(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国 际 局

(43) 国际公布日
2014 年 5 月 15 日 (15.05.2014)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2014/071772 A1

(51) 国际专利分类号:
C07D 471/04 (2006.01) *A61K 31/4745* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2013/083195

(22) 国际申请日: 2013 年 9 月 10 日 (10.09.2013)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201210452297.6 2012 年 11 月 9 日 (09.11.2012) CN

(71) 申请人: **诸城市浩天药业有限公司 (ZHUCHENG HAOTIAN PHARM CO., LTD.)** [CN/CN]; 中国山东省诸城市辛兴镇, Shandong 262218 (CN)。

(72) 发明人: **朱理平 (ZHU, Liping)**; 中国山东省诸城市辛兴镇, Shandong 262218 (CN)。

(74) 代理人: **上海专利商标事务所有限公司 (SHANGHAI PATENT & TRADEMARK LAW OFFICE, LLC)**; 中国上海市桂平路 435 号, Shanghai 200233 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明，要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明，要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。

WO 2014/071772 A1

(54) **Title**: PYRROLOQUINOLINE QUININE DISODIUM SALT CRYSTAL

(54) **发明名称** : 吡咯并喹啉醌的二钠盐结晶

(57) **Abstract**: Provided are pyrroloquinoline quinone disodium salt crystals A and B, and the preparation method and use thereof. The crystal has low moisture absorption and high stability, as well as excellent use and storage performances.

(57) **摘要**: 提供了吡咯并喹啉醌的二钠盐结晶 A 和结晶 B，其制备方法及其应用。该结晶具有低吸湿性和高稳定性，具有优良的使用和储存性能。

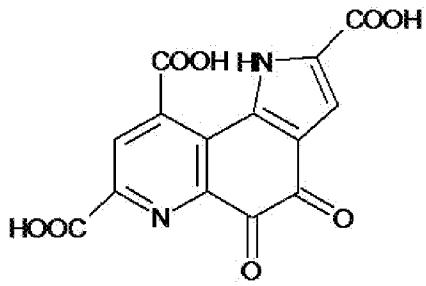
吡咯并喹啉醌的二钠盐结晶

技术领域

本发明涉及吡咯并喹啉醌的二钠盐的新型结晶及其制备方法。

背景技术

吡咯并喹啉醌(Pyrroloquinoline Quinone，PQQ)是最早从微生物中发现的小分子化合物，它是细菌中多种重要酶类的辅基，在高等真核生物体内也有存在，并广泛分布于人体各组织器官。PQQ 是一种无味无嗅的化合物，其分子式如结构式 I 所示：



结构式 I

近年来，对于 PQQ 的研究表明，它是一种对人体健康非常有利的物质：PQQ 缺乏的小鼠生长缓慢，生殖能力差，并且容易产生关节炎症，可能是体内必需的维生素之一；作为一种抗氧化剂，PQQ 能够保护肝脏免受 CCl4 或酒精损伤；纯化的 PQQ 减少鸡胚发育过程中糖皮质激素诱导的白内障形成； PQQ 保护神经细胞免受 NMDA 毒性影响，从而防止脑部缺血缺氧，避免动物模型发生严重的休克；此外，PQQ 还具有防治心肌缺血，心肌梗死，有效地预防和治疗动脉粥样硬化作用。

目前 PQQ 可以通过发酵法和化学合成的方法制备获得。但由这些方法获得的 PQQ 二钠盐结晶晶型不稳定，极具引湿性，在常温储存的温度范围内，湿度变化幅度大，固体状态不理想，从而对 PQQ 二钠盐的应用和储存造成了非常不利的影响。

日本三菱瓦斯化学株式会社已就 PQQ 二钠盐的晶体 1(即本专利申请中所述结晶 E)申请了专利(专利文献 1，申请号 CN201080031945，申请日 2010 年 6 月 9 日)。然而经本发明人研究发现，该晶体吸湿性高，不利于加工和储存。

因此，考虑到 PQQ 在药学、保健学、食品学等多种方面中的应用，本领域迫切需要在高纯度状态下获得在具有高稳定性、优异可加工性和可存储性的 PQQ 结晶及其制备方法。

发明内容

本发明的主要目的之一正是为了从结晶度、稳定性、吸湿性和/或加工性等方面出发，提供稳定的 PQQ 的二钠盐结晶及其制备方法。本发明的发明人通过设计 PQQ 二钠盐的结晶化条件，筛选并获得了适合医药、食品、保健等应用的晶型。

在本发明的第一方面中，提供了一种吡咯并喹啉醌的二钠盐结晶 A，所述结晶 A 用 Cu-K α 射线衍射得到的 X-射线粉末衍射图谱在如下的 2θ 角度有衍射峰：9.6±0.2°、11.6±0.2°、14.9±0.2°、16.0±0.2°、18.8±0.2°、19.4±0.2°、20.4±0.2°、21.9±0.2°、22.7±0.2°、23.2±0.2°、25.6±0.2°、33.7±0.2°、35.0±0.2°、35.8±0.2°、36.7±0.2°、38.0±0.2°、38.6±0.2°。

在一些实施方式中，所述结晶 A 用 Cu-K α 射线衍射得到的 X-射线粉末衍射图谱在如下的 2θ 角度有衍射峰：9.2±0.2°、 9.6±0.2°、11.6±0.2°、13.5±0.2°、14.9±0.2°、16.0±0.2°、18.2±0.2°、18.8±0.2°、19.4±0.2°、20.4±0.2°、21.9±0.2°、22.7±0.2°、23.2±0.2°、23.8±0.2°、25.6±0.2°、26. 4±0.2°、27.3±0.2°、28.4±0.2°、30.7±0.2°、31.7±0.2°、32. 4±0.2°、33.7±0.2°、35.0±0.2°、35.8±0.2°、36.7±0.2°、38.0±0.2°、38.6±0.2°。

在另一些实施方式中，所述结晶 A 用 Cu-K α 射线衍射得到的 X-射线粉末衍射图谱基本上如图 1 所示。

在一个优选例中，在 25℃下，所述二钠盐结晶 A 65～80%RH 时的引湿性低于 3%。

在另一个优选例中，在 25℃下，所述二钠盐结晶 A 在从 65%RH 变化到 80%RH 时的引湿性变化小于 1%，优选小于 0.6%。

在另一个优选例中，所述二钠盐结晶 A 在 30-400℃范围内的热重分析曲线基本上如图 2 所示。

在另一个优选例中，所述二钠盐结晶 A 是二水合物。

在另一个优选例中，所述二钠盐结晶 A 在 50-280℃范围内、以 10℃/min 的扫描速率得到的差示扫描量热分析图谱基本上如图 3 所示。

在本发明的第二方面中，提供了一种吡咯并喹啉醌的二钠盐结晶 B，所述结晶 B

用 Cu-K α 射线衍射得到的 X-射线粉末衍射图谱在如下的 2θ 角度有衍射峰：8.1±0.2°、9.0±0.2°、10.1±0.2°、13.7±0.2°、16.4±0.2°、17.6±0.2°、18.2±0.2°、23.9±0.2°、25.8±0.2°、27.2±0.2°、31.0±0.2°、39.5±0.2°。

