

人参萃取物用于制备抗疲劳或提升认知功能表现组合物的用途

技术领域

5 本发明涉及一种人参萃取物的用途，特别是关于人参萃取物用于制备抗疲劳或提升认知功能表现的组合物。

背景技术

10 刚从土中挖出的新鲜人参含有很多的水分，不易保存，市面上很少见，仅偶尔在产地附近被用于入菜。人参通常会经过不同的加工炮制过程，将新鲜人参分别制成红参、白参或太极参。

虽然普遍认为红参、白参和太极参比新鲜人参有更好的效用，更高的皂苷含量。但是红参、白参和太极参各有不同特性与适用性，基于加工炮制的手法不同也造成红参、白参和太极参的质量各有不同。

15 发明内容

有鉴于此，为了避免过度加工或加工过程造成的未知影响，本发明针对未经烘干加工，完整保留原始人参成分活性的人参提取出一种人参萃取物，其可应用于制备抗疲劳或提升认知功能表现组合物。

20 在一些实施例中，一种人参萃取物的用途，其是用于制备抗疲劳的组合物，人参萃取物是以水为溶剂提取自人参（*Panax ginseng* C. A. Meyer）。

在一些实施例中，人参萃取物促进粒线体活性。

在一些实施例中，人参萃取物促进骨骼肌细胞增生。

25 在一些实施例中，一种人参萃取物的用途，其是用于制备提升认知功能表现的组合物，人参萃取物是以水为溶剂提取自人参（*Panax ginseng* C. A. Meyer）。

在一些实施例中，人参萃取物用于提升耐缺氧能力。

在一些实施例中，人参萃取物用于提升血氧饱和度。

在一些实施例中，人参萃取物提升脂质过氧化指标 MDA。

在一些实施例中，人参萃取物提升总和抗氧化能力 TAC。

30 在一些实施例中，组合物为食品组合物，且组合物内至少包含人参萃取物

5 mL。意即，人参萃取物的有效用量为 5 mL/日。

在一些实施例中，人参萃取物每 100 毫升具有人参皂苷 Rg3 (Ginsenoside) 至少 13.3 毫克。

综上所述，任一实施例的人参萃取物可用以制备抗疲劳或提升认知功能表现的组合物。任一实施例的人参萃取物可用以制备促进粒线体活性、促进骨骼肌细胞增生、提升耐缺氧能力、提升血氧饱和度、提升脂质过氧化指标 MDA、提升总和抗氧化能力 TAC、提升缺氧耐受力、提高判断力与短期记忆力。任一实施例的人参萃取物每 100 毫升具有人参皂苷 Rg3 至少 13.3 毫克。

10 附图说明

图 1 是指纹图谱分析结果图。

图 2 是相对人参皂苷 Rg3 含量测试结果图。

图 3 是相对总生物碱含量测试结果图。

图 4 是相对抗氧化效率测试结果图。

15 图 5 是相对粒腺体膜电位测试结果图。

图 6 是相对骨骼细胞增生测试结果图。

图 7 是人参萃取物人体试验中血氧饱和浓度测试结果图。

图 8 是人参萃取物人体试验中脂质过氧化指标测试结果图。

图 9 是人参萃取物人体试验中总和抗氧化能力测试结果图。

20 图 10 是人参萃取物人体试验中答题花费时间结果图。

图 11 是人参萃取物人体试验中答对题数结果图。

图 12 是人参萃取物人体试验中答题准确率结果图。

其中，附图标记：

Rg3: 人参皂苷 Rg3

25

具体实施方式

如本文中所使用，术语“萃取物”系指藉由萃取作用所制备之产物。该萃取物可以溶于溶剂中之溶液形式呈现，或萃取物可为不含或大体上不含溶剂之浓缩物或精华呈现。

30 如本文所用“人参”系指新鲜人参（学名： *Panax ginseng*）的肉质根部，也

称高丽参。在一些实施例中，人参是指未经烘干或蒸煮的人参的根部。在一些实施例中，人参是采收后七日内经冷冻或冷藏的根部，其可进一步包含完整、剁碎、切丁、碾磨、研磨或以其他方式经加工以影响原物料之大小及实体完整性的根部。

- 5 在一些实施例中，人参采用中国东北生产的人参。在一些实施例中，人参采用人工种植五年以下的人参。

 在一些实施例中，人参萃取物是以水为溶剂对人参进行萃取所制得。在一些实施例中，人参萃取物是以水为溶剂对人参进行加热萃取所制得。在一些实施例中，加热萃取是指将水与人参原料混合后的混合溶液加热，使其在 85 ± 5
10 $^{\circ}\text{C}$ 下维持 50~80 分钟。换言之，萃取温度为 $85 \pm 5^{\circ}\text{C}$ ，且萃取时间为 50~80 分钟。在一些实施例中，萃取温度可为 85°C ，且萃取时间可为 60 分钟。于此，萃取是将人参浸泡在加热后的水中。

