloza và xenluloza axetat trong điện di phân tách rõ ràng chondroitin sulfat hoặc muối của nó có nguồn gốc từ sụn cá mập từ (các) axit mucopolysacarit hoặc (các) muối của chúng ngoài chondroitin sulfat.

Kiểm tra định tính có thể bao gồm (các) bước ngoài bước điện di, bước nhuộm và bước phát hiện nêu trên. Theo một phương án, kiểm tra định tính có thể bao gồm bước chuẩn bị sản phẩm được xử lý với enzym (cũng được gọi là mẫu xử lý với enzym) bằng cách xử lý mẫu thí nghiệm với enzym phân giải axit mucopolysacarit hoặc muối của nó trong mẫu thí nghiệm (sau đây, enzym này cũng được gọi đơn giản là enzym phân giải axit mucopolysacarit). Trong trường hợp này, tốt hơn là, mẫu được xử lý với enzym thu được bằng cách xử lý mẫu thí nghiệm với enzym phân giải axit mucopolysacarit cũng được đưa vào bước điện di và bước nhuộm để thu mẫu vạch, sao cho mẫu vạch của mẫu thí nghiệm (mẫu thí nghiệm không được xử lý với enzym) và mẫu vạch của sản phẩm được xử lý với enzym được so sánh với nhau. Sáng chế cho phép xác định loại axit mucopolysacarit hoặc muối của nó trong mẫu thí nghiệm bằng cách, như đã mô tả ở trên, so sánh khoảng cách dịch chuyển của vạch của mẫu thí nghiệm (không được xử lý với enzym) hoặc mẫu vạch của chúng thu được từ điện di với khoảng cách dịch chuyển của vạch của mẫu chuẩn tham chiếu hoặc mẫu đối chứng. Ở đây, loại axit mucopolysacarit hoặc muối của nó trong mẫu thí nghiệm có thể được xác định với độ chính xác cao hơn bằng cách so sánh thêm mẫu vạch của mẫu thí nghiệm (không được xử lý với enzym) và sản phẩm được xử lý với enzym phân giải axit mucopolysacarit trong bước điện di. Enzym phân giải axit mucopolysacarit có thể được lựa chọn theo loại axit mucopolysacarit hoặc muối của nó có trong mẫu thí nghiệm. Ví dụ, đối với chondroitin sulfat hoặc muối của nó, chondroitinaza ABC có thể được sử dụng. Khi vạch của axit mucopolysacarit cụ thể hoặc muối của nó đã được phát hiện trong mẫu thí nghiệm biến mất (không được phát hiện) khi kiểm tra sản phẩm của nó được xử lý với enzym phân giải axit mucopolysacarit hoặc muối của nó, axit mucopolysacarit hoặc muối của nó được xác định là có trong mẫu thí nghiệm.

Theo một phương án, khi chondroitin sulfat hoặc muối của nó có trong mẫu thí nghiệm hoặc khi sự có mặt của chondroitin sulfat hoặc muối của nó trong mẫu thí

nghiệm cần được xác định, kiểm tra định tính có thể bao gồm bước xử lý (phân giải) mẫu thí nghiệm với chondroitinaza ABC để chuẩn bị sản phẩm được xử lý với enzym. Chondroitin sulfat hoặc muối của nó có hoặc không có trong mẫu thí nghiệm có thể được xác định với độ chính xác cao hơn bằng cách thu mẫu vạch của mẫu thí nghiệm và sản phẩm được xử lý với enzym thông qua bước điện di và bước nhuộm, và so sánh mẫu vạch của mẫu thí nghiệm (mẫu thí nghiệm không được xử lý với enzym) và mẫu vạch của sản phẩm được xử lý với enzym. Ở đây, sản phẩm được xử lý với enzym thu được bằng cách xử lý mẫu thí nghiệm chứa axit mucopolysacarit hoặc muối của nó với chondroitinaza ABC. Ví dụ, khi vạch axit mucopolysacarit hoặc muối của nó đã được phát hiện trong mẫu thí nghiệm biến mất khi kiểm tra sản phẩm của nó được xử lý với enzym chondroitinaza ABC, chondroitin sulfat hoặc muối của nó được xác định là có trong mẫu thí nghiệm. Bước so sánh mẫu vạch giữa mẫu thí nghiệm và sản phẩm được xử lý với enzym có thể được kết hợp với bước so sánh khoảng cách dịch chuyển của vạch của mẫu chuẩn tham chiếu hoặc so sánh với mẫu vạch của mẫu đối chứng. Theo một phương án, khi mẫu thí nghiệm chứa chondroitin sulfat hoặc muối của nó được phân tích hoặc sự có mặt của chondroitin sulfat hoặc muối của nó cần được xác định, tốt hơn là, mẫu thí nghiệm được xử lý với chondroitinaza ABC để chuẩn bị mẫu được xử lý với enzym và sau đó mẫu vạch của mẫu thí nghiệm với sản phẩm được xử lý với enzym được so sánh với nhau.

Tốt hơn là, phương pháp phân tích theo sáng chế theo một phương án xác định loại axit mucopolysacarit hoặc muối của nó trong mẫu thí nghiệm bằng cách thu mẫu vạch của mẫu thí nghiệm (mẫu thí nghiệm không được xử lý với enzym phân giải axit mucopolysacarit), sản phẩm được xử lý với enzym của mẫu thí nghiệm và mẫu chuẩn tham chiếu (hoặc mẫu đối chứng) thông qua bước điện di và bước nhuộm, và tiến hành so sánh mẫu vạch của mẫu thí nghiệm với mẫu chuẩn tham chiếu (hoặc mẫu đối chứng) và so sánh mẫu vạch của mẫu thí nghiệm với sản phẩm được xử lý với enzym.

Trong trường hợp này, tốt hơn là, ví dụ, loại axit mucopolysacarit hoặc muối của nó trong mẫu thí nghiệm được xác định bằng cách so sánh mẫu vạch của mẫu thí nghiệm với mẫu chuẩn tham chiếu. Mẫu thí nghiệm sau đó được xử lý với enzym phân giải axit mucopolysacarit để chuẩn bị sản phẩm được xử lý với enzym và mẫu vạch của sản phẩm được xử lý với enzym được thu, được so sánh với mẫu vạch của mẫu thí nghiệm. Enzym phân giải axit mucopolysacarit có thể là enzym cho phép phân giải axit mucopolysacarit hoặc muối của nó được xác định bằng cách so sánh với mẫu chuẩn tham chiếu. Khi vạch axit mucopolysacarit hoặc muối của nó đã được phát hiện trong mẫu thí nghiệm mà không được phát hiện khi kiểm tra sản phẩm được xử lý với enzym, loại axit mucopolysacarit hoặc muối của nó được xác định bằng cách so sánh với mẫu chuẩn tham chiếu.

Phương pháp phân tích theo sáng chế có thể bao gồm bước xử lý bằng cách khử protein. Ví dụ, khi mẫu thí nghiệm được xử lý với enzym phân giải axit mucopolysacarit, mẫu thí nghiệm có thể được đưa đi xử lý bằng cách khử protein trước khi xử lý với enzym phân giải axit mucopolysacarit. Bước xử lý bằng cách khử protein cho phép enzym phân giải axit mucopolysacarit phân giải axit mucopolysacarit hoặc muối của nó suôn sẻ hơn. Bước xử lý bằng cách khử protein không bị giới hạn miễn là nó không làm giảm hiệu quả của sáng chế. Ví dụ của chúng bao gồm xử lý mẫu thí nghiệm với proteaza; làm thay đổi độ pH của mẫu thí nghiệm (ví dụ, làm cho độ pH cao hơn hoặc bằng 12); và bổ sung dung môi hữu cơ để loại bỏ protein ở dạng phân kết tủa. Cụ thể là, xử lý với proteaza tốt hơn là được cân nhắc do thao tác đơn giản và bước xử lý enzym đơn giản sử dụng chondroitinaza ABC hoặc enzym tương tự sau đó. Proteaza có thể là enzym không phân giải bất cứ axit mucopolysacarit hoặc muối của nó và tốt hơn là actinaza E.

Đối với bước xử lý chondroitinaza ABC, tốt hơn là, mẫu thí nghiệm được xử lý với actinaza E trước khi xử lý với chondroitinaza ABC. Đó là bởi vì xử lý mẫu thí

thí nghiệm với chondroitinaza ABC sau khi phân giải protein trong mẫu thí nghiệm với actinaza E cho phép enzym phân giải chondroitin sulfat hoặc muối của nó suôn sẻ hơn.

Bước xử lý với enzym chẳng hạn như enzym phân giải axit mucopolysacarit, bao gồm chondroitinaza ABC và actinaza E có thể được thực hiện bằng phương pháp thông thường được lựa chọn tùy theo loại enzym. Ví dụ, độ pH và nhiệt độ đối với bước xử lý với enzym chẳng hạn như actinaza E hoặc chondroitinaza ABC tốt hơn là lần lượt nằm trong khoảng từ 7 đến 9 và nằm trong khoảng từ 25°C đến 50°C. Thời gian xử lý với actinaza E, ví dụ, có thể nằm trong khoảng từ 10 đến 24 giờ. Thời gian xử lý với chondroitinaza ABC có thể, ví dụ, nằm trong khoảng từ 0,5 đến 2 giờ. Khi mẫu được xử lý với enzym, enzym có thể được bất hoạt nếu cần và sau đó được loại bỏ khỏi mẫu bằng phương pháp đã biết chẳng hạn như ly tâm trước khi mẫu được thực hiện điện di màng.

Kiểm tra định lượng bao gồm bước định lượng đo màu là bước phân tích định lượng axit mucopolysacarit hoặc muối của nó trong mẫu thí nghiệm bằng phương pháp đo màu sử dụng thuốc nhuộm có thể phát hiện axit mucopolysacarit hoặc muối của nó.

Phương pháp đo màu sử dụng thuốc nhuộm bao gồm các bước, ví dụ, bổ sung thuốc nhuộm vào mẫu thí nghiệm và đo độ hấp thụ của dung dịch chẳng hạn như dung dịch phản ứng có màu của mẫu thí nghiệm sử dụng quang phổ kế, nhờ đó tính toán lượng axit mucopolysacarit hoặc muối của nó từ đường chuẩn được tạo ra bằng cách sử dụng mẫu chuẩn tham chiếu. Trong phân tích định lượng bằng phương pháp đo màu, lượng axit mucopolysacarit hoặc muối của nó trong mẫu thí nghiệm thường được xác định là lượng dựa theo axit mucopolysacarit hoặc muối của nó được sử dụng làm mẫu chuẩn tham chiếu. Lượng axit mucopolysacarit hoặc muối của nó thu được theo cách đó có thể được sử dụng là kết quả phân tích định lượng từ kiểm tra định lượng. Mẫu chuẩn tham chiếu có thể được lựa chọn phụ thuộc vào axit mucopolysacarit hoặc muối của nó.

