



(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)



1-0047396

(51)^{2020.01} A23L 2/52; A61K 9/10; A61K 31/702; (13) B
A23L 33/10; A23L 33/105

(21) 1-2021-07446

(22) 22/04/2020

(86) PCT/JP2020/017399 22/04/2020

(87) WO 2020/218379 29/10/2020

(30) 2019-086867 26/04/2019 JP

(45) 25/06/2025 447

(43) 25/02/2022 407A

(73) SUNTORY HOLDINGS LIMITED (JP)

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

(72) URAI Soichiro (JP); NAGAO Koji (JP); YOKOO Yoshiaki (JP).

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

(54) CHẾ PHẨM DÙNG ĐỂ THÚC ĐẨY TIẾT GLP-1 VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN
XUẤT CHẾ PHẨM NÀY

(21) 1-2021-07446

(57) Sáng chế đề cập đến chế phẩm để thúc đẩy tiết GLP-1. Chế phẩm dùng để thúc đẩy tiết GLP-1 chứa các hạt đã được nhũ hóa bao gồm thành phần tăng tiết GLP-1 lưỡng tính và chất nhũ hóa, trong đó chất nhũ hóa là chất nhũ hóa loại dầu trong nước và thành phần tăng tiết GLP-1 được hợp nhất vào trong các hạt đã được nhũ hóa.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chế phẩm dùng để thúc đẩy tiết peptit-1 giống glucagon (glucagon-like peptide-1, GLP-1) bao gồm hạt đã được nhũ hóa bao gồm thành phần thúc đẩy tiết GLP-1 lưỡng tính và chất nhũ hóa.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Peptit-1 giống glucagon (GLP-1) là hormone được tiết từ biểu mô niêm mạc dạ dày-ruột và tương tự. GLP-1 được biết đến là có các tác dụng như kích thích tổng hợp và tiết insulin, ức chế tiết glucagon, ức chế hấp thu thực phẩm, và giảm tăng đường-huyết. Có thể hy vọng sự hoạt hóa quá trình tiết GLP-1 để cải thiện các tác dụng này.

Tài liệu sáng chế 1 mô tả mười một loại triterpen kiểu cucurbitan được chứa trong quả mướp đắng như là các thành phần thúc đẩy tiết GLP-1 mới. Tài liệu sáng chế 2 mô tả rằng steviosit, rebaudiosit A, rebaudiosit B, và rebaudiosit D có các tính chất thúc đẩy tiết GLP-1.

Tài liệu trích dẫn

Tài liệu sáng chế

Tài liệu sáng chế 1: WO 2017/159725

Tài liệu sáng chế 2: WO 2017/018404

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Các vấn đề cần được giải quyết bởi sáng chế

Mong đợi sẽ phát triển các thành phần tiết GLP-1 tốt hơn.

Các biện pháp giải quyết vấn đề

Theo một phương án, sáng chế đề xuất các mục sau đây.

[1] Chế phẩm dùng để thúc đẩy tiết GLP-1, trong đó chế phẩm này bao gồm hạt đã được nhũ hóa bao gồm thành phần thúc đẩy tiết GLP-1 lưỡng tính và chất nhũ hóa, trong đó:

chất nhũ hóa là chất nhũ hóa dầu trong nước; và

thành phần thúc đẩy tiết GLP-1 được hợp nhất vào trong hạt đã được nhũ hóa.

[2] Chế phẩm theo mục [1], trong đó thành phần thúc đẩy tiết GLP-1 là rebaudiosit A.

- [3] Chế phẩm theo mục [1] hoặc [2], trong đó giá trị cân bằng ưa nước-ưa chất béo (hydrophilic-lipophilic balance, HLB) của chất nhũ hóa nằm trong khoảng từ 7 đến 18.
- [4] Chế phẩm theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [3], trong đó chất nhũ hóa bao gồm ít nhất một chất được chọn từ nhóm gồm có este của axit béo với polyglyxerol, este của axit béo với propylen glycol, lexitin được xử lý bằng enzym, este của axit béo với sucroza, và monoglyxerit của axit hữu cơ.
- [5] Chế phẩm theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [4], trong đó nhóm ưa nước của chất nhũ hóa được dẫn xuất từ thành phần có tính ngọt.
- [6] Chế phẩm theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [5], trong đó chất nhũ hóa bao gồm ít nhất một chất nhũ hóa được chọn từ nhóm gồm có este của axit béo với polyglyxerol và este của axit béo với sucroza.
- [7] Chế phẩm theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [6], trong đó nhóm ưa nước của chất nhũ hóa bao gồm nhóm phosphat.
- [8] Chế phẩm theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [7], trong đó tỷ lệ của chất nhũ hóa dựa trên thành phần thúc đẩy tiết GLP-1 nằm trong khoảng từ 0,02 đến 50% khối lượng.
- [9] Chế phẩm theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [8], trong đó chế phẩm này bao gồm chất nhũ hóa theo tỷ lệ nằm trong khoảng từ 0,1 đến 5% khối lượng.
- [10] Chế phẩm theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [9], trong đó chế phẩm này bao gồm thành phần thúc đẩy tiết GLP-1 theo tỷ lệ nằm trong khoảng từ 1 đến 20% khối lượng.
- [11] Chế phẩm theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [10], trong đó chế phẩm này dùng để cải thiện sự chuyển hóa đường, để kìm hãm sự thèm ăn, hoặc để ngăn ngừa hoặc cải thiện bệnh đái tháo đường hoặc bệnh béo phì.
- [12] Đồ uống bao gồm chế phẩm theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [11].
- [13] Thực phẩm bao gồm chế phẩm theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [11].
- [14] Dược phẩm bao gồm chế phẩm theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [11].
- [15] Phương pháp sản xuất hạt đã được nhũ hóa trong đó thành phần thúc đẩy tiết GLP-1 đã được hợp nhất, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

trộn chất nhũ hóa dầu trong nước, thành phần thúc đẩy tiết GLP-1 lưỡng tính,

và môi trường nước để điều chế hỗn hợp; và

bổ sung chất béo và dầu vào hỗn hợp và khuấy trộn.

[16] Chế phẩm bao gồm hạt đã được nhũ hóa bao gồm rebaudiosit A và chất nhũ hóa dầu trong nước,

trong đó rebaudiosit A được hợp nhất vào trong hạt đã được nhũ hóa.

Các tác dụng có lợi của sáng chế

Theo sáng chế, bằng cách sử dụng thành phần thúc đẩy tiết GLP-1 lưỡng tính và chất nhũ hóa dầu trong nước, và hợp nhất thành phần thúc đẩy tiết GLP-1 vào trong hạt đã được nhũ hóa, tác dụng thúc đẩy tiết GLP-1 của thành phần thúc đẩy tiết GLP-1 có thể được gia tăng.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là đồ thị thể hiện các lượng tiết GLP-1 của các chất tạo ngọt khác nhau trong ví dụ thực nghiệm 1.

Fig.2 là đồ thị thể hiện mối quan hệ giữa nồng độ của mẫu chứa rebaudiosit C (dưới đây, rebaudiosit đôi khi được viết tắt là Reb) thu được trong ví dụ thực nghiệm 2 và lượng tiết GLP-1.

Fig.3 là đồ thị thể hiện mối quan hệ giữa nồng độ của mẫu chứa steviosit thu được trong ví dụ thực nghiệm 3 và lượng tiết GLP-1.

Fig.4 là đồ thị thể hiện mối quan hệ giữa nồng độ của mẫu chứa rebaudiosit A thu được trong ví dụ thực nghiệm 4 và lượng tiết GLP-1.

Fig.5 là đồ thị thể hiện mối quan hệ giữa nồng độ của mẫu chứa rebaudiosit A đã được nhũ hóa thu được trong ví dụ thực nghiệm 5 và lượng tiết GLP-1.

Fig.6 là đồ thị thể hiện sức căng bề mặt của các chất tạo ngọt khác nhau trong ví dụ thực nghiệm 6.

Fig.7 là đồ thị thể hiện các đặc tính hương vị của RebA trong ví dụ thực nghiệm 7.

Fig.8 là đồ thị thể hiện mối quan hệ giữa nồng độ của các mẫu khác nhau thu được trong các ví dụ thực nghiệm từ 8 đến 13 và lượng tiết GLP-1.

Fig.9 là đồ thị thể hiện mối quan hệ giữa nồng độ của mẫu chứa rebaudiosit A thu được trong ví dụ thực nghiệm 8 và lượng tiết GLP-1.

Fig.10 là đồ thị thể hiện mối quan hệ giữa nồng độ của mẫu chứa rebaudiosit A đã được nhũ hóa thu được trong ví dụ thực nghiệm 9 và lượng tiết GLP-1.

Fig.11 là đồ thị thể hiện mối quan hệ giữa nồng độ của mẫu chứa hạt đã được nhũ hóa thu được trong ví dụ thực nghiệm 10 và lượng tiết GLP-1.

Fig.12 là đồ thị thể hiện mối quan hệ giữa nồng độ của dung dịch hỗn hợp gồm mẫu chứa RebA và mẫu chứa hạt đã được nhũ hóa thu được trong ví dụ thực nghiệm 11 và lượng tiết GLP-1.

Fig.13 là đồ thị thể hiện mối quan hệ giữa nồng độ của mẫu chứa glyxerol thu được trong ví dụ thực nghiệm 12 và lượng tiết GLP-1.

Fig.14 là đồ thị thể hiện mối quan hệ giữa nồng độ của mẫu chứa dầu triglyxerit mạch trung bình (medium-chain triglyceride, MCT) thu được trong ví dụ thực nghiệm 13 và lượng tiết GLP-1.

Fig.15 là đồ thị thể hiện tính độc tế bào (sử dụng các tế bào chết làm chỉ thị) của các mẫu khác nhau thu được trong các ví dụ thực nghiệm từ 15 đến 20. Kết quả sau 2 giờ từ khi sử dụng được thể hiện trong đồ thị a, và kết quả sau 24 giờ từ khi sử dụng được thể hiện trong đồ thị b,

Fig.16 là đồ thị thể hiện lượng tiết GLP-1 của các mẫu khác nhau thu được trong các ví dụ thực nghiệm từ 21 đến 31. Kết quả sau 2 giờ từ khi sử dụng được thể hiện trong đồ thị a, và kết quả sau 24 giờ từ khi sử dụng được thể hiện trong đồ thị b,

Fig.17 thể hiện các kết quả của tỷ lệ phân bố và các ảnh thể hiện trạng thái trong quá trình thử nghiệm của mỗi steviol glycosit thu được trong ví dụ thực nghiệm 32.

Fig.18 là ảnh thể hiện trạng thái của dung dịch chứa RebA sau thử nghiệm trong ví dụ thực nghiệm 32.

Fig.19 là biểu đồ thể hiện tác dụng của nhiệt độ bảo quản lên các đặc tính hương vị trong ví dụ thực nghiệm 33.

Fig.20 là biểu đồ thể hiện độ ổn định trong các môi trường rung trong ví dụ thực nghiệm 33.

Fig.21 là biểu đồ thể hiện mức độ giảm cường độ ngọt do sự nhũ hóa trong ví dụ thực nghiệm 33.

Fig.22 là đồ thị thể hiện lượng tiết GLP-1 trong ví dụ thực nghiệm 34.

Mô tả chi tiết sáng chế

Thông qua nghiên cứu của các tác giả sáng chế, đã phát hiện ra rằng có thể đạt được khả năng thúc đẩy tiết GLP-1 tốt hơn bằng cách hợp nhất thành phần thúc đẩy tiết GLP-1 như RebA vào trong các hạt đã được nhũ hóa như các mixen.

Cũng đã phát hiện ra rằng chế phẩm bao gồm hạt đã được nhũ hóa trong đó thành phần thúc đẩy tiết GLP-1 đã được hợp nhất duy trì trạng thái nhũ hóa sau khi bảo quản, đặc biệt là sau khi bảo quản trong các môi trường khắc nghiệt như các điều kiện nhiệt độ cao, các điều kiện axit, và các môi trường rung, và có xu hướng ít bị giảm mùi vị sau khi bảo quản ở các nhiệt độ cao và độ ổn định bảo quản rất tốt.

Thành phần thúc đẩy tiết GLP-1

Thành phần thúc đẩy tiết GLP-1 là chất hoặc chế phẩm có tính chất mà bản thân chất hoặc chế phẩm này tác động lên các tế bào của người hoặc các động vật không phải là người có khả năng tiết GLP-1 để tăng lượng tiết GLP-1 (dưới đây được gọi là thúc đẩy khả năng tiết GLP-1).

Khi một chất hoặc chế phẩm có khả năng thúc đẩy tiết GLP-1 được sử dụng cho các tế bào tiết GLP-1, lượng tiết GLP-1 được tăng lên. Sự tăng hoặc giảm của lượng tiết GLP-1 được xác nhận theo cách giống như trong các ví dụ thực nghiệm. Nghĩa là, mẫu chứa chất thử nghiệm hoặc chế phẩm thử nghiệm và mẫu so sánh âm không có chất kích thích của cùng một chế phẩm ngoại trừ rằng mẫu này không chứa chất thử nghiệm hoặc chế phẩm thử nghiệm được điều chế, và cả các mẫu được bổ sung vào các tế bào có nguồn gốc từ kết tràng người có khả năng tiết GLP-1 (ví dụ, H716) trong cùng các điều kiện, sau đó lượng tiết GLP-1 được thử nghiệm với mẫu được so sánh với lượng tiết GLP-1 được thử nghiệm với mẫu so sánh âm không có chất kích thích để xác nhận sự tăng hoặc giảm của lượng này. Lưu ý rằng so sánh âm đôi khi ở đây được dùng để chỉ “đối chứng âm”.

Thành phần thúc đẩy tiết GLP-1 được sử dụng theo sáng chế là lưỡng tính. Thuật ngữ “lưỡng tính” có nghĩa là “phân tử hoặc nhóm gồm các nguyên tử có cả phần có ái lực cao với nước (nhóm ưa nước) và phần có ái lực thấp với nước (nhóm kỵ nước)” (xem, Digital Dai-ji-sen Japanese Dictionary).

Thành phần thúc đẩy tiết GLP-1 lưỡng tính có xu hướng có sức căng bề mặt nhỏ hơn nước.

Thành phần thúc đẩy tiết GLP-1 lưỡng tính tốt hơn là bao gồm chất tạo ngọt glycosit có khả năng thúc đẩy tiết GLP-1. Các ví dụ được ưu tiên về chất tạo ngọt glycosit bao gồm steviol glycosit hoặc mogrosit (dưới đây, mogrosit đôi khi được viết tắt là Mog) có khả năng thúc đẩy tiết GLP-1. Các ví dụ được ưu tiên hơn bao gồm rebaudiosit A, rebaudiosit B, phần chiết stevia, steviol glycosit có cấu trúc mà rhamnoza được gắn vào, steviosit, và mogrosit V, và các ví dụ còn được ưu tiên hơn nữa bao gồm rebaudiosit A, rebaudiosit B, rebaudiosit C, steviosit, và mogrosit V.

Chất tạo ngọt glycosit được mô tả ở trên tốt hơn là có sức căng bề mặt Q (mN/m) nằm trong khoảng bất kỳ trong số các khoảng sau đây:

$Q = 40-70, 45-65, 40-60, 50-70, 58-63, 59-62, 60-61, 50-63, 51-63, 52-63, 53-63, 54-63, 55-63, 56-63, 57-63, 59-63, 60-63, 58-62, 58-61, 58-60.$

Sức căng bề mặt Q được đo bằng phương pháp bản mỏng. Chẳng hạn, chất tạo ngọt glycosit, là chất thử nghiệm, được bổ sung với lượng để có Brix 10 trên cơ sở sucroza để điều chế dung dịch nước. Sức căng bề mặt của dung dịch nước điều chế được đo bằng phương pháp bản mỏng bằng cách sử dụng máy đo sức căng bề mặt tự động (loại CBVP-Z, được sản xuất bởi Kyowa Interface Science Co., Ltd).

Trên quan điểm ứng dụng cho thực phẩm và đồ uống, steviol glycosit được điều chế dưới dạng chất tạo ngọt glycosit có khả năng thúc đẩy tiết GLP-1.

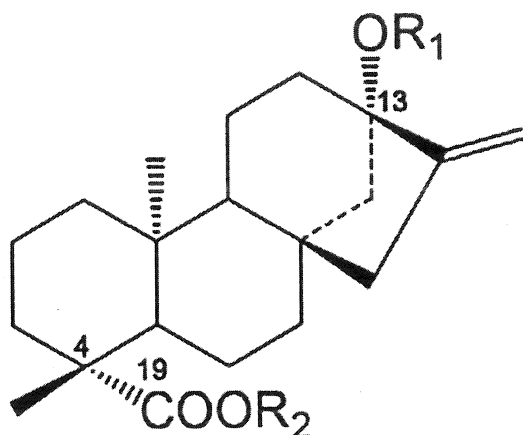
Các ví dụ về thành phần thúc đẩy tiết GLP-1 lưỡng tính khác với chất tạo ngọt glycosit bao gồm protein và glycoprotein. Các ví dụ về chúng bao gồm protein sữa bao gồm casein, muối casein hoặc protein nước sữa; protein lòng đỏ trứng, protein lòng trắng trứng, protein đậu nành, protein bột mì, protein đậu Hà Lan, muxin, proteoglycan, và sản phẩm chế biến của chúng.

Theo sáng chế, rebaudiosit A là được ưu tiên nhất làm thành phần thúc đẩy tiết GLP-1 lưỡng tính. Điều này là do khả năng thúc đẩy tiết GLP-1 của bản thân rebaudiosit A có thể được tăng một cách hiệu quả bằng cách hợp nhất vào trong các hạt đã được nhũ hóa. Lý do cho điều này chưa được biến đến, nhưng các tác giả sáng chế phỏng đoán như sau.

Rebaudiosit A có cấu trúc trong đó bốn glucoza được gắn vào aglycon steviol. Có nhiều loại steviol glycosit khác nhau khác với rebaudiosit A. Ở đây, bằng ví dụ, các cấu trúc của các steviol glycosit được sử dụng trong ví dụ thực nghiệm 32 (đối với tỷ lệ

phân bố) được thể hiện.

Công thức 1



Tên hợp chất	R ₁	R ₂
Rebaudiosit A (rebA)	Glcβ1,2(Gluβ1,3)Gluβ1-	Glcβ1-
Steviosit (stv)	Glcβ1,2Gluβ1-	Glcβ1-
Rebaudiosit D (rebD)	Glcβ1,2(Gluβ1,3)Gluβ1-	Glcβ1,2Glcβ1-
Rebaudiosit M (rebM)	Glcβ1,2(Gluβ1,3)Gluβ1-	Glcβ1,2(Gluβ1,3)Gluβ1-

Khi các tác giả sáng chế đo tỷ lệ phân bố của rebaudiosit A và các steviosit glycosit khác, bất ngờ phát hiện ra rằng chỉ các hệ sử dụng rebaudiosit A có hiện tượng nhũ hóa trong đó dung môi hữu cơ được phân tán vào trong môi trường nước và kết quả là lớp hữu cơ và lớp nước có thể không được tách riêng, mặc dù thực tế là rebaudiosit A và các steviosit glycosit khác chỉ hơi khác về vị trí và số lượng của glucoza được gắn vào. Nghĩa là, rebaudiosit A không chỉ thể hiện tính lưỡng tính, mà còn thể hiện khả năng nhũ hóa tốt hơn nhiều các steviol glycosit khác.

Sức căng bề mặt cũng được nghiên cứu, và đã phát hiện ra rằng hiệu quả hoạt động bề mặt của RebA cao hơn hiệu quả của các glycosit khác. Sức căng bề mặt thấp này của RebA và đặc điểm cấu trúc của RebA trong đó các glucoza được gắn vào ở các

vị trí 13 và 19 của trục chính steviol được cho là làm cho RebA tương đối có xu hướng lưỡng tính bằng cách có các gốc kỵ nước và ưa nước. Do đó, cho rằng rebaudiosit A có xu hướng được hợp nhất vào trong vỏ có ở bên ngoài lõi của các hạt đã được nhũ hóa, điều này dẫn đến việc tăng mạnh khả năng thúc đẩy tiết GLP-1.

Chất nhũ hóa

Chất nhũ hóa được sử dụng theo sáng chế là chất nhũ hóa dầu trong nước.

Được ưu tiên là chất nhũ hóa dầu trong nước có một trong số các giá trị HLB sau đây: 7 đến 18, 9 đến 18, 11 đến 18, 13 đến 18, 15 đến 18, 7 đến 17, 7 đến 15, 7 đến 13, 7 đến 11, 7 đến 9, 9 đến 16, hoặc 11 đến 14.

Theo sáng chế, giá trị HLB được tính bằng phương pháp của Griffin.

Theo sáng chế, chất nhũ hóa dầu trong nước có thể là, nhưng không bị giới hạn ở, chất nhũ hóa dầu trong nước đã biết. Các ví dụ về chất nhũ hóa dầu trong nước trong điều kiện trong đó giá trị HLB là một trong số các giá trị nêu trên bao gồm este của axit béo với glyxerol như monoglyxerit, monoglyxerit của axit hữu cơ, và este của axit béo với polyglyxerol; este của axit béo với sorbitan; este của axit béo với sucroza; este của axit béo với propylen glycol; stearyl lactat; polysorbat; lexitin như lexitin thực vật, lexitin lòng đỏ trứng, lexitin phân đoạn, hoặc lexitin được xử lý bằng enzym; phân chiết kiraya, phân chiết bột yucca; sterol thực vật, sphingolipit; bột mật, và sterol động vật.

Các ví dụ được ưu tiên về chất nhũ hóa dầu trong nước trong điều kiện trong đó giá trị HLB là một trong số các giá trị nêu trên bao gồm ít nhất một chất được chọn từ nhóm gồm có este của axit béo với polyglyxerol, este của axit béo với propylen glycol, lexitin được xử lý bằng enzym, este của axit béo với sucroza, và monoglyxerit của axit hữu cơ.

Theo cách khác, được ưu tiên là chất nhũ hóa được sử dụng bao gồm chất nhũ hóa trong đó nhóm ưa nước được dẫn xuất từ thành phần có tính ngọt trong điều kiện trong đó giá trị HLB là một trong số các giá trị nêu trên, và đặc biệt được ưu tiên là chất nhũ hóa được sử dụng bao gồm ít nhất một chất nhũ hóa được chọn từ nhóm gồm có este của axit béo với polyglyxerol và este của axit béo với sucroza.

Hơn nữa, trong điều kiện trong đó giá trị HLB là một trong số các giá trị nêu trên, được ưu tiên là chất nhũ hóa bao gồm chất nhũ hóa có nhóm ưa nước bao gồm nhóm phosphat, và đặc biệt được ưu tiên là chất nhũ hóa bao gồm lexitin.

Chế phẩm

Trong chế phẩm của sáng chế, thành phần thúc đẩy tiết GLP-1 được hợp nhất vào trong hạt đã được nhũ hóa.

Theo sáng chế, “hạt đã được nhũ hóa” có nghĩa là hạt dạng keo trong đó các phân tử hoặc các ion được dẫn xuất từ chất nhũ hóa tập hợp lại để tạo ra hạt dạng keo. Trong phạm vi các chất nhũ hóa, các hạt dạng keo đôi khi được gọi theo cách khác là các mixen, các nhũ tương nano, các nhũ tương, hoặc tương tự, phụ thuộc vào kích thước (xem, Toshiyuki Suzuki, J. Soc. Cosmet. Jpn., Vol. 44, No. 2, 2010). “Hạt đã được nhũ hóa” theo sáng chế bao gồm tất cả các loại này.

Cụm từ “thành phần thúc đẩy tiết GLP-1 được hợp nhất vào trong hạt đã được nhũ hóa” có nghĩa là phân tử hoặc ion được dẫn xuất từ ít nhất một phần của thành phần thúc đẩy tiết GLP-1 được hợp nhất vào trong ít nhất một phần của hạt đã được nhũ hóa được bao gồm trong chế phẩm. Thuật ngữ “được hợp nhất” có nghĩa là ít nhất một phần của phân tử hoặc ion được dẫn xuất từ thành phần thúc đẩy tiết GLP-1 có mặt ở bên trong của hoặc tiếp xúc với hạt đã được nhũ hóa. “Bên trong của hạt đã được nhũ hóa” có nghĩa là lõi của hạt đã được nhũ hóa, hoặc vỏ nằm ở hoặc bên ngoài lõi của hạt đã được nhũ hóa và chủ yếu bao gồm một phần của nhóm ưa nước đến nhóm kỵ nước của chất nhũ hóa. Do thành phần thúc đẩy tiết GLP-1 là lưỡng tính, cho rằng thành phần thúc đẩy tiết GLP-1 chủ yếu có mặt trong hoặc có xu hướng tiếp xúc với vỏ của hạt đã được nhũ hóa. Khi thành phần thúc đẩy tiết GLP-1 được hợp nhất vào trong hạt đã được nhũ hóa, thành phần thúc đẩy tiết GLP-1 có xu hướng được bao gồm trong phân đoạn trên phía hạt đã được nhũ hóa khi cắt phân đoạn giữa hạt đã được nhũ hóa và môi trường nước.

Được ưu tiên là tỷ lệ hợp nhất thành phần thúc đẩy tiết GLP-1 vào hạt đã được nhũ hóa nằm trong khoảng từ 10 đến 90%. Tỷ lệ hợp nhất được biểu diễn bằng công thức sau đây:

$$\text{Tỷ lệ hợp nhất (\%)} = (\text{Lượng của thành phần thúc đẩy tiết GLP-1 được hợp nhất vào trong hạt đã được nhũ hóa} / \text{Lượng của tổng thành phần thúc đẩy tiết GLP-1 trong chế phẩm}) \times 100$$

Trong quá trình tính tỷ lệ hợp nhất, thành phần thúc đẩy tiết GLP-1 được hợp nhất vào trong hạt đã được nhũ hóa và thành phần thúc đẩy tiết GLP-1 không được hợp

nhất vào trong hạt đã được nhũ hóa có thể được tách riêng ra khỏi chế phẩm đã được nhũ hóa. Cụ thể là, chế phẩm đã được nhũ hóa được tách như lọc bằng bộ lọc, lọc ly tâm, tách trên cột, hoặc cách tương tự.

Tốt hơn là, việc lọc bằng bộ lọc được thực hiện để tách.

Kích thước hạt trung bình của các hạt đã được nhũ hóa tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,05 đến 0,5, 0,07 đến 0,5, 0,05 đến 0,4, 0,05 đến 0,3, 0,05 đến 0,2, 0,05 đến 0,1, 0,1 đến 0,4, 0,2 đến 0,3, 0,07 đến 0,15, 0,07 đến 0,12 hoặc 0,07 đến 0,09 μ m ở giai đoạn trước khi bảo quản (ví dụ, trong vòng nửa ngày từ khi sản xuất).

Kích thước hạt trung bình của các hạt đã được nhũ hóa có xu hướng không thay đổi nhiều sau thời gian bảo quản lâu dài. Chẳng hạn, khi chế phẩm thúc đẩy tiết GLP-1 của sáng chế được bảo quản ở 4°C trong 2 tháng sau khi điều chế, mức thay đổi R về kích thước hạt trung bình trước và sau khi bảo quản ($R = \text{Kích thước hạt trung bình sau khi bảo quản} / \text{Kích thước hạt trung bình trước khi bảo quản} \times 100 - 100$) nằm trong khoảng từ -40% đến +40%, -37% đến +37%, -35% đến +35%, -20% đến +20%, hoặc -12% đến +12%.