 在一些实施例中，水与人参的重量比为 1: 5~15。在一些实施例中，水与人参的重量比为 1: 5。

- 15 在一些实施例中，人参萃取物是以水为溶剂对人参进行萃取以得到初萃液后，通过筛网将初萃液内的固体滤除所制得。举例而言，筛网可以是 400 网目（mesh）的筛网。

 在一些实施例中，人参萃取物每 100 毫升具有人参皂苷 Rg3（Ginsenoside）至少 13.3 毫克。

- 20 在一些实施例中，人参萃取物可以制备抗疲劳的组合物。在一些实施例中，人参萃取物经由促进粒线体活性达成抗疲劳。在一些实施例中，人参萃取物经由促进骨骼肌细胞增生达成抗疲劳。意即，人参萃取物可以促进肌肉细胞力量转换。

 在一些实施例中，人参萃取物可以制备提升认知功能表现的组合物。在一些
25 一些实施例中，人参萃取物经由提升耐缺氧能力达成提升认知功能。在一些实施例中，人参萃取物经由提升血氧饱和度达成提升认知功能。在一些实施例中，人参萃取物经由提升脂质过氧化指标 MDA 达成提升认知功能。在一些实施例中，人参萃取物经由提升总和抗氧化能力 TAC 达成提升认知功能。

- 在一些实施例中，上述组合物为食品组合物，且组合物至少包含人参萃取
30 物 5 mL。

在一些实施例中，前述之组合物可为医药品。换言之，此医药品包含有效含量的人参萃取物。

在一些实施例中，前述之医药品可利用本领域普通技术人员所详知的技术而被制造成一适合于经肠道或口服的投药剂型。这些投药剂型包括，但不限于：

5 锭剂 (tablet)、片剂 (troche)、口含锭 (lozenge)、丸剂 (pill)、胶囊 (capsule)、分散性粉末 (dispersible powder) 或细颗粒 (granule)、溶液、悬浮液 (suspension)、乳剂 (emulsion)、糖浆 (syrup)、酏剂 (elixir)、浓浆 (slurry) 以及类似之物。

在一些实施例中，前述之医药品可利用本领域普通技术人员所详知的技术而被制造成一适合于非经肠道 (parenterally) 或局部地 (topically) 投药的剂型，这些投药剂型包括，但不限于：注射品 (injection)、无菌的粉末 (sterile powder)、外部制剂 (external preparation) 以及类似之物。在一些实施例中，该医药品可以一选自于由下列所构成之群组中的非经肠道途径 (parenteral routes) 来投药：皮下注射 (subcutaneous injection)、表皮内注射 (intraepidermal injection)、皮内注射 (intradermal injection) 以及病灶内注射 (intralesional injection)。

10 15

在一些实施例中，医药品可进一步包含有被广泛地使用于药物制造技术之医药上可接受的载剂 (pharmaceutically acceptable carrier)。例如，医药上可接受的载剂可包含下列的试剂中一种或多种：溶剂 (solvent)、缓冲液 (buffer)、

20 乳化剂 (emulsifier)、悬浮剂 (suspending agent)、分解剂 (decomposer)、崩解剂 (disintegrating agent)、分散剂 (dispersing agent)、黏结剂 (binding agent)、赋形剂 (excipient)、安定剂 (stabilizing agent)、螯合剂 (chelating agent)、稀释剂 (diluent)、胶凝剂 (gelling agent)、防腐剂 (preservative)、润湿剂 (wetting agent)、润滑剂 (lubricant)、吸收延迟剂 (absorption delaying agent)、

25 脂质体 (liposome) 以及类似之物。有关这些试剂的选用与数量是落在本领域普通技术人员的专业素养与例行技术范畴内。

在一些实施例中，医药上可接受的载剂包含有一选自于由下列所构成之群组中的溶剂：水、生理盐水 (normal saline)、磷酸盐缓冲生理盐水 (phosphate buffered saline, PBS)、含有醇的水性溶液 (aqueous solution containing alcohol)。

30 在一些实施例中，前述之组合物可为非医疗目的可食用组合物。在一些实

施例中,此可食用组合物可以制成食品产品或可为食品添加物(food additive),意即藉由现有技术方法于食材制备时添加而制得食品产品,或是于食品产品的制作过程中添加。于此,食品产品可以是与可食性材料配制成供人类或动物摄食的产品。

- 5 在一些实施例中,食品产品可为但不限于:饮料(beverages)、发酵食品(fermented foods)、烘培产品(bakery products)、非医疗目的的健康食品(health foods)以及非医疗目的的膳食补充品(dietary supplements)。

例一:测试样品的制备

- 10 1-1、制备人参萃取物:将人参的完整肉质根部(人工种植五年以下,采收后七日内经冷冻的新鲜人参)粉碎至分散为粉状后,以12mm网目(mesh)筛网将其过筛以制得尺寸为12mm以下的人参粉末。接着,以水为溶剂,将人参粉末与水以1:5的重量比例混合后在85℃下萃取1小时成为初萃液。后续,将萃取完成的初萃液通过400网目的筛网以制得人参萃取物。