Thuốc nhuộm được sử dụng trong kiểm tra định lượng có thể là thuốc nhuộm (chất phản ứng) hữu ích trong bước phát hiện axit mucopolysacarit hoặc muối của nó. Thuốc nhuộm có khả năng liên kết với axit mucopolysacarit hoặc muối của nó được ưu tiên. Thuốc nhuộm có khả năng phát hiện tùy ý mà liên kết với axit mucopolysacarit hoặc muối của nó được ưu tiên hơn nữa. Xét về độ chính xác và các chỉ số tương tự trong phân tích, thuốc nhuộm tốt hơn là xanh Alcian hoặc carbazol, tốt hơn nữa là xanh Alcian.

Khi thuốc nhuộm là xanh Alcian, axit mucopolysacarit hoặc muối của nó được phân tích định lượng bằng phương pháp đo màu xanh Alcian. Phương pháp đo màu xanh Alcian có thể được thực hiện theo quy trình thông thường. Khi dung dịch xanh Alcian được bổ sung vào mẫu thí nghiệm trong phương pháp đo màu xanh Alcian, xanh Alcian và axit mucopolysacarit hoặc muối của nó tạo thành phức, phức sau đó sẽ kết tủa. Phần kết tủa này được hòa tan lại trong dung dịch kiềm và độ hấp thụ của dung dịch tạo thành được đo bằng quang phổ kế. Bước sóng của phép đo tốt hơn là nằm trong khoảng từ 570 đến 660 nm, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 590 đến 640 nm. Độ hấp thụ được sử dụng để tính toán lượng axit mucopolysacarit hoặc muối của nó dựa trên đường chuẩn được tạo ra trước bằng cách sử dụng mẫu chuẩn tham chiếu. Khi xanh Alcian được sử dụng, axit mucopolysacarit hoặc muối của nó trong mẫu thí nghiệm có thể được phân tích định lượng bằng, ví dụ, phương pháp được mô tả trong các ví dụ. Phương pháp đo màu xanh Alcian có lợi làm phương pháp phân tích định lượng axit mucopolysacarit do thao tác đơn giản và độ lặp lại cao.

Khi thuốc nhuộm là carbazol, axit mucopolysacarit hoặc muối của nó có thể được phân tích định lượng bằng phương pháp carbazol-axit sulfuric. Phương pháp sử dụng carbazol-axit sulfuric có thể được thực hiện theo quy trình thông thường. Việc bổ sung dung dịch carbazol và axit sulfuric đặc vào mẫu thí nghiệm làm hiện màu đỏ-tím nếu mẫu thí nghiệm chứa axit uronic. Độ hấp thụ của dung dịch phản ứng có màu

được đo bằng quang phổ kế và lượng axit uronic được tính toán từ đường chuẩn được tạo ra bằng cách sử dụng mẫu chuẩn tham chiếu, vì vậy lượng chondroitin sulfat hoặc muối của nó được xác định. Bước sóng của phép đo tốt hơn là nằm trong khoảng từ 500 đến 600 nm, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 520 đến 550 nm. Trong kiểm tra định lượng, mẫu thí nghiệm có thể được xử lý với proteaza hoặc enzym tương tự nếu cần. Proteaza có thể là enzym mà không phân giải axit mucopolysacarit bất kỳ hoặc muối của chúng và tốt hơn là actinaza E được mô tả trên đây.

Thuốc nhuộm được sử dụng trong kiểm tra định lượng theo sáng chế tốt hơn nữa là xanh Alcian. Việc sử dụng xanh Alcian trong kiểm tra định tính và kiểm tra định lượng có ưu điểm ở chỗ sản phẩm hoặc chất tương tự chứa thành phần khác axit mucopolysacarit hoặc muối của nó (sau đây, thành phần này cũng được gọi là thành phần khác) được phân tích với độ chính xác cao hơn. Việc sử dụng xanh Alcian cũng được ưu tiên do thao tác đơn giản hơn trong kiểm tra định lượng. Khi xanh Alcian được sử dụng trong kiểm tra định tính và kiểm tra định lượng, chỉ có axit mucopolysacarit hoặc muối của nó được phát hiện hoặc phân tích định lượng trong các phép kiểm tra này. Nói cách khác, kết quả phân tích định lượng từ kiểm tra định lượng phản ánh lượng axit mucopolysacarit hoặc muối của nó được xác định trong kiểm tra định tính. Ví dụ, khi kiểm tra định tính thể hiện rằng có một loại axit mucopolysacarit hoặc muối của nó có trong mẫu thí nghiệm, kết quả phân tích định lượng từ kiểm tra định lượng sử dụng mẫu thí nghiệm có thể được coi là lượng axit mucopolysacarit hoặc muối của nó có trong mẫu thí nghiệm. Do đó, việc sử dụng cùng thuốc nhuộm (xanh Alcian) để phát hiện axit mucopolysacarit hoặc muối của nó trong kiểm tra định tính và kiểm tra định lượng kết hợp cho phép xác định loại và phân tích định lượng axit mucopolysacarit hoặc muối của nó trong mẫu thí nghiệm với độ chính xác cao thông qua các bước đơn giản.

Theo một phương án, khi kiểm tra định tính thể hiện rằng có một loại axit

mucopolysacarit hoặc muối của nó có trong mẫu thí nghiệm, kết quả phân tích định lượng từ kiểm tra định lượng có thể được coi là lượng axit mucopolysacarit hoặc muối của nó. Phương pháp phân tích theo sáng chế, khi một loại axit mucopolysacarit hoặc muối của nó có trong mẫu thí nghiệm, do đó có thể được sử dụng làm phương pháp phân tích định lượng axit mucopolysacarit hoặc muối của nó. Phương pháp phân tích theo sáng chế có thể phân tích axit mucopolysacarit hoặc muối của nó có trong sản phẩm chẳng hạn như thực phẩm, thuốc và mỹ phẩm và nguyên liệu thô được sử dụng cho chúng thông qua các bước đơn giản để xác định loại và lượng axit mucopolysacarit hoặc muối của nó. Phương pháp phân tích theo sáng chế cũng hữu ích trong việc, ví dụ, kiểm soát chất lượng thực phẩm, thuốc, mỹ phẩm, nguyên liệu thô của các sản phẩm này và sản phẩm tương tự.

Phương pháp phân tích theo sáng chế có thể được sử dụng làm phương pháp phân tích chondroitin sulfat hoặc muối của nó có trong mẫu thí nghiệm. Khi phương pháp phân tích được sử dụng để phân tích mẫu thí nghiệm chứa chondroitin sulfat hoặc muối của nó, bước phát hiện tốt hơn là bao gồm bước xác định sự có mặt của chondroitin sulfat hoặc muối của nó trong mẫu thí nghiệm từ mẫu vạch thu được từ bước nhuộm.

Phương pháp phân tích theo sáng chế có thể là phương pháp phân tích chondroitin sulfat hoặc muối của nó có trong mẫu thí nghiệm, bao gồm các bước: thực hiện kiểm tra định tính và kiểm tra định lượng mẫu thí nghiệm chứa chondroitin sulfat hoặc muối của nó, kiểm tra định tính bao gồm: bước điện di là bước đưa mẫu thí nghiệm đi điện di sử dụng màng; bước nhuộm là bước nhuộm màng sau khi điện di với xanh Alcian; và bước phát hiện là bước xác định loại axit mucopolysacarit hoặc muối của nó trong mẫu thí nghiệm từ mẫu vạch tạo thành từ bước nhuộm, kiểm tra định lượng bao gồm: bước định lượng đo màu là bước phân tích định lượng axit mucopolysacarit hoặc muối của nó trong mẫu thí nghiệm bằng phương pháp đo màu

sử dụng thuốc nhuộm có thể phát hiện axit mucopolysacarit hoặc muối của nó. Trong phương pháp phân tích này, khi axit mucopolysacarit hoặc muối của nó trong mẫu thí nghiệm được xác định chỉ là chondroitin sulfat hoặc muối của nó trong kiểm tra định tính, kết quả phân tích định lượng từ kiểm tra định lượng được coi là lượng chondroitin sulfat hoặc muối của nó. Phương pháp phân tích chondroitin sulfat hoặc muối của nó có thể được sử dụng làm phương pháp phân tích định lượng chondroitin sulfat hoặc muối của nó trong mẫu thí nghiệm.

Sáng chế cũng bao gồm phương pháp phân tích định lượng chondroitin sulfat hoặc muối của nó sau đây.

Phương pháp phân tích định lượng chondroitin sulfat hoặc muối của nó có trong mẫu thí nghiệm, bao gồm các bước: thực hiện kiểm tra định tính và kiểm tra định lượng mẫu thí nghiệm chứa chondroitin sulfat hoặc muối của nó, kiểm tra định tính bao gồm: bước điện di là bước đưa mẫu thí nghiệm đi điện di sử dụng màng; bước nhuộm là bước nhuộm màng sau khi điện di với xanh Alcian; và bước phát hiện là bước xác định loại axit mucopolysacarit hoặc muối của nó trong mẫu thí nghiệm từ mẫu vạch tạo thành từ bước nhuộm, kiểm tra định lượng bao gồm bước định lượng đo màu là bước phân tích định lượng axit mucopolysacarit hoặc muối của nó trong mẫu thí nghiệm bằng phương pháp đo màu sử dụng thuốc nhuộm có thể phát hiện axit mucopolysacarit hoặc muối của nó, trong đó khi axit mucopolysacarit hoặc muối của nó trong mẫu thí nghiệm được xác định chỉ là chondroitin sulfat hoặc muối của nó trong kiểm tra định tính, kết quả phân tích định lượng từ kiểm tra định lượng được coi là lượng chondroitin sulfat hoặc muối của nó.

Kiểm tra định tính, kiểm tra định lượng và các phương án được ưu tiên của chúng trong phương pháp phân tích định lượng chondroitin sulfat hoặc muối của nó là giống với các kiểm tra trong phương pháp phân tích nêu trên. Chondroitin sulfat và các phương án được ưu tiên của chúng cũng giống với chondroitin sulfat trong phương

pháp phân tích nêu trên.

Phương pháp kiểm tra kiểm soát chất lượng cho mẫu chứa axit mucopolysacarit hoặc muối của nó

Phương pháp kiểm tra kiểm soát chất lượng cho sản phẩm chứa axit mucopolysacarit hoặc muối của nó theo sáng chế bao gồm: bước phân tích mẫu thí nghiệm là bước phân tích sản phẩm là mẫu thí nghiệm bằng phương pháp phân tích theo sáng chế được mô tả trên đây; bước phân tích mẫu đối chứng là bước phân tích bằng phương pháp phân tích mẫu đối chứng chứa axit mucopolysacarit hoặc muối của nó mà nồng độ và loại đã biết; và bước đánh giá là bước đánh giá chất lượng của mẫu thí nghiệm bằng cách so sánh kết quả kiểm tra định tính và kết quả kiểm tra định lượng của mẫu thí nghiệm với kết quả kiểm tra định tính với kết quả kiểm tra định lượng của mẫu đối chứng từ các bước phân tích tương ứng.

