

说明书

发明名称: 山竹壳提取物用于制备骨骼保健组合物的用途

技术领域

[0001] 本发明涉及一种山竹壳提取物的用途，特别是涉及以山竹壳制备而成的山竹壳提取物，其在骨骼保健上的应用。

背景技术

[0002] 现代社会中，全球大约有2亿人受到骨质疏松症状的影响。根据统计，每年大约有890万例脆性骨折发生，而其中约三分之一的女性和五分之一的50岁以上的男性在其一生中经历过脆性骨折。

[0003] 并且，每年患有退化性关节炎占全球超过五亿人口，随着老年人口增加，2019年截止近30年，患有关节炎的比例增加了48%，关节炎、软组织发炎的症状会出现骨头之间的软骨磨损、结构变形或关节间滑液分泌减少而使关节处产生疼痛、肿胀、发热、僵硬等症状。

[0004] 骨科医师指出，骨质疏松基本上为不可逆的症状，一旦骨质流失，后续治疗与预防上最多也只能减缓骨质流失的速度，然而针对关节炎的治疗方式，也是以缓解关节的负担与疼痛感为主，而无法恢复以往的骨质状态与关节活动力。

[0005] 因此，近年来骨骼保健逐渐被社会大众重视，而骨骼保健除了骨骼强化、关节灵活活动外，还包含协助骨骼与关节运动的肌肉，为了改善上述问题，本领域的技术人员亟需研发出能够改善上述问题的机能性食品，以造福有此需求的广大族群。

[0006] 发明公开

[0007] 在一些实施例中，一种山竹壳提取物用于制备骨骼保健的组合物的用途，其中山竹壳提取物是将山竹(*Garcinia mangostana*)的果实外壳以酵素溶液依序进行不同提取温度的二阶段提取所制得。

[0008] 在一些实施例中，前述二阶段提取的提取温度分别为45℃至65℃以及75℃至95℃。

[0009] 在一些实施例中，前述二阶段提取中各阶段的提取时间为60分钟至90分钟。

- [0010] 在一些实施例中，前述进行二阶段提取的步骤包括：将山竹的果实外壳以酵素溶液于45℃至65℃下进行初次提取60分钟以得到初次提取液、将初次提取液于75℃至95℃下进行二次提取60至90分钟以得到二次提取液，以及将二次提取液进行过滤并浓缩后以得到山竹壳提取物。
- [0011] 在一些实施例中，前述初次提取的提取温度为 $55 \pm 5^\circ\text{C}$ ，而前次二次提取的提取温度为 $85 \pm 5^\circ\text{C}$ 。
- [0012] 在一些实施例中，前述酵素溶液为含有0.1重量%至1重量%的糖化酵素的水溶液。
- [0013] 在一些实施例中，前述糖化酵素为葡萄糖淀粉酵素、 α -淀粉酶、 β -淀粉酶、异淀粉酶或其组合。
- [0014] 在一些实施例中，山竹壳提取物具有至少 $19000 \pm 5000\text{ppm}$ 的总黄酮含量。
- [0015] 在一些实施例中，前述骨骼保健为强化骨骼、预防关节磨损及/或预防骨质流失。
- [0016] 在一些实施例中，前述山竹壳提取物具有通过抑制噬骨细胞分化、增加骨质密度、促进肠道钙质吸收以及促进骨钙素分泌中至少一项功能，以强化骨骼。
- [0017] 在一些实施例中，前述山竹壳提取物具有通过促进聚葡萄糖胺表现、以及降低发炎中至少一项功能，以预防关节磨损。
- [0018] 在一些实施例中，前述山竹壳提取物具有通过抑制噬骨细胞分化以及促进骨钙素分泌中至少一项功能，以预防骨质流失。
- [0019] 在一些实施例中，前述山竹壳提取物具有缓解体内发炎的功能。
- [0020] 综上所述，任一实施例的山竹壳提取物，其具有骨骼保健的功效。并且，山竹壳提取物是通过不同提取温度的二阶段提取所制得，以完整释放山竹壳中的活性成分及提高山竹壳提取物中的活性成分含量。在一些实施例中，山竹壳提取物具有强化骨骼、预防关节磨损、缓解骨质流失、提高钙质吸收、缓解体内发炎、预防关节磨损所致的发炎等功效。
- [0021] 以下结合附图和具体实施例对本发明进行详细描述，但不作为对本发明的限定。
- [0022] 附图简要说明