- 15 1-2、制备白参萃取物:将白参粉碎至分散为粉状后,以12mm网目(mesh)筛网将其过筛以制得尺寸为12mm以下的白参粉末。接着,以水为溶剂,将白参粉末与水以1:5的重量比例混合后在85℃下萃取1小时成为初萃液。后续,将萃取完成的初萃液通过400网目的筛网以制得白参萃取物。于此,白参是将新鲜人参去皮后,经由45℃到50℃的热风干燥而得。

- 20 1-3、制备红参萃取物:将红参粉碎至分散为粉状后,以12mm网目(mesh)筛网将其过筛以制得尺寸为12mm以下的红参粉末。接着,以水为溶剂,将红参粉末与水以1:5的重量比例混合后在85℃下萃取1小时成为初萃液。后续,将萃取完成的初萃液通过400网目的筛网以制得红参萃取物。于此,红参是将未经去皮的新鲜人参,以90℃到100℃蒸煮至少1小时后,再经由45℃到50℃的热风干燥而得。

25 例二:人参萃取物的成分分析

为了解人参相对于不同加工方式制得的白参及红参的成分的差异,下面针对人参、白参及红参各别的人参皂苷Rg3的含量以及其指纹图谱进行分析。

2-1、设备仪器、设定方式与设备来源说明如下:

- 30 核磁共振光谱仪(Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer, NMR)。1D与2D光谱使用Ascend 400 MHz, Bruker Co., Germany,以 δ 表示化学位移

(chemical shift), 单位为 ppm。

质谱仪 (Mass Spectrometer, MS) 串联质谱-二维离子阱串联傅立叶变换质谱及 ESI-MS/MS: 使用 Bruker amaZon SL system 测定, 单位为 m/z。

中压液相层析仪 (Medium pressure liquid chromatography, MPLC):

- 5 CombiFlash[®] Rf⁺, Teledyne ISCO, Lincoln, NE, 高效能液相层析仪 (High Performance Liquid Chromatography, HPLC): 高效液相层析仪 (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) 系 Agilent 1200 系列: 脱气装置系 Agilent 真空脱气装置 1322A; 冲提溶剂输送系 Agilent 四元泵 G1311A; 可变波长侦测器系 (Multiple Wavelength Detector, MWD) Agilent G1314B; 光二极
10 管数组侦测器 (Diode Array Detector, DAD) 系 Agilent 1260 Infinity DAD VL G1315D, 侦测波长为 210 nm, 280 nm, 320 nm, 365 nm (Agilent Germany)。

分析管柱: Luna[®]5 μ m C18(2) 100 Å (250 x 10 mm, Phenomenex, USA)。

- 管柱层析 (Column Chromatography) 填充材料: Sephadex LH-20 (Pharmacia, Piscataway, NJ, USA) . Diaion HP-20 (Mitsubishi Chemical Co.,
15 Japan) Merck Kieselgel 60 (40-63 μ m, Art. 9385) Merck LiChroprep[®] RP-18 (40-63 μ m, Art. 0250)。

薄层色层分析 (Thin-Layer Chromatography) 采用 TLC aluminium sheets (Silica gel 60 F254, 0.25 mm, Merck, Germany) 及 TLC aluminium sheets (RP-18 F254-S, 0.25 mm, Merck, Germany)。

- 20 采用溶剂 (solvent) 及其来源说明: 正己烷 (n-hexane)、乙酸乙酯 (ethyl acetate)、丙酮 (acetone)、甲醇 (methanol)、乙醇 (ethanol)、乙腈 (acetonitrile) (采购至默克中国台湾)、氯仿-d1 (deuteration degree 99.5%)、甲醇-d4 (deuteration degree 99.5%)、重水 deuterium oxide (deuteration degree > 99.8%)、Dimethyl sulfoxide-d6 (deuteration degree > 99.9%) (默克中国台湾)。

- 25 2-2、分析流程:

首先, 利用高效液相色谱法 (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) 来对例一所制得的人参萃取物、白参萃取物及红参萃取物进行分析, 以得到个别的指纹图谱, 如图 1 所示。

- 上述液相色谱的相关设定: 使用溶剂为甲醇 (A) 与水 (B), 并额外添加
30 加 0.1% 甲酸, 流速为 1 mL/min, 柱温度为 40°C, 注射量为 10 μ L, 人参萃取

液注射前以 0.22 μm 聚偏氟乙烯薄膜过滤。

冲提条件：0 分钟时 A：B=2：98；10 分钟时 A：B=2：98；40 分钟时 A：B=70：30；50 分钟时 A：B=100：0；60 分钟时 A：B=100：0。