在一些实施方式中，所述结晶 B 用 Cu-K α 射线衍射得到的 X-射线粉末衍射图谱中在如下 2θ 角度的峰强度均小于 600。

在一个优选例中，所述结晶 B 用 Cu-K α 射线衍射得到的 X-射线粉末衍射图谱中在如下 2θ 角度的峰强度为(2θ/峰强度)：9.0°/517、10.1°/366、16.4°/107、23.9°/582、27.2°/511(峰强因实验和样品条件等可存在一定差异，但该差异范围在本领域普通技术人员可预期的范围内)。

在 25℃下，所述二钠盐结晶 B 在 65～80%RH 时的引湿性低于或等于 12.0%。

在一个优选例中，在 25℃下，所述二钠盐结晶 B 在从 65%RH 变化到 80%RH 时的引湿性变化小于 1.5%，优选小于或等于 1.0%。

在另一些实施方式中，所述结晶 B 用 Cu-K α 射线衍射得到的 X-射线粉末衍射图谱基本上如图 5 所示。

在一个优选例中，所述二钠盐结晶 B 在 30-400℃范围内的热重分析曲线基本上如图 6 所示。

在另一个优选例中，所述二钠盐结晶 B 是二水合物。

在另一个优选例中，所述二钠盐结晶 B 在 50-280℃范围内、以 10℃/min 的扫描速率得到的差示扫描量热分析图谱基本上如图 7 所示。

在本发明的第三方面中，提供了制备本发明所述的二钠盐结晶 A 的方法，所述制备方法选自下组：

(A) 混悬结晶法：在 20℃～60℃温度范围内，将吡咯并喹啉醌二钠盐与溶剂搅拌至平衡得到混悬液，过滤得到所述二钠盐结晶 A；

(B) 缓慢挥发法：将吡咯并喹啉醌二钠盐与溶剂搅拌、混匀至溶解，并在 20℃～60℃的条件下将溶剂挥干，得到所述二钠盐结晶 A；

(C) 反溶剂沉淀结晶法：在 20～60℃的温度范围下，将吡咯并喹啉醌二钠盐溶解在高溶解度溶剂中，在所得体系中加入低溶解度反溶剂以析出所述二钠盐结晶 A，

其中，25℃下，吡咯并喹啉醌二钠盐在所述高溶解度溶剂中的溶解度≥0.35 g/100g 溶剂，吡咯并喹啉醌二钠盐在所述低溶解度反溶剂中的溶解度≤0.15 g/100g 溶剂。

在一个优选例中，所述吡咯并喹啉醌二钠盐通过化学合成或发酵生产制备。

在另一个优选例中，所述吡咯并喹啉醌二钠盐含或不含结晶。

在另一个优选例中，所述吡咯并喹啉醌二钠盐可含或不含杂质，其纯度为98%~100%，优选 99%~100%。

在另一个优选例中，在方法(A)～(C)中，吡咯并喹啉醌二钠盐与最初使用的溶剂之间的质量体积比 g/L 为 100:1~1:100。在方法(A)中，吡咯并喹啉醌二钠盐与最初使用的溶剂之间的质量体积比 g/L 为 100:1~1:50，优选 100:1~1:1。在方法(B)中，吡咯并喹啉醌二钠盐与最初使用的溶剂之间的质量体积比 g/L 为 50:1~1:100，优选 10:1~1:100。

在另一个优选例中，方法(A)～(C)在室温～55℃，优选 25～50℃，更优选室温、25℃或 50℃下进行。

在另一个优选例中，方法(A)和(B)中的搅拌时间至少为 2 小时，优选 2 小时～10 天，更优选 2 小时～7 天。

在另一个优选例中，方法(B)中的挥发时间至少为 2 小时，优选 2 小时～14 天，更优选 2 小时～10 天；所述挥发可在真空条件下进行。

在另一个优选例中，由高效液相色谱法测定通过方法(A)～(C)中任一种所述方法获得的 PQQ 二钠盐的纯度高于 99.0%，优选高于 99.5%，更优选高于 99.8%。

在一些实施方式中，所述方法(A)、(B)和(C)中所用的溶剂分别选自下组，其中的比例为体积比：

方法(A)：乙腈、甲醇、乙醇、水、乙烷、庚烷、甲醇:水、乙醇:水、丙酮:水、乙腈:水、四氢呋喃:水、甲醇:己烷、乙醇:己烷、乙腈:己烷、四氢呋喃:己烷、甲醇:甲基叔丁基醚、乙醇:甲基叔丁基醚、甲醇:甲苯、乙醇:甲苯、乙腈:甲苯、甲醇:甲基异丁基酮、甲苯:乙烷，其中各混合溶剂中各溶剂的体积比为 5:1~1:5，优选 2:1~1:2，更优选 1:1；

方法(B)：甲醇:水、乙醇:水、异丙醇:水、丙酮:水、乙腈:水、四氢呋喃:水，其中各混合溶剂中各溶剂的体积比为 10:1~1:10，优选 5:1~1:5；

方法(C)中的高溶解度溶剂为水，低溶解度反溶剂选自：甲醇、乙醇、异丙醇、丙酮、乙腈和四氢呋喃。

在一个优选例中，在 25℃下进行方法(A)时的溶剂选自下组：乙腈、甲醇、乙醇、水、甲醇:水、乙醇:水、丙酮:水、乙腈:水、四氢呋喃:水、甲醇:己烷、乙醇:己烷、乙腈:己烷、四氢呋喃:己烷、甲醇:甲基叔丁基醚、乙醇:甲基叔丁基醚、甲醇:甲苯、乙醇:甲苯、乙腈:甲苯、甲醇:甲基异丁基酮，其中各混合溶剂中各溶剂的体积比为

5:1~1:5，优选 2:1~1:2，更优选 1:1。

在另一个优选例中，在 50℃下进行方法(A)时的溶剂选自下组：乙腈、甲醇、乙醇、乙烷、庚烷、甲醇:水、乙醇:水、乙腈:水、四氢呋喃:水、甲醇:己烷、乙醇:己烷、乙腈:己烷、甲苯:己烷、甲醇:甲基叔丁基醚、乙醇:甲基叔丁基醚、甲醇:甲苯、乙醇:甲苯、乙腈:甲苯、甲醇:甲基异丁基酮，其中各混合溶剂中各溶剂的体积比为 5:1~1:5，优选 2:1~1:2，更优选 1:1。

