



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I796560 B

(45)公告日：中華民國 112 (2023) 年 03 月 21 日

(21)申請案號：109113758

(22)申請日：中華民國 109 (2020) 年 04 月 24 日

(51)Int. Cl.：

*A61K31/704 (2006.01)**A61K38/00 (2006.01)**A61K47/14 (2006.01)**A61K47/24 (2006.01)**A61K47/26 (2006.01)**A61K47/34 (2017.01)**A61K9/10 (2006.01)**A61P3/04 (2006.01)**A61P3/10 (2006.01)**A23L2/52 (2006.01)**A23L33/10 (2016.01)*

(30)優先權：2019/04/26 日本

2019-086870

(71)申請人：日商三得利控股股份有限公司 (日本) SUNTORY HOLDINGS LIMITED (JP)
日本(72)發明人：浦井聡一郎 URAI, SOICHIRO (JP)；長尾浩二 NAGAO, KOJI (JP)；橫尾芳明
YOKOO, YOSHIAKI (JP)

(74)代理人：林志剛

(56)參考文獻：

TW 202106310

JP 1-176443

US 2015/0237901A1

審查人員：徐永任

申請專利範圍項數：16 項 圖式數：22 共 77 頁

(54)名稱

用於促進 G L P - 1 分泌之組成物

(57)摘要

期待開發更優異之 GLP-1 分泌促進成分。若依據本發明，提供一種用於促進 GLP-1 分泌之組成物，其含有：GLP-1 分泌促進成分與包含水中油型乳化劑之乳化粒子。



I796560

【發明摘要】

【中文發明名稱】

用於促進 G L P - 1 分泌之組成物

【中文】

期待開發更優異之 GLP-1 分泌促進成分。若依據本發明，提供一種用於促進 GLP-1 分泌之組成物，其含有：GLP-1 分泌促進成分與包含水中油型乳化劑之乳化粒子。

【指定代表圖】無

【代表圖之符號簡單說明】無

【特徵化學式】無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

用於促進 GLP-1 分泌之組成物

【技術領域】

【0001】本發明係關於含有 GLP-1 分泌促進成分與包含水中油型乳化劑之乳化粒子之用於促進 GLP-1 分泌之組成物等。

【先前技術】

【0002】GLP-1[類升糖素胜肽-1(Glucagon-like peptide-1)]為自消化道黏膜上皮等被分泌之激素。作為 GLP-1 的作用，已知有刺激胰島素合成或分泌、阻礙升糖素分泌、阻礙食物攝取、減低高血糖症等。藉由活化 GLP-1 之分泌，可期待此等作用的提升。

【0003】專利文獻1中，記載有苦瓜所含之11種類的葫蘆烷型三萜類作為新穎 GLP-1 分泌促進成分。又，專利文獻2中，記載甜菊苷、瑞鮑迪苷A、瑞鮑迪苷B、瑞鮑迪苷D有促進 GLP-1 分泌的性質。

[先前技術文獻]

[專利文獻]

【0004】

[專利文獻1] 國際公開第2017/159725號

[專利文獻2] 國際公開第2017/018404號

【發明內容】

[發明所欲解決之課題]

【0005】期待開發更優異之GLP-1分泌促進成分。

[解決課題之手段]

【0006】本發明之一態樣提供下述。

[1]一種用於促進GLP-1分泌之組成物，其含有：GLP-1分泌促進成分與包含水中油型乳化劑之乳化粒子。

[2]如上述[1]中記載之組成物，其中前述水中油型乳化劑之HLB值為7~18。

[3]如上述[1]或[2]中記載之組成物，其中前述水中油型乳化劑，包含選自由聚甘油脂肪酸酯、丙二醇脂肪酸酯、酵素處理卵磷脂、蔗糖脂肪酸酯及有機酸單甘油酯所成群組中之至少1種的乳化劑。

[4]如上述[1]~[3]中任一項記載之組成物，其中前述水中油型乳化劑之親水基包含磷酸基。

[5]如上述[1]~[4]中任一項記載之組成物，其中前述GLP-1分泌促進成分包含醣苷甜味料。

[6]如上述[5]中記載之組成物，其中前述醣苷甜味料，包含選自由瑞鮑迪苷A、瑞鮑迪苷B、瑞鮑迪苷C、羅漢果苷V及甜菊苷所成群組中之至少1種。

[7]如上述[1]~[4]中任一項記載之組成物，其中前述

GLP-1分泌促進成分，包含選自由單糖、雙醣、蔗糖衍生物、胺基酸、胜肽、蛋白質、糖蛋白質、脂質及脂肪酸所成群組中之至少1種。

[8]如上述[1]~[4]中任一項記載之組成物，前述GLP-1分泌促進成分，包含乳蛋白質、卵黃蛋白質、卵白蛋白質、大豆蛋白質、小麥蛋白質、豌豆蛋白質、黏蛋白、蛋白多醣或此等之加工品。

[9]如上述[1]~[8]中任一項記載之組成物，其中前述乳化粒子於核不含GLP-1分泌促進成分。

[10]如上述[1]~[9]中任一項記載之組成物，其中前述GLP-1分泌促進成分之藉由平板法測定的表面張力為40~70mN/m。

[11]如上述[1]~[10]中任一項記載之組成物，其中前述水中油型乳化劑相對於前述GLP-1分泌促進成分的比例為0.001~50質量%。

[12]如上述[1]~[11]中任一項記載之組成物，其中以0.1~5質量%之比例含有前述水中油型乳化劑。

[13]如上述[1]~[12]中任一項記載之組成物，其中以1~99.9質量%之比例含有前述GLP-1分泌促進成分。

[14]如上述[1]~[13]中任一項記載之組成物，其係用於改善糖代謝、用於抑制食慾或用於預防或改善糖尿病或肥胖症。

[15]一種用於促進GLP-1分泌之飲料，其含有如上述[1]~[14]中任一項記載之組成物。

[16]一種用於促進 GLP-1 分泌之食品，其含有如上述 [1]~[14] 中任一項記載之組成物。

[17]一種醫藥組成物，其含有如上述 [1]~[14] 中任一項記載之組成物。

[18]一種用於促進 GLP-1 分泌之組成物的製造方法，其包含：攪拌水中油型乳化劑與水性介質與油脂形成乳化粒子，調製含乳化粒子之混合物的步驟，及，混合前述含乳化粒子之混合物與包含 GLP-1 分泌促進成分及水性介質之含有 GLP-1 分泌促進成分之混合物的步驟。

[發明效果]

【0007】本發明中，藉由使組成物中存在有 GLP-1 分泌促進成分與包含水中油型乳化劑之乳化粒子，可提高 GLP-1 分泌促進成分之促進 GLP-1 分泌的效果。

【圖式簡單說明】

【0008】

[圖 1]顯示實驗例 1 中之各種甜味料的 GLP-1 分泌量之圖表。

[圖 2]顯示實驗例 2 所得之含有瑞鮑迪苷 C(以下，有時將瑞鮑迪苷簡稱為 Reb)之試料之濃度與 GLP-1 分泌量的關係之圖表。

[圖 3]顯示實驗例 3 所得之含有甜菊苷之試料之濃度與 GLP-1 分泌量的關係之圖表。

[圖 4]顯示實驗例 4 所得之含有瑞鮑迪苷 A 之試料之濃度與 GLP-1 分泌量的關係之圖表。

[圖 5]顯示實驗例 5 所得之含有 RebA 乳化物之試料之濃度與 GLP-1 分泌量的關係之圖表。

[圖 6]顯示實驗例 6 中之各種甜味料所具有的表面張力之圖表。

[圖 7]顯示實驗例 7 中之 RebA 的香味特性之圖表。

[圖 8]顯示實驗例 8~13 所得之各種試料之濃度與 GLP-1 分泌量的關係之圖表。

[圖 9]顯示實驗例 8 所得之含有 RebA 之試料之濃度與 GLP-1 分泌量的關係之圖表。

[圖 10]顯示實驗例 9 所得之含有 RebA 乳化物之試料之濃度與 GLP-1 分泌量的關係之圖表。

[圖 11]顯示實驗例 10 所得之含有乳化粒子之試料之濃度與 GLP-1 分泌量的關係之圖表。

[圖 12]顯示實驗例 11 所得之含有 RebA 之試料與含有乳化粒子之試料的混合液之濃度與 GLP-1 分泌量的關係之圖表。

[圖 13]顯示實驗例 12 所得之含有甘油之試料之濃度與 GLP-1 分泌量的關係之圖表。

[圖 14]顯示實驗例 13 所得之含有 MCT 油之試料之濃度與 GLP-1 分泌量的關係之圖表。

[圖 15]顯示實驗例 15~20 所得之各種試料之細胞毒性(死細胞為指標)之圖表。a 為自投予 2 小時後，b 為 24 小時後

之結果。

[圖 16]顯示實驗例 21~31 所得之各種試料之 GLP-1 分泌量之圖表。a 為自投予 2 小時後，b 為 24 小時後之結果。

[圖 17]顯示實驗例 32 所得之各甜菊醇醣苷之分配比率，與試驗中樣子的照片。

[圖 18]顯示實驗例 32 中，試驗後之含有 RebA 之溶液狀態的照片。

[圖 19]顯示實驗例 33 中保存溫度之對香味特性的影響之圖。

[圖 20]顯示實驗例 33 中震動環境下的穩定性之圖。

[圖 21]顯示實驗例 33 中乳化所致之甜味強度的下降程度之圖。

[圖 22]顯示實驗例 34 中 GLP-1 分泌量之圖。

【實施方式】

【0009】依據本發明者的研究可知，藉由於組成物中含有包含 RebA 等之 GLP-1 分泌促進成分與水中油型乳化劑(以下，有時僅稱為乳化劑)的乳化粒子，可實現更優異之促進 GLP-1 分泌的能力。

【0010】

<GLP-1 分泌促進成分>

所謂 GLP-1 分泌促進成分，係指具有其本身作用於人類或具有 GLP-1 分泌能力之非人類動物的細胞使 GLP-1 之分泌量增加的性質(以下，稱為促進 GLP-1 分泌的能力)之

物質或組成物的意思。

【0011】若給予GLP-1分泌細胞具有促進GLP-1分泌的能力之物質或組成物，則GLP-1分泌量變多。GLP-1分泌量的多少，可藉由與實驗例相同的方法來確認。即，準備包含被驗物質或組成物而成之樣本，與除未包含被驗物質或組成物之點以外具有相同組成的無刺激陰性對照樣本，相同條件下將兩樣本給予具有GLP-1分泌能力之源自人類結腸的細胞(例如H716)，與無刺激陰性對照樣本相比確認GLP-1分泌量之多/少。

【0012】一態樣中，本發明中使用之GLP-1分泌促進成分，為兩親媒性較佳。「兩親媒性」，係指「於分子及原子團，具有與水親和性大的部分(親水基)及親和性小的部分(疏水基)兩者」的意思(參照：數位大辭泉)。

【0013】兩親媒性之GLP-1分泌促進成分，有具有較水小的表面張力之傾向。

【0014】兩親媒性之GLP-1分泌促進成分，包含醣苷甜味料較佳。醣苷甜味料，較合適為包含具有促進GLP-1分泌的能力之甜菊醇醣苷或羅漢果苷(以下，有時將羅漢果苷簡稱為Mog)，更合適為包含鍵結瑞鮑迪苷A、瑞鮑迪苷B、甜菊萃取物、具有鼠李糖而成之結構的甜菊醇醣苷、甜菊苷及羅漢果苷V，再合適為包含瑞鮑迪苷A、瑞鮑迪苷B、瑞鮑迪苷C、甜菊苷及羅漢果苷V。

【0015】上述醣苷甜味料，較合適為具有以下任一者之表面張力 $Q(\text{mN/m})$ 。

Q=40~70、45~65、40~60、50~70、58~63、59~62、60~61、50~63、51~63、52~63、53~63、54~63、55~63、56~63、57~63、59~63、60~63、58~62、58~61、58~60

【0016】表面張力Q，係藉由平板法來測定。例如，以蔗糖換算計成為Brix10之量摻合被驗物質之醣苷甜味料，調製水溶液。藉由使用自動表面張力計(CBVP-Z型，協和界面科學公司製)之平板法來測定所調製之水溶液的表面張力。

【0017】由適用於飲食品等之觀點來看，作為具有促進GLP-1分泌的能力之醣苷甜味料，以甜菊醇醣苷較佳，瑞鮑迪苷A最適宜。

【0018】作為醣苷甜味料以外之GLP-1分泌促進成分，可舉例例如葡萄糖等之單糖類、蔗糖等之雙醣類、蔗糖素等之蔗糖衍生物等(參照：Hyeung-Jin Jang et al., “Gut-expressed gustducin and taste receptors regulate secretion of glucagon-like peptide-1” PNAS, 2007, vol. 104, no. 38, 15069-15074)。作為單糖類、雙醣類，其他，可舉例果糖；麥芽糖；乳糖；稀少糖等。單糖類、雙醣類，可以含有於高果糖液糖；果糖葡萄糖液糖；葡萄糖果糖液糖；寡糖；蜂蜜；甘蔗榨汁液(黑糖蜜)；砂糖(白糖、三溫糖、黑糖、和三盆等)；楓糖漿；糖蜜(molasses)；水飴等之狀態來使用。又，亦可舉例麩醯胺等之胺基酸、二肽、三肽等之胜肽、蛋白質、糖蛋白質、脂質、脂肪酸等(參照：Gwen Tolhurst et al., “Nutritional regulation of

glucagon-like peptide-1 secretion” J Physiol 587.1 (2009) pp 27-32)。作為蛋白質，可舉例包含酪蛋白、酪蛋白鹽或乳清蛋白質之乳蛋白質、卵黃蛋白質、卵白蛋白質、大豆蛋白質、小麥蛋白質、豌豆蛋白質或此等之加工品等。作為糖蛋白質，可舉例黏蛋白、蛋白多醣或此等之加工品等。醣苷甜味料以外之GLP-1分泌促進成分，以包含乳蛋白質、卵黃蛋白質、卵白蛋白質、大豆蛋白質、小麥蛋白質、豌豆蛋白質、黏蛋白、蛋白多醣或此等之加工品較佳。

【0019】

<乳化劑>

本發明中使用之乳化劑，為水中油型乳化劑。

【0020】水中油型乳化劑中，HLB值為7~18、9~18、11~18、13~18、15~18、7~17、7~15、7~13、7~11、7~9、9~16或11~14較佳。

【0021】本發明中，HLB值係以格里芬法算出。

【0022】本發明中，未限定，可使用已知的水中油型乳化劑。例如，作為水中油型乳化劑，在HLB值為上述任一值的條件下，可舉例單甘油酯、有機酸單甘油酯、聚甘油脂肪酸酯等之甘油脂肪酸酯；去水山梨醇脂肪酸酯；蔗糖脂肪酸酯；丙二醇脂肪酸酯；硬脂醯基乳酸鹽；聚山梨醇酯；植物卵磷脂、卵黃卵磷脂、分別卵磷脂、酵素處理卵磷脂等之卵磷脂類；皂樹皮萃取物、絲蘭泡沫萃取物(Yucca foam extract)；植物性固醇；神經鞘脂質；膽汁末；動物性固醇等。

【0023】較合適為水中油型乳化劑在HLB值為上述任一值的條件下，包含選自由聚甘油脂肪酸酯、丙二醇脂肪酸酯、酵素處理卵磷脂、蔗糖脂肪酸酯及有機酸單甘油酯所成群組中之至少1種。

【0024】或是，使用之乳化劑在HLB值為上述任一值的條件下，包含親水基為源自甜味成分的乳化劑較佳，特別是，包含選自由聚甘油脂肪酸酯及蔗糖脂肪酸酯所成群組中之至少1種的乳化劑較佳。

【0025】進而又，乳化劑在HLB值為上述任一值的條件下，包含親水基包含磷酸基之乳化劑較佳，特別是，包含卵磷脂類較佳。

【0026】本發明之組成物中，存在有GLP-1分泌促進成分，與包含水中油型乳化劑之乳化粒子。

【0027】本發明中所謂「乳化粒子」，係指源自乳化劑之分子或離子聚集做成之膠體粒子的意思。乳化劑之領域中，膠體粒子雖有時依據大小分別稱為微胞、奈米乳劑、乳劑等(參照：Toshiyuki Suzuki, J.Soc.Cosmet.Jpn., Vol.44, No.2, 2010)，但本發明中之「乳化粒子」包含此等全部。

【0028】較合適為本發明之組成物中，乳化粒子於核不含GLP-1分泌促進成分。所謂「乳化粒子於核不含GLP-1分泌促進成分」，係指至少一部分的乳化粒子於核不含GLP-1分泌促進成分，較合適為至少一部分的GLP-1分泌促進成分不被包含於乳化粒子之核或殼中呈未乳化之非乳

化狀態的意思。所謂「核」，係指乳化粒子之中心部(核)的意思。使用水中油型乳化劑時，核係乳化劑之特別是疏水基圍繞所形成。殼位於核之外側，主要是係指藉由乳化劑之自親水基到疏水基的部分所形成的區域。

【0029】

<組成物>

乳化劑相對於GLP-1分泌促進成分之比例(質量%)，較合適為0.001~50、0.005~50、0.01~50、0.05~50、0.1~50、0.4~50、0.7~50、1~50、5~50、10~50、20~50、30~50、40~50、0.001~40、0.001~30、0.001~20、0.001~10、0.001~5、0.001~1、0.001~0.5、0.001~0.1、0.005~40、0.01~30、0.05~20、0.1~10、0.4~5或0.7~1質量%。

【0030】或是，乳化劑相對於GLP-1分泌促進成分之比例(質量%)，較合適為5~200、7~200、9~200、10~200、30~200、50~200、70~200、90~200、110~200、130~200、150~200、170~200、5~180、5~160、5~140、5~120、5~100、5~80、5~60、5~40、5~30、5~20、7~180、9~160、10~140、30~120、50~100、10.0~180、10.0~160、10.0~140、10.0~120、10.0~100、10.0~80或10.0~60質量%。

【0031】較合適為本發明之組成物中之乳化劑的含有比例(質量%)，為0.1~5、0.1~4、0.1~3、0.1~2、0.1~1、0.3~5、0.5~5、0.7~5、0.9~5、1.1~5、2.1~5、3.1~5、4.1~5、0.3~4、0.5~3、0.7~2、0.9~1、0.3~5、0.5~5.0、

0.7~5.0、0.9~5.0、1~5.0、1.5~5.0、2~5.0、2.5~5.0、3~5.0、3.5~5.0、4~5.0、4.5~5.0、0.1~4、0.1~3、0.1~2、0.1~1、0.1~0.8、0.1~0.6、0.1~0.4、0.1~0.2、0.2~4.5、0.3~4.0、0.4~3.5、0.5~3.0、0.6~2.5、0.7~2.0、0.8~1.5或0.9~1.0質量%。

【0032】或是，本發明之組成物中之乳化劑的含有比例(質量%)，較合適為以質量基準計，為0.001~1、0.001~0.5、0.001~0.25、0.001~0.2、0.01~1、0.01~0.5、0.01~0.25、0.01~0.2、0.1~1、0.1~10、0.4~10、0.7~10、1~10、3~10、5~10、7~10、0.1~8、0.1~6、0.1~4、0.1~2、1~8、1~7、1~6、3~10、3~7、3~6或5~7%。