- [0023] 图1是任一实施例的山竹壳提取物的制备流程；
- [0024] 图2是实验组及控制组的抑制噬骨细胞分化实验照片；
- [0025] 图3是实验组及控制组的聚葡萄糖胺分泌实验照片；
- [0026] 图4是实验组及控制组的钙质吸收实验照片；
- [0027] 图5是钙质吸收实验数据结果图；
- [0028] 图6是第0周及第12周受试者的骨钙素分泌平均检测数据图；
- [0029] 图7是第0周及第12周受试者的体内发炎指针平均检测数据图；
- [0030] 图8是第0周、第8周及第12周受试者的骨密度平均检测数据图；以及
- [0031] 图9是第0周、第8周及第12周骨密度较低的受试者的骨密度平均检测数据图。
- [0032] 其中，附图标记：
- S100 ~ S400:步骤
- [0033] 实现本发明的最佳方式
- [0034] 以下将描述本案的部分具体实施态样。在不背离本案精神下，本案尚可以多种不同形式的态样来实践，不应将保护范围限于说明书所具体陈述的条件。
- [0035] 山竹(Mangosteen；学名：Garcinia mangostana)，又名莽吉柿、芒翕、山竺、山竹子、倒捻子、凤果，为藤黄科藤黄属下的一个种。山竹树属热带常绿乔木，原产于马来群岛中的巽他群岛和摩鹿加群岛。山竹的果实成熟后，其果实外型为直径4~8厘米的球形，表皮光滑，具肉质萼片及外果皮内层的柱头残存。山竹果实的果皮色黑味苦不食用，而果肉为白色蒜瓣状，其气味与口感皆香甜柔和。
- [0036] 山竹提取物是将山竹(Garcinia mangostana)的果实外壳(以下简称山竹壳)与提取溶剂以一定比例混合后，并分别以不同提取温度进行二阶段提取一段时间后而获得。在一些实施例中，所使用的山竹壳可为成熟山竹(Garcinia mangostana)的果实外壳。
- [0037] 在一些实施例中，请参见图1。首先，将取得的山竹壳粗碎成山竹壳以得到山竹壳碎片或颗粒(以下称山竹壳原料)(步骤S100)。在一些实施例中，山竹壳原料是山竹壳截切粗碎成约12毫米大小的山竹壳碎片。举例来说，将山竹壳切碎后通过孔径12毫米的筛网来得到进行提取的山竹壳原料。于此，借由特定孔径的

筛网的筛选可确保山竹壳碎片的尺寸符合要求，进而提高后续提取步骤的与溶剂作用的接触面积。

- [0038] 于步骤S100后，接续将山竹壳原料与酵素溶液混合，以利用酵素溶液对山竹壳原料进行初次段提取以得到初次提取液(即步骤S200)。其中，酵素溶液为含有0.1重量%至1重量%(例如，0.5重量%)的糖化酵素的水溶液。举例来说，酵素溶液是将糖化酵素溶于RO水中。糖化酵素可以为但不限于葡萄糖淀粉酵素、 α -淀粉酶、 β -淀粉酶、异淀粉酶或其组合。在一些实施例中，山竹壳原料与酵素溶液的重量比为0.2~5:1~10(例如，1:4)。在一些实施例中，初次提取的提取温度为45℃至65℃(例如，55±5℃)，且初次提取的提取时间为60分钟至90分钟。举例来说，将酵素溶液的温度提高至初次提取的提取温度后，再加入山竹壳原料进行初次提取，以得到初次提取液。
- [0039] 于步骤S200后，接续将初次提取液进行二次提取以得到二次提取液(即步骤S300)。在一些实施例中，二次提取的提取温度为75℃至95℃(例如，85±5℃)，且二次提取的提取时间为60分钟至90分钟。举例来说，将初次提取液的温度提高至二次提取的提取温度后，再进行二次提取，以得到二次提取液。在一些实施例中，二次提取后所得二次提取液的白利糖甜度(Degrees Brix, ° Bx)大于1.3° Bx(20℃下检测)。在一些示范例中，将初次提取液的温度提升至85±5℃后提取60分钟，并于60分钟检测当下二次提取液的白利糖甜度是否符合规范(即是否大于1.3)，若未达到规范要求，可继续提取30分钟后再次确认。
- [0040] 于此，特定比例的提取溶剂与待萃物、特定尺寸的待萃物(如，粉碎后的果实外壳)、阶段性的特定提取温度与时间、或其任意组合可明显提升提取效率。再者，特定的提取温度还可更完整的使原料中的活性成分释放，而特定的提取时间可避免提取时间过长造成提取物中的有效成分可能产生降解。
- [0041] 在一些实施例中，于接续步骤S300后，过滤及浓缩二次提取液以得到山竹壳提取物(即步骤S400)。在一些实施例中，过滤步骤是指将二次提取液以特定孔径大小的滤网进行过滤，以将提取过后山竹壳碎片滤除。在一些实施例中，浓缩是利用特定温度及压力的蒸气对过滤后的二次提取液进行减压浓缩，并通过检测其浓缩后的白利糖甜度是否符合规范，才确认是否得到山竹壳提取物。在