同时也对人参萃取物、红参萃取物与白参萃取物，进行人参皂苷 Rg3 定量分析。首先，以人参皂苷 Rg3 标准化合物制得标准曲线。于此，人参皂苷 Rg3 标准化合物采购自中国台湾默克(CAS No. 14197-60-5，纯度 98%以上)。

标准曲线制备：精称 10 毫克的人参皂苷 Rg3，以甲醇/水=1/1(体积比)定容至 10 毫升量瓶，是为浓度 100 毫克/100 毫升的人参皂苷 Rg3 标准品溶液。

人参皂苷 Rg3 检量线：分别配置浓度 40、20、10、5、与 1 毫克/100 毫升的人参皂苷 Rg3 溶液，HPLC 分析管柱：Mightysil RP-18 GP 250 (250 x 4.6 mm, 5 μm , Kanto,Tokyo, Japan)，侦测波长 210 nm。得到 40、20、10、5、与 1 毫克/100 毫升的峰面积依序为 2206.5、1108.1、477.7、230.4、与 48.1，线性回归得到人参皂苷 Rg3 的浓度(x-轴)-峰面积(y-轴)的标准曲线为 $y=43.84x+16.275$ ($r^2=0.9998$)。

依据上述指纹图谱得到人参萃取物、红参萃取物与白参萃取物的峰面积分别为 599.4、208.7、92.1，经由标准曲线与计算可得知各萃取物的人参皂苷 Rg3 含量为 13.3 毫克/100 毫升，红参萃取物人参皂苷 Rg3 含量为 4.389 毫克/100 毫升，白参萃取物的人参皂苷 Rg3 含量为 1.792 毫克/100 毫升，并换算为百分比后如图 2 所示。

2-3、测试结果

参照图 1，在 27 分的时间点出现的波峰所代表的生物活性物质即为人参皂苷 Rg3。并且图 1 清楚可见，人参萃取物在 27 分的时间点出现的波峰最高，代表人参萃取物的人参皂苷 Rg3 含量最高。红参萃取物的指纹图谱在 27 分附近同样有小幅度的波峰，意即红参萃取物虽然也含有人参皂苷 Rg3，但其含量较人参萃取物更少。而白参萃取物在 27 分附近同样有小幅度的波峰，意即其人参皂苷 Rg3 也不多。

参照图 2。将人参萃取物（实验组）的数值视为 100%。相较于人参萃取物，红参萃取物（对照组 B）的人参皂苷 Rg3 的相对含量为 13.0%，白参萃取物（对照组 A）的人参皂苷 Rg3 的相对含量为 33.0%。

例三：总生物碱含量测试

3-1、材料说明：

DR 溶液：通过混合第 1 溶液（0.8 g 的五水合硝酸铋在 40mL 蒸馏水和 10mL 冰醋酸），以及第 2 溶液（8.0g 碘化钾在 20 mL 蒸馏水）来制备。

标准硝酸铋（ $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ）溶液：将 10mg 的硝酸铋溶解于 5mL 浓硝酸中，再用蒸馏水稀释至 100mL。

3%硫脲溶液：将 3 克硫脲（Thiourea）溶解在 100 毫升蒸馏水中制备而得。

1%硫化二钠溶液：将 1 g 硫化二钠（Disodium sulfide）溶解在 100 mL 蒸馏水中制备而得。

3-2、制备标准曲线：

首先，通过将 1mL、2mL、3mL、4mL、5mL、6mL、7mL、8mL 和 9mL 标准硝酸铋溶液移入个别的 10 mL 标准烧瓶中并用蒸馏水稀释至刻度 10 mL，以将标准硝酸铋溶液稀释成 9 种不同浓度硝酸铋溶液作为标准样品。从 9 种不同浓度硝酸铋溶液(标准样品)中各取 1mL，并向各标准样品添加 5mL 硫脲溶液形成 9 种黄色标准样品。再相对于无色试剂空白，在 435 nm 处测量此 9 种黄色标准样品的吸亮度值。

3-3、测试流程：

各组取 5 mL 的样品，添加 HCl 将 pH 值维持在 2~2.5。于此，实验组的样品为例一所制得的人参萃取物，对照组 A 的样品为例一所制得的白参萃取物，并且对照组 B 的样品为例一所制得的红参萃取物。

各组加入 2mL 的 DR 溶液，并进行离心后形成具有沉淀的离心液。同时，通过于离心液内再添加 DR 溶液，以检查离心液是否完全沉淀。

离心后，将离心液的液体倒出，取出沉淀物（precipitate）并进一步用酒精洗涤。

除去滤液后，用 2mL 硫化二钠溶液处理沉淀物，形成的棕黑色沉淀物。同时，通过再添加 2 滴硫化二钠来检查沉淀的完成。

将残余物溶解在 2mL 浓硝酸中，必要时加温以使完全溶解成为溶液。

将此溶液用蒸馏水稀释至 10mL 于标准烧瓶中。然后，取出 1 mL，并向其中加入 5 mL 硫脲溶液后，在 435 nm 处测量吸亮度。

将样品的吸亮度与标准曲线比对，以得到样品的总生物碱含量，结果显示于图 3。

3-4、测试结果

续参考图 3。将实验组的数值视为 100%。相较于实验组，对照组 A 的总生物碱的相对含量为 67.3%，对照组 B 的总生物碱的相对含量为 21.3%。

例四：抗氧化效率测试

5 4-1、材料与设备说明：

细胞株：采用骨骼肌细胞 C2C12（后续简称 C2C12 细胞），C2C12 细胞购自美国典型培养物保存中心（American Type Culture Collection, ATCC®）之 C2C12 细胞株（ATCC CRL-1772™）。