【0033】較合適為本發明之組成物中之GLP-1分泌促進成分的含有比例(質量%)，為1~99.9、5~99.9、9~99.9、10~99.9、20~99.9、30~99.9、40~99.9、50~99.9、60~99.9、70~99.9、80~99.9、1~90、1~80、1~70、1~60、1~50、1~40、1~30、1~20、1~10、5~90、5~80、5~70、5~60、5~50、5~40、5~30、5~20或5~10質量%。

【0034】較合適為本發明之組成物中之GLP-1分泌促進成分的含有比例(質量%)，為0.001~1.4、0.001~1.3、0.001~1.2、0.001~1.1、0.001~1.0、0.001~0.9、0.001~0.8、0.001~0.7、0.001~0.6、0.001~0.5、0.001~0.4、0.001~0.3、0.001~0.2、0.01~1.4、0.01~1.3、0.01~1.2、0.01~1.1、0.01~1.0、0.01~0.9、0.01~0.8、0.01~0.7、0.01~0.6、0.01~0.5、0.01~0.4、0.01~0.3或0.01~0.2質量

%。

【0035】或，較合適為以質量基準計，為1~500,000、1~400,000、1~300,000、1~200,000、1~100,000、1~80,000、1~60,000、1~40,000、1~20,000、1~10,000、1~8,000、1~6,000、1~4,000、1~2,000、1~1,000、1~500、50~500,000、100~500,000、500~500,000、1,000~500,000、1,500~500,000、3,000~500,000、4,500~500,000、6,000~500,000、7,500~500,000、9,000~500,000、10,000~500,000、50,000~500,000、100,000~500,000、200,000~500,000、300,000~500,000、400,000~500,000、50~400,000、100~300,000、500~200,000、1,000~100,000、1,500~80,000、3,000~60,000、4,500~40,000、6,000~20,000或7,500~10,000ppm。又，較合適為25~550、30~550、35~550、40~550、45~550、50~550、55~550、20~540、25~540、30~540、35~540、40~540、45~540、50~540、55~540、20~530、25~530、30~530、35~530、40~530、45~530、50~530、55~530、20~520、25~520、30~520、35~520、40~520、45~520、50~520、55~520、20~510、25~510、30~510、35~510、40~510、45~510、50~510、55~510、20~505、25~505、30~505、35~505、40~505、45~505、50~505、55~505、20~500、25~500、30~500、35~500、40~500、45~500、50~500、55~500、20~495、25~495、30~495、35~495、40~495、45~495、50~495、55~495、20~490、25~490、30~490、35~490、40~

490 、 45~490 、 50~490 或 55~490ppm 。 又 ， 較 合 適 為
 1~1500 、 1~1200 、 5~1200 、 1~1000 、 5~1000 、 10~1000 、
 1~900 、 5~900 、 10~900 、 15~900 、 20~900 、 25~900 、 30~
 900 、 35~900 、 40~900 、 45~900 、 50~900 、 55~900 、 1~800
 、 5~800 、 10~800 、 15~800 、 20~800 、 25~800 、 30~800 、
 35~800 、 40~800 、 45~800 、 50~800 、 55~800 、 1~700 、
 5~700 、 10~700 、 15~700 、 20~700 、 25~700 、 30~700 、
 35~700 、 40~700 、 45~700 、 50~700 、 55~700 、 1~600 、
 5~600 、 10~600 、 15~600 、 20~600 、 25~600 、 30~600 、
 35~600 、 40~600 、 45~600 、 50~600 、 55~600 、 1~550 、
 1~540 、 1~530 、 1~520 、 1~510 、 1~505 、 1~500 、 1~495 、
 1~490 、 5~550 、 5~540 、 5~530 、 5~520 、 5~510 、 5~505 、
 5~500 、 5~495 、 5~490 、 10~550 、 10~540 、 10~530 、
 10~520 、 10~510 、 10~505 、 10~500 、 10~495 、 10~490 、
 15~550 、 15~540 、 15~530 、 15~520 、 15~510 、 15~505 、
 15~500 、 15~495 或 15~490ppm 。

【0036】 或 ， 較 合 適 為 以 質 量 基 準 計 ， 為 10~ 500,000
 、 10~450,000 、 10~400,000 、 10~350,000 、 10~300,000 、
 10~250,000 、 10~200,000 、 10~150,000 、 10~100,000 、
 10~50,000 、 10~40,000 、 10~30,000 、 10~20,000 、
 100~500000 、 100~450,000 、 100~400,000 、 100~350,000 、
 100~300,000 、 100~250,000 、 100~200,000 、 100~150,000
 、 100~100,000 、 100~50,000 、 100~40,000 、 100~30,000 、
 100~20,000 、 1,000~500000 、 1,000~ 450,000 、 1,000~

400,000、1,000~350,000、1,000~300,000、1,000~250,000、1,000~200,000、1,000~150,000、1,000~100,000、1,000~50,000、1,000~40,000、1,000~30,000或1,000~20,000ppm。

【0037】本發明之組成物之促進GLP-1分泌的能力，相較於GLP-1分泌促進成分單體較增加。本發明之組成物的促進GLP-1分泌的能力相較於GLP-1分泌促進成分單體是否較增加，藉由下述方法確認。即，調製除僅摻合作為有效成分之GLP-1分泌促進成分之點以外與本發明之組成物相同的比較對象組成物。給予GLP-1分泌細胞本發明之組成物與比較對象組成物，測定GLP-1分泌量。給予本發明之組成物時之GLP-1分泌量較給予比較對象組成物時多的情形中，判斷促進GLP-1分泌的能力提升。較合適為促進GLP-1分泌的能力，相較於GLP-1分泌促進成分單體為增加1.05倍以上，更合適為增加1.1倍以上，特別合適為增加1.2~100倍，最合適為增加2~50倍。

【0038】本發明之組成物亦可包含GLP-1分泌促進成分及乳化劑以外之其他成分。

【0039】其他成分雖可視本發明之組成物的用途等適當地決定，但可舉例例如甜味料、賦形劑、結合劑、崩解劑、塗層劑、潤滑劑、著色劑、矯味矯臭劑、安定劑、吸收促進劑、pH調製劑、防腐劑、抗氧化劑、香料、維生素類、微量金屬成分等。

【0040】其他甜味料，亦可為GLP-1分泌促進成分以外之天然甜味料、糖醇、人工甜味料等。可舉例例如阿斯

巴甜、紐甜、阿力甜等之胜肽系甜味料；乙醯磺胺酸 K、糖精、Advantame、甜蜜素、甘味精等之合成甜味料；莫內林、仙茅甜蛋白、甜味蛋白(brazzein)、索馬甜等之植物性之蛋白質系甜味料；沙馬甜；新橘皮苷二氫查酮；赤藻糖醇、木糖醇、山梨糖醇、麥芽糖醇、甘露醇等之糖醇；等。

【0041】又，作為其他成分，適合使用不具有促進 GLP-1 分泌的能力之油脂等。該油脂，為可選擇性存在於乳化粒子之核的成分。作為油脂，以由 C6~C12 之脂肪酸構成的 MCT 油較佳。

【0042】可選擇性存在於乳化粒子之核的成分，相對於 GLP-1 分泌促進成分以 0.1~500 質量 % 之量含有較佳。

【0043】進而又，作為其他成分，使用甘油等之水性基劑較佳。

【0044】水性基劑，相對於 GLP-1 分泌促進成分以 0.4~600 質量 % 之量含有較佳。

【0045】雖詳述於後，但本發明之組成物做成飲食品時，亦可包含食品添加劑作為其他成分。作為食品添加劑，可舉例例如賦形劑(例如，小麥澱粉、玉米澱粉、纖維素、甘露醇、山梨糖醇、木糖醇、 α 化澱粉、矽酸鋁酸鎂、矽酸鈣等)、結合劑(例如， α 化澱粉、羥基丙基甲基纖維素、聚乙烷基吡咯啉酮等)、崩解劑(例如，纖維素、羥基丙基纖維素、玉米澱粉等)、流動化劑(例如，輕質無水矽酸等)、油脂(例如，大豆油、芝麻油、橄欖油、亞麻

仁油、荳胡麻油、油菜籽油、椰子油、玉米油等之植物油或源自動物、魚的油)、營養素(例如，各種礦物質、各種維生素)、香料、甜味料、矯味劑、著色料、溶劑(例如，乙醇)、鹽類、pH調節劑、緩衝劑、抗氧化劑、安定劑、凝膠化劑、增黏劑、潤滑劑、膠囊化劑、懸濁劑、塗層劑、防腐劑等。食品添加劑可單獨含有或組合2種以上含有。

【0046】作為本發明之組成物的一例，可舉例含有作為GLP-1分泌促進成分之RebA、作為水中油型乳化劑之選自由聚甘油脂肪酸酯、丙二醇脂肪酸酯、酵素處理卵磷脂、蔗糖脂肪酸酯及有機酸單甘油酯所成群組中之至少1種、作為可選擇性存在於乳化粒子之核的成分之由C6~C12之脂肪酸構成的MCT油、作為水性基劑之甘油，及作為分散介質之水性介質，特別是水者。特別是，可舉例含有作為GLP-1分泌促進成分之RebA、作為水中油型乳化劑之聚甘油脂肪酸酯、作為可選擇性存在於乳化粒子之核的成分之由C6~C12之脂肪酸構成的MCT油、作為水性基劑之甘油，及作為分散介質之水者。

【0047】進而，作為本發明之組成物的一例，可舉例含有作為GLP-1分泌促進成分之RebA、作為水中油型乳化劑之選自由聚甘油脂肪酸酯、丙二醇脂肪酸酯、酵素處理卵磷脂、蔗糖脂肪酸酯及有機酸單甘油酯所成群組中之至少1種、作為可選擇性存在於乳化粒子之核的成分之由C6~C12之脂肪酸構成的MCT油、作為水性基劑之甘油，

及作為分散介質之水性介質，特別是水，且水中油型乳化劑的含有比例為 **GLP-1** 分泌促進成分之 0.001~50 質量%，可選擇性存在於乳化粒子之核的成分的含有比例為 **GLP-1** 分泌促進成分之 0.1~500 質量%，水性基劑的含有比例為 **GLP-1** 分泌促進成分之 0.4~600 質量%者。特別是，可舉例含有作為 **GLP-1** 分泌促進成分之 **RebA**、作為水中油型乳化劑之聚甘油脂肪酸酯、作為可選擇性存在於乳化粒子之核的成分之由 **C6~C12** 之脂肪酸構成的 **MCT** 油、作為水性基劑之甘油，及作為分散介質之水，且水中油型乳化劑的含有比例為 **GLP-1** 分泌促進成分之 0.001~50 質量%，可選擇性存在於乳化粒子之核的成分的含有比例為 **GLP-1** 分泌促進成分之 0.1~500 質量%，水性基劑的含有比例為 **GLP-1** 分泌促進成分之 0.4~600 質量%者。

【0048】本發明之組成物，可為任意之形狀，例如，可為固體狀(例如，粉末狀)、凝膠狀或液狀。又，分別準備含有 **GLP-1** 分泌促進成分之組成物與含有乳化粒子之組成物，混合兩組成物來攝取、服用或投予，或亦可分別攝取、服用或投予兩組成物。

【0049】本發明之組成物，可適用於 **GLP-1** 分泌促進之用途。

【0050】例如，本發明之組成物，可使用於選自用於抑制血糖值上升、用於抑制食慾、用於抑制過度飲食、用於改善糖代謝、用於預防或治療糖尿病、用於預防或治療肥胖症、用於減低體重，及用於減低體脂肪率中之至少 1

種用途。較合適為可使用於選自用於改善糖代謝、用於抑制食慾及用於預防或改善糖尿病或肥胖症中之至少1種用途。

【0051】又，可使用在促進胃內容物排出、抑制胃酸分泌、抑制肝醣釋出、保護心肌、提升學習記憶能力、預防或治療餐後高血糖(隱性糖尿病)、預防或治療潰瘍性大腸炎等之目的。

【0052】又，可使用於用以預防或治療動脈粥樣硬化等之血管性疾病、神經退化性疾病、非酒精性肝炎、肝斑、哮喘(參照：Young-Sun Lee et al., “Anti-Inflammatory Effects of GLP-1-Based Therapies beyond Glucose Control”, Mediators of Inflammation Volume 2016, Article ID 3094642, 11 pages)。

【0053】本發明之組成物，其本身可直接使用(攝取、服用或投予)於人類或具有GLP-1分泌能力之非人類動物。

【0054】作為直接使用於人類或非人類動物時之本發明之組成物的態樣，可舉例用於抑制血糖值上升、用於抑制食慾、用於抑制過度飲食、用於改善糖代謝、用於預防或治療糖尿病、用於預防或治療肥胖症、用於減低體重、用於減低體脂肪率、用於促進胃內容物排出、用於抑制胃酸分泌、用於抑制肝醣釋出、用於保護心肌、用於提升學習記憶能力、用於預防或治療血管性疾病、用於預防或治療神經退化性疾病、用於預防或治療非酒精性肝炎、用於

預防或治療肝斑，或用於預防或治療哮喘之食品，例如麵類(蕎麥麵、烏龍麵、中華麵、泡麵等)、豆腐、糖果甜點類(糖果、口香糖、巧可力、零食點心、餅乾(biscuit)、餅乾(cookie)、軟糖等)、麵包類、水產或畜產加工食品(魚板、火腿、香腸等)、乳製品(發酵乳等)、油脂及油脂加工食品(沙拉油、天婦羅油、人造奶油、美乃滋、酥油、鮮奶油、淋醬、油脂抹醬等)、調味料(醬汁、佐醬等)、調理品或半調理品(雜炒等)、殺菌袋裝食品(咖哩、燉物、丼、粥、雜炊等)、冰品(冰淇淋、雪霜、刨冰等)、粉末食品(飲料粉、湯粉等)、經腸流質食物等。又，上述用途之食品中，所謂的健康食品之外，亦包含特定保健用食品、營養機能食品等之保健機能食品、營養補充品(營養輔助食品)、飼料。

又，可舉例用於抑制血糖值上升、用於抑制食慾、用於抑制過度飲食、用於改善糖代謝、用於預防或治療糖尿病、用於預防或治療肥胖症、用於減低體重、用於減低體脂肪率、用於促進胃內容物排出、用於抑制胃酸分泌、用於抑制肝醣釋出、用於保護心肌、用於提升學習記憶能力、用於預防或治療血管性疾病、用於預防或治療神經退化性疾病、用於預防或治療非酒精性肝炎、用於預防或治療肝斑，或用於預防或治療哮喘之飲料，例如茶飲料、清涼飲料、碳酸飲料(包含無酒精啤酒)、營養飲料、果實飲料、乳酸飲料、果汁、飲用劑、酒精飲料、加工乳、調製豆乳；等。

【0055】將本發明之組成物製劑化使用時，作為劑型，可舉例例如錠劑、散劑、細粒劑、顆粒劑、乾式糖漿劑、被覆錠劑、口腔內崩解錠、咀嚼錠、膠囊劑、軟膠囊劑、糖漿劑、經腸營養劑等。

【0056】

<製造方法>

本發明之組成物，藉由視其用途、組成等之已知的方法來製造。

【0057】較合適為經過攪拌乳化劑與水性介質與油脂形成乳化粒子，調製含乳化粒子之混合物的步驟，及，混合前述含乳化粒子之混合物與包含GLP-1分泌促進成分及水性介質之含有GLP-1分泌促進成分之混合物的步驟來製造。此時，攪拌係定為使用均質混合器等之高速攪拌較佳。又，混合係以GLP-1分泌促進成分布進入乳化粒子之核的方式，以較用以形成乳化粒子的攪拌更溫和的條件進行較佳。進而，亦可另外設置混合GLP-1分泌促進成分與水性介質調製含有GLP-1分泌促進成分之混合物的步驟。

【0058】高速攪拌時，攪拌速度較合適為5,000~10,000、5,000~8,000或8,000~10,000rpm。

【0059】因此，本發明之一觀點，係關於一種用於促進GLP-1分泌之組成物的製造方法，其包含：攪拌水中油型之乳化劑與水性介質與油脂形成乳化粒子，調製含乳化粒子之混合物的步驟，及，混合前述含乳化粒子之混合物與包含GLP-1分泌促進成分及水性介質之含有GLP-1分泌

促進成分之混合物的步驟，及，關於一種藉由前述方法製造之用於促進 GLP-1 分泌之組成物。該方法所製造之用於促進 GLP-1 分泌之組成物中，有乳化粒子於核不含 GLP-1 分泌促進成分之傾向。

【0060】

<應用>

本發明之組成物，亦可在被含在飲料、食品、醫藥組成物等之狀態下，藉由經口、經鼻、經腸等之路徑或經管的路徑來使用。

【0061】本發明之組成物添加於飲食品(或使其含有)使用時，飲食品之種類並無特別限定。作為食品，可舉例例如麵類(蕎麥麵、烏龍麵、中華麵、泡麵等)、豆腐、糖果甜點類(糖果、口香糖、巧可力、零食點心、餅乾(biscuit)、餅乾(cookie)、軟糖等)、麵包類、水產或畜產加工食品(魚板、火腿、香腸等)、乳製品(發酵乳等)、油脂及油脂加工食品(沙拉油、天婦羅油、人造奶油、美乃滋、酥油、鮮奶油、淋醬、油脂抹醬等)、調味料(醬汁、佐醬等)、調理品或半調理品(雜炒等)、殺菌袋裝食品(咖哩、燉物、丼、粥、雜炊等)、冰品(冰淇淋、雪霜、刨冰等)、粉末食品(飲料粉、湯粉等)、經腸流質食物等。又，所謂的健康食品之外，亦包含特定保健用食品、營養機能食品等之保健機能食品、營養補充品(營養輔助食品)、飼料等。

作為飲料，可舉例例如茶飲料、清涼飲料、碳酸飲料

(包含無酒精啤酒)、營養飲料、果實飲料、乳酸飲料、果汁、飲用劑、酒精飲料、加工乳、調製豆乳等。

【0062】飲食品，只要包含本發明之組成物，亦可包含其他成分。此時作為其他成分之例，可舉例與<組成物>之項目中所示之其他成分的例子相同者。

【0063】本發明中，GLP-1分泌促進成分之攝取量(服用量、投予量)並無特別限定，可視年齡、體重、健康狀態等適當地選擇。

【0064】本發明，可使用或適用於治療的用途(醫療用途)或非治療用途之任一者。具體而言，不論是否被分類成醫藥品、準醫藥品、化妝品等，可使用或適用作為明示或暗示性訴求促進GLP-1之分泌的機能或起因於GLP-1之分泌促進的機能之任何組成物或飲食品。又，使用本發明之製品中，亦可標示促進GLP-1之分泌的機能或起因於GLP-1之分泌促進的機能。作為如此之標示雖無特別限定，但可舉例GLP-1之分泌促進機能，或起因於GLP-1之分泌促進的機能，例如，抑制血糖值上升機能、抑制食欲機能、抑制過度飲食機能、改善糖代謝機能、預防或治療糖尿病機能、預防或治療肥胖症機能、減低體重機能、減低體脂肪率機能、促進胃內容排出機能、抑制胃酸分泌機能、抑制肝醣釋出機能、保護心肌機能、提升學習記憶能力機能、預防或治療血管性疾病機能、預防或治療神經退化性疾病的機能、預防或治療非酒精性肝炎機能、預防或治療肝斑機能、預防或治療哮喘機能，或是可視同為此等