Kích thước hạt trung bình của các hạt đã được nhũ hóa có thể được đo bằng phương pháp tán xạ nhiễu xạ laze. Chẳng hạn, như được thể hiện trong các ví dụ được mô tả sau đây, kích thước hạt trung bình của các hạt đã được nhũ hóa có thể được đo bằng cách làm loãng mẫu theo cách thích hợp bằng nước trao đổi ion để cường độ tán xạ laze bằng khoảng 1%, và sau đó đo mẫu đã được làm loãng bằng máy đo sự phân bố kích thước hạt loại tán xạ laze (Spectris Co., Ltd., Malvern Panalytical).

Tỷ lệ (% khối lượng) của chất nhũ hóa dựa trên thành phần thúc đẩy tiết GLP-1 tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,02 đến 50, 0,07 đến 50, 0,1 đến 50, 0,4 đến 50, 0,7 đến 50, 1 đến 50, 5 đến 50, 10 đến 50, 20 đến 50, 30 đến 50, 40 đến 50, 0,02 đến 40, 0,02 đến 30, 0,02 đến 20, 0,02 đến 10, 0,02 đến 5, 0,02 đến 1, 0,07 đến 40, 0,1 đến 30, 0,4 đến 20, 0,7 đến 10, 1 đến 5, 1 đến 100, 5 đến 100, 9 đến 100, 1 đến 100, 1 đến 90, 1 đến 80, 1 đến 70, 1 đến 60, 1 đến 50, 1 đến 40, 1 đến 30, 1 đến 20, 1 đến 10, 5 đến 99, 5 đến 90, 5 đến 80, 5 đến 70, 5 đến 60, 5 đến 50, 5 đến 40, 5 đến 30, 5 đến 20, 5 đến 10, 10 đến 50, 20 đến 50, 30 đến 50, 40 đến 50, 5 đến 40, 10 đến 30% khối lượng.

Theo cách khác, tỷ lệ (% khối lượng) của chất nhũ hóa dựa trên thành phần thúc đẩy tiết GLP-1 tốt hơn là nằm trong khoảng từ 5 đến 200, 7 đến 200, 9 đến 200, 10 đến

200, 30 đến 200, 50 đến 200, 70 đến 200, 90 đến 200, 110 đến 200, 130 đến 200, 150 đến 200, 170 đến 200, 5 đến 180, 5 đến 160, 5 đến 140, 5 đến 120, 5 đến 100, 5 đến 80, 5 đến 60, 5 đến 40, 5 đến 30, 5 đến 20, 7 đến 180, 9 đến 160, 10 đến 140, 30 đến 120, 50 đến 100, 10,0 đến 180, 10,0 đến 160, 10,0 đến 140, 10,0 đến 120, 10,0 đến 100, 10,0 đến 80 hoặc 10,0 đến 60% khối lượng.

Hàm lượng (% khối lượng) của chất nhũ hóa trong chế phẩm của sáng chế tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,1 đến 5, 0,1 đến 4, 0,1 đến 3, 0,1 đến 2, 0,1 đến 1, 0,3 đến 5, 0,5 đến 5, 0,7 đến 5, 0,9 đến 5, 1,1 đến 5, 2,1 đến 5, 3,1 đến 5, 4,1 đến 5, 0,3 đến 4, 0,5 đến 3, 0,7 đến 2, 0,9 đến 1, 0,3 đến 5, 0,5 đến 5,0, 0,7 đến 5,0, 0,9 đến 5,0, 1 đến 5,0, 1,5 đến 5,0, 2 đến 5,0, 2,5 đến 5,0, 3 đến 5,0, 3,5 đến 5,0, 4 đến 5,0, 4,5 đến 5,0, 0,1 đến 4, 0,1 đến 3, 0,1 đến 2, 0,1 đến 1, 0,1 đến 0,8, 0,1 đến 0,6, 0,1 đến 0,4, 0,1 đến 0,2, 0,2 đến 4,5, 0,3 đến 4,0, 0,4 đến 3,5, 0,5 đến 3,0, 0,6 đến 2,5, 0,7 đến 2,0, 0,8 đến 1,5, hoặc 0,9 đến 1,0% khối lượng, trên cơ sở khối lượng.

Theo cách khác, hàm lượng (% khối lượng) của chất nhũ hóa trong chế phẩm của sáng chế tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,001 đến 1, 0,001 đến 0,5, 0,001 đến 0,25, 0,001 đến 0,2, 0,01 đến 1, 0,01 đến 0,5, 0,01 đến 0,25, 0,01 đến 0,2, 0,1 đến 1, 0,1 đến 10, 0,4 đến 10, 0,7 đến 10, 1 đến 10, 3 đến 10, 5 đến 10, 7 đến 10, 0,1 đến 8, 0,1 đến 6, 0,1 đến 4, 0,1 đến 2, 1 đến 8, 1 đến 7, 1 đến 6, 3 đến 10, 3 đến 7, 3 đến 6, hoặc 5 đến 7% khối lượng, trên cơ sở khối lượng.

Hàm lượng (% khối lượng) của thành phần thúc đẩy tiết GLP-1 trong chế phẩm của sáng chế tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,1 đến 50, 1 đến 20, 0,1 đến 40, 0,1 đến 30, 0,1 đến 20, 0,1 đến 10, 0,1 đến 5, 0,1 đến 1, 0,4 đến 50, 0,7 đến 50, 1 đến 50, 5 đến 50, 10 đến 50, 20 đến 50, 30 đến 50, 40 đến 50, 0,4 đến 40, 0,7 đến 30, 1 đến 20, 5 đến 10, 2 đến 15, 2 đến 10, 2 đến 5, 5 đến 20, 8 đến 20, 11 đến 20, 14 đến 20, 17 đến 20, 5 đến 15, hoặc 8 đến 10% khối lượng.

Theo cách khác, hàm lượng (% khối lượng) của thành phần thúc đẩy tiết GLP-1 trong chế phẩm của sáng chế tốt hơn là nằm trong khoảng từ 1 đến 500,000, 1 đến 400,000, 1 đến 300,000, 1 đến 200,000, 1 đến 100,000, 1 đến 80,000, 1 đến 60,000, 1 đến 40,000, 1 đến 20,000, 1 đến 10,000, 1 đến 8,000, 1 đến 6,000, 1 đến 4,000, 1 đến 2,000, 1 đến 1,000, 1 đến 500, 50 đến 500,000, 100 đến 500,000, 500 đến 500,000, 1000 đến 500,000, 1500 đến 500,000, 3,000 đến 500,000, 4,500 đến 500,000, 6,000 đến

500,000, 7,500 đến 500,000, 9,000 đến 500,000, 10,000 đến 500,000, 50,000 đến 500,000, 100,000 đến 500,000, 200,000 đến 500,000, 300,000 đến 500,000, 400,000 đến 500,000, 50 đến 400,000, 100 đến 300,000, 500 đến 200,000, 1000 đến 100,000, 1500 đến 80,000, 3,000 đến 60,000, 4,500 đến 40,000, 6,000 đến 20,000, hoặc 7,500 đến 10,000ppm, trên cơ sở khối lượng. Theo cách khác, tốt hơn là hàm lượng này nằm trong khoảng từ 25 đến 550, 30 đến 550, 35 đến 550, 40 đến 550, 45 đến 550, 50 đến 550, 55 đến 550, 20 đến 540, 25 đến 540, 30 đến 540, 35 đến 540, 40 đến 540, 45 đến 540, 50 đến 540, 55 đến 540, 20 đến 530, 25 đến 530, 30 đến 530, 35 đến 530, 40 đến 530, 45 đến 530, 50 đến 530, 55 đến 530, 20 đến 520, 25 đến 520, 30 đến 520, 35 đến 520, 40 đến 520, 45 đến 520, 50 đến 520, 55 đến 520, 20 đến 510, 25 đến 510, 30 đến 510, 35 đến 510, 40 đến 510, 45 đến 510, 50 đến 510, 55 đến 510, 20 đến 505, 25 đến 505, 30 đến 505, 35 đến 505, 40 đến 505, 45 đến 505, 50 đến 505, 55 đến 505, 20 đến 500, 25 đến 500, 30 đến 500, 35 đến 500, 40 đến 500, 45 đến 500, 50 đến 500, 55 đến 500, 20 đến 495, 25 đến 495, 30 đến 495, 35 đến 495, 40 đến 495, 45 đến 495, 50 đến 495, 55 đến 495, 20 đến 490, 25 đến 490, 30 đến 490, 35 đến 490, 40 đến 490, 45 đến 490, 50 đến 490, hoặc 55 đến 490ppm, trên cơ sở khối lượng. Theo cách khác, tốt hơn là hàm lượng này nằm trong khoảng từ 1 đến 1500, 1 đến 1200, 5 đến 1200, 1 đến 1000, 5 đến 1000, 10 đến 1000, 1 đến 900, 5 đến 900, 10 đến 900, 15 đến 900, 20 đến 900, 25 đến 900, 30 đến 900, 35 đến 900, 40 đến 900, 45 đến 900, 50 đến 900, 55 đến 900, 1 đến 800, 5 đến 800, 10 đến 800, 15 đến 800, 20 đến 800, 25 đến 800, 30 đến 800, 35 đến 800, 40 đến 800, 45 đến 800, 50 đến 800, 55 đến 800, 1 đến 700, 5 đến 700, 10 đến 700, 15 đến 700, 20 đến 700, 25 đến 700, 30 đến 700, 35 đến 700, 40 đến 700, 45 đến 700, 50 đến 700, 55 đến 700, 1 đến 600, 5 đến 600, 10 đến 600, 15 đến 600, 20 đến 600, 25 đến 600, 30 đến 600, 35 đến 600, 40 đến 600, 45 đến 600, 50 đến 600, 55 đến 600, 1 đến 550, 1 đến 540, 1 đến 530, 1 đến 520, 1 đến 510, 1 đến 505, 1 đến 500, 1 đến 495, 1 đến 490, 5 đến 550, 5 đến 540, 5 đến 530, 5 đến 520, 5 đến 510, 5 đến 505, 5 đến 500, 5 đến 495, 5 đến 490, 10 đến 550, 10 đến 540, 10 đến 530, 10 đến 520, 10 đến 510, 10 đến 505, 10 đến 500, 10 đến 495, 10 đến 490, 15 đến 550, 15 đến 540, 15 đến 530, 15 đến 520, 15 đến 510, 15 đến 505, 15 đến 500, 15 đến 495, hoặc 15 đến 490ppm, trên cơ sở khối lượng.

Theo cách khác, hàm lượng của thành phần thúc đẩy tiết GLP-1 trong chế phẩm của sáng chế tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,1 đến 25,000, 1 đến 25000, 10 đến 25000,

0,1 đến 2500, 1 đến 2500, hoặc 10 đến 2500ppm, trên cơ sở khối lượng.

Khả năng thúc đẩy tiết GLP-1 của chế phẩm của sáng chế được tăng so với khả năng này của một mình thành phần thúc đẩy tiết GLP-1. Khả năng thúc đẩy tiết GLP-1 của chế phẩm của sáng chế có được tăng hay không khi so sánh với khả năng này của một mình thành phần thúc đẩy tiết GLP-1 được xác nhận bằng phương pháp sau đây. Nghĩa là, chế phẩm của sáng chế và chế phẩm cần được so sánh là giống nhau ngoại trừ rằng chỉ thành phần thúc đẩy tiết GLP-1 được chứa dưới dạng thành phần hoạt tính được điều chế. Chế phẩm của sáng chế và chế phẩm cần được so sánh được sử dụng cho các tế bào có khả năng tiết GLP-1, và lượng tiết GLP-1 được đo. Nếu lượng tiết GLP-1 khi sử dụng chế phẩm của sáng chế lớn hơn lượng tiết GLP-1 khi sử dụng chế phẩm cần được so sánh, xác định được là khả năng thúc đẩy tiết GLP-1 được cải thiện. Tốt hơn là, khả năng thúc đẩy tiết GLP-1 của chế phẩm của sáng chế được tăng lớn hơn hoặc bằng 1,05 lần, tốt hơn nữa là lớn hơn hoặc bằng 1,1 lần, đặc biệt tốt hơn là nằm trong khoảng từ 1,2 đến 100 lần, và tốt nhất là 2 đến 50 lần so với khả năng thúc đẩy tiết GLP-1 của một mình thành phần thúc đẩy tiết GLP-1.

Chế phẩm của sáng chế có thể bao gồm thành phần khác khác với thành phần thúc đẩy tiết GLP-1 và chất nhũ hóa.

Thành phần khác này được xác định một cách thích hợp phụ thuộc vào mục đích sử dụng, v.v., của chế phẩm của sáng chế. Các ví dụ về thành phần khác bao gồm chất tạo ngọt, tá dược, chất kết dính, chất làm rắn, chất bao, chất làm trơn, chất tạo màu, chất làm biến đổi vị và hương, chất làm ổn định, chất tăng cường hấp thu, chất điều chỉnh độ pH, chất bảo quản, chất chống oxy hóa, chất tạo hương vị, vitamin, hợp phần kim loại vết, và chất tương tự.

Chất tạo ngọt của thành phần khác có thể là chất tạo ngọt tự nhiên, rượu đường, chất tạo ngọt nhân tạo, hoặc chất tương tự. Các ví dụ bao gồm glucoza; fructoza; maltoza; sucroza; lactoza; đường hiếm; chất tạo ngọt trên cơ sở peptit như aspartam, neotam, alitam; dẫn xuất sucroza như sucraloza; chất tạo ngọt tổng hợp như axesulfam K, sacarin, advantam, natri xyclohexylsulfamat, và dulxin; chất tạo ngọt trên cơ sở protein thực vật như monenlin, curculin, brazzein, và thaumatin; taumarin; neohesperidin dihydrochalcon; rượu đường như erytritol, xylitol, sorbitol, maltitol, và manitol; rượu mạnh có hàm lượng fructoza cao; rượu mạnh chứa fructoza-glucoza; rượu

mạnh chứa glucoza-fructoza; oligosacarit; mật ong; nước ép mía (xi rô đường nâu); đường (đường trắng, đường vàng, đường nâu, đường Nhật Bản tinh luyện, và đường tương tự); xi rô cây thích; rỉ mật; và xi rô tinh bột.

Là thành phần khác, thành phần có thể có mặt chọn lọc trong trung tâm (lõi) của hạt đã được nhũ hóa, như chất béo và dầu, được sử dụng một cách thích hợp. Để làm chất béo và dầu, dầu MCT được tạo nên bởi axit béo có từ 6 đến 12 nguyên tử cacbon tốt hơn là được sử dụng.

Thành phần có thể có mặt chọn lọc trong trung tâm (lõi) của hạt đã được nhũ hóa tốt hơn là được bao gồm với lượng nằm trong khoảng từ 0,5 đến 500% khối lượng dựa trên thành phần thúc đẩy tiết GLP-1.

Theo cách khác, thành phần có thể có mặt chọn lọc trong trung tâm (lõi) của hạt đã được nhũ hóa tốt hơn là được bao gồm với lượng nằm trong khoảng từ 100 đến 400, 150 đến 400, 200 đến 400, 250 đến 400, 300 đến 400, 350 đến 400, 100 đến 350, 100 đến 300, 100 đến 250, 150 đến 250, 100 đến 200, 100 đến 150, 190 đến 300, hoặc 240 đến 300% khối lượng dựa trên thành phần thúc đẩy tiết GLP-1.

Hơn nữa, được ưu tiên là bazơ trong nước như glyxerol được sử dụng làm thành phần khác.

Bazơ trong nước tốt hơn là được bao gồm với lượng nằm trong khoảng từ 2 đến 600% khối lượng dựa trên thành phần thúc đẩy tiết GLP-1.

Theo cách khác, bazơ trong nước tốt hơn là được bao gồm với lượng nằm trong khoảng từ 2 đến 2100, 100 đến 2100, 200 đến 2100, 300 đến 2100, 400 đến 2100, 500 đến 2100, 600 đến 2100, 700 đến 2100, 800 đến 2100, 900 đến 2100, 1000 đến 2100, 100 đến 2000, 100 đến 1800, 100 đến 1600, 100 đến 1400, 100 đến 1200, 100 đến 1000, 100 đến 800, 100 đến 700, 100 đến 600, 100 đến 500, 200 đến 1800, 300 đến 1600, 400 đến 1400, 500 đến 1200, 600 đến 1000, 490 đến 2100, 490 đến 1900, 490 đến 1700, 490 đến 1500, 490 đến 1300, 490 đến 1100, 490 đến 900, 490 đến 700, 490 đến 600, 490 đến 560, 490 đến 550, 490 đến 540, hoặc 490 đến 530% khối lượng dựa trên thành phần thúc đẩy tiết GLP-1.

Như sẽ được mô tả chi tiết sau đây, khi chế phẩm của sáng chế được sử dụng làm thực phẩm và đồ uống, chất phụ gia thực phẩm có thể được chứa dưới dạng thành phần khác. Các ví dụ về chất phụ gia thực phẩm bao gồm tá dược (như tinh bột mì, tinh

bột ngô, xenluloza, lactoza, sucroza, manitol, sorbitol, xylitol, tinh bột gelatin hóa sơ bộ, casein, magie aluminat silicat, và canxi silicat); chất kết dính (như tinh bột gelatin hóa sơ bộ, hydroxypropyl metyl xenluloza, và polyvinylpyrrolidon; chất làm rắn như xenluloza, hydroxypropyl metyl xenluloza, và tinh bột ngô); chất hóa lỏng (như axit silixic khan nhẹ); chất béo và dầu (chẳng hạn, dầu thực vật như dầu đậu nành, dầu vừng, dầu oliu, dầu hạt lanh, dầu tía tô, dầu hạt cải dầu, dầu dừa, và dầu ngô, hoặc dầu được dẫn xuất từ động vật hoặc cá); chất dinh dưỡng (như các chất khoáng khác nhau, các loại vitamin khác nhau, và axit amin); hương vị; chất tạo ngọt; chất làm biến đổi vị; chất tạo màu; dung môi (như etanol); các muối; chất điều chỉnh độ pH; chất đệm; chất chống oxy hóa; chất làm ổn định, chất tạo gel; chất làm đặc; chất làm trơn; chất bao nang; chất tạo hỗn dịch; chất bao; chất bảo quản; và chất nhũ hóa. Chất phụ gia thực phẩm có thể được sử dụng một mình hoặc ở dạng phối hợp của hai hoặc nhiều chất trong số chúng.

Các ví dụ về chế phẩm của sáng chế bao gồm chế phẩm bao gồm: RebA làm thành phần thúc đẩy tiết GLP-1; ít nhất một chất được chọn từ nhóm gồm có este của axit béo với polyglyxerol, este của axit béo với propylen glycol, lexitin được xử lý bằng enzym, este của axit béo với sucroza, và monoglyxerit của axit hữu cơ làm chất nhũ hóa dầu trong nước; dầu MCT được tạo nên bởi axit béo có từ 6 đến 12 nguyên tử cacbon làm thành phần có thể có mặt chọn lọc trong trung tâm (lõi) của hạt đã được nhũ hóa; glyxerol làm bazơ trong nước; và môi trường nước, đặc biệt là nước, làm môi trường phân tán. Các ví dụ cụ thể bao gồm chế phẩm bao gồm: RebA làm thành phần thúc đẩy tiết GLP-1; este của axit béo với polyglyxerol làm chất nhũ hóa dầu trong nước, dầu MCT được tạo nên bởi axit béo có từ 6 đến 12 nguyên tử cacbon làm thành phần có thể có mặt chọn lọc trong trung tâm (lõi) của hạt đã được nhũ hóa; glyxerol làm bazơ trong nước; và nước làm môi trường phân tán.

Các ví dụ khác về chế phẩm của sáng chế bao gồm chế phẩm bao gồm: RebA làm thành phần thúc đẩy tiết GLP-1; ít nhất một chất được chọn từ nhóm gồm có este của axit béo với polyglyxerol, este của axit béo với propylen glycol, lexitin được xử lý bằng enzym, este của axit béo với sucroza, và monoglyxerit của axit hữu cơ làm chất nhũ hóa dầu trong nước; dầu MCT được tạo nên bởi axit béo có từ 6 đến 12 nguyên tử cacbon làm thành phần có thể có mặt chọn lọc trong trung tâm (lõi) của hạt đã được nhũ hóa; glyxerol làm bazơ trong nước; và môi trường nước, đặc biệt là nước, làm môi trường phân tán, trong đó hàm lượng của chất nhũ hóa dầu trong nước nằm trong khoảng

từ 0,02 đến 50% khối lượng dựa trên thành phần thúc đẩy tiết GLP-1; hàm lượng của thành phần có thể có mặt chọn lọc trong trung tâm (lõi) của hạt đã được nhũ hóa nằm trong khoảng từ 0,5 đến 500% khối lượng dựa trên thành phần thúc đẩy tiết GLP-1; và hàm lượng của bazơ trong nước nằm trong khoảng từ 2 đến 600% khối lượng dựa trên thành phần thúc đẩy tiết GLP-1. Các ví dụ cụ thể bao gồm chế phẩm bao gồm: RebA làm thành phần thúc đẩy tiết GLP-1; este của axit béo với polyglyxerol làm chất nhũ hóa dầu trong nước, dầu MCT được tạo nên bởi axit béo có từ 6 đến 12 nguyên tử cacbon làm thành phần có thể có mặt chọn lọc trong trung tâm (lõi) của hạt đã được nhũ hóa; glyxerol làm bazơ trong nước; và nước làm môi trường phân tán, trong đó hàm lượng của chất nhũ hóa dầu trong nước nằm trong khoảng từ 0,02 đến 50% khối lượng dựa trên thành phần thúc đẩy tiết GLP-1; hàm lượng của thành phần có thể có mặt chọn lọc trong trung tâm (lõi) của hạt đã được nhũ hóa nằm trong khoảng từ 2 đến 600% khối lượng dựa trên thành phần thúc đẩy tiết GLP-1; và hàm lượng của bazơ trong nước nằm trong khoảng từ 2 đến 600% khối lượng dựa trên thành phần thúc đẩy tiết GLP-1.

Một ví dụ khác về chế phẩm của sáng chế bao gồm chế phẩm bao gồm: RebA làm thành phần thúc đẩy tiết GLP-1; ít nhất một chất được chọn từ nhóm gồm có este của axit béo với polyglyxerol, este của axit béo với propylen glycol, lexitin được xử lý bằng enzym, este của axit béo với sucroza, và monoglyxerit của axit hữu cơ làm chất nhũ hóa dầu trong nước; dầu MCT được tạo nên bởi axit béo có từ 6 đến 12 nguyên tử cacbon làm thành phần có thể có mặt chọn lọc trong trung tâm (lõi) của hạt đã được nhũ hóa; glyxerol làm bazơ trong nước; và môi trường nước, đặc biệt là nước, làm môi trường phân tán, trong đó hàm lượng của chất nhũ hóa dầu trong nước nằm trong khoảng từ 5 đến 200% khối lượng dựa trên thành phần thúc đẩy tiết GLP-1; hàm lượng của thành phần có thể có mặt chọn lọc trong trung tâm (lõi) của hạt đã được nhũ hóa nằm trong khoảng từ 100 đến 400% khối lượng dựa trên thành phần thúc đẩy tiết GLP-1; và hàm lượng của bazơ trong nước nằm trong khoảng từ 2 đến 2100% khối lượng dựa trên thành phần thúc đẩy tiết GLP-1. Các ví dụ cụ thể bao gồm chế phẩm bao gồm: RebA làm thành phần thúc đẩy tiết GLP-1; este của axit béo với polyglyxerol làm chất nhũ hóa dầu trong nước, dầu MCT được tạo nên bởi axit béo có từ 6 đến 12 nguyên tử cacbon làm thành phần có thể có mặt chọn lọc trong trung tâm (lõi) của hạt đã được nhũ hóa; glyxerol làm bazơ trong nước; và nước làm môi trường phân tán, trong đó hàm lượng của chất nhũ hóa dầu trong nước nằm trong khoảng từ 5 đến 200% khối lượng dựa trên

thành phần thúc đẩy tiết GLP-1; hàm lượng của thành phần có thể có mặt chọn lọc trong trung tâm (lõi) của hạt đã được nhũ hóa nằm trong khoảng từ 100 đến 400% khối lượng dựa trên thành phần thúc đẩy tiết GLP-1; và hàm lượng của bazơ trong nước nằm trong khoảng từ 2 đến 2100% khối lượng dựa trên thành phần thúc đẩy tiết GLP-1.

Chế phẩm của sáng chế có thể là chế phẩm có dạng bất kỳ, và có thể là, chẳng hạn, chất rắn (ví dụ, dạng bột), giống gel, hoặc chế phẩm lỏng.

Chế phẩm của sáng chế có thể được áp dụng được sử dụng để thúc đẩy sự tiết GLP-1.

Chẳng hạn, chế phẩm của sáng chế có thể được sử dụng cho ít nhất một mục đích sử dụng được chọn từ ngăn chặn mức gluco-a-huyết gia tăng, kìm hãm sự thèm ăn, ngăn chặn việc ăn quá nhiều, cải thiện sự chuyển hóa đường, phòng ngừa hoặc điều trị bệnh đái tháo đường, phòng ngừa hoặc điều trị bệnh béo phì, giảm trọng lượng cơ thể, và giảm tỷ lệ phần trăm mỡ trong cơ thể. Tốt hơn là, chế phẩm của sáng chế có thể được sử dụng cho ít nhất một mục đích sử dụng được chọn từ cải thiện sự chuyển hóa đường, kìm hãm sự thèm ăn, và phòng ngừa hoặc cải thiện bệnh đái tháo đường hoặc bệnh béo phì.

Chế phẩm của sáng chế có thể cũng được sử dụng để thúc đẩy quá trình làm rộng dạ dày, ngăn chặn sự tiết axit dạ dày, ngăn chặn sự giải phóng gluco-a ở gan, bảo vệ cơ tim, cải thiện trí nhớ trong học tập, phòng ngừa hoặc điều trị chứng tăng đường huyết sau ăn (bệnh đái tháo đường ẩn), phòng ngừa hoặc điều trị bệnh viêm ruột kết mạn loét, và bệnh tương tự.

Chế phẩm của sáng chế có thể cũng được sử dụng để phòng ngừa hoặc điều trị các bệnh về mạch máu như bệnh vữa xơ động mạch, bệnh thoái hóa thần kinh, bệnh viêm gan do rượu, chứng râm da, và bệnh hen (xem, 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).

Theo cách khác, chế phẩm của sáng chế có thể là chế phẩm được sử dụng để làm giảm vị đắng hoặc được sử dụng để giảm độ ngọt. Chẳng hạn, khi thành phần thúc đẩy tiết GLP-1 bao gồm chất tạo ngọt glycosit, chế phẩm của sáng chế có thể được sử dụng cho mục đích làm giảm độ đắng hoặc độ ngọt của chất tạo ngọt glycosit bằng cách hợp nhất thành phần thúc đẩy tiết GLP-1 vào trong hạt đã được nhũ hóa.

Bản thân chế phẩm của sáng chế có thể được sử dụng trực tiếp cho (được lấy bởi, được nhận bởi, hoặc được sử dụng cho) người hoặc động vật không phải là người có khả năng tiết GLP-1.

