

含有褐藻胶寡糖二酸的药用组合物

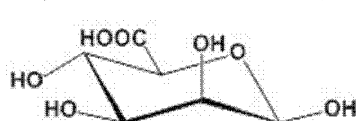
技术领域

- 5 本发明涉一种以褐藻胶寡糖二酸或其药学上可接受的盐为原料制备的药用组合物及其制备方法；属于医药技术领域。

背景技术

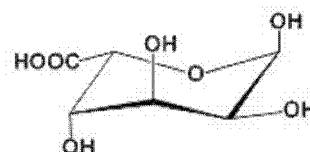
- 褐藻胶寡糖由于其潜在的药用价值已经受到广泛的重视。褐藻胶寡糖通常以海藻酸为原料经过多步骤制得。

在褐藻胶寡糖分子中，有由甘露糖醛酸（D-mannuronic acid）通过 β -1,4-糖苷键连接形成的 M 段、古罗糖醛酸（L-guluronic acid）通过 α -1,4-糖苷键连接形成的 G 段，以及由这两种糖杂合形成的 MG 段。甘露糖醛酸和古罗糖醛酸的结构式如下（I）式和（II）式所示：



M: β -D-甘露糖醛酸

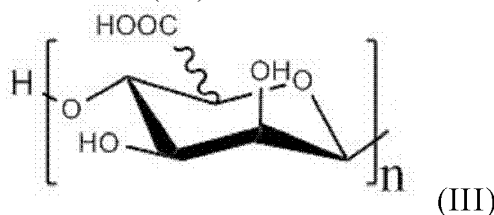
(I)



G: α - L - 古罗糖醛酸

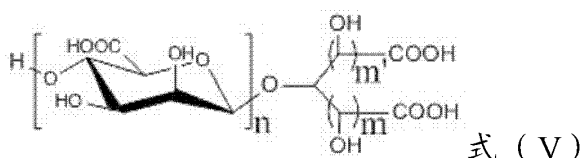
(II)

褐藻胶寡糖的结构式如下(III)式所示：



(III)

- 20 在先专利申请 CN201711467596.6 公开了一种甘露糖醛二酸寡糖组合，其包含具有式（V）的甘露糖醛二酸或其药学上可接受的盐：



其中 n 为选自 1-9 的整数, m 选自 0, 1 或 2, m' 选自 0 或 1, 并且其中,

$n=1-5$ 的甘露糖醛二酸的重量总和占所述组合总重量的 80-95%;

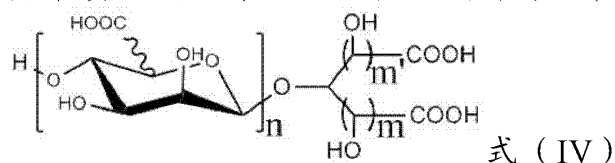
5 $n=1-3$ 的甘露糖醛二酸的重量总和与 $n=4-7$ 的甘露糖醛二酸重量总和的比例在 1.0-3.5 之间。

所述甘露糖醛二酸寡糖组合能够抑制细胞损伤, 保护神经细胞, 并且增加细胞存活率。具有潜在的预防和治疗阿尔茨海默病的作用。

10 为了获得在先专利公开的具有抗阿尔茨海默病和抗糖尿病的作用甘露寡糖二酸, 需将原料海藻酸中的古罗糖醛酸除去, 而海藻酸中古罗糖醛酸的含量通常在 30% 以上, 最高可达 70% 左右, 因此为了获得高纯度的甘露寡糖二酸, 实际生产成本非常之高。因此, 开发出适于使用的褐藻胶寡糖二酸的药用组合物符合本行业的迫切需要。

15 发明内容

本发明的一个方面提供一种药物组合物, 包含 40-90wt% 的褐藻胶寡糖二酸或其药学上可接受的盐, 结构如式 (IV) 所示, 和 8-50wt% 的填充剂; 其中填充剂选自淀粉类和/或纤维素类;



20 其中 n 为选自 1-9 的整数, m 选自 0, 1 或 2, m' 选自 0 或 1。并且其中,

$n=1-5$ 的褐藻胶寡糖二酸的重量总和占所述组合总重量的 60% 以上; 古罗糖醛酸二酸的重量总和占所述组合物重量的 50% 以下。

所述褐藻胶寡糖二酸是不同聚合度的甘露糖醛酸和古罗糖醛酸的混合物，其主要成分是由甘露糖醛酸通过 β -1,4-糖苷键连接形成的M段、古罗糖醛酸通过 α -1,4-糖苷键连接形成的G段，以及由这两种糖杂合形成的MG段，聚合度为2至10的寡糖。已知甘露糖醛二酸具有一定的抗阿尔茨海默病和抗糖尿病的药理活性。活性最高的糖为5-8糖，特别是6糖。但是，发明人发现，聚合度为2至10的甘露糖醛酸和古洛糖醛酸的寡糖二酸混合物，同样具有抗阿尔茨海默病和抗糖尿病的药理活性，但前提是需要将古洛糖醛酸的含量控制在一定范围内。也即，本发明无需将原料海藻酸中的含量为30%，甚至70%以上的古罗糖醛酸除去，以获得高纯度的甘露寡糖二酸。这样可以大大降低生产成本，在实际生产中更容易实现，更易于实现工业化大生产。