之標示等。

【0065】本發明之組成物之使用的時間點，並無特別限定，例如，可為餐前、餐中、餐間、餐後，睡前等。

【0066】本發明之一觀點，係關於一種組成物，其含有：GLP-1分泌促進成分與包含水中油型乳化劑之乳化粒子，使用於藉由促進GLP-1分泌可改善之疾病的處置。又，本發明之一觀點，係關於在對象中促進GLP-1之分泌，或，處置在對象中藉由促進GLP-1之分泌可改善之疾病的方法，其係包含將含有：GLP-1分泌促進成分與包含水中油型乳化劑之乳化粒子組成物投予至需要其之對象。進而又，本發明之一觀點，係關於一種GLP-1分泌促進成分及包含水中油型乳化劑之乳化粒子之於製造用以治療藉由促進GLP-1分泌可改善之疾病之醫藥的使用。此外，上述各觀點，亦可具有本說明書中記載的各種特徵。

【0067】疾病，包含高血糖症、過度飲食症、胃酸過多症、糖尿病、肥胖症、血管性疾病、神經退化性疾病、非酒精性肝炎、肝斑、哮喘等。

本說明書中，用語「對象」係指具有GLP-1分泌能力之任意的生物個體，較佳為動物，進而佳為哺乳動物，進而佳為人類之個體。雖對象可為健康正常者(例如，不具特定之或任意之疾病)，亦可為罹患某些疾病者，但企圖用於藉由促進GLP-1之分泌可改善之疾病的處置等時，係指典型地罹患該疾病，或具有罹患風險的對象。

本說明書中，用語「處置」，係定為包含以疾病之治

癒、一時性緩解或預防等為目的之醫學上容許之所有種類的預防的及/或治療的介入者。例如，「處置」包含包括疾病之進行延遲或停止、病變之退縮或消失、預防該疾病發病或防止復發等之各種目的之醫學上容許的介入。因此，本發明之組成物可使用於疾病之治療及/或預防。

【0068】又，本發明之一觀點，係關於一種增加 GLP-1 分泌促進成分之促進 GLP-1 分泌的能力的方法，其包含將 GLP-1 分泌促進成分與包含水中油型乳化劑之乳化粒子組合使用。

[實施例]

【0069】以下藉由實施例進一步具體說明本發明。此外，實驗例 14 為缺號。

<實驗例 1>

探討 RebA、RebB、RebM、RebN、RebD、RebC、MogV 及甜菊苷是否具有促進 GLP-1 分泌的效果。具體而言，藉由以下之程序，測定 GLP-1 分泌量，將較對照組之 no sample 分泌量多者判定為有促進 GLP-1 分泌的效果。

【0070】

(各被驗物質之調整)

使用 PBS(Thermo Fisher Scientific)(Cat. No. 14190250)溶解各被驗物質(B, C, D, E, F, G, I, J)，得到儲備原液。儲備原液之濃度表示如下。

B(RebA)；5mM,C (RebB)；1M,D(RebM)；2.5mM,
E(RebN)；1M,F(RebD)；2.5mM,G (RebC)；2.5mM,
I(MogV)；1M,J(甜菊苷)；1M

【0071】

(GLP-1之定量)

將 H716(ATCC)(Cat.No.ATCC(註冊商標)CCL-251)以
RPMI 1640(10%FBS(Thermo Fisher Scientific)(Cat.
No.10439024), 1mM Sodium Pyruvate)，於37℃、5%CO₂之
培養箱中培養。

進行前培養2週，充分喚醒細胞後，製作細胞的原
液。

於96孔盤中每1孔以 2×10^5 cells/90 μ L (high)播種細胞
(N=4)。此時將培養基所含之FBS降至0.5%，抑制細胞的
增殖。

24小時後，各加入10 μ L之最高濃度的樣本(即，儲備
原液)。

進而24小時後進行GLP-1之定量。具體的程序依照
PerkinElmer公司提供之Human GLP-1(7-36 amide)
Immunoassay kit(Cat.No.AL359)(Lot number 2361115)使用
者指南。此外，使用PBS作為陰性對照組(no sample)。

【0072】結果表示於圖1。依據圖1，GLP-1分泌量顯
著地較no sample多者，為RebA、RebB、RebC、MogV、
甜菊苷。

【0073】

<實驗例 2>

相對於 RebC 20mg，加入 21 μ L 之 DMSO(富士軟片和光純藥公司製，型號：037-24053)後，藉由試管震盪器攪拌，靜置數小時得到 RebC 濃度 1,000mM 之儲備原液。使用所得之儲備原液與 PBS，製作 10mM 溶液。

使用含有 1%DMSO 之 PBS 視需要稀釋 10mM 溶液，得到試料 G-1mM~試料 G-10mM。表 1 中記載 RebC 之濃度。

【0074】

<實驗例 3>

相對於甜菊苷 15mg，加入 12.4 μ L 之 DMSO(富士軟片和光純藥公司製，型號：037-24053)後，藉由試管震盪器攪拌，得到甜菊苷濃度 150mM 之儲備原液。使用所得之儲備原液與 PBS，製作 15mM 溶液。

使用含有 1%DMSO 之 PBS 視需要稀釋 15mM 溶液，得到試料 J-0.1mM~試料 J-15mM。表 1 中記載甜菊苷之濃度。

【0075】

<實驗例 4>

相對於 RebA 20mg，加入 8.27 μ L 之 DMSO(富士軟片和光純藥公司製，型號：037-24053)後，加入 74.5 μ L 之 PBS 藉由試管震盪器攪拌，獲得 RebA 濃度 250mM 之儲備原液。使用所得之儲備原液與 PBS，製作 25mM 溶液。

使用含有 1%DMSO 之 PBS 視需要稀釋 25mM 溶液，獲得試料 B-1mM~試料 B-25mM。表 1 中記載 RebA 之濃度。

【0076】

<實驗例 5>

混合甘油490g、RebA 100g及聚甘油脂肪酸酯10g，於70℃升溫溶解做成水系混合溶液。於此水系混合溶液中添加MCT油300g作為油脂，利用均質混合器(特殊機化工業製)以旋轉數8000rpm進行乳化。攪拌結束後冷卻至40℃，加入水100g，得到RebA加工液。

相對於所得之RebA加工液241.8 μ L，加入10 μ L之DMSO(富士軟片和光純藥公司製，型號：037-24053)及748.2 μ L之PBS藉由試管震盪器攪拌，得到RebA濃度25mM之儲備原液。

使用含有1%DMSO之PBS視需要稀釋儲備原液，得到試料B加工-0.25mM~試料B加工-25mM。表1中記載RebA之濃度。

【0077】

<GLP-1分泌量之測定>

表1所示條件下，將實驗例2~5所得之試料添加至培養基中，以所得之培養基培養細胞，測定2小時後之GLP-1分泌量。具體的程序如下。

將H716(源自人類結腸的細胞)以RPMI 1640(Thermo Fisher Scientific製，型號：61870-036)(10%FBS(Hyclone製，型號：SH30396.03)，1mM Sodium Pyruvate)，於37℃、5%CO₂之培養箱中培養。

進行前培養2週，充分喚醒細胞後，製作細胞的原液。

於 96 孔盤中每 1 孔以 2×10^5 cells/90 μ L 播種細胞。此時將培養基所含之 FBS 降至 0.5%，抑制細胞的增殖。

24 小時後，各試料各加入 10 μ L (試料 B 為 $n=3 \sim 4$ ，試料 B 加工、試料 G、試料 J 為 $n=4$)。培養基中之最終濃度，表示於表 1 之「樣本 F.C.(mM)」之欄中。

自添加經過指定時間(2 小時)後，回收 96 孔盤。

將回收之 96 孔盤以 300g 離心 5 分鐘，回收上清液。

使用 Human GLP-1(7-36amide) Immunoassay kit(PerkinElmer 公司製，型號：AL359C)定量回收之上清液中的 GLP-1，結果表示於圖 2~5。圖 2~5 中，亦記載作為無刺激性對照組(陰性對照)之含有 1%DMSO 之溶液的 GLP-1 分泌量，與作為陽性對照組之 PMA(富士軟片和光純藥公司製，型號：162-23591)之水系溶液的 GLP-1 分泌量。PMA 之水系溶液，係藉由相對於 PMA 1mg 加入 16.21 μ L 之 DMSO 調製儲備原液，並於該儲備原液中添加 PBS 製作 1mM 溶液，以含有 1%DMSO 之 PBS 稀釋此溶液而得。

【0078】以下顯示表 1。表 1 中之陽性對照亦稱為陽性對照組。陰性對照亦稱為陰性對照組。

[表1]

	#	試料	添加濃度 (mM)	ppm換算	添加量 (μL)	培養基 (μL)	總計 (μL)	樣本F.C. (mM)	ppm換算
無刺激 陰性對照	1	含有1% DMSO之PBS	—	—	10	90	100	—	—
陽性對照	2	PMA	0.01	6.2	10	90	100	0.001	0.6
	3	1%DMSO	1	616.8	10	90	100	0.1	61.7
被驗物質	4	B 1%DMSO	1	967.0	10	90	100	0.1	96.7
	5		2.5	2417.5	10	90	100	0.25	241.8
	6		5	4835.1	10	90	100	0.5	483.5
	7		10	9670.1	10	90	100	1	967.0
	8		15	14505.2	10	90	100	1.5	1450.5
	9		20	19340.2	10	90	100	2	1934.0
	10		25	24175.3	10	90	100	2.5	2417.5
	11		0.25	241.8	10	90	100	0.025	24.2
	12	B加工 1%DMSO	0.5	483.5	10	90	100	0.05	48.4
	13		1	967.0	10	90	100	0.1	96.7
	14		2.5	2417.5	10	90	100	0.25	241.8
	15		5	4835.0	10	90	100	0.5	483.5
	16		10	9670.0	10	90	100	1	967.0
	17		15	14505.0	10	90	100	1.5	1450.5
	18		20	19340.0	10	90	100	2	1934.0
	19		25	24175.0	10	90	100	2.5	2417.5
	20	G 1%DMSO	1	951.01	10	90	100	0.1	95.1
	21		2.5	2377.5	10	90	100	0.25	237.8
	22		5	4755.1	10	90	100	0.5	475.5
	23		10	9510.1	10	90	100	1	951.0
	25	J 1%DMSO	0.1	80.5	10	90	100	0.01	8.0
	26		1	804.9	10	90	100	0.1	80.5
	27		2.5	2012.2	10	90	100	0.25	201.2
	28		5	4024.4	10	90	100	0.5	402.4
	29		10	8048.7	10	90	100	1	804.9
	30		15	12073.1	10	90	100	1.5	1207.3

- 關於試料B加工，將最終濃度0.025 mM (#11)及0.05 mM (#12)追加至試驗預定濃度(0.1~2.5 mM)中。
- 關於試料G，由於最終濃度成為1.5 mM (#24)無法溶解，故以最終濃度1 mM 以下進行評估。

【 0079 】

<實驗例 6：表面張力之測定>

為了調查促進 GLP-1分泌的效果與乳化劑之表面張力之間是否有相關關係，以下述程序進行了實驗。

調製分別摻合 RebA、RebD及RebM(市售品)之水溶液。RebA、RebD及RebM之摻合量，以蔗糖換算統整為 Brix10。即，做成 RebA 333ppm、RebD 351ppm、RebM 351ppm。藉由使用自動表面張力計(CBVP-Z型，協和界面科學股份有限公司製)之平板法測定所得水溶液之表面張

力。將水作為對照，同樣地進行試驗。結果表示於圖6。

【0080】

<實驗例7：香味特性之評估>

藉由下述程序評估 RebA 之乳化組成物之香味特性。

將 RebA 溶解於純水中，製作 100ppm 及 300ppm 之水溶液，作為對照組。接著將實驗例5製作之 RebA 加工液添加至純水中，同樣地製作 100ppm 及 300ppm 之水溶液。由訓練有素的官能檢查員7人，將對照組定為3分，以0.5分為間隔實施添加 RebA 加工液之水溶液的香味評估，以平均值表示於圖。此外，香味評估，係以甜味強度、甜味後韻、苦味強度進行評估。

結果表示於圖7。

【0081】

<實驗例8>

相對於 RebA 20mg，加入 8.27 μ L 之 DMSO(富士軟片和光純藥公司製，型號：037-24053)後，加入 74.43 μ L 之 PBS 藉由試管震盪器攪拌，獲得 RebA 濃度 250mM 之儲備原液。使用所得之儲備原液與 PBS，製作 50mM 溶液。

使用含有 1%DMSO 之 PBS 稀釋 50mM 溶液，得到試料 B-1mM~試料 B-25mM。表2中記載 RebA 之濃度。

【0082】

<實驗例9>

混合甘油 490g、RebA 100g 及聚甘油脂肪酸酯 10g，於 70℃ 升溫溶解做成水系混合溶液。於此水系混合溶液中添

加 MCT 油 300g 作為油脂，利用均質混合器(特殊機化工業製)以旋轉數 8000rpm 進行乳化。攪拌結束後冷卻至 40℃，加入水 100g，得到 RebA 加工液。

相對於所得之 RebA 加工液 241.8 μ L，加入 10 μ L 之 DMSO(富士軟片和光純藥公司製，型號：037-24053)及 748.2 μ L 之 PBS 藉由試管震盪器攪拌，得到 RebA 濃度 25mM 之儲備原液。

使用含有 1%DMSO 之 PBS 視需要稀釋儲備原液，得到試料 B 加工 -1mM~試料 B 加工 -25mM。表 2 中記載 RebA 之濃度。

【0083】

<實驗例 10>

除不使用 RebA 100g，使用甘油 490g、聚甘油脂肪酸酯 10g、MCT 油 300g 及水 200g 之點以外，與實驗例 9 之 RebA 加工液之調整同樣的進行，得到 C 溶液。

相對於所得之 C 溶液 483.5 μ L，加入 DMSO(富士軟片和光純藥公司製，型號：037-24053)10 μ L 及 PBS 506.5 μ L 藉由試管震盪器攪拌，得到 RebA 相當濃度 50mM 之儲備原液。

使用含有 1%DMSO 之 PBS 稀釋所得之儲備原液，得到試料 C-1mM~試料 C-25mM。表 2 中記載了 RebA 相當濃度。所謂 RebA 相當濃度，係指某試料 C 中之甘油、聚甘油脂肪酸酯及 MCT 油之濃度與實驗例 9 之某試料 B 加工中之甘油、聚甘油脂肪酸酯及 MCT 油之濃度相同時之該試料 B 加工中

的 RebA 之濃度的意思。

【0084】

<實驗例 11>

與實驗例 8 同樣地進行，得到包含試料 B+C 之 2 倍濃度之 RebA 的試料 B。即，得到試料 B-2mM、試料 B-5mM、試料 B-10mM、試料 B-20mM、試料 B-30mM、試料 B-40mM、試料 B-50mM。連字符後之濃度，表示 RebA 之濃度。

與實驗例 10 同樣地進行，得到包含試料 B+C 之 2 倍濃度之聚甘油脂肪酸酯等的試料 C。即，得到試料 C-2mM、試料 C-5mM、試料 C-10mM、試料 C-20mM、試料 C-30mM、試料 C-40mM、試料 C-50mM。連字符後之濃度，表示 RebA 相當濃度。

將相同濃度之試料 B 與試料 C (例如試料 B-2mM 與試料 C-2mM) 等量混溶，得到試料 B+C-1mM~試料 B+C-25mM。表 2 中記載了 RebA 之濃度。

【0085】

<實驗例 12>

相對於甘油 118.5 μ L，加入 10 μ L 之 DMSO (富士軟片和光純藥公司製，型號：037-24053) 及 871.5 μ L 之 PBS 藉由試管震盪器攪拌，得到 RebA 相當濃度 25mM 之儲備原液。

使用含有 1% DMSO 之 PBS 視需要稀釋所得之儲備原液，得到試料 D-1mM~試料 D-25mM。表 2 中記載了 RebA 相當濃度。所謂 RebA 相當濃度，係指某試料 D 中之甘油濃度，與實驗例 9 之某試料 B 加工中之甘油濃度相同時之該試

料B加工中的RebA之濃度的意思。

【0086】

<實驗例13>

相對於MCT油72.5 μ L，加入10 μ L之DMSO(富士軟片和光純藥公司製，型號：037-24053)及917.5 μ L之PBS藉由試管震盪器攪拌，得到RebA相當濃度25mM之儲備原液。

使用含有1%DMSO之PBS視需要稀釋所得之儲備原液，得到試料E-1mM~試料E-25mM。表2中記載了RebA相當濃度。所謂RebA相當濃度，係指某試料E中之MCT油之濃度，與實驗例9之某試料B加工中之MCT油濃度相同時之該試料B加工中的RebA之濃度的意思。

【0087】

<GLP-1分泌量之測定>

在表2所示條件下，將上述實驗例8~13所得之試料添加至培養基，以所得之培養基培養細胞，測定2小時後之GLP-1分泌量。具體的程序如下。

將H716(源自人類結腸的細胞)以RPMI 1640(Thermo Fisher Scientific公司製，型號：61870-036)(10%FBS(Hyclone製，型號：SH30396.03), 1mM Sodium Pyruvate)，於37℃、5%CO₂之培養箱中培養。

進行前培養2週，充分喚醒細胞後，製作細胞的原液。

於96孔盤中每1孔以 2×10^5 cells/90 μ L播種細胞。將此時培養基所含之FBS(Hyclone公司製，型號：

SH30396.03)降至0.5%，抑制細胞的增殖。

24小時後，各試料各加入10 μ L(n=3~4)。培養基中之最終濃度，顯示於表2之「樣本F.C.」之欄。

自添加經過指定時間(2小時)後，回收96孔盤。

將回收之96孔盤以300g離心5分鐘，回收上清液。

使用PerkinElmer公司製Human GLP-1(7-36amide) Immunoassay kit，定量經回收之上清液中的GLP-1。此時，校正曲線之標準的範圍為30~100,000pg/mL，由於有大於100,000pg/mL之值為錯誤者，故將認為100,000pg/mL以上之值作為100,000pg/mL算出。

藉由史密諾夫-格拉布斯(Smirnov-Grubbs)檢定將離群值($p<0.01$)除外。

結果表示於圖8。圖8中，亦揭示作為無刺激性對照組之含有1%DMSO之溶液的GLP-1分泌量，與作為陽性對照組之PMA(富士軟片和光純藥公司製，型號：162-23591)之水系溶液的GLP-1分泌量。PMA之水系溶液，係藉由相對於PMA 1mg加入16.21 μ L之DMSO調製儲備原液，並於該儲備原液中添加PBS製作1mM溶液，以含有1%DMSO之PBS稀釋此溶液而得。

【0088】接著，為了確認，其他盤亦進行GLP-1分泌量之測定。具體而言，使用與圖8相同之培養上清液，將試料B~D以1個測定盤，試料E以另1個測定盤進行GLP-1量之測定。2小時後之培養上清液以同一測定盤測定的結果表示於圖9~14。使用之各試料之濃度記載於圖9~14中。此