一些实施例中，山竹壳提取物的白利糖甜度为 $6.0 \pm 0.5^{\circ} \text{ Bx}$ (20℃下检测)。在一些示范例中，将二次提取液以400目(mesh)孔径的滤网进行过滤后，在于55℃至65℃(例如 $60 \pm 5^{\circ} \text{C}$)下以 $1 \pm 0.2 \text{ kg/cm}^2$ 蒸气浓缩过滤后的二次提取液，使其白利糖甜度为 $6.0 \pm 0.5^{\circ} \text{ Bx}$ (20℃下检测)后停止浓缩，即可得到山竹壳提取物。

- [0042] 在一些实施例中，山竹壳提取物具有至少 $19000 \pm 5000 \text{ ppm}$ 的总黄酮含量。
- [0043] 在一些实施例中，山竹壳提取物具有骨骼保健的功效。举例来说，山竹壳提取物可强化骨骼、预防关节磨损及/或缓解骨质流失。
- [0044] 在一些实施例中，山竹壳提取物除了具有骨骼强化、预防关节磨损及/或预防骨质流失外，山竹壳提取物更可使关节灵活活动、协助骨骼与关节运动的肌肉。
- [0045] 在一些实施例中，山竹壳提取物具有抑制噬骨细胞分化、增加骨质密度、促进聚葡萄糖胺表现、促进肠道钙质吸收、促进骨钙素(Osteocalcin)分泌以及降低发炎中至少一项功能。
- [0046] 应能明了的是，下文所述及的受体是指以侵入式(如注射)或非侵入式(如食用)施予山竹壳提取物的对象。在一些实施例中，受体为人。
- [0047] 在一些实施例中，山竹壳提取物可以有效抑制受体体内噬骨细胞分化、减少成熟噬骨细胞数量，以强化骨质及提高骨质密度。在一些实施例中，山竹壳提取物可提升骨质密度，以强化骨骼。
- [0048] 在一些实施例中，山竹壳提取物可以提升钙质在受体体内肠道的吸收率(如使吸收率达10%)，以增强骨骼及骨质。并且，可避免或减少当钙摄取不足时，人体会从骨骼中吸取钙质的机率。
- [0049] 在一些实施例中，山竹壳提取物可促进骨钙素分泌，以提高血中骨钙素浓度，并帮助骨质形成。具体而言，骨钙素主要是由造骨细胞所生成，其含量与骨质的生成具有正相关性。一般而言，骨钙素浓度越高，表示骨合成作用越好。据此，山竹壳提取物促进受体骨钙素分泌，可帮助受体骨质生成。
- [0050] 举例来说，前述山竹壳提取物通过抑制噬骨细胞分化、增加骨质密度、促进肠道钙质吸收以及促进骨钙素分泌中至少一项功能，以达到强化骨骼的功效。举