此外，褐藻胶寡糖二酸极具引湿性，在高温、强碱和氧化等条件下会大量分解。同时，由于甘露糖醛酸和古罗糖醛酸在处理过程中可能发生降解，产生对人体不利的甲酸杂质，因此，需要对原料进行质量控制，以获得具有高的安全性和有效性的口服制剂。本申请的发明人经研究开发出更稳定且可以快速溶出的褐藻胶寡糖二酸的新药用组合物。

本发明中使用的褐藻胶寡糖二酸或其药学上可接受的盐的纯度大于90%、优选大于95%、更优选大于98%。杂质来源较为复杂，经申请人研究发现，褐藻胶寡糖二酸制备过程中可能产生如下物质中的一种或多种：甲酸、乙醇酸、草酸、丙二酸、羟基丙二酸、酒石酸等等。不囿于任何理论，也不构成对本发明杂质种类的限制，这些杂质可能来源于氧化步骤，也可能来源于初始藻类原料中不易检测的杂质或对初始藻类原料的处理。发明人发现，这些杂质中，甲酸由于分子量小，更不易除去，且对制剂的稳定性有显著影响。因此，控制褐藻胶寡糖二酸或其药学上可接受的盐中甲酸含量是本发明的重要方面之一。不囿于任何理论，将制剂中活性成分的粒径控制在一定范围内

会获得更加稳定的制剂，产生的杂质甲酸含量更少。

本发明的另一个方面涉及一种药物组合物在制备用于治疗选自老年性痴呆、帕金森病、炎症、疼痛、糖尿病或血管性痴呆的药物中的用途。

- 5 本发明的再一个方面涉及一种治疗患有选自如下疾病的患者的方法：老年性痴呆、帕金森病、炎症、疼痛、糖尿病或血管性痴呆，该方法包括通过给予需要的患者单位剂量形式的本发明所述的药物组合物。

10 本发明的又一个方面涉及一种包含本发明所述的药物组合物的药物制剂。

本发明的另一个方面涉及一种本发明所述药物组合物的制备方法，包含以下步骤：

（1）按含有 40-90wt%褐藻胶寡糖二酸或其药学上可接受的盐和 8-50wt%的填充剂混合均匀；

- 15 （2）将混合均匀的物料制粒，以定量装入包装袋，或充填入胶囊，或压片，制得所述药物组合物；或将步骤（1）得到的混合均匀的物料直接压片得到所述药物组合物。

20 本发明的褐藻胶寡糖二酸或其盐的制剂具有优异的制剂稳定性，同时能够在体内环境下具有快速溶出的能力，能够使得褐藻胶寡糖二酸有效成分快速被人体吸收。另外，本发明人还通过制剂的组成设计克服了高载量的褐藻胶寡糖二酸在制备过程中产生的问题，包括制剂的均匀性，颗粒分布均一等。

附图说明

- 25 图 1 中间体核磁图谱。

图 2 是褐藻胶寡糖二酸原料药中二糖、三糖和四糖的质谱图。

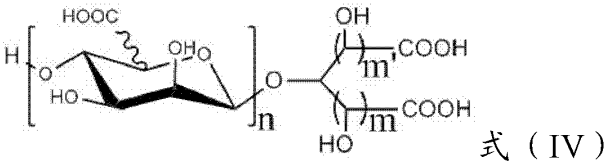
图 3 是褐藻胶寡糖二酸原料药中五糖、六糖和七糖的质谱图。

图 4 是褐藻胶寡糖二酸原料药中八糖、九糖和十糖的质谱图。
图 5 表示褐藻胶寡糖二酸原料药的核磁图谱。

具体实施方式

5 下文将对本发明的各个方面进行具体说明，但本发明并不限于这些具体的实施方式。本领域技术人员可以根据下文公开内容的实质对本发明进行一些修改和调整，这些调整也属于本发明的范围。

本发明提供一种药物组合物，包含 40-90wt% 的褐藻胶寡糖二酸
10 或其药学上可接受的盐，结构如式（IV）所示，和 8-50wt% 的填充剂；其中填充剂选自淀粉类、纤维素类中的至少一种；



其中 n 为选自 1-9 的整数，m 选自 0，1 或 2，m' 选自 0 或 1。

15 优选地，所述填充剂选自：干淀粉、玉米淀粉、预胶化淀粉、微晶纤维素、羧甲基纤维素钠、交联羧甲基纤维素钠中的至少一种。

优选地，本发明所述的药用组合物还含有 0-10wt% 的粘合剂和 0.1-3wt% 的润滑剂；其中粘合剂为淀粉浆、羧甲基纤维素钠、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮中的至少一种；润滑剂为润滑剂选自滑石粉、硬脂酸镁、微粉硅胶、氢化植物油中的至少一
20 种。