Các ví dụ về một phương án của chế phẩm của sáng chế được sử dụng trực tiếp cho người hoặc các động vật không phải là người bao gồm thực phẩm, chẳng hạn, mì (như mì soba, udon, mì Trung Quốc, mì ăn liền); đậu phụ; bánh kẹo (như kẹo, kẹo gôm, sôcôla, món ăn nhẹ, bánh quy, bánh cúc-ki, và kẹo dẻo); bánh mì; thực phẩm chế biến có nguồn gốc từ biển hoặc gia súc (như chả cá kamaboko, giăm bông, và xúc xích); sản phẩm sữa (như sữa lên men); chất béo và dầu, và thực phẩm chế biến từ chất béo và dầu (như dầu xalát, dầu tempura, macgarin, và nước sốt maioney, soctening, váng sữa đánh toi, nước sốt, và chất béo dùng để phết); đồ gia vị (như nước sốt và mỡ dùng để rưới lên thịt); sản phẩm nấu chín hoặc nửa chín (như chanpuru); thực phẩm hấp thanh trùng (như ca ri, thịt hầm, bát, cháo kiểu mạch, và cháo gạo); đồ ngọt đông lạnh (như kem, món tráng miệng sorbet, và đá bào); thực phẩm dạng bột (như đồ uống dạng bột và súp dạng bột); và thực phẩm dạng dùng trong ruột được sử dụng để ngăn chặn mức glucoza-huyết gia tăng, kìm hãm sự thèm ăn, ngăn chặn việc ăn quá nhiều, cải thiện sự chuyển hóa đường, phòng ngừa hoặc điều trị bệnh đái tháo đường, phòng ngừa hoặc điều trị bệnh béo phì, giảm trọng lượng cơ thể, giảm tỷ lệ phần trăm mỡ trong cơ thể, thúc đẩy quá trình làm rỗng dạ dày, ngăn chặn sự tiết axit dạ dày, ngăn chặn sự giải phóng glucoza ở gan, bảo vệ cơ tim, cải thiện trí nhớ trong học tập, phòng ngừa hoặc điều trị các bệnh về mạch máu, phòng ngừa hoặc điều trị bệnh thoái hóa thần kinh, phòng ngừa hoặc điều trị bệnh viêm gan do rượu, phòng ngừa hoặc điều trị chứng râm da, hoặc phòng ngừa hoặc điều trị bệnh hen. Các thực phẩm để sử dụng cho các mục đích sử dụng nêu trên bao gồm, bên cạnh những thực phẩm được gọi là thực phẩm bổ dưỡng, thực phẩm có công bố về sức khỏe như thực phẩm cho các mục đích sức khỏe cụ thể và thực phẩm có công bố chức năng dinh dưỡng, các chất bổ sung (các chất bổ sung dinh dưỡng), và các thực phẩm chăn nuôi.

Các ví dụ khác bao gồm đồ uống như đồ uống chứa trà, đồ uống không có rượu, đồ uống có ga bao gồm bia không có rượu, đồ uống dinh dưỡng, đồ uống từ hoa quả, đồ uống chứa axit lactic, nước ép, đồ uống tăng lực, đồ uống có rượu, sữa chế biến, và sữa đậu nành chế biến được sử dụng để ngăn chặn mức glucoza-huyết gia tăng, kìm hãm sự thèm ăn, ngăn chặn việc ăn quá nhiều, cải thiện sự chuyển hóa đường, phòng ngừa hoặc

điều trị bệnh đái tháo đường, phòng ngừa hoặc điều trị bệnh béo phì, giảm trọng lượng cơ thể, giảm tỷ lệ phần trăm mỡ trong cơ thể, thúc đẩy quá trình làm rỗng dạ dày, ngăn chặn sự tiết axit dạ dày, ngăn chặn sự giải phóng glucoza ở gan, bảo vệ cơ tim, cải thiện trí nhớ trong học tập, phòng ngừa hoặc điều trị các bệnh về mạch máu, phòng ngừa hoặc điều trị bệnh thoái hóa thần kinh, phòng ngừa hoặc điều trị bệnh viêm gan do rượu, phòng ngừa hoặc điều trị chứng râm da, hoặc phòng ngừa hoặc điều trị bệnh hen.

Khi chế phẩm của sáng chế được lập công thức để được sử dụng, các ví dụ về dạng liều dùng bao gồm viên nén, bột, hạt mịn, hạt, xi rô khan, viên nén bao, viên nén phân rã trong miệng, viên nén nhai được, viên nang, viên nang mềm, xi rô, và chất bổ sung dinh dưỡng đường ruột.

Phương pháp sản xuất

Chế phẩm của sáng chế được sản xuất bằng phương pháp đã biết phụ thuộc vào mục đích sử dụng của nó, chế phẩm, hoặc tương tự.

Tốt hơn là, chế phẩm của sáng chế được sản xuất bằng các bước: trộn chất nhũ hóa dầu trong nước, thành phần thúc đẩy tiết GLP-1 lưỡng tính, và môi trường nước để điều chế hỗn hợp; và bổ sung thành phần mà có thể được bao gồm trong lõi của hạt đã được nhũ hóa, như chất béo và dầu, vào hỗn hợp, và khuấy trộn. Bước khuấy trộn tốt hơn là được thực hiện ở tốc độ cao hơn bằng cách sử dụng máy trộn đồng hóa hoặc máy tương tự và trong điều kiện nghiêm ngặt hơn bước trộn để chất béo và dầu hoặc chất tương tự được chứa trong lõi của hạt đã được nhũ hóa.

Để khuấy trộn ở tốc độ cao hơn trong các điều kiện nghiêm ngặt hơn bước trộn, tốc độ khuấy trộn tốt hơn là nằm trong khoảng từ 5000 đến 10000, 5000 đến 8000, hoặc 8000 đến 10000 vòng/phút (rpm).

Do đó, một khía cạnh của sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất chế phẩm được sử dụng để thúc đẩy tiết GLP-1, bao gồm các bước: trộn chất nhũ hóa dầu trong nước, thành phần thúc đẩy tiết GLP-1 lưỡng tính, và môi trường nước để điều chế hỗn hợp; và bổ sung chất béo và dầu vào hỗn hợp thu được và khuấy trộn, và chế phẩm được sản xuất bằng phương pháp, mà bao gồm hạt đã được nhũ hóa bao gồm thành phần thúc đẩy tiết GLP-1 lưỡng tính và chất nhũ hóa dầu trong nước, trong đó thành phần thúc đẩy tiết GLP-1 lưỡng tính được hợp nhất vào trong hạt đã được nhũ hóa.

Là một khía cạnh khác, chế phẩm của sáng chế có thể cũng được sản xuất qua

các bước: trộn chất nhũ hóa dầu trong nước và môi trường nước để điều chế hỗn hợp; và bổ sung thành phần thúc đẩy tiết GLP-1 lưỡng tính và thành phần mà có thể được bao gồm trong lõi của hạt đã được nhũ hóa như chất béo và dầu vào hỗn hợp điều chế được và khuấy trộn. Bước khuấy trộn tốt hơn là được thực hiện ở tốc độ cao hơn bằng cách sử dụng máy trộn đồng hóa hoặc máy tương tự và trong điều kiện nghiêm ngặt hơn bước trộn để chất béo và dầu hoặc chất tương tự được chứa trong lõi của hạt đã được nhũ hóa. Để khuấy trộn ở tốc độ cao hơn trong các điều kiện nghiêm ngặt hơn bước trộn, tốc độ khuấy trộn tốt hơn là nằm trong khoảng từ 5000 đến 10000, 5000 đến 8000, hoặc 8000 đến 10000 vòng/phút.

Ứng dụng

Chế phẩm của sáng chế có thể cũng được sử dụng ở trạng thái được chứa trong đồ uống, thực phẩm, dược phẩm, hoặc loại tương tự, bằng đường như miệng, mũi, hoặc đường ruột, hoặc đường có ống.

Khi chế phẩm của sáng chế được bổ sung vào (hoặc được chứa trong) thực phẩm và đồ uống, loại thực phẩm và đồ uống không bị giới hạn cụ thể. Thực phẩm bao gồm, chẳng hạn, mì (như mì soba, udon, mì Trung Quốc, mì ăn liền); đậu phụ; bánh kẹo (như kẹo, kẹo gôm, sôcôla, món ăn nhẹ, bánh quy, bánh cúc-ki, và kẹo dẻo); bánh mì; thực phẩm chế biến có nguồn gốc từ biển hoặc gia súc (như chả cá kamaboko, giăm bông, và xúc xích); sản phẩm sữa (như sữa lên men); chất béo và dầu, và thực phẩm chế biến từ chất béo và dầu (như dầu xalát, dầu tempura, macgarin, và nước sốt maioney, soctening, váng sữa đánh toi, nước sốt, và chất béo dùng để phết); đồ gia vị (như nước sốt và mỡ dùng để rưới lên thịt); sản phẩm nấu chín hoặc nửa chín (như chanpuru); thực phẩm hấp thanh trùng (như ca ri, thịt hầm, bát, cháo kiểu mạch, và cháo gạo); đồ ngọt đông lạnh (như kem, món tráng miệng sorbet, và đá bào); thực phẩm dạng bột (như đồ uống dạng bột và súp dạng bột); và thực phẩm dạng dùng trong ruột. Thực phẩm cũng bao gồm, bên cạnh những thực phẩm được gọi là thực phẩm bổ dưỡng, thực phẩm có công bố về sức khỏe như thực phẩm cho các mục đích sức khỏe cụ thể và thực phẩm có công bố chức năng dinh dưỡng, các chất bổ sung (các chất bổ sung dinh dưỡng), các thực phẩm chăn nuôi, và tương tự.

Đồ uống bao gồm, chẳng hạn, đồ uống chứa trà, đồ uống không có rượu, đồ uống có ga bao gồm bia không có rượu, đồ uống dinh dưỡng, đồ uống từ hoa quả, đồ

uống chứa axit lactic, nước ép, đồ uống tăng lực, đồ uống có rượu, sữa chế biến, sữa đậu nành chế biến, và loại tương tự.

Thực phẩm và đồ uống có thể bao gồm thành phần khác miễn là thực phẩm và đồ uống này bao gồm chế phẩm của sáng chế. Các ví dụ về thành phần khác trong trường hợp này bao gồm thành phần giống như thành phần trong các ví dụ về thành phần khác trong phần Chế phẩm.

Theo sáng chế, lượng đưa vào cơ thể (liều hoặc liều lượng) của thành phần thúc đẩy tiết GLP-1 không bị giới hạn cụ thể, và có thể được chọn một cách thích hợp theo độ tuổi, trọng lượng, và điều kiện sức khỏe của đối tượng, và thông số tương tự.

Sáng chế có thể được sử dụng hoặc áp dụng cho ứng dụng điều trị bất kỳ (ứng dụng y tế) hoặc ứng dụng không điều trị. Cụ thể là, cho dù nó được phân loại là dược phẩm, dược mỹ phẩm, mỹ phẩm, hoặc loại tương tự, sáng chế có thể được sử dụng hoặc áp dụng như bất kỳ chế phẩm hoặc thực phẩm và đồ uống theo đuổi một cách rõ ràng hoặc ẩn ý chức năng thúc đẩy tiết GLP-1 hoặc chức năng tạo ra sự thúc đẩy tiết GLP-1. Hơn nữa, sản phẩm sử dụng sáng chế có thể chỉ ra chức năng thúc đẩy tiết GLP-1 và chức năng tạo ra từ sự thúc đẩy tiết GLP-1. Các ví dụ về chỉ định như vậy bao gồm, nhưng không bị giới hạn đặc biệt ở, chức năng thúc đẩy tiết GLP-1 và chức năng tạo ra từ sự thúc đẩy tiết GLP-1, như chức năng ngăn ngừa tăng mức glucoza-huyết, chức năng ngăn ngừa thèm ăn, chức năng ngăn ngừa ăn quá nhiều, chức năng cải thiện sự chuyển hóa đường, chức năng phòng ngừa hoặc điều trị bệnh đái tháo đường, chức năng phòng ngừa hoặc điều trị bệnh béo phì, chức năng giảm trọng lượng, chức năng giảm tỷ lệ phần trăm mỡ trong cơ thể, chức năng thúc đẩy quá trình làm rỗng dạ dày, chức năng ngăn ngừa sự tiết axit dạ dày, chức năng ngăn ngừa sự giải phóng glucoza ở gan, chức năng bảo vệ cơ tim, chức năng cải thiện trí nhớ trong học tập, chức năng phòng ngừa hoặc điều trị bệnh tim mạch, chức năng phòng ngừa hoặc điều trị bệnh thoái hóa thần kinh, chức năng phòng ngừa hoặc điều trị bệnh viêm gan do rượu, chức năng phòng ngừa hoặc điều trị chứng râm da, chức năng phòng ngừa hoặc điều trị bệnh hen, hoặc chỉ định được cho là tương đương với các chỉ định này.

Thời điểm sử dụng các chế phẩm của sáng chế không bị giới hạn cụ thể, và có thể, chẳng hạn, trước, trong, giữa, hoặc sau bữa ăn, hoặc trước khi đi ngủ.

Một khía cạnh của sáng chế đề cập đến chế phẩm bao gồm hạt đã được nhũ hóa

bao gồm thành phần thúc đẩy tiết GLP-1 lưỡng tính và chất nhũ hóa, trong đó chất nhũ hóa là chất nhũ hóa dầu trong nước, thành phần thúc đẩy tiết GLP-1 được hợp nhất vào trong hạt đã được nhũ hóa, và chế phẩm này được sử dụng để điều trị bệnh có thể được cải thiện bằng cách thúc đẩy tiết GLP-1. Một khía cạnh của sáng chế đề cập đến phương pháp để thúc đẩy tiết GLP-1 ở đối tượng hoặc điều trị bệnh có thể được cải thiện bằng cách thúc đẩy tiết GLP-1 ở đối tượng, trong đó phương pháp này bao gồm bước cho đối tượng cần điều trị sử dụng chế phẩm bao gồm hạt đã được nhũ hóa bao gồm thành phần thúc đẩy tiết GLP-1 lưỡng tính và chất nhũ hóa, trong đó chất nhũ hóa là chất nhũ hóa dầu trong nước, và trong đó thành phần thúc đẩy tiết GLP-1 được hợp nhất vào trong hạt đã được nhũ hóa. Hơn nữa, một khía cạnh của sáng chế đề cập đến việc sử dụng chế phẩm bao gồm hạt đã được nhũ hóa bao gồm thành phần thúc đẩy tiết GLP-1 lưỡng tính và chất nhũ hóa để sản xuất thuốc để điều trị bệnh có thể được cải thiện bằng cách thúc đẩy tiết GLP-1, trong đó chất nhũ hóa là chất nhũ hóa dầu trong nước, và trong đó thành phần thúc đẩy tiết GLP-1 được hợp nhất vào trong hạt đã được nhũ hóa. Cần lưu ý rằng mỗi trong số các khía cạnh nêu trên có thể có các đặc điểm khác nhau được mô tả ở đây.

Các ví dụ về bệnh bao gồm bệnh tăng đường-huyết, chứng ăn vô độ, chứng nhiễm axit dạ dày, bệnh đái tháo đường, bệnh béo phì, bệnh tim mạch, bệnh thoái hóa thần kinh, bệnh viêm gan do rượu, chứng râm da, và bệnh hen.

Ở đây, thuật ngữ “đối tượng” có nghĩa là cơ thể sinh vật riêng biệt bất kỳ, tốt hơn là động vật, tốt hơn nữa là động vật có vú, tốt hơn nữa là cá thể người. Đối tượng có thể khỏe mạnh (ví dụ, không có bệnh đặc biệt hoặc bệnh bất kỳ) hoặc có thể bị nhiễm một số bệnh. Khi việc điều trị bệnh có thể được cải thiện bằng cách thúc đẩy tiết GLP-1 được dự định, chẳng hạn, đối tượng thường có nghĩa là đối tượng bị nhiễm bệnh hoặc có nguy cơ bị nhiễm bệnh.

Ở đây, thuật ngữ “điều trị” bao gồm mọi loại can thiệp dự phòng và/hoặc trị liệu được chấp nhận về mặt y học nhằm mục đích chữa khỏi, thuyên giảm tạm thời hoặc phòng ngừa, v.v., một bệnh. “Điều trị” bao gồm sự can thiệp chấp nhận được về mặt y học đối với các mục đích khác nhau bao gồm, chẳng hạn, làm chậm hoặc ngăn chặn sự tiến triển của bệnh, sự thoái lui hoặc biến mất của tổn thương, ngăn ngừa sự khởi phát của bệnh hoặc ngăn ngừa sự tái phát của bệnh. Do đó, chế phẩm của sáng chế có thể được sử dụng để điều trị và/hoặc phòng ngừa bệnh.

Một khía cạnh của sáng chế cũng đề cập đến phương pháp để tăng khả năng thúc đẩy tiết GLP-1 của thành phần thúc đẩy tiết GLP-1, trong đó phương pháp này bao gồm bước hợp nhất (nhũ hóa) thành phần thúc đẩy tiết GLP-1 vào trong hạt đã được nhũ hóa.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Dưới đây, sáng chế được mô tả chi tiết hơn bằng các ví dụ. Lưu ý rằng số của ví dụ thực nghiệm 14 không được sử dụng.

Ví dụ thực nghiệm 1

RebA, RebB, RebM, RebN, RebD, RebC, MogV, và steviosit được kiểm tra các tác dụng thúc đẩy tiết GLP-1 của chúng. Cụ thể là, lượng tiết GLP-1 được đo bằng các quy trình sau đây. Chất có lượng tiết GLP-1 lớn hơn lượng tiết GLP-1 ở chất đối chứng, không chứa mẫu, được xác định là có tác dụng thúc đẩy tiết GLP-1.

Điều chế mỗi chất thử nghiệm

Mỗi chất thử nghiệm B, C, D, E, F, G, I, hoặc J được hòa tan trong PBS (Thermo Fisher Scientific Inc.) (số catalo 14190250) để thu được dung dịch gốc. Nồng độ của dung dịch gốc được thể hiện dưới đây:

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 (steviosit): 1M.

Định lượng GLP-1

H716 (ATCC) (số catalo ATCC® CCL-251) được nuôi cấy trong RPMI 1640 (10% FBS (Thermo Fisher Scientific Inc.) (số catalo 10439024), natri pyruvat 1mM) trong tủ ủ ở 37°C, 5% CO₂.

Việc nuôi cấy sơ bộ được thực hiện trong 2 tuần, và các tế bào được thu hồi một cách phù hợp, và sau đó các nguyên liệu gốc tế bào được điều chế.

Các tế bào được gieo trong đĩa 96 lỗ ở nồng độ 2×10^5 tế bào/90μl (cao) trên mỗi lỗ (N = 4). Ở thời điểm này, hàm lượng của FBS trong môi trường được giảm đến 0,5% để ngăn chặn sự tăng sinh tế bào.

Sau 24 giờ, mẫu ở nồng độ cao nhất (nghĩa là, dung dịch gốc) được bổ sung bởi mỗi 10μl.

Sau 24 giờ nữa, việc định lượng GLP-1 được thực hiện. Các quy trình cụ thể

được thực hiện theo hướng dẫn sử dụng của bộ kit xét nghiệm miễn dịch Human GLP-1 (7-36 amide) Immunoassay kit (số catalo AL359) (số lô 2361115) được cung cấp bởi PerkinElmer, Inc. PBS được sử dụng làm đối chứng âm (không chứa mẫu).

Các kết quả được thể hiện trên Fig.1. Như có thể nhận thấy từ Fig.1, RebA, RebB, RebC, MogV, và steviosit có các lượng tiết GLP-1 lớn hơn đáng kể so với không chứa mẫu.

Ví dụ thực nghiệm 2

21 μ l DMSO (được sản xuất bởi FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, số model: 037-24053) được bổ sung vào 20mg RebC. Sau đó, hỗn hợp được khuấy bằng cách tạo dòng chảy rồi và để yên trong vài giờ để thu được dung dịch gốc có nồng độ RebC bằng 1000mM. Dung dịch gốc và PBS thu được được sử dụng để điều chế dung dịch 10mM.

Dung dịch 10mM này được làm loãng nếu cần PBS chứa 1% DMSO để thu được mẫu G-1mM đến mẫu G-10mM. Các nồng độ của RebC được mô tả trong bảng 1.

Ví dụ thực nghiệm 3

12,4 μ l DMSO (được sản xuất bởi FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, số model: 037-24053) được bổ sung vào 15mg steviosit. Sau đó, hỗn hợp được khuấy bằng cách tạo dòng chảy rồi để thu được dung dịch gốc có nồng độ steviosit bằng 150mM. Dung dịch gốc và PBS thu được được sử dụng để điều chế dung dịch 15mM.

Dung dịch 15mM được làm loãng, nếu cần, bằng PBS chứa 1% DMSO để thu được mẫu J-0,1mM đến mẫu J-15mM. Các nồng độ của steviosit được mô tả trong bảng 1.

Ví dụ thực nghiệm 4

8,27 μ l DMSO (được sản xuất bởi FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, số model: 037-24053) được bổ sung vào 20mg RebA, tiếp theo bổ sung 74,5 μ l PBS. Sau đó, hỗn hợp được khuấy bằng cách tạo dòng chảy rồi để thu được dung dịch gốc có nồng độ RebA bằng 250mM. Dung dịch gốc và PBS thu được được sử dụng để điều chế dung dịch 25mM.

Dung dịch 25mM này được làm loãng, nếu cần, bằng PBS chứa 1% DMSO để thu được mẫu B-1mM đến mẫu B-25mM. Các nồng độ của RebA được mô tả trong bảng 1.

Ví dụ thực nghiệm 5

Dung dịch hỗn hợp trong nước được điều chế bằng cách trộn 490g glyxerol, 100g RebA, và 10g este của axit béo với polyglyxerol, và gia nhiệt và hòa tan hỗn hợp ở 70°C. Dung dịch hỗn hợp trong nước này được bổ sung 300g dầu MCT dưới dạng chất béo và dầu, và hỗn hợp này được nhũ hóa ở tốc độ quay 8000 vòng/phút bằng máy trộn đồng hóa (được sản xuất bởi Tokushu Kika Kogyo Co., Ltd.). Sau khi hoàn thành việc khuấy trộn, hỗn hợp được làm nguội đến 40°C, và 100g nước được bổ sung để thu được dung dịch RebA đã xử lý.

241,8μl dung dịch RebA đã xử lý thu được được bổ sung 10μl DMSO (được sản xuất bởi FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, số model: 037-24053) và 748,2μl PBS. Hỗn hợp này được khuấy bằng cách tạo dòng chảy rồi để thu được dung dịch gốc có nồng độ RebA bằng 25mM.

Dung dịch gốc được làm loãng, nếu cần, bằng PBS chứa 1% DMSO để thu được mẫu B đã xử lý-0,25mM đến mẫu B đã xử lý-25mM. Các nồng độ của RebA được mô tả trong bảng 1.

Đo lường tiết GLP-1

Trong các điều kiện được thể hiện trong bảng 1, mỗi trong số các mẫu thu được trong các ví dụ thực nghiệm từ 2 đến 5 được bổ sung vào môi trường. Trong môi trường thu được, các tế bào được nuôi cấy, và lượng tiết GLP-1 sau 2 giờ được đo. Các quy trình cụ thể là như sau.

H716 (tế bào có nguồn gốc từ kết tràng người) được nuôi cấy trong RPMI 1640 (Thermo Fisher Scientific Inc., số model: 61870-036) (10% FBS (Hyclone, số model: SH30396,03), natri pyruvat 1mM) trong tủ ủ ở 37°C, 5% CO₂.

Việc nuôi cấy sơ bộ được thực hiện trong 2 tuần, và các tế bào được thu hồi một cách phù hợp, và sau đó các nguyên liệu gốc tế bào được điều chế.

Các tế bào được gieo trong đĩa 96 lỗ ở nồng độ 2×10^5 tế bào/90μl trên mỗi lỗ. Ở thời điểm này, hàm lượng của FBS trong môi trường được giảm đến 0,5% để ngăn chặn sự tăng sinh tế bào.

Sau 24 giờ, 10μl mỗi mẫu được bổ sung ($n = 3$ đến 4 đối với mẫu B, và $n = 4$ đối với mẫu B đã xử lý, mẫu G, và mẫu J). Các nồng độ cuối cùng trong môi trường được thể hiện trong cột “Mẫu F.C. (mM)” của bảng 1.

Sau thời gian đã được xác định trước (2 giờ) từ khi bổ sung, các đĩa 96 lỗ được thu hồi.

Các đĩa 96 lỗ thu hồi được được ly tâm ở 300 g x 5 phút, và phần nổi lên trên được thu hồi.

GLP-1 trong phần nổi lên trên thu hồi được được định lượng bằng bộ kit xét nghiệm miễn dịch Human GLP-1 (7-36 amide) Immunoassay kit (được sản xuất bởi PerkinElmer, Inc., số model: AL359C). Các kết quả được thể hiện trên các Fig.2 đến 5. Lượng tiết GLP-1 trong dung dịch chứa 1% DMSO dùng làm đối chứng không kích thích (so sánh âm), và lượng tiết GLP-1 trong dung dịch nước của PMA (được sản xuất bởi FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, số model: 162-23591) dùng làm đối chứng dương cũng được thể hiện trên các Fig.2 đến 5. Dung dịch nước của PMA thu được bằng cách bổ sung 16,21 μ l DMSO vào 1mg PMA để điều chế dung dịch gốc; bổ sung PBS vào dung dịch gốc để điều chế dung dịch 1mM; và làm loãng nó bằng PBS chứa 1% DMSO.

Bảng 1 được thể hiện dưới đây. So sánh dương trong bảng 1 còn được gọi là đối chứng dương. So sánh âm còn được gọi là đối chứng âm.

Bảng 1

	#	Mẫu	Nồng độ bổ sung (mM)	Đương lượng ppm	Lượng bổ sung (μ l)	Môi trường (μ l)	Tổng (μ l)	Mẫu F.C. (mM)	Đương lượng ppm
So sánh âm không kích thích	1	PBS chứa 1% DMSO	-	-	10	90	100	-	-
So sánh dương	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
Chất thử nghiệm	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	B đã xử lý	0,25	241,8	10	90	100	0,025	24,2

12	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	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	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

- Đối với mẫu B đã xử lý, các nồng độ cuối cùng bằng 0,025mM (#11) và 0,05mM (#12) được bổ sung vào các nồng độ cần được thử nghiệm (0,1 đến 2,5mM).

- Đối với mẫu G, đánh giá được thực hiện ở nồng độ bằng hoặc thấp hơn nồng độ cuối cùng 1mM do mẫu không thể được hòa tan ở nồng độ cuối cùng bằng 1,5mM (#24).

Ví dụ thực nghiệm 6: Đo sức căng bề mặt

Để nghiên cứu liệu có sự tương quan giữa tác dụng thúc đẩy tiết GLP-1 và sức căng bề mặt của chất nhũ hóa hay không, các thử nghiệm được thực hiện phù hợp với các quy trình sau đây.

Mỗi dung dịch trong số các dung dịch nước chứa RebA, RebD, và RebM (các sản phẩm hiện có bán trên thị trường) được điều chế. Các hàm lượng của RebA, RebD, và RebM được căn chỉnh với Brix 10 trên cơ sở sucroza. Nghĩa là, các hàm lượng của RebA, RebD, và RebM bằng 333ppm, 351ppm, và 351ppm, tương ứng. Sức căng bề mặt của dung dịch nước thu được được đo bằng phương pháp bản mỏng bằng cách sử dụng máy đo sức căng bề mặt tự động (loại CBVP-Z, được sản xuất bởi Kyowa Interface

Science Co., Ltd). Nước được sử dụng làm đối chứng và được thử nghiệm theo cùng một cách. Các kết quả được thể hiện trên Fig.6.