在另一个优选例中，在 25℃下进行方法(B)时所用溶剂选自下组：甲醇:水(1:2～1:6)、乙醇:水(1:2～1:6)、异丙醇:水(1:2)、丙酮:水(2:9～1:4)、乙腈:水(2:5～1:4)、四氢呋喃:水(2:5～1:4)。

在另一个优选例中，在 50℃下进行方法(B)时的溶剂选自下组：甲醇:水(1:6)、乙醇:水(1:2)、异丙醇:水(1:2)、丙酮:水(2:9)、乙腈:水(2:5～1:4)、四氢呋喃:水(2:5)。

在本发明的第四方面中，提供了制备本发明所述的二钠盐结晶 B 的方法，所述制备方法选自下组：

(A') 混悬结晶法：在 20℃～60℃温度范围内，将吡咯并喹啉醌二钠盐与溶剂搅拌至平衡得到混悬液，过滤得到所述二钠盐结晶 B；或

(B') 缓慢挥发法：将吡咯并喹啉醌二钠盐与溶剂搅拌、混匀至溶解，并在 20℃～60℃的条件下将溶剂挥干，得到所述二钠盐结晶 B。

在一个优选例中，所述吡咯并喹啉醌二钠盐通过化学合成或发酵生产制备。

在另一个优选例中，所述吡咯并喹啉醌二钠盐含或不含结晶。

在另一个优选例中，所述吡咯并喹啉醌二钠盐可含或不含杂质，其纯度为 98%~100%，优选 98%~100%。

在另一个优选例中，在方法(A')～(B')中，吡咯并喹啉醌二钠盐与最初使用的溶剂之间的质量体积比 g/L 为 100:1~1:100。在方法(A')中，吡咯并喹啉醌二钠盐与最初使用的溶剂之间的质量体积比 g/L 为 100:1~1:50，优选 100:1~1:1。在方法(B')中，吡咯并喹啉醌二钠盐与最初使用的溶剂之间的质量体积比 g/L 为 50:1~1:100，优选 10:1~1:100。

在另一个优选例中，方法(A')～(B')在室温～55℃，优选 25～50℃，更优选室温、25℃或 50℃下进行。

在另一个优选例中，方法(A')中的搅拌时间至少为 2 小时，优选 2 小时～10 天，更优选 2 小时～7 天。

在另一个优选例中，方法(B')中的挥发时间至少为 2 小时，优选 2 小时～14 天，更优选 2 小时～10 天；所述挥发可在真空条件下进行。

在一些实施方式中，所述方法(A')和(B')中所用的溶剂分别选自下组，其中的比例为体积比：

方法(A')：丙酮、异丙醇、异戊醇、乙酸乙酯、乙酸异丙酯、己烷、庚烷、甲基叔丁基醚、甲基异丁基酮、二氯甲烷、氯仿、四氢呋喃、甲苯、硝基甲烷、乙醚、甲乙酮、丙酮:乙烷、甲乙酮:乙烷、硝基甲烷:乙烷、乙酸乙酯:乙烷、甲基叔丁基醚:乙烷、甲苯:乙烷、丙酮:甲基叔丁基醚、甲乙酮:甲基叔丁基醚、乙腈:甲基叔丁基醚、四氢呋喃:甲基叔丁基醚、硝基甲烷:甲基叔丁基醚、乙酸乙酯:甲基叔丁基醚、丙酮:甲苯、甲乙酮:甲苯、四氢呋喃:甲苯、硝基甲烷:甲苯、乙酸乙酯:甲苯、丙酮:甲基异丁基酮、甲乙酮:甲基异丁基酮、乙腈:甲基异丁基酮、四氢呋喃:甲基异丁基酮、硝基甲烷:甲基异丁基酮、乙酸乙酯:甲基异丁基酮、甲基叔丁基醚:甲基异丁基酮、甲苯:甲基异丁基酮、四氢呋喃:乙烷，其中各混合溶剂中各溶剂的体积比为 5:1~1:5，优选 2:1~1:2，更优选 1:1；

方法(B')：异丙醇:水、四氢呋喃:水，其中各混合溶剂中各溶剂的体积比为 10:1~1:10，优选 5:1~1:5，更优选 4:1~1:4。

在一个优选例中，在 25℃下进行方法(A')时的溶剂选自下组：丙酮、异丙醇、异戊醇、乙酸乙酯、乙酸异丙酯、己烷、庚烷、甲基叔丁基醚、甲基异丁基酮、二氯甲烷、氯仿、四氢呋喃、甲苯、硝基甲烷、乙醚、甲乙酮、丙酮:乙烷、甲乙酮:乙烷、硝基甲烷:乙烷、乙酸乙酯:乙烷、甲基叔丁基醚:乙烷、甲苯:乙烷、丙酮:甲基叔丁基醚、甲乙酮:甲基叔丁基醚、乙腈:甲基叔丁基醚、四氢呋喃:甲基叔丁基醚、硝基甲烷:甲基叔丁基醚、乙酸乙酯:甲基叔丁基醚、丙酮:甲苯、甲乙酮:甲苯、四氢呋喃:甲苯、硝基甲烷:甲苯、乙酸乙酯:甲苯、丙酮:甲基异丁基酮、甲乙酮:甲基异丁基酮、乙腈:甲基异丁基酮、四氢呋喃:甲基异丁基酮、硝基甲烷:甲基异丁基酮、乙酸乙酯:甲基异丁基酮、甲基叔丁基醚:甲基异丁基酮、甲苯:甲基异丁基酮，其中各混合溶剂中各溶剂的体积比为 5:1~1:5，优选 2:1~1:2，更优选 1:1。

在另一个优选例中，在 50℃下进行方法(A')时的溶剂选自下组：丙酮、异丙醇、异戊醇、乙酸乙酯、乙酸异丙酯、甲基叔丁基醚、甲基异丁基酮、二氯甲烷、氯仿、四氢呋喃、甲苯、硝基甲烷、乙醚、甲乙酮、丙酮:乙烷、甲乙酮:乙烷、四氢呋喃:乙烷、硝基甲烷:乙烷、乙酸乙酯:乙烷、甲基叔丁基醚:乙烷、丙酮:甲基叔丁基醚、甲乙酮:甲基叔丁基醚、四氢呋喃:甲基叔丁基醚、硝基甲烷:甲基叔丁基醚、乙酸乙酯:甲基

叔丁基醚、丙酮:甲苯、甲乙酮:甲苯、四氢呋喃:甲苯、硝基甲烷:甲苯、乙酸乙酯:甲苯、丙酮:甲基异丁基酮、甲乙酮:甲基异丁基酮、乙腈:甲基异丁基酮、四氢呋喃:甲基异丁基酮、硝基甲烷:甲基异丁基酮、乙酸乙酯:甲基异丁基酮、甲基叔丁基醚:甲基异丁基酮、甲苯:甲基异丁基酮，其中各混合溶剂中各溶剂的体积比为 5:1~1:5，优选 2:1~1:2，更优选 1:1。