优选地，本发明所述的药物组合物包含：60-75wt% 的褐藻胶寡糖二酸或其药学上可接受的盐，25-35wt% 的填充剂，1-3wt% 的润滑剂。

优选地，本发明所述的药物组合物包含：80-90wt% 的褐藻胶寡糖二酸或其药学上可接受的盐，8-16wt% 的填充剂，1-3wt% 的润滑剂。

25 优选地，用于本发明的药用组合物中的褐藻胶寡糖二酸或其药学

上可接受的盐（原料药 API）的粒径被控制在使得 100%过 60 目筛，且其中 70%以上过 100 目筛，按重量计。优选地，80%以上过 100 目筛，更优选地，90%以上过 100 目筛。由于活性成分具有易容易吸湿的特点，为了使药物活性成分更好地发挥作用，发明人发现，当控制 API 的粒径低于 100 目粉末的比例，且适当降低大于 60 目的粗原料，
5 分别有助于提高胶囊溶出度和改善制粒后中间颗粒形态。

优选地，本发明所述的药用组合物中， $n=1-5$ 的褐藻胶寡糖二酸的重量总和占褐藻胶寡糖二酸或其药学上可接受的盐总重量的 60%以上；古罗糖醛酸二酸的重量总和占褐藻胶寡糖二酸或其药学上可接受的
10 的盐总重量的 0-50%。

优选地，本发明所述的药用组合物中， $n=1-3$ 的甘露糖醛酸和/或古罗糖醛酸的重量总和占褐藻胶寡糖二酸或其药学上可接受的盐的总重量的 20-70%。

优选地，本发明所述的药用组合物中，古罗糖醛酸二酸的重量总和占褐藻胶寡糖二酸或其药学上可接受的盐总重量的 5-50%，优选
15 10-40%，更优选 15-35%。

优选地，本发明所述的药用组合物中，各聚合度褐藻胶寡糖二酸或其药学上可接受的盐的重量占褐藻胶寡糖二酸或其药学上可接受的盐的总重量的百分比为：二糖（ $n=1$ ）5-30%，三糖（ $n=2$ ）15-35%，
20 四糖（ $n=3$ ）15-35%，五糖（ $n=4$ ）、六糖（ $n=5$ ）、七糖（ $n=6$ ）、八糖（ $n=7$ ）、九糖（ $n=8$ ）和十糖（ $n=9$ ）的总含量为 20-45%。

优选地，本发明所述的药用组合物中，各聚合度褐藻胶寡糖二酸或其药学上可接受的盐的重量占褐藻胶寡糖二酸或其药学上可接受的盐的总重量的百分比为：二糖 5-30%，三糖 15-35%，四糖 15-35%，
25 五糖 10-25%，六糖 5-15%，七糖 3-10%，八糖 2-5%，九糖 1-5%，十糖 1-5%。

优选地，本发明所述的药用组合物，其特征在于，其中各聚合度

褐藻胶寡糖二酸或其药学上可接受的盐的重量占褐藻胶寡糖二酸或其药学上可接受的盐的总重量的百分比为：二糖 10-29%，三糖 18-32%，四糖 15-30%，五糖 15-20%，六糖 5-10%，七糖 3-5%，八糖 2-3%，九糖 1-3%，十糖 1-3%。

5

在一个优选的实施方案中，根据前述任一项所述的药用组合物，其特征在于甲酸或其盐的含量低于 0.2%，优选低于 0.1%，更优选低于 0.05%。

10 优选地，本发明所述的药用组合物，其含有褐藻胶寡糖二酸钠盐或钾盐作为药学上可接受的盐。

优选地，本发明所述的药用组合物，其含有褐藻胶寡糖二酸钠盐作为药学上可接受的盐，其含量约为 100mg 至 500mg，优选 150mg 至 450mg。

15

本发明的另一个方面涉及一种药物组合物在制备用于治疗选自老年性痴呆、帕金森病、炎症、疼痛、糖尿病或血管性痴呆的药物中的用途。

20 中国专利申请 CN201810721327.6 公开了甘露糖醛酸和古罗糖醛酸的寡糖二酸混合物（本发明所述褐藻胶寡糖二酸原料药）被证明具有抗老年性痴呆、帕金森病、炎症、疼痛、糖尿病或血管性痴呆的药理活性。因此，本发明的含有褐藻胶寡糖二酸或其盐的药用组合物同样具有抗老年性痴呆、帕金森病、炎症、疼痛、糖尿病或血管性痴呆的药理活性。