例来说，前述山竹壳提取物通过抑制噬骨细胞分化以及促进骨钙素分泌中至少一项功能，以达到缓解骨质流失的功效。

- [0051] 在一些实施例中，山竹壳提取物可以促进受体体内聚葡萄糖胺表现，以减少软骨磨损，并让关节不被磨损。
- [0052] 在一些实施例中，山竹壳提取物可帮助缓解体内发炎。举例来说，受体服用山竹壳提取物，可降低体内高敏感性C-反应蛋白(High-sensitivity C-Reactive Protein,hs-CRP)的浓度。hs-CRP是由肝脏细胞所产生的特殊蛋白，当身体有受伤、感染或发炎状况时，血液中的浓度会升高，为发炎指标之一。当关节软骨耗损造成骨头磨擦而发炎，通过服用山竹壳提取物可缓解体内发炎，进而减轻关节疼痛。此外，研究发现，骨骼代谢转换的过程中，发炎反应对骨生理和骨重塑(bone remodeling)有重大的影响，因而诱发骨质疏松。因此，山竹壳提取物缓解体内发炎，进而降低诱发骨质疏松的可能性。
- [0053] 举例来说，前述山竹壳提取物通过促进聚葡萄糖胺表现、以及降低发炎中至少一项功能，以达到预防关节磨损的功效。
- [0054] 在一些实施例中，前述的山竹壳提取物可利用本领域技术人员所详知的技术而被制造成适合于经肠道、口服。
- [0055] 在一些实施例中，经肠道或口服可为，但不限于，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)或类似之物。
- [0056] 在一些实施例中，前述的任一组合合物可为食用产品。换言之，食用产品包含特定含量的山竹壳提取物。在一些实施例中，食用产品可为一般食品、保健食品或膳食补充品。
- [0057] 在一些实施例中，前述的食用产品可利用本领域技术人员所详知的技术而被制造成适合于口服的剂型。在一些实施例中，前述的一般食品可为食用产品本身。在一些实施例中，一般食品可为但不限于：饮料(beverages)、发酵食品(fermented foods)、烘培产品(bakery products)或调味料。

- [0058] 在一些实施例中,所得的山竹壳提取物可进一步作为食品添加剂(food additive),以制得含有山竹壳提取物的食品组合物。于此,能借由现有方法于原料制备时添加任一实施例的山竹壳提取物,或是于食品的制作过程中添加任一实施例的山竹壳提取物,而与任一种可食性材料配制成供人类与非人类动物摄食的食用产品(即食品组合物)。
- [0059] 在一些实施例中,前述组合物的使用剂型可以为液态或固态(例如,粉包或锭剂)。
- [0060] 在一些实施例中,前述组合物的使用量为2g/日的液态的山竹壳提取物。
- [0061] 在一些实施例中,前述组合物的使用量为0.2g/日的固态的山竹壳提取物。
- [0062] 例1: 山竹壳提取物的制备
- [0063] 将山竹壳粗碎成约12毫米大小的山竹壳原料,并将其与酵素溶液以1: 4的重量比进行后续二阶段提取步骤。其中,酵素溶液为将葡萄糖淀粉酵素(购自: TRUMP chemical corp.)溶于RO水所制成的含有0.5重量%的葡萄糖淀粉酵素的水溶液。将酵素溶液升温至 $55 \pm 5^{\circ}\text{C}$ 后,将山竹壳原料加入至酵素溶液以 $3.0 \pm 0.5\text{kg}/\text{cm}^2$ 的回流泵搅拌提取60分钟,以得到初次提取液。接着,再将提取温度升至 $85 \pm 5^{\circ}\text{C}$ 后,将初次提取液进行二次提取60分钟以得到二次提取液,并确认所得的二次提取液的白利糖甜度大于 1.3°Bx (20°C 下检测);如若未达到要求,可再提取30分钟直到确认白利糖甜度达到要求。
- [0064] 将确认白利糖甜度达到要求的二次提取液以400目孔径的滤网进行过滤以去除山竹壳原料,并于 $60 \pm 5^{\circ}\text{C}$ 下以 $1 \pm 0.2\text{kg}/\text{cm}^2$ 蒸气浓缩过滤后的二次提取液,使其白利糖甜度为 $6.0 \pm 0.5^{\circ}\text{Bx}$ (20°C 下检测)后停止浓缩,即可得到山竹壳提取物。
- [0065] 例2: 噬骨细胞分化实验
- [0066] 噬骨细胞为多个单核球细胞融合分化而成的多核细胞型态,主要功能为对骨组织的分解破坏,与骨质疏松息息相关。因此,通过观察山竹壳提取物抑制单核球细胞分化成噬骨细胞的能力,可推估其是否具有改善骨质疏松的功效。
- [0067] 于此,所使用细胞为外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC; 以下称PBMC细胞),由健康捐赠者取得的周边血经离心所制得。所

