

活化胰岛素及治疗糖尿病的复合苦瓜肽口服药及制备方法

5 本申请要求于 2019 年 10 月 25 日提交中国专利局、申请号为 201911024571.8、发明名称为“活化胰岛素及治疗糖尿病的复合苦瓜肽口服药及制备方法”的中国专利申请的优先权，其全部内容通过引用结合在本申请中。

10 **技术领域**

本发明属于药品开发与生物发酵领域，具体涉及一种活化胰岛素及治疗糖尿病的复合苦瓜肽口服药及制备方法。

背景技术

15 世界各国糖尿病的发病率正在逐年增加。据世界卫生组织有关资料表明，全球糖尿病患者已经超过 3.82 亿，我国糖尿病患者约 1.14 亿人。

糖尿病是以高血糖为特征的代谢性疾病，高血糖则是由于胰岛素分泌缺陷或生物作用受损或两者兼有引起的，可导致各种组织，特别是眼、肾、心脏、血管、神经的慢性损害、功能障碍。高血糖及糖尿病的发病有先天遗传和后天因素多种原因，但主要原因之一是近年来中国人膳食中能量、蛋白质和脂肪来源明显发生了变化，纯热能食品、动物性脂肪增加，造成糖尿病的发生呈上升趋势。

20 目前很多糖尿病患者发病初期通过服用西药使得血糖能够快速下降，但西药会对机体产生很大的伤害和副作用，且为保证治疗结果，只能逐渐增大药物用量以及不断换服各种药物，上述方式非但不能使胰岛功能恢复正常，血糖平稳下降，反而使得药物的毒副作用在机体长期积蓄，导致更大的伤害。

25 近年来，一直都有关于苦瓜在防治糖尿病方面的研究成果发表，例如，1981 年 Khana 报道了由苦瓜果实、种子和组织中提取出分子量为 11kDa 的成分，该成分经皮下注射对人体 I、II 型糖尿病具有良好的降血糖活性，

但该成分口服会因肠道破坏失活；2003 年刘璇报道了由苦瓜籽提取出 6.8kDa 的苦瓜多肽，该多肽具胰蛋白酶抑制活性和抗植物致病菌活性；2012 年 Blum A 报道了由苦瓜中提取的粗提物可抑制 11 β -羟基类固醇脱氢酶 I 型基因表达，用于 II 型糖尿病治疗。

5 因此，如何提供一种能更有效调控血糖的苦瓜肽制剂显得尤为重要。

发明内容

有鉴于此，本发明的目的在于提供一种活化胰岛素及治疗糖尿病的复合苦瓜肽口服药及其制备方法，其通过反复酶解、阶段性升温以及补充缓冲液的方式来制备苦瓜肽，以提高苦瓜肽活性成分的含量，且通过与其他天然植物组分的配合使用来达到更好的降血糖效果。

为了实现根据本发明的这些目的和其它优点，提供了一种活化胰岛素及治疗糖尿病的复合苦瓜肽口服药，按重量份计，包括：苦瓜肽粉 20-30 份、西洋参 4-6 份、黄芪 10-12 份、灵芝粉 3-5 份、山药粉 8-10 份、麦麸 15 10-15 份、番石榴叶粉 10-12 份、洋葱提取物 5-10 份、枸杞 5-10 份、平卧菊三七提取物 12-15 份、薏苡仁 1-2 份、魔芋葡甘聚糖 5-8 份、荷叶 8-10 份和低聚木糖 5-8 份。

优选的，所述苦瓜肽粉的制备方法包括如下步骤：

S11、取新鲜苦瓜、干燥苦瓜、苦瓜籽中的一项或几项作为苦瓜原料，20 加入苦瓜原料重量 5 倍的去离子水，并在 25℃ 水温下浸泡 10-12h，取出再用去离子水冲洗 2-3 遍；

S12、将冲洗后的苦瓜原料进行干燥，打碎磨浆，得到苦瓜浆液；

S13、取苦瓜浆液以及缓冲液进行混合，以获得混合体系，按重量比计，按照苦瓜浆液：缓冲液=1:(3-5)；记录混合体系总体积数值，将 pH 25 值调节为 6.8-7 后对混合体系进行温度处理，以获得浸提物；

所述温度处理过程包括：

升温至 45-55℃，保温 45-60min，再降温至 20-25℃，保温 25-30min，并记录此时液体的第一体积数值；按照(总体积-第一体积)*60%补入含有去离子水和缓冲液的第一混合液，且按照重量比计，去离子水：缓冲液= 30 4：1；补入第一混合液后，升温至 60-75℃，保温 60-75min，再降温至

45-55℃，保温 30-35min，并记录此时液体的第二体积数值；按照(总体积-第二体积)*75%补入含有去离子水和缓冲液的第二混合液，且按照重量比计，去离子水：缓冲液=3：1；补入第二混合液后，升温至 80-90℃，保温 75-85min，再降温至 60-75℃，保温 35-45min；

- 5 S14、将浸提物温度降至 20-25℃后对所述浸提物进行酶解，以获得苦瓜肽酶解体系；其中，所述酶解过程包括：

第一次酶解：将浸提物的 pH 值调节至 7.5-8.5，按浸提物重量的 5% 加入胰蛋白酶，80-100 转/min 条件下搅拌，且搅拌的同时升温至 35-40℃，保温 45-60min 后得到第一酶解体系；

- 10 第二次酶解：待第一酶解体系温度降至 20-25℃后，再调整其 pH 值至 3.0-4.0，按第一酶解体系重量的 3%加入果胶酶，80-100 转/min 条件下搅拌，且搅拌的同时升温至 45-55℃，保温 40-60min 后得到第二酶解体系；

- 第三次酶解：待第二酶解体系温度降至 20-25℃后，再调整其 pH 值至 4.5-5.0，按第二酶解体系重量的 2%加入纤维素酶，80-100 转/min 条件下搅拌，且搅拌的同时升温至 55-60℃，保温 30-45min 后得到第三酶解体系；
- 15