Ví dụ không giới hạn về sản phẩm chứa axit mucopolysacarit hoặc muối của nó bao gồm thực phẩm, thuốc và mỹ phẩm và nguyên liệu thô của các sản phẩm này chứa axit mucopolysacarit hoặc muối của nó, mà được sử dụng làm mẫu thí nghiệm trong phương pháp phân tích nêu trên. Theo sáng chế, bước phân tích mẫu thí nghiệm có thể thực hiện trước bước phân tích mẫu đối chứng và ngược lại. Kiểm tra định tính, kiểm tra định lượng, các phương án được ưu tiên của chúng và các phép kiểm tra tương tự là giống với các phép kiểm tra trong phương pháp phân tích được mô tả trên đây. Axit mucopolysacarit hoặc muối của nó là giống với axit mucopolysacarit hoặc muối của nó trong phương pháp phân tích được mô tả trên đây. Mẫu đối chứng chứa axit mucopolysacarit hoặc muối của nó có nồng độ (lượng) và loại đã biết. Mẫu đối chứng có thể được lựa chọn thích hợp theo mẫu thí nghiệm. Ví dụ, sản phẩm chẳng hạn như thực phẩm, thuốc, hoặc mỹ phẩm, hoặc nguyên liệu thô của bất kỳ sản phẩm này chứa lượng chuẩn axit mucopolysacarit hoặc muối của nó nhất định có thể được sử dụng làm mẫu đối chứng.

Kết quả kiểm tra định tính và kết quả kiểm tra định lượng của mẫu thí nghiệm từ bước phân tích mẫu thí nghiệm được so sánh lần lượt với kết quả kiểm tra định tính và kết quả kiểm tra định lượng của mẫu đối chứng. Điều này cho phép xác định có hay không có loại và lượng axit mucopolysacarit hoặc muối của nó trong mẫu thí nghiệm (sản phẩm) giống với loại và lượng axit mucopolysacarit hoặc muối của nó trong mẫu đối chứng. Theo một phương án, ví dụ, khi loại axit mucopolysacarit hoặc muối của nó trong mẫu thí nghiệm giống với loại axit mucopolysacarit hoặc muối của nó trong mẫu đối chứng và lượng axit mucopolysacarit hoặc muối của nó trong mẫu thí nghiệm lớn hơn hoặc bằng lượng trong mẫu đối chứng, mẫu thí nghiệm, tức là, sản phẩm, có thể được xem là thỏa mãn các tiêu chuẩn chất lượng. Cũng theo một phương án, bởi vì loại axit mucopolysacarit hoặc muối của nó có trong mẫu đối chứng là đã biết, việc so sánh kết quả các kiểm tra định tính cho phép xác định loại axit mucopolysacarit hoặc muối của nó trong mẫu thí nghiệm. Đối với kiểm soát chất lượng sản phẩm chứa axit mucopolysacarit hoặc muối của nó, việc kiểm soát loại và lượng axit mucopolysacarit hoặc muối của nó trong sản phẩm là quan trọng. Sáng chế cho phép phân tích axit mucopolysacarit hoặc muối của nó có trong sản phẩm và đánh giá chất lượng sản phẩm một cách đơn giản và khách quan. Phương pháp kiểm soát chất lượng này hữu ích trong việc kiểm soát chất lượng của thực phẩm, thuốc, mỹ phẩm, nguyên liệu thô của các sản phẩm này và sản phẩm tương tự chứa axit mucopolysacarit hoặc muối của nó.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sau đây, sáng chế được mô tả chi tiết dựa trên các ví dụ. Sáng chế không bị giới hạn trong các ví dụ này.

Ví dụ 1

Axit mucopolysacarit và nguyên liệu thô sụn cá mập được thực hiện điện di, sau đó được nhuộm với xanh Alcian. Từ khoảng cách dịch chuyển tạo thành của các

vạch, axit mucopolysacarit trong nguyên liệu thô sụn cá mập được phân tích một cách định tính.

(1) Thiết bị và dụng cụ được sử dụng trong phân tích

- Thiết bị điện di màng (Nihon Eido Co. Ltd., NA-4700)
- Bộ nguồn điện AE-3121 điện tuyến tính 2000 (Atto Corporation)
- Màng xenluloza axetat (tên sản phẩm: SELECA-VSP, 6×11 cm, Toyo Roshi Kaisha, Ltd.)
- Màng nitroxenluloza (tên sản phẩm: màng nitroxenluloza, $0,45 \mu\text{m}$, 6×11 cm hoặc $7 \times 8,5$ cm, Bio-Rad Laboratories, Inc.)
- Màng kết hợp của nitroxenluloza và xenluloza axetat (tên sản phẩm: màng nitroxenluloza, số sản phẩm: bộ lọc màng MF ($0,45 \mu\text{m}$ HA), Merk KGaA)

(2) Chất phản ứng và nguyên liệu thô được sử dụng trong phân tích

- Natri hyaluronat (MCE MedChemExpress)
- Muối natri chondroitin sulfat C (Nacalai Tesque, Inc.)
- Heparan sulfat (MCE MedChemExpress)
- Heparin natri (Santa Cruz Biotechnology, Inc.)
- Dermatan sulfat (Tronto Research Chemicals Inc.)
- Nguyên liệu thô sụn cá mập (I) (tên sản phẩm: bột chiết sụn cá mập, Nihon Yakuhin Co., Ltd.)
- Nguyên liệu thô sụn cá mập (II) (tên sản phẩm: SCP, Maruha Nichiro Corporation)
- Xanh Alcian 8GX (Funakoshi Co., Ltd.)
- Pyridin, axit axetic, bari axetat (toàn bộ là hàng cao cấp, Nacalai Tesque, Inc.)
- Actinaza E (Kaken Pharmaceutical Co., Ltd.)
- Chondroitinaza ABC (Sigma-Aldrich)

Mỗi nguyên liệu thô sụn cá mập (I) và nguyên liệu thô sụn cá mập (II) chứa

phần chiết sụn cá mập. Mỗi nguyên liệu thô sụn cá mập (I) và nguyên liệu thô sụn cá mập (II) chứa 20 % khối lượng chondroitin sulfat C (lượng được báo cáo bởi nhà sản xuất).

Natri hyaluronat, muối natri chondroitin sulfat C, heparan sulfat, heparin natri và dermatan sulfat được sử dụng làm mẫu chuẩn tham chiếu.

(3) Chuẩn bị chất phản ứng

1) 25% Dung dịch metanol chứa nước

Nước cất được bổ sung vào 250 mL metanol, sao cho 1 L dung dịch metanol chứa nước được tạo thành.

2) Dung dịch đậm 1,0 M axit axetic/pyridin (dung dịch đậm axit axetic - pyridin) (độ pH 3,5)

800 mL nước cất được bổ sung vào 60 g axit axetic và dung dịch tạo thành được điều chỉnh để có độ pH 3,5 bằng pyridin, sao cho 1 L dung dịch đậm được tạo thành.

3) Dung dịch đậm 0,1 M bari axetat (độ pH 5,0)

800 mL nước cất được bổ sung vào 25,5 g bari axetat và dung dịch tạo thành được điều chỉnh để có độ pH 5,0 bằng axit axetic, sao cho 1 L dung dịch đậm được tạo thành.

4) Dung dịch xanh Alcian (dung dịch nhuộm)

Dung dịch axit axetic chứa nước 0,3% được bổ sung vào 5,0 g xanh Alcian 8GX, sao cho 1 L dung dịch được tạo thành.

5) Dung dịch axit axetic chứa nước 1%

Nước cất được bổ sung vào axit axetic (10 mL), sao cho 1 L dung dịch được tạo thành.

6) Dung dịch axit axetic chứa nước 5%

Nước cất được bổ sung vào axit axetic (50 mL), sao cho 1 L dung dịch được tạo

thành.

7) Dung dịch actinaza E (I)

Nước cất được bổ sung vào actinaza E, sao cho dung dịch có nồng độ actinaza E là 3,4 mg/mL được tạo thành.

8) Dung dịch atinaza E (II)

Nước cất được bổ sung vào actinaza E, sao cho dung dịch có nồng độ actinaza E là 1,0 mg/mL được tạo thành.

9) Dung dịch chondroitinaza ABC

Chondroitinaza ABC được hòa tan trong nước cất, sao cho 10 U/mL dung dịch được tạo thành.

(4) Chuẩn bị mẫu phân tích

Năm mẫu chuẩn tham chiếu chứa axit mucopolysacarit (natri hyaluronat, muối natri chondroitin sulfat C, heparan sulfat, heparin natri, dermatan sulfat), mỗi mẫu được hòa tan trong nước cất, sao cho 0,1 mg/mL dung dịch chứa nước được tạo thành. Mỗi nguyên liệu thô sụn cá mập (I) và (II) được hòa tan trong nước cất, sao cho 1,0 mg/mL dung dịch chứa nước được tạo thành. Các dung dịch mẫu chuẩn chứa nước và các dung dịch nguyên liệu thô sụn cá mập chứa nước thu được sử dụng làm các mẫu phân tích.

(5) Quy trình phân tích

(5-1) Đánh giá bằng cách sử dụng màng xenluloza axetat

1) Các đường kẻ bút chì (5 mm) để phát hiện mẫu phân tích được vẽ lên màng xenluloza axetat. Cụ thể là, các đường kẻ song song với mặt đáy của màng được vẽ với khoảng cách 1 cm từ mặt đáy với các khoảng 5 mm. Các đường kẻ được vẽ với khoảng cách lớn hơn hoặc bằng 1 cm từ bên trái và bên phải của màng.

2) Màng xenluloza axetat được ngâm trong dung dịch metanol chứa nước 25% trong 10 phút hoặc lâu hơn.

3) Màng xenluloza axetat được ngâm trong đệm (dung dịch đệm 1,0 M axit axetic/pyridin) trong 30 phút.

4) Màng được lấy ra khỏi đệm (dung dịch đệm 1,0 M axit axetic/pyridin) và được làm khô.

5) Các điểm phát hiện giống như vạch của mẫu phân tích được tạo ra trên màng xenluloza axetat.

6) Mỗi ngăn catot và anot của buồng dịch chuyển được tích điện trong đệm (dung dịch đệm 1,0 M axit axetic/pyridin) và màng xenluloza axetat được thiết đặt trong buồng dịch chuyển, với các điểm phát hiện mẫu gần với catot.

7) Nắp được đặt lên trên buồng dịch chuyển, sau đó giữ yên 10 phút để màng cân bằng.

8) Điện di được chạy với dòng điện không đổi 11 mA trong 10 phút.

9) Sau khi kết thúc điện di, màng được lấy ra, làm khô trong không khí và ngâm trong dung dịch xanh Alcian trong 10 phút để nhuộm.

10) Màng được làm mất màu bằng dung dịch axit axetic 1%.