外，圖 11、13、14 記載之 C、D、E 之濃度，為 RebA 相當濃度。

雖校正曲線之範圍為 30~100,000pg/mL，但由於此次有大於 100,000pg/mL 之值為錯誤之數值，故關於大於 100,000pg/mL 之值作為理論值算出。

【0089】以下顯示表 2。表 2 中之陽性對照，亦稱為陽性對照組。陰性對照，亦稱為陰性對照組。

[表2]

	#		添加濃度		ppm換算	添加量(μL)	PBS	培養基(μL)	總計(μL)	樣本F.C.		ppm換算
無刺激 陰性對照	1	含有1% DMSO之溶液	-		-	10	0	90	100	-		-
陽性對照	2	PMA	0.01	mM	-	10	0	90	100	0.001	mM	-
	3	1%DMSO	1	mM	-	10	0	90	100	0.1	mM	-
被驗物質	4	B 1%DMSO	1	mM	10.0	10	0	90	100	0.10	mM	1.0
	5		2.5	mM	25.0	10	0	90	100	0.25	mM	2.5
	6		5	mM	50.0	10	0	90	100	0.50	mM	5.0
	7		10	mM	100.0	10	0	90	100	1.00	mM	10.0
	8		15	mM	150.0	10	0	90	100	1.50	mM	15.0
	9		20	mM	200.0	10	0	90	100	2.00	mM	20.0
	10		25	mM	250.0	10	0	90	100	2.50	mM	25.0
	11		1	mM	10.0	10	0	90	100	0.10	mM	1.0
	12	B加工 1%DMSO	2.5	mM	25.0	10	0	90	100	0.25	mM	2.5
	13		5	mM	50.0	10	0	90	100	0.50	mM	5.0
	14		10	mM	100.0	10	0	90	100	1.00	mM	10.0
	15		15	mM	150.0	10	0	90	100	1.50	mM	15.0
	16		20	mM	200.0	10	0	90	100	2.00	mM	20.0
	17		25	mM	250.0	10	0	90	100	2.50	mM	25.0
	18	C 1% DMSO	1	mM	-	10	0	90	100	0.10	mM	-
	19		2.5	mM	-	10	0	90	100	0.25	mM	-
	20		5	mM	-	10	0	90	100	0.50	mM	-
	21		10	mM	-	10	0	90	100	1.00	mM	-
	22		15	mM	-	10	0	90	100	1.50	mM	-
	23		20	mM	-	10	0	90	100	2.00	mM	-
	24		25	mM	-	10	0	90	100	2.50	mM	-
	25	B+C 1% DMSO	1	mM	10.0	10	0	90	100	0.10	mM	1.0
	26		2.5	mM	25.0	10	0	90	100	0.25	mM	2.5
	27		5	mM	50.0	10	0	90	100	0.50	mM	5.0
	28		10	mM	100.0	10	0	90	100	1.00	mM	10.0
	29		15	mM	150.0	10	0	90	100	1.50	mM	15.0
	30		20	mM	200.0	10	0	90	100	2.00	mM	20.0
	31		25	mM	250.0	10	0	90	100	2.50	mM	25.0
	32	D 1% DMSO	1	mM	-	10	0	90	100	0.10	mM	-
	33		2.5	mM	-	10	0	90	100	0.25	mM	-
	34		5	mM	-	10	0	90	100	0.50	mM	-
	35		10	mM	-	10	0	90	100	1.00	mM	-
	36		15	mM	-	10	0	90	100	1.50	mM	-
	37		20	mM	-	10	0	90	100	2.00	mM	-
	38		25	mM	-	10	0	90	100	2.50	mM	-
	39	E 1% DMSO	1	mM	-	10	0	90	100	0.10	mM	-
	40		2.5	mM	-	10	0	90	100	0.25	mM	-
	41		5	mM	-	10	0	90	100	0.50	mM	-
	42		10	mM	-	10	0	90	100	1.00	mM	-
	43		15	mM	-	10	0	90	100	1.50	mM	-
	44		20	mM	-	10	0	90	100	2.00	mM	-
	45		25	mM	-	10	0	90	100	2.50	mM	-

【 0090】

<實驗例 15>

相對於 RebA 36.3mg，加入 9.4μL 之 DMSO(富士軟片和光純藥公司製，型號：037-24053)後，加入 929.0μL 之 PBS 藉由試管震盪器攪拌，得到 RebA 濃度 40mM 之儲備原液。

使用含有 1%DMSO 之 PBS 稀釋所得之儲備原液與 PBS，得到試料 B-0.31mM~試料 B-20mM。表 3 中記載了 RebA 之

濃度。

【0091】

<實驗例 16>

混合甘油490g、RebA 100g及聚甘油脂肪酸酯10g，於70℃升溫溶解做成水系混合溶液。於此水系混合溶液中添加MCT油300g作為油脂，利用均質混合器(特殊機化工業製)以旋轉數8000rpm進行乳化。攪拌結束後冷卻至40℃，加入水100g，得到RebA加工液。

相對於所得之RebA加工液193.4 μ L，加入10 μ L之DMSO(富士軟片和光純藥公司製，型號：037-24053)及796.6 μ L之PBS藉由試管震盪器攪拌，得到RebA濃度20mM之儲備原液。

使用含有1%DMSO之PBS視需要稀釋儲備原液，得到試料B加工-0.31mM~試料B加工-20mM。表3中記載了RebA之濃度。

【0092】

<實驗例 17>

除不使用RebA 100g，使用甘油490g、聚甘油脂肪酸酯10g、MCT油300g及水200g之點以外，與實驗例16之RebA加工液之調整同樣地進行得到C溶液。

相對於C溶液386.8 μ L，加入10 μ L之DMSO(富士軟片和光純藥公司製，型號：037-24053)及603.2 μ L之PBS藉由試管震盪器攪拌，得到RebA相當濃度40mM之儲備原液。

使用含有1%DMSO之PBS稀釋儲備原液，得到試料C-

0.31mM~試料C-20mM。表3中記載了RebA相當濃度。所謂RebA相當濃度，係指某試料C中之聚甘油脂肪酸酯之濃度，與實驗例16之某試料B加工中之聚甘油脂肪酸酯濃度相同時之該試料B加工中的RebA之濃度的意思。

【0093】

<實驗例18>

與實驗例15同樣地進行，得到包含試料B+C之2倍濃度之RebA的試料B。即，得到試料B-0.62mM、試料B-2.5mM、試料B-10mM、試料B-40mM。連字符後之濃度，表示RebA之濃度。

與實驗例17同樣地進行，得到包含試料B+C之2倍濃度之聚甘油脂肪酸酯的試料C。即，得到試料C-0.62mM、試料C-2.5mM、試料C-10mM、試料C-40mM。連字符後之濃度，表示RebA相當濃度。

將相同濃度之試料B與試料C(例如試料B-0.62mM與試料C-0.62mM)等量混溶，得到試料B+C-0.31mM~試料B+C-20mM。表3中記載了RebA之濃度。

【0094】

<實驗例19>

相對於甘油94.8 μ L，加入10 μ L之DMSO(富士軟片和光純藥公司製，型號：037-24053)及895.2 μ L之PBS藉由試管震盪器攪拌，得到RebA相當濃度20mM之儲備原液。

使用含有1%DMSO之PBS視需要稀釋所得之儲備原液，得到試料D-0.31mM~試料D-20mM。表3中記載了RebA

相當濃度。所謂 RebA 相當濃度，係指某試料 D 中之甘油之濃度，與實驗例 16 之某試料 B 加工中之甘油濃度相同時之該試料 B 加工中的 RebA 之濃度的意思。

【0095】

<實驗例 20>

相對於 MCT 油 58.0 μ L，加入 10 μ L 之 DMSO(富士軟片和光純藥公司製，型號：037-24053)及 932.0 μ L 之 PBS 藉由試管震盪器攪拌，得到 RebA 相當濃度 20mM 之儲備原液。

使用含有 1%DMSO 之 PBS 視需要稀釋所得之儲備原液，得到試料 E-0.31mM~試料 E-20mM。表 3 中記載了 RebA 相當濃度。所謂 RebA 相當濃度，係指某試料 E 中之 MCT 油之濃度，與實驗例 16 之某試料 B 加工中之 MCT 油濃度相同時之該試料 B 加工中的 RebA 之濃度的意思。

【0096】

<細胞毒性>

表 3 所示之條件下，將上述實驗例 15~20 所得之試料添加至培養基，以所得之培養基培養細胞，測定 2 小時後與 24 小時後之細胞毒性。具體的程序如下。

將 H716 細胞以 RPMI 1640(Thermo Fisher Scientific 公司製，型號：61870-036)(10%FBS(Gibco 製，型號：SH102770), 1mM Sodium Pyruvate)於 37℃、5%CO₂ 下培養於培養箱內。H716 細胞以 2 $\times 10^5$ cells/90 μ L/孔(死細胞評估用)播種於 96 孔盤及以 4 $\times 10^5$ cells/180 μ L/孔(形態觀察用)播種於 48 孔盤。播種於盤時之培養基中 FBS 定為 0.5%。細胞

播種 24 小時後，將各濃度之試料以 10 μ L/孔 (96 孔盤) 或 20 μ L/孔 (48 孔盤) 添加。培養基中之最終濃度，顯示於表 3 之「樣本 F.C.」之欄。評估添加試料 2 小時後各試料之最高濃度 (表 3 記載之 #1、#6、#10、#14、#18、#22、#26、#30)。

【0097】

(死細胞作為指標之評估)

試料添加 2 小時後及 24 小時後，將細胞以 100 $\times$ g 離心 5 分鐘去除上清液。以 50 μ L/孔添加 Propidium iodide 溶液 (0.66 μ g/mL，以 PBS 進行 1:1500 稀釋)，室溫靜置 15 分鐘進行死細胞的染色。藉由吸移使細胞懸濁後，顯微鏡下拍攝相位差圖像及螢光圖像。藉由 ImageJ 基於相位差圖像計算測量細胞總數，基於螢光圖像計算測量死細胞數。使用計算測量之細胞數算出死細胞率。

$$\text{死細胞率 (\%)} = \text{死細胞數} / \text{細胞總數} \times 100$$

添加各試料時之死細胞率，係以將細胞播種 24 小時後之未添加時中的死細胞率定為 0%，添加 70% 乙醇於冰上靜置 30 分鐘以上時的死細胞率定為 100% 來修正。結果表示於圖 15。圖 15a 顯示 2 小時後之結果，圖 15b 顯示 24 小時後之結果。

【0098】由顯示 2 小時後之結果的圖 15a 可知，所有試料中皆未誘導細胞死。

【0099】又，由顯示 24 小時後之結果的圖 15b 可理解，雖添加試料 B+C (RebA 濃度 2mM) 時之死細胞率為最

高，但與 PMA 之最低濃度為同等之死細胞率。關於試料 B+C 以外，為與陰性對照 (-)(亦稱為陰性對照組)同等或低於陰性對照的死細胞率。因此，以試料 B+C 誘導細胞死的可能性低，其他試料中未誘導細胞死。

【0100】

(以細胞形態作為指標之評估)

添加試料 2 小時後及 24 小時後，在顯微鏡下拍攝細胞，確認形態變化的有無。雖由於試料 B 加工、C 及 B+C 呈白濁故添加 0.5mM 及 2mM 時在顯微鏡下之判定困難，但即使添加其他試料至 H716 細胞，亦未見到細胞的收縮或破裂等之形態變化。

【0101】以下顯示表 3。表 3 中之陽性對照，亦稱為陽性對照組。陰性對照，亦稱為陰性對照組。

[表3]

	#	被驗物質	添加濃度		ppm換算	樣本F.C.		ppm換算
無刺激 陰性對照	1	含有1%DMSO 之溶液	-		-	-		-
陽性對照	2	PMA (1%DMSO)	0.004	mM	-	0.0004	mM	-
	3		0.016	mM	-	0.0016	mM	-
	4		0.063	mM	-	0.0063	mM	-
	5		0.25	mM	-	0.025	mM	-
	6		1	mM	-	0.1	mM	-
被驗物質	7	B 1%DMSO	0.31	mM	3.1	0.03	mM	0.3
	8		1.25	mM	12.5	0.13	mM	1.3
	9		5	mM	50.0	0.50	mM	5.0
	10		20	mM	200.0	2.00	mM	20.0
	11	B加工 1%DMSO	0.31	mM	3.1	0.03	mM	0.3
	12		1.25	mM	12.5	0.13	mM	1.3
	13		5	mM	50.0	0.50	mM	5.0
	14		20	mM	200.0	2.00	mM	20.0
	15	C 1% DMSO	0.31	mM	-	0.03	mM	-
	16		1.25	mM	-	0.13	mM	-
	17		5	mM	-	0.50	mM	-
	18		20	mM	-	2.00	mM	-
	19	B + C 1% DMSO	0.31	mM	3.1	0.03	mM	0.3
	20		1.25	mM	12.5	0.13	mM	1.3
	21		5	mM	50.0	0.50	mM	5.0
	22		20	mM	200.0	2.00	mM	20.0
	23	D 1% DMSO	0.31	mM	-	0.03	mM	-
	24		1.25	mM	-	0.13	mM	-
	25		5	mM	-	0.50	mM	-
	26		20	mM	-	2.00	mM	-
	27	E 1% DMSO	0.31	mM	-	0.03	mM	-
	28		1.25	mM	-	0.13	mM	-
	29		5	mM	-	0.50	mM	-
	30		20	mM	-	2.00	mM	-

【 0102】

<實驗例 21>

相對於 RebA 134.3mg，加入 34.7 μ L之 DMSO(富士軟片和光純藥公司製，型號：037-24053)後，加入 3438 μ L之 PBS藉由試管震盪器攪拌，得到 RebA濃度 40mM之儲備原

液。

使用含有 1%DMSO 之 PBS 稀釋所得之儲備原液，得到試料 B-1mM~試料 B-20mM。表 4 中記載了 RebA 之濃度。

【 0103 】

<實驗例 22>

除將 RebA 100g 替換成水 100g 之點，以及，作為乳化劑使用蔗糖脂肪酸酯 10g 代替聚甘油脂肪酸酯 10g 之點以外，與實驗例 16 之 RebA 加工液之調整同樣地進行得到 C-1 溶液。具體而言，混合甘油 490g、蔗糖脂肪酸酯 10g (三菱化學食品製 HLB=16) 於 70℃ 升溫溶解做成水系混合溶液。於此水系混合溶液中添加 MCT 油 300g 作為油脂，利用均質混合器 (特殊機化工業製) 以旋轉數 8000rpm 進行乳化。攪拌結束後冷卻至 40℃，加入水 200g，得到 C-1 溶液。

相對於所得之 C-1 溶液 580.2μL，加入 15μL 之 DMSO (富士軟片和光純藥公司製，型號：037-24053) 及 904.8μL 之 PBS 藉由試管震盪器攪拌，得到 RebA 相當濃度 40mM 之儲備原液。

使用含有 1%DMSO 之 PBS 稀釋所得之儲備原液，得到試料 C-1-1mM~試料 C-1-20mM。表 4 中記載了 RebA 相當濃度。所謂 RebA 相當濃度，係指某試料 C-1 中之甘油及乳化劑之濃度，與實驗例 25 之某試料 B+C-1 中之甘油及乳化劑之濃度相同時之該試料 B+C-1 中的 RebA 之濃度的意思。

【 0104 】

<實驗例 23>

除使用酵素分解卵磷脂(太陽化學製HLB=12.0) 10g代替蔗糖脂肪酸酯(三菱化學食品製HLB=16) 10g之點以外，與實驗例22同樣地進行，得到試料C-2-1mM~試料C-2-20mM。表4中記載了RebA相當濃度。所謂RebA相當濃度，係指某試料C-2中之甘油及乳化劑之濃度，與實驗例26之某試料B+C-2中之甘油及乳化劑之濃度相同時之該試料B+C-2中的RebA之濃度的意思。

【0105】

<實驗例24>

除使用有機酸單甘油酯(太陽化學製HLB=9.0)10g代替蔗糖脂肪酸酯(三菱化學食品製HLB=16)10g之點以外，與實驗例22同樣地進行，得到試料C-3-1mM~試料C-3-20mM。表4中記載了RebA相當濃度。所謂RebA相當濃度，係指某試料C-3中之甘油及乳化劑之濃度，與實驗例27之某試料B+C-3中之甘油及乳化劑之濃度相同時之該試料B+C-3中的RebA之濃度的意思。

【0106】

<實驗例25>

與實驗例21同樣地進行，得到包含試料B+C-1之2倍濃度之RebA的試料B。即，得到試料B-2mM、試料B-5mM、試料B-10mM、試料B-20mM、試料B-30mM、試料B-40mM。連字符後之濃度，表示RebA之濃度。

與實驗例22同樣地進行，得到包含試料B+C-1之2倍濃度之蔗糖脂肪酸酯的C-1試料。即，得到試料C-1-2mM、

試料 C-1-5mM、試料 C-1-10mM、試料 C-1-20mM、試料 C-1-30mM、試料 C-1-40mM。連字符後之濃度，表示 RebA 相當濃度。

將相同濃度之試料 B 與試料 C (例如試料 B-1-2mM 與試料 C-1-2mM) 等量混溶，得到試料 B+C-1-1mM~試料 B+C-1-20mM。表 4 中記載了 RebA 之濃度。

【 0107】

<實驗例 26>

除使用酵素分解卵磷脂 (太陽化學製 HLB=12.0) 10g 代替蔗糖脂肪酸酯 (三菱化學食品製 HLB=16) 10g 之點以外，與實驗例 25 同樣地進行，得到試料 B+C-2-1mM~試料 B+C-2-20mM。表 4 中記載了 RebA 之濃度。

【 0108】

<實驗例 27>

除使用有機酸單甘油酯 (太陽化學製 HLB=9.0) 10g 代替蔗糖脂肪酸酯 (三菱化學食品製 HLB=16) 10g 之點以外，與實驗例 25 同樣地進行，得到試料 B+C-3-1mM~試料 B+C-3-20mM。表 4 中記載了 RebA 之濃度。

【 0109】

<實驗例 28>

相對於蔗糖脂肪酸酯 13.1mg 加入 339 μ L 之 DMSO (富士軟片和光純藥公司製，型號：037-24053) 進行試管震盪，進而以 DMSO 稀釋 20 倍，得到 RebA 相當濃度 2,000mM 之儲備原液。於所得之儲備原液摻合 PBS，得到 20mM 溶液。

使用含有 1%DMSO 之 PBS 視需要稀釋所得之 20mM 溶液，得到試料 G-1-1mM~試料 G-1-20mM。表 4 中記載了 RebA 相當濃度。所謂 RebA 相當濃度，係指某試料 G-1 中之蔗糖脂肪酸酯之濃度，與實驗例 25 之某試料 B+C-1 中之蔗糖脂肪酸酯之濃度相同時之該試料 B+C-1 中的 RebA 之濃度的意思。

【0110】

<實驗例 29>

相對於酵素分解卵磷脂 20.9mg 加入 540 μ L 之 PBS 進行試管震盪，進而以 DMSO(富士軟片和光純藥公司製，型號：037-24053)稀釋 20 倍，得到 RebA 相當濃度 2,000mM 之儲備原液。於儲備原液摻合 PBS 與 DMSO，製作 20mM 溶液 (1%DMSO)。