Ví dụ thực nghiệm 7: Đánh giá các đặc tính hương vị

Các đặc tính hương vị của chế phẩm đã được nhũ hóa của RebA được đánh giá bằng quy trình sau đây.

RebA được hòa tan trong nước tinh khiết để điều chế các dung dịch nước 100ppm và 300ppm, được sử dụng làm đối chứng. Tiếp theo, dung dịch RebA đã xử lý được điều chế trong ví dụ thực nghiệm 5 được bổ sung vào nước tinh khiết, và các dung dịch nước 100ppm và 300ppm được điều chế theo cùng một cách. Việc đánh giá hương vị của dung dịch nước đã được bổ sung dung dịch RebA đã xử lý được thực hiện bởi bảy người tham gia thử nghiệm cảm quan đã được đào tạo kỹ theo từng 0,5 điểm lấy đối chứng là 3 điểm. Các giá trị trung bình được thể hiện trên hình vẽ. Hương vị được đánh giá bởi cường độ ngọt, mức kéo dài vị ngọt, và cường độ đắng.

Các kết quả được thể hiện trên Fig.7.

Ví dụ thực nghiệm 8

8,27 μ l DMSO (được sản xuất bởi FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, số model: 037-24053) được bổ sung vào 20mg RebA tiếp theo bổ sung 74,43 μ l PBS. Sau đó, hỗn hợp được khuấy bằng cách tạo dòng chảy rồi để thu được dung dịch gốc có nồng độ RebA bằng 250mM. Dung dịch gốc và PBS thu được được sử dụng để điều chế dung dịch 50mM.

Dung dịch 50mM được làm loãng, nếu cần, bằng PBS chứa 1% DMSO để thu được mẫu B-1mM đến mẫu B-25mM. Các nồng độ của RebA được mô tả trong bảng 2.

Ví dụ thực nghiệm 9

Dung dịch hỗn hợp trong nước được điều chế bằng cách trộn 490g glyxerol, 100g RebA, và 10g este của axit béo với polyglyxerol, và gia nhiệt và hòa tan hỗn hợp ở 70°C. Dung dịch hỗn hợp trong nước này được bổ sung 300g dầu MCT dưới dạng chất béo và dầu, và hỗn hợp này được nhũ hóa ở tốc độ quay 8000 vòng/phút bằng máy trộn đồng hóa (được sản xuất bởi Tokushu Kika Kogyo Co., Ltd.). Sau khi hoàn thành việc khuấy trộn, hỗn hợp được làm nguội đến 40°C, và 100g nước được bổ sung để thu được dung dịch RebA đã xử lý.

241,8 μ l dung dịch RebA đã xử lý thu được được bổ sung 10 μ l DMSO (được sản xuất bởi FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, số model: 037-24053) và 748,2 μ l PBS. Hỗn hợp này được khuấy bằng cách tạo dòng chảy rồi để thu được dung dịch gốc có nồng độ RebA bằng 25mM.

Dung dịch gốc được làm loãng, nếu cần, bằng PBS chứa 1% DMSO để thu được mẫu B đã xử lý-1mM đến mẫu B đã xử lý-25mM. Các nồng độ của RebA được mô tả trong bảng 2.

Ví dụ thực nghiệm 10

Dung dịch C thu được theo cách giống như cách điều chế dung dịch RebA đã xử lý trong ví dụ thực nghiệm 9 ngoại trừ rằng 100g RebA không được sử dụng và 490g glyxerol, 10g este của axit béo với polyglyxerol, 300g dầu MCT, và 200g nước được sử dụng.

483,5 μ l dung dịch C thu được được bổ sung 10 μ l DMSO (được sản xuất bởi FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, số model: 037-24053) và 506,5 μ l PBS. Hỗn hợp này được khuấy bằng cách tạo dòng chảy rồi để thu được dung dịch gốc có nồng độ đương lượng RebA bằng 50mM.

Dung dịch gốc thu được được làm loãng bằng PBS chứa 1% DMSO để thu được mẫu C-1mM đến mẫu C-25mM. Bảng 2 mô tả các nồng độ đương lượng RebA. Nồng độ đương lượng RebA dùng để chỉ nồng độ của RebA trong mẫu B đã xử lý đã cho của ví dụ thực nghiệm 9 khi các nồng độ của glyxerol, este của axit béo với polyglyxerol và dầu MCT trong mẫu C đã cho và các nồng độ của glyxerol, este của axit béo với polyglyxerol và dầu MCT trong mẫu B đã xử lý đã cho là như nhau.

Ví dụ thực nghiệm 11

Theo cách giống như trong ví dụ thực nghiệm 8, thu được mẫu B chứa RebA ở nồng độ gấp hai lần nồng độ trong mẫu B + C. Nghĩa là, thu được mẫu B-2mM, mẫu B-5mM, mẫu B-10mM, mẫu B-20mM, mẫu B-30mM, mẫu B-40mM, và mẫu B-50mM. Nồng độ sau các dấu gạch nối là nồng độ của RebA.

Theo cách giống như trong ví dụ thực nghiệm 10, mẫu C chứa este của axit béo với polyglyxerol, v.v., ở nồng độ gấp hai lần nồng độ trong mẫu B + C thu được. Nghĩa là, thu được mẫu C-2mM, mẫu C-5mM, mẫu C-10mM, mẫu C-20mM, mẫu C-30mM, mẫu C-40mM, và mẫu C-50mM. Nồng độ sau các dấu gạch nối là nồng độ đương lượng

RebA.

Các lượng bằng nhau của mẫu B và mẫu C ở cùng một nồng độ (ví dụ, mẫu B-2mM và mẫu C-2mM) được trộn để thu được mẫu B + C-1mM đến mẫu B + C-25mM. Các nồng độ của RebA được mô tả trong bảng 2.

Ví dụ thực nghiệm 12

118,5 μ l glyxerol được bổ sung 10 μ l DMSO (được sản xuất bởi FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, số model: 037-24053) và 871,5 μ l PBS. Hỗn hợp này được khuấy bằng cách tạo dòng chảy rồi để thu được dung dịch gốc có nồng độ đương lượng RebA bằng 25mM.

Dung dịch gốc thu được được làm loãng, nếu cần, bằng PBS chứa 1% DMSO để thu được mẫu D-1mM đến mẫu D-25mM. Bảng 2 mô tả các nồng độ đương lượng RebA. Nồng độ đương lượng RebA dùng để chỉ nồng độ của RebA trong mẫu B đã xử lý đã cho của ví dụ thực nghiệm 9 khi nồng độ của glyxerol trong mẫu D đã cho và các nồng độ của glyxerol trong mẫu B đã xử lý đã cho là như nhau.

Ví dụ thực nghiệm 13

72,5 μ l dầu MCT được bổ sung 10 μ l DMSO (được sản xuất bởi FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, số model: 037-24053) và 917,5 μ l PBS. Hỗn hợp này được khuấy bằng cách tạo dòng chảy rồi để thu được dung dịch gốc có nồng độ đương lượng RebA bằng 25mM.

Dung dịch gốc thu được được làm loãng, nếu cần, bằng PBS chứa 1% DMSO để thu được mẫu E-1mM đến mẫu E-25mM. Bảng 2 mô tả các nồng độ đương lượng RebA. Nồng độ đương lượng RebA dùng để chỉ nồng độ của RebA trong mẫu B đã xử lý đã cho của ví dụ thực nghiệm 9 khi nồng độ của dầu MCT trong mẫu E đã cho và các nồng độ của dầu MCT trong mẫu B đã xử lý đã cho là như nhau.

Đo lượng tiết GLP-1

Trong các điều kiện được thể hiện trong bảng 2, mỗi trong số các mẫu thu được trong các ví dụ thực nghiệm từ 8 đến 13 nêu trên được bổ sung vào môi trường. Trong môi trường thu được, các tế bào được nuôi cấy, và lượng tiết GLP-1 sau 2 giờ được đo. Các quy trình cụ thể là như sau.

H716 (tế bào có nguồn gốc từ kết tràng người) được nuôi cấy trong RPMI 1640 (Thermo Fisher Scientific Inc., số model: 61870-036) (10% FBS (Hyclone, số model:

SH30396,03), natri pyruvat 1mM) trong tủ ủ ở 37°C, 5% CO₂.

Việc nuôi cấy sơ bộ được thực hiện trong 2 tuần, và các tế bào được thu hồi một cách phù hợp, và sau đó các nguyên liệu gốc tế bào được điều chế.

Các tế bào được gieo trong đĩa 96 lỗ ở nồng độ 2×10^5 tế bào/90µl trên mỗi lỗ. Ở thời điểm này, hàm lượng của FBS (Hyclone, số model: SH30396,03) trong môi trường được giảm đến 0,5% để ngăn chặn sự tăng sinh tế bào.

Sau 24 giờ, 10µl mỗi mẫu được bổ sung ($n = 3$ đến 4). Các nồng độ cuối cùng trong môi trường được thể hiện trong cột “Mẫu F.C.” của bảng 2.

Sau thời gian đã được xác định trước (2 giờ) từ khi bổ sung, các đĩa 96 lỗ được thu hồi.

Các đĩa 96 lỗ thu hồi được được ly tâm ở 300 g x 5 phút, và phần nổi lên trên được thu hồi.

GLP-1 trong phần nổi lên trên thu hồi được được định lượng bằng bộ kit xét nghiệm miễn dịch Human GLP-1 (7-36 amide) Immunoassay kit được sản xuất bởi PerkinElmer, Inc. Ở thời điểm này, khoảng của mẫu chuẩn trong đường cong hiệu chuẩn nằm trong khoảng từ 30 đến 100000pg/ml. Có giá trị mà gây ra các sai số với giá trị lớn hơn 100000pg/ml, giá trị như vậy được giả định là lớn hơn hoặc bằng 100000pg/ml được tính là 100000pg/ml.

Các giá trị ngoại lệ ($p < 0,01$) được loại trừ bằng thử nghiệm Smirnov-Grubbs.

Các kết quả được thể hiện trên Fig.8. Lượng tiết GLP-1 trong dung dịch chứa 1% DMSO dùng làm đối chứng không kích thích, và lượng tiết GLP-1 trong dung dịch nước của PMA (được sản xuất bởi FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, số model: 162-23591) dùng làm đối chứng dương cũng được thể hiện trên Fig.8. Dung dịch nước của PMA thu được bằng cách bổ sung 16,21µl DMSO vào 1mg PMA để điều chế dung dịch gốc; bổ sung PBS vào dung dịch gốc để điều chế dung dịch 1mM; và làm loãng nó bằng PBS chứa 1% DMSO.

Tiếp theo, để xác nhận, lượng tiết GLP-1 cũng được đo bằng các đĩa khác. Cụ thể là, cùng một phần nổi lên trên của môi trường nuôi cấy như trên Fig.8 được sử dụng, và phép đo lượng GLP-1 được thực hiện trong một đĩa thử nghiệm đối với mẫu B đến mẫu D và một đĩa thử nghiệm khác đối với mẫu E. Các kết quả thu được bằng cách đo phần nổi lên trên của môi trường nuôi cấy sau 2 giờ trong cùng một đĩa thử nghiệm được

thể hiện trên các Fig.9 đến 14. Các nồng độ của mỗi mẫu được sử dụng được thể hiện trên các Fig.9 đến 14. Lưu ý rằng các nồng độ của C, D, và E được thể hiện trên các Fig.11, 13, và 14 là các nồng độ đương lượng RebA.

Khoảng của đường cong hiệu chuẩn là từ 30 đến 100000pg/ml, và lần này không có giá trị số nào gây ra sai số với giá trị lớn hơn 100000pg/ml, do đó các giá trị lớn hơn 100000pg/ml được tính là giá trị lý thuyết.

Bảng 2 được thể hiện dưới đây. So sánh dương trong bảng 2 còn được gọi là đối chứng dương. So sánh âm còn được gọi là đối chứng âm.

Bảng 2

	#		Nồng độ bổ sung		Đương lượng ppm	Lượng bổ sung (μl)	PBS	Môi trường (μl)	Tổng (μl)	Mẫu F.C.		Đương lượng ppm
So sánh âm không kích thích	1	PBS chứa 1% DMSO	-		-	10	0	90	100	-		-
So sánh dương	2	PMA	0,01	mM	-	10	0	90	100	0,001	mM	-
	3	1% DMSO	1	mM	-	10	0	90	100	0,1	mM	-
Chất thử nghiệm	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	B đã xử lý 1% DMSO	1	mM	10,0	10	0	90	100	0,10	mM	1,0
	12		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	mM	-	10	0	90	100	0,10	mM	-

19	1% DMSO	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	-

Ví dụ thực nghiệm 15

36,3mg RebA, được bổ sung 9,4 μ l DMSO (được sản xuất bởi FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, số model: 037-24053) tiếp theo bổ sung 929,0 μ l PBS. Sau đó, hỗn hợp được khuấy bằng cách tạo dòng chảy rồi để thu được dung dịch gốc có nồng

độ RebA bằng 40mM.

Dung dịch gốc và PBS thu được được làm loãng bằng PBS chứa 1% DMSO để thu được mẫu B-0,31mM đến mẫu B-20mM. Các nồng độ của RebA được mô tả trong bảng 3.

Ví dụ thực nghiệm 16

Dung dịch hỗn hợp trong nước được điều chế bằng cách trộn 490g glyxerol, 100g RebA, và 10g este của axit béo với polyglyxerol, và gia nhiệt và hòa tan hỗn hợp ở 70°C. Dung dịch hỗn hợp trong nước này được bổ sung 300g dầu MCT dưới dạng chất béo và dầu, và hỗn hợp này được nhũ hóa ở tốc độ quay 8000 vòng/phút bằng máy trộn đồng hóa (được sản xuất bởi Tokushu Kika Kogyo Co., Ltd.). Sau khi hoàn thành việc khuấy trộn, hỗn hợp được làm nguội đến 40°C, và 100g nước được bổ sung để thu được dung dịch RebA đã xử lý.

1,4μl dung dịch RebA đã xử lý thu được được bổ sung 10μl DMSO (được sản xuất bởi FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, số model: 037-24053) và 796,6μl PBS. Hỗn hợp này được khuấy bằng cách tạo dòng chảy rồi để thu được dung dịch gốc có nồng độ RebA bằng 20mM.

Dung dịch gốc được làm loãng, nếu cần, bằng PBS chứa 1% DMSO để thu được mẫu B đã xử lý-0,31mM đến mẫu B đã xử lý-20mM. Các nồng độ của RebA được mô tả trong bảng 3.

Ví dụ thực nghiệm 17

Dung dịch C thu được theo cách giống như cách điều chế dung dịch RebA đã xử lý trong ví dụ thực nghiệm 16 ngoại trừ rằng 100g RebA không được sử dụng và 490g glyxerol, 10g este của axit béo với polyglyxerol, 300g dầu MCT, và 200g nước được sử dụng.

386,8μl dung dịch C được bổ sung 10μl DMSO (được sản xuất bởi FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, số model: 037-24053) và 603,2 μl PBS. Hỗn hợp này được khuấy bằng cách tạo dòng chảy rồi để thu được dung dịch gốc có nồng độ đương lượng RebA bằng 40mM.

Dung dịch gốc được làm loãng bằng PBS chứa 1% DMSO để thu được mẫu C-0,31mM đến mẫu C-20mM. Bảng 3 mô tả các nồng độ đương lượng RebA. Nồng độ đương lượng RebA dùng để chỉ nồng độ của RebA trong mẫu B đã xử lý đã cho của ví

dự thực nghiệm 16 khi các nồng độ của este của axit béo với polyglyxerol trong mẫu C đã cho và các nồng độ của este của axit béo với polyglyxerol trong mẫu B đã xử lý đã cho là như nhau.

Ví dụ thực nghiệm 18

Theo cách giống như trong ví dụ thực nghiệm 15, thu được mẫu B chứa RebA ở nồng độ gấp hai lần nồng độ trong mẫu B + C. Nghĩa là, thu được mẫu B-0,62mM, mẫu B-2,5mM, mẫu B-10mM, và mẫu B-40mm. Nồng độ sau các dấu gạch nối là nồng độ của RebA.

Theo cách giống như trong ví dụ thực nghiệm 17, mẫu C chứa este của axit béo với polyglyxerol ở nồng độ gấp hai lần nồng độ trong mẫu B + C thu được. Nghĩa là, thu được mẫu C-0,62mM, mẫu C-2,5mM, mẫu C-10mM, và mẫu C-40mm. Nồng độ sau các dấu gạch nối là nồng độ đương lượng RebA.

Các lượng bằng nhau của mẫu B và mẫu C ở cùng một nồng độ (ví dụ, mẫu B-0,62mm và mẫu C-0,62mM) được trộn để thu được mẫu B + C-0,31mM đến mẫu B + C-20mM. Các nồng độ của RebA được mô tả trong bảng 3.

Ví dụ thực nghiệm 19

94,8μl glyxerol, được bổ sung 10μl DMSO (được sản xuất bởi FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, số model: 037-24053) và 895μl PBS. Hỗn hợp này được khuấy bằng cách tạo dòng chảy rồi để thu được dung dịch gốc có nồng độ đương lượng RebA bằng 20mM.

Dung dịch gốc thu được được làm loãng, nếu cần, bằng PBS chứa 1% DMSO để thu được mẫu D-0,31mM đến mẫu D-20mM. Bảng 3 mô tả các nồng độ đương lượng RebA. Nồng độ đương lượng RebA dùng để chỉ nồng độ của RebA trong mẫu B đã xử lý đã cho của ví dụ thực nghiệm 16 khi nồng độ của glyxerol trong mẫu D đã cho và các nồng độ của glyxerol trong mẫu B đã xử lý đã cho là như nhau.

Ví dụ thực nghiệm 20

58,0μl dầu MCT được bổ sung 10μl DMSO (được sản xuất bởi FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, số model: 037-24053) và 932,0μl PBS. Hỗn hợp này được khuấy bằng cách tạo dòng chảy rồi để thu được dung dịch gốc có nồng độ đương lượng RebA bằng 20mM.

Dung dịch gốc thu được được làm loãng, nếu cần, bằng PBS chứa 1% DMSO

để thu được mẫu E-0,31mM đến mẫu E-20mM. Bảng 3 mô tả các nồng độ đương lượng RebA. Nồng độ đương lượng RebA dùng để chỉ nồng độ của RebA trong mẫu B đã xử lý đã cho của ví dụ thực nghiệm 16 khi nồng độ của dầu MCT trong mẫu E đã cho và các nồng độ của dầu MCT trong mẫu B đã xử lý đã cho là như nhau.

Tính độc tế bào

Trong các điều kiện được thể hiện trong bảng 3, các mẫu thu được trong các ví dụ thực nghiệm từ 15 đến 20 nêu trên được bổ sung vào môi trường. Trong môi trường thu được, các tế bào được nuôi cấy, và tính độc tế bào sau 2 giờ và 24 giờ được đo. Các quy trình cụ thể là như sau.

Các tế bào H716 được nuôi cấy trong RPMI 1640 (được sản xuất bởi Thermo Fisher Scientific Inc., số model 61870-036) (10% FBS (được sản xuất bởi Gibco, số model SH102770), natri pyruvat 1mM) trong tủ ủ ở 37°C, 5% CO₂. Các tế bào H716 được gieo trong đĩa 96 lỗ ở nồng độ 2×10^5 tế bào/90μl/lỗ (để đánh giá tế bào chết) và trong các đĩa 48 lỗ ở nồng độ 4×10^5 tế bào/180μl/lỗ (để đánh giá hình thái học). Hàm lượng của FBS trong môi trường khi các tế bào được gieo trong đĩa là 0,5%. Sau 24 giờ từ khi gieo tế bào, mẫu ở mỗi nồng độ được bổ sung ở nồng độ 10μl/lỗ (các đĩa 96 lỗ) hoặc 20μl/lỗ (các đĩa 48 lỗ). Các nồng độ cuối cùng trong môi trường được thể hiện trong cột “Mẫu F.C.” của bảng 3. Sau hai giờ từ khi bổ sung mẫu, mỗi mẫu ở nồng độ cao nhất (#1, #6, #10, #14, #18, #22, #26, #30 trong bảng 3) được đánh giá.

Đánh giá bằng cách sử dụng các tế bào chết làm chỉ thị

Sau 2 giờ và 24 giờ từ khi bổ sung mẫu, các tế bào được ly tâm ở 100 x g trong 5 phút, và phần nổi lên trên được loại bỏ. Dung dịch propidi iodua (0,66μg/ml, làm loãng ở tỷ lệ 1:1500 trong PBS) được bổ sung với lượng 50μl/lỗ, và các tế bào được để yên ở nhiệt độ phòng trong 15 phút để nhuộm các tế bào chết. Các tế bào được tạo huyền phù bằng cách nhỏ pipet, và sau đó các hình ảnh tương phản pha và các hình ảnh phát huỳnh quang được chụp bằng cách sử dụng kính hiển vi. Tổng số các tế bào được đếm dựa trên các hình ảnh tương phản pha bằng ImageJ, và số lượng của các tế bào chết được đếm dựa trên các hình ảnh phát huỳnh quang. Tỷ lệ tế bào chết được tính bằng số lượng các tế bào đếm được.

Tỷ lệ tế bào chết (%) = số lượng các tế bào chết/tổng số lượng các tế bào x 100

Mỗi tỷ lệ trong số tỷ lệ tế bào chết ở thời điểm bổ sung mẫu được hiệu chỉnh

bằng cách lấy tỷ lệ tế bào chết sau 24 giờ từ khi gieo tế bào mà không bổ sung mẫu là 0%, và tỷ lệ tế bào chết khi các tế bào được để yên trên nước đá trong thời gian lớn hơn hoặc bằng 30 phút trong điều kiện etanol 70% là 100%. Các kết quả được thể hiện trên Fig.15. Fig.15a thể hiện các kết quả sau 2 giờ, và Fig.15b thể hiện các kết quả sau 24 giờ.

Có thể nhận thấy từ Fig.15a thể hiện các kết quả sau 2 giờ rằng tất cả các mẫu không làm chết tế bào.

Ngoài ra, như có thể nhận thấy từ Fig.15b thể hiện các kết quả sau 24 giờ, tỷ lệ tế bào chết là cao nhất khi mẫu B + C (nồng độ RebA 2mM) được bổ sung, nhưng nó ở cùng một mức như nồng độ thấp nhất của PMA. Các mẫu khác với mẫu B + C có tỷ lệ tế bào chết bằng hoặc thấp hơn so sánh âm (-) (còn được gọi là đối chứng âm). Do đó, không có khả năng xảy ra sự chết tế bào do mẫu B + C gây ra, và các mẫu khác không làm chết tế bào.

Đánh giá bằng cách sử dụng hình thái học tế bào làm chỉ thị)

Sau 2 giờ và 24 giờ từ khi bổ sung mẫu, các tế bào được chụp ảnh bằng kính hiển vi, và sự có mặt và vắng mặt của sự thay đổi hình thái học được kiểm tra. Do mẫu B đã xử lý, mẫu C và mẫu B + C bị đục, nên việc xác định khi sử dụng kính hiển vi ở các nồng độ bổ sung là 0,5mM và 2mM là khó khăn. Tuy nhiên, khi các mẫu khác được bổ sung vào các tế bào H716, không quan sát thấy có sự thay đổi hình thái học như co hoặc vỡ tế bào.

Bảng 3 được thể hiện dưới đây. So sánh dương trong bảng 3 còn được gọi là đối chứng dương. So sánh âm còn được gọi là đối chứng âm.

Bảng 3

	#	Chất thử nghiệm	Nồng độ bổ sung		Đương lượng ppm	Mẫu F.C.		Đương lượng ppm
So sánh âm không kích thích	1	Dung dịch chứa 1% DMSO	-		-	-		-
So sánh đương	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	-
Chất thử nghiệm	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 đã xử lý 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	-

Ví dụ thực nghiệm 21

134,3mg RebA được bổ sung 34,7 μ l DMSO (được sản xuất bởi FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, số model: 037-24053), tiếp theo bổ sung 3438 μ l PBS. Sau đó, hỗn hợp được khuấy bằng cách tạo dòng chảy rồi để thu được dung dịch gốc có nồng độ RebA bằng 40mM.

Dung dịch gốc thu được được làm loãng bằng PBS chứa 1% DMSO để thu được mẫu B-1mM đến mẫu B-20mM. Các nồng độ của RebA được mô tả trong bảng 4.

Ví dụ thực nghiệm 22

Dung dịch C-1 thu được theo cách giống như cách điều chế dung dịch RebA đã xử lý trong ví dụ thực nghiệm 16 ngoại trừ rằng 100g RebA được thay thế bằng 100g nước, và 10g este của axit béo với sucroza được sử dụng thay cho 10g este của axit béo với polyglyxerol làm chất nhũ hóa. Cụ thể là, dung dịch hỗn hợp trong nước được điều chế bằng cách trộn 490g glyxerol, và 10g este của axit béo với sucroza (được sản xuất bởi Mitsubishi-Chemical Foods Corporation, HLB = 16), và gia nhiệt và hòa tan hỗn hợp ở 70°C. Dung dịch hỗn hợp trong nước này được bổ sung 300g dầu MCT dưới dạng chất béo và dầu, và hỗn hợp này được nhũ hóa ở tốc độ quay 8000 vòng/phút bằng máy trộn đồng hóa (được sản xuất bởi Tokushu Kika Kogyo Co., Ltd.). Sau khi hoàn thành việc khuấy trộn, hỗn hợp được làm nguội đến 40°C, và 200g nước được bổ sung để thu được dung dịch C-1.

580,2 μ l dung dịch C-1 thu được được bổ sung 15 μ l DMSO (được sản xuất bởi FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, số model: 037-24053) và 904,8 μ l PBS. Hỗn hợp này được khuấy bằng cách tạo dòng chảy rồi để thu được dung dịch gốc có nồng độ đương lượng RebA bằng 40mM.

Dung dịch gốc thu được được làm loãng bằng PBS chứa 1% DMSO để thu được mẫu C-1-1mM đến mẫu C-1-20mM. Bảng 4 mô tả các nồng độ đương lượng RebA. Nồng độ đương lượng RebA dùng để chỉ nồng độ của RebA trong mẫu B+C-1 đã cho của ví dụ thực nghiệm 25 khi các nồng độ của glyxerol và chất nhũ hóa trong mẫu C-1 đã cho và các nồng độ của glyxerol và chất nhũ hóa trong mẫu B+C-1 đã cho là như nhau.

Ví dụ thực nghiệm 23

Thu được mẫu C-2-1mM đến mẫu C-2-20mM theo cách giống như trong ví dụ

thực nghiệm 22 ngoại trừ rằng 10g lexitin đã được cắt bằng enzym (được sản xuất bởi Taiyo Kagaku Co., Ltd., HLB = 12,0) được sử dụng thay cho 10g este của axit béo với sucroza (được sản xuất bởi Mitsubishi-Chemical Foods Corporation, HLB = 16). Bảng 4 mô tả các nồng độ đương lượng RebA. Nồng độ đương lượng RebA dùng để chỉ nồng độ của RebA trong mẫu B+C-2 đã cho của ví dụ thực nghiệm 26 khi các nồng độ của glyxerol và chất nhũ hóa trong mẫu C-2 đã cho và các nồng độ của glyxerol và chất nhũ hóa trong mẫu B+C-2 đã cho là như nhau.