10 细胞培养基：为添加有 10% 的胎牛血清（fetal bovine serum, FBS; Gibco 公司, 编号 10437-028）、1% 的青霉素-链霉素（Antibiotic-Antimycotic）（Gibco 公司, Cat.15140122）及 1mM 的丙酮酸钠（sodium pyruvate, Gibco 公司, 编号 11360-070）的最低限度必需培养基（Minimum essential medium, 简称 MEM, 以下称 MEM 培养基）（Gibco 公司, 编号 11095080）。

磷酸缓冲盐溶液（PBS 溶液）：购自 Gibco, 产品编号 10437-028。

15 DCFH-DA 溶液：将二氯二氢荧光素二乙酸酯（2,7-dichloro-dihydro-fluorescein diacetate, DCFH-DA; 产品编号 SI-D6883, 购自 Sigma）溶于二甲基亚砜（dimethyl sulfoxide, DMSO, 购自 Sigma, 产品编号 SI-D6883-50MG）以配制成 5 μg/mL 的 DCFH-DA 溶液。

流式细胞仪（Flow cytometry），BD Accuri C6 Plus。

20 双氧水（H₂O₂）：购自 Sigma-Aldrich, 产品型号 95299-1L。

胰蛋白酶（Trypsin-EDTA）：10X Trypsin-EDTA（购自 Gibco）以 1X PBS 溶液稀释 10 倍。

4-2、测试流程：

25 首先，以 2×10⁵ 个 C2C12 细胞的密度植入至 6 孔细胞培养盘中，每孔添加 2mL 的细胞培养基，于 37℃ 下的二氧化碳培养箱中培养 24 小时。

待 C2C12 细胞贴附于细胞培养盘的底部后，将 C2C12 细胞分为实验组、对照组 A 及对照组 B。移除各组别的细胞培养基并更换为 500 μl/well 测试培养基，然后置于 37℃ 下处理 1 小时。

30 其中，实验组的测试培养基为含有 0.25% 的例一中得到的人参萃取物以及 1mM 双氧水的细胞培养基。对照组 A 的测试培养基为含有 0.25% 的例一中

所得到的白参萃取物以及 1mM 双氧水的细胞培养基。对照组 B 的测试培养基为含有 0.25% 的例一中所得到的红参萃取物以及 1mM 双氧水的细胞培养基。

加入 DCFH-DA 溶液后，于 37℃ 下处理 15 分钟。

每孔加入 10 μ L 的双氧水后，于 37℃ 下处理 1 小时。

5 将孔盘内液体移除，以 PBS 冲洗细胞，重复上述动作 2 次。

将孔盘内液体移除，加入 200 μ L/well 的 1X 胰蛋白酶避光下作用 5 分钟。

以培养基终止反应，并移至 1.5mL 微量离心管，以 400xg 离心 10 分钟。

去除上清液，以 PBS 冲洗细胞，再以 400 xg 离心 10 分钟。

10 去除上清液，以每管 1mL 的 PBS 溶液重新悬浮细胞。

以流式细胞仪测得 DCFH-DA 的荧光信号（设定为激发光：450-490 nm；散射光：510-550 nm），结果如图 4 所示，图式中显示的抗氧化效率采相对倍率呈现。

4-3、测试结果

15 请参阅图 4。将对照组 B 的数值视为 100%。相较于对照组 B，实验组的相对氧化效率高达 279.2%。而对照组 A 的相对氧化效率为 152.9%。换言之，人参萃取物能显著促进骨骼肌细胞对抗双氧水造成的氧化伤害，并且相较于红参显著的提高达 2.7 倍。

例五：粒线体活性测试

20 粒腺体是细胞进行代谢与提供能量的重要胞器，粒腺体活性过低通常代表细胞处于疲劳的状态。本测试以流式细胞仪评估骨骼肌细胞 C2C12 经不同样本处理后，其粒线体活性的变化。测试中以 JC-1 聚集能力作为粒线体活性之指标，在膜电位正常的健康粒线体中，JC-1 以多聚体（polymer）形式存在，而当粒线体膜电位降低时，JC-1 会变成单体（monomer），其可当作粒线体活性评估的指标。

5-1、材料与设备说明：

实验细胞株：采用骨骼肌细胞 C2C12（后续简称 C2C12 细胞），C2C12 细胞购自美国典型培养物保存中心（American Type Culture Collection, ATCC®）之 C2C12 细胞株（ATCC CRL-1772™）。