25 本发明所述疼痛包括各种疼痛，包括但不限于急性疼痛、慢性疼痛、神经性疼痛、术后痛、慢性下背痛、丛集性头痛、疱疹神经痛、幻肢痛、中枢性痛、牙痛、阿片样物质抗性疼痛、内脏痛、手术痛、

骨损伤痛、劳累和分娩过程中的疼痛、因灼伤包括晒伤导致的疼痛、产后痛、偏头痛、心绞痛和与泌尿生殖道相关的疼痛（包括膀胱炎）、血管性疼痛、三叉神经痛、肋间神经痛、手术切口痛、慢性筋膜炎痛、足跟痛、肌肉疼痛、骨骼疼痛、关节疼痛、癌性疼痛、非癌性疼痛等。

5 本发明所述炎症包括各种炎症，包括但不限于急性炎症、慢性炎症、血管炎症、神经炎症、中枢神经炎症（例如多发性硬化症，包括脑脊髓炎等）、外周神经炎症、关节炎（例如骨关节炎、骶髂关节炎等、牛皮癣关节炎、类风湿性关节炎、风湿性关节炎等）、强直性脊柱炎、炎症性肠病（例如克罗恩病和溃疡性结肠炎）、炎症性糖尿病性溃疡、系统性红斑狼疮、炎症性皮肤病（例如银屑病、特应性皮炎、湿疹）等。

本发明的另一个方面涉及一种治疗患有选自如下疾病的患者的方法：老年性痴呆、帕金森病、炎症、疼痛、糖尿病或血管性痴呆，
15 该方法包括通过给予需要的患者单位剂量形式的本发明所述的药物组合物。

优选地，单位剂量可含介于约 100mg 至 500mg 的褐藻胶寡糖二酸钠盐，优选 150mg 至 450mg。单位剂量可每天一次或以上给予患者。

本发明的另一个方面涉及一种包含本发明所述的药物组合物的
20 药物制剂。

优选地，本发明的药用组合物适用于口服给药。根据本发明的药用组合物的使用及优选的口服剂型有片剂、颗粒剂、胶囊、锭剂、包衣片剂及其它固体口服剂型。

25 本发明的另一个方面涉及一种本发明所述药物组合物的制备方法，包含以下步骤：

（1）按含有 40-90wt%褐藻胶寡糖二酸或其药学上可接受的盐，

8-50wt%的填充剂混合均匀；

(2) 将混合均匀的物料制粒，以定量装入包装袋，或充填入胶囊，或压片，制得所述药物组合物；或将步骤(1)得到的混合均匀的物料直接压片得到所述药物组合物。

5

优选地，在制备过程中还可以加入 0-10wt%的粘合剂，优选 1-10wt%，更优选 2-8wt%。可以在步骤(1)填充剂和褐藻胶寡糖二酸或其药学上可接受的盐混合时加入；也可以在步骤(2)制粒时加入。粘合剂选自淀粉浆、羧甲基纤维素钠、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮的至少一种。或者，粘合剂也可以是低级

10 烷醇的水溶液，如甲醇、乙醇、异丙醇的水溶液。

优选地，本发明所述的制备方法，步骤(2)中所述制粒为干法制粒、湿法制粒或沸腾制粒。

优选地，本发明所述的制备方法，步骤(2)所述制粒完成后还可以加入 0.1-3wt%的润滑剂。

15

优选地，本发明所述的制备方法，步骤(2)之后进行步骤(3)：在步骤(2)压片得到的素片进行包衣，制得所述药物组合物。

优选地，本发明所述的制备方法，包含以下步骤：

(1) 按含有 40-90wt%褐藻胶寡糖二酸或其药学上可接受的盐，

20 8-50wt%的填充剂混合均匀；

(2) 将混合均匀的物料，加入粘合剂制软材，孔径 $4 \pm 0.5\text{mm}$ 筛网制粒， $60-70^\circ\text{C}$ 干燥，孔径 $1.2 \pm 0.2\text{mm}$ 筛网整粒，加入润滑剂，混合均匀填充胶囊，或压片包薄膜衣。

25 本发明所述的药用组合物，选用了特定的填充剂、粘合剂或润滑剂，并与褐藻胶寡糖二酸或其药学上可接受的盐以特定的比例组合后，具有良好的稳定性，且崩解溶出速度快，30 分钟溶出度可达到

90%以上。

本发明的优点在以下非限制性的实施例中进一步进行说明。但实施例中采用的具体材料及其用量，以及其他实验条件并不应理解为对本发明的限制。除非特别指明，本发明中份数、比例、百分比等均以质量计。

实施例

下文具体实施例中采用的测定方法如下。

10

溶出度检测方法：硫酸吡唑法

按照溶出度与释放法测定法（《中国药典》2015 版第四部通则 0931 第一法）以醋酸-醋酸钠缓冲溶液（pH4.5）900mL 为溶出介质，转速为 50 转/分钟，依法操作，经 30 分钟，取溶液适量，采用硫酸吡唑法，以葡萄糖醛酸钠为标准品做标准曲线，计算溶出液及对照溶液的含量，得到溶出度。