Ví dụ thực nghiệm 24

Thu được mẫu C-3-1mM đến mẫu C-3-20mm theo cách giống như trong ví dụ thực nghiệm 22 ngoại trừ rằng 10g monoglyxerit của axit hữu cơ (được sản xuất bởi Taiyo Kagaku Co., Ltd., HLB = 9,0) được sử dụng thay cho 10g este của axit béo với sucroza (được sản xuất bởi Mitsubishi-Chemical Foods Corporation, HLB = 16). Bảng 4 mô tả các nồng độ đương lượng RebA. Nồng độ đương lượng RebA dùng để chỉ nồng độ của RebA trong mẫu B+C-3 đã cho của ví dụ thực nghiệm 27 khi các nồng độ của glyxerol và chất nhũ hóa trong mẫu C-3 đã cho và các nồng độ của glyxerol và chất nhũ hóa trong mẫu B+C-3 đã cho là như nhau.

Ví dụ thực nghiệm 25

Theo cách giống như trong ví dụ thực nghiệm 21, thu được mẫu B chứa RebA ở nồng độ gấp hai lần nồng độ trong mẫu B + C-1. Nghĩa là, thu được mẫu B-2mM, mẫu B-5mM, mẫu B-10mM, mẫu B-20mM, mẫu B-30mm, và mẫu B-40mm. Nồng độ sau các dấu gạch nối là nồng độ của RebA.

Theo cách giống như trong ví dụ thực nghiệm 22, thu được mẫu C-1 chứa este của axit béo với sucroza ở nồng độ gấp hai lần nồng độ trong mẫu B + C-1. Nghĩa là, thu được mẫu C-1-2mM, mẫu C-1-5mM, mẫu C-1-10mM, mẫu C-1-20mM, mẫu C-1-30mm, và mẫu C-1-40mm. Nồng độ sau các dấu gạch nối là nồng độ đương lượng RebA.

Các lượng bằng nhau của mẫu B và mẫu C ở cùng một nồng độ (ví dụ, mẫu B-1-2mm và mẫu C-1-2mM) được trộn để thu được mẫu B + C-1-1mM đến mẫu B + C-1-20mM. Các nồng độ của RebA được mô tả trong bảng 4.

Ví dụ thực nghiệm 26

Thu được mẫu B+C-2-1mM đến mẫu B+C-2-20mm theo cách giống như trong ví dụ thực nghiệm 25 ngoại trừ rằng 10g lexitin đã được cắt bằng enzym (được sản xuất

bởi Taiyo Kagaku Co., Ltd., HLB = 12,0) được sử dụng thay cho 10g este của axit béo với sucroza (được sản xuất bởi Mitsubishi-Chemical Foods Corporation, HLB = 16). Các nồng độ của RebA được mô tả trong bảng 4.

Ví dụ thực nghiệm 27

Thu được mẫu B+C-3-1mM đến mẫu B+C-3-20mM theo cách giống như trong ví dụ thực nghiệm 25 ngoại trừ rằng 10g monoglyxerit của axit hữu cơ (được sản xuất bởi Taiyo Kagaku Co., Ltd., HLB = 9,0) được sử dụng thay cho 10g este của axit béo với sucroza (được sản xuất bởi Mitsubishi-Chemical Foods Corporation, HLB = 16). Các nồng độ của RebA được mô tả trong bảng 4.

Ví dụ thực nghiệm 28

13,1mg este của axit béo với sucroza được bổ sung 339 μ l DMSO (được sản xuất bởi FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, số model: 037-24053). Hỗn hợp này được khuấy bằng cách tạo dòng chảy rồi và được làm loãng 20 lần bằng DMSO để thu được dung dịch gốc có nồng độ đương lượng RebA bằng 2000mM. Dung dịch gốc thu được được bổ sung PBS để thu được dung dịch 20mM.

Dung dịch 20mM thu được được làm loãng, nếu cần, bằng PBS chứa 1% DMSO để thu được mẫu G-1-1mM đến mẫu G-1-20mM. Bảng 4 mô tả các nồng độ đương lượng RebA. Nồng độ đương lượng RebA dùng để chỉ nồng độ của RebA trong mẫu B + C-1 đã cho của ví dụ thực nghiệm 25 khi nồng độ của este của axit béo với sucroza trong mẫu G-1 đã cho và nồng độ của este của axit béo với sucroza trong mẫu B + C-1 đã cho là như nhau.

Ví dụ thực nghiệm 29

20,9mg lexitin đã được cắt bằng enzym được bổ sung 540 μ l PBS. Hỗn hợp này được khuấy bằng cách tạo dòng chảy rồi và được làm loãng 20 lần bằng DMSO (được sản xuất bởi FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, số model: 037-24053) để thu được dung dịch gốc có nồng độ đương lượng RebA bằng 2000mM. Dung dịch gốc thu được được bổ sung PBS và DMSO, và điều chế được dung dịch 20mM (1% DMSO).

Dung dịch 20mM thu được được làm loãng, nếu cần, bằng PBS chứa 1% DMSO để thu được mẫu G-2-1mM đến mẫu G-2-20mM. Bảng 4 mô tả các nồng độ đương lượng RebA. Nồng độ đương lượng RebA dùng để chỉ nồng độ của RebA trong mẫu B + C-2 đã cho của ví dụ thực nghiệm 26 khi nồng độ của lexitin đã được cắt bằng enzym

trong mẫu G-2 đã cho và nồng độ của lexitin đã được cắt bằng enzym trong mẫu B + C-2 đã cho là như nhau.

Ví dụ thực nghiệm 30

Monoglyxerit của axit hữu cơ được hòa tan ở 60°C, và 905µl DMSO được bổ sung vào 35,0mg monoglyxerit của axit hữu cơ hòa tan. Hỗn hợp này được khuấy bằng cách tạo dòng chảy rồi và được làm loãng 20 lần bằng DMSO để thu được dung dịch gốc có nồng độ đương lượng RebA bằng 2000mM. Dung dịch gốc thu được được bổ sung PBS để thu được dung dịch 20mM.

Dung dịch 20mM thu được được làm loãng, nếu cần, bằng PBS chứa 1% DMSO để thu được mẫu G-3-1mM đến mẫu G-3-20mM. Bảng 4 mô tả các nồng độ đương lượng RebA. Nồng độ đương lượng RebA dùng để chỉ nồng độ của RebA trong mẫu B + C-3 đã cho của ví dụ thực nghiệm 27 khi nồng độ của monoglyxerit của axit hữu cơ trong mẫu G-3 đã cho và nồng độ của monoglyxerit của axit hữu cơ trong mẫu B + C-3 đã cho là như nhau.

Ví dụ thực nghiệm 31

Este của axit béo với polyglyxerol được hòa tan ở 60°C, và 259µl DMSO (được sản xuất bởi FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, số model: 037-24053) được bổ sung vào 50µl este của axit béo với polyglyxerol hòa tan, tiếp theo bổ sung 984µl PBS. Hỗn hợp này được khuấy bằng cách tạo dòng chảy rồi và được làm loãng 20 lần bằng DMSO để thu được dung dịch gốc có nồng độ đương lượng RebA bằng 400mM.

Dung dịch gốc và PBS thu được được sử dụng để điều chế dung dịch 20mM. Dung dịch 20mM thu được được làm loãng, nếu cần, bằng PBS chứa 1% DMSO để thu được mẫu G-4-1mM đến mẫu G-4-20mM. Bảng 4 mô tả các nồng độ đương lượng RebA. Nồng độ đương lượng RebA dùng để chỉ nồng độ của RebA trong mẫu B + C đã cho của các ví dụ thực nghiệm 25-27 khi nồng độ của este của axit béo với polyglyxerol trong mẫu G-4 đã cho và nồng độ của chất nhũ hóa trong mẫu B + C đã cho là như nhau.

Lượng tiết GLP-1

Mỗi trong số các mẫu thu được trong các ví dụ thực nghiệm từ 21 đến 31 nêu trên được sử dụng cho tế bào, và lượng tiết GLP-1 sau 2 giờ và 24 giờ được đo. Các quy trình cụ thể là như sau.

Các tế bào H716 được nuôi cấy trong RPMI 1640 (Thermo Fisher Scientific

Inc., số model: 61870-036) (10% FBS (được sản xuất bởi Gibco, số model SH102770), natri pyruvat 1mM) trong tủ ủ ở 37°C, 5% CO₂. Các tế bào H716 được gieo trong đĩa 96 lỗ ở nồng độ 2×10^5 tế bào/90µl/lỗ. Hàm lượng của FBS trong môi trường khi các tế bào được gieo trong đĩa là 0,5%.

Sau 24 giờ từ khi gieo tế bào, các mẫu thu được trong các ví dụ thực nghiệm từ 21 đến 31 như được thể hiện trong bảng 4 được bổ sung vào môi trường với lượng 10µl/lỗ. Các nồng độ cuối cùng trong môi trường được thể hiện trong cột “Mẫu F.C.” của bảng 4.

Sau 2 giờ và 24 giờ từ khi bổ sung mẫu, đĩa 96 lỗ được ly tâm ở 300 x g trong 5 phút, và phần nổi lên trên của môi trường nuôi cấy được thu hồi.

GLP-1 trong phần nổi lên trên của môi trường nuôi cấy thu hồi được được định lượng bằng bộ kit xét nghiệm miễn dịch Human GLP-1 (7-36 amide) Immunoassay kit (được sản xuất bởi PerkinElmer, Inc., số model: AL359C). Đối với các giá trị định lượng, giá trị nằm ngoài phạm vi của đường cong hiệu chuẩn và gây sai số được loại trừ. Hơn nữa, đồ thị dạng hộp được tạo ra bằng phần mềm phân tích thống kê R, và khi giá trị nhỏ hơn điểm tứ phân vị thứ nhất hoặc lớn hơn điểm tứ phân vị thứ ba bằng hoặc vượt qua phạm vi 1,5 điểm tứ phân vị, giá trị này được loại trừ dưới dạng giá trị ngoại lệ.

Các kết quả được thể hiện trên Fig.16. Lượng tiết GLP-1 trong dung dịch chứa 1% DMSO dùng làm đối chứng không kích thích, và lượng tiết GLP-1 trong dung dịch nước của PMA (được sản xuất bởi FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, 162-23591) dùng làm đối chứng dương cũng được thể hiện trên Fig.16. Dung dịch nước của PMA thu được bằng cách bổ sung 16,21µl DMSO vào 1mg PMA để điều chế dung dịch gốc; bổ sung PBS vào dung dịch gốc để điều chế dung dịch 1mM; và làm loãng nó bằng PBS chứa 1% DMSO.

Bảng 4 được thể hiện dưới đây. So sánh dương trong bảng 4 còn được gọi là đối chứng dương. So sánh âm còn được gọi là đối chứng âm.

Bảng 4

	#	Nồng độ bổ sung			Đương lượng ppm	Lượng bổ sung (μl)	Môi trường (μl)	Tổng (μl)	Mẫu F.C.	
So sánh âm không kích thích	1	1%DMSO- chứa PBS	-		-	10	90	100	-	
So sánh dương	2	PMA	0,01	mM	-	10	90	100	0,001	mM
	3	(1%DMSO)	1	mM	-	10	90	100	0,1	mM
Chất thử nghiệm	4	B (1%DMSO)	1	mM	967,0	10	90	100	0,10	mM
	5		2,5	mM	2417,5	10	90	100	0,25	mM
	6		5	mM	4835,1	10	90	100	0,50	mM
	7		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	C-1 (1%DMSO)	1	mM	967,0	10	90	100	0,10	mM
	11		2,5	mM	2417,5	10	90	100	0,25	mM
	12		5	mM	4835,1	10	90	100	0,50	mM
	13		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	C-2 (1%DMSO)	1	mM	967,0	10	90	100	0,10	mM
	17		2,5	mM	2417,5	10	90	100	0,25	mM
	18		5	mM	4835,1	10	90	100	0,50	mM
	19		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	C-3 (1%DMSO)	1	mM	967,0	10	90	100	0,10	mM
	23		2,5	mM	2417,5	10	90	100	0,25	mM
	24		5	mM	4835,1	10	90	100	0,50	mM
	25		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	B + C-1	1	mM	967,0	10	90	100	0,10	mM
	29	(1%DMSO)	2,5	mM	2417,5	10	90	100	0,25	mM

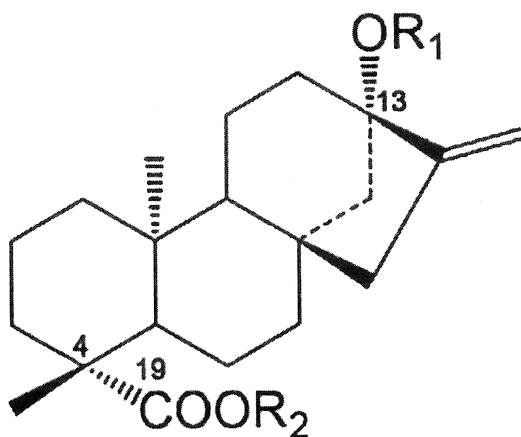
30		5	mM	4835,1	10	90	100	0,50	mM
31		10	mM	9670,1	10	90	100	1,00	mM
32		15	mM	14505,2	10	90	100	1,50	mM
33		20	mM	19340,2	10	90	100	2,00	mM
34	B + C-2 (1%DMSO)	1	mM	967,0	10	90	100	0,10	mM
35		2,5	mM	2417,5	10	90	100	0,25	mM
36		5	mM	4835,1	10	90	100	0,50	mM
37		10	mM	9670,1	10	90	100	1,00	mM
38		15	mM	14505,2	10	90	100	1,50	mM
39		20	mM	19340,2	10	90	100	2,00	mM
40	B + C-3 (1%DMSO)	1	mM	967,0	10	90	100	0,10	mM
41		2,5	mM	2417,5	10	90	100	0,25	mM
42		5	mM	4835,1	10	90	100	0,50	mM
43		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	G-1 (1%DMSO)	1	mM	967,0	10	90	100	0,10	mM
47		2,5	mM	2417,5	10	90	100	0,25	mM
48		5	mM	4835,1	10	90	100	0,50	mM
49		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	G-2 (1%DMSO)	1	mM	967,0	10	90	100	0,10	mM
53		2,5	mM	2417,5	10	90	100	0,25	mM
54		5	mM	4835,1	10	90	100	0,50	mM
55		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	G-3 (1%DMSO)	1	mM	967,0	10	90	100	0,10	mM
59		2,5	mM	2417,5	10	90	100	0,25	mM
60		5	mM	4835,1	10	90	100	0,50	mM
61		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	G-4	1	mM	967,0	10	90	100	0,10	mM

65	(1%DMSO)	2,5	mM	2417,5	10	90	100	0,25	mM
66		5	mM	4835,1	10	90	100	0,50	mM
67		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

* Nồng độ từ #10 đến #69 được chỉ ra dưới dạng nồng độ của mẫu B đã xử lý.

Ví dụ thực nghiệm 32

Các tỷ lệ phân bố của steviosit, RebA, RebD, và RebM được đo. Để tham khảo, các công thức cấu trúc của steviosit, RebA, RebD, và RebM được thể hiện dưới đây.



Tên hợp chất	R ₁	R ₂
Rebaudiosit A (rebA)	Glcβ1,2(Gluβ1,3)Gluβ1-	Glcβ1-
Steviosit (stv)	Glcβ1,2Gluβ1-	Glcβ1-
Rebaudiosit D (rebD)	Glcβ1,2(Gluβ1,3)Gluβ1-	Glcβ1,2Glcβ1-
Rebaudiosit M (rebM)	Glcβ1,2(Gluβ1,3)Gluβ1-	Glcβ1,2(Gluβ1,3)Gluβ1-

Các quy trình đo cụ thể là như sau.

Sau khi mỗi khoảng 100ml nước tinh khiết và toluen được nạp vào phễu tách, 30mg mỗi steviol glycosit được bổ sung. Phễu tách được đậy kín để tránh rò rỉ chất lỏng, và khuấy bằng cách lắc có sử dụng máy lắc trong khoảng 30 phút, và sau đó để yên. Khi

lớp chất lỏng tách riêng thành hai lớp, tỷ lệ phân bố được đo bằng phép phân tích sắc ký lỏng-phổ khối (liquid chromatography-mass spectrum, LCMS) sau khi việc lấy mẫu được thực hiện từ mỗi lớp.

Các kết quả đo và các hình ảnh trong quá trình thử nghiệm được thể hiện trên Fig.17. Các ảnh của dung dịch chứa RebA sau thử nghiệm được thể hiện trên Fig.18.

Ví dụ thực nghiệm 33

1. Điều chế mẫu

Các mẫu SA-70A, SA-70B, SA-200A, SA-200B, SA-206A, SA-206B, SA-207A và SA-207B được điều chế bằng các quy trình sau đây. Lưu ý rằng mẫu có tên kết thúc bằng chữ A là mẫu được điều chế bằng hòa tan RebA trong hệ nước. Mẫu có tên kết thúc bằng chữ B là mẫu được điều chế bằng cách phân tán RebA vào trong hệ dầu.

(SA-70A)

Dung dịch hỗn hợp trong nước thu được bằng cách trộn 487g glyxerol, 103g RebA, và 10g este của axit béo với polyglyxerol (được sản xuất bởi Taiyo Kagaku Co., Ltd., HLB = 16,7), và gia nhiệt và hòa tan hỗn hợp ở 70°C. Dung dịch hỗn hợp trong nước này được bổ sung 300g MCT làm chất béo và dầu, và hỗn hợp này được nhũ hóa ở tốc độ quay 8000 vòng/phút bằng máy trộn đồng hóa (được sản xuất bởi Tokushu Kika Kogyo Co., Ltd.). Sau khi hoàn thành việc khuấy trộn, hỗn hợp được làm nguội đến 40°C, và 100g nước được bổ sung để thu được chế phẩm đã được nhũ hóa SA-70A.

(SA-70B)

Dung dịch hỗn hợp trong nước thu được bằng cách trộn 487g glyxerol và 10g este của axit béo với polyglyxerol (được sản xuất bởi Taiyo Kagaku Co., Ltd., HLB = 16,7), và gia nhiệt và hòa tan hỗn hợp ở 70°C. Dung dịch được trộn trong dầu thu được bằng cách trộn 300g MCT và 103g RebA ở nhiệt độ trong phòng. Dung dịch hỗn hợp trong nước này được bổ sung dung dịch được trộn trong dầu, và hỗn hợp này được nhũ hóa ở tốc độ quay 8000 vòng/phút bằng máy trộn đồng hóa (được sản xuất bởi Tokushu Kika Kogyo Co., Ltd.). Sau khi hoàn thành việc khuấy trộn, hỗn hợp được làm nguội đến 40°C, và 100g nước được bổ sung để thu được chế phẩm đã được nhũ hóa SA-70B.

(SA-200A)

Dung dịch hỗn hợp trong nước được điều chế bằng cách trộn 567g glyxerol, 103g RebA, và 30g este của axit béo với polyglyxerol (được sản xuất bởi Taiyo Kagaku

Co., Ltd., HLB = 16,7), và gia nhiệt và hòa tan hỗn hợp ở 70°C. Dung dịch hỗn hợp trong nước này được bổ sung 200g MCT làm chất béo và dầu, và hỗn hợp này được nhũ hóa ở tốc độ quay 8000vòng/phút bằng máy trộn đồng hóa (được sản xuất bởi Tokushu Kika Kogyo Co., Ltd.). Sau khi hoàn thành việc khuấy trộn, hỗn hợp được làm nguội đến 40°C, và 100g nước được bổ sung để thu được chế phẩm đã được nhũ hóa SA-200A.

(SA-200B)

Dung dịch hỗn hợp trong nước được điều chế bằng cách trộn 567g glyxerol và 30g este của axit béo với polyglyxerol (được sản xuất bởi Taiyo Kagaku Co., Ltd., HLB = 16,7), và gia nhiệt và hòa tan hỗn hợp ở 70°C. Dung dịch được trộn trong dầu thu được bằng cách trộn 200g MCT và 103g RebA ở nhiệt độ trong phòng. Dung dịch hỗn hợp trong nước này được bổ sung dung dịch được trộn trong dầu, và hỗn hợp này được nhũ hóa ở tốc độ quay 8000 vòng/phút bằng máy trộn đồng hóa (được sản xuất bởi Tokushu Kika Kogyo Co., Ltd.). Sau khi hoàn thành việc khuấy trộn, hỗn hợp được làm nguội đến 40°C, và 100g nước được bổ sung để thu được chế phẩm đã được nhũ hóa SA-200B.

(SA-206A)

Dung dịch hỗn hợp trong nước được điều chế bằng cách trộn 537g glyxerol, 103g RebA, và 60g este của axit béo với polyglyxerol (được sản xuất bởi Taiyo Kagaku Co., Ltd., HLB = 16,7), và gia nhiệt và hòa tan hỗn hợp ở 70°C. Dung dịch hỗn hợp trong nước này được bổ sung 200g MCT làm chất béo và dầu, và hỗn hợp này được nhũ hóa ở tốc độ quay 8000 vòng/phút bằng máy trộn đồng hóa (được sản xuất bởi Tokushu Kika Kogyo Co., Ltd.). Sau khi hoàn thành việc khuấy trộn, hỗn hợp được làm nguội đến 40°C, và 100g nước được bổ sung để thu được chế phẩm đã được nhũ hóa sơ bộ. Sau đó, chế phẩm đã được nhũ hóa sơ bộ này được nhũ hóa mịn ở áp suất 150MPa bằng máy phun kiểu ướt để thu được chế phẩm đã được nhũ hóa SA-206A.

(SA-206B)

Dung dịch hỗn hợp trong nước được điều chế bằng cách trộn 578g glyxerol và 55g este của axit béo với polyglyxerol (được sản xuất bởi Taiyo Kagaku Co., Ltd., HLB = 16,7), và gia nhiệt và hòa tan hỗn hợp ở 70°C. Dung dịch được trộn trong dầu thu được bằng cách trộn 182g MCT và 94g RebA ở nhiệt độ trong phòng. Dung dịch hỗn hợp trong nước này được bổ sung dung dịch được trộn trong dầu, và hỗn hợp này được

nhũ hóa ở tốc độ quay 8000 vòng/phút bằng máy trộn đồng hóa (được sản xuất bởi Tokushu Kika Kogyo Co., Ltd.). Sau khi hoàn thành việc khuấy trộn, hỗn hợp được làm nguội đến 40°C, và 91g nước được bổ sung để thu được chế phẩm đã được nhũ hóa sơ bộ. Sau đó, chế phẩm đã được nhũ hóa sơ bộ này được nhũ hóa mịn ở áp suất 150MPa bằng máy phun kiểu ước để thu được chế phẩm đã được nhũ hóa SA-206B.

(SA-207A)

Dung dịch hỗn hợp trong nước được điều chế bằng cách trộn 706g glyxerol, 34g RebA, và 60g este của axit béo với polyglyxerol (được sản xuất bởi Taiyo Kagaku Co., Ltd., HLB = 16,7), và gia nhiệt và hòa tan hỗn hợp ở 70°C. Dung dịch hỗn hợp trong nước này được bổ sung 100g MCT làm chất béo và dầu, và hỗn hợp này được nhũ hóa ở tốc độ quay 8000 vòng/phút bằng máy trộn đồng hóa (được sản xuất bởi Tokushu Kika Kogyo Co., Ltd.). Sau khi hoàn thành việc khuấy trộn, hỗn hợp được làm nguội đến 40°C, và 100g nước được bổ sung để thu được chế phẩm đã được nhũ hóa sơ bộ. Sau đó, chế phẩm đã được nhũ hóa sơ bộ này được nhũ hóa mịn ở áp suất 150MPa bằng máy phun kiểu ước để thu được chế phẩm đã được nhũ hóa SA-207A.

(SA-207B)

Dung dịch hỗn hợp trong nước được điều chế bằng cách trộn 706g glyxerol và 60g este của axit béo với polyglyxerol (được sản xuất bởi Taiyo Kagaku Co., Ltd., HLB = 16,7), và gia nhiệt và hòa tan hỗn hợp ở 70°C. Dung dịch được trộn trong dầu thu được bằng cách trộn 100g MCT và 34g RebA ở nhiệt độ trong phòng. Dung dịch hỗn hợp trong nước này được bổ sung dung dịch được trộn trong dầu, và hỗn hợp này được nhũ hóa ở tốc độ quay 8000 vòng/phút bằng máy trộn đồng hóa (được sản xuất bởi Tokushu Kika Kogyo Co., Ltd.). Sau khi hoàn thành việc khuấy trộn, hỗn hợp được làm nguội đến 40°C, và 100g nước được bổ sung để thu được chế phẩm đã được nhũ hóa sơ bộ. Sau đó, chế phẩm đã được nhũ hóa sơ bộ này được nhũ hóa mịn ở áp suất 150MPa bằng máy phun kiểu ước để thu được chế phẩm đã được nhũ hóa SA-207B.

2. Đánh giá độ ổn định của nhũ tương

Độ ổn định được đánh giá bằng cách sử dụng các mẫu được điều chế trong phần 1 nêu trên. Các quy trình cụ thể của việc đánh giá này là như sau.

2.1. Đo kích thước hạt của các hạt đã được nhũ hóa ngay sau khi điều chế

Kích thước hạt trung bình của các hạt đã được nhũ hóa trong mỗi mẫu ngay sau

khi điều chế được đo. Cụ thể là, mỗi mẫu ngay sau khi điều chế được làm loãng thích hợp bằng nước trao đổi ion để cường độ tán xạ laser bằng khoảng 1%, và sau đó kích thước hạt được đo bằng máy đo phân bố kích thước hạt kiểu nhiễu xạ/tán xạ laser (Spectris Co., Ltd., Malvern Panalytical).

2.2. Đo kích thước hạt của các hạt đã được nhũ hóa sau khi bảo quản lạnh

Mỗi mẫu được để yên trong tủ lạnh ở 4°C trong 2 tháng. Sau đó, kích thước hạt của các hạt đã được nhũ hóa được đo theo cách giống như trong phần 2.1.

Các kết quả được thể hiện trong bảng dưới đây.

Bảng 5

(%)	SA-70		SA-200		SA-206		SA-207	
	A	B	A	B	A	B	A	B
RebA	10,3		10,3		10,3	9,4	3,4	
MCT	30,0		20,0		20,0	18,2	10,0	
Chất nhũ hóa	1,0		3,0		6,0	5,5	6,0	
Glyxerol	48,7		56,7		53,7	57,8	70,6	
Nước	10,0		10,0		10,0	9,1	10,0	
Tổng	100,0		100,0		100,0	100,0	100,0	
Kích thước hạt của các hạt đã được nhũ hóa (μm) khi điều chế	0,40	0,27	0,20	0,17	0,07	0,08	0,06	0,06
Kích thước hạt của các hạt đã được nhũ hóa (μm) sau khi bảo quản lạnh trong 2 tháng	0,36	0,29	0,20	0,18	0,11	0,10	0,09	0,10

3. Đánh giá các đặc tính hương vị

Các đặc tính hương vị được đánh giá bằng cách sử dụng mẫu được điều chế trong phần 1 nêu trên. Các quy trình cụ thể của việc đánh giá này là như sau.

RebA được hòa tan trong nước tinh khiết để điều chế dung dịch nước có nồng độ RebA bằng 467ppm, được sử dụng làm đối chứng. Tiếp theo, nước tinh khiết được bổ sung vào mỗi mẫu được điều chế trong phần 1 nêu trên để điều chế dung dịch nước có nồng độ RebA bằng 467ppm. Việc đánh giá hương vị của mỗi dung dịch nước được

thực hiện bởi bảy người tham gia thử nghiệm cảm quan đã được đào tạo kỹ theo từng 0,5 điểm lấy đối chứng là 3 điểm. Các giá trị trung bình được tính, và chúng được xếp hạng. Hương vị được đánh giá bởi cường độ ngọt, mức kéo dài vị ngọt, và cường độ đắng. Những đặc tính có cùng điểm được đặt ở cùng một thứ hạng. Các thứ hạng được thể hiện trong mỗi cột mục đánh giá của bảng dưới đây. Tổng của các thứ hạng được thể hiện trong cột tổng của bảng dưới đây.