30 培养基：采用 Dulbecco's modified Eagle's medium 培养基，采购自 Gibco

公司, 美国, 型号 Gat.11965-092。添加 10%胎牛血清, 采购自 Gibco 公司, 美国, 型号 Gat.10437-028。添加 1%抗生素, 采购自 Gibco 公司, 美国, 型号 Gat.15240-062。

MitoScreen 流式细胞仪粒腺体膜电位检测试剂盒 (BD; Cat. BDB551302)
5 粒线体膜电位侦测套组 (BDTM MitoScreen (JC-1) kit, 型号 551302)。其中, 粒线体膜电位侦测套组具有 JC-1 染料 (冻干) 及 10X 分析缓冲液。于使用前, 以 1X PBS 将 10X 分析缓冲液稀释 10 倍, 以形成 1X 分析缓冲液。加入 130 μ L DMSO 至 JC-1 染料 (冻干) 中, 以形成 JC-1 储备溶液。然后, 再以 1X 分析缓冲液稀释 JC-1 储备溶液, 以形成 JC-1 工作试剂 (JC-1 working
10 solution; 即 JC-1 粒线体特异性染料)。稀释倍率为 JC-1 储备溶液比 1X 分析缓冲液为 1: 100。

胰蛋白酶: 10X Trypsin-EDTA (购自 Gibco) 以 1X PBS 溶液稀释 10 倍。

流式细胞仪: Flow cytometry (采购自 Beckman)。

5-2、测试流程:

15 首先, 取 6 孔培养盘将每孔接种 1×10^5 个细胞于 37°C 下培养 24 小时。将培养完成的细胞分为三组: 实验组、对照组 A 与对照组 B。移除各组别的细胞培养基并更换为测试培养基, 然后置于 37°C 下处理 24 小时。

其中, 实验组的测试培养基为含有 0.25%的例一中所得到的的人参萃取物的细胞培养基。对照组 A 的测试培养基为含有 0.25%的例一中所得到的白参萃取
20 物的细胞培养基。对照组 B 的测试培养基为含有 0.25%的例一中所得到的红参萃取物的细胞培养基。

移除培养盘中的测试培养基并以 1X PBS 溶液润洗 2 次。

将 200 μ L 胰蛋白酶加至每孔中并在暗处反应 5 分钟。反应后, 添加细胞培养基终止反应。将各孔中之细胞与细胞培养基收集至个别对应的 1.5 mL 离
25 心管内, 并将含有细胞与细胞培养基之离心管以 400 xg 离心 10 分钟。

于离心后移除上清液, 再以 1 mL 的 1X PBS 溶液重新回溶或转移细胞沉淀物至 15 mL 离心管以形成细胞悬浮液。

将含有细胞悬浮液的离心管以 400 xg 离心 5 分钟。

于离心后移除各离心管中的上清液并加入 100 μ L 的 JC-1 工作试剂至各离
30 心管。

将各离心管中的细胞沉淀物与 JC-1 工作试剂涡旋均匀并在避光处理下培养 15 分钟。

15 分钟后，将各离心管以 400 xg 离心 5 分钟。

于离心后，移除各离心管中的上清液、以 1 mL 的 1X PBS 溶液回溶各离心管中的细胞沉淀物并以 400 xg 离心 5 分钟。

于离心后，移除各离心管中的上清液、以 1 mL 的 1X PBS 溶液回溶各离心管中的细胞沉淀物并以 400 xg 离心 5 分钟。

于离心后，移除各离心管中的上清液、以 500 μ L 的 1X PBS 重新悬浮细胞，以得到待测细胞液。

10 以流式细胞仪量测各孔的待检测细液中细胞粒线体的膜电位，以进行粒线体活性分析。因实验系进行三重复，故将各组的三重复实验之结果平均以得平均值，然后以对照组 A 的平均值为 1 之相对 JC-1 聚集量，将实验组及对照组 B 的平均值换算为相对 JC-1 聚集量，如图 5 所示。

5-3、测试结果

15 参阅图 5，将对照组 A 的数值视为 1。相较于对照组 A，实验组的相对粒线体膜电位高达 12.77 倍。而对照组 B 的相对粒线体膜电位为 6.52。换言之，人参萃取物能显著促进骨骼肌细胞对抗过度疲劳造成的粒线体活性下降。

例六：骨骼肌细胞增生试验

肌肉组织较多的人，其耐力也会较高，更长时间的劳动而不会感到疲劳。

20 6-1、材料与设备说明：

实验细胞株：采用骨骼肌细胞 C2C12（后续简称 C2C12 细胞），C2C12 细胞购自美国典型培养物保存中心（American Type Culture Collection，ATCC®）之 C2C12 细胞株（ATCC CRL-1772™）。