使用的细胞培养基为含有10%的胎牛血清(Gibco; Cat.10437-028)及1X抗生素(Gibco; Cat.15240-062)的 α -MEM培养基(Gibco; Cat.12000-022)。所使用的噬骨细胞分化培养基为含有10%的胎牛血清(Gibco; Cat.10437-028)、1X抗生素(Gibco; Cat.15240-062)、40ng/mL的human RANKL(PeproTech; Cat.310-01,)及25ng/mL human M-CSF(PeproTech; Cat.300-25)的 α -MEM培养基(Gibco; Cat.12000-022)。

- [0068] 首先, 将PBMC细胞以 1×10^6 cells/well的密度种植于每孔含有500 μ L的细胞培养基的24孔细胞培养盘, 并置于二氧化碳培养箱中培养24小时。
- [0069] 将培养后的PBMC细胞分为控制组与实验组, 将上述PBMC细胞依据组别更换对应的实验培养基, 并培养14至21天, 期间每三天更换一次实验培养基, 直到以显微镜(ZEISS; Cat.Vert.A1)观察控制组的噬骨细胞分化情形以决定实验终止点。于此, 控制组的实验培养基为噬骨细胞分化培养基, 而实验组的实验培养基为添加有0.03125mg/mL的例1所制备的山竹壳提取物的噬骨细胞分化培养基。
- [0070] 分别添加1滴ActinRedTM555 ReadyProbesTM试剂(Thermo; Cat.R37112)及赫斯特33342染料(Hoechst 33342; 购自Thermo; 编号: Cat.62249; 1: 20000稀释)至控制组及实验组中避光作用15分钟, 以将肌动细胞、细胞进行染色。接着, 以荧光显微镜(倒立式显微镜搭载照相系统; ZEISS; Cat.Vert.A1)避光观察并拍摄纪录噬骨细胞其形态及细胞核数以判别样品抑制噬骨细胞分化的能力。拍摄结果如图2所示。
- [0071] 请参见图2。左图为控制组的荧光拍摄照片而右图为实验组的荧光拍摄照片。其中, 蓝色圆形为细胞核, 而橘色为肌动蛋白, 而红色箭头则为噬骨细胞。当PBMC细胞未分化时期体积要小, 肌动蛋白会表现在整个细胞内, 故染色后会看到点状荧光, 如图2右图的实验组所示。然而, 若PBMC细胞经噬骨细胞分化因子刺激会分化并彼此融合成体积较大且多核的噬骨细胞, 且肌动蛋白会在细胞边缘形成明显环状构造, 故染色后会看见细胞边缘有环状荧光, 如图2左图的控制组所示。因此, 由图2可知, 山竹壳提取物可抑制PBMC细胞受到噬骨细胞分化因子刺激, 进而抑制噬骨细胞分化、降低骨质代谢、强化骨骼及预防骨质流失。

[0072] 例3：聚葡萄糖胺分泌实验

[0073] 于此，所使用的细胞为ATDC5细胞(ATCC®CRL-2846™)，其为软骨前驱细胞(chondrogenic cell)。所使用的细胞培养基为含有2mM的L-麸酰胺酸(L-Glutamine，购自Gibco)、5%的胎牛血清蛋白(Fetal Bovine Serum,FBS，购自Gibco)及1%的penicillin/streptomycin二合一抗生素(购自Gibco)的DMEM: Ham's F12(1: 1)培养基(购自Gibco)。所使用的软骨细胞分化培养基为含有1%的胰岛素-转铁蛋白-硒(Insulin-transferrin-Selenium，购自Gibco)、2mM的L-麸酰胺酸(L-Glutamine，购自Gibco)、5%的胎牛血清蛋白(Fetal Bovine Serum,FBS，购自Gibco)及1%的penicillin/streptomycin二合一抗生素(购自Gibco)的DMEM: Ham's F12(1: 1)培养基(购自Gibco)。

[0074] 首先，将 1×10^5 个ATDC5细胞培养于每孔含有2mL的细胞培养基的6孔培养盘中，并于37℃恒温培养箱中培养24小时，并接着每三天更换一次细胞培养基直到细胞满盘。

[0075] 将ATDC5细胞分为控制组与实验组，并更换细胞培养基为实验培养基，并持续培养分化35天，且期间每三天更换一次实验培养基。于此，控制组的实验培养基为软骨细胞分化培养基，而实验组的实验培养基为添加有0.03125mg/mL的例1所制备的山竹壳提取物的软骨细胞分化培养基。