(5-2) Đánh giá bằng cách sử dụng màng nitroxenlulaza

1) Tương tự với bước đánh giá bằng cách sử dụng màng xenluloza axetat, các đường kẻ bút chì (5 mm) để phát hiện mẫu phân tích được vẽ lên màng nitroxenlulaza.

2) Màng nitroxenlulaza (6×11 cm hoặc $7 \times 8,5$ cm) được ngâm trong đệm (dung dịch đệm 0,1 M bari axetat) trong 10 phút hoặc lâu hơn.

3) Màng được lấy ra khỏi đệm (dung dịch đệm 0,1 M bari axetat) và được làm khô.

4) Các điểm phát hiện giống như vạch của mẫu phân tích được tạo ra trên màng nitroxenlulaza.

5) Mỗi ngăn catot và anot của buồng dịch chuyển được tích điện trong đệm (dung dịch đệm 0,1 M bari axetat) và màng nitroxenlulaza được thiết đặt trong buồng

dịch chuyển, với các điểm phát hiện mẫu gần với catot.

6) Nắp được đặt lên trên buồng dịch chuyển, sau đó giữ yên 10 phút để màng cân bằng.

7) Điện di được chạy với dòng điện không đổi 17 mA trong 40 phút.

8) Sau khi kết thúc điện di, màng được lấy ra, làm khô và ngâm trong dung dịch xanh Alcian trong 10 phút để nhuộm.

9) Màng được làm mất màu bằng dung dịch axit axetic 5%.

Kết quả sẽ bền hơn khi buồng dịch chuyển được thiết đặt ở nhiệt độ thấp hơn 10°C (ví dụ, 4°C) trong quá trình điện di.

(5-3) Đánh giá bằng cách sử dụng màng kết hợp của nitroxenluloza và xenluloza axetat

Kiểm tra được chạy bằng cùng phương pháp ngoại trừ trong phần (5-2) Đánh giá bằng cách sử dụng màng nitroxenlulaza, màng kết hợp của nitroxenluloza và xenluloza axetat được sử dụng thay vì màng nitroxenlulaza.

(5-4) Xác định chondroitin sulfat thông qua thủy phân enzym với chondroitinaza ABC

(5-4-1) Quá trình xử lý với enzym (xử lý enzym) của mẫu chuẩn tham chiếu chứa axit mucopolysacarit.

1) Nước cất được bổ sung vào muối natri chondroitin sulfat C và heparin natri, làm mẫu chuẩn tham chiếu chứa axit mucopolysacarit, để tạo thành dung dịch chứa nước 4 mg/mL của mỗi mẫu chuẩn tham chiếu.

2) 60 μ L của mỗi dung dịch chứa nước của mẫu chuẩn tham chiếu chứa axit mucopolysacarit được bổ sung 75 μ L dung dịch actinaza E (I) và 150 μ L nước cất để tạo ra quá trình xử lý với enzym ở 40°C trong 17 giờ, nhờ đó thu được dung dịch xử lý với actinaza E.

3) Dung dịch xử lý với actinaza E được đặt trong bể nước sôi, giữ yên trong 10

phút để làm bất hoạt enzym.

4) Các dung dịch thu được từ bước 3) được làm mát đến nhiệt độ phòng. Mỗi dung dịch được bổ sung 15 μL dung dịch chondroitinaza ABC để gây ra quá trình xử lý với enzym ở 37°C trong một giờ, sao cho thu được dung dịch được xử lý với chondroitinaza.

5) Dung dịch xử lý với chondroitinaza được đặt trong bể nước sôi, giữ yên trong 10 phút để làm bất hoạt enzym, nhờ đó thu được sản phẩm được xử lý với enzym.

6) Sản phẩm được xử lý với enzym thu được trong bước 5) được làm mát đến nhiệt độ phòng, sau đó là ly tâm. Mỗi dịch nổi tạo thành được pha loãng ba lần với nước cất và sau đó được phân tích dựa theo các phương pháp đánh giá bằng cách sử dụng màng xenluloza axetat và màng nitroxenlulaza.

(5-4-2) Quá trình xử lý với enzym của nguyên liệu thô sụn cá mập

1) Nước cất được bổ sung vào 500 mg mỗi nguyên liệu thô sụn cá mập (I) và (II) để thu được 10 mL các dung dịch nguyên liệu thô (dung dịch nguyên liệu thô sụn cá mập (I) và dung dịch nguyên liệu thô sụn cá mập (II)).

2) 100 μL mỗi dung dịch nguyên liệu thô thu được từ bước 1) được bổ sung 850 μL dung dịch actinaza E (II) để gây ra quá trình xử lý với enzym ở 40°C trong 17 giờ, nhờ đó thu được dung dịch xử lý với actinaza E.

3) Dung dịch xử lý với actinaza E được đặt trong bể nước sôi, giữ yên trong 10 phút để làm bất hoạt enzym.

4) Các dung dịch thu được từ bước 3) được làm mát đến nhiệt độ phòng. Mỗi dung dịch được bổ sung 50 μL dung dịch chondroitinaza ABC để gây ra quá trình xử lý với enzym ở 37°C trong một giờ, sao cho thu được dung dịch được xử lý với chondroitinaza.

5) Dung dịch xử lý với chondroitinaza được đặt trong bể nước sôi, giữ yên

trong 10 phút để làm bất hoạt enzym, nhờ đó thu được sản phẩm được xử lý với enzym.

6) Sản phẩm được xử lý với enzym thu được trong bước 5) được làm mát đến nhiệt độ phòng, sau đó là ly tâm. Mỗi dịch nổi tạo thành được pha loãng ba lần với nước cất và sau đó được phân tích dựa theo các phương pháp đánh giá bằng cách sử dụng màng xenluloza axetat và màng nitroxenlulaza.

Mẫu không qua quá trình xử lý với enzym (xử lý với enzym) được tạo thành bằng cách bổ sung cùng một lượng nước cất thay vì dung dịch enzym trong quy trình 2) và 4) trong mục (5-4-1) và (5-4-2) nêu trên và tiến hành cùng thao tác như thao tác đối với sản phẩm được xử lý với enzym (mẫu xử lý với enzym) trong các quy trình khác.

(6) Kết quả

Các hình vẽ từ Fig.1 đến Fig.4 thể hiện kết quả điện di màng của mẫu chuẩn tham chiếu chứa axit mucopolysacarit và nguyên liệu thô sụn cá mập. Fig.5 thể hiện kết quả điện di màng của sản phẩm được xử lý với enzym của mẫu chuẩn tham chiếu chứa axit mucopolysacarit và sản phẩm được xử lý với enzym của nguyên liệu thô sụn cá mập được tạo thành bằng phương pháp trong mục (5-4) nêu trên.

(6-1) Kết quả đánh giá bằng cách sử dụng màng xenluloza axetat

Fig.1 bao gồm các hình ảnh mẫu vạch của mẫu chuẩn tham chiếu chứa axit mucopolysacarit và nguyên liệu thô sụn cá mập (I) thu được bằng cách điện di sử dụng màng xenluloza axetat. Fig.1(a) thể hiện kết quả điện di mẫu chuẩn tham chiếu chứa axit mucopolysacarit và nguyên liệu thô sụn cá mập (I). Fig.1(b) thể hiện kết quả điện di mẫu chuẩn tham chiếu chứa axit mucopolysacarit và nguyên liệu thô sụn cá mập (I) cùng được phát hiện. Bảng 1 thể hiện mẫu theo làn từ 1 đến 9 trong Fig.1(a) và theo làn từ 10 đến 15 trong Fig.1(b). Mẫu nguyên liệu thô sụn cá mập (I) trong các làn từ 6 đến 9 là các lô khác nhau và mẫu nguyên liệu thô sụn cá mập (I) trong các làn từ 10

đến 15 là cùng lô với lần 6. Lượng của mỗi mẫu chuẩn tham chiếu chứa axit mucopolysacarit được phát hiện là 0,3 μg và lượng của nguyên liệu thô sụn cá mập được phát hiện là 2,0 μg trong Fig.1 và các hình mô tả sau đây từ Fig.2 đến Fig.4. Để tham chiếu, Fig.7 thể hiện hình ảnh giản lược mẫu vạch trong các hình được thể hiện trong Fig.1 ((a): hình ảnh giản lược của Fig.1(a), (b): hình ảnh giản lược của Fig.1(b)).

Bảng 1

Lần	Mẫu	Lần	Mẫu
1	Natri hyaluronat	10	Nguyên liệu thô sụn cá mập (I)
2	Muối natri chondroitin sulfat C	11	Nguyên liệu thô sụn cá mập (I) + natri hyaluronat
3	Heparan sulfat	12	Nguyên liệu thô sụn cá mập (I) + muối natri chondroitin sulfat C
4	Heparin natri	13	Nguyên liệu thô sụn cá mập (I) + heparan sulfat
5	Dermatan sulfat	14	Nguyên liệu thô sụn cá mập (I) + heparin natri
6-9	Nguyên liệu thô sụn cá mập (I)	15	Nguyên liệu thô sụn cá mập (I) + dermatan sulfat

Fig.2 bao gồm các hình ảnh mẫu vạch của mẫu chuẩn tham chiếu chứa axit mucopolysacarit và nguyên liệu thô sụn cá mập (II) thu được bằng cách điện di sử dụng màng xenluloza axetat. Fig.2(a) thể hiện kết quả điện di mẫu chuẩn tham chiếu chứa axit mucopolysacarit và nguyên liệu thô sụn cá mập (II). Fig.2(b) thể hiện kết quả điện di của mẫu chuẩn tham chiếu chứa axit mucopolysacarit và nguyên liệu thô sụn cá mập (II) cùng được phát hiện. Bảng 2 thể hiện mẫu theo lần từ 1 đến 9 trong Fig.2(a) và theo lần từ 10 đến 15 trong Fig.2(b). Mẫu nguyên liệu thô sụn cá mập (II) trong các lần từ 6 đến 9 là các lô khác nhau và mẫu nguyên liệu thô sụn cá mập (II) trong các lần từ 10 đến 15 là cùng lô với lần 6. Để tham chiếu, Fig.8 thể hiện hình ảnh giản lược mẫu vạch trong các hình được thể hiện trong Fig.2 ((a): hình ảnh giản lược của Fig.2(a), (b): hình ảnh giản lược của Fig.2(b)).