Bảng 6

	70A	200A	206A	207A
Cường độ ngọt	2	3	1	3
Mức kéo dài vị ngọt	3	1	2	1
Độ đắng	1	4	2	3
tổng	6	8	5	7
	70B	200B	206B	207B
Cường độ ngọt	4	2	3	1
Mức kéo dài vị ngọt	3	2	1	2
Độ đắng	4	2	1	3
tổng	11	6	5	6

4. Đánh giá các đặc tính khác sau khi bảo quản

Độ ổn định của nhũ tương, các đặc tính hương vị, và độ ổn định khi rung sau khi bảo quản được đánh giá bằng cách sử dụng mẫu được điều chế trong phần 1 nêu trên. Các quy trình cụ thể của việc đánh giá này là như sau.

16990,3mg mẫu SA-70A được bổ sung 3,483ml nước tinh khiết để thu được dung dịch đánh giá 70A. Dung dịch đánh giá 206A cũng được điều chế theo cùng một cách ngoại trừ rằng mẫu SA-206A được sử dụng thay cho mẫu SA-70A. Chế phẩm của mỗi dung dịch đánh giá là như sau.

Bảng 7

	70A	206A
Lượng mẫu (mg)	16990,3	16990,3
Tỷ lệ RebA trong mẫu (%)	10,3	10,3
Đương lượng RebA (mg)	1750,0	1750,0
Lượng nước tinh khiết được bổ sung (ml)	3483,0	3483,0
Tổng lượng (ml)	3500	3500
Nồng độ RebA (ppm)	500,0	500,0

Dung dịch đánh giá 70A và dung dịch đánh giá 206A thu được được để yên trong tủ lạnh có nhiệt độ bên trong bằng 5°C trong 4 tuần. Một dung dịch đánh giá 70A khác và một dung dịch đánh giá 206A khác được để yên trong buồng ổn nhiệt ở 55°C trong 4 tuần.

Ngoài ra, dung dịch đánh giá 70A và dung dịch đánh giá 206A sau khi được điều chỉnh độ pH của chúng đến 2,5 bằng cách sử dụng các anhydrit axit xitric được để yên trong tủ lạnh có nhiệt độ bên trong bằng 5°C trong 4 tuần. Một dung dịch đánh giá 70A khác và một dung dịch đánh giá 206A khác sau khi được điều chỉnh độ pH của chúng đến 2,5 bằng cách sử dụng các anhydrit axit xitric được để yên trong buồng ổn nhiệt ở 55°C trong 4 tuần.

4-1. Độ ổn định của nhũ tương sau khi bảo quản

Quan sát về bề ngoài của bề mặt chất lỏng của các dung dịch đánh giá sau 4 tuần để yên. Các kết quả được thể hiện trong bảng dưới đây.

Bảng 8

		Nhiệt độ khi để yên	
		5°C	55°C
Không điều chỉnh độ pH	70A	Không có dầu nổi lên	Không có dầu nổi lên
	206A	Không có dầu nổi lên	Không có dầu nổi lên
Độ pH=2,5	70A	Dầu nổi lên	Dầu nổi lên
	206A	Không có dầu nổi lên	Không có dầu nổi lên

4-2. Ảnh hưởng của nhiệt độ bảo quản lên các đặc tính hương vị

Ảnh hưởng của nhiệt độ khi để yên lên hương vị được kiểm tra. Các quy trình cụ thể là như sau.

Dung dịch đánh giá 70A có nhiệt độ khi để yên bằng 5°C và không điều chỉnh độ pH được sử dụng làm đối chứng. Hương vị của dung dịch đánh giá 70A có nhiệt độ khi để yên bằng 55°C và không điều chỉnh độ pH được đánh giá theo từng 0,5 điểm, lấy đánh giá của đối chứng là 5 điểm. Những người tham gia thử nghiệm là bốn người tham gia thử nghiệm cảm quan đã được đào tạo kỹ. Giá trị trung bình của các đánh giá của những người tham gia thử nghiệm được tính.

Theo cùng một cách, dung dịch đánh giá 206A có nhiệt độ khi để yên bằng 5°C và không điều chỉnh độ pH được sử dụng làm đối chứng, và hương vị của dung dịch đánh giá 206A có nhiệt độ khi để yên bằng 5°C và không điều chỉnh độ pH được đánh giá theo từng 0,5 điểm.

Theo cùng một cách, dung dịch đánh giá 70A có độ pH=2,5 có nhiệt độ khi để yên bằng 5°C được sử dụng làm đối chứng, và hương vị của dung dịch đánh giá 70A có độ pH=2,5 có nhiệt độ khi để yên bằng 55°C được đánh giá theo từng 0,5 điểm.

Theo cùng một cách, dung dịch đánh giá 260A có độ pH=2,5 có nhiệt độ khi để yên bằng 5°C được sử dụng làm đối chứng, và hương vị của dung dịch đánh giá 260A có độ pH=2,5 có nhiệt độ khi để yên bằng 55°C được đánh giá theo từng 0,5 điểm.

Các kết quả được thể hiện trên Fig.19. Ngoài ra, các bình luận của những người tham gia thử nghiệm được mô tả dưới đây.

70A, không điều chỉnh độ pH;

Vị nhẹ không đắng, trắng đục và hơi mát. Dịu nhẹ hơn và ít đắng hơn. Độ trắng sữa tăng. Dễ uống. Độ tươi mát ít hơn một chút, nhưng không bị biến chất nghiêm trọng.

260A, không điều chỉnh độ pH;

Vị nhẹ không đắng, trắng đục và hơi mát. Dịu nhẹ hơn và ít đắng hơn. Độ trắng sữa tăng. Không thay đổi về độ ngọt. Không thay đổi. Độ tươi mát ít hơn một chút, nhưng không bị biến chất nghiêm trọng.

70A, pH=2,5

Vị chua được giảm bớt. Độ chua tăng thêm. Vị có một chút mạnh. Độ chua nhẹ

hơn. Tốt. Dịu nhẹ hơn một chút và ít chua gắt.

206A, pH=2,5;

Vị chua được giảm bớt. Độ chua tăng thêm. Nhưng dễ uống. Không thay đổi. Ít đắng hơn. Tốt. Dịu nhẹ hơn một chút và ít chua gắt.

4-3. Thử nghiệm tăng độ rung

Đối với các dung dịch đánh giá sau 4 tuần để yên ở 5°C, hệ số hấp thụ ở bước sóng 680nm được đo bằng phổ quang kế (UV1800 UV spectrophotometer, được sản xuất bởi SHIMADZU CORPORATION).

Các dung dịch đánh giá sau đó được ly tâm ở 3000 vòng/phút trong 30 phút, và hệ số hấp thụ ở bước sóng 680nm được đo đối với các dung dịch đánh giá sau khi ly tâm. Mức chênh lệch về hệ số hấp thụ giữa trước và sau khi ly tâm Δabs được tính. Dung dịch nào có Δabs nhỏ hơn hoặc bằng 0,02 được đánh giá là “tốt” vì có độ ổn định của nhũ tương trong quá trình rung rất tốt.

Các kết quả được thể hiện trên Fig.20.

5. Mức độ giảm cường độ ngọt

Mức độ giảm cường độ ngọt do sự nhũ hóa được đánh giá bằng cách sử dụng mẫu SA-70A và mẫu SA-206A được điều chế trong phần 1 nêu trên. Các quy trình cụ thể để đánh giá là như sau.

RebA được hòa tan trong nước tinh khiết để điều chế dung dịch nước 467ppm, được sử dụng làm đối chứng. Tiếp theo, mỗi mẫu được điều chế trong phần 1. được bổ sung vào nước tinh khiết để điều chế dung dịch nước có nồng độ RebA bằng 467ppm. Sau đó, bốn người tham gia thử nghiệm cảm quan đã được đào tạo kỹ đã xác định cường độ ngọt của mỗi dung dịch nước gần bằng cường độ ngọt nào trong số Brix 2, 5, 8, 11, và 14. Giá trị trung bình của các kết quả đánh giá của những người tham gia thử nghiệm được tính. Các kết quả được thể hiện trên Fig.21.

Ví dụ thực nghiệm 34

Theo cách giống như trong phần “4. Đánh giá các đặc tính khác sau khi bảo quản” trong ví dụ thực nghiệm 33, thu được dung dịch đánh giá 70A và dung dịch đánh giá 206A.

Dung dịch đánh giá 70A và dung dịch đánh giá 206A được làm loãng bằng PBS

chứa DMSO để điều chế các dung dịch được làm loãng có các nồng độ RebA được thể hiện trong cột nồng độ bổ sung của bảng dưới đây.

Một dung dịch đánh giá 70A khác và một dung dịch đánh giá 206A khác được để yên trong buồng ổn nhiệt ở 55°C trong 4 tuần. Dung dịch đánh giá 70A và dung dịch đánh giá 206A sau khi để yên được làm loãng bằng PBS chứa DMSO để điều chế các dung dịch được làm loãng có các nồng độ RebA được thể hiện trong cột nồng độ bổ sung của bảng dưới đây.

Để làm làm đối chứng không kích thích (so sánh âm), dung dịch chứa 1% DMSO được điều chế. Ngoài ra, để làm đối chứng dương, dung dịch được điều chế bằng cách làm loãng PMA (được sản xuất bởi FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, số model: 162-23591) bằng DMSO 1% để có nồng độ được thể hiện trong cột nồng độ bổ sung của bảng dưới đây.

Bảng 9

Lượng bổ sung và nồng độ cuối cùng của mỗi chất thử nghiệm

#		Nồng độ bổ sung (mM)	Lượng bổ sung (μl)	Môi trường (μl)	Tổng (μl)	Nồng độ cuối cùng (mM)
1	Dung dịch chứa 1% DMSO	-	10	90	100	-
2	PMA (1% DMSO)	0,01	10	90	100	0,001
3		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	70A4W	0,25	10	90	100	0,025
11		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		10	10	90	100	1,000
22	206A4W	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

Trong các điều kiện được thể hiện trong bảng nêu trên, các dung dịch đã được làm loãng số từ 1 đến 27 được bổ sung vào môi trường, và các tế bào được nuôi cấy trong môi trường thu được. Các quy trình cụ thể là như sau.

Các tế bào H716 được nuôi cấy trong RPMI 1640 (được sản xuất bởi Thermo Fisher Scientific Inc., số model 61870-036) (10% FBS (được sản xuất bởi Gibco, số model SH102770), natri pyruvat 1mM) trong tủ ủ ở 37°C, 5% CO₂. Các tế bào H716 được gieo trong đĩa 96 lỗ ở nồng độ 2×10^5 tế bào/90µl/lỗ (để đánh giá tế bào chết) và trong các đĩa 48 lỗ ở nồng độ 4×10^5 tế bào/180µl/lỗ (để đánh giá hình thái học). Hàm lượng của FBS trong môi trường khi các tế bào được gieo trong đĩa là 0,5%. Sau 24 giờ trôi qua kể từ khi gieo tế bào, các dung dịch đã được làm loãng số từ 1 đến 27 được bổ sung vào các lỗ với lượng 10µl/lỗ. Các nồng độ cuối cùng của RebA trong môi trường sau khi bổ sung các dung dịch đã được làm loãng được thể hiện trong cột “Nồng độ cuối cùng (mM)” của bảng nêu trên.

Khả năng sống sót của tế bào được kiểm tra sau 2 giờ và 24 giờ từ khi bổ sung các dung dịch đã được làm loãng. Không có vấn đề với bất kỳ mẫu nào.

Sau 2 giờ và 24 giờ từ khi bổ sung các dung dịch đã được làm loãng, đĩa 96 lỗ được ly tâm ở 300 x g trong 5 phút, và phần nổi lên trên của môi trường nuôi cấy được thu hồi.

GLP-1 trong phần nổi lên trên của môi trường nuôi cấy thu hồi được định lượng bằng bộ kit xét nghiệm miễn dịch Human GLP-1 (7-36 amide) Immunoassay kit (được sản xuất bởi PerkinElmer, Inc., số model: AL359C). Đối với các giá trị định lượng,

giá trị nằm ngoài phạm vi của đường cong hiệu chuẩn và gây sai số được loại trừ. Hơn nữa, đồ thị dạng hộp được tạo ra bằng phần mềm phân tích thống kê R, và khi giá trị nhỏ hơn điểm tứ phân vị thứ nhất hoặc lớn hơn điểm tứ phân vị thứ ba bằng hoặc vượt qua phạm vi 1,5 điểm tứ phân vị, giá trị này được loại trừ dưới dạng giá trị ngoại lệ.

Các kết quả được thể hiện trên Fig.22.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm bao gồm hạt đã được nhũ hóa bao gồm thành phần thúc đẩy tiết GLP-1 lưỡng tính và chất nhũ hóa, trong đó:

chất nhũ hóa là chất nhũ hóa dầu trong nước;

thành phần thúc đẩy tiết GLP-1 được hợp nhất vào trong hạt đã được nhũ hóa;

và

chất nhũ hóa bao gồm ít nhất một thành phần được chọn từ nhóm bao gồm este của axit béo với polyglyxerol, este của axit béo với propylen glycol, lexitin được xử lý bằng enzym, este của axit béo với sucroza, và monoglyxerit của axit hữu cơ.

2. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó thành phần thúc đẩy tiết GLP-1 là rebaudiosit A.

3. Chế phẩm theo điểm 1 hoặc 2, trong đó giá trị cân bằng ưa nước-ưa chất béo (hydrophilic-lipophilic balance, HLB) của chất nhũ hóa nằm trong khoảng từ 7 đến 18.

4. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó nhóm ưa nước của chất nhũ hóa được dẫn xuất từ thành phần có tính ngọt.

5. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó chất nhũ hóa bao gồm ít nhất một chất nhũ hóa được chọn từ nhóm gồm có este của axit béo với polyglyxerol và este của axit béo với sucroza.

6. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó nhóm ưa nước của chất nhũ hóa bao gồm nhóm phosphat.

7. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó tỷ lệ của chất nhũ hóa trên thành phần thúc đẩy tiết GLP-1 nằm trong khoảng từ 0,02 đến 50% khối lượng.

8. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, trong đó chế phẩm này bao gồm chất nhũ hóa theo tỷ lệ nằm trong khoảng từ 0,1 đến 5% khối lượng.

9. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8, trong đó chế phẩm này bao gồm thành phần thúc đẩy tiết GLP-1 theo tỷ lệ nằm trong khoảng từ 1 đến 20% khối lượng.

10. Chế phẩm dùng để cải thiện sự chuyển hóa đường, kìm hãm sự thèm ăn, hoặc ngăn ngừa hoặc cải thiện bệnh đái tháo đường hoặc bệnh béo phì, chế phẩm này bao gồm hạt đã được nhũ hóa bao gồm thành phần thúc đẩy tiết GLP-1 lưỡng tính và chất nhũ hóa, trong đó:

chất nhũ hóa là chất nhũ hóa dầu trong nước;

thành phần thúc đẩy tiết GLP-1 được hợp nhất vào trong hạt đã được nhũ hóa;

và

chất nhũ hóa bao gồm ít nhất một thành phần được chọn từ nhóm bao gồm este của axit béo với polyglyxerol, este của axit béo với propylen glycol, lexitin được xử lý bằng enzym, este của axit béo với sucroza, và monoglyxerit của axit hữu cơ.

11. Đồ uống bao gồm chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10.

12. Thực phẩm bao gồm chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10.

13. Dược phẩm bao gồm chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10.

14. Phương pháp sản xuất chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10, phương pháp này bao gồm các bước:

trộn chất nhũ hóa dầu trong nước, thành phần thúc đẩy tiết GLP-1 lưỡng tính, và môi trường nước để điều chế hỗn hợp; và

bổ sung chất béo và dầu vào hỗn hợp và khuấy trộn.