[0076] 待分化完后，移除二组的实验培养基，并使用1XPBS润洗3次二组细胞后，加入0.5mL的10%的甲醛(formaldehyde，购自Echo chemical，中国台湾，Cat.TG1794-4-0000-72NI)，并于室温作用30分钟以固定细胞。接着，去除甲醛后再使用1XPBS润洗3次。

[0077] 接着，加入0.5mL的1%的阿利新蓝染液(Alcianblue solution,pH2.5；以0.1M的HCl配制)至每孔培养盘中，于温进行染色隔夜。染色完后，使用1XPBS润洗3次，并于显微镜(ZEISS)下观察阿利新蓝染上葡萄糖胺聚糖所呈现的蓝色讯号。结果如图3所示。

[0078] 请参见图3。左侧为控制组的拍摄照片，而右侧为实验组的拍摄照片。其中，背景细胞间蓝色信号为聚葡萄糖胺，而红色箭头所指为由ATDC5细胞分化为的软骨细胞。当软骨前驱细胞(chondrogenic cell)分化为成熟的软骨细胞后，软骨细

胞具有生成聚葡萄糖胺的能力，因此通过比较图3的实验组及控制组的蓝色背景信号，可发现添加山竹壳提取物具有促进ATDC5细胞分化为的软骨细胞能力，且能生成更多的聚葡萄糖胺。于此，聚葡萄糖胺是软骨与关节液的主要成分，随着关节老化或过度使用将可能造成软骨磨损、关节液不足，进而造成关节间的间距窄化。并且，随着耗损日积月累将可能造成关节摩擦，严重的话会使得关节发炎、肿胀、疼痛等等。基此，因聚葡萄糖胺与关节健康有关，故受体通过服用山竹壳提取物后可生成更多的聚葡萄糖胺，并能改善关节不适、预防关节磨损疼痛、关节退化、减少关节炎的发生。

[0079] 例4：钙质吸收实验

[0080] 于此，所使用的细胞为人类肠道细胞(以下称C2BBE1细胞；ATCC CRL-2102)，其为软骨前驱细胞(chondrogenic cell)。所使用的细胞培养基为含有10%的胎牛血清蛋白(Fetal Bovine Serum, FBS，购自Gibco，Cat.10438-026)及1%的penicillin/streptomycin二合一抗生素(购自Gibco，Cat.15140-122)的Dulbecco's Modified Eagle培养基(购自Gibco，Cat.12100-038)。

[0081] 首先，将 2×10^5 个C2BBE1细胞接种于每孔含有2mL的细胞培养基的6孔培养盘中，并于37℃恒温培养箱中培养24小时。

[0082] 将培养后的C2BBE1细胞分为控制组及实验组，并将各组的细胞培养基更换为实验培养基，并培养1小时。其中，控制组的实验培养基为细胞培养基，而实验组的实验培养基为添加有0.0625mg/mL的例1所制备的山竹壳提取物的细胞培养基。

[0083] 于各组中加入 $2 \mu\text{M}$ 的Fluo-4 AM钙离子指示剂(购自Invitrogen)室温培养45分钟，接着以1XPBS清洗一次后，再加入细胞培养基，并以荧光显微镜(Fluorescence Microscopy, Zeiss)观察二组的C2BBE1细胞的荧光表现。于此，当C2BBE1细胞中荧光表现越强代表C2BBE1细胞内的钙离子越多。结果如图4所示。

[0084] 请参见图4。图4的左侧为控制组的荧光拍摄照片，而右侧为实验组的荧光拍摄照片。于此，绿色荧光代表钙离子。因此，从图4可知山竹壳提取物可提升肠道细胞内钙指示剂量。