使用含有 1%DMSO 之 PBS 視需要稀釋所得之 20mM 溶液，得到試料 G-2-1mM~試料 G-2-20mM。表 4 中記載了 RebA 相當濃度。所謂 RebA 相當濃度，係指某試料 G-2 中之酵素分解卵磷脂之濃度，與實驗例 26 之某試料 B+C-2 中之酵素分解卵磷脂之濃度相同時之該試料 B+C-2 中的 RebA 之濃度的意思。

【0111】

<實驗例 30>

於 60 $^{\circ}$ C 溶解有機酸單甘油酯，相對於 35.0mg 加入 905 μ L 之 DMSO 進行試管震盪，進而以 DMSO 稀釋 20 倍，得到 RebA 相當濃度 2,000mM 之儲備原液。於儲備原液摻合 PBS

得到 20mM 溶液。

使用含有 1%DMSO 之 PBS 視需要稀釋所得之 20mM 溶液，得到試料 G-3-1mM~試料 G-3-20mM。表 4 中記載了 RebA 相當濃度。所謂 RebA 相當濃度，係指某試料 G-3 中之有機酸單甘油酯之濃度，與實驗例 27 之某試料 B+C-3 中之有機酸單甘油酯之濃度相同時之該試料 B+C-3 中的 RebA 之濃度的意思。

【0112】

<實驗例 31>

於 60℃ 溶解聚甘油脂肪酸酯，相對於 50μL 加入 259μL 之 DMSO(富士軟片和光純藥公司製，型號：037-24053)後，加入 984μL 之 PBS 進行試管震盪，得到 RebA 相當濃度 400mM 之儲備原液。

使用所得之儲備原液與 PBS，調製 20mM 溶液。使用含有 1%DMSO 之 PBS 視需要稀釋所得之 20mM 溶液，得到試料 G-4-1mM~試料 G-4-20mM。表 4 中記載了 RebA 相當濃度。所謂 RebA 相當濃度，係指某試料 G-4 中之聚甘油脂肪酸酯之濃度，與實驗例 25~27 之某試料 B+C 中之乳化劑之濃度相同時之該試料 B+C 中的 RebA 之濃度的意思。

【0113】

<GLP-1 分泌量>

測定將上述實驗例 21~31 所得之試料給予細胞 2 小時後與 24 小時後之 GLP-1 分泌量。具體的程序如下。

將 H716 細胞以 RPMI 1640(Thermo Fisher Scientific 公

司製，型號：61870-036)(10%FBS(Gibco製，型號：SH102770)，1mM Sodium Pyruvate)於37℃、5%CO₂下培養於培養箱內。H716細胞以 2×10^5 cells/90μL/孔播種於96孔盤中。播種於盤時之培養基中FBS定為0.5%。

細胞播種24小時後，如表4所示，將實驗例21~31所得之試料以10μL/孔添加至培養基。培養基中之最終濃度，顯示於表4之「樣本F.C.」之欄。

自添加試料2小時後及24小時後，將96孔盤以300×g離心5分鐘，回收培養上清液。

使用Human GLP-1(7-36amide) Immunoassay kit(PerkinElmer公司製，型號：AL359C)定量經回收之培養上清液中的GLP-1。關於定量值，將超過校正曲線之範圍為錯誤之值除外。又，使用統計解析軟體R製作Box plot，將小於第一四分位或大於第三四分位之值為1.5四分位範圍以上之情形當作離群值除外。

結果表示於圖16。圖16中亦揭示作為無刺激性對照組之含有1%DMSO之溶液的GLP-1分泌量，與作為陽性對照組之PMA(富士軟片和光純藥公司製，162-23591)之水系溶液的GLP-1分泌量。PMA之水系溶液，係藉由相對於PMA 1mg加入16.21μL之DMSO調製儲備原液，並於該儲備原液中添加PBS製作1mM溶液，以含有1%DMSO之PBS稀釋此溶液而得。

【0114】以下顯示於表4。表4中之陽性對照，亦稱為陽性對照組。陰性對照，亦稱為陰性對照組。

[表4]

	#	添加濃度		ppm換算	添加量(μL)	培養基(μL)	總計(μL)	樣本F.C.	
無刺激 陰性對照	1	含有1%DMSO 之PBS	-	-	10	90	100	-	
	2	PMA	0.01 mM	-	10	90	100	0.001	mM
陽性對照	3	(1%DMSO)	1 mM	-	10	90	100	0.1	mM
	4		1 mM	967.0	10	90	100	0.10	mM
被驗物質	5		2.5 mM	2417.5	10	90	100	0.25	mM
	6	B	5 mM	4835.1	10	90	100	0.50	mM
	7	(1%DMSO)	10 mM	9670.1	10	90	100	1.00	mM
	8		15 mM	14505.2	10	90	100	1.50	mM
	9		20 mM	19340.2	10	90	100	2.00	mM
	10		1 mM	967.0	10	90	100	0.10	mM
	11		2.5 mM	2417.5	10	90	100	0.25	mM
	12	C-1	5 mM	4835.1	10	90	100	0.50	mM
	13	(1%DMSO)	10 mM	9670.1	10	90	100	1.00	mM
	14		15 mM	14505.2	10	90	100	1.50	mM
	15		20 mM	19340.2	10	90	100	2.00	mM
	16		1 mM	967.0	10	90	100	0.10	mM
	17		2.5 mM	2417.5	10	90	100	0.25	mM
	18	C-2	5 mM	4835.1	10	90	100	0.50	mM
	19	(1%DMSO)	10 mM	9670.1	10	90	100	1.00	mM
	20		15 mM	14505.2	10	90	100	1.50	mM
	21		20 mM	19340.2	10	90	100	2.00	mM
	22		1 mM	967.0	10	90	100	0.10	mM
	23		2.5 mM	2417.5	10	90	100	0.25	mM
	24	C-3	5 mM	4835.1	10	90	100	0.50	mM
	25	(1%DMSO)	10 mM	9670.1	10	90	100	1.00	mM
	26		15 mM	14505.2	10	90	100	1.50	mM
	27		20 mM	19340.2	10	90	100	2.00	mM
	28		1 mM	967.0	10	90	100	0.10	mM
	29		2.5 mM	2417.5	10	90	100	0.25	mM
	30	B + C-1	5 mM	4835.1	10	90	100	0.50	mM
	31	(1%DMSO)	10 mM	9670.1	10	90	100	1.00	mM
	32		15 mM	14505.2	10	90	100	1.50	mM
	33		20 mM	19340.2	10	90	100	2.00	mM
	34		1 mM	967.0	10	90	100	0.10	mM
	35		2.5 mM	2417.5	10	90	100	0.25	mM
	36	B + C-2	5 mM	4835.1	10	90	100	0.50	mM
	37	(1%DMSO)	10 mM	9670.1	10	90	100	1.00	mM
	38		15 mM	14505.2	10	90	100	1.50	mM
	39		20 mM	19340.2	10	90	100	2.00	mM
	40		1 mM	967.0	10	90	100	0.10	mM
	41		2.5 mM	2417.5	10	90	100	0.25	mM
	42	B + C-3	5 mM	4835.1	10	90	100	0.50	mM
	43	(1%DMSO)	10 mM	9670.1	10	90	100	1.00	mM
	44		15 mM	14505.2	10	90	100	1.50	mM
	45		20 mM	19340.2	10	90	100	2.00	mM
	46		1 mM	967.0	10	90	100	0.10	mM
	47		2.5 mM	2417.5	10	90	100	0.25	mM
	48	G-1	5 mM	4835.1	10	90	100	0.50	mM
	49	(1%DMSO)	10 mM	9670.1	10	90	100	1.00	mM
	50		15 mM	14505.2	10	90	100	1.50	mM
	51		20 mM	19340.2	10	90	100	2.00	mM
	52		1 mM	967.0	10	90	100	0.10	mM
	53		2.5 mM	2417.5	10	90	100	0.25	mM
	54	G-2	5 mM	4835.1	10	90	100	0.50	mM
	55	(1%DMSO)	10 mM	9670.1	10	90	100	1.00	mM
	56		15 mM	14505.2	10	90	100	1.50	mM
	57		20 mM	19340.2	10	90	100	2.00	mM
	58		1 mM	967.0	10	90	100	0.10	mM
	59		2.5 mM	2417.5	10	90	100	0.25	mM
	60	G-3	5 mM	4835.1	10	90	100	0.50	mM
	61	(1%DMSO)	10 mM	9670.1	10	90	100	1.00	mM
	62		15 mM	14505.2	10	90	100	1.50	mM
	63		20 mM	19340.2	10	90	100	2.00	mM
	64		1 mM	967.0	10	90	100	0.10	mM
	65		2.5 mM	2417.5	10	90	100	0.25	mM
	66	G-4	5 mM	4835.1	10	90	100	0.50	mM
	67	(1%DMSO)	10 mM	9670.1	10	90	100	1.00	mM
	68		15 mM	14505.2	10	90	100	1.50	mM
	69		20 mM	19340.2	10	90	100	2.00	mM

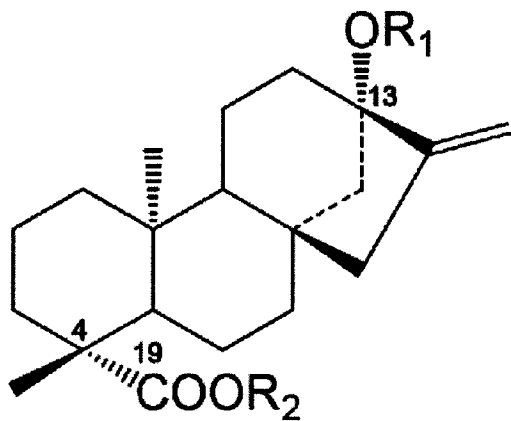
※ 關於#10~69以B加工濃度記載

【 0115】

<實驗例 32>

測定甜菊苷、RebA、RebD、RebM之分配比率。用於參考，甜菊苷、RebA、RebD、RebM之結構式表示於下。

[化1]



化合物名	R ₁	R ₂
瑞鮑迪苷A (rebA)	Glc β 1, 2(Glu β 1, 3)Glu β 1-	Glc β 1-
甜菊苷 (stv)	Glc β 1, 2Glu β 1-	Glc β 1-
瑞鮑迪苷D (rebD)	Glc β 1, 2(Glu β 1, 3)Glu β 1-	Glc β 1, 2Glc β 1-
瑞鮑迪苷M (rebM)	Glc β 1, 2(Glu β 1, 3)Glu β 1-	Glc β 1, 2(Glu β 1, 3)Glu β 1-

具體而言，進行以下之操作。

於分液漏斗中放入純水與甲苯各約100mL後，添加各甜菊醇醣苷30mg。以液體不漏出之方式密閉，藉由震盪機震盪約30分鐘攪拌後靜置分液漏斗。分配比率在液層分離成2層時，自各別的層進行取樣，藉由LCMS進行測定。

測定結果與試驗中之照片顯示於圖17。試驗後之含RebA之液的照片顯示於圖18。

【 0116】

<實驗例 33>

1.樣本調製

以下述程序準備樣本 SA-70A、SA-70B、SA-200A、SA-200B、SA-206A、SA-206B、SA-207A、SA-207B。此外，以 A 結尾的樣本，為使 RebA 溶解於水系而調製的樣本。以 B 結尾的樣本，為使 RebA 分散於油系而調製的樣本。

【 0117】

(SA-70A)

混合甘油 487g、RebA 103g 及聚甘油脂肪酸酯 10g(太陽化學股份有限公司製，HLB=16.7)，於 70℃ 升溫溶解獲得水系混合溶液。於此水系混合溶液中添加 MCT 300g 作為油脂，藉由均質混合器(特殊機化工業(股)製)以旋轉數 8000rpm 進行乳化。攪拌結束後冷卻至 40℃，加入水 100g 得到乳化組成物 SA-70A。

【 0118】

(SA-70B)

混合甘油 487g 及聚甘油脂肪酸酯 10g(太陽化學股份有限公司製，HLB=16.7)，於 70℃ 升溫溶解獲得水系混合溶液。又，於室溫混合 MCT 300g 及 RebA 103g 得到油系混合溶液。於水系混合溶液中添加油系混合溶液，藉由均質混合器(特殊機化工業(股)製)以旋轉數 8000rpm 進行乳化。攪拌結束後冷卻至 40℃，加入水 100g 得到乳化組成物 SA-70B。

【 0119】

(SA-200A)

混合甘油 567g、RebA 103g及聚甘油脂肪酸酯 30g(太陽化學股份有限公司製，HLB=16.7)，於 70℃ 升溫溶解做成水系混合溶液。於此水系混合溶液中添加 MCT 200g 作為油脂，藉由均質混合器(特殊機化工業(股)製)以旋轉數 8000rpm 進行乳化。攪拌結束後冷卻至 40℃，加入水 100g 得到乳化組成物 SA-200A。

【0120】

(SA-200B)

混合甘油 567g及聚甘油脂肪酸酯 30g(太陽化學股份有限公司製，HLB=16.7)，於 70℃ 升溫溶解做成水系混合溶液。又，於室溫混合 MCT 200g及 RebA 103g得到油系混合溶液。於水系混合溶液中添加油系混合溶液，藉由均質混合器(特殊機化工業(股)製)以旋轉數 8000rpm 進行乳化。攪拌結束後冷卻至 40℃，加入水 100g 得到乳化組成物 SA-200B。

【0121】

(SA-206A)

混合甘油 537g、RebA 103g及聚甘油脂肪酸酯 60g(太陽化學股份有限公司製，HLB=16.7)，於 70℃ 升溫溶解做成水系混合溶液。於此水系混合溶液中添加 MCT 200g 作為油脂，藉由均質混合器(特殊機化工業(股)製)以旋轉數 8000rpm 進行乳化。攪拌結束後冷卻至 40℃，加入水 100g 得到預備乳化組成物後，進而藉由濕式微粒化裝置以壓力

150MPa加以細微乳化得到乳化組成物 SA-206A。

【 0122】

(SA-206B)

混合甘油 578g 及聚甘油脂肪酸酯 55g(太陽化學股份有限公司製，HLB=16.7)，於 70℃ 升溫溶解做成水系混合溶液。又，於室溫混合 MCT 182g 及 RebA 94g 得到油系混合溶液。於水系混合溶液中添加油系混合溶液，藉由均質混合器(特殊機化工業(股)製)以旋轉數 8000rpm 進行乳化。攪拌結束後冷卻至 40℃，加入水 91g 得到預備乳化組成物後，進而藉由濕式微粒化裝置以壓力 150MPa 加以細微乳化得到乳化組成物 SA-206B。

【 0123】

(SA-207A)

混合甘油 706g、RebA 34g 及聚甘油脂肪酸酯 60g(太陽化學股份有限公司製，HLB=16.7)，於 70℃ 升溫溶解做成水系混合溶液。於此水系混合溶液中添加 MCT 100g 作為油脂，藉由均質混合器(特殊機化工業(股)製)以旋轉數 8000rpm 進行乳化。攪拌結束後冷卻至 40℃，加入水 100g 得到預備乳化組成物後，進而藉由濕式微粒化裝置以壓力 150MPa 加以細微乳化得到乳化組成物 SA-207A。

【 0124】

(SA-207B)

混合甘油 706g 及聚甘油脂肪酸酯 60g(太陽化學股份有限公司製，HLB=16.7)，於 70℃ 升溫溶解做成水系混合溶

液。又，於室溫混合MCT 100g及RebA 34g得到油系混合溶液。於水系混合溶液中添加油系混合溶液，藉由均質混合器(特殊機化工業(股)製)以旋轉數8000rpm進行乳化。攪拌結束後冷卻至40℃，加入水100g得到預備乳化組成物後，進而藉由濕式微粒化裝置以壓力150MPa加以細微乳化得到乳化組成物SA-207B。

【0125】

2.乳化穩定性之評估

使用上述1.所調整的樣本，進行穩定性之評估。具體的程序如下。

【0126】

2.1調整後立即之乳化粒徑的測定

測定調製後立即之各樣本中乳化粒子的平均粒徑。具體而言，將調製後立即之各樣本以離子交換水適當稀釋成雷射散射強度成為1%左右，之後，以雷射繞射散射式粒度分佈測定器(Spectris股份有限公司Malvern Panalytical事業部)測定。

【0127】

2.2冷藏保存後之乳化粒徑的測定

將各樣本靜置於冷藏庫(4℃)內2個月。之後，與2.1同樣地進行，測定乳化粒徑。

【0128】結果表示於下述表中。

[表5]

(%)	SA-70		SA-200		SA-206		SA-207	
	A	B	A	B	A	B	A	B
Reb A	10.3		10.3		10.3	9.4	3.4	
MCT	30.0		20.0		20.0	18.2	10.0	
乳化劑	1.0		3.0		6.0	5.5	6.0	
甘油	48.7		56.7		53.7	57.8	70.6	
水	10.0		10.0		10.0	9.1	10.0	
總計	100.0		100.0		100.0	100.0	100.0	
乳化粒徑 (μm) 調製時	0.40	0.27	0.20	0.17	0.07	0.08	0.06	0.06
乳化粒徑 (μm) 冷藏保存2個月時	0.36	0.29	0.20	0.18	0.11	0.10	0.09	0.10

【 0129】

3.香味特性之評估

使用上述 1.所調整的樣本，評估香味特性。具體而言，以下述程序進行評估。

將 RebA 溶解於純水，製作 RebA 濃度為 467ppm 的水溶液，作為對照組。接著，在 1.中所調整之各樣本中添加純水，製作 RebA 濃度為 467ppm 的水溶液。由訓練有素的官能檢查員 7 人，將對照組定為 3 分，以 0.5 分為間隔實施各水溶液的香味評估，算出平均值後，進行排序。香味評估，係以甜味強度、甜味後韻、苦味強度進行評估。相同分數者定為相同序位。序位表示於下述表之各評估項目的欄中。下述表之總計的欄中，表示序位的和。

[表6]

	70A	200A	206A	207A
甜味強度	2	3	1	3
後韻	3	1	2	1
苦味	1	4	2	3
總計	6	8	5	7
	70B	200B	206B	207B
甜味強度	4	2	3	1
後韻	3	2	1	2
苦味	4	2	1	3
總計	11	6	5	6

【 0130】

4.保存後之各種特性之評估

使用 1.中所調整之樣本，評估保存後之乳化穩定性、香味特性、震動穩定性。具體而言，以下述程序進行評估。

於 16990.3mg 之樣本 SA-70A 中，添加純水 3,483ml，得到評估用液 70A。除使用樣本 SA-206A 代替樣本 SA-70A 之點以外，同樣地進行，得到評估用液 206A。各評估用液之組成如下。

[表7]

	70A	206A
樣本量 (mg)	16,990.3	16,990.3
樣本中之RebA率 (%)	10.3	10.3
RebA換算(mg)	1,750.0	1,750.0
純水添加量 (ml)	3,483.0	3,483.0
總量 (ml)	3,500	3,500
RebA濃度(ppm)	500.0	500.0

將所得之評估用液 70A 與評估用液 206A，於庫內溫度 5℃ 之冷藏庫靜置 4 週。又，將另外的評估用液 70A 與評估用液 206A 靜置於 55℃ 的恆溫保存庫 4 週。