- S15、待步骤 S14 中的酶解过程完成后，对获得的第三酶解体系升温至 90℃，维持 10min，以完成灭酶活过程，获得苦瓜肽粗提体系；再在所述苦瓜肽粗提体系中按其重量的 4-5%加入活性炭，搅拌均匀，在 65℃
- 20 下保温 60-90min 后离心，去沉渣后获得苦瓜肽粗提液；

将所述苦瓜肽粗提液经硅藻土过滤，以得到苦瓜肽清液，且过滤压力为 0.2-0.3MPa；再在所述苦瓜肽清液中按其重量加入 4-5%的活性炭，静置 45-50min 后离心，去沉渣；

- S16、将去沉渣后的苦瓜肽清液经过滤孔径为 0.5-0.8μm 的微滤陶瓷膜进行过滤，过滤温度为 55-65℃，以获得微滤膜透过液；
- 25

再将所述微滤膜透过液经截留分子量为 100-200kDa 卷式超滤膜进行过滤，过滤温度为 45-50℃，以获得超滤膜透过液；

再将所述超滤膜透过液经截留分子量为 150-1000Da 的卷式高压反渗透膜进行浓缩，以除去水分及部分残留无机盐和小分子杂质，浓缩温度在

40℃以下，以得到苦瓜肽浓缩液；

S17、通过真空冷冻干燥方法对所述苦瓜肽浓缩液进行干燥，以获得苦瓜多肽蛋白含量不低于30%的苦瓜肽粉。

优选的，所述缓冲液为磷酸盐缓冲液。

5 优选的，所述平卧菊三七提取物的提取方法包括：

S21、挑选出无霉变、无斑点、病虫害的平卧菊三七植株整株，洗净后在温度为100℃的烘箱中烘60-90min后取出粉碎，并过30-50目筛；

S22、按重量比计，按照原料：酶：水=1：0.5：30的比例进行混合，记录混合体系总重量，且搅拌均匀，再对混合体系进行温度处理，以获得酶解体系；
10

所述温度处理过程包括：

升温至35-45℃，保温45-60min，降温至20-25℃，保温25-30min，并记录此时混合体系的第一重量数值；按照(总重量-第一重量)*50%补入含有去离子水和木质素酶的第一混合液，且按照重量比计，去离子水：木质素酶=1：0.03；补入第一混合液后，升温至50-55℃，保温60-75min，
15 降温至35-55℃，保温30-35min，并记录此时混合体系的第二重量数值；按照(总重量-第二重量)*50%补入含有去离子水和纤维素酶的第二混合液，且按照重量比计，去离子水：纤维素酶=1：0.05；补入第二混合液后，升温至55-60℃，保温45-60min，降温至35-40℃，保温30-40min，
20 并记录此时混合体系的第三重量数值；按照(总重量-第三重量)*50%补入含有去离子水和果胶酶的第三混合液，且按照重量比计，去离子水：果胶酶=1：0.04；补入第三混合液后，升温至45-50℃，保温60-70min，降温至20-25℃，保温30-35min；

S23、对所述酶解体系进行过滤，以分离出第一滤液以及第一滤渣；

25 S24、按重量比计，在所述第一滤渣中加入其重量20-25倍的体积分数为60%的乙醇溶液进行超声提取，且超声功率为100KW，超声提取温度为30-35℃，超声提取时间为35-45min；超声提取完成后进行抽滤，以得到第二滤液和第二滤渣；

按重量比计，再在所述第二滤渣中加入其重量15-20倍的体积分数为

60%的乙醇溶液再次进行超声提取，且超声功率为 100KW，超声提取温度为 30-35℃，超声提取时间为 20-30min；超声提取完成后再次进行抽滤，以得到第三滤液和第三滤渣；

将第一滤液、第二滤液以及第三滤液合并，以获得平卧菊三七提取物
5 粗提液；

S25、将所述平卧菊三七提取物粗提液经模拟移动床色谱进行分离提纯，得到平卧菊三七提取液；再使用真空浓缩器对平卧菊三七提取液进行浓缩，其中，浓缩温度为 70-75℃，以得到平卧菊三七提取物浓缩液；再对平卧菊三七提取物浓缩液进行喷雾干燥，喷雾干燥机组的进风温度
10 120-130℃，出风温度 40-50℃，最终得到所述平卧菊三七提取物成品。

本发明还提供一种活化胰岛素及治疗糖尿病的复合苦瓜肽口服药的制备方法，包括：

S100、制备苦瓜肽粉以及平卧菊三七提取物；

S200、按照上述组分用量称取各组分；

15 S300、将所述重量份的西洋参、黄芪、灵芝粉、山药粉、麦麸、番石榴叶粉、洋葱提取物、薏苡仁、荷叶、枸杞在水中浸泡 5-8h，且用于浸泡的水的重量为西洋参、黄芪、灵芝粉、山药粉、麦麸、番石榴叶粉、洋葱提取物、薏苡仁、荷叶、枸杞总重量的 5-8 倍，然后加热至煮沸，煮沸状态持续 1-2h 后过滤，以获得第一过滤液以及第一过滤渣；

20 S400、对所述第一过滤渣进行干燥，干燥后的第一过滤渣中加入其重量 2-3 倍的体积分数为 70%的乙醇，浸泡 1-2h 后加热至 55℃-65℃，浸提 1.5-2h，浸提过程中每 10min 搅拌一次，搅拌速率为 200-250 转/min；然后在 6-9℃条件下静置 24h，通过过滤分离获得第二过滤液和第二过滤渣；

25 S500、在第二过滤渣中加入其重量 0.8-1 倍的体积分数为 70%的乙醇浸泡 3-5h，加热至 60℃-70℃，浸提 2.5-3h，每次 1-2 小时，然后在 6-9℃条件下静置 24h，通过过滤分离获得第三过滤液和第三过滤渣；合并第一过滤液、第二过滤液以及第三过滤液，以获得液体原料；

S600、将所述液体原料经截流分子量为 6000-10000Da 的超滤膜进行

超滤或通过硅藻土进行过滤，再在所述原料过滤液中加入苦瓜肽粉、平卧菊三七提取物，以获得原料混合物，再将所述原料混合物置于减压浓缩罐中，加热至 50-60℃ 进行真空减压浓缩，以获得 80℃ 时相对密度为 1.10-1.15 的浓缩液；