Bảng 2

Làn	Mẫu	Làn	Mẫu
1	Natri hyaluronat	10	Nguyên liệu thô sụn cá mập (II)
2	Muối natri chondroitin sulfat C	11	Nguyên liệu thô sụn cá mập (II) + natri hyaluronat
3	Heparan sulfat	12	Nguyên liệu thô sụn cá mập (II) + muối natri chondroitin sulfat C
4	Heparin natri	13	Nguyên liệu thô sụn cá mập (II) + heparan sulfat
5	Dermatan sulfat	14	Nguyên liệu thô sụn cá mập (II) + heparin natri
6-9	Nguyên liệu thô sụn cá mập (II)	15	Nguyên liệu thô sụn cá mập (II) + dermatan sulfat

(6-2) Kết quả đánh giá bằng cách sử dụng màng nitroxenlulaza

Fig.3 bao gồm các hình ảnh mẫu vạch của mẫu chuẩn tham chiếu chứa axit mucopolysacarit và nguyên liệu thô sụn cá mập (I) thu được bằng cách điện di sử dụng màng nitroxenlulaza. Fig.3(a) thể hiện kết quả điện di mẫu chuẩn tham chiếu chứa axit mucopolysacarit và nguyên liệu thô sụn cá mập (I). Fig.3(b) thể hiện kết quả điện di mẫu chuẩn tham chiếu chứa axit mucopolysacarit và nguyên liệu thô sụn cá mập (I) cùng được phát hiện. Bảng 3 thể hiện mẫu theo làn từ 1 đến 8 trong Fig.3(a) và theo làn từ 9 đến 14 trong Fig.3(b). Mẫu nguyên liệu thô sụn cá mập (I) trong các làn từ 6 đến 8 là các lô khác nhau và mẫu nguyên liệu thô sụn cá mập (I) trong các làn từ 9 đến 14 là cùng lô với làn 6. Để tham chiếu, Fig.9 thể hiện hình ảnh giản lược mẫu vạch trong các hình được thể hiện trong Fig.3 ((a): hình ảnh giản lược của Fig.3(a), (b): hình ảnh giản lược của Fig.3(b)).

Bảng 3

Làn	Mẫu	Làn	Mẫu
1	Natri hyaluronat	9	Nguyên liệu thô sụn cá mập (I)

2	Muối natri chondroitin sulfat C	10	Nguyên liệu thô sụn cá mập (I) + natri hyaluronat
3	Heparan sulfat	11	Nguyên liệu thô sụn cá mập (I) + muối natri chondroitin sulfat C
4	Heparin natri	12	Nguyên liệu thô sụn cá mập (I) + heparan sulfat
5	Dermatan sulfat	13	Nguyên liệu thô sụn cá mập (I) + heparin natri
6-8	Nguyên liệu thô sụn cá mập (I)	14	Nguyên liệu thô sụn cá mập (I) + dermatan sulfat

Fig.4 bao gồm các hình ảnh mẫu vạch của mẫu chuẩn tham chiếu chứa axit mucopolysacarit và nguyên liệu thô sụn cá mập (II) thu được bằng cách điện di sử dụng màng nitroxenlulaza. Fig.4(a) thể hiện kết quả điện di mẫu chuẩn tham chiếu chứa axit mucopolysacarit và nguyên liệu thô sụn cá mập (II). Fig.4(b) thể hiện kết quả điện di mẫu chuẩn tham chiếu chứa axit mucopolysacarit và nguyên liệu thô sụn cá mập (II) cùng được phát hiện. Bảng 4 thể hiện mẫu theo làn từ 1 đến 8 trong Fig.4(a) và theo làn từ 9 đến 14 trong Fig.4(b). Mẫu nguyên liệu thô sụn cá mập (II) trong các làn từ 6 đến 8 là các lô khác nhau và mẫu nguyên liệu thô sụn cá mập (II) trong các làn từ 9 đến 14 là cùng lô với làn 6. Để tham chiếu, Fig.10 thể hiện hình ảnh giản lược mẫu vạch trong các hình được thể hiện trong Fig.4 ((a): hình ảnh giản lược của Fig.4(a), (b): hình ảnh giản lược của Fig.4(b)).

Bảng 4

Làn	Mẫu	Làn	Mẫu
1	Natri hyaluronat	9	Nguyên liệu thô sụn cá mập (II)
2	Muối natri chondroitin sulfat C	10	Nguyên liệu thô sụn cá mập (II) + natri hyaluronat
3	Heparan sulfat	11	Nguyên liệu thô sụn cá mập (II) + muối natri chondroitin sulfat C
4	Heparin natri	12	Nguyên liệu thô sụn cá mập (II) + heparan sulfat
5	Dermatan sulfat	13	Nguyên liệu thô sụn cá mập (II) + heparin natri

6-8	Nguyên liệu thô sụn cá mập (II)	14	Nguyên liệu thô sụn cá mập (II) + dermatan sulfat
-----	---------------------------------	----	--

(6-3) Màng kết hợp của nitroxenluloza và xenluloza axetat

Điện di sử dụng màng kết hợp của nitroxenluloza và xenluloza axetat chứng minh các kết quả (mẫu vạch) giống với các kết quả điện di sử dụng màng nitroxenluloza được thể hiện trong Fig.3 và Fig.4.

(6-4) Kết quả xác định chondroitin sulfat bằng thủy phân enzym

Fig.5 bao gồm các hình ảnh mẫu vạch của sản phẩm được xử lý với enzym của nguyên liệu thô sụn cá mập và sản phẩm được xử lý với enzym của mẫu chuẩn tham chiếu chứa axit mucopolysacarit thu được bằng cách điện di sử dụng màng xenluloza axetat hoặc màng nitroxenluloza ((a): màng xenluloza axetat, (b): màng nitroxenluloza). Bảng 5 thể hiện mẫu theo lần từ 1 đến 8 trong các Fig.5(a) và Fig.5(b). Trong bảng 5, mẫu “được xử lý” được ghi trong cột “xử lý enzym” chỉ sản phẩm được xử lý với enzym (mẫu qua quá trình xử lý với enzym) nêu trên và mẫu “không được xử lý” được ghi trong cột “xử lý enzym” chỉ mẫu không qua xử lý với actinaza E và chondroitinaza ABC nêu trên. Lượng của mỗi nguyên liệu thô sụn cá mập hoặc sản phẩm được xử lý với enzym của chúng được phát hiện trong điện di là 2,0 µg. Lượng của mỗi mẫu chuẩn tham chiếu chứa axit mucopolysacarit hoặc sản phẩm được xử lý enzym của chúng được phát hiện là 0,8 µg. Để tham chiếu, Fig.11 thể hiện hình ảnh giản lược mẫu vạch trong các hình được thể hiện trong Fig.5 ((a): hình ảnh giản lược của Fig.5(a), (b): hình ảnh giản lược của Fig.5(b)).

Bảng 5

Lần	Mẫu	Xử lý enzym
1	Nguyên liệu thô sụn cá mập (I)	Không được xử lý

2	Nguyên liệu thô sụn cá mập (I)	Được xử lý
3	Nguyên liệu thô sụn cá mập (II)	Không được xử lý
4	Nguyên liệu thô sụn cá mập (II)	Được xử lý
5	Muối natri chondroitin sulfat C	Không được xử lý
6	Muối natri chondroitin sulfat C	Được xử lý
7	Heparin natri	Không được xử lý
8	Heparin natri	Được xử lý

Như được thể hiện trong các làn từ 6 đến 10 trong các Fig.1 và Fig.2 và các làn từ 6 đến 9 trong các Fig.3 và Fig.4, một vạch của mỗi mẫu nguyên liệu thô sụn cá mập (từ các nhà sản xuất khác nhau và/hoặc lô khác nhau) xuất hiện khi nhuộm xanh Alcian sau khi điện di màng. Việc cùng phát hiện mẫu nguyên liệu thô sụn cá mập và mỗi mẫu chuẩn tham chiếu chứa axit mucopolysacarit trong điện di sử dụng màng xenluloza axetat chỉ ra rằng khoảng cách dịch chuyển của vạch của nguyên liệu thô sụn cá mập khác với khoảng cách dịch chuyển của vạch của natri hyaluronat, heparan sulfat và dermatan sulfat (các làn 11, 13 và 15 trong các Fig.1 và Fig.2). Việc cùng phát hiện mẫu nguyên liệu thô sụn cá mập và mỗi mẫu chuẩn tham chiếu chứa axit mucopolysacarit chỉ ra rằng khoảng cách dịch chuyển của vạch của nguyên liệu thô sụn cá mập và vạch của mẫu chuẩn natri chondroitin sulfat là giống nhau (làn 12 trong các Fig.1 và Fig.2), nhưng vạch của mẫu nguyên liệu thô sụn cá mập được phát hiện cùng với vết loang heparin natri (làn 14 trong các Fig.1 và Fig.2). Điện di sử dụng màng nitroxenlulaza chỉ ra rằng khoảng cách dịch chuyển của vạch nguyên liệu thô sụn cá mập chỉ giống với mẫu chuẩn natri chondroitin sulfat và khác với khoảng cách dịch chuyển của vạch của các axit mucopolysacarit khác (các làn từ 10 đến 14 trong các Fig.3 và Fig.4). Các kết quả này thể hiện rằng chondroitin sulfat là axit mucopolysacarit duy nhất có trong nguyên liệu thô sụn cá mập và các axit

mucopolysacarit khác không có trong đó.

Như được mô tả trên đây, trong điện di sử dụng màng xenluloza axetat, vạch của nguyên liệu thô sụn cá mập (I) và (II) xuất hiện chồng lên vạch của natri chondroitin sulfat. Tương tự, vạch của nguyên liệu thô sụn cá mập và heparin natri cùng phát hiện vết loang. Nguyên liệu thô sụn cá mập (I) và (II), mẫu chuẩn natri chondroitin sulfat và mẫu chuẩn heparin natri bị thủy phân enzym với chondroitinaza ABC theo phương pháp được mô tả trong mục (5-4) nêu trên và thực hiện điện di màng như nêu trên. Kết quả là, chỉ có vạch của nguyên liệu thô sụn cá mập (I) và (II) và mẫu chuẩn natri chondroitin sulfat không xuất hiện (Fig.5).

Sụn cá mập đã được báo cáo là chứa các axit mucopolysacarit chẳng hạn như chondroitin sulfat, axit hyaluronic và dermatan sulfat (Higashi K., et al, PloS One, 10(6), e0131502(2015)). Ngoài các chất này, heparan sulfat và heparin natri, là các axit mucopolysacarit tiêu biểu, được sử dụng làm mẫu chuẩn tham chiếu trong điện di màng của nguyên liệu thô sụn cá mập (I) và (II). Trong đánh giá bằng cách sử dụng màng xenluloza axetat, chỉ có một vạch của mỗi nguyên liệu thô được phát hiện. Khoảng cách dịch chuyển của chúng giống với khoảng cách dịch chuyển của vạch của chondroitin sulfat và vạch này chồng lên vạch của heparin. Bước đánh giá được thực hiện bằng cách thay đổi giá cho màng nitroxenlulaza và kết quả thể hiện rằng khoảng cách dịch chuyển của vạch của mỗi nguyên liệu thô và vạch của chondroitin sulfat là giống nhau. Để xác định axit mucopolysacarit trong nguyên liệu thô sụn cá mập, nguyên liệu thô và mẫu chuẩn tham chiếu được thủy phân enzym với chondroitinaza ABC. Điều đó dẫn đến sự biến mất của vạch của nguyên liệu thô sụn cá mập và mẫu chuẩn tham chiếu chondroitin sulfat, có nghĩa là axit mucopolysacarit có trong nguyên liệu thô sụn cá mập được phân giải với chondroitinaza ABC. Kết quả một vạch duy nhất được nhuộm với xanh Alcian và khoảng cách dịch chuyển của nó giống với khoảng cách dịch chuyển của vạch của chondroitin sulfat, điều này thể hiện rằng axit

mucopolysacarit có trong nguyên liệu thô chỉ là chondroitin sulfat và các axit mucopolysacarit khác không có trong đó. Hơn thế nữa, kết quả vạch được phân giải với chondroitinaza ABC khẳng định rằng axit mucopolysacarit có trong nguyên liệu thô chỉ là chondroitin sulfat và các axit mucopolysacarit khác không có trong đó. Thông thường, phân tích định lượng bằng phương pháp đo màu sử dụng các đặc tính của các nhóm chức trong hợp chất, thường liên quan đến vấn đề về tính đặc hiệu. Tuy nhiên, bởi vì chỉ có vạch của chondroitin sulfat được nhuộm với thuốc nhuộm xanh Alcian khi đánh giá nguyên liệu thô sụn cá mập, kết quả phân tích định lượng từ phân tích định lượng bằng phương pháp đo màu xanh Alcian của nguyên liệu thô có thể được xem là phản ánh lượng chondroitin sulfat hoặc muối của nó.