在另一个优选例中，在 25℃下进行方法(B')时所用溶剂为异丙醇:水(1:4)。

在另一个优选例中，在 50℃下进行方法(B')时的溶剂选自下组：四氢呋喃:水(1:4)。

在另一个优选例中，由高效液相色谱法测定通过方法(A')～(B')中任一种所述方法获得的 PQQ 二钠盐的纯度高于 98.0%，优选高于 99%，更优选高于 99.5%。

在本发明的第五方面中，提供了一种组合物或包装品，其包含：

(I) 本发明所述的吡咯并喹啉醌的二钠盐结晶 A、本发明所述的吡咯并喹啉醌的二钠盐结晶 B、通过本发明所述的方法制备的吡咯并喹啉醌的二钠盐结晶 A 和/或通过本发明所述的方法制备的吡咯并喹啉醌的二钠盐结晶 B；

(II) 药学上、生理学上或制剂学上可接受的载体和/或辅料。

在一些实施方式中，所述组合物或包装品选自下组：药物组合物、功能性食品、饲料、添加剂、微生物生长抑制剂和防腐剂。

在一个优选例中，所述二钠盐结晶的加入量为所述组合物重量的 0.001 wt%至 99.99 wt%，优选 0.01 wt%至 99.0 wt%，更优选 0.1 wt%至 90 wt%。

在另一优选例中，所述二钠盐结晶在组合物或包装品中的形式选自：粉末、颗粒、或微丸，优选粉末形式。

在另一个优选例中，所述组合物或包装品用于选自下组的一种或多种用途：促生长、抗炎、增锌降铅、防治肝脏疾病、减少白内障形成、抗癌、促进神经再生、防治心梗、动脉粥样硬化、解酒、预防/缓解或治疗老年痴呆、抑制微生物生长、延长食物保存时间。

在另一个优选例中，所述组合物或包装品还可包含具有选自下组的活性的一种或多种其它活性物质：促生长、抗炎、增锌降铅、防治肝脏疾病、减少白内障形成、抗癌、促进神经再生、防治心梗、动脉粥样硬化、解酒、预防/缓解或治疗老年痴呆、抑制微生物生长或延长食物保存时间。

在本发明的第六方面中，提供了本发明所述的吡咯并喹啉醌的二钠盐结晶 A、本

发明所述的吡咯并喹啉醌的二钠盐结晶 B、通过本发明所述的方法制备的吡咯并喹啉醌的二钠盐结晶 A 和/或通过本发明所述的方法制备的吡咯并喹啉醌的二钠盐结晶 B 的用途，其用于制备用于预防、缓解或治疗选自下组的疾病或症状的药物组合物或功能性食品：促生长、抗炎、增锌降铅、防治肝脏疾病、减少白内障形成、抗癌、促进神经再生、防治心梗、动脉粥样硬化、解酒、老年痴呆、微生物感染。

在另一个优选例中，所述药物组合物或功能性食品还可包含具有选自下组的活性的一种或多种其它活性物质：促生长、抗炎、增锌降铅、防治肝脏疾病、减少白内障形成、抗癌、促进神经再生、防治心梗、动脉粥样硬化、解酒、预防/缓解或治疗老年痴呆、抑制微生物生长或延长食物保存时间。

本发明的其它方面由于本文的公开内容，对本领域的技术人员而言是显而易见的。并且，本领域普通技术人员可对本文中所述的各种特征和方面进行有效的组合，这些组合仍然在本申请所要求保护的范围之内。

附图说明

图 1：实施例 1 中得到的结晶 A 的 X-射线粉末衍射(XRPD)图；

图 2：实施例 1 中得到的结晶 A 的热失重分析(TG)图；

图 3：实施例 1 中得到的结晶 A 的差示扫描量热分析(DSC)图；

图 4：实施例 1 中得到的结晶 A 的吸湿性分析(DVS)图；

图 5：实施例 4 中得到的结晶 B 的 X-射线粉末衍射(XRPD)图；

图 6：实施例 4 中得到的结晶 B 的热失重分析(TG)图；

图 7：实施例 4 中得到的结晶 B 的差示扫描量热分析(DSC)图；

图 8：实施例 4 中得到的结晶 B 的吸湿性分析(DVS)图；

图 9：比较实施例 1 中得到的结晶 C 的 X-射线粉末衍射(XRPD)图；

图 10：比较实施例 1 中得到的结晶 C 的热失重分析(TG)图；

图 11：比较实施例 1 中得到的结晶 C 的差示扫描量热分析(DSC)图；

图 12：比较实施例 1 中得到的结晶 C 的吸湿性分析(DVS)图；

图 13A：结晶 A、B 以及结晶 C 的 XRPD 谱图叠加比较；

图 13B：结晶 A、B 以及结晶 C 的 XRPD 谱图叠加放大比较 1；

图 13C：结晶 A、B 以及结晶 C 的 XRPD 谱图叠加放大比较 2；

图 14：结晶 A、B 以及结晶 C 的 TG 谱图叠加比较；

图 15：结晶 A、B 以及结晶 C 的 DSC 谱图叠加比较；

图 16：结晶 A、B 以及结晶 C 的 DVS 谱图叠加比较；

图 17A：结晶 A、B 以及结晶 C 的拉曼光谱(Raman)谱图叠加比较；

图 17B：结晶 A、B 以及结晶 C 的 Raman 谱图叠加放大比较 1；

图 17C：结晶 A、B 以及结晶 C 的 Raman 谱图叠加放大比较 2；

图 18A：结晶 A、B 以及结晶 C 的红外光谱(IR)谱图叠加比较；

图 18B：结晶 A、B 以及结晶 C 的 IR 谱图叠加放大比较 1；

图 18C：结晶 A、B 以及结晶 C 的 IR 谱图叠加放大比较 2；

图 19：结晶 A、B、结晶 C 与结晶 D(JACS，*Journal of the American Chemical Society*，1989 年 8 月，111 卷，17 期，6822-6828 中显示为单晶的 PQQ 钠盐结晶)的 XRPD 谱图叠加比较；

图 20：结晶 A、B、结晶 E 与结晶 D 的 XRPD 谱图叠加比较；

图 21：结晶 E 的吸湿性分析(DVS)图；

图 22：结晶 A、B 以及结晶 E 的 DVS 谱图叠加比较。

具体实施方式

本发明人经过长期而深入的研究制得了 PQQ 二钠盐晶体 A 和 B，并出乎意料地发现该晶体具有纯度高、吸湿度低、稳定性佳等优良特性，其存放和使用均较已知的 PQQ 二钠盐固体更为方便，特别适合用作制备包含 PQQ 二钠盐的组合物或包装物。在此基础上，发明人完成了本发明。