- 5 S700、将浓缩液置于配液罐中，再向配液罐内加入权利要求 1 所述重量份的魔芋葡甘聚糖和低聚木糖，搅拌均匀后加热煮沸，最终 60℃ 下相对密度为 1.05-1.10 的口服药。

优选的，步骤 S600 中，在加入苦瓜肽粉、平卧菊三七提取物前，先将所述液体原料通过硅藻土进行过滤。

- 10 优选的，步骤 S600 中，在将浓缩液置于配液罐前，先将浓缩液置于 4℃ 以下静置 36h 以上，并在转速 15000-18000 转/min 条件下离心 3-5min。

- 本发明与现有技术相比具有的有益效果是：本发明通过阶段性升温、反复酶解以及多重过滤的提取工艺，使得苦瓜肽中苦瓜多肽蛋白含量不低于 20%，以及通过阶段性升温和反复超声提取的方式获得平卧菊三七提
15 取物，由此可大幅提高苦瓜多肽蛋白以及平卧菊三七提取物的生产效率和纯度，进一步的，苦瓜肽与其他组分复配使用后，其具有明显的降血糖、降血压血脂、减肥等功效，并且可使得使用者摆脱使用化学药物降糖所带来的副作用。

具体实施方式

- 20 下面结合实施例对本发明进一步说明。

应当理解，本文所使用的诸如“具有”、“包含”以及“包括”术语并不配出一个或多个其它元件或其组合的存在或添加。

需要说明的是，下述实施方案中所述试验方法，如无特殊说明，均为常规方法，所述试剂和材料，如无特殊说明，均可从商业途径获得。

- 25 **实施例 1**

按重量份计，本实施例中的活化胰岛素及治疗糖尿病的复合苦瓜肽口服药包括：苦瓜肽粉 20 份、西洋参 4 份、黄芪 10 份、灵芝粉 3 份、山药粉 8 份、麦麸 10 份、番石榴叶粉 10 份、洋葱提取物 5 份、枸杞 5 份、平卧菊三七提取物 12 份、薏苡仁 1 份、魔芋葡甘聚糖 5 份、荷叶 8 份、低

聚木糖 5 份。

进一步的, 所述苦瓜肽的制备方法包括如下步骤:

S11、取新鲜苦瓜、干燥苦瓜、苦瓜籽中的一项或几项作为苦瓜原料, 加入苦瓜原料重量 5 倍的去离子水, 并在 25℃ 水温下浸泡 10.5h, 取出再用去离子水冲洗 2-3 遍, 以去除农残药残以及杂质;

S12、将冲洗后的苦瓜原料风干干燥, 取出打碎磨浆, 得到苦瓜浆液;

S13、取苦瓜浆液以及缓冲液(所述缓冲液为包含有酸、碱、盐等试剂的缓冲体系, 如磷酸盐缓冲液)进行混合, 以获得混合体系, 按重量比计, 按照苦瓜浆液: 缓冲液=1:4; 记录混合体系总体积数值, 将 pH 值调节为 6.8-7 后对混合体系进行温度处理, 以获得浸提物;

其中, 所述温度处理过程包括:

升温至 50℃, 保温 55min, 降温至 22℃, 保温 28min, 并记录此时液体的第一体积数值; 因在前述升温、保温过程中, 其反应体系内的水、酸等会被蒸发, 有可能会影响其中酸、碱以及无机离子的溶解度产生变化, 从而影响浸提效果, 因此, 在前述升温、保温过程后, 需按照(总体积-第一体积)*60%补入含有去离子水和所述缓冲液的第一混合液, 且按照重量比计, 去离子水: 缓冲液=4: 1, 由此对水、酸等蒸发后的反应体系进行补偿, 使反应体系始终处于较优的浸提环境中; 补入第一混合液后, 升温至 65℃, 保温 65min, 降温至 50℃, 保温 32min, 并记录此时液体的第二体积数值; 按照(总体积-第二体积)*75%补入含有去离子水和缓冲液的第二混合液, 且按照重量比计, 去离子水: 缓冲液=3: 1, 该次升温、保温的温度相较第一次而言有所提高, 因此, 反应体系内的水、酸等的蒸发效果更为明显, 因此此次补入的第二混合液的比例要有所上升(增加到 75%), 且第二混合液中缓冲液的比例有所增加; 补入第二混合液后, 升温至 85℃, 保温 80min, 降温至 70℃, 保温 40min;

本步骤中, 通过阶段性的升温、保温, 可使得组分的细胞结构(如细胞壁等)组成在不同的温度变化环境下被反复冲击、破坏, 同时, 每一升温、保温阶段结束后补充相应比例的水以及缓冲液, 由此对水、酸等蒸发后的反应体系进行补偿, 使反应体系始终处于较优的浸提环境中, 以达到

最佳的浸提效果；

S14、将浸提物温度降至 20-25℃后对所述浸提物进行酶解，以获得
苦瓜肽酶解体系；其中，所述酶解过程包括：

第一次酶解：将浸提物的 pH 值调节至 7.0，按浸提物重量的 5%加入
5 胰蛋白酶，80-100 转/min 条件下搅拌，且搅拌的同时升温至 37℃，保温
55min 后得到第一酶解体系；

第二次酶解：待第一酶解体系温度降至 20-25℃后，再调整其 pH 值
至 3.5，按第一酶解体系重量的 3%加入果胶酶，80-100 转/min 条件下搅
拌，且搅拌的同时升温至 50℃，保温 50min 后得到第二酶解体系；

10 第三次酶解：待第二酶解体系温度降至 20-25℃后，再调整其 pH 值
至 4.7，按第二酶解体系重量的 2%加入纤维素酶，80-100 转/min 条件下
搅拌，且搅拌的同时升温至 58℃，保温 35min 后得到第三酶解体系；

由于本发明中的组分多为植物组分，其细胞结构中包含有细胞壁，因
此，本步骤中，通过在不同阶段采用不同的酶及酶解条件对细胞壁进行充
15 分酶解，使细胞壁中的纤维素、果胶等成分破坏殆尽，可使得细胞壁内的
有效成分(如苦瓜多肽蛋白)得以充分释放，以提高其提取效率；