Ví dụ 2

Lượng chondroitin sulfat hoặc muối của nó trong mỗi nguyên liệu thô sụn cá mập (I) và (II) được sử dụng trong ví dụ 1 được phân tích định lượng bằng phương pháp đo màu xanh Alcian. Phân tích định lượng bằng phương pháp đo màu xanh Alcian được thực hiện theo phương pháp mô tả trong Tạp chí Hiệp hội vệ sinh thực phẩm Nhật Bản (Journal of the Food Hygienic Society of Japan) (Shokuhin Eiseigaku Zasshi) (Yoshie YABE, et al., Determination of Sodium Chondroitin Sulfate Added in Foods, 28(1), pp.13-18 (1987)).

(1) Chuẩn bị chất phản ứng

1) Dung dịch actinaza E

Dung dịch đệm phosphat được bổ sung vào 0,5 g actinaza E (Kaken Pharmaceutical Co., Ltd.), sao cho 50 mL dung dịch được tạo thành.

2) Chất phản ứng xanh Alcian

1 g xanh Alcian 8GX được bổ sung vào 4,2 mL axit clohydric, 1,38 g natri dihydro phosphat và nước, sao cho 100 mL chất phản ứng được tạo thành.

3) Dung dịch đệm phosphat

305 mL dung dịch dinatri phosphat 0,2 mol/L và 195 mL dung dịch mononatri phosphat 0,2 mol/L được trộn với nhau, sau đó bổ sung nước. Nhờ đó, 1000 mL dung dịch đệm phosphat được tạo thành. Dung dịch có độ pH bằng 7.

(2) Chuẩn bị dung dịch chuẩn và dung dịch chuẩn cho đường chuẩn

100 mg natri chondroitin sulfat (loại cao cấp) được cân chính xác và hòa tan đến thể tích cố định 100 mL trong nước (nồng độ: 1000 µg/mL). 1 mL dung dịch này được pha loãng chính xác thành 10 mL với nước, mà được sử dụng làm dung dịch chuẩn (nồng độ: 100 µg/mL).

Dung dịch chuẩn được pha loãng với nước để tạo thành các dung dịch 1,0 µg/mL, 4,0 µg/mL, 7,0 µg/mL, 10 µg/mL và 20 µg/mL, mà được sử dụng làm dung dịch chuẩn cho đường chuẩn.

(3) Chuẩn bị dung dịch kiểm tra

2 g mẫu đã được tán thành bột được bổ sung vào 40 mL dung dịch đệm phosphat có độ pH 7,0. Sau đó, 5 mL dung dịch actinaza E (10 mg/mL) được bổ sung vào đó và dung dịch tạo thành được lắc. Dung dịch được giữ yên ở 40°C qua đêm và sau đó được pha loãng thành thể tích cố định 100 mL với nước. Dung dịch lọc bằng giấy lọc và dung dịch tạo thành được coi là dung dịch kiểm tra.

(4) Phương pháp định lượng đo màu

1 mL dung dịch kiểm tra được bổ sung thêm 0,2 mL chất phản ứng xanh Alcian và dung dịch được giữ yên trong 20 phút. Phần kết tủa được tạo thành, sau đó được ly tâm ở 3000 vòng/phút trong năm phút. Dịch nổi được loại bỏ và phần kết tủa được ly tâm một lần nữa sau khi được rửa với 3 mL nước. Phần kết tủa tạo thành được hòa tan trong 10 mL monoetanolin để tạo thành mẫu cho phép đo độ hấp thụ. Độ hấp thụ của mẫu cho phép đo độ hấp thụ ở bước sóng 615 nm được đo bằng quang phổ kế. Độ hấp thụ của dung dịch chuẩn cho đường chuẩn được đo sau khi làm hiện màu bằng thao tác tương tự. Đường chuẩn tạo ra bằng cách sử dụng độ hấp thụ của dung dịch

chuẩn cho đường chuẩn được sử dụng để tính toán lượng chondroitin sulfat hoặc muối của nó trong dung dịch kiểm tra. Lượng chondroitin sulfat hoặc muối của nó được tính toán ở đây là lượng natri chondroitin sulfat.

(5) Kết quả

Lượng chondroitin sulfat hoặc muối của nó trong nguyên liệu thô sụn cá mập (I) là 20,6 g/100 g và lượng chondroitin sulfat hoặc muối của nó trong nguyên liệu thô sụn cá mập (II) là 20,9 g/100 g.

Kết quả nêu trên thể hiện rằng axit mucopolysacarit có trong nguyên liệu thô sụn cá mập (I) và (II) được xác định bằng kiểm tra định tính (ví dụ 1) chỉ là chondroitin sulfat (100% chondroitin sulfat). Tương tự, kiểm tra định lượng (ví dụ 2) bằng phương pháp đo màu thể hiện rằng lượng chondroitin sulfat hoặc muối của nó trong nguyên liệu thô sụn cá mập (I) và (II) lần lượt là 20,6 g/100 g và 20,9 g/100 g. Bởi vì kiểm tra định tính (ví dụ 1) thể hiện rằng axit mucopolysacarit hoặc muối của nó có trong nguyên liệu thô sụn cá mập (I) và (II) chỉ là chondroitin sulfat hoặc muối của nó, kết quả phân tích định lượng từ kiểm tra định lượng (ví dụ 2) là lượng chondroitin sulfat hoặc muối của nó trong nguyên liệu thô sụn cá mập (I) và (II) tương ứng.

Do đó, sử dụng kết hợp kiểm tra định tính bao gồm các bước: đưa mẫu đi điện di màng để xác định loại axit mucopolysacarit hoặc muối của nó trong mẫu từ mẫu vạch thu được từ bước nhuộm xanh Alcian, và kiểm tra định lượng axit mucopolysacarit hoặc muối của nó bằng kiểm tra định lượng sử dụng phương pháp đo màu cho phép xác định loại và phân tích định lượng axit mucopolysacarit hoặc muối của nó trong mẫu thông qua các bước đơn giản.

Kiểm tra ví dụ 1

Phép kiểm tra sau đây được tiến hành để khẳng định rằng chondroitin sulfat hoặc muối của nó không được phân giải với actinaza E. Chất phản ứng, nguyên liệu

thô và chất tương tự bao gồm muối natri chondroitin sulfat C và nguyên liệu thô sụn cá mập (I) và (II) là giống với các chất trong ví dụ 1.

(1) Chuẩn bị mẫu phân tích

(1-1) Mẫu qua quá trình xử lý với enzym của nguyên liệu thô sụn cá mập (actinaza (+), chondroitinaza (+))

Mẫu được xử lý với enzym của nguyên liệu thô sụn cá mập (I) và mẫu xử lý với enzym của nguyên liệu thô sụn cá mập (II) (mẫu được xử lý với actinaza E và chondroitinaza ABC) được tạo thành theo phương pháp được mô tả trong mục (5-4-2) (Quá trình xử lý với enzym của nguyên liệu thô sụn cá mập) trong ví dụ 1.

(1-2) Mẫu được xử lý với actinaza của nguyên liệu thô sụn cá mập (actinaza (+), chondroitinaza (-))

Mẫu được tạo thành bằng phương pháp giống với phương pháp trong mục (1-1) nêu trên ngoại trừ nguyên liệu thô sụn cá mập không được xử lý với chondroitinaza ABC. Cụ thể là, dung dịch chondroitinaza ABC trong quy trình 4) trong phương pháp được mô tả trong mục (5-4-2) của ví dụ 1 được thay thế bằng cùng lượng nước cất. Ngoại trừ thay đổi này, mẫu được xử lý với actinaza của nguyên liệu thô sụn cá mập (I) và mẫu được xử lý với actinaza của nguyên liệu thô sụn cá mập (II) (các mẫu được xử lý với actinaza E nhưng không được xử lý với chondroitinaza ABC) được tạo thành theo phương pháp mô tả trong mục (5-4-2) của ví dụ 1.

(1-3) Các mẫu nguyên liệu thô sụn cá mập không xử lý với enzym (actinaza (-), chondroitinaza (-))

Mẫu được tạo ra bằng phương pháp giống với mục (1-1) nêu trên ngoại trừ nguyên liệu thô sụn cá mập không được xử lý với actinaza E và chondroitinaza ABC. Cụ thể là, mỗi dung dịch actinaza E (II) và dung dịch chondroitinaza ABC trong các quy trình 2) và 4) tương ứng, trong phương pháp được mô tả trong mục (5-4-2) của ví dụ 1 được thay thế bằng cùng lượng nước cất. Ngoại trừ những thay đổi này, mẫu

nguyên liệu thô sụn cá mập (I) không xử lý với enzym và mẫu nguyên liệu thô sụn cá mập (II) không xử lý với enzym (mẫu không được xử lý với actinaza E và chondroitinaza ABC) được tạo thành theo phương pháp được mô tả trong mục (5-4-2) của ví dụ 1.

(1-4) Mẫu được xử lý với enzym của muối natri chondroitin sulfat C (actinaza (+), chondroitinaza (+))

Mẫu được xử lý với enzym của muối natri chondroitin sulfat C được tạo thành bằng cách xử lý mẫu chuẩn tham chiếu chứa muối natri chondroitin sulfat C với actinaza E và chondroitinaza ABC bằng phương pháp được mô tả trong mục (5-4-1) (Quá trình xử lý enzym của mẫu chuẩn tham chiếu chứa axit mucopolysacarit) trong ví dụ 1.

(1-5) Mẫu được xử lý với actinaza của muối natri chondroitin sulfat C (actinaza (+), chondroitinaza (-))

Mẫu được tạo thành bằng phương pháp giống với mục (1-4) nêu trên ngoại trừ muối natri chondroitin sulfat C không được xử lý với chondroitinaza ABC. Cụ thể là, dung dịch chondroitinaza ABC trong quy trình 4) theo phương pháp được mô tả trong mục (5-4-1) của ví dụ 1 được thay thế bằng cùng lượng nước cất. Ngoại trừ thay đổi này, mẫu được xử lý với actinaza của muối natri chondroitin sulfat C được tạo thành bằng phương pháp mô tả trong mục (5-4-1) của ví dụ 1.