又，使用無水檸檬酸，將評估用液 70A 與評估用液 206A 之 pH 調整至 2.5，於庫內溫度 5℃ 之冷藏庫靜置 4 週。使用無水檸檬酸，將另外的評估用液 70A 與評估用液 206A 之 pH 調製成 2.5，於 55℃ 之恆溫保存庫靜置 4 週。

【 0131】

4-1.保存後之乳化穩定性

觀察靜置 4 週後評估用液之液面的外觀。結果表示於下述表。

[表8]

		靜置溫度	
		5℃	55℃
無pH調製	70A	無浮油	無浮油
	206A	無浮油	無浮油
pH2.5	70A	有浮油	有浮油
	206A	無浮油	無浮油

【 0132】**4-2.保存溫度之對香味特性的影響**

又，確認靜置溫度之對香味的影響。具體而言以下述程序進行確認。

將無 pH調製、靜置溫度 5℃ 之評估用液 70A 作為對照組。以 0.5 分為間隔評估以對照組之評估定為 5 分時之無 pH 調製、靜置溫度 55℃ 之評估用液 70A 的香味。檢查員為訓練有素的官能檢查員 4 人。算出各檢查員之評估的平均值。

同樣地進行，將無 pH調製、靜置溫度 5℃ 之評估用液 206A 作為對照組，以 0.5 分為間隔評估無 pH調製、靜置溫度 55℃ 之評估用液 206A 的香味。

同樣地進行，將 pH2.5、靜置溫度 5℃ 之評估用液 70A 作為對照組，以 0.5 分為間隔評估 pH2.5、靜置溫度 55℃ 之評估用液 70A 的香味。

同樣地進行，將 pH2.5、靜置溫度 5℃ 之評估用液 206A 作為對照組，以 0.5 分為間隔評估 pH2.5、靜置溫度 55℃ 之評估用液 206A 的香味。

【 0133】結果表示於圖 19。又，檢查員的評論記載於下。

70A，無 pH調製；

苦味的尖銳被去除而溫和、乳白、微透明。變得溫和苦味減少。乳白度增加。變得容易飲用。雖稍微少了清新感，但沒有嚴重的劣化。

206A，無 pH 調製；

苦味的尖銳被去除而溫和、乳白、微透明。變得溫和苦味減少。乳白度增加。甜度未改變。無變化。雖稍微少了清新感，但沒有嚴重的劣化。

70A，pH2.5；

酸味被抑制。酸味增加。刺激。變成溫和的酸味。良好。稍稍變得溫和，酸味的刺激減少。

206A，pH2.5；

酸味被抑制。酸味增加。但變得容易飲用。無變化。苦味略有減少。良好。稍稍變得溫和，酸味的刺激減少。

【0134】

4-3.震動加速試驗

對於在 5℃ 靜置 4 週後之評估用液，藉由分光光度計 (島津公司製 UV1800 UV spectrophotometer) 測定波長 680 nm 中之吸光度。

接著，以 3000rpm 將評估用液離心 30 分鐘。對於離心後之評估用液，測定波長 680nm 中之吸光度。算出離心前後吸光度的差 Δ_{abs} ， Δ_{abs} 為 0.02 以下者，係震動時之乳化穩定性優異，評估為「良好」。

結果表示於圖 20。

【0135】

5.甜味強度的降低程度

使用上述 1. 中所調整之樣本 SA-70A 及 SA-206A，評估乳化所致之甜味強度的降低程度。具體而言，以下述程序

進行評估。

將 RebA 溶解於純水製作 467ppm 之水溶液，作為對照組。接著，添加 1. 所調整之各樣本至純水，製作 RebA 濃度為 467ppm 的水溶液。讓訓練有素之官能檢查員 4 人，選擇各水溶液為接近蔗糖水溶液之 Brix 2、5、8、11、14 哪一個的甜味強度。算出各檢查員之評估結果的平均值。結果表示於圖 21。

【0136】

<實驗例 34>

與實驗例 33 之「4. 保存後之各種特性之評估」同樣地進行，得到評估用液 70A 及評估用液 206A。

以含 DMSO 之 PBS 稀釋所得之評估用液 70A 與評估用液 206A，調整下述表中添加濃度之欄所示 RebA 濃度的稀釋液。

又，將另外的評估用液 70A 與評估用液 206A 靜置於 55℃ 的恆溫保存庫 4 週。以含 DMSO 之 PBS 稀釋靜置後之評估用液 70A 與評估用液 206A，調整下述表中添加濃度之欄所示 RebA 濃度的稀釋液。

此外，調製含有 1%DMSO 之溶液作為無刺激性對照組(陰性對照)。又，以成為下述表中添加濃度之欄所示濃度之方式，調整以 1%DMSO 稀釋 PMA(富士軟片和光純藥公司製，型號：162-23591)而成者作為陽性對照組。

[表9]

各被驗物質之添加量與最終濃度

#		添加濃度 (mM)	添加量(μL)	培養基(μL)	總計(μL)	最終濃度 (mM)
1	含有1%DMSO之溶液	-	10	90	100	-
2	PMA	0.01	10	90	100	0.001
3	(1%DMSO)	1	10	90	100	0.100
4	70A	0.25	10	90	100	0.025
5		0.5	10	90	100	0.050
6		1	10	90	100	0.100
7		2.5	10	90	100	0.250
8		5	10	90	100	0.500
9		10	10	90	100	1.000
10		0.25	10	90	100	0.025
11	70A4W	0.5	10	90	100	0.050
12		1	10	90	100	0.100
13		2.5	10	90	100	0.250
14		5	10	90	100	0.500
15		10	10	90	100	1.000
16	206A	0.25	10	90	100	0.025
17		0.5	10	90	100	0.050
18		1	10	90	100	0.100
19		2.5	10	90	100	0.250
20		5	10	90	100	0.500
21	206A4W	10	10	90	100	1.000
22		0.25	10	90	100	0.025
23		0.5	10	90	100	0.050
24		1	10	90	100	0.100
25		2.5	10	90	100	0.250
26		5	10	90	100	0.500
27		10	10	90	100	1.000

【0137】在上述表所示條件下，將稀釋液 No.1~27 添加至培養基，以所得之培養基培養細胞。具體的程序如下。

將 H716 細胞以 RPMI1640(Thermo Fisher Scientific 公司製，型號：61870-036)(10%FBS(Gibco製，型號：SH102770)，1mM Sodium Pyruvate)於 37℃、5%CO₂下培養於培養箱內。H716 細胞以 2×10⁵cells/90μL/孔播種於 96 孔盤中。播種於盤時之培養基中 FBS 定為 0.5%。自細胞播種經過 24 小時後，將稀釋液 No.1~27 以 10μL/孔的量加至孔中。添加稀釋液後之培養基中的 RebA 最終濃度 (No.2,3 之情形中為 PMA 濃度)，顯示於上述表之「Final conc(mM)」欄中。

【0138】確認自添加稀釋液 2 小時後與 24 小時後的細胞生存率。任一樣本皆無問題。

【0139】自添加稀釋液 2 小時後及 24 小時後，將 96 孔

盤以 $300\times g$ 離心 5 分鐘，回收培養上清液。

使用 Human GLP-1(7-36amide)Immunoassay kit(PerkinElmer 公司製，型號：AL359C)，定量經回收之培養上清液中的 GLP-1。關於定量值，將超過校正曲線之範圍為錯誤之值除外。又，使用統計解析軟體 R 製作 Box plot，將小於第一四分位或大於第三四分位之值為 1.5 四分位範圍以上之情形當作離群值除外。

結果表示於圖 22。

【發明申請專利範圍】

【請求項1】一種組成物，其含有：GLP-1分泌促進成分與包含水中油型乳化劑之乳化粒子，前述水中油型乳化劑為選自由聚甘油脂肪酸酯、丙二醇脂肪酸酯、蔗糖脂肪酸酯及有機酸單甘油酯所成群組中之至少1種之水中油型乳化劑。

【請求項2】如請求項1之組成物，其中前述水中油型乳化劑之HLB值為7~18。

【請求項3】如請求項1之組成物，其中前述GLP-1分泌促進成分包含醣苷甜味料。

【請求項4】如請求項3之組成物，其中前述醣苷甜味料，包含選自由瑞鮑迪苷A、瑞鮑迪苷B、瑞鮑迪苷C、羅漢果苷V及甜菊苷所成群組中之至少1種。

【請求項5】如請求項1之組成物，其中前述GLP-1分泌促進成分，包含選自由單糖、雙醣、蔗糖衍生物、胺基酸、胜肽、蛋白質、糖蛋白質、脂質及脂肪酸所成群組中之至少1種。

【請求項6】如請求項1之組成物，其中前述GLP-1分泌促進成分，包含乳蛋白質、卵黃蛋白質、卵白蛋白質、大豆蛋白質、小麥蛋白質、豌豆蛋白質、黏蛋白、蛋白多醣或此等之加工品。

【請求項7】如請求項1~6中任一項之組成物，其中前述乳化粒子於核不含GLP-1分泌促進成分。

【請求項8】如請求項1~6中任一項之組成物，其中前

述 GLP-1 分泌促進成分之藉由平板法測定的表面張力為 40~70mN/m。

【請求項 9】如請求項 1~6 中任一項之組成物，其中前述水中油型乳化劑相對於前述 GLP-1 分泌促進成分的比例為 0.001~50 質量%。

【請求項 10】如請求項 1~6 中任一項之組成物，其中以 0.1~5 質量%之比例含有前述水中油型乳化劑。

【請求項 11】如請求項 1~6 中任一項之組成物，其中以 1~99.9 質量%之比例含有前述 GLP-1 分泌促進成分。

【請求項 12】一種飲料，其含有如請求項 1~11 中任一項之組成物。

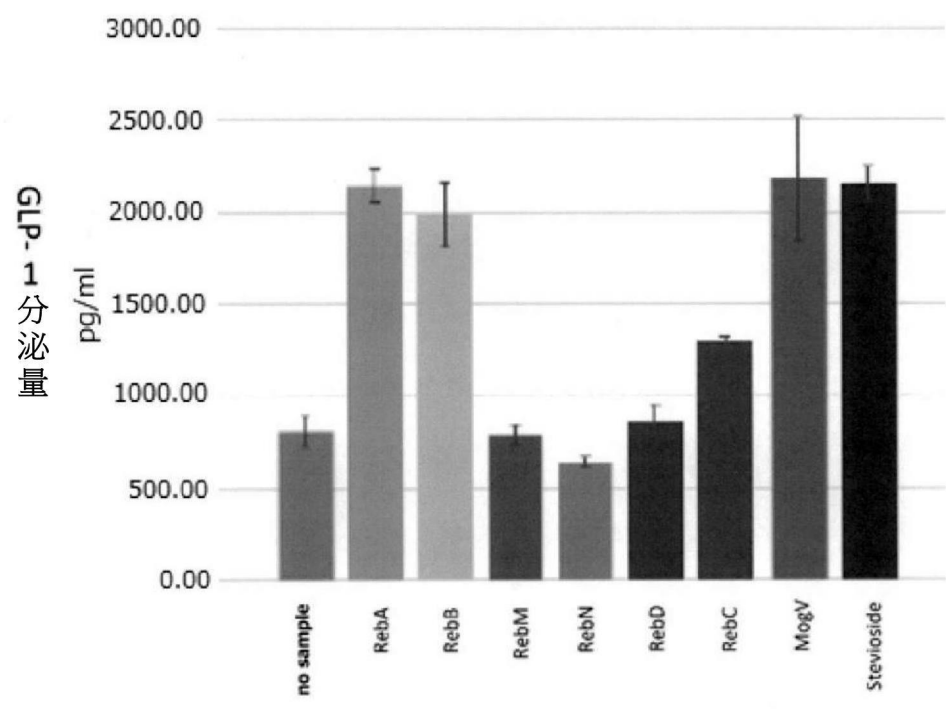
【請求項 13】一種食品，其含有如請求項 1~11 中任一項之組成物。

【請求項 14】一種醫藥組成物，其含有如請求項 1~11 中任一項之組成物。

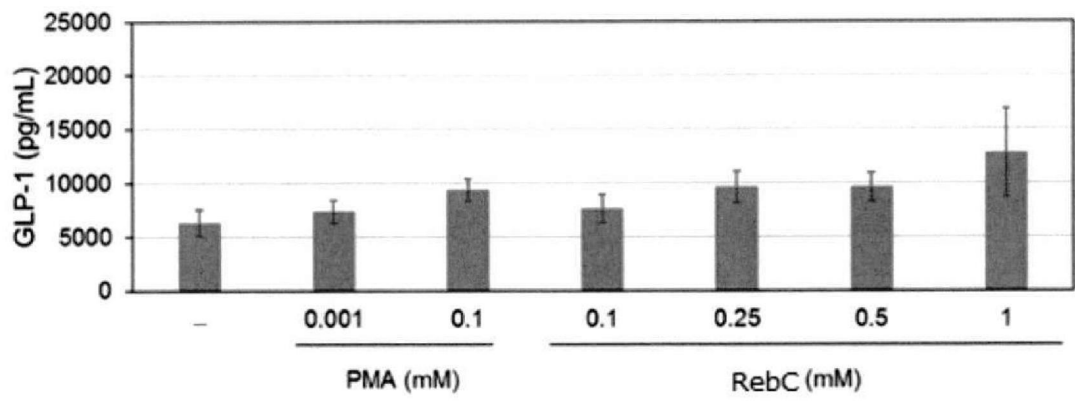
【請求項 15】一種含有 GLP-1 分泌促進成分與包含水中油型乳化劑之乳化粒子之組成物的製造方法，其包含：攪拌水中油型乳化劑與水性介質與油脂形成乳化粒子，調製含乳化粒子之混合物的步驟，及，混合前述含乳化粒子之混合物與包含 GLP-1 分泌促進成分及水性介質之含有 GLP-1 分泌促進成分之混合物的步驟。