PQQ 二钠盐晶体的制备

如本文所用，术语“晶体”具有本领域中常规知晓的含义，即由结晶物质构成的、其内部的构造质点(如原子、分子)呈平移周期性规律排列的固体。

如本文所用，术语“吡咯并喹啉醌”与“PQQ”可互换使用，均是指结构式如上文结构式 I 所示的化合物。作为获得本发明晶体 A 和晶体 B 的原料化合物，所使用的 PQQ 二钠盐可以本领域中常规方法获得，例如通过发酵法(例如，专利文献 CN 101228963 B)和有机化学合成法(J. Am. Chem. Soc., 1981, 103,5599～5600)等制备。原料中使用的 PQQ 二钠盐可以是结晶也可以是非晶质的。此外，所用原料也可以含有杂质。

在结晶制备前，可通过常规方法测定 PQQ 二钠盐在不同溶剂中的溶解度，并

随后选用适当的溶剂制备本发明的结晶。例如，可采用如下方法测定 PQQ 二钠盐在多种溶剂中的溶解度：

(1)取大约 25mg PQQ 二钠盐，分别在 25℃和 50℃条件下与 1 ml 溶剂搅拌平衡至少 24 h，随后，分别过滤溶液，液体部分在真空中将溶剂挥干。利用重量分析法测定原料药在溶剂中的近似溶解度。

重量分析法：准确取一定体积(一般为 0.5mL)的滤液放入干燥且已称好重量的容器中，记为 $M_{空}$，随即称量容器加滤液的总重量，记为 M_0，则滤液重量为 M_0-$M_{空}$。于真空中挥干溶剂后再准确称量其总重量(记为 M_1)，则析出的固体质量为 $M_1-M_{空}$，溶剂的质量为 M_0-M_1，据此原料在该溶剂中的近似溶解度为：

$$X(g)=[(M_1-M_{空})/(M_0-M_1)]\times 100(g)$$

【表 1】PQQ 二钠盐在各种溶剂中的溶解度

溶剂	溶解度@25℃(g/100g)	溶解度@50℃(g/100g)
丙酮	0.13	0.05
乙腈	0.01	0.05
甲醇	0.09	0.11
乙醇	0.08	0.11
异丙醇	0.09	0.08
异戊醇	0.02	0.00
乙酸乙酯	0.11	0.09
乙酸异丙酯	0.36	0.03
己烷	0.06	0.02
庚烷	0.02	0.11
甲基叔丁基醚	0.05	0.03
甲基异丁基酮	0.05	0.07
二氯甲烷	0.02	0.04
氯仿	0.02	0.03
四氢呋喃	0.15	0.24
甲苯	0.02	0.05
硝基甲烷	0.01	0.02
乙醚	0.06	0.01
甲基乙基酮	0.16	0.06
水	0.37	0.89
甲醇:水(1:1)	0.15	0.13
乙醇:水(1:1)	0.10	0.10
丙酮:水(1:1)	0.53	1.36
乙腈:水(1:1)	0.22	0.14
四氢呋喃:水(1:1)	0.24	0.29

乙腈:甲基叔丁基醚(1:1)	0.10	0.04
乙腈: 甲基叔丁基醚(1:1)	0.03	0.02
乙腈:甲苯(1:1)	0.04	0.00
乙腈:甲基异丁基甲酮(1:1)	0.09	0.04

PQQ 二钠盐结晶 A 的制备

PQQ 二钠盐结晶 A 可通过方法(A)混悬结晶法、方法(B)缓慢挥发法或方法(C)反溶剂沉淀结晶法制得。

方法(A)混悬结晶法、方法(B)缓慢挥发法或方法(C)反溶剂沉淀结晶法的示例如下。本领域普通技术人员可根据常识对这些方法中的条件进行调整：

方法(A)：25℃和 50℃混悬结晶法：将 PQQ 二钠盐在 25℃和 50℃条件下与溶剂搅拌平衡至少 24h，过滤得到结晶。方法(B)缓慢挥发法：将 PQQ 二钠盐与溶剂搅拌、混匀、溶解，并在 25℃和 50℃条件下将溶剂挥干得到结晶。方法(C)反溶剂沉淀结晶法：根据上述(1)测得近似溶解度，取两种在室温条件下溶解度相差很大的溶剂作为一组相结合。取大约 5-200mg PQQ 二钠盐溶解在 0.5~5ml 溶解度很高的溶剂中，随后，加入 4-20ml 对 PQQ 二钠盐高度不溶的溶剂(反溶剂)，析出沉淀，获得结晶。

在 25℃进行方法(A)操作中可使用的溶剂的例子，包括但不限于：乙腈、甲醇、乙醇、水、甲醇：水 (1:1)、乙醇：水 (1:1)、丙酮：水(1:1)、乙腈：水 (1:1) 、四氢呋喃：水 (1:1) 、甲醇：己烷(1:1) 、乙醇：己烷 (1:1) 、乙腈 ：己烷(1:1) 、四氢呋喃：己烷(1:1) 、甲醇: 甲基叔丁基醚(1:1) 、乙醇: 甲基叔丁基醚(1:1) 、甲醇：甲苯 (1:1) 、乙醇 ：甲苯(1:1) 、乙腈：甲苯(1:1) 、甲醇：甲基异丁基酮(1:1)；

在 50℃进行方法(A)操作中可使用的溶剂的例子，包括但不限于：乙腈、甲醇、乙醇、乙烷、庚烷、甲醇:水 (1:1)、乙醇:水 (1:1)、乙腈:水 (1:1) 、四氢呋喃:水 (1:1) 、甲醇:己烷(1:1) 、乙醇:己烷 (1:1) 、乙腈 :己烷(1:1) 、甲苯:己烷(1:1)、甲醇: 甲基叔丁基醚(1:1) 、乙醇: 甲基叔丁基醚(1:1) 、甲醇:甲苯 (1:1) 、乙醇 :甲苯(1:1) 、乙腈:甲苯(1:1) 、甲醇:甲基异丁基酮(1:1)。其中原料与溶剂的质量体积比 (g/L) 为 100:1～1:1。

方法(A)中所述在 25℃和 50℃条件下的搅拌平衡时，优选根据需要进行搅拌，然后在真空条件下挥干溶剂，搅拌时间优选 2h~7d。

在 25℃进行方法(B)操作中可使用的溶剂的例子，包括但不限于：甲醇:水(1:2；

1:6)、乙醇:水(1:2；1:6)、异丙醇:水(1:2)、丙酮:水(2:9；1:4)、乙腈:水(2:5；1:4)、四氢呋喃:水(2:5；1:4)；若列举(3)50℃缓慢挥发法中使用溶剂的例子、包括甲醇:水(1:6)、乙醇:水(1:2)、异丙醇:水(1:2)、丙酮:水(2:9)、乙腈:水(2:5；1:4)、四氢呋喃:水(2:5)。其中原料与溶剂的质量体积比(g/L)为 10:1~1:100。