(1-6) Mẫu của muối natri chondroitin sulfat C không được xử lý với enzym (actinaza (-), chondroitinaza (-))

Mẫu được tạo thành bằng phương pháp giống với mục (1-4) nêu trên ngoại trừ muối natri chondroitin sulfat C không được xử lý với actinaza E và chondroitinaza ABC. Cụ thể là, muối natri chondroitin sulfat C (mẫu chuẩn tham chiếu) được sử dụng và mỗi dung dịch actinaza E (I) và dung dịch chondroitinaza ABC trong các quy trình 2) và 4) tương ứng, theo phương pháp được mô tả trong mục (5-4-1) của ví dụ 1 được

thay thế bằng cùng lượng nước cất. Ngoại trừ các thay đổi này, mẫu muối natri chondroitin sulfat C không được xử lý với enzym được tạo thành bằng phương pháp được mô tả trong mục (5-4-1) của ví dụ 1.

(2) Đánh giá bằng cách sử dụng màng xenluloza axetat

Mẫu được tạo thành trong các mục từ (1-1) đến (1-6) trong mục (1) nêu trên được phân tích bằng phương pháp đánh giá bằng cách sử dụng màng xenluloza axetat trong mục (5-1) của ví dụ 1.

Fig.6 thể hiện kết quả điện di màng.

Fig.6 là hình ảnh mẫu vạch thu được bằng cách đưa mẫu không được xử lý với enzym, mẫu được xử lý với actinaza và mẫu được xử lý với enzym của mỗi nguyên liệu thô sụn cá mập và muối natri chondroitin sulfat C đi điện di sử dụng màng xenluloza axetat. Bảng 6 thể hiện mẫu theo làn từ 1 đến 9 trong Fig.6. Mẫu được xử lý với actinaza E được ghi “+” trong cột “xử lý actinaza” và mẫu không được xử lý được ghi “-”. Mẫu được xử lý với chondroitinaza ABC được ghi “+” trong cột “xử lý chondroitinaza” và mẫu không được xử lý được ghi “-”. Lượng của mỗi mẫu được phát hiện trên màng là 5,0 µg theo làn từ 1 đến 6 và 0,8 µg theo làn từ 7 đến 9. Để tham chiếu, Fig.12 thể hiện hình ảnh giản lược của mẫu vạch được biểu diễn trong Fig.6.

Bảng 6

Làn	Nguyên liệu thô hoặc sản phẩm đối chứng axit mucopolysacarit	Xử lý actinaza	Xử lý chondroitinaza
1	Nguyên liệu thô sụn cá mập (II)	-	-
2	Nguyên liệu thô sụn cá mập (II)	+	-
3	Nguyên liệu thô sụn cá mập (II)	+	+
4	Nguyên liệu thô sụn cá mập (I)	-	-
5	Nguyên liệu thô sụn cá mập (I)	+	-

6	Nguyên liệu thô sụn cá mập (I)	+	+
7	Muối natri chondroitin sulfat C	-	-
8	Muối natri chondroitin sulfat C	+	-
9	Muối natri chondroitin sulfat C	+	+

Các làn 1, 4 và 7 trong Fig.6 là các mẫu không được xử lý với enzym. Các làn 2, 5 và 8 là các mẫu được xử lý với actinaza. Mỗi vạch trong các làn 1, 2, 4, 5 và 8 trong Fig.6 được phát hiện tại cùng vị trí so với làn 7 (mẫu chuẩn tham chiếu chứa muối natri chondroitin sulfat C). Các làn 3, 6 và 9 là các mẫu được xử lý với enzym actinaza E và chondroitinaza ABC. Vạch có nguồn gốc từ muối natri chondroitin sulfat C biến mất trong làn 3, 6 và 9. Các kết quả này thể hiện rằng chondroitin sulfat hoặc muối của nó được phân giải với chondroitinaza ABC nhưng không phân giải với actinaza E.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp phân tích axit mucopolysacarit hoặc muối của nó có trong mẫu thí nghiệm, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

thực hiện kiểm tra định tính và kiểm tra định lượng mẫu thí nghiệm chứa axit mucopolysacarit hoặc muối của nó,

kiểm tra định tính bao gồm:

bước điện di để đưa mẫu thí nghiệm đi điện di sử dụng màng;

bước nhuộm để nhuộm màng sau khi điện di với xanh Alcian; và

bước phát hiện để xác định loại axit mucopolysacarit hoặc muối của nó trong mẫu thí nghiệm từ mẫu vạch tạo thành từ bước nhuộm,

kiểm tra định lượng bao gồm:

bước định lượng đo màu để phân tích định lượng axit mucopolysacarit hoặc muối của nó trong mẫu thí nghiệm bằng phương pháp đo màu sử dụng thuốc nhuộm có thể phát hiện axit mucopolysacarit hoặc muối của nó,

trong đó axit mucopolysacarit là chondroitin sulfat,

thuốc nhuộm có thể phát hiện axit mucopolysacarit hoặc muối của nó là xanh Alcian, và

bước định lượng đo màu bao gồm bước bổ sung xanh Alcian vào mẫu thí nghiệm và đo độ hấp thụ của dung dịch của mẫu thí nghiệm.

2. Phương pháp phân tích theo điểm 1, trong đó khi một loại axit mucopolysacarit hoặc muối của nó được xác định là có trong mẫu thí nghiệm trong kiểm tra định tính, kết quả phân tích định lượng từ kiểm tra định lượng được coi là lượng axit mucopolysacarit hoặc muối của nó.

3. Phương pháp phân tích theo điểm 1 hoặc 2, trong đó màng là màng nitroxenluloza, màng xenluloza axetat, hoặc màng kết hợp của nitroxenluloza và xenluloza axetat.

4. Phương pháp phân tích theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó

màng là màng nitroxenlulaza hoặc màng xenluloza axetat.

5. Phương pháp phân tích định lượng chondroitin sulfat hoặc muối của nó có trong mẫu thí nghiệm, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

thực hiện kiểm tra định tính và kiểm tra định lượng mẫu thí nghiệm chứa chondroitin sulfat hoặc muối của nó,

kiểm tra định tính bao gồm:

bước điện di để đưa mẫu thí nghiệm đi điện di sử dụng màng;

bước nhuộm để nhuộm màng sau khi điện di với xanh Alcian; và

bước phát hiện để xác định loại axit mucopolysacarit hoặc muối của nó trong mẫu thí nghiệm từ mẫu vạch tạo thành từ bước nhuộm,

kiểm tra định lượng bao gồm:

bước định lượng đo màu để phân tích định lượng axit mucopolysacarit hoặc muối của nó trong mẫu thí nghiệm bằng phương pháp đo màu sử dụng thuốc nhuộm có thể phát hiện axit mucopolysacarit hoặc muối của nó,

trong đó thuốc nhuộm có thể phát hiện axit mucopolysacarit hoặc muối của nó là xanh Alcian, và

bước định lượng đo màu bao gồm bước bổ sung xanh Alcian vào mẫu thí nghiệm và đo độ hấp thụ của dung dịch của mẫu thí nghiệm, và

khi axit mucopolysacarit hoặc muối của nó trong mẫu thí nghiệm được xác định chỉ là chondroitin sulfat hoặc muối của nó trong kiểm tra định tính, kết quả phân tích định lượng từ kiểm tra định lượng được coi là lượng chondroitin sulfat hoặc muối của nó.

6. Phương pháp kiểm tra kiểm soát chất lượng sản phẩm chứa axit mucopolysacarit hoặc muối của nó, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

bước phân tích mẫu thí nghiệm để phân tích sản phẩm là mẫu thí nghiệm bằng phương pháp phân tích theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4;

bước phân tích mẫu đối chứng để phân tích bằng phương pháp phân tích mẫu đối chứng chứa axit mucopolysacarit hoặc muối của nó đã biết nồng độ và loại; và

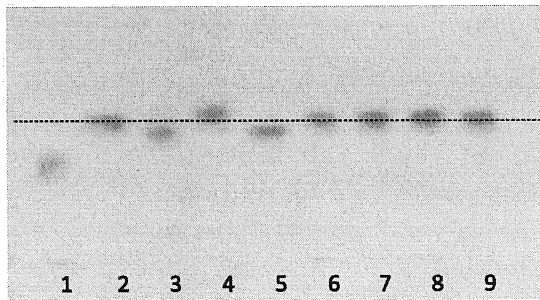
bước đánh giá để đánh giá chất lượng sản phẩm bằng cách so sánh kết quả kiểm tra định tính và kết quả kiểm tra định lượng của mẫu thí nghiệm với kết quả kiểm tra định tính và kết quả kiểm tra định lượng của mẫu đối chứng từ các bước phân tích tương ứng,

trong đó axit mucopolysacarit là chondroitin sulfat.

1/4

FIG.1

(a)



(b)

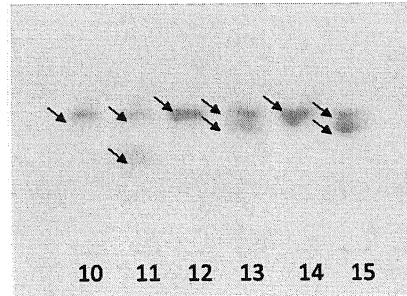
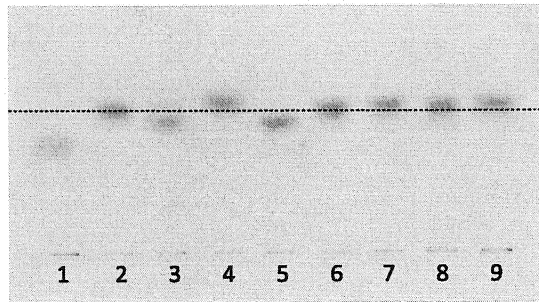


FIG.2

(a)



(b)

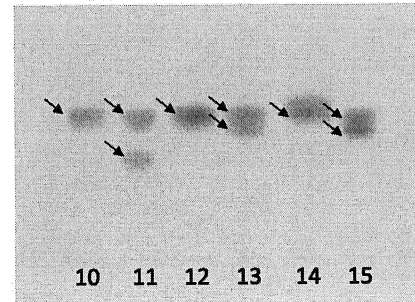
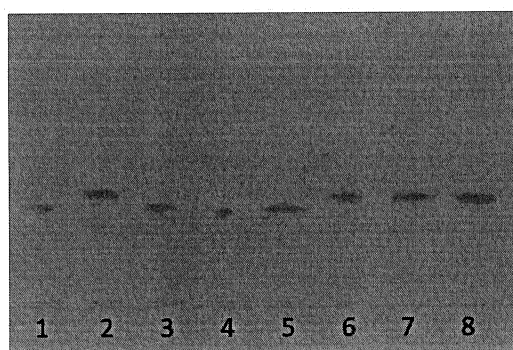
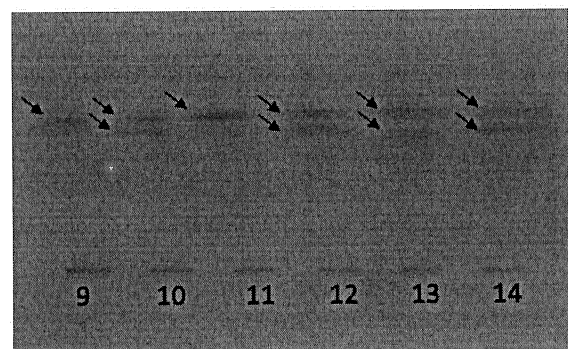