S15、待步骤 S14 中的酶解过程完成后，对获得的第三酶解体系升温
至 90℃，维持 10min，以完成灭酶活过程，获得苦瓜肽粗提体系；再在
所述苦瓜肽粗提体系中按其重量的 4-5%加入活性炭，搅拌均匀，在 65℃
20 下保温 75min 后离心，去沉渣后获得苦瓜肽粗提液；

将所述苦瓜肽粗提液经硅藻土过滤，以得到苦瓜肽清液，且过滤压力
为 0.25MPa；再在所述苦瓜肽清液中按其重量加入 4-5%的活性炭，静置
45-50min 后离心，去沉渣；

通过上述活性炭、硅藻土的吸附处理，苦瓜肽酶解液中的色素、悬浮
25 颗粒以及胶体等杂质，使最后获得的成品纯度更高；

S16、将去沉渣后的苦瓜肽清液经过滤孔径为 0.5-0.8μm 的微滤陶瓷
膜进行过滤，过滤温度为 60℃，以获得微滤膜透过液；进一步的，所述
微滤陶瓷膜采用三支膜并联使用；

再将所述微滤膜透过液经截留分子量为 100-200kDa 卷式超滤膜进行

过滤，除去大分子杂质，操作温度控制在 55-65℃，以获得超滤膜透过液；其中，卷式超滤膜为能截留分子量为 100-200kDa 的卷式超滤膜，且所述卷式超滤膜采用两支膜并联使用；

再将所述超滤膜透过液经截留分子量为 150-1000Da 的卷式高压反渗透膜进行浓缩，以除去水分及部分残留无机盐和小分子杂质，浓缩温度在 40℃ 以下，以得到苦瓜肽浓缩液，且苦瓜肽浓缩液的固形物含量 $\geq 40\%$ ；其中，卷式高压反渗透膜系统为高压浓缩膜，具体由(PS)聚砜或(PFS)聚醚砜材料等复合材料膜制成，且采用四支膜串联使用；

该步骤中采用多层次的膜分离纯化技术分离纯化苦瓜多肽蛋白，其浓缩温度低，有效保证苦瓜蛋白多肽的天然活性及其高含量；

S17、通过真空冷冻干燥方法对所述苦瓜肽浓缩液进行干燥，以获得苦瓜多肽蛋白含量不低于 30% 的苦瓜肽粉。

此外，平卧菊三七含有生物碱、香豆素类、黄酮类、苯并呋喃、多糖、有机酸等多种活性成分，有明显的降糖降脂作用，因此，本发明中还提供了一种平卧菊三七提取物的制备方法，其具体包括：

S21、挑选出无霉变、无斑点、病虫害的平卧菊三七植株整株，洗净后在温度为 100℃ 的烘箱中烘 75min 后取出粉碎，并过 30-50 目筛；

S22、按重量比计，按照原料：酶：水=1：0.5：30 的比例进行混合，记录混合体系总重量，且搅拌均匀，再对混合体系进行温度处理，以获得酶解体系；

所述温度处理过程包括：

升温至 40℃，保温 50min，降温至 20-25℃，保温 25-30min，并记录此时混合体系的第一重量数值；按照(总重量-第一重量)*50%补入含有去离子水和木质素酶的第一混合液，且按照重量比计，去离子水：木质素酶=1：0.03；补入第一混合液后，升温至 52℃，保温 65min，降温至 45℃，保温 30-35min，并记录此时混合体系的第二重量数值；按照(总重量-第二重量)*50%补入含有去离子水和纤维素酶的第二混合液，且按照重量比计，去离子水：纤维素酶=1：0.05；补入第二混合液后，升温至 55-60℃，保温 50min，降温至 37℃，保温 35min，并记录此时混合体系的第三重量

数值；按照(总重量-第三重量)*50%补入含有去离子水和果胶酶的第三混合液，且按照重量比计，去离子水：果胶酶=1：0.04；补入第三混合液后，升温至45-50℃，保温60-70min，降温至20-25℃，保温30-35min；

类似的，本步骤中通过阶段性的升温、保温，可使得组分的细胞结构(如细胞壁等)组成在不同的温度变化环境下被反复冲击、破坏，同时，每一升温、保温阶段结束后补充相应比例的水以及不同种类的酶，由此对水、酸等蒸发后的反应体系进行补偿，且使得细胞壁组分在各种条件下被充分分解，有利于平卧菊三七细胞壁内有效成分的充分释放；

S23、所述酶解体系进行过滤，以分离出第一滤液以及第一滤渣；

10 S24、按重量比计，在所述第一滤渣中加入其重量20-25倍的体积分数为60%的乙醇溶液进行超声提取，且超声功率为100KW，超声提取温度为32℃，超声提取时间为35-45min；超声提取完成后进行抽滤，以得到第二滤液和第二滤渣；

按重量比计，在第二滤渣中加入其重量18倍的体积分数为60%的乙醇溶液再次进行超声提取，且超声功率为100KW，超声提取温度为30-35℃，超声提取时间为25min；超声提取完成后再次进行抽滤，分别得到第三滤液和第三滤渣；

将第一滤液、第二滤液以及第三滤液合并，以获得平卧菊三七提取物粗提液；

20 S25、将平卧菊三七提取物粗提液经模拟移动床色谱进行分离提纯，得到平卧菊三七提取液；其中，按重量份计，所述模拟移动床色谱填充的吸附剂包括：大孔吸附树脂5-8份；作为解吸剂的体积分数为60%的乙醇溶液15-20份；作为树脂吸附再生溶剂的95%乙醇溶液5-10份；且洗脱速度为1-2BV/h，温度为50℃-60℃，压力为0.5-0.6MPa；

25 再使用真空浓缩器对平卧菊三七提取液进行浓缩，其中，浓缩温度为70-75℃以得到平卧菊三七提取物浓缩液；再在对平卧菊三七提取物浓缩液进行喷雾干燥，喷雾干燥机组的进风温度125℃，出风温度45℃，最终得到平卧菊三七提取物成品。