FIG. 1

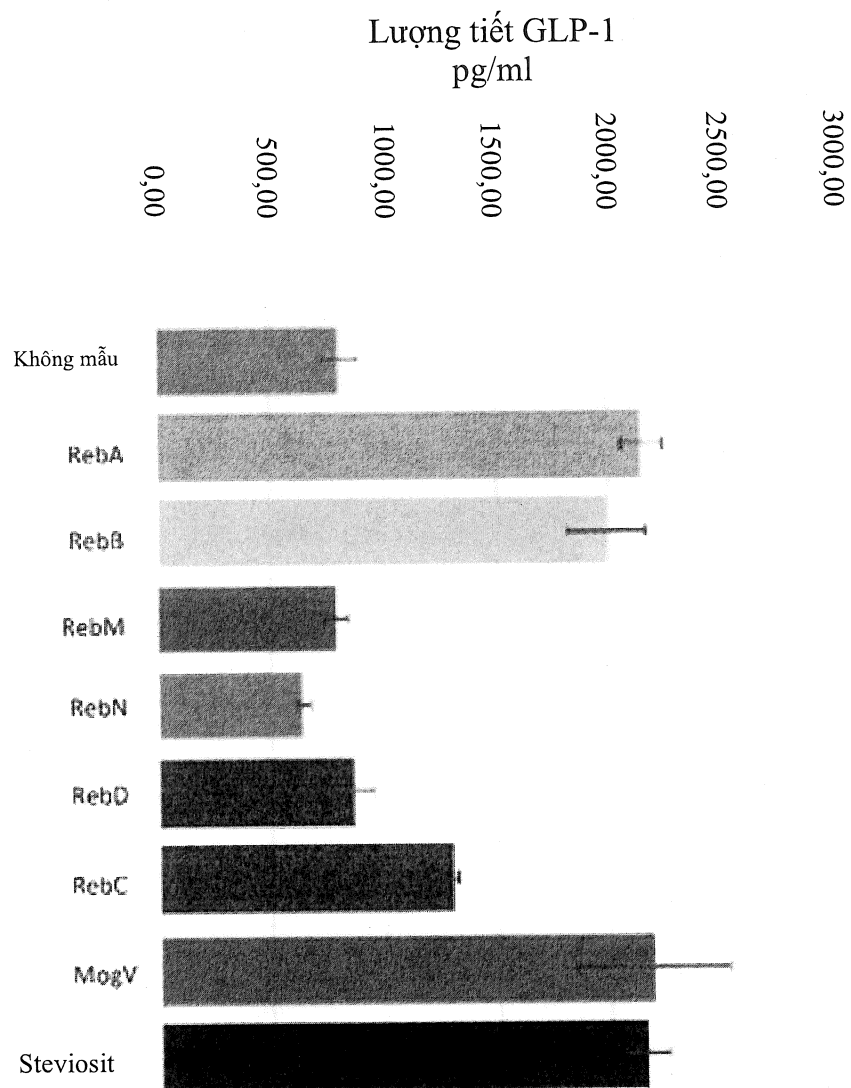


FIG. 2

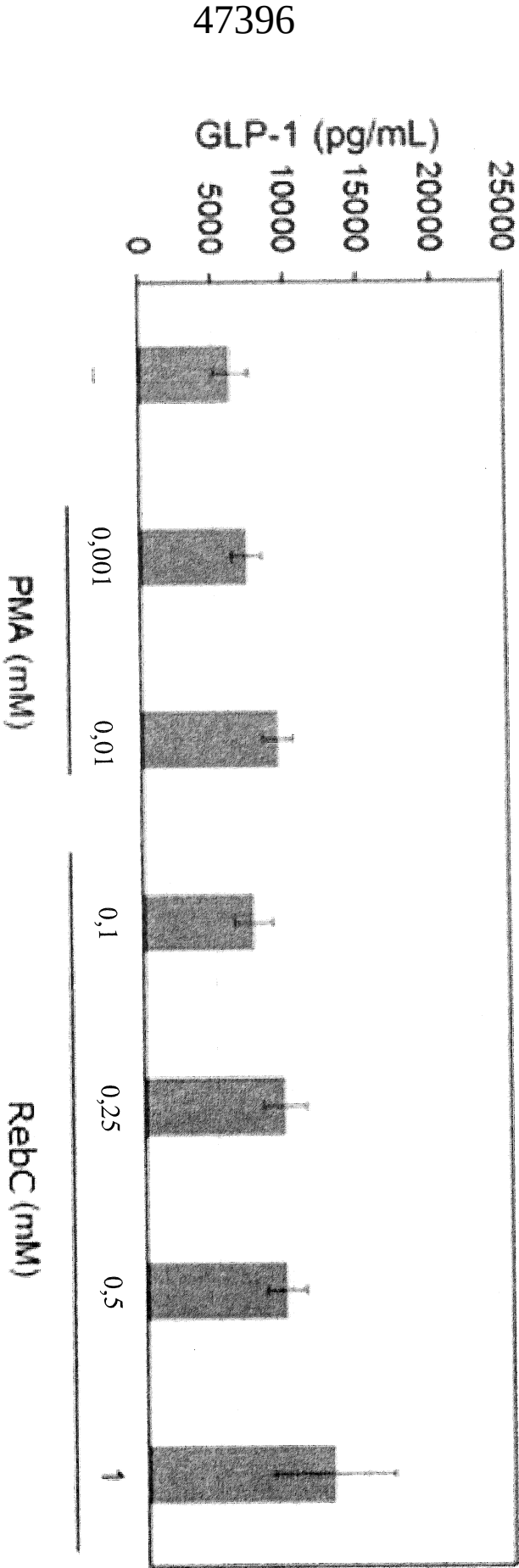


FIG. 3

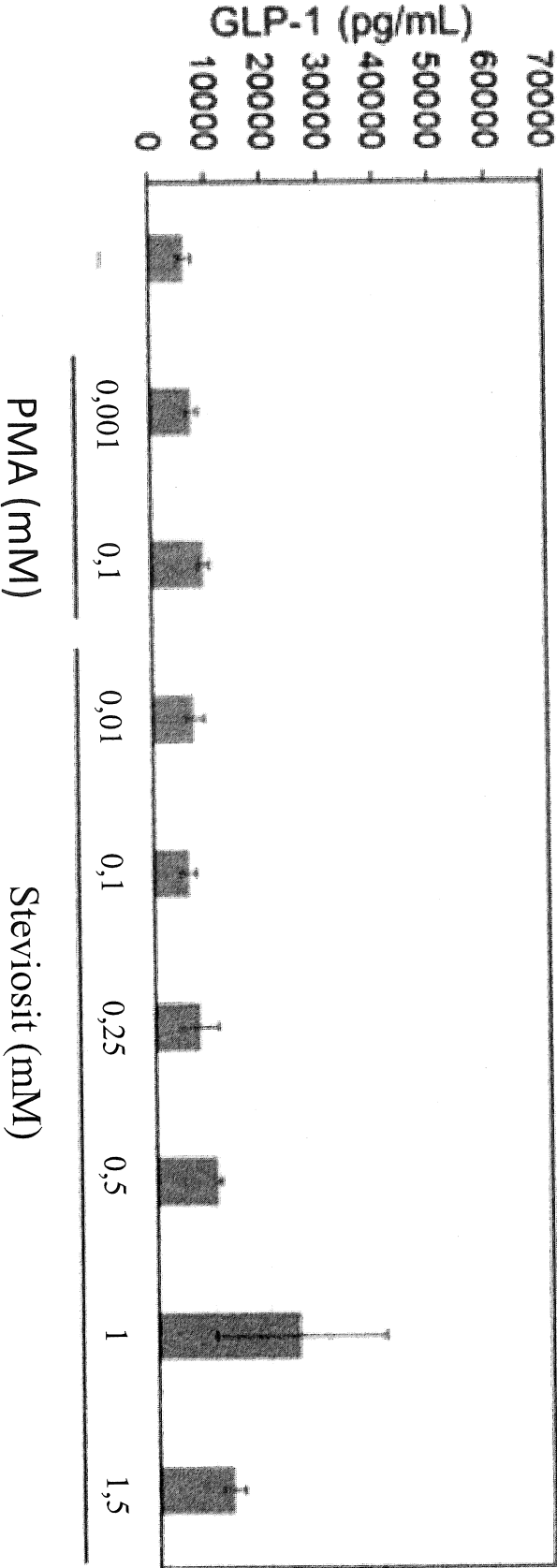


FIG. 4

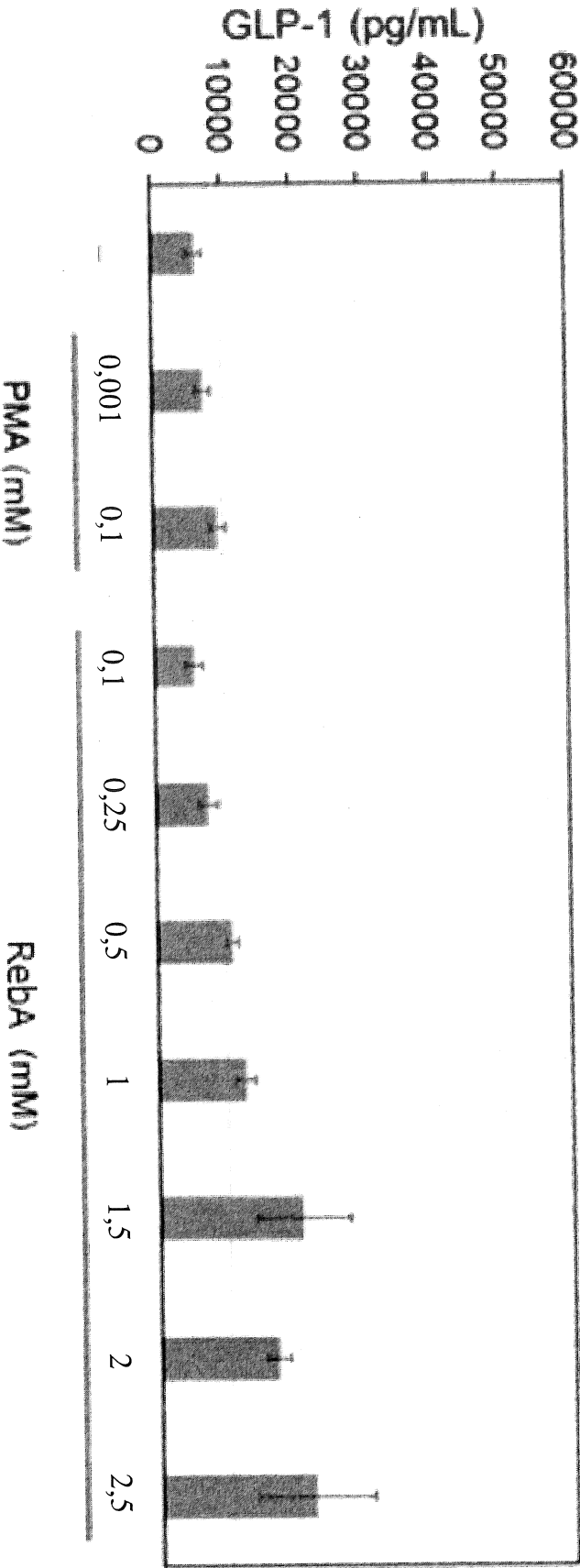


FIG. 5

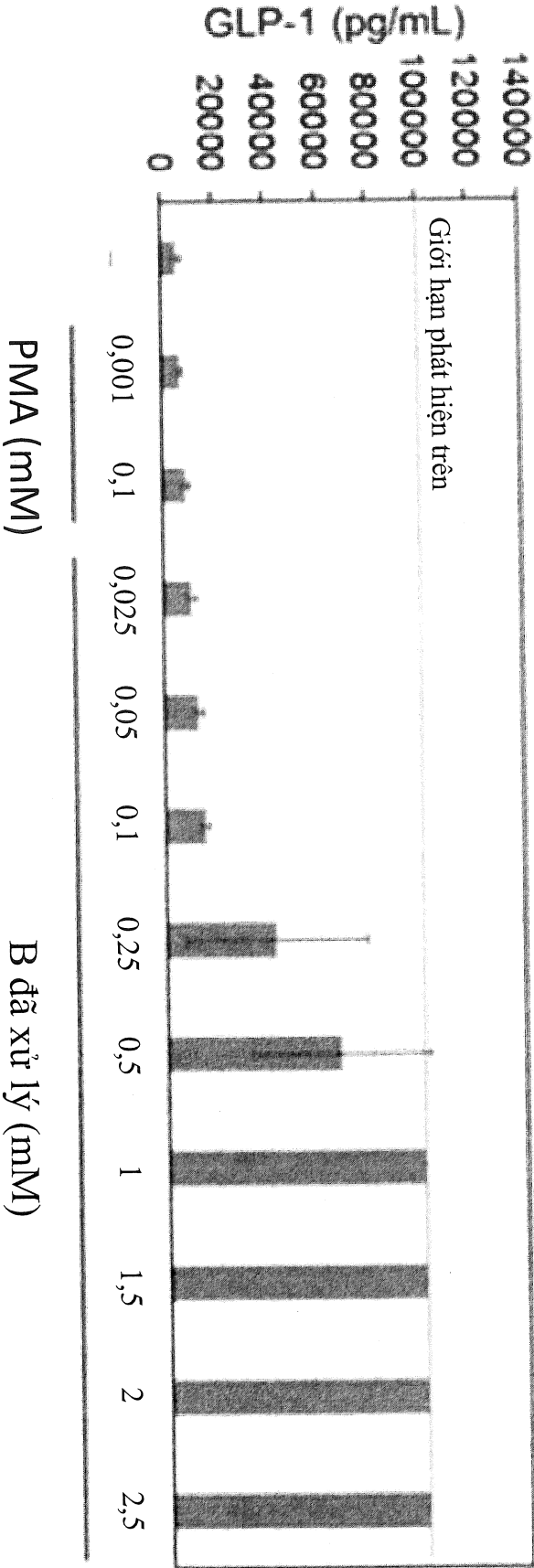


FIG. 6

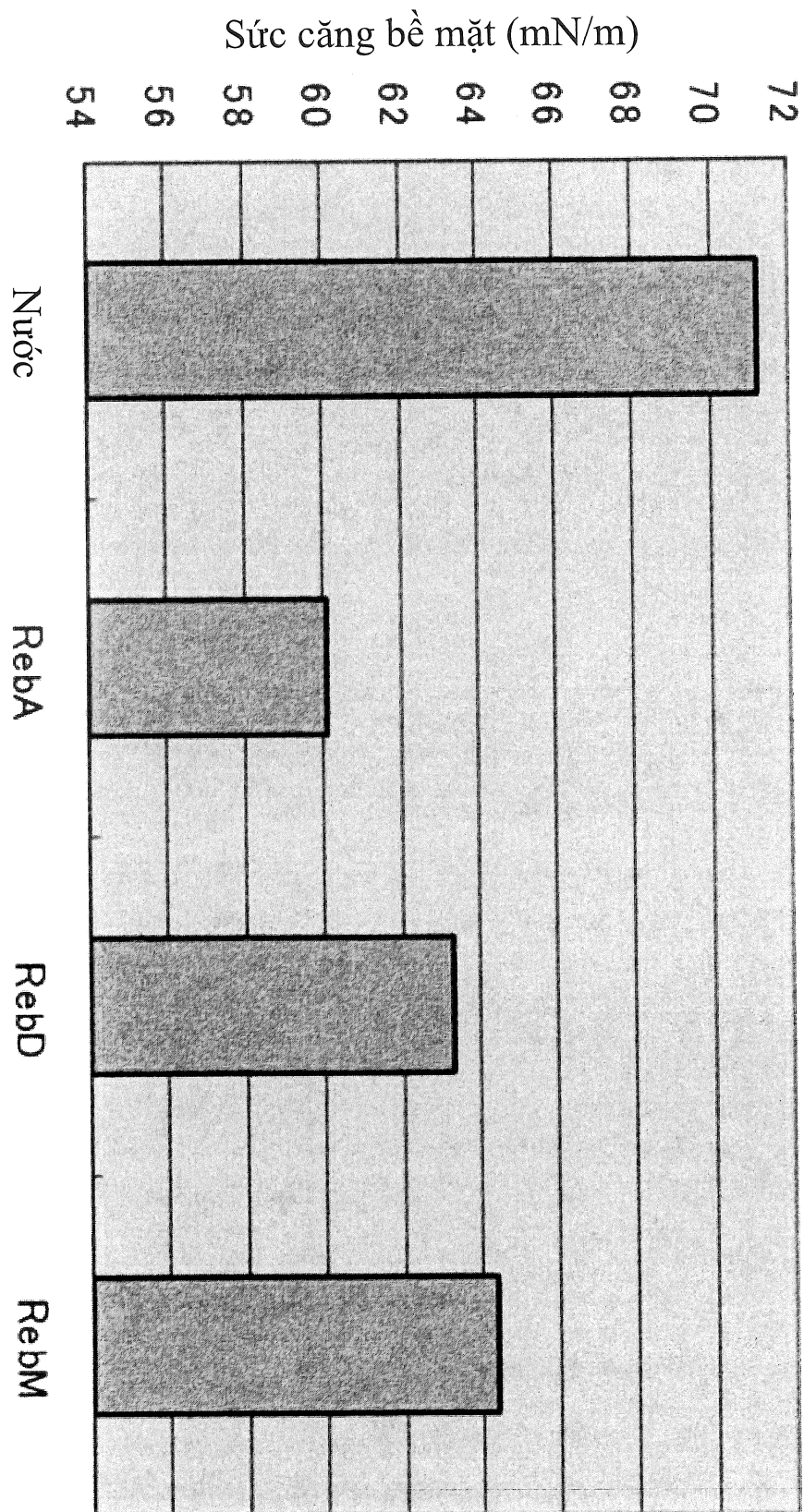


FIG. 7

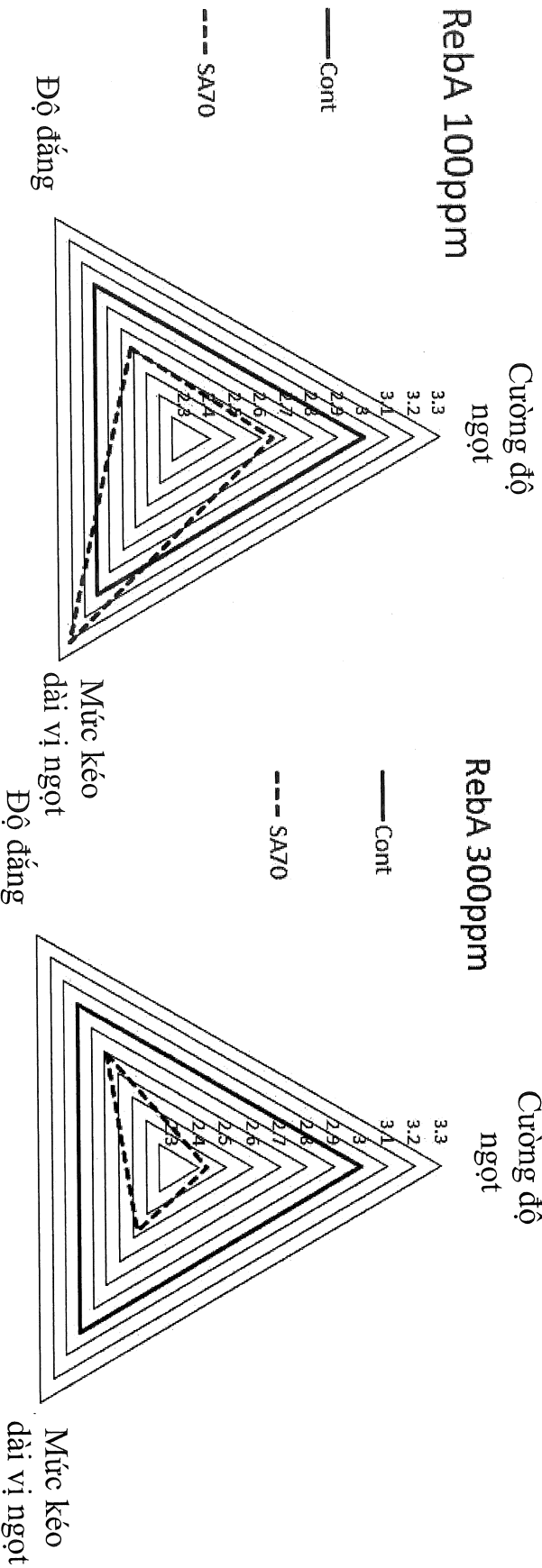


FIG. 8

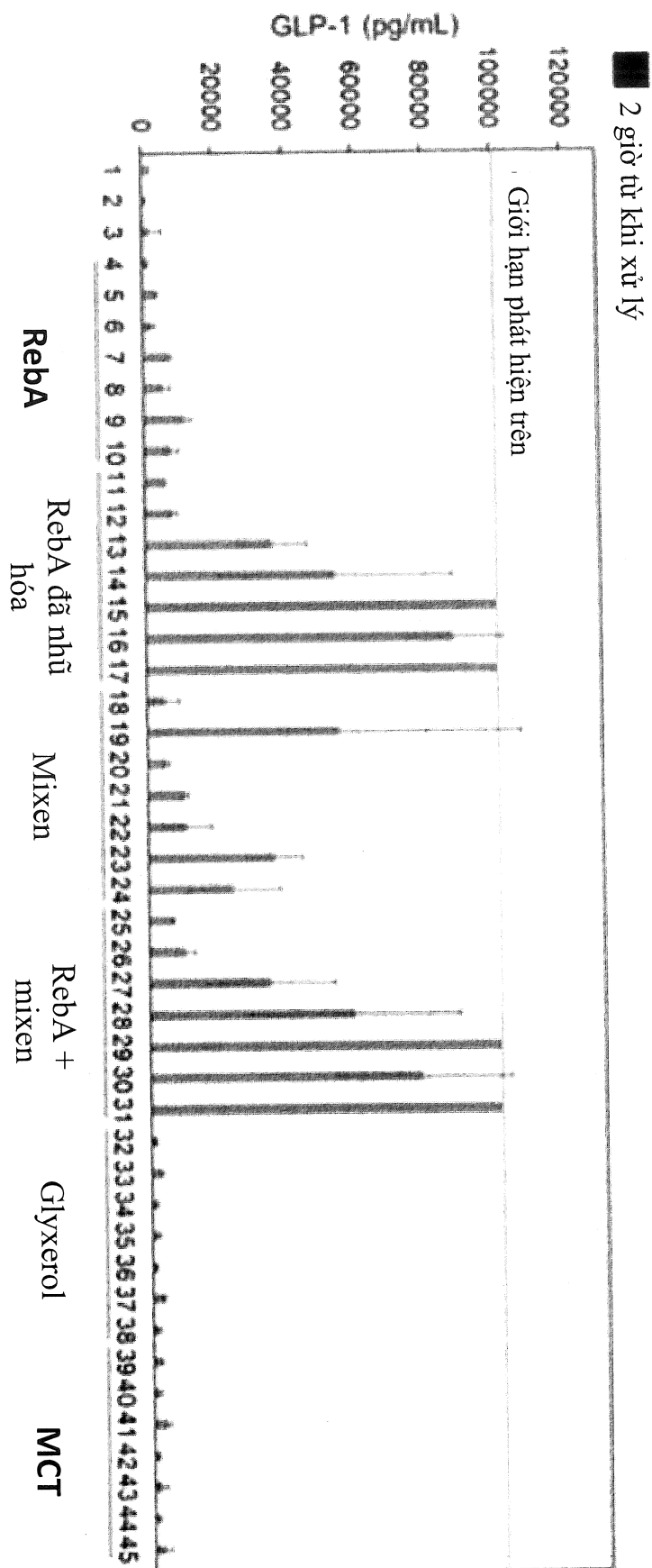


FIG. 9

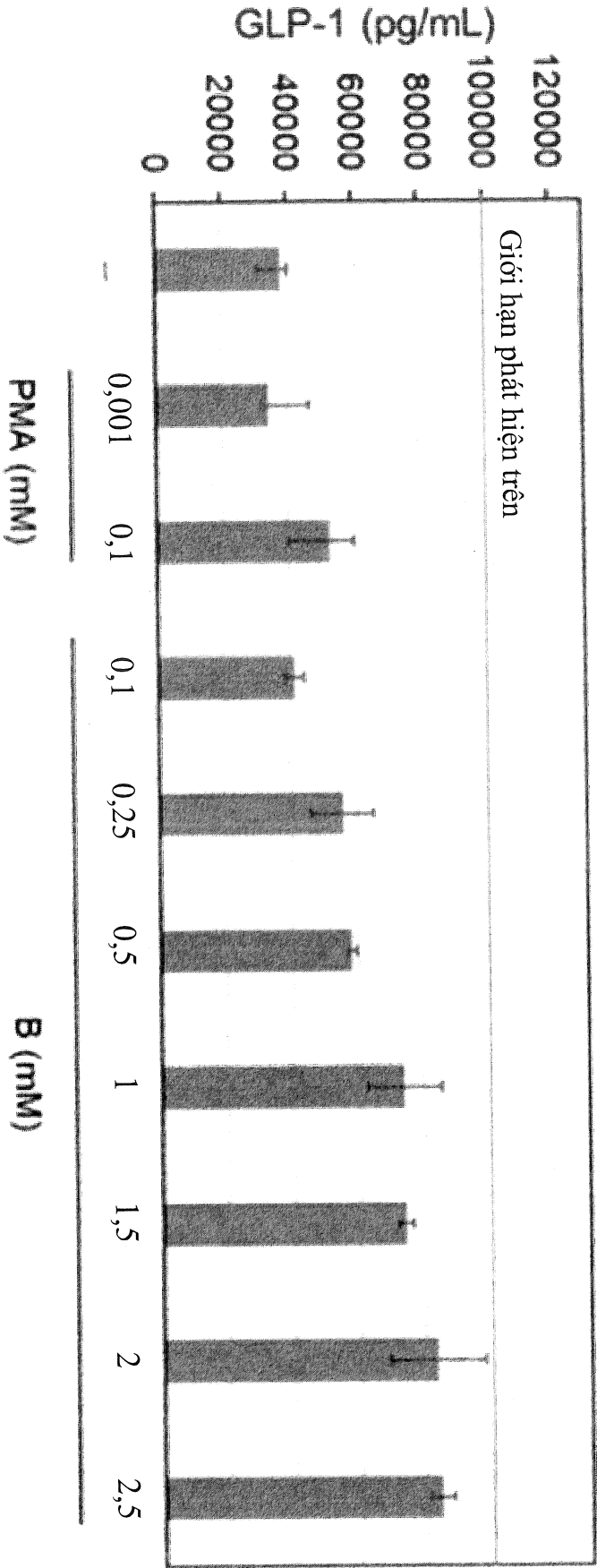


FIG. 10

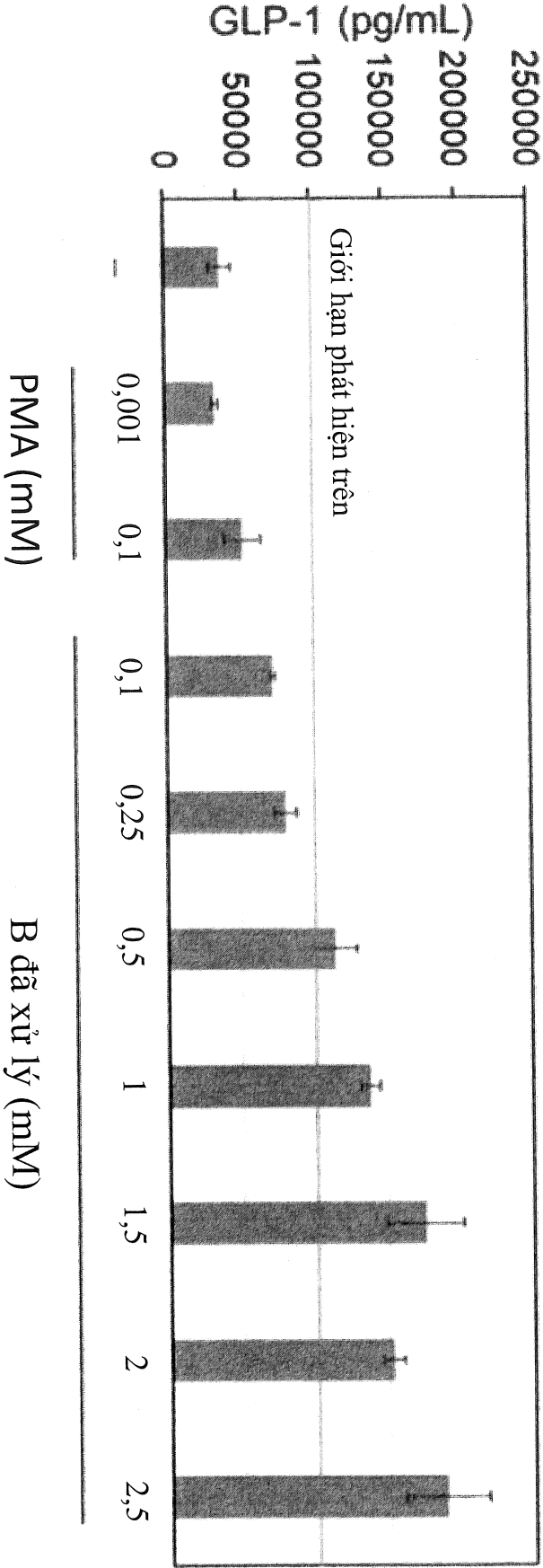


FIG. 11

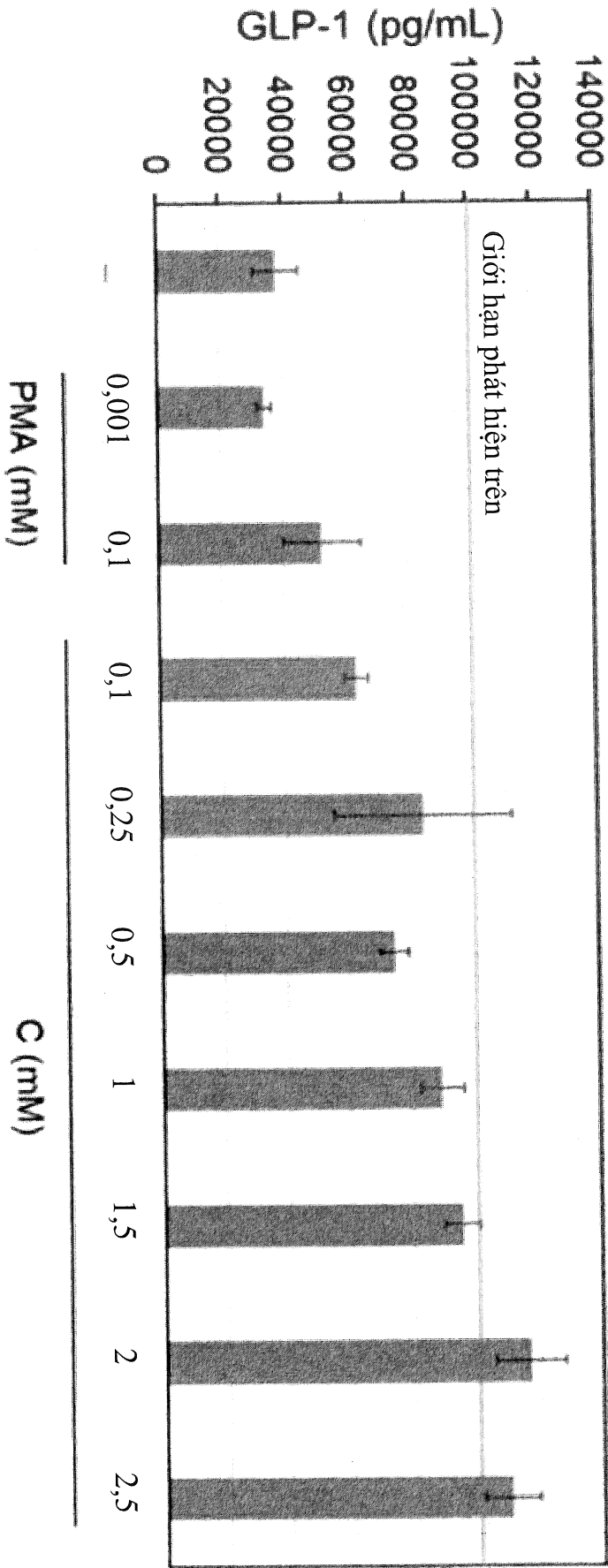


FIG. 12

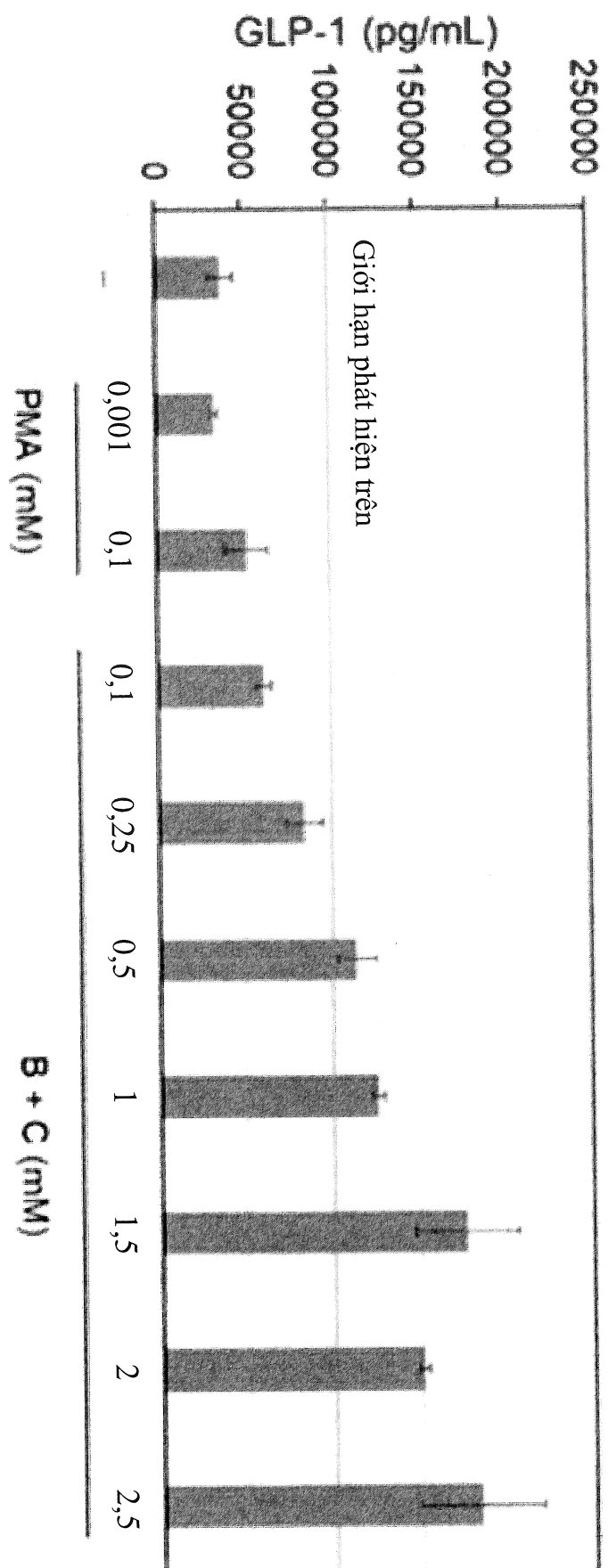