FIG.3

(a)



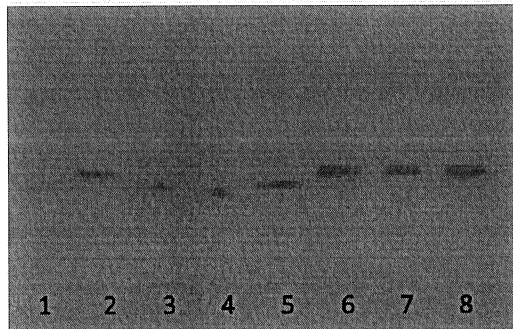
(b)



2/4

FIG.4

(a)



(b)

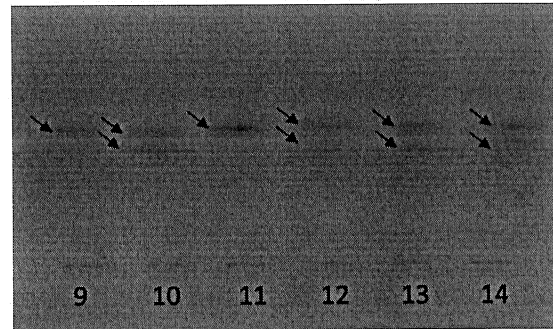
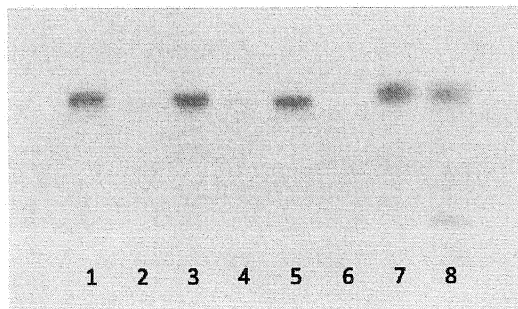


FIG.5

(a)



(b)

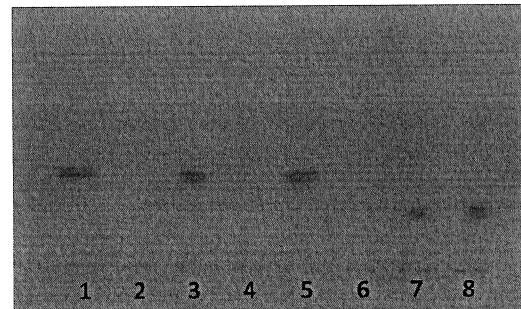
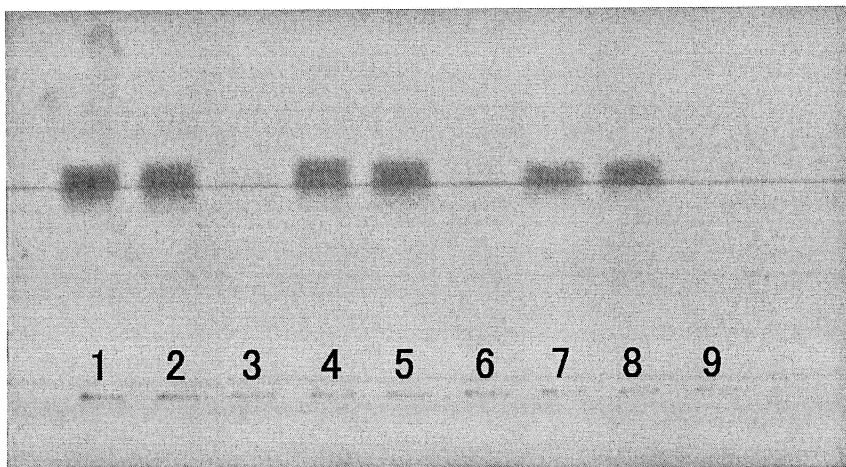


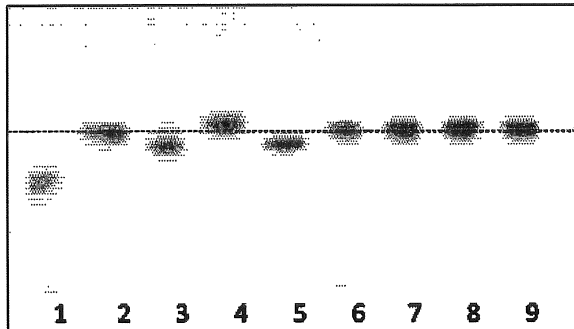
FIG.6



3/4

FIG.7

(a)



(b)

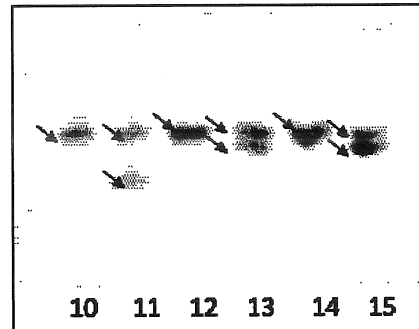
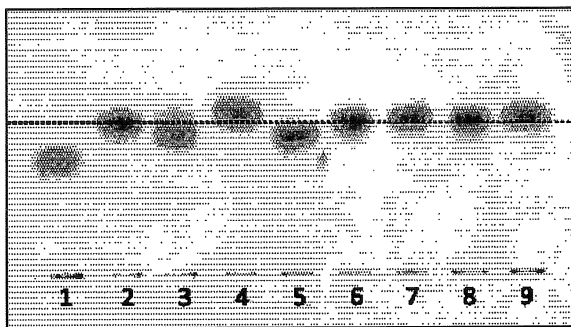


FIG.8

(a)



(b)

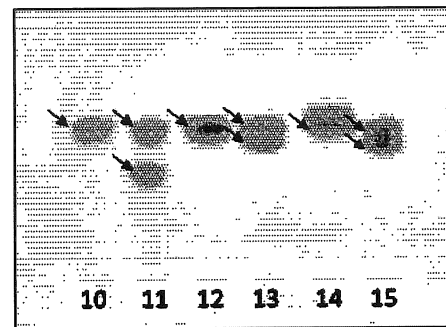
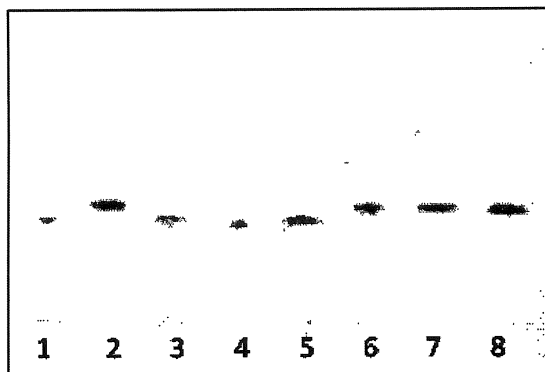
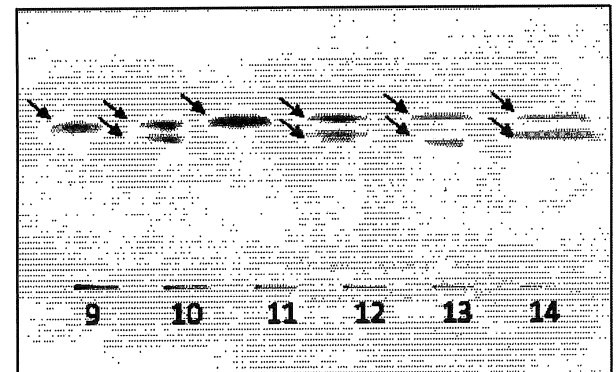


FIG.9

(a)



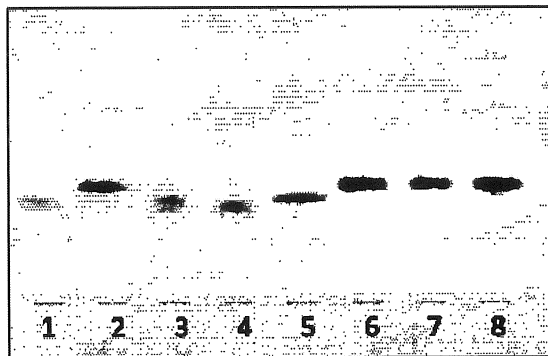
(b)



4/4

FIG.10

(a)



(b)

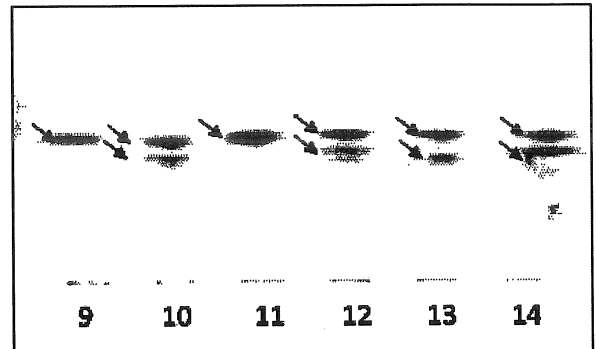
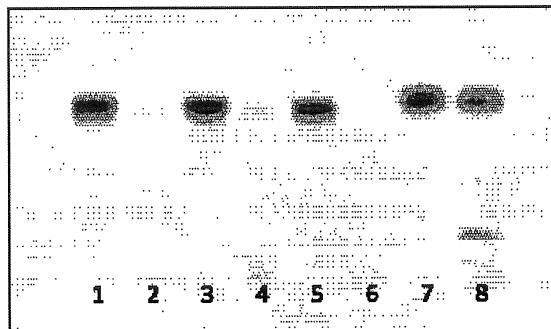


FIG.11

(a)



(b)

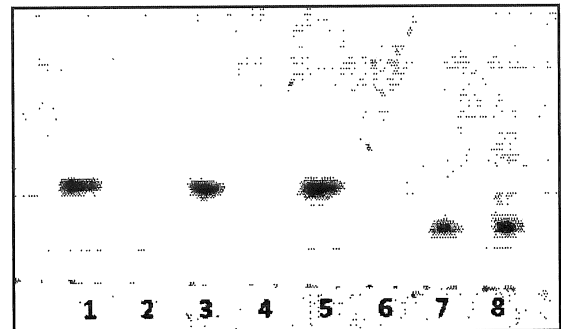


FIG.12