方法(B)中所述的搅拌平衡，优选根据需要进行搅拌，然后在 25℃和 50℃条件下挥干溶剂，挥干时间优选 2h~10d。

方法(C)反溶剂沉淀结晶法中所述两种在室温条件下溶解度相差很大的溶剂组合(溶剂/反溶剂)，包括水/甲醇，水/乙醇，水/异丙醇，水/丙酮，水/乙腈，水/四氢呋喃，等。其中原料与溶剂的质量体积比(g/L)为 10:1～1:100。

方法(C)中所述的加入反溶剂后析出沉淀的时间，设为 2h~2d。

通过本发明方法(A)、(B)或(C)可获得极高纯度的结晶 A，由高效液相色谱法确定其纯度可大于 99.8%。

PQQ 二钠盐结晶 B 的制备

PQQ 二钠盐结晶 B 可通过方法(A')混悬结晶法或方法(B')缓慢挥发法制得。例如，可通过在 25℃和 50℃进行方法(A')或(B')来制备结晶 B。本领域普通技术人员可根据常识对这些方法中的条件进行调整：

在 25℃进行方法(A')操作中可使用的溶剂的例子，包括但不限于：丙酮、异丙醇、异戊醇、乙酸乙酯、乙酸异丙酯、己烷、庚烷、甲基叔丁基醚、甲基异丁基酮、二氯甲烷、氯仿、四氢呋喃、甲苯、硝基甲烷、乙醚、甲乙酮、丙酮:乙烷(1:1)、甲乙酮:乙烷(1:1)、硝基甲烷:乙烷(1:1)、乙酸乙酯:乙烷(1:1)、甲基叔丁基醚:乙烷(1:1)、甲苯:乙烷(1:1)、丙酮:甲基叔丁基醚(1:1)、甲乙酮:甲基叔丁基醚(1:1)、乙腈:甲基叔丁基醚(1:1)、四氢呋喃:甲基叔丁基醚(1:1)、硝基甲烷:甲基叔丁基醚(1:1)、乙酸乙酯:甲基叔丁基醚(1:1)、丙酮:甲苯(1:1)、甲乙酮:甲苯(1:1)、四氢呋喃:甲苯(1:1)、硝基甲烷:甲苯(1:1)、乙酸乙酯:甲苯(1:1)、丙酮:甲基异丁基酮(1:1)、甲乙酮:甲基异丁基酮(1:1)、乙腈:甲基异丁基酮(1:1)、四氢呋喃:甲基异丁基酮(1:1)、硝基甲烷:甲基异丁基酮(1:1)、乙酸乙酯:甲基异丁基酮(1:1)、甲基叔丁基醚:甲基异丁基酮(1:1)、甲苯:甲基异丁基酮(1:1)。

在 50℃进行方法(A')操作中可使用的溶剂的例子，包括但不限于：丙酮、异丙醇、异戊醇、乙酸乙酯、乙酸异丙酯、甲基叔丁基醚、甲基异丁基酮、二氯甲烷、氯仿、四氢呋喃、甲苯、硝基甲烷、乙醚、甲乙酮、丙酮:乙烷(1:1)、甲乙酮:乙烷

(1:1)、四氢呋喃:乙烷(1:1)、硝基甲烷:乙烷(1:1)、乙酸乙酯:乙烷(1:1)、甲基叔丁基醚:乙烷(1:1)、丙酮:甲基叔丁基醚(1:1)、甲乙酮:甲基叔丁基醚(1:1)、四氢呋喃:甲基叔丁基醚(1:1)、硝基甲烷:甲基叔丁基醚(1:1)、乙酸乙酯:甲基叔丁基醚(1:1)、丙酮:甲苯(1:1)、甲乙酮:甲苯(1:1)、四氢呋喃:甲苯(1:1)、硝基甲烷:甲苯(1:1)、乙酸乙酯:甲苯(1:1)、丙酮:甲基异丁基酮(1:1)、甲乙酮:甲基异丁基酮(1:1)、乙腈:甲基异丁基酮(1:1)、四氢呋喃:甲基异丁基酮(1:1)、硝基甲烷:甲基异丁基酮(1:1)、乙酸乙酯:甲基异丁基酮(1:1)、甲基叔丁基醚:甲基异丁基酮(1:1)、甲苯:甲基异丁基酮(1:1)。其中原料与溶剂的质量体积比(g/L)为 100:1~1:1。

结晶 B 用方法(A')制备，在 25℃和 50℃条件下的搅拌平衡时，优选根据需要进行搅拌，然后在真空条件下挥干溶剂，搅拌时间优选 2h~7d。

在 25℃进行方法(B')操作中可使用的溶剂的例子，包括但不限于：异丙醇：水(1:4)等；在 50℃进行方法(B')操作中可使用的溶剂的例子，包括但不限于：四氢呋喃：水(1:4)。其中原料与溶剂的质量体积比(g/L)为 10:1~1:100。

方法(B')操作中搅拌平衡时，优选根据需要进行搅拌，然后在 25℃和 50℃条件下挥干溶剂，挥干时间优选 2h~10d。

PQQ 二钠盐晶体的鉴定和性质

本发明人在获得 PQQ 二钠盐晶体后进一步采用多种方式和仪器对其性质进行了研究。

“X 射线粉末衍射”，又称“X 射线多晶衍射(XRD 或 SRPD)”是目前用于测定晶体构造(即晶型)的常用试验方法。采用 X 射线粉末衍射仪，在 X 射线透过晶体时产生一系列衍射图谱，该图谱中不同的衍射线及其强度由一定结构的原子团所决定，由此确定晶体的具体晶型结构。

本发明的 PQQ 二钠盐晶体具有特定的晶体形态，其在 X 射线衍射图谱中具有特定的特征峰。

结晶 A 用 Cu-K α 射线衍射得到的 X-射线粉末衍射图谱在约如下的 2θ 角度有衍射峰：9.2°、 9.6°、11.6°、13.5°、14.9°、16.0°、18.2°、18.8°、19.4°、20.4°、21.9°、22.7°、23.2°、23.8°、25.6°、26. 4°、27.3°、28.4°、30.7°、31.7°、32. 4°、33.7°、35.0°、35.8°、36.7°、38.0°、38.6°(均为±0.2°)的 PQQ 二钠盐结晶。

结晶 B 用 Cu-K α 射线衍射得到的 X-射线粉末衍射图谱在约如下的 2θ 角度有衍射峰：8.1°、9.0°、10.1°、13.7°、16.4°、17.6°、18.2°、23.9°、25.8°、27.2°、31.0°、

39.5°(均为±0.2°)的 PQQ 二钠盐结晶。

以上 X 射线粉末衍射的衍射角 2θ 的测定，在以下的测定条件进行。

仪器型号：Bruker D8 advance

靶：Cu-K α(40kV，40mA)

样品到检测器距离：30 cm

扫描范围：3°-40°(2θ 值)