由此，通过对滤渣的反复提取以及结合模拟移动床色谱分离，可大幅

提高所述平卧菊三七提取物的纯度和浓度，使其具备显著的降血糖效果。

实施例 2

本实施例与实施例 1 的不同之处仅在于，按重量份计，本实施例中的活化胰岛素及治疗糖尿病的复合苦瓜肽口服药由以下组分组成：苦瓜肽粉 30 份、西洋参 6 份、黄芪 12 份、灵芝粉 5 份、山药粉 10 份、麦麸 15 份、番石榴叶粉 12 份、洋葱提取物 10 份、枸杞 10 份、平卧菊三七提取物 15 份、薏苡仁 2 份、魔芋葡甘聚糖 8 份、荷叶 10 份、低聚木糖 8 份。

实施例 3

本实施例与实施例 1 的不同之处仅在于，按重量份计，本实施例中的活化胰岛素及治疗糖尿病的复合苦瓜肽口服药由以下组分组成：苦瓜肽粉 25 份、西洋参 5 份、黄芪 11 份、灵芝粉 4 份、山药粉 9 份、麦麸 12 份、番石榴叶粉 11 份、洋葱提取物 7 份、枸杞 8 份、平卧菊三七提取物 13 份、薏苡仁 1.5 份、魔芋葡甘聚糖 7 份、荷叶 9 份、低聚木糖 7 份。

<苦瓜肽分子量检测结果>

采用申请号 201710832199.8(“一种全程低温生产苦瓜多肽蛋白提取物的新方法、苦瓜多肽蛋白提取物及其应用”)的专利申请中实施例 1 所述的方法提取苦瓜肽，以作为对比例 1，将其与通过本发明实施例 1-3 中的苦瓜肽粉制备方法制备获得的苦瓜肽粉进行高效凝胶过滤色谱法检测，以获得苦瓜肽分子量大小及分布范围，其结果如表 1 所示。

表 1 苦瓜肽分子量大小及分布范围

分子量范围 (Da)	峰面积百分比(%, λ220nm)				数均分子量				重均分子量			
	对比 例 1	实施 例 1	实施 例 2	实施 例 3	对比 例 1	实施 例 1	实施 例 2	实施 例 3	对比 例 1	实施 例 1	实施 例 2	实施 例 3
>7000	16.35	9.45	9.79	9.86	9623	8131	8268	8311	9799	8199	8615	8562
7000-5000	22.66	32.64	33.52	33.69	6721	6215	6452	6141	6878	6477	6547	6458
5000-3000	14.32	19.31	19.99	20.58	4520	4202	4321	4158	4625	4325	4475	4341
3000-1000	21.47	25.91	23.43	25.01	1652	2852	2745	2902	2978	2752	2872	2958
<1000	25.20	12.69	13.27	10.86	879	756	744	698	903	812	805	789

由此可见，本发明的苦瓜肽粉制备方法中，首先通过阶段性的升温、保温，可使得组分的细胞结构(如细胞壁等)组成在不同的温度变化环境下

被反复冲击、破坏，同时，每一升温、保温阶段结束后补充相应比例的水以及缓冲液，由此对水、酸等蒸发后的反应体系进行补偿，使反应体系始终处于较优的浸提环境中，进一步再进行阶段性升温、反复酶解以及多层次的膜分离纯化技术提取工艺来制备苦瓜多肽蛋白，使得到的苦瓜多肽提取物中苦瓜多肽蛋白的含量高于 30%，且提取物产品中不含大豆蛋白多肽等其他非苦瓜来源的多肽蛋白。从表 1 中可以看出，本发明制备获得的 5000-7000Da 范围内的苦瓜多肽片段占比接近 30%，而 5000-7000Da 范围内的苦瓜多肽片段正是具有调节血糖功能、片段大小最接近胰岛素分子量的片段，因此得到的苦瓜多肽提取物具有非常好的调控血糖代谢效果，尤其是可大幅度提高胰岛素受体的结合能力及降血糖的效果。

<平卧菊三七提取物检测结果>

在晒干的平卧菊三七中加入其重量 5 倍的质量分数为 95% 的乙醇进行回流提取，回流提取的温度为 80℃，回流 3 次，每次 4 小时，合并 3 次得到的提取液，再将所述提取液在压力为 0.5MPa 过滤，过滤后对滤液进行喷雾干燥，喷雾干燥时进风温度为 120℃，出风温度为 80℃，以得到做为对比例 2 的粉状平卧菊三七提取物，再将其通过本发明实施例 1-3 中的制备方法获得的平卧菊三七提取物进行检测，以获得绿原酸、黄酮及多糖的含量及纯度，其结果如表 2 所示。

表 2 平卧菊三七提取物绿原酸、黄酮及多糖含量及得率

	绿原酸 (mg/g)		黄酮 (mg/g)		多糖 (mg/g)	
	含量 (mg/g)	纯度 (%)	含量 (mg/g)	纯度 (%)	含量 (mg/g)	纯度 (%)
对比例 2	1.72±0.58	56.2	1.57±0.85	61.7	11.43±1.25	63.4
实施例 1	3.64±0.48	79.6	4.23±0.92	85.6	16.51±2.12	78.4
实施例 2	3.59±0.15	83.6	4.52±0.18	83.4	15.21±1.45	83.1
实施例 3	3.45±0.68	82.7	4.38±0.39	84.6	15.87±0.85	82.7

20

从表 2 中可以看出，采用本发明中的方法制备所述平卧菊三七提取物，其绿原酸、黄酮及多糖的含量及纯度相对于对比例 2 而言均有显著提高，其中，绿原酸、黄酮及多糖的含量最高可分别达到 3.64mg/g、4.52mg/g 以及 16.51mg/g，纯度最高可分别达到 83.6%、85.6% 和 83.1%。其原因在于，本步骤中通过阶段性的升温、保温，可使得组分的细胞结构(如细