25 培养基：采用 Dulbecco's modified Eagle's medium 培养基，采购自 Gibco 公司，美国，型号 Gat.11965-092。添加 10% 的 FBS 胎牛血清，采购自 Gibco 公司，美国，型号 Gat.10437-028。添加 1% 抗生素，采购自 Gibco 公司，美国，型号 Gat.15240-062。

细胞增殖套组：ELISA，BrdU（购自罗氏；型号 11647229001）。其中，包括 EdU 试剂、FixDenat 试剂、BrdU-POD 试剂
30 (Remove the antibody conjugate and rinse well three times with 200-300 μ L washin

g solution)、洗涤液、底物溶剂。

6-2、测试流程：

首先，取 96 孔培养盘将每孔接种 5000 个细胞于 37℃ 下培养 2 小时。将培养完成的细胞分为五组：实验组、空白组、阳性对照组、对照组 A 与对照组 B。

空白组：仅添加培养基，并于 37℃ 下培养 24 小时。阳对照组：额外另添加 10% 的 FBS 胎牛血清。实验组：添加含有 0.25% 的例一中所得到的的人参萃取物的细胞培养基。对照组 A：添加含有 0.25% 的例一中所得到的白参萃取物的细胞培养基。对照组 B：添加含有 0.25% 的例一中所得到的红参萃取物的细胞培养基。

接着，依据细胞增殖套组标准测试程序，加入 EdU 试剂后接续于 37℃ 下培养 24 小时。然后，移除上清液再添加 FixDenat 试剂后在室温下处理 30 分钟。除去 FixDenat 试剂并用 PBS 缓冲液清洗一次。加入 BrdU-POD 试剂后在室温下处理 90 分钟。去除抗体偶联物(BrdU-POD 试剂)洗涤液冲洗 3 次。除去洗涤液，加入底物溶剂并在室温处理 15 分钟。添加 H₂SO₄（浓度 1M）后处理 10 分钟。在以 300rpm 摇动 1 分钟后，以流式细胞仪量测各孔的待检测细胞液的荧光信号（激发光：450nm），换算出细胞数量。

所得结果利用 Excel 软件进行 student t-test 以决定两个样本群体之间是否在统计上具有显著差异，如图 6 所示，其中「*」代表 p 值小于 0.05，「**」代表 p 值小于 0.01，以及「***」代表 p 值小于 0.001。当「*」越多时，代表统计上相对于空白组的差异越显著。

6-3、测试结果

参考图 6。将空白组所测得的骨骼肌细胞数量视为 100% 时，阳性对照组相对于空白组的骨骼肌细胞数量为 126.22%，而实验组相对于空白组的骨骼肌细胞数量为 106.7%。相较于空白组而言，实验组具有统计学上的显著差异。

然而，白参萃取物（对照组 A）与红参萃取物（对照组 B）不但不具备骨骼肌增生的效用，反而使得骨骼肌细胞数量减少。可知，人参萃取物才能够有效促进骨骼肌细胞的生长，从而提升个体的抗疲劳效率。

例七：人体实验

样品：采用例一所制备的人参萃取物。

受试者：3 位受试者。各受试者年龄层为 20 岁以上，55 岁以下。其中，受试者自述为易疲劳、常脑雾之族群，并且无潜在其他疾病之健康成年人。

7-1、测试项目

项目包括：血氧饱和浓度（SpO₂，Oxygen saturation 以%表示）、脂质过氧化指标（MDA，Malondialdehyde）、总和抗氧化能力（TAC）、判断力测试（Stroop Tess）、短期记忆力测试（Digit Span Test）。

其中，血氧饱和浓度是指血液中含氧血红素与总血红素的比例，利用血氧机（威创手持式，型号 TD-8255）进行检测。此测试过程中，受试者全程配戴面罩（以控制供氧量）进行缺氧暴露，并记录开始前（一般空气，含氧量约 21%）以及暴露缺氧（含氧量 7%）30 分钟后之血氧浓度。

其中，脂质过氧化指标是以利用脂质过氧化作用的终产物之一 Malondialdehyde（MDA）可作为测量脂质过氧化的指针，采用血液为样本，委托检验单位为立人医事检验所。

其中，采用 TPTZ 氧化还原法，藉由人体血清内抗氧化剂均具有还原能力的特性，能促使三价的氧化铁螯合物（Fe³⁺-TPTZ）被还原成二价还原型的铁螯合物（Fe²⁺-TPTZ），来评估血液中的总抗氧化能力。

其中，判断力测试（Stroop Tess）采用答题花费时间来进行评量，意即答题花费时间愈短则代表判断力愈高。于此，判断力测试方法测验方法：测验开始后会出现一个色彩单字，但其单字的字体颜色不一定与其本身所代表色彩相符，受试者需要正确回答字体颜色，而非单字本身代表的颜色，连续测试 40 题，纪录其作答总花费时间。答题时间越短，表示判断力越高。