- [0085] 接着, 将各组经胰蛋白酶(Trypsin)作用以收集上述各组C2BBe1细胞, 并以300xg离心5分钟来收集各组C2BBe1细胞沉淀物, 接着以500 μ L含2%的FBS的PBS回溶C2BBe1细胞沉淀物以得到各组待测样品。接着, 将各组待测样品以Fluo-4 AM钙离子指示剂(购自Invitrogen)处理后, 利用流式细胞仪(厂商: BD Accuri C6 Plus)测定激发/散射(Ex/Em)波长494/506nm的吸光值来侦测肠道细胞的钙吸收量。于此, 将控制组的数值视为100%的相对钙吸收量, 进而实验组的推算相对钙吸收量。结果如图5所示。其中, 图式中「★」代表p值小于0.05。
- [0086] 请参见图5。控制组相对钙吸收量为100%, 而实验组的相对钙吸收量为110.4%。并且, 实验组相对于控制组提高约10%的钙吸收量。由此可知, 山竹壳提取物可提升C2BBe1细胞内的相对钙吸收量。换言之, 当受体服用山竹壳提取物, 其肠道细胞可吸收较多的钙质, 进而有利于避免骨骼的钙质不被吸取来维持正常血钙浓度, 并可增强骨质与骨骼及预防骨质流失。
- [0087] 例5: 人体试验
- [0088] 于此, 采自身对照方式进行, 比较8位受试者服用含有山竹壳提取物的组合物前后的骨骼保健功效变化。其中, 所使用的组合物为每瓶50mL的山竹壳提取饮, 且每瓶山竹壳提取饮含有2克的山竹壳提取物及48克的水。
- [0089] 测试方式: 8位受试者每日服用一瓶山竹壳提取物, 连续服用12周, 并于服用前(第0周)、服用8周后(第8周)及服用12周后(第12周)委托「国泰健检中心」以双能量X光吸收仪(DXA)骨密度检测, 并于服用前(第0周)及服用12周后(第12周)进行空腹血液采集并委托「立人医事检验所」进行血液检测。其中, 8位受试者为25岁至55岁、经常喝咖啡或/及碳酸饮料的族群。
- [0090] 血液检测项目: 血液骨质生成指标(立人医事检验所备注HB0699)及血液发炎指标(立人医事检验所备注HE0106)。其中, 血液骨质生成指标是指骨钙素(Osteocalcin)浓度; 血液发炎指标是指: 高敏感性C-反应蛋白(hs-CRP)浓度。
- [0091] 骨密度检测项目: 以仪器测量表以「T score」呈现。「T score」是作为判断骨密度的指针, 骨密度正常值「T score」为-1~1之间。若「T score」数值小于-1时即为骨质偏少, 即骨密度偏少, 而小于等于-2.5即为骨质疏松。
- [0092] 例5-1: 血液中骨钙素检测

- [0093] 请参见图6。8位受试者于第0周时其血液中平均骨钙素浓度为19.1ng/mL，而于服用12周含有山竹壳提取物的山竹壳提取饮后，血液中平均骨钙素浓度提高至19.6ng/mL，代表经连续12周服用山竹壳提取物后，8位受试者体内的血液中平均骨钙素浓度提高2.6%，且改善人数比率达62.5%(即5人)。
- [0094] 由此可知，通过服用山竹壳提取物可提高血液中骨钙素浓度，进而帮助骨质生成、提升骨质密度、强化骨质和骨骼，并预防骨质流失。
- [0095] 例5-2：血液中发炎指标检测
- [0096] 请参见图7。8位受试者于第0周时其血液中平均hs-CRP量为0.158mg/dL，而于服用12周含有山竹壳提取物的山竹壳提取饮后，血液中平均hs-CRP量降低为0.048mg/dL，代表经连续12周服用山竹壳提取物后，8位受试者体内的血液中平均hs-CRP量下降69.6%，且改善人数比率达75%(即6人)。
- [0097] 由此可知，通过服用山竹壳提取物可缓解体内发炎，并预防关节磨损所致的发炎或预防因关节软骨耗损发炎所导致的关节疼痛。
- [0098] 例5-3：骨密度检测
- [0099] 请参见图8。8位受试者于第0周时其平均T score为-0.16，于第8周时其平均T score为-0.10，而于第12周时其平均T score为0.06。由此可知，此8位受试者于第0周时，骨密度介于-1与1之间，均属于骨密度正常的族群。经连续12周服用山竹壳提取物后，8位受试者的T score提升了0.22，代表其平均骨质有所提升，亦指骨密度提高。换言之，通过服用山竹壳提取物可帮助提升骨质密度、预防骨质流失并强化骨骼。
- [0100] 8位受试者中有4位于第0周时所检测出的T score小于0.0，为骨质密度较低者，并将此4位受试者的检测结果整理如图9所示。请参见图9。4位受试者于第0周时其平均T score为-0.95，介于骨密度正常值-1到1之间，接近骨密度偏少，于第8周时其平均T score为-0.9，而于第12周时其平均T score为-0.7。由此可知，经连续12周服用山竹壳提取物后，4位受试者的T score提升了0.25，代表其平均骨质有所提升，亦指骨密度提高。换言之，通过服用山竹壳提取物可帮助提升骨质密度并强化骨骼。