25

胞壁等)组成在不同的温度变化环境下被反复冲击、破坏,同时,每一升温、保温阶段结束后补充相应比例的水以及不同种类的酶,由此对水、酸等蒸发后的反应体系进行补偿,且使得细胞壁组分在各种条件下被充分分解,有利于平卧菊三七细胞壁内有效成分的充分释放,进一步的,结合超声提取、滤渣的反复提取,可使得原料被充分利用,提高活性成分的得率,并且通过模拟移动床色谱的分离提纯保证成分纯度,使其充分发挥其各自功效。

实施例 4

本实施例还提供了一种活化胰岛素及治疗糖尿病的复合苦瓜肽口服药的制备方法,其包括:

S100、按照实施例 1-3 之一所述苦瓜肽粉以及平卧菊三七提取物的制备方法分别制备所述苦瓜肽粉以及平卧菊三七提取物;

S200、按照实施例 1-3 之一所述复合苦瓜肽口服药中的组分用量称取各组分;

S300、将所述重量份的西洋参、黄芪、灵芝粉、山药粉、麦麸、番石榴叶粉、洋葱提取物、薏苡仁、荷叶、枸杞在水中浸泡 6h,且用于浸泡的水的重量为西洋参、黄芪、灵芝粉、山药粉、麦麸、番石榴叶粉、洋葱提取物、薏苡仁、荷叶、枸杞总重量的 7 倍,然后加热至煮沸,煮沸状态持续 1-2h 后过滤,以获得第一过滤液以及第一过滤渣;

S400、对所述第一过滤渣进行干燥,干燥后的第一过滤渣中加入其重量 2-3 倍的体积分数为 70% 的乙醇,浸泡 1-2h 后加热至 60℃,浸提 1.5-2h,浸提过程中每 10min 搅拌一次,搅拌速率为 220 转/min;然后在 6-9℃ 条件下静置 24h,通过过滤分离获得第二过滤液和第二过滤渣;

S500、在第二过滤渣中加入其重量 0.8-1 倍的体积分数为 70% 的乙醇浸泡 3-5h,加热至 60℃-70℃,浸提 2.5-3h,每次 1-2 小时,然后在 6-9℃ 条件下静置 24h,通过过滤分离获得第三过滤液和第三过滤渣;合并第一过滤液、第二过滤液以及第三过滤液,以获得液体原料;

S600、将所述液体原料经截流分子量为 6000-10000Da 的超滤膜进行超滤或通过硅藻土进行过滤,再在所述原料过滤液中加入苦瓜肽粉、平卧

菊三七提取物,以获得原料混合物,再将所述原料混合物置于减压浓缩罐中,加热至 55℃进行真空减压浓缩,以获得 80℃时相对密度为 1.10-1.15 的浓缩液;

S700、将浓缩液置于配液罐中,再向配液罐内加入实施例 1-3 之一所述重量份的魔芋葡甘聚糖和低聚木糖,搅拌均匀后加热煮沸,最终 60℃下相对密度为 1.05-1.10 的口服药。

<降血糖功效评价试验>

选取健康的雄性小鼠 120 只,编号后在正常环境中适应性饲养 2 周,自由进食饮水。适应性饲养结束后,选 10 只作为空白对照组。其余只用
10 剂量 200mg/kg 腹腔注射 5%链脲佐菌素,2h 之内如果有昏迷现象饲喂葡萄糖糖水直至清醒,2 天以后,测定空腹血糖,取血糖值在 10 以上的作为糖尿病动物模型。

各组小鼠按照以下方式进行处理:空白组:自由进食饮水;糖尿病模型组:自由进食饮水;阳性对照组:按照给药剂量为 15mg/kg·d 饲喂罗格列酮进行治疗;高剂量组:按给药剂量为 2g/kg·d 给予本发明的复合苦瓜肽口服药(以下均为“复合苦瓜肽口服药”)进行治疗,自由进食饮水;中剂量组:按给药剂量为 1g/kg·d 给予本发明的复合苦瓜肽口服药进行治疗,自由进食饮水;低剂量组:按给药剂量为 0.5g/kg·d 给予本发明的复合苦瓜肽口服药进行治疗,自由进食饮水。实验过程中每天对各个组份的小鼠
20 进行腹腔注射给药,连续 15 天后,对小鼠禁食 8h 测定空腹血糖值。实验结束,记录最终血糖含量,结果如表 3 所示。

表 3 复合苦瓜肽口服药对小鼠血糖影响

组别		小鼠数量(只)	空腹血糖值(mmol/L)
空白对照组		20	5.41±0.63
模型组		20	15.16±2.28
阳性对照组		20	7.24±0.85
低剂量组	实施例 1	20	8.52±1.25
	实施例 2	20	8.23±1.32
	实施例 3	20	7.94±1.41
中剂量组	实施例 1	20	7.53±1.38
	实施例 2	20	7.64±1.44
	实施例 3	20	7.42±1.20

高剂量组	实施例 1	20	5.69±0.92
	实施例 2	20	5.54±0.87
	实施例 3	20	5.56±0.98

结果表明, 模型组空腹血糖值明显高于空白对照组, 低、中、高剂量组空腹血糖值明显低于模型组, 尤其是高剂量组, 其可以降低血糖将至空白对照组水平, 即接近正常血糖水平, 说明本发明中的复合苦瓜肽口服药对

5 糖尿病小鼠有明显的降血糖作用。

<降糖化血红蛋白功效评价试验>

选取健康的雄性大鼠 240 只, 体重为 180~220g, 适应性喂养一周。将适应性喂养后的合格大鼠随机分为 12 组。选 20 只为空白对照组, 其余大鼠给予灌胃高脂乳剂 10mL/kg, 每天 1 次, 连续 2 个月, 末次灌胃后大

10 鼠禁食不禁水 12h, 一次性腹腔注射链脲佐菌素 STZ 溶液 30mg/kg 建立糖尿病大鼠模型。

空白对照组腹腔注射等剂量柠檬酸—柠檬酸钠缓冲液。注射链脲佐菌素 72h 后, 大鼠禁食不禁水 12h, 尾部取血, 检测空腹血糖, 空腹血糖 $\geq 7.0\text{mmol/L}$ 为造模成功的大鼠。