15

甲酸含量的测定方法：

参照中国药典 2015 版《通则》0521 气相色谱法。

重均分子量、分子量分布测定方法：

20

尺寸排阻色谱光散射联用系统

色谱条件：Waters SEC 色谱柱（Waters ACQUITY UPLC@BEH125 SEC 1.7 μ m 4.6 $\times$ 300mm column），柱温 25 $^{\circ}$ C；流动相为甲醇：80mmol/L 乙酸铵=1:4（V/V）；流速为 0.1mL/min；检测器为十八角度激光检测器（LS），示差折光检测器（RI，35 $^{\circ}$ C）。

25

将待测样品用流动相稀释制成相当于褐藻胶寡糖二酸 10mg/mL 的溶液作为供试品溶液；取供试品溶液 20 μ l，注入液相色谱，测定得到多角度激光散射-示差折光色谱图；采用图谱处理软件（ASTRA）

处理，得到待测样品重均分子量和分子量分布。

实施例 1：制备褐藻胶寡糖二酸或其药学上可接受的盐（原料药 API）

步骤 1）：褐藻胶寡糖混合物的制备

- 5 将 5 Kg 海藻酸钠配成约 10% 的溶液，加稀盐酸调 pH 至 3.0 左右，升温至 80 °C，搅拌，反应 10 hr，停止加热，冷却至室温后，加 NaOH 调 pH 值至 9.0，再加稀盐酸回调 pH 至 3.2，离心机 5000 rpm 离心 10 min，收集上清，旋转蒸发仪浓缩，真空干燥得中间体 1500 g。

中间体的核磁图谱见附图 1。核磁共振测定方法如下：样品准备：

- 10 称取 30mg 待测样品溶于 0.5ml D₂O，冷冻干燥，再加 0.5ml 氘代重水溶解，重新冻干，最后把冻干样品粉末用适量重水溶解后，全部转移至核磁管中，配成 100mg/ml 的待测溶液，加入 0.01%（w/v）的氘代 TSP（trimethylsilylpropionic）钠盐做内标。核磁数据采集和处理：400M 傅里叶变换核磁共振仪在 60°C 采集一维氢谱。脉冲序列为 45°脉冲，每次采集 4 秒，弛豫时间 1 秒，累积 20 次，谱宽从 -2ppm 到 10ppm。数据收集后采用傅里叶变换得到一维氢谱，将 TSP 甲基氢信号设定为 0.00ppm。

- 20 由图 1 可知，该中间体含有甘露糖醛酸片段（M-block，化学位移 5.1ppm）和古罗糖醛酸片段（G-block，化学位移 5.5ppm）以及甘露糖醛酸和古罗糖醛酸镶嵌片段（MG-block，化学位移 5.3ppm）。称取 500g 该中间体，加蒸馏水溶解后，配成 5 L 体积的溶液，NaOH 调 pH 至 6.5，水浴加热，控制反应温度到 75 °C。调节氧气钢瓶出口的气流量和臭氧发生器的功率，使得臭氧质量浓度流量达到 8 g/hr，通入反应液中。反应 4 hr 后停止通入臭氧，加适量水调整溶液浓度至 10% 左右，以截留
- 25 分子量为 2000 Da 的超滤膜过滤，收集未透过液，旋转蒸发仪浓缩，真空干燥，得 350 g 褐藻胶寡糖二酸原料药。

步骤 2）：褐藻胶寡糖二酸原料药中各聚合度寡糖的比例和结构分

析

精密称取 100 mg 上述干燥的褐藻胶寡糖二酸原料药，加水溶解配制成 10 mg/mL 的浓度，过 0.22 μm 滤膜，作为供试样品溶液。采用 Superdex peptide(GE 公司)分子排阻色谱联用多角度激光散射(MALS,

5 怀雅特公司) 测定组合物中不同聚合度寡糖的比例。实验方法如下：

色谱柱：Superdex peptide 10/300G1

流动相：0.1 mol/L NaCl

进样量：10 μL

流速：0.3 mL/min

10 测试结果：二糖-十糖分别以 dp2-dp10 表示，分别为 dp2 为 18%，dp3 为 24%，dp4 为 23%，dp5 为 14%，dp6 为 8%，dp7 为 7%，dp8 为 2%，dp9 为 2%，dp10 为 2%。

步骤 3)：LC-MS 分析褐藻胶寡糖二酸原料药中各聚合度寡糖的结构

15 实验条件：

色谱柱：Superdex peptide 10/300G1

流动相：20% 甲醇+80% 80mmol/L NH_4Ac

流速：0.1 mL/ min

柱温：25 $^{\circ}\text{C} \pm 0.8^{\circ}\text{C}$ 。

20 质谱条件：Agilent 6540 QTOF；离子源：ESI 碰撞电压 120 V；负离子模式。采集信号 (m/z) 宽度为 100-1000。

各聚合度寡糖的质谱图见附图 2-4 所示。对质谱图中各信号峰进行归属，验证了原料药中所有寡糖的分子结构，即通式 (III) 所示的结构。信号归属及该信号所对应的结构见下表 1。