【請求項 16】一種組成物，其含有：GLP-1 分泌促進成分與包含水中油型乳化劑之乳化粒子，其係由如請求項 15 之方法所製造者。

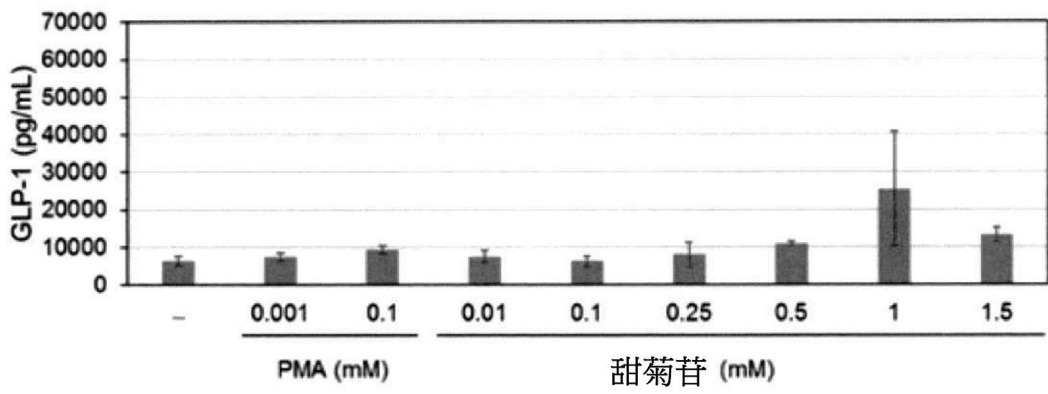
【發明圖式】



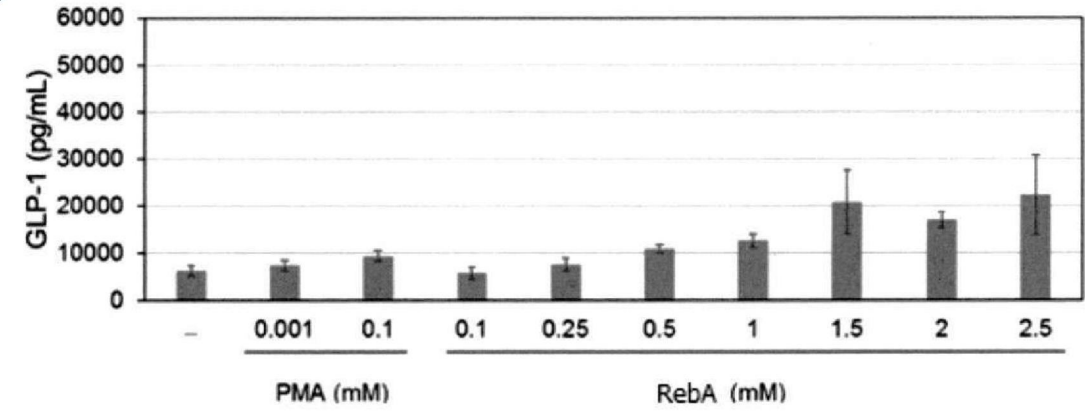
【圖 1】



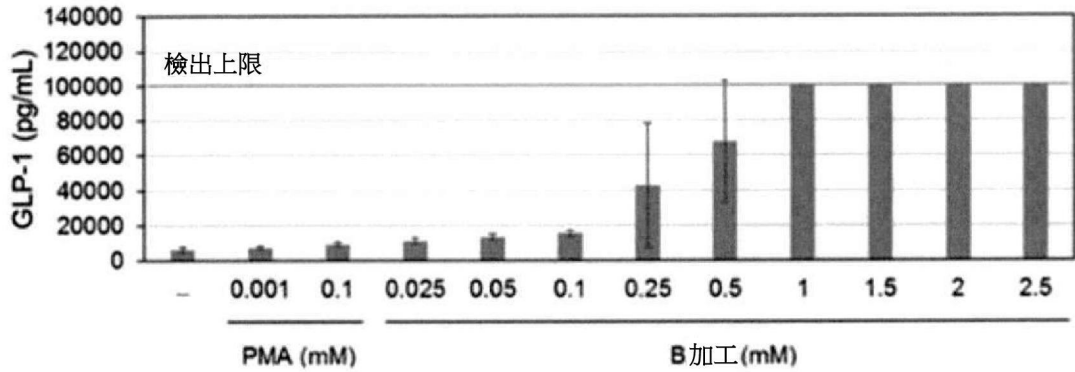
【圖 2】



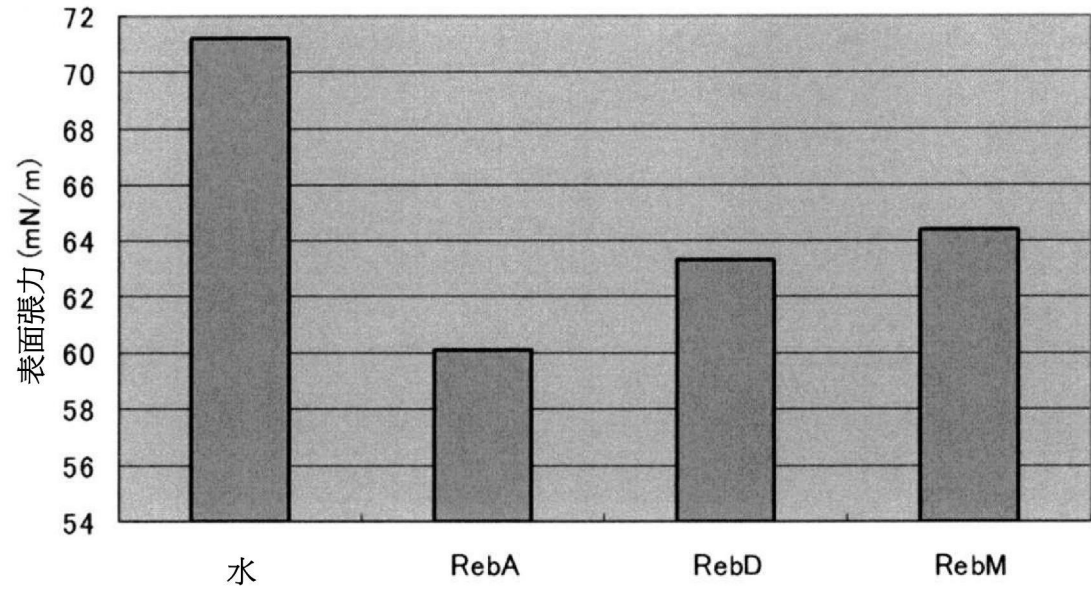
【圖 3】



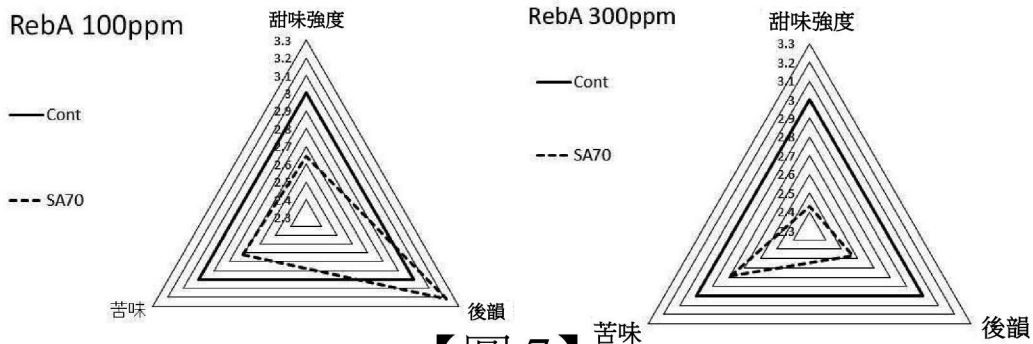
【圖 4】



【圖 5】

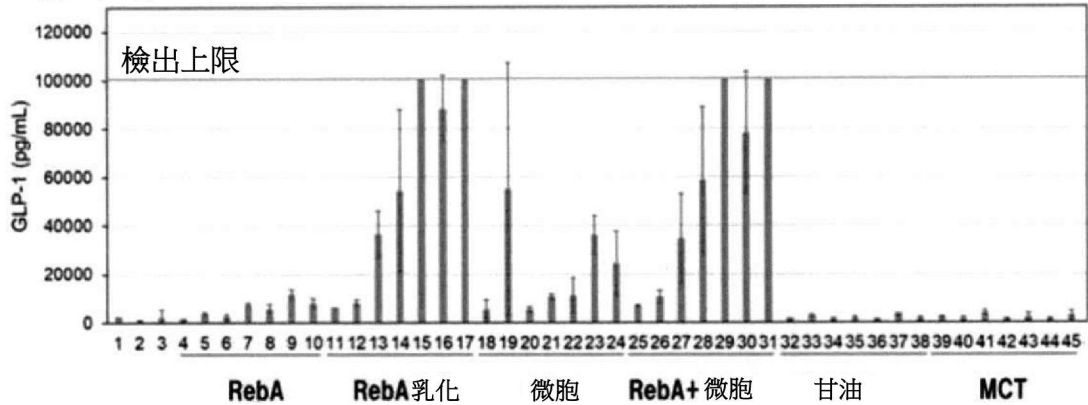


【圖 6】

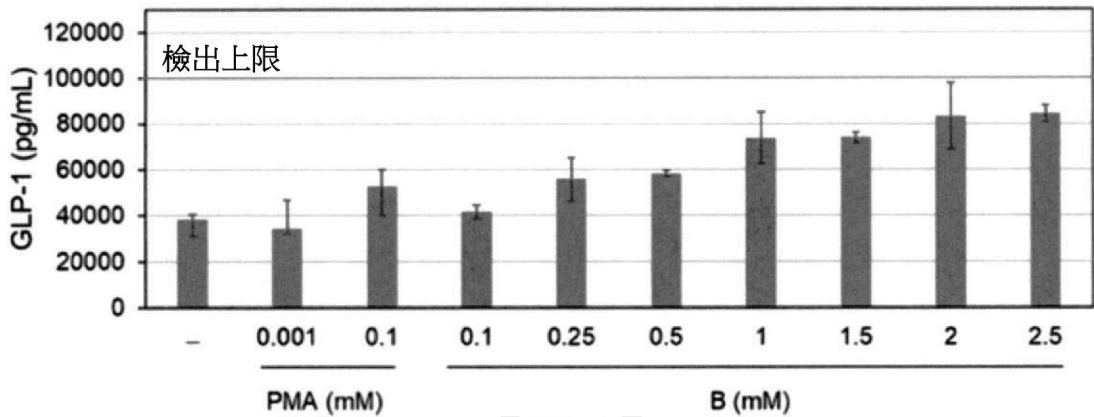


【圖 7】

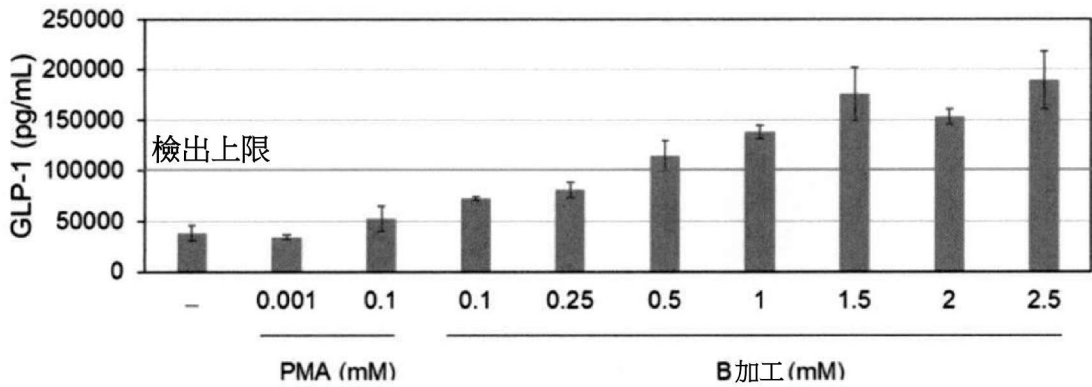
■ 2小時處理



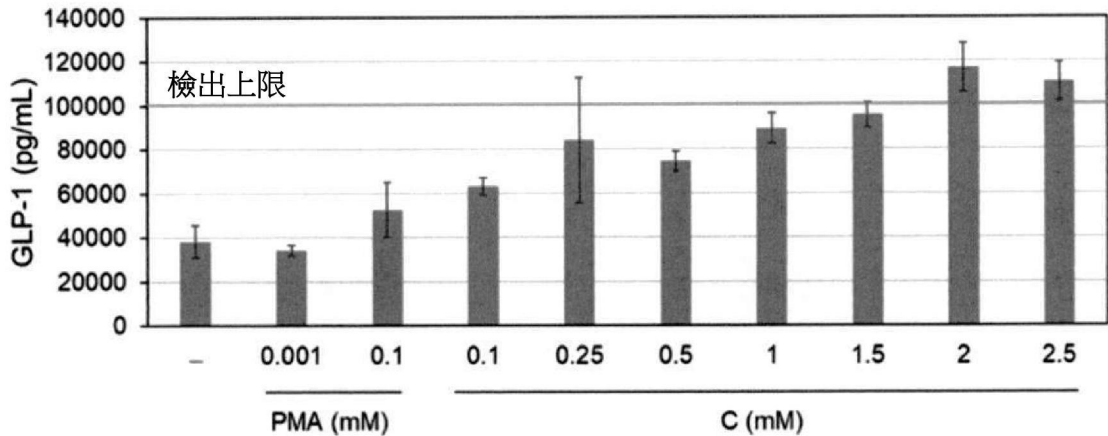
【圖 8】



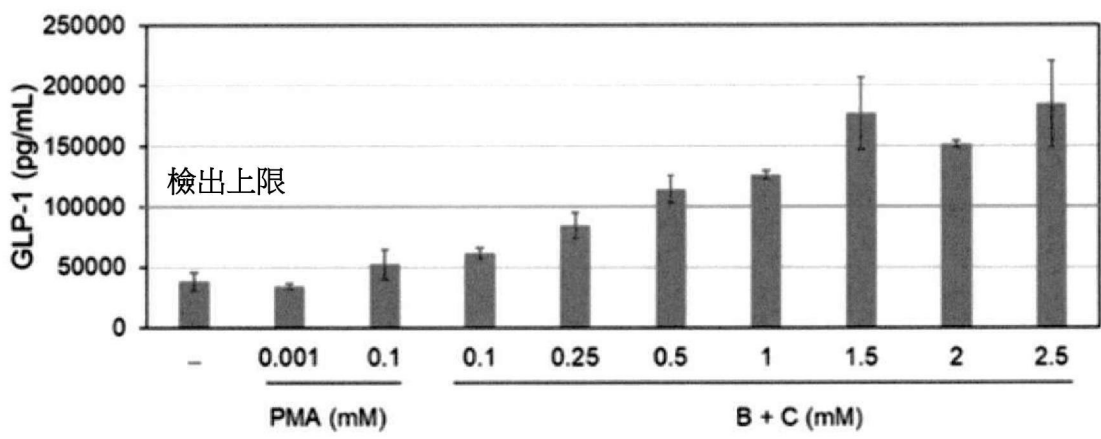
【圖 9】