15 各组大鼠按照以下方式进行处理: 空白组: 自由进食饮水; 糖尿病模型组: 自由进食饮水; 阳性对照组: 按照给药剂量为 $0.15\text{g/kg}\cdot\text{d}$ 饲喂二甲双胍进行治疗; 高剂量组: 按给药剂量为 $3.6\text{g/kg}\cdot\text{d}$ 给予本发明的复合苦瓜肽口服药进行治疗, 自由进食饮水; 中剂量组: 按给药剂量为 $1.8\text{g/kg}\cdot\text{d}$ 给予本发明的复合苦瓜肽口服药进行治疗, 自由进食饮水; 低剂量组: 按

20 给药剂量为 $0.9\text{g/kg}\cdot\text{d}$ 给予本发明的复合苦瓜肽口服药进行治疗, 自由进食饮水。实验过程中每天对各个组份的大鼠进行腹腔注射给药, 连续 15 天后, 对大鼠禁食 8h 测定糖化血红蛋白含量, 结果如表 4 所示。

表 4 复合苦瓜肽口服药对大鼠糖化血红蛋白含量影响

组别		大鼠数量 (只)	糖化血红蛋白含量 (ng/mL)
空白对照组		20	27.54±3.41
模型组		20	48.69±3.43
阳性对照组		20	30.14±1.25
低剂量组	实施例 1	20	41.78±3.56
	实施例 2	20	41.30±1.83

	实施例 3	20	42.18±2.03
中剂量组	实施例 1	20	32.80±1.69
	实施例 2	20	32.14±2.77
	实施例 3	20	32.48±3.19
高剂量组	实施例 1	20	28.65±3.91
	实施例 2	20	29.20±0.42
	实施例 3	20	29.18±0.34

结果表明：给药前，造模大鼠糖化血红蛋白高于空白对照组，表明造模成功。给药后各剂量组糖化血红蛋白较治疗前和模型对照组均显著降低（最多可降低 41.2%），说明本发明的复合苦瓜肽对糖尿病大鼠有明显的降糖化血红蛋白作用。

<减肥功效评价试验>

根据实验要求，选取健康的雄性小鼠 120 只，分为 6 组，体重为 18.5g~28.5g，平均体重 23.8g；选取健康雄性大鼠 120 只，分为 6 组，体重为 185.5g~225.3g，平均为 223.7g。

根据实验需求将小鼠、大鼠分为以下变量组，其中，空白对照组：按照小鼠饲料为普通饲料 4g/只·天，大鼠饲料为普通鼠料 30g/只·天饲喂，自由饮水；模型组：按照小鼠饲料为 2g 高脂饲料+2g 普通饲料/只·天，大鼠饲料为 15g 高脂饲料+15g 普通鼠料/只·天饲喂，自由饮水；阳性对照组：按照每 1kg 高脂饲料添加 10mg 洛伐他汀，在高脂饲料中加入洛伐他汀，自由饮水；高剂量组：按照小鼠饲料为 2g 高脂饲料+2g 本发明复合苦瓜肽口服药+1g 普通饲料/只·天，大鼠饲料为 15g 高脂饲料+10g 本发明复合苦瓜肽口服药+10g 普通鼠料/只·天饲喂，自由饮水；中剂量组：按照小鼠饲料为 2g 高脂饲料+1.5g 本发明复合苦瓜肽口服药+1g 普通饲料/只·天，大鼠饲料为 15g 高脂饲料+8g 本发明复合苦瓜肽口服药+10g 普通鼠料/只·天饲喂，自由饮水；低剂量组：按照小鼠饲料为 2g 高脂+0.5g 本发明复合苦瓜肽口服药+1g 普通饲料/只·天，大鼠饲料为 15g 高脂饲料+5g 本发明复合苦瓜肽口服药+10g 普通鼠料/只·天饲喂，自由饮水。

30 天测量后各组小鼠大鼠的体重情况，结果如表 5 所示。

表 5 复合苦瓜肽口服药对小鼠大鼠体重影响

组别		数量（只）		体重（克/只）	
		小鼠	大鼠	小鼠	大鼠
空白对照		10	10	29.5±4.1	248.3±2.6
模型组		10	10	34.5±3.4	296.7±4.1
阳性对照组		10	10	33.9±2.3	255.2±3.5
低剂量组	实施例 1	10	10	32.9±2.6	275.7±4.2
	实施例 2	10	10	31.3±2.4	278.3±5.1
	实施例 3	10	10	32.1±2.4	276.8±3.3
中剂量组	实施例 1	10	10	31.4±2.9	261.4±4.2
	实施例 2	10	10	30.9±1.8	259.2±3.8
	实施例 3	10	10	31.2±3.3	262.7±3.3
高剂量组	实施例 1	10	10	30.8±2.8	250.2±4.2
	实施例 2	10	10	30.2±2.7	248.7±6.1
	实施例 3	10	10	30.9±2.1	251.4±3.8

从表 5 中可以看出, 小鼠和大鼠在实验的第 30 天后, 模型组小鼠体重明显上升, 显著高于空白对照组和低、中、高剂量组。且低剂量组与高剂量组相比较模型组均有显著的降低。说明本发明中的复合苦瓜肽口服药对肥胖小鼠大鼠具有明显的减肥效果。

5 <胰岛素受体结合能力功效评价试验>

选取健康大鼠 240 只, 体重约在 160-200g, 雌雄各半, 给予自由进食饮水, 稳定饲养一周, 期间取血测空腹血糖 2 次, 以血糖 3.6-5.4mmol/L 为入选动物标准, 其中 20 只作为正常对照备用, 其余用四氧嘧啶造模(剂量 15mg/100g 体重), 造模后 7-10 天复测空腹血糖, 以大于 13.8mmol/L 作为模型成功大鼠。

各组大鼠按照以下方式进行处理: 空白组: 自由进食饮水; 糖尿病模型组: 自由进食饮水; 阳性对照组: 按照给药剂量为 0.15g/kg·d 饲喂二甲双胍进行治疗; 高剂量组: 按给药剂量为 3.6g/kg·d 给予本发明的复合苦瓜肽口服药进行治疗, 自由进食饮水; 中剂量组: 按给药剂量为 1.8g/kg·d 给予本发明的复合苦瓜肽口服药进行治疗, 自由进食饮水; 低剂量组: 按