表 1 原料药中不同聚合度寡糖中的 6 种二酸结构及其在质谱中的质荷比

序 号	分子结构	分子式	质荷比 (m/z)								
			n=1	n=2	n=3	n=4	n=5	n=6	n=7	n=8	n=9
			[M-1] ⁻	[M-1] ⁻	[M-1] ⁻	[M-1] ⁻	[M-1] ⁻	[M-1] ⁻	[M-2] ⁻²	[M-2] ⁻²	[M-2] ⁻²
1		(C ₆ H ₈ O ₆) _n C ₆ H ₁₀ O ₈ n=1-9	385	561	737	913	1089	1265	1441	1617	1793
2		(C ₆ H ₈ O ₆) _n C ₅ H ₈ O ₇ n=1-9	355	531	707	883	1059	1235	1411	1587	1763
3		(C ₆ H ₈ O ₆) _n C ₅ H ₈ O ₇ n=1-9	355	531	707	883	1059	1235	1411	1587	1763
4		(C ₆ H ₈ O ₆) _n C ₄ H ₆ O ₆ n=1-9	325	501	677	853	1029	1205	1381	1557	1733
5		(C ₆ H ₈ O ₆) _n C ₄ H ₆ O ₆ n=1-9	325	501	677	853	1029	1205	1381	1557	1733
6		(C ₆ H ₈ O ₆) _n C ₃ H ₄ O ₅ n=1-9	295	471	647	823	999	1175	1351	1527	1703

由上述质谱结构解析发现，原料药中糖链还原末端的甘露糖醛酸或古罗糖醛酸氧化为糖二酸结构（结构见通式 IV），该糖二酸可以是含 6 个碳（ $m+m'=3$ ）的甘露糖二酸或古罗糖二酸结构，含量约为 10%~30%，也可以是甘露糖二酸或古罗糖二酸的脱羧产物，
 5 即 5 个碳（ $m+m'=2$ ）的糖二酸（30~50%）和 4 个碳（ $m+m'=1$ ）的糖二酸（30%~40%）。

步骤 4）核磁分析褐藻胶寡糖二酸原料药中古罗糖醛酸含量

样品准备：称取 50mg 待测样品溶于 0.5ml D₂O，冷冻干燥，再加 0.5ml 氘代重水溶解，重新冻干，最后把冻干样品粉末用适量
 10 重水溶解后，全部转移至核磁管中，配成 100mg/ml 的待测溶液，加入 0.01%（w/v）的氘代 TSP（trimethylsilylpropionic）钠盐做内标。

核磁数据采集和处理：400M 傅里叶变换核磁共振仪在室温采集一维氢谱。脉冲序列为 45°脉冲，每次采集 4 秒，弛豫时间 1 秒，累积 20 次，谱宽从 -2ppm 到 10ppm。数据收集后采用傅里叶变换得到
 15 一维氢谱，将 TSP 甲基氢信号设定为 0.00ppm。原料药的核磁共振氢谱如图 5 所示。附图 5 中，化学位移为 4.6ppm 的多重峰为甘露糖醛酸（M）C-1 位的氢信号，5.0ppm 为古罗糖醛酸（G）C-1 位的氢信号，4.9ppm 为甘露糖醛酸和古罗糖醛酸嵌合片段（MG）的 C-1
 20 位氢信号。古罗糖醛酸的含量计算公式为：

$$G\% = \frac{I_{5.0} + 0.5I_{4.9}}{I_{5.0} + I_{4.6} + I_{4.9}} \times 100\%$$

上式中， $I_{4.6}$ ， $I_{5.0}$ 和 $I_{4.9}$ 分别为甘露糖醛酸（M），古罗糖醛酸（G），甘露糖醛酸和古罗糖醛酸嵌合片段（MG）的 C-1 位氢信号积分值。通过计算，原料药的古罗糖醛酸含量为 30%。

25

实施例 2：褐藻胶寡糖二酸原料药的吸湿现象

实施例 1 制备获得的褐藻胶寡糖二酸原料药（纯度 99.2%）在高湿（RH75%，25℃）环境下放置 5 天后会由均匀分散的淡黄色细粉状态变为黄褐色膏状，表面光滑有光泽；称量发现

30%以上。

实施例 3: 制剂实施例

将 150 g 按实施例 1 制备的褐藻胶寡糖二酸原料药（经粒径检测：100%过 60 目筛，且其中 80%过 100 目筛），55g 玉米淀粉（市售产品，符合中国药典标准，粒径：全部通过 100 目筛）混合均匀，85%乙醇作粘合剂制软材，孔径 $4 \pm 0.5\text{mm}$ 筛网制粒，60-70℃干燥，孔径 $1.2 \pm 0.2\text{mm}$ 筛网整粒，加入 2g 硬脂酸镁和 2g 滑石粉，混合均匀，填充胶囊，约为 1000 粒。