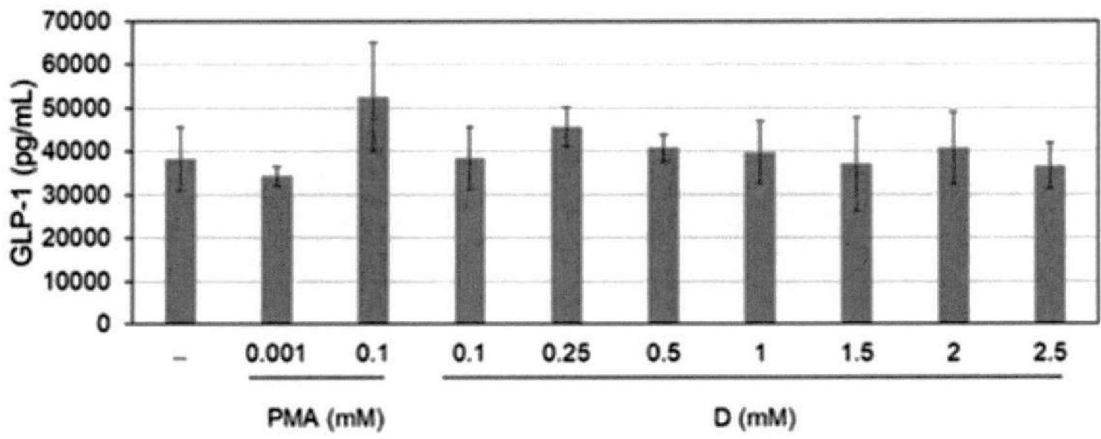
【圖 10】



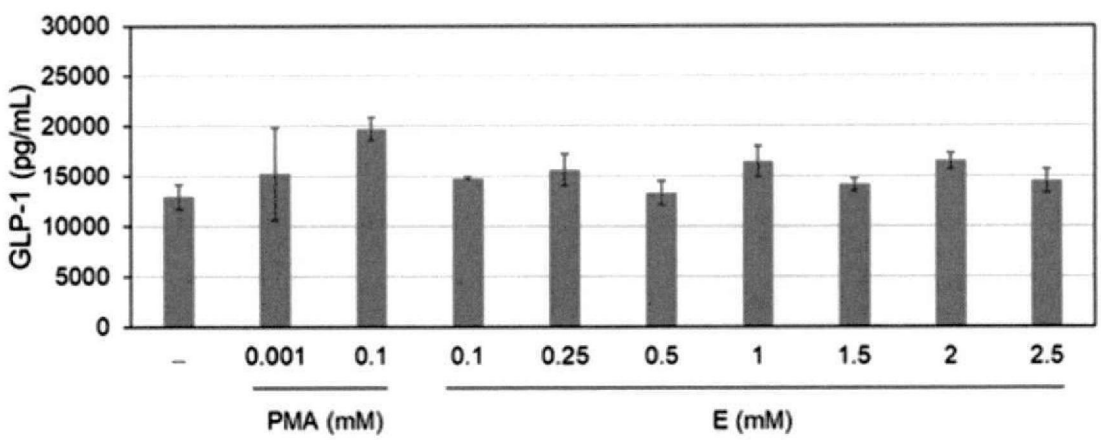
【圖 11】



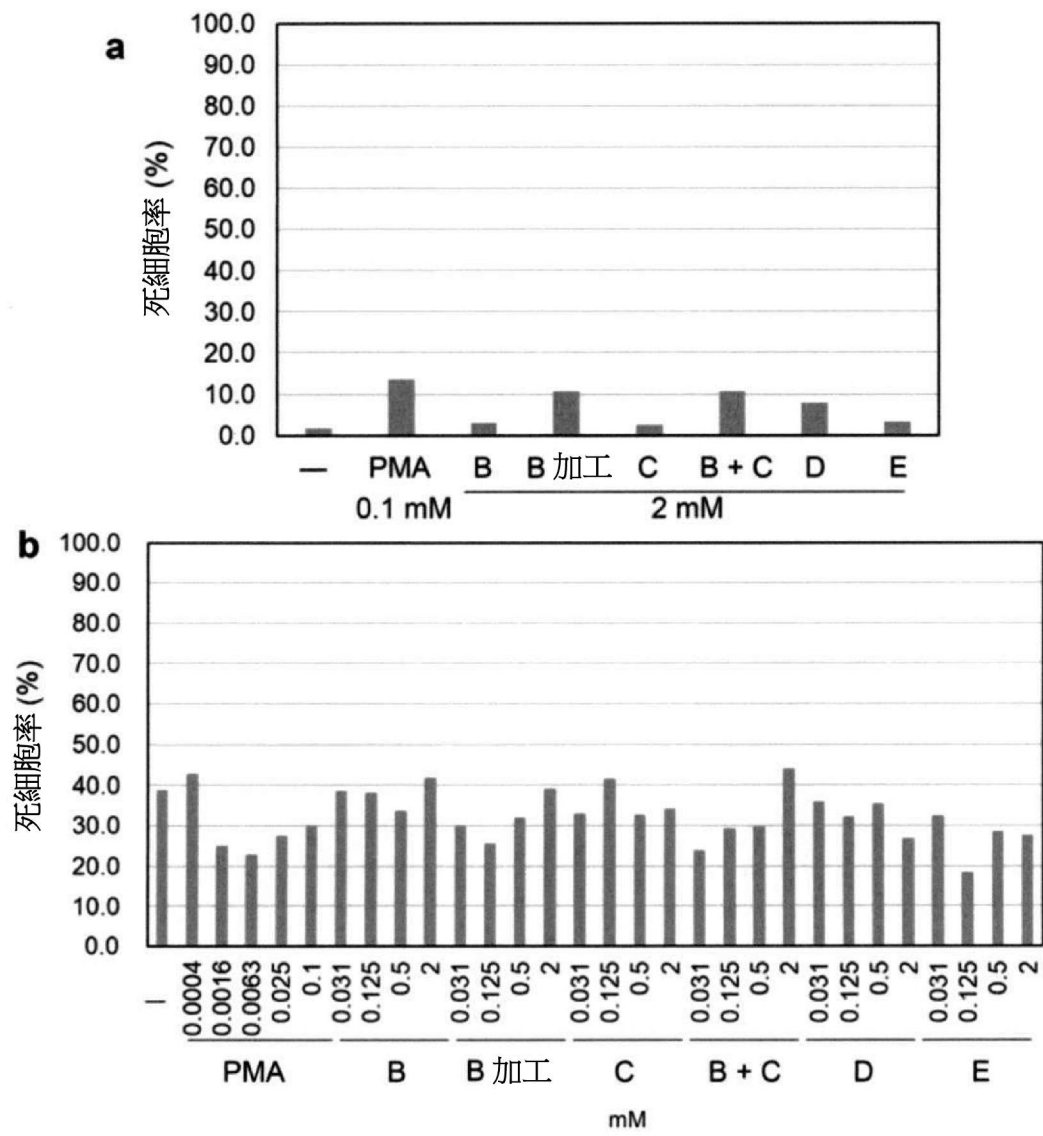
【圖 12】



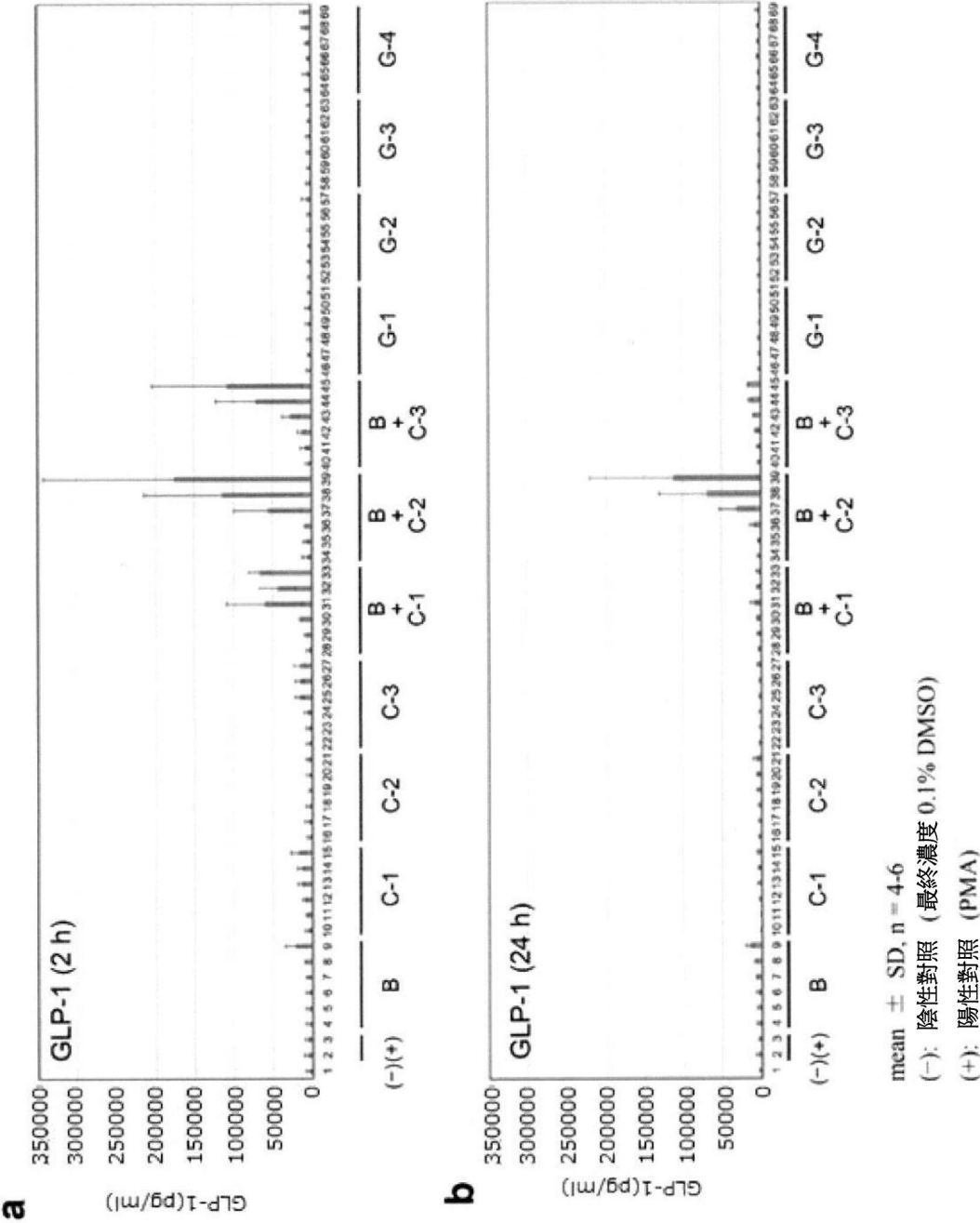
【圖 13】



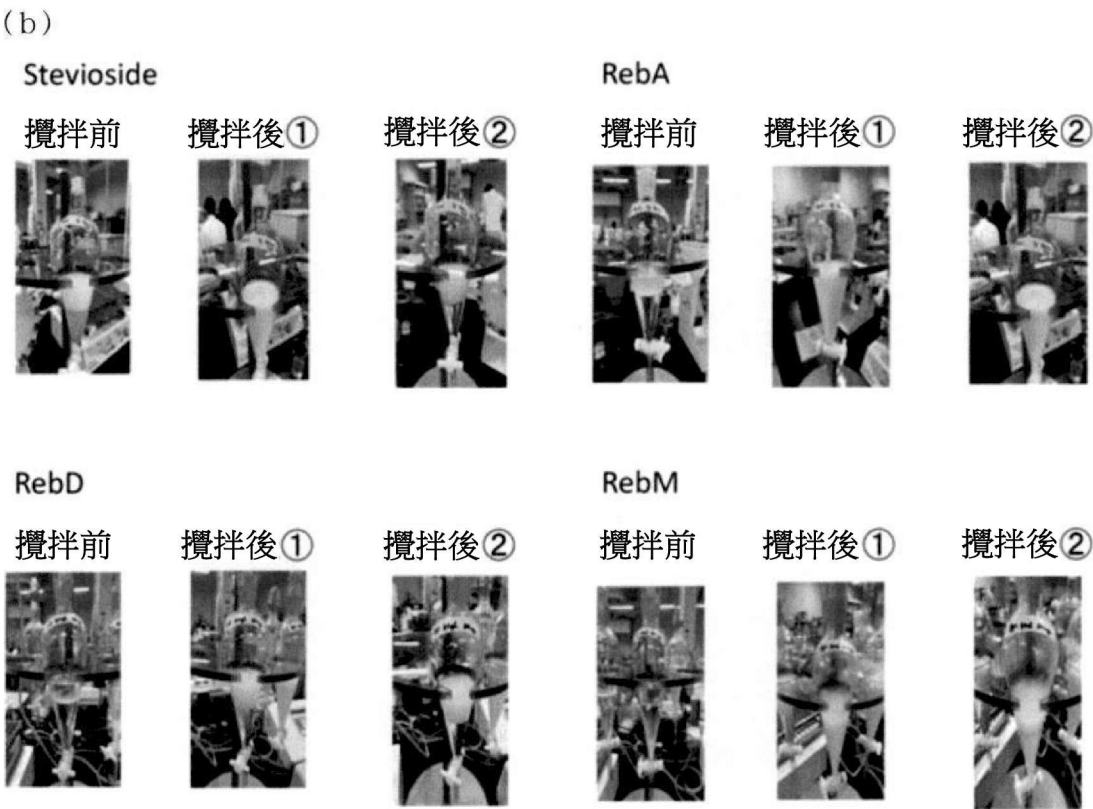
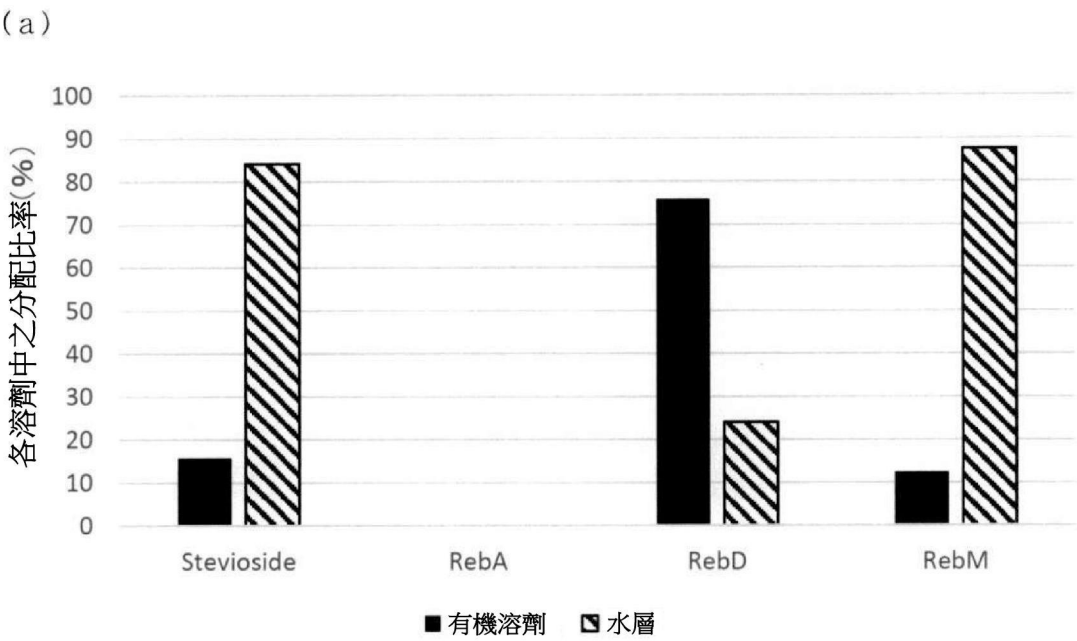
【圖 14】



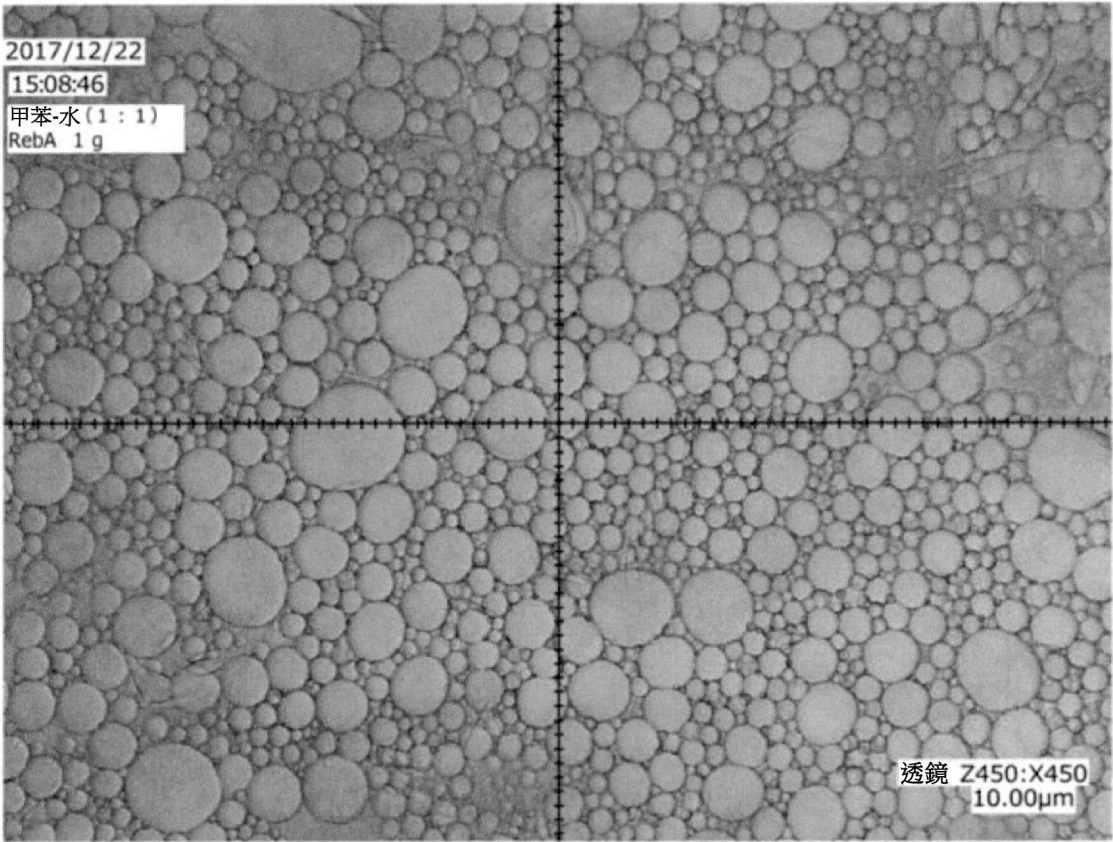
【圖 15】



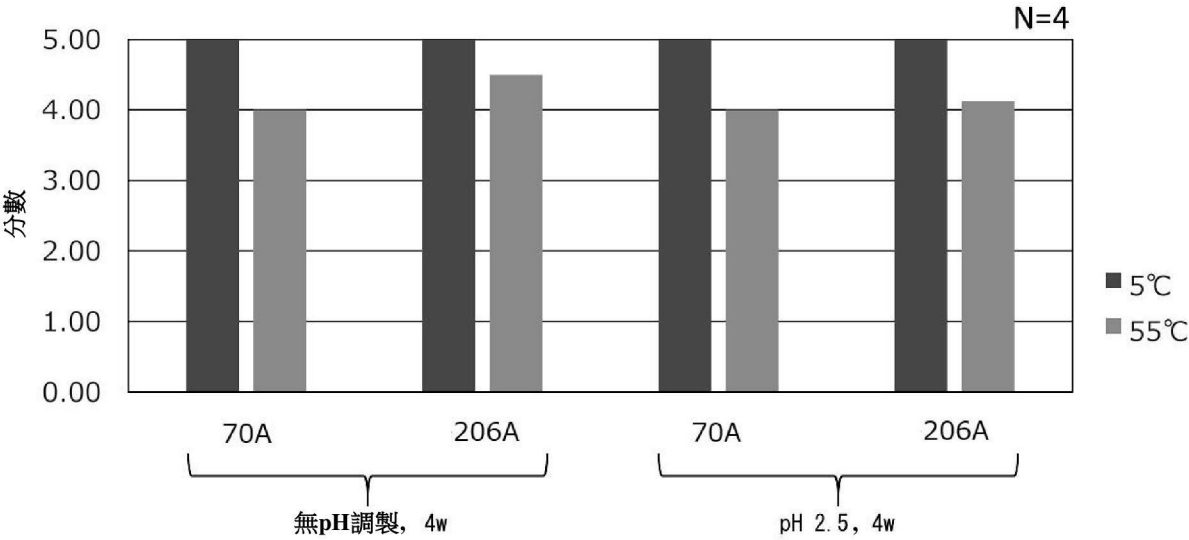
【圖 16】



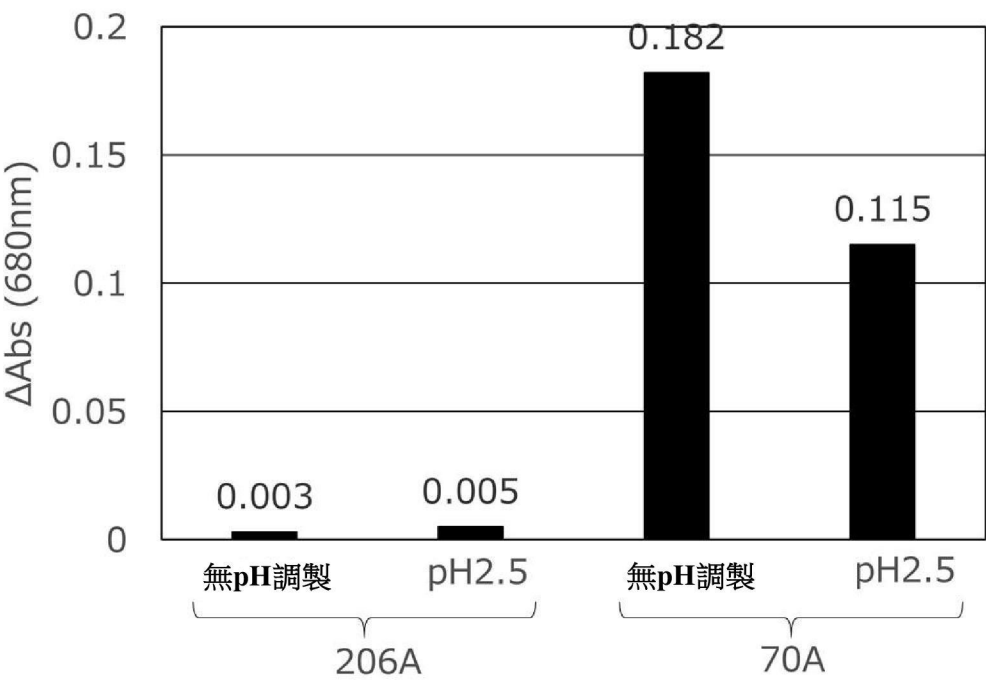
【圖 17】



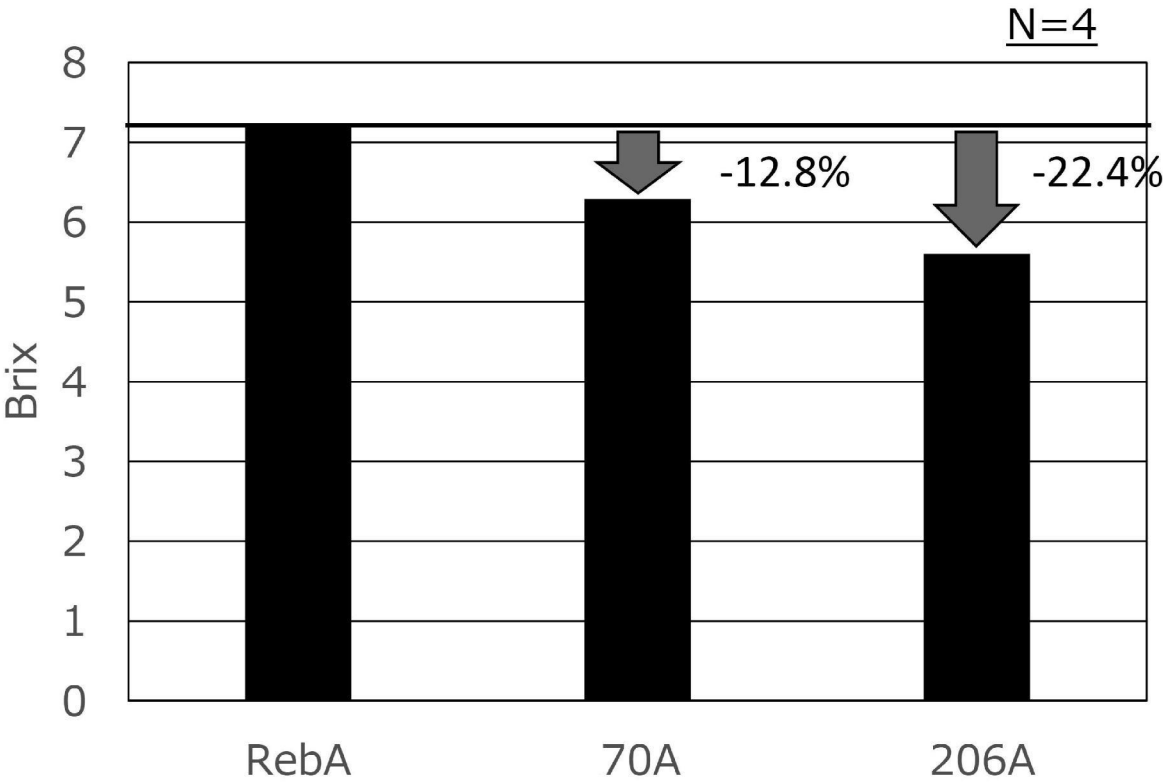
【圖 18】



【圖 19】

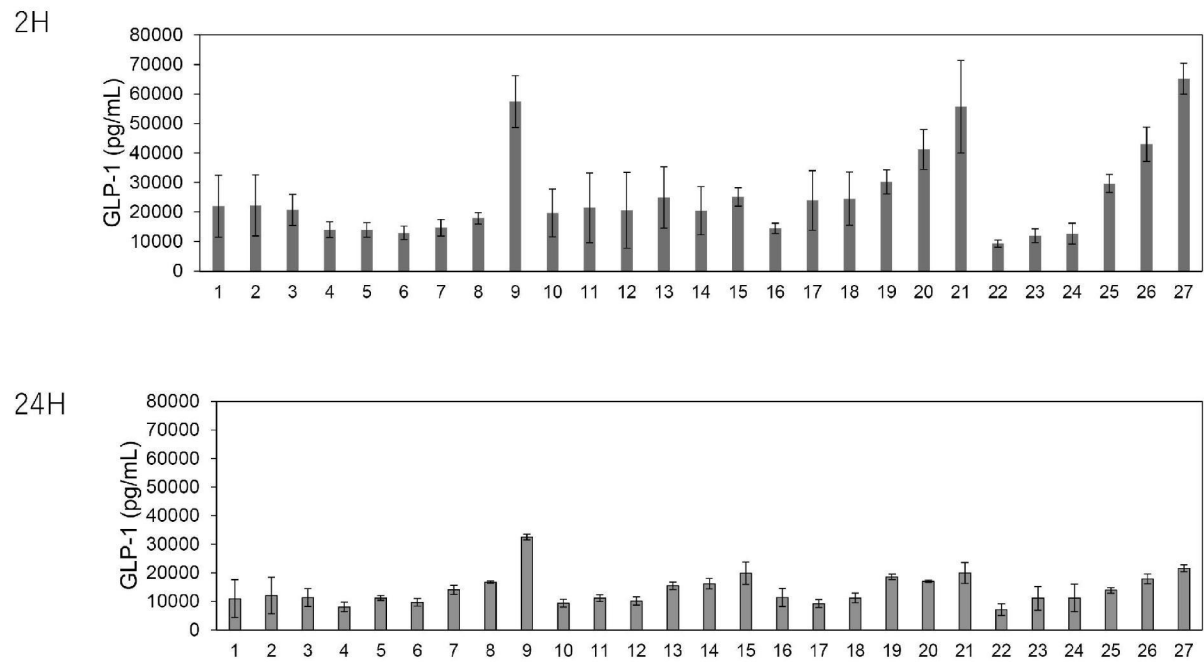


【圖 20】



【圖 21】

GLP-1分泌



【圖 22】