- [0101] 由上述可知，连续服用山竹壳提取物12周后，可提高受试者的血液骨钙素浓度、缓解受试者体内发炎情形，并提高受试者的骨密度数值，此显示山竹壳提取物具有降低发炎与骨骼保健之功能。
- [0102] 综上，根据本发明任一实施例的山竹壳提取物，其是通过不同提取温度的二阶段提取所制得，并具有骨骼保健的功效。通过不同提取温度的二阶段提取，可完整释放并保留山竹壳中的活性成分进而提高山竹壳提取物中的活性成分含量。并且，山竹壳提取物具有强化骨骼、预防关节磨损、预防骨质流失、提升骨质密度、提高钙质吸收、缓解体内发炎、预防关节磨损所致的发炎等功效。
- [0103] 虽然本发明的技术内容已经以较佳实施例揭露如上，然其并非用以限定本发明，任何本领域技术人员，在不脱离本发明的精神所作些许的更动与润饰，皆应涵盖于本发明的范畴内，因此本发明的保护范围当视后附的权利要求范围所界定者为准。
- [0104] 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。
- [0105] 工业应用性
- [0106] 一种山竹壳提取物用于制备骨骼保健的组合物的用途，其中山竹壳提取物是将山竹(*Garcinia mangostana*)的果实外壳以酵素溶液依序进行不同提取温度的二阶段提取所制得。

权利要求书

- [权利要求 1] 一种山竹壳提取物用于制备骨骼保健的组合物的用途，其中该山竹壳提取物是将山竹(*Garcinia mangostana*)的果实外壳以一酵素溶液依序进行不同提取温度的二阶段提取所制得。
- [权利要求 2] 根据权利要求1所述的用途，其特征在于，该山竹壳提取物具有至少 19000 ± 5000 ppm的总黄酮含量。
- [权利要求 3] 根据权利要求1所述的用途，其特征在于，该酵素溶液为含有0.1重量%至1重量%的糖化酵素的水溶液。
- [权利要求 4] 根据权利要求3所述的用途，其特征在于，该糖化酵素为葡萄糖淀粉酵素、 α -淀粉酶、 β -淀粉酶、异淀粉酶或其组合。
- [权利要求 5] 根据权利要求1所述的用途，其特征在于，该二阶段提取的该提取温度分别为 45°C 至 65°C 以及 75°C 至 95°C 。
- [权利要求 6] 根据权利要求5所述的用途，其特征在于，该二阶段提取的该提取温度分别为 $55 \pm 5^{\circ}\text{C}$ 以及 $85 \pm 5^{\circ}\text{C}$ 。
- [权利要求 7] 根据权利要求1所述的用途，其特征在于，该二阶段提取中各阶段的提取时间为60分钟至90分钟。
- [权利要求 8] 根据权利要求1所述的用途，其特征在于，进行该二阶段提取的步骤包括：
将该山竹的果实外壳以该酵素溶液于 45°C 至 65°C 下进行初次提取60分钟以得到一初次提取液；
将该初次提取液于 75°C 至 95°C 下进行二次提取60至90分钟以得到一二次提取液；以及
将该二次提取液进行过滤并浓缩后以得到该山竹壳提取物。
- [权利要求 9] 根据权利要求1所述的用途，其特征在于，该骨骼保健为强化骨骼、预防关节磨损及/或预防骨质流失。
- [权利要求 10] 根据权利要求1所述的用途，其特征在于，该山竹壳提取物具有抑制噬骨细胞分化、增加骨质密度、促进肠道钙质吸收、促进骨钙素分泌以及抗发炎中至少一项功能，以强化骨骼。

- [权利要求 11] 根据权利要求1所述的用途，其特征在于，该山竹壳提取物用以促进聚葡萄糖胺表现以及降低发炎中至少一项功能，以预防关节磨损。
- [权利要求 12] 根据权利要求1所述的用途，其特征在于，该山竹壳提取物用以抑制噬骨细胞分化以及促进骨钙素分泌中至少一项功能，以预防骨质流失。
- [权利要求 13] 根据权利要求1所述的用途，其特征在于，该山竹壳提取物具有缓解体内发炎的功能。