给药剂量为 0.9g/kg·d 给予本发明的复合苦瓜肽口服药进行治疗，自由进食饮水。实验过程中每天对各个组份的大鼠进行腹腔注射给药，连续 15 天后，对大鼠禁食 8h 测定血清胰岛素含量，结果如表 6 所示。

表 6 复合苦瓜肽口服药对大鼠血清胰岛素值影响

组别		大鼠数量（只）	血清胰岛素值（mu/L）
空白对照组		20	31.4±6.5
模型组		20	18.3±5.0
低剂量组	实施例 1	20	25.2±5.5
	实施例 2	20	22.1±10.1
	实施例 3	20	22.3±10.2
中剂量组	实施例 1	20	23.2±5.5
	实施例 2	20	26.4±6.8
	实施例 3	20	24.6±7.0
高剂量组	实施例 1	20	24.1±10.1
	实施例 2	20	28.4±4.3
	实施例 3	20	27.0±8.3

5 表 6 结果表明，模型组血清胰岛素水平明显低于空白对照组，说明四氧嘧啶对胰岛β-细胞造成了一定损伤。低、中、高剂量组胰岛素水平明显高于模型组，说明本发明中的复合苦瓜肽口服药对受损的胰岛β-细胞有一定的修复作用，能促进胰岛素分泌量增加，提高胰岛素受体结合能力，加强降血糖作用。

10 <降血脂功效评价试验>

 选取健康的雌性大鼠 240 只，编号后在正常环境中适应性饲养 2 周，自由进食饮水。适应性饲养结束后，随机分为 12 组，每组 20 只，分别为空白对照组、模型组、阳性对照组(辛伐他汀)、高剂量组、中剂量组，低剂量组。除空白对照组，其余各组均采用高脂饲料。建模 3 周后以每天灌胃量为大鼠体重的 2%将复合苦瓜肽口服药以及辛伐他汀配制成相应浓度的溶液。其中，低剂量组：灌胃 25mg/kg bw·d；中剂量组：灌胃 50mg/kg bw·d；高剂量组：灌胃 100mg/kg bw·d；阳性对照组：灌胃辛伐他汀 50mg/kg bw·d；空白对照组：相应体积蒸馏水。连续喂养 10 周后，末次喂养后。禁食不禁水 10h，主动脉取血测血清中总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)的浓

度，检测结果如表 7 所示。

表 7 复合苦瓜肽口服药对大鼠血清脂质影响

组别		大鼠数量（只）	TC(mmol/L)	TG(mmol/L)
空白对照组		20	1.79±0.25	0.34±0.18
模型组		20	3.41±0.58	0.57±0.18
阳性对照组		20	2.59±0.24	0.32±0.14
低剂量组	实施例 1	20	3.26±0.48	0.34±0.14
	实施例 2	20	3.15±0.34	0.31±0.17
	实施例 3	20	3.13±0.42	0.32±0.13
中剂量组	实施例 1	20	2.73±0.58	0.26±0.07
	实施例 2	20	2.79±0.61	0.27±0.09
	实施例 3	20	2.96±0.63	0.24±0.06
高剂量组	实施例 1	20	3.57±0.47	0.28±0.06
	实施例 2	20	3.64±0.49	0.29±0.04
	实施例 3	20	3.71±0.53	0.26±0.07

由表 7 可见，分别给予本发明高、中、低剂量的苦瓜多肽口服药可以显著降低大鼠血清 TG 和 TC 浓度(最多可分别下降 58%和 20%)，故本发明的复合苦瓜肽口服药具有降低血清中 TG 和 TC 作用，因此具有降血脂的功能。

需要说明的是，上述实施例 1 至 4 中的技术方案可进行任意组合，且组合后获得的技术方案均属于本发明的保护范围。

综上所述，本发明的苦瓜肽粉制备方法中，首先通过阶段性的升温、保温，可使得组分的细胞结构(如细胞壁等)组成在不同的温度变化环境下被反复冲击、破坏，同时，每一升温、保温阶段结束后补充相应比例的水以及缓冲液，由此对水、酸等蒸发后的反应体系进行补偿，使反应体系始终处于较优的浸提环境中，进一步再进行阶段性升温、反复酶解以及多层次的膜分离纯化技术提取工艺来制备苦瓜多肽蛋白和平卧菊三七提取物，使得到的苦瓜多肽提取物中苦瓜多肽蛋白的含量高于 30%，且提取物产品中不含大豆蛋白多肽等其他非苦瓜来源的多肽蛋白。从表 1 中可以看出，本发明制备获得的 5000-7000Da 范围内的苦瓜多肽片段占比接近

30%，而 5000-7000Da 范围内的苦瓜多肽片段正是具有调节血糖功能、片段大小最接近胰岛素分子量的片段，因此得到的苦瓜多肽提取物具有非常好的调控血糖代谢效果，尤其是可大幅度提高胰岛素受体的结合能力及降血糖的效果，以及有利于平卧菊三七细胞壁内有效成分的充分释放，进一步的，结合超声提取、滤渣的反复提取，可使得原料被充分利用，提高活性成分的得率，并且通过模拟移动床色谱的分离提纯保证成分纯度，使其充分发挥其各自功效。进一步的，苦瓜肽与其他组分复配(如人参、黄芪、灵芝粉、山药粉、葛根等)使用后，其具有明显的降血糖、血脂以及糖化血红蛋白，减肥等功效，并且可使得使用者摆脱使用化学药物降糖所带来的副作用。

这里说明的设备数量和处理规模是用来简化本发明的说明的。对本发明的应用、修改和变化对本领域的技术人员来说是显而易见的。尽管本发明的实施方案已公开如上，但其并不仅仅限于说明书和实施方式中所列运用，它完全可以被适用于各种适合本发明的领域，对于熟悉本领域的人员而言，可容易地实现另外的修改，因此在不背离权利要求及等同范围所限定的一般概念下，本发明并不限于特定的细节和这里示出与描述的实例。

20

25