FIG. 13

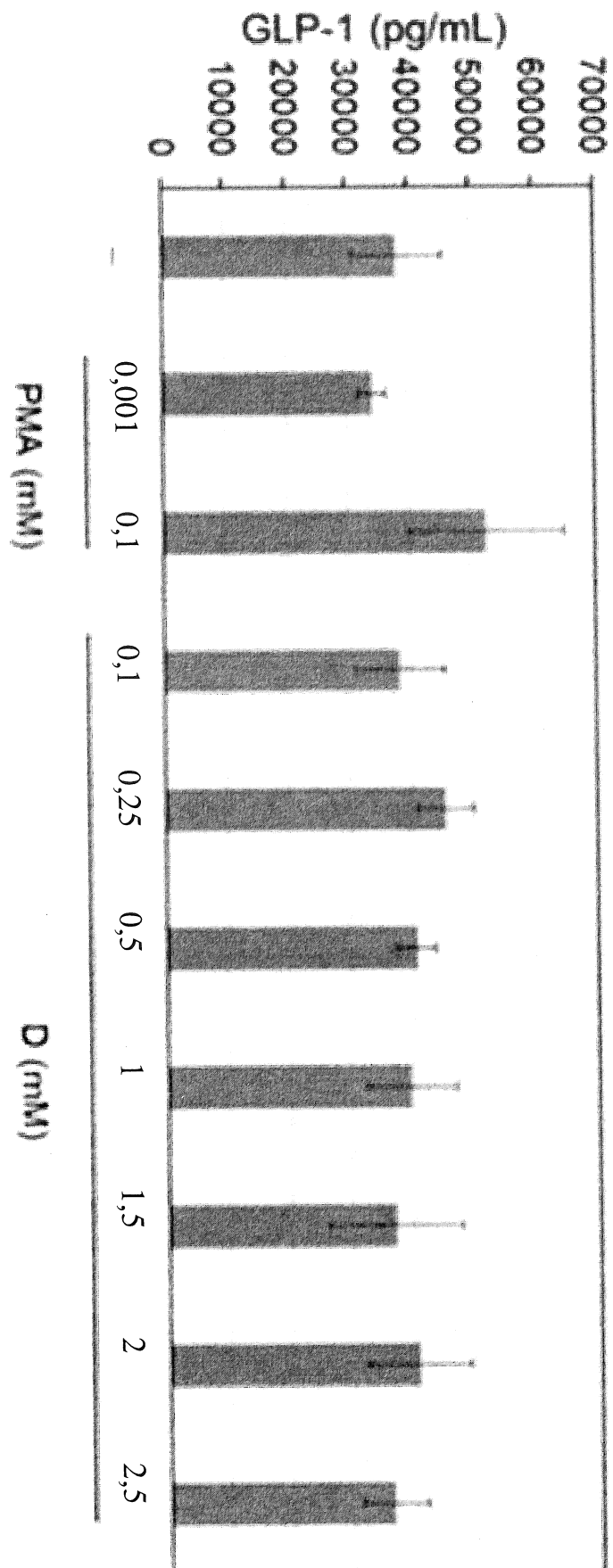


FIG. 14

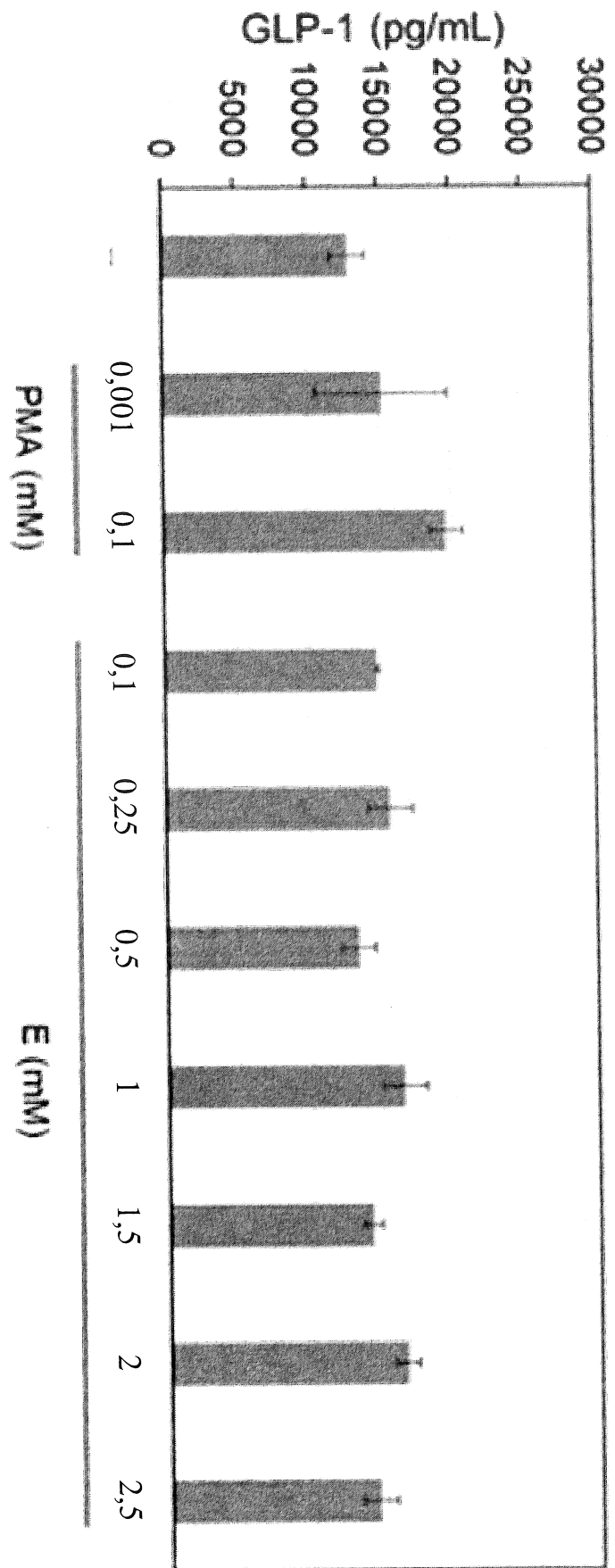


FIG. 15

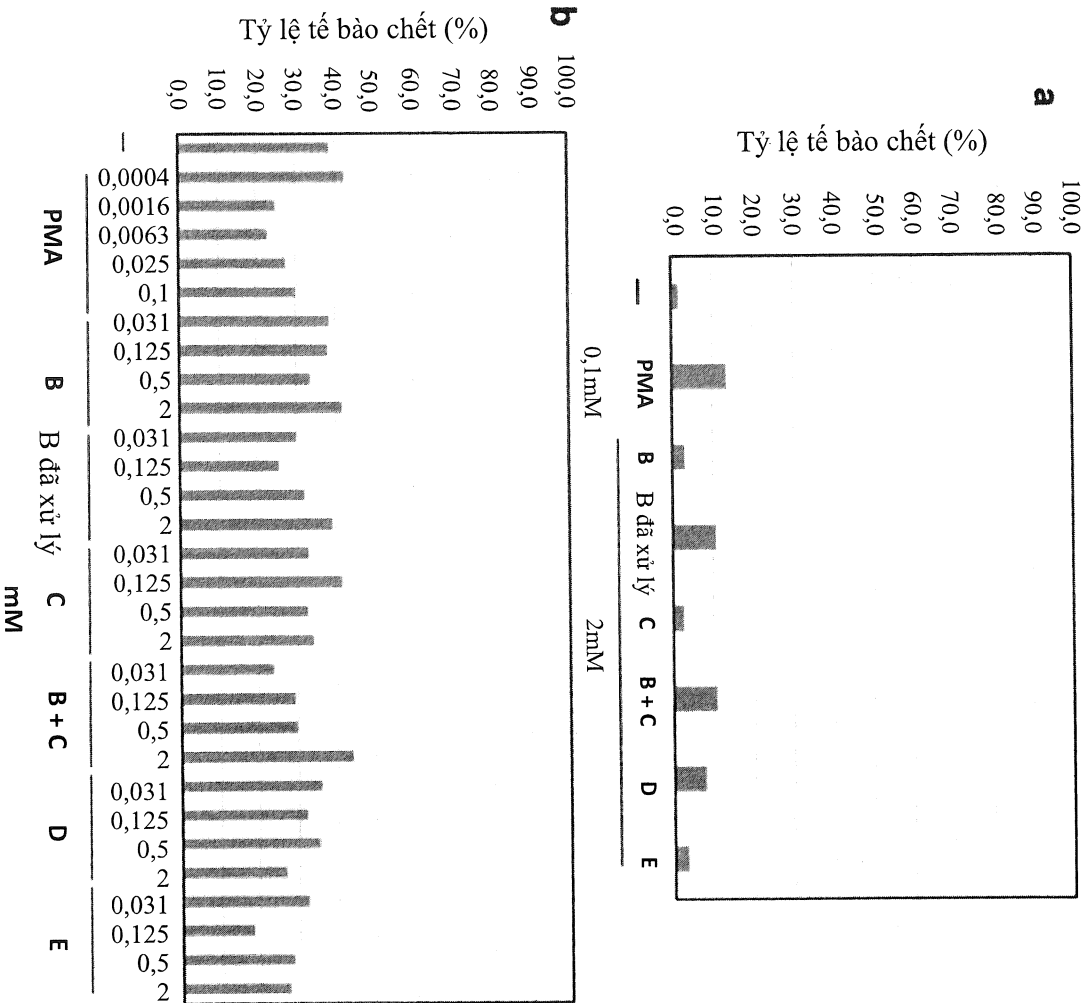
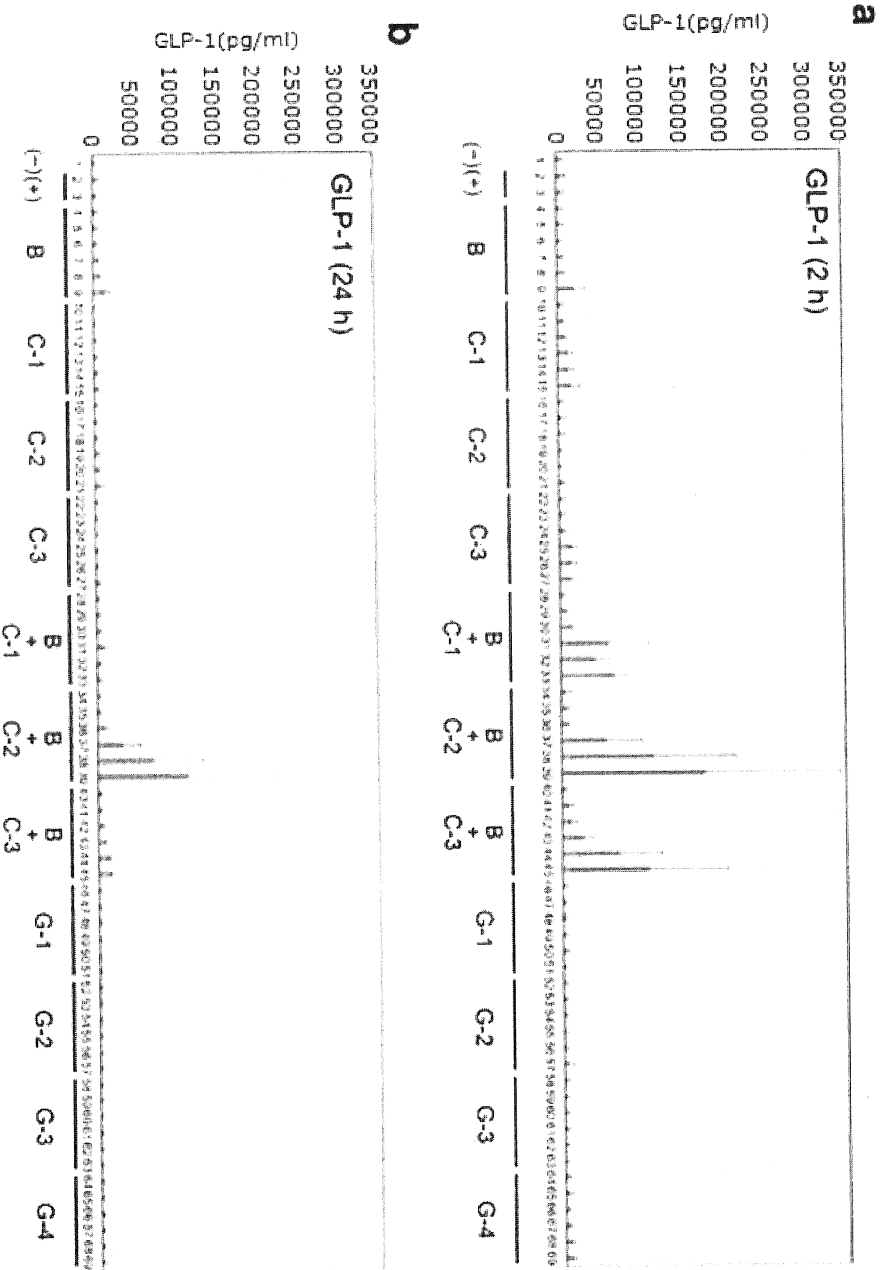


FIG. 16



giá trị trung bình $\pm$ SD, n = 4-6
(-): so sánh âm (DMSO, nồng độ cuối cùng 0,1%)
(+): so sánh dương (PMA)

FIG. 17

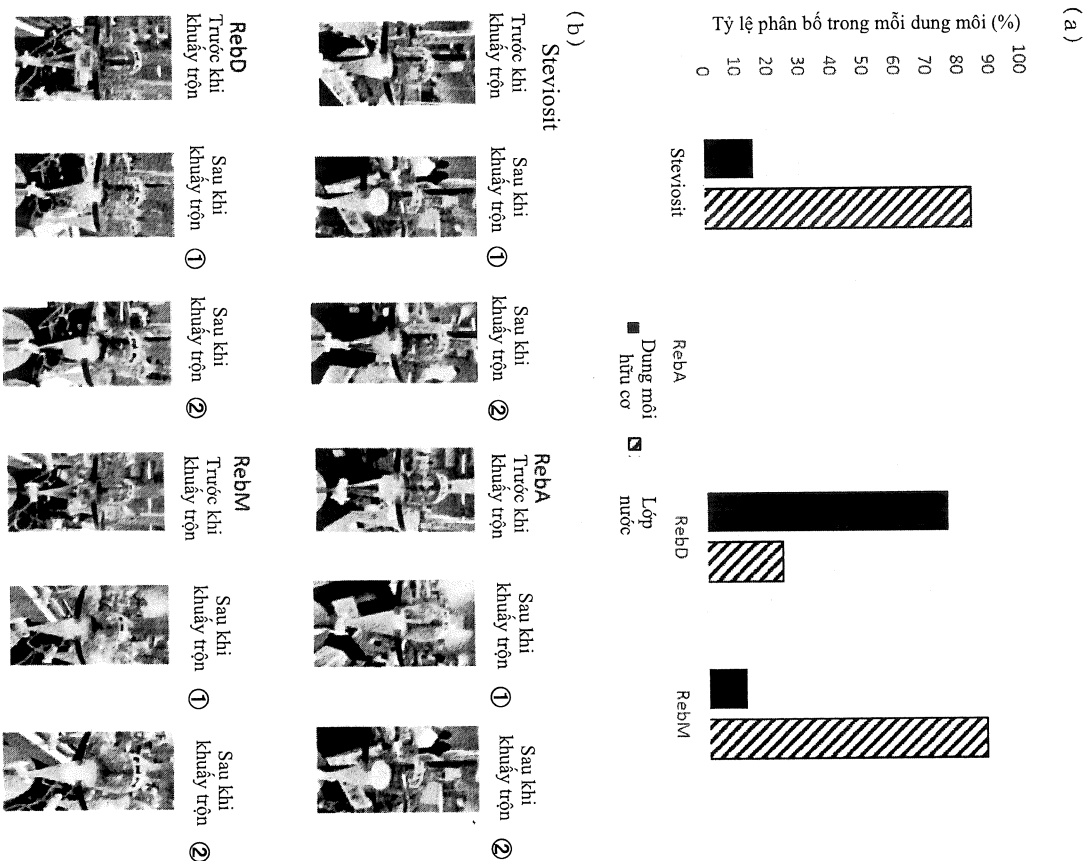
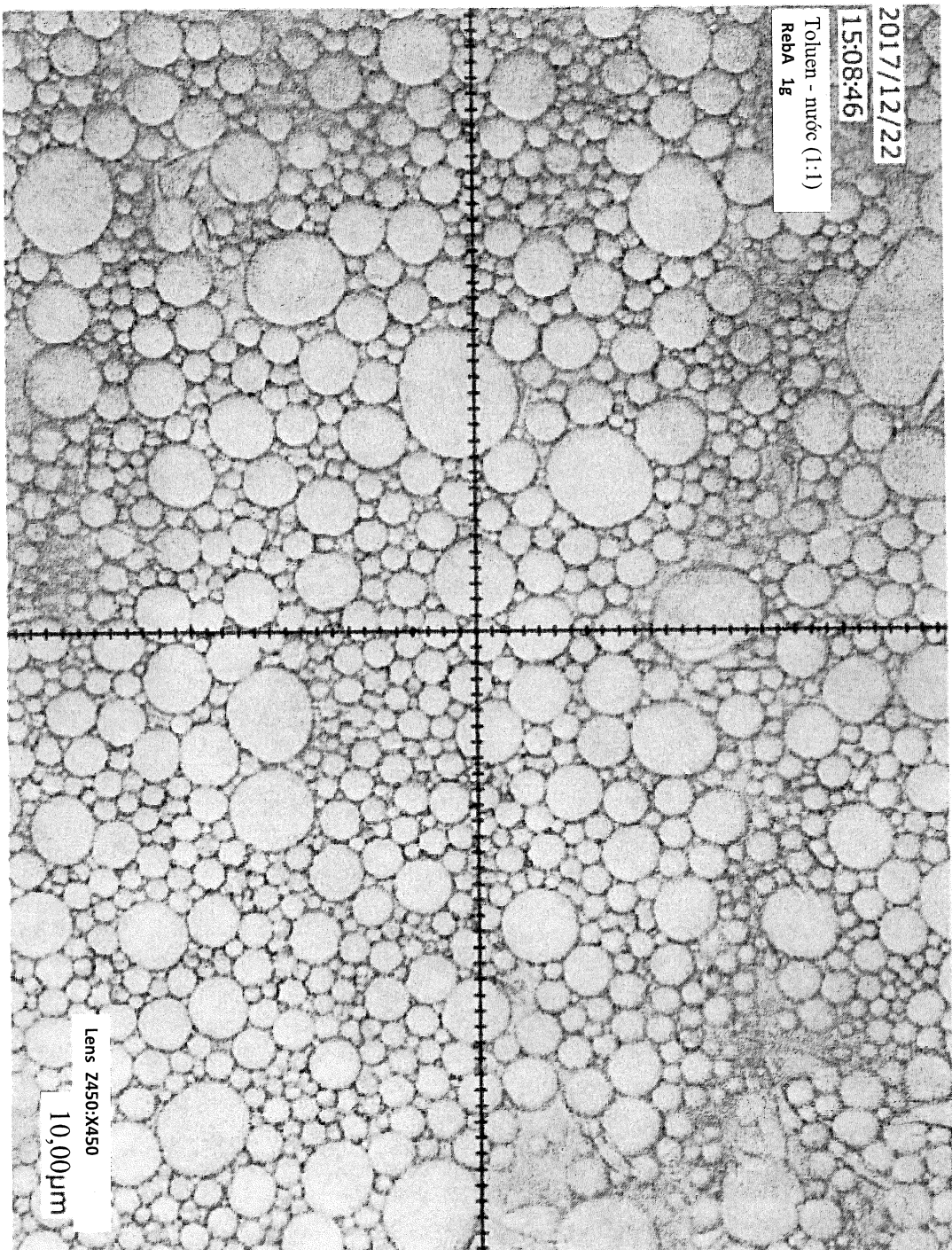


FIG. 18



47396

FIG. 19

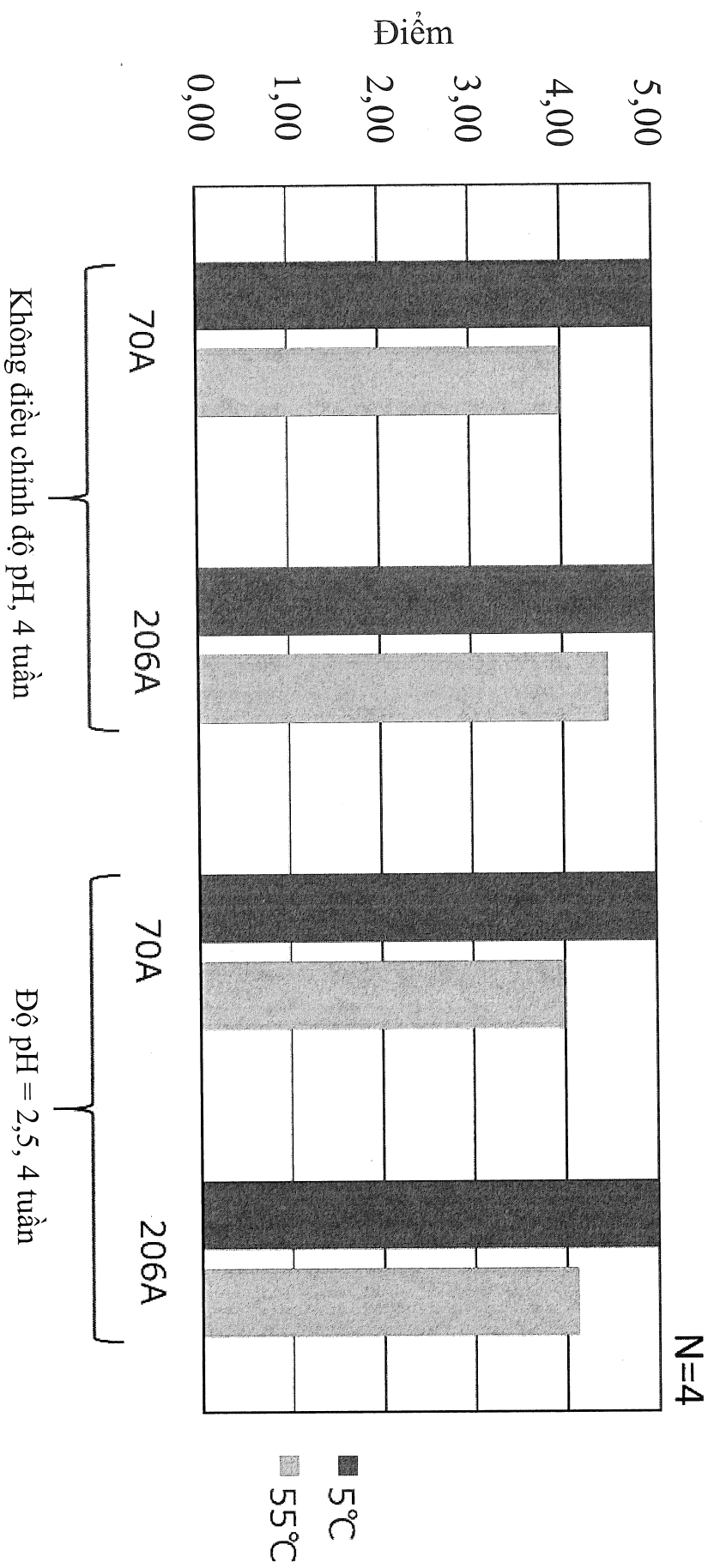


FIG. 20

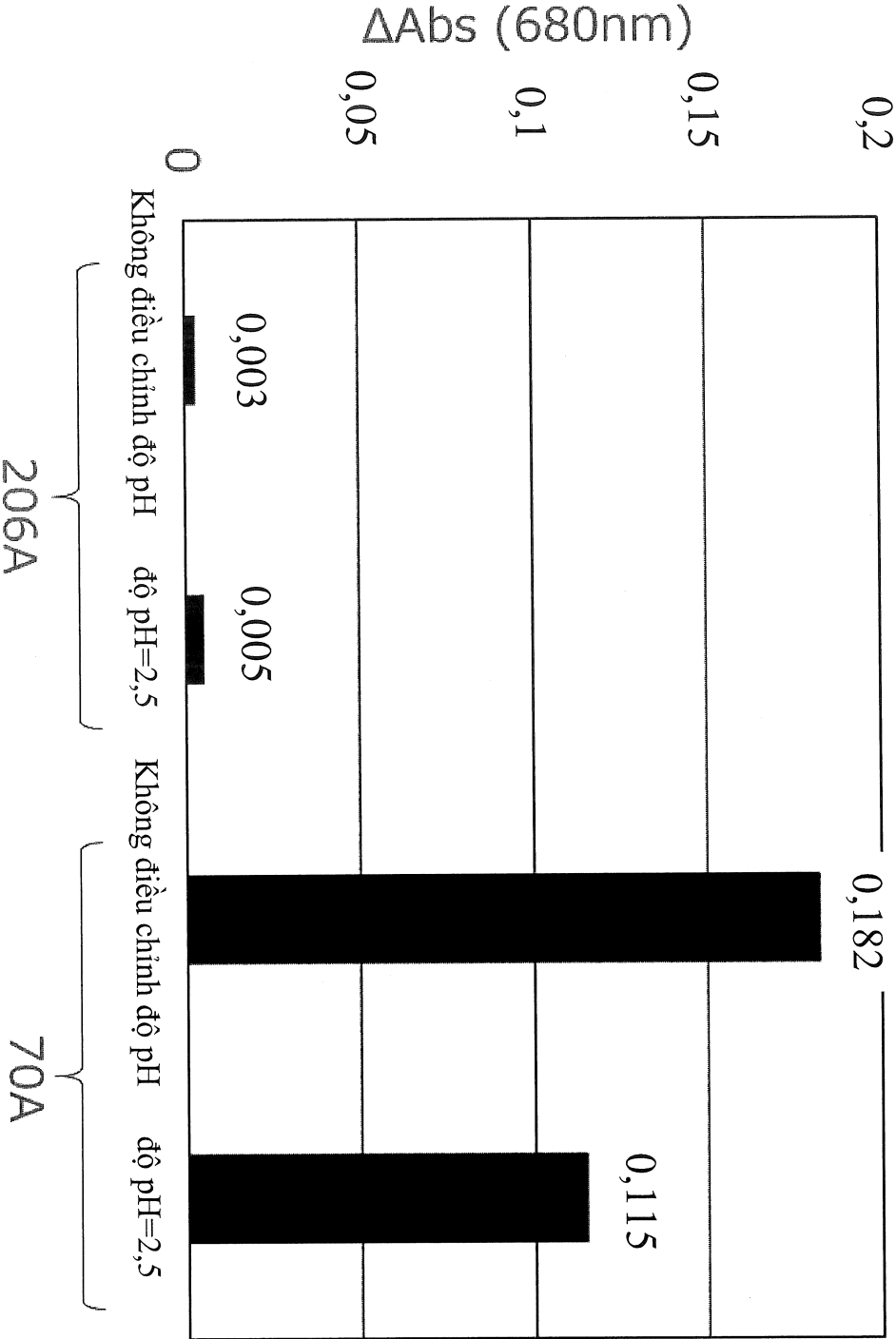


FIG. 21

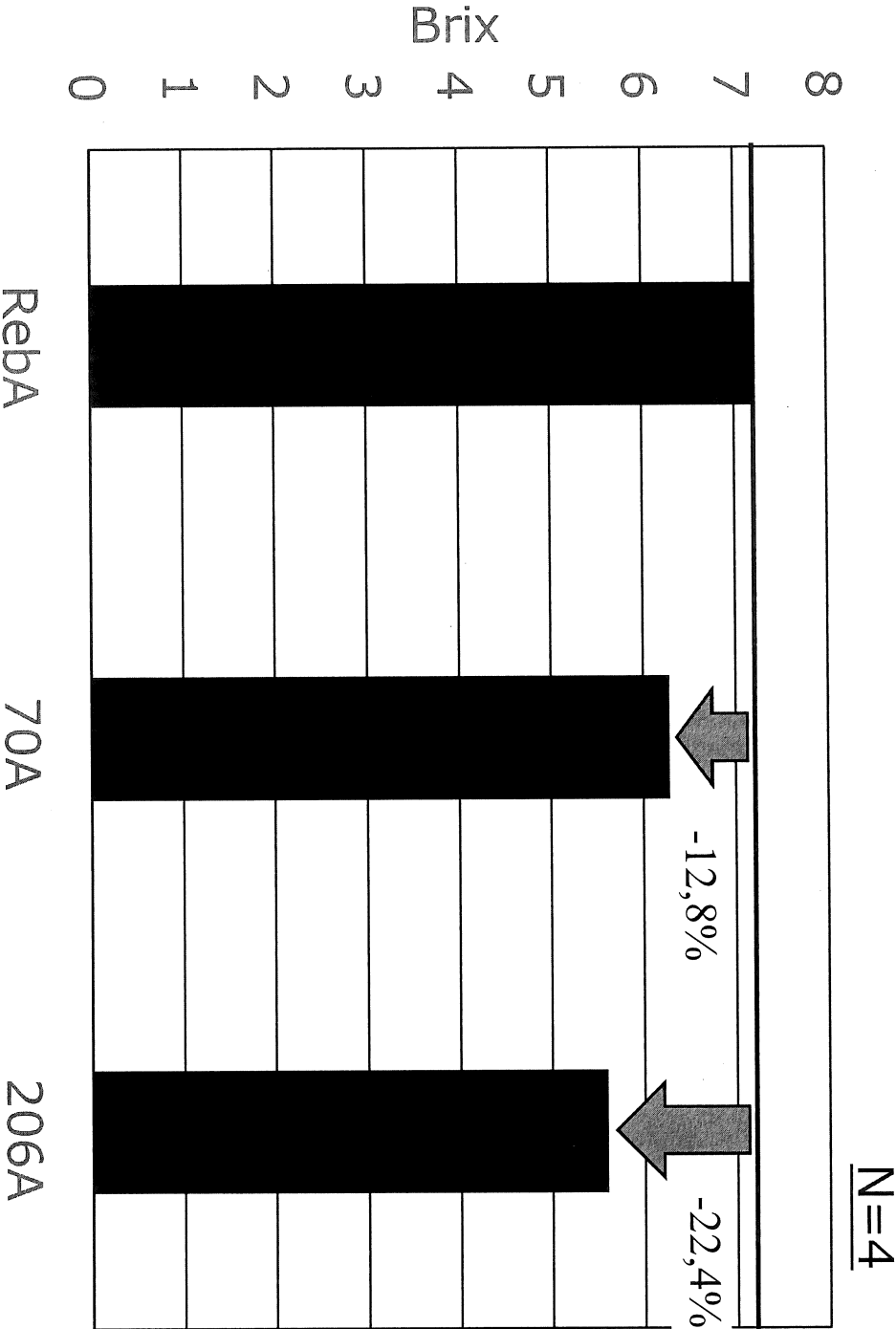


FIG. 22
Tiết GLP-1