其中，短期记忆力测试采用答对题数与答题准确率来评量，意即答对题数愈多，答题准确率愈高代表其短期记忆力愈佳。于此，采用以数字广度测验（Digit Span Test）来作为短期记忆力测试，受试者需要记忆多个数字，然后依显示顺序，逆向答出正确的数字字符串。位数会逐渐增加，直到受试者不能正确回忆为止。并且，以答对题数除以总测试题数后乘以百分比，进行平均值计算，即可得到答题准确率。

7-2、测试流程：

令 3 位受试者每日摄取 5mL 的人参萃取物，并每天持续摄入四周。于开始摄入前（即第 0 周，又称对照组）及饮用四周后（即第 4 周，又称为实验组）

分别进行以上述设备进行量测。

7-3、测试结果：

请参阅图 7。对照组的平均血氧饱和度从 97.7%，经模拟缺氧状态 30 分钟后降为 88.0%，二者差距达 9.7。经过四周的每日摄取 5mL 的人参萃取物后，3 位受试者的平均血氧饱和度从 97.0%，经模拟缺氧状态 30 分钟后降为 92.3%，二者差距为 4.7。于此，差距愈小代表缺氧耐受力愈好。可知，使用本发明之人参萃取物仅四周，即便处于缺氧情况下 30 分钟，受试者仍能维持其血氧饱和度在 90%以上，表示其耐缺氧能力大幅提升。意即，每日摄取 5mL 的人参萃取物可以有效提升缺氧耐受力。

请参阅图 8。经过四周的每日摄取 5mL 的人参萃取物后，3 位受试者的平均脂质过氧化指针从 1.3（第 0 周）在维持日常作息的情况下降至 1.11（第 4 周）。意即，每日摄取 5mL 的人参萃取物可以有效改善脂质过氧化指标达 14.58%。

请参阅图 9。经过四周的每日摄取 5mL 的人参萃取物后，3 位受试者的平均总和抗氧化能力从 0.62（第 0 周）在维持日常作息的情况提升到 0.67（第 4 周）。意即，每日摄取 5mL 的人参萃取物可以有效提升总和抗氧化能力达 8.02%。

请参阅图 10。经过四周的每日摄取 5mL 的人参萃取物后，3 位受试者的平均答题所花时间为 45 秒（第 0 周）在维持日常作息的情况减少到 43.3 秒（第 4 周）。意即，每日摄取 5mL 的人参萃取物可以有效提升判断力。

请参阅图 11。经过四周的每日摄取 5mL 的人参萃取物后，3 位受试者的平均答对题数从 21.7（第 0 周）在维持日常作息的情况下可以提升到 25.3（第 4 周）。意即，每日摄取 5mL 的人参萃取物可以有效提升短期记忆力。

请参阅图 12。经过四周的每日摄取 5mL 的人参萃取物后，3 位受试者的平均答题准确率从 88.5（第 0 周）在维持日常作息的情况下可以提升到 89.2（第 4 周）。意即，每日摄取 5mL 的人参萃取物可以有效提升短期记忆力。

工业应用性

综上所述，任一实施例的人参萃取物可用以制备抗疲劳或提升认知菜单现的组合物。任一实施例的人参萃取物可用以制备促进粒线体活性、促进骨骼肌

细胞增生、提升耐缺氧能力、提升血氧饱和度、提升脂质过氧化指标 MDA、提升总和抗氧化能力 TAC、提升缺氧耐受力、提高判断力与短期记忆力。

当然，本发明还可有其它多种实施例，在不背离本发明精神及其实质的情况下，熟悉本领域的技术人员可根据本发明作出各种相应的改变和变形，但这些相应的改变和变形都应属于本发明权利要求的保护范围。

权利要求书

- 1、一种人参萃取物的用途，其是用于制备抗疲劳的组合物，该人参萃取物是以水为溶剂提取自人参（*Panax ginseng* C. A. Meyer）。
- 2、如权利要求 1 所述的用途，其中该人参萃取物促进粒线体活性。
- 5 3、如权利要求 1 所述的用途，其中该人参萃取物促进骨骼肌细胞增生。
- 4、一种人参萃取物的用途，其是用于制备提升认知功能表现的组合物，该人参萃取物是以水为溶剂提取自人参（*Panax ginseng* C. A. Meyer）。
- 5、如权利要求 4 所述的用途，其中该人参萃取物用于提升耐缺氧能力。
- 6、如权利要求 4 所述的用途，其中该人参萃取物用于提升血氧饱和度。
- 10 7、如权利要求 4 所述的用途，其中该人参萃取物提升脂质过氧化指标 MDA。
- 8、如权利要求 4 所述的用途，其中该人参萃取物提升总和抗氧化能力 TAC。
- 9、如权利要求 1 至 8 其中任一项所述的用途，其中该组合物为一食品组
- 15 合物，且该组合物至少包含该人参萃取物 5 mL。
- 10、如权利要求 1 或 4 所述的用途，其中该人参萃取物每 100 毫升具有人参皂苷 Rg3（Ginsenoside）13.3 毫克。