扫描步径：0.1 s

应理解，以上峰值也可以由其它安装有单色器的一般的 X 射线粉末衍射仪器观测到。此外，上述对于本发明中规定的结晶形状可能含有测定误差，因此，峰值只要在测定误差范围内，即认为合理。

也可采用差示量热扫描分析(DSC)、热重分析(TG)、红外扫描(IR)等常规方法对本发明的晶体进行表征和研究。

经研究，本发明的晶体 A 和晶体 B 可以是含水物(如二水合物)，其熔点在其分解温度以上，只要具有上述 X 射线粉末衍射的衍射角 2θ 的测定峰即可。

与已知结晶相比，本发明的晶体 A 和晶体 B 具有显著降低的吸湿性，使得本发明的晶体在应用和储存中不易吸湿形成诸如团块等不良形态，从而具有良好的稳定性和可加工性。

本发明晶体的应用

根据本领域中的现有常识，PQQ 具有促生长、抗炎、增锌降铅、防治肝脏疾病、减少白内障形成、抗癌、促进神经再生、防治心梗和动脉粥样硬化的药理作用，同时，PQQ 还可抑制食品中微生物生长，可以延长食物的保存时间。

因此，本发明的 PQQ 结晶 A 和结晶 B 能够与“药学上或生理学上或制剂学上可接受的载体”组合使用，作为多种组合物的有效成分，通过口服、喷涂、鼻腔内、或透皮等途径给予所需的对象。

本发明的组合物中 PQQ 二钠盐晶体 A 和/或 B 有效成分占组合物总重量的 0.001～99.9wt%；优选为组合物总重量的 1～95wt%，较优选为 5～90wt%，更优选 10～80wt%。余量为药学上可接受的载体以及其它添加剂等物质。

如本文所用，术语“药学上或生理学上或制剂学上可接受的载体”指用于保健品或药物制剂的载体，包括各种赋形剂和稀释剂，它们本身并不是必要的活性成

分，且施用后没有或没有过分的毒性。合适的载体是本领域普通技术人员所熟知的。 例如，药学上可接受的载体详细记载于《雷明顿药物科学》(Remington's Pharmaceutical Sciences，Mack Pub. Co.，N.J. 1991)。

在组合物中可接受的载体可含有液体，如水、盐水、甘油和乙醇。另外，这些载体中还可能存在辅助性的物质，如填充剂、崩解剂、润滑剂、助流剂、泡腾剂、润湿剂或乳化剂、矫味剂、pH 缓冲物质等。通常，可将这些物质配制于无毒的、惰性的和药学上可接受的水性载体介质中，其中 pH 通常约为 5-8，较佳地，pH 约为 6-8。本发明的组合物可选自：药物组合物、功能性食品、饲料、添加剂、微生物生长抑制剂和防腐剂。

另外，PQQ 结晶 A 或结晶 B 能够单独或与其它材料组合使用，所述其它材料包括但不限于：维生素类、氨基酸类、类胡萝卜素类、ω3 脂肪酸类、ω6 脂肪酸类、虾青素等。

可将本发明的结晶或组合物按照具体需要制成包装品，例如药盒、功能性食品套盒等，其中可包含：本发明的 PQQ 二钠盐晶体；任选的，其它活性物质、指导用户或医师使用该药盒的说明书、容器、赋形剂等，本领域技术人员可根据具体需要来确定其中的任选组分。

本发明的组合物或包装品还可包含具有选自下组的活性的一种或多种其它活性物质：促生长、抗炎、增锌降铅、防治肝脏疾病、减少白内障形成、抗癌、促进神经再生、防治心梗、动脉粥样硬化、解酒、预防/缓解或治疗老年痴呆、抑制微生物生长或延长食物保存时间。这些其它活性物质包括但不限于：维生素类、氨基酸类、类胡萝卜素类、ω3 脂肪酸类、ω6 脂肪酸类、虾青素等。

本发明的优点

本发明的优点主要在于：

1. 本发明中提供了 PQQ 二钠盐的两种新晶型，即结晶 A 和结晶 B；

2. 本发明的结晶 A、B 在结晶度、稳定性、吸湿性以及可加工性方面与已知 PQQ 二钠盐晶体或固体相比具有明显的优越性，因此在工业、医药和功能性食品等领域具有广泛的应用前景。

实施例

下面结合具体实施例，进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本

发明而不用于限制本发明的范围。本领域技术人员可对本发明做出适当的修改、变动，这些修改和变动都在本发明的范围之内。

下列实施例中未注明具体条件的实验方法，可采用本领域中的常规方法，例如参考《晶型药物》(吕扬、杜冠华主编，人民卫生出版社，2009 年)或按照供应商所建议的条件，也可由商业公司提供测试。以下实施例中所有试剂都可来源于市售。

除非另外说明，否则百分比和份数按重量计算。除非另行定义，文中所使用的所有专业与科学用语与本领域熟练人员所熟悉的意义相同。此外，任何与所记载内容相似或均等的方法及材料皆可应用于本发明方法中。文中所述的较佳实施方法与材料仅作示范之用。

参考例. PQQ 二钠盐的制备

通过如下操作得到 PQQ 二钠盐：

在 Corey 等人 1981 年报道的化学合成文献(J. Am. Chem. Soc., 1981, 103,5599～5600)的基础上，对合成工艺路线和条件进行优化改进，经九步反应得到 PQQ 二钠盐。

与 Corey 的文献相比，本发明所用方法优化改进之处主要在于：1)将催化氢化反应文献用的催化剂贵金属铂改为钯；2)将文献中重氮化偶联反应中的偶联试剂 2-甲基乙酰乙酸甲酯改为 2-甲基乙酰乙酸乙酯；3)将文献中酯水解反应先与原甲酸酯反应得到单缩酮再在碱性条件下水解得到最终产物，改进为直接在碱性条件下水解后调 pH 得到产物。

具体合成过程如下：

(1) 甲酰化反应：原料 2-甲氧基-5-硝基苯胺在甲酸和乙酸酐作用下氨基被甲酰化保护得到 N-(2-甲氧基-5-硝基苯基)甲酰胺；

(2) 催化氢化反应：氨基被甲酰化保护后的化合物在乙醇作溶剂，钯/炭作催化剂的条件下，芳环硝基被还原为氨基得到 N-(5-氨基-2-甲氧基苯基)甲酰胺；

(3) 重氮化偶联反应：在亚硝酸钠作用下氨基重氮化后形成氟硼酸重氮盐，氟硼酸重氮盐直接与 2-甲基乙酰乙酸乙酯偶联得到 2-{[(3-甲酰胺基-4-甲氧基)芳基]亚肼基}-丙酸乙酯；