根据前述方法检测，30 分钟主要有效成分溶出度为 91.6%，甲酸含量为 0.037%，重均分子量为 925.1Da，分子量分布为 1.051。

实施例 4:

将 150g 按实施例 1 制备的褐藻胶寡糖二酸原料药（经粒径检测：100%过 60 目筛，且其中 80%过 100 目筛）、65g 玉米淀粉混合均匀，85%乙醇作粘合剂制软材，孔径 $4 \pm 0.5\text{mm}$ 筛网制粒，60-70℃干燥，孔径 $1.2 \pm 0.2\text{mm}$ 筛网整粒，加入 3g 硬脂酸镁和 3g 滑石粉，混合均匀，填充胶囊，约为 1000 粒。根据前述方法检测，30 分钟主要有效成分溶出度为 93.8%，甲酸含量为 0.041%，重均分子量为 907.9Da，分子量分布为 1.048。

实施例 5:

将 450g 按实施例 1 制备的褐藻胶寡糖二酸原料药（经粒径检测：100%过 60 目筛，且其中 85%过 100 目筛）、65g 玉米淀粉混合均匀，85%乙醇作粘合剂制软材，孔径 $4 \pm 0.5\text{mm}$ 筛网制粒，60-70℃干燥，孔径 $1.2 \pm 0.2\text{mm}$ 筛网整粒，加入 2.5g 硬脂酸镁和 5g 滑石粉，混合均匀，填充胶囊，约为 1000 粒。检测，30 分钟主要有效成分溶出度为 94.6%，甲酸含量为 0.039%，重均分子量为 915.2Da，分子量分布为 1.044。

实施例 6:

将 450g 按实施例 1 制备的褐藻胶寡糖二酸原料药（经粒径检测：100%过 60 目筛，且其中 90%过 100 目筛）、45g 羧甲纤维素钠混合均匀，85%乙醇作粘合剂制软材，孔径 $4\pm 0.5\text{mm}$ 筛网制粒，60-70℃干燥，孔径 $1.2\pm 0.2\text{mm}$ 筛网整粒，加入 2.5g 硬脂酸镁和 5g 滑石粉，混合均匀，压片包薄膜衣，约为 1000 粒。检测，30 分钟主要有效成分溶出度为 93.8%，甲酸含量为 0.037%，重均分子量为 918.9Da，分子量分布为 1.046。

10

实施例 7:

将 450g 按实施例 1 制备的褐藻胶寡糖二酸原料药（经粒径检测：100%过 60 目筛，且其中 90%过 100 目筛）、85g 玉米淀粉混合均匀，用 5%玉米淀粉浆沸腾制粒，经孔径 $1.2\pm 0.2\text{mm}$ 筛网整粒，加入 2.5g 硬脂酸镁和 5g 滑石粉，混合均匀，压片包薄膜衣，约为 1000 粒。检测，30 分钟主要有效成分溶出度为 95.1%，甲酸含量为 0.032%，重均分子量为 919.3Da，分子量分布为 1.049。

15

实施例 8:

将 150g 按实施例 1 制备的褐藻胶寡糖二酸原料药（经粒径检测：100%过 60 目筛，且其中 90%过 100 目筛）、75g 微晶纤维素混合均匀，85%乙醇作粘合剂制软材，孔径 $4\pm 0.5\text{mm}$ 筛网制粒，60-70℃干燥，孔径 $1.2\pm 0.2\text{mm}$ 筛网整粒，加入 3g 硬脂酸镁和 3g 滑石粉，混合均匀，填充胶囊，约为 1000 粒。检测，30 分钟主要有效成分溶出度为 93.8%，甲酸含量为 0.041%，重均分子量为 907.9Da，分子量分布为 1.048。

20

25

比较例:

将 450g 按实施例 1 制备的褐藻胶寡糖二酸原料药（经粒径检

- 测：100%过 60 目筛，且其中 30%过 100 目筛）、20g 玉米淀粉混合均匀，85%乙醇作粘合剂制软材，孔径 $4 \pm 0.5\text{mm}$ 筛网制粒，80-90℃干燥，孔径 $1.2 \pm 0.2\text{mm}$ 筛网整粒，加入 10g 硬脂酸镁，5g 滑石粉，混合均匀，压片包薄膜衣，约为 1000 粒。检测，30 分钟主要有效成分溶出度为 62.5%，甲酸含量为 0.27%，重均分子量为 905.4Da，分子量分布为 1.046。

实施例 8：加速稳定性实验

- 将实施例 3-8、对比例制备的组合物放置于 $40^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}/75\%\text{RH} \pm 5\%\text{RH}$ 加速试验结果如下表：

样品	考察项目	时间（月）				
		0	1	2	3	6
实施例 3	性状为白色至淡黄色粉末或颗粒	符合	符合	符合	符合	符合
	30 分钟溶出度（%）	91.6	91.3	91.5	91.2	91.3
	甲酸（%）	0.037	0.037	0.038	0.039	0.039
	重均分子量（Da）	925.1	920.1	929.5	930.6	921.4
	分子量分布	1.051	1.048	1.052	1.048	1.047
实施例 4	性状为白色至淡黄色粉末或颗粒	符合	符合	符合	符合	符合
	30 分钟溶出度（%）	93.8	93.6	93.1	94	93.6
	甲酸（%）	0.041	0.040	0.041	0.041	0.042
	重均分子量（Da）	907.9	910.1	911.9	900.2	902.4
	分子量分布	1.048	1.049	1.049	1.045	1.054
实施例 5	性状为白色至淡黄色粉末或颗粒	符合	符合	符合	符合	符合
	30 分钟溶出度（%）	94.6	94.2	94.6	94.3	94.5
	甲酸（%）	0.039	0.039	0.040	0.041	0.042
	重均分子量（Da）	915.2	915.6	918.1	909.7	920
	分子量分布	1.044	1.048	1.048	1.043	1.045
实施例 6	性状为白色至淡黄色粉末或颗粒	符合	符合	符合	符合	符合
	30 分钟溶出度（%）	93.8	93.4	93.5	93.3	93.4
	甲酸（%）	0.037	0.038	0.037	0.039	0.040
	重均分子量（Da）	918.9	915.6	912.6	916.3	915.6

	分子量分布	1.046	1.046	1.047	1.042	1.044
实施例 7	性状为白色至淡黄色粉末或颗粒	符合	符合	符合	符合	符合
	30 分钟溶出度 (%)	95.1	95	95.3	95.1	95.4
	甲酸 (%)	0.032	0.033	0.034	0.034	0.035
	重均分子量 (Da)	919.3	917.6	915.3	919.2	918.4
	分子量分布	1.049	1.05	1.047	1.049	1.046
实施例 8	性状为白色至淡黄色粉末或颗粒	符合	符合	符合	符合	符合
	30 分钟溶出度 (%)	93.8	93.6	93.6	93.7	93.6
	甲酸 (%)	0.041	0.041	0.042	0.043	0.043
	重均分子量 (Da)	907.9	908.6	908.3	909.2	908.4
	分子量分布	1.048	1.047	1.049	1.048	1.049
比较例	性状为白色至淡黄色粉末或颗粒	符合	符合	符合	黄褐色膏状	黄褐色膏状
	30 分钟溶出度 (%)	62.5	62.4	63.1	62.3	62.5
	甲酸 (%)	0.27	0.29	0.30	0.32	0.37
	重均分子量 (Da)	905.4	874.3	867.5	813.4	799.4
	分子量分布	1.046	1.186	1.25	1.32	1.57

临床研究情况:

该研究为 36 周、随机、双盲、安慰剂平行对照、多中心临床试验, 818 例患者随机入组, 接受褐藻胶寡糖二酸组合物 450 mg 每日 2 次口服治疗。受试者年龄在 50-85 岁, MMSE 量表评分在 11-26 分, MRI 显示内侧颞叶萎缩视觉评定量表 (MTA) 不大于 2 级, 脑白质病变 Fazekas 量表小于 3 级, 直径大于 2 cm 的梗死灶不多于 2 个, 在关键脑区无梗死灶, 符合轻度至中度阿尔茨海默症的临床诊断标准。主要疗效指标为认知功能评价量表 ADAS-cog12 治疗 36 周相对于安慰剂组与基线变化的组间差异; 次要疗效指标为治疗 36 周临床医生面谈的印象变化量表 CIBIC-plus 和日常生活能力 ADCS-ADL 量表及精神行为问卷 NPI 相对于基线变化的组间差异。安全性评价指标包括不良事件、实验室检查、生命体征、心电图和体格检查等。

临床研究结果显示, 褐藻胶寡糖二酸组合物能明显改善 AD 患

- 者认知功能障碍，与安慰剂组相比，ADAS-cog12 量表平均改善值为 2.54，具有极其显著的统计学意义 ($p<0.0001$)。在疾病严重程度偏重的亚组中 (MMSE 量表评分在 11-14) 疗效尤为显著，与安慰剂组相比，ADAS-cog12 量表平均改善值为 4.55。褐藻胶寡糖二
- 5 酸组合物对次要疗效指标 CIBIC-plus 具有明显改善趋势 ($p=0.059$)；但对 ADCS-ADL 量表和 NPI 问卷尚未观察到统计学意义。褐藻胶寡糖二酸组合物组和安慰剂组相比，其不良事件或严重不良事件的发生率无显著统计学差异，褐藻胶寡糖二酸组合物安全性好，耐受性强。