(4) 成吡咯环反应：前一步产物在甲酸作用下形成吡咯环得到 6-甲酰氨基-5-甲氧基-1 氢-吲哚-2-羧酸乙酯；

(5) 甲酰胺水解反应：将第一步保护的甲酰胺基在酸性条件下酰胺键打开游离出氨基得到 6-氨基-5-甲氧基-1 氢-吲哚-2-羧酸乙酯；

(6) 成环反应：前一步游离出氨基的产物和 2-氧代戊烯二酸二甲酯反应成环得到 9-羟基-5-甲氧基-6,7,8,9-四氢-1 氢-吡咯[2,3-f]喹啉-2,7,9-三羧酸-2-乙酯-7,9-二甲酯；

(7) 喹啉环的形成：前一步产物在醋酸铜和酸性条件下形成喹啉环得到 5-甲氧基-1 氢-吡咯[2,3-f]喹啉-2,7,9-三羧酸-2-乙酯-7,9-二甲酯；

(8) 氧化反应：前一步产物在氧化剂作用下形成醌环得到 4,5-二氧-4,5-二氢化-1 氢-吡咯[2,3-f]喹啉-2,7,9-三羧酸-2-乙酯-7,9-二甲酯；

(9) 酯水解反应：PQQ 酯在碱性条件下三个酯基水解，水解完成后用 6mol/L 的盐酸将溶液 pH 调到 3.0，保持 3 小时后分离出固体即为 PQQ 二钠盐。

所得 PQQ 二钠盐原料即为结晶 C。

所得 PQQ 二钠盐用高效液相色谱法在如下所示条件下可测得纯度大于 99.0%：

仪器型号：UlTiMate3000，美国戴安

色谱柱：YMC-C18 250×4.6mm I.D.

流动相：乙腈：100mM 磷酸二氢钾=12：88，用磷酸调整 pH 为 2.0

检测波长：249nm

柱温：35℃

流速：1.0 ml/min

进样量：10μl

实施例 1. 用混悬结晶法制备 PQQ 二钠盐结晶 A 及所得结晶的性质研究

取按如上参考例方法制备的 10mg PQQ 二钠盐(纯度≥98，也可采用市购 sigma 公司 PQQ 二钠盐，货号：80198-10MG-F)，在 25℃和 50℃条件下与 1mL 乙腈搅拌平衡 5d，随后分别过滤溶液，固体部分在空气中干燥 10min，得到 PQQ 二钠盐结晶 A。

对所得 PQQ 二钠盐结晶 A 进行 X 射线粉末衍射分析(XRPD，图 1)、热重分析(TG，图 2)、差示扫描量热分析(DSC，图 3)和吸湿性分析(DVS，图 4)

1. X 射线粉末衍射谱图

在下面所示的条件下测定所得结晶的 X 射线粉末衍射谱图。在图 1 中表示结果。通过 X 射线粉末衍射使用 Cu-K α 放射线得到的 2θ 的峰在约：9.2°、9.6°、11.6°、

13.5°、14.9°、16.0°、18.2°、18.8°、19.4°、20.4°、21.9°、22.7°、23.2°、23.8°、25.6°、26.4°、27.3°、28.4°、30.7°、31.7°、32.4°、33.7°、35.0°、35.8°、36.7°、38.0°、38.6°(均为±0.2°)。

仪器型号：Bruker D8 advance

靶：Cu-K α(40kV，40mA)

样品到检测器距离：30 cm

扫描范围：3°-40°(2θ 值)

扫描步径：0.1 s

得到的固体是结晶性的。

2. 热重分析

TG(图 2)显示，结晶 A 在 30~200℃有 1.33%、6.02%两个失重(一个水分子的理论失重值为 4.6%)，可能是水合物，分解峰值温度 312.5℃。

仪器型号：Netzsch TG 209F3

温度范围：30-400℃

扫描速率：10K/min

吹扫气：25 mL/min

保护气：15 mL/min

3. 差示扫描量热分析

对应的 DSC(图 3)在该温度区间(30~200℃)有吸热峰出现，表明该晶体含水。并且，在升温范围内没有发现熔融现象，这表明其熔点可能在药物分解温度以上。

仪器型号：Perkin Elmer DSC 8500

温度范围：50-280℃

扫描速率：10℃/min

氮气流速：50ml/min

4. 吸湿性分析

DVS(图 4)显示，晶体 A 在 40%RH 吸收水分 1.6%，在 65%RH 吸收水分 2.3%，在 80%RH 吸收水分 2.8%。在常规存储环境中，40-80RH, 吸湿性变化小于 2%，仅略有吸湿性。

仪器型号：SMS DVS Intrinsic，0~95%RH，

温度：25℃

实施例 2. 用缓慢挥发法制备 PQQ 二钠盐结晶 A 及所得结晶的性质研究

准备 3mg PQQ 二钠盐两份(参考例中所制备)，分别与含 160μL 无水乙醇+560μL 水和含 160μL 无水乙醇+320μL 水的溶剂混匀，溶解，分别在 25℃和 50℃缓慢挥发至干，溶剂挥干后减压干燥得到 PQQ 二钠盐结晶 A。

在实施例 1 所述条件下检测所得结晶的 X 射线粉末衍射谱图，并进行热重分析、差示扫描量热分析和吸湿性分析，所得结果同实施例 1。

实施例 3. 用反溶剂沉淀结晶法制备 PQQ 二钠盐结晶 A 及所得结晶的性质研究

取 10mg PQQ 二钠盐(参考例中所制备)，溶解在 2mL 水中，并搅拌平衡。随后放入含有 6mL 无水乙醇的棕色玻璃瓶中，12h 后将析出沉淀。对过滤得到的固体进行加压干燥，得到 PQQ 二钠盐结晶 A。

在实施例 1 所述条件下检测所得结晶的 X 射线粉末衍射谱图，并进行热重分析、差示扫描量热分析和吸湿性分析，所得结果同实施例 1。

实施例 4. 用混悬结晶法制备 PQQ 二钠盐结晶 B 及所得结晶的性质研究

取 10mg PQQ 二钠盐(参考例中所制备)，在 25℃和 50℃条件下与 1mL 乙酸乙酯搅拌平衡 5d，随后分别过滤溶液，固体部分减压干燥得到 PQQ 二钠盐结晶 B。

采用实施例 1 所示条件，对所得 PQQ 二钠盐结晶 B 进行 X 射线粉末衍射分析(XRPD，图 5)、热重分析(TG，图 6)、差示扫描量热分析(DSC，图 7)和吸湿性分析(DVS，图 8)：

1. X 射线粉末衍射分析

测定所得结晶 B 的 X 射线粉末衍射谱图。在图 5 中表示结果。通过 X 射线粉末衍射使用 Cu-Kα 放射线得到的 2θ 的峰出现 8.1°、9.0°、10.1°、13.7°、16.4°、17.6°、18.2°、23.9°、25.8°、27.2°、31.0°、39.5°(均为±0.2°)。

2. 热重分析

TG(图 6)显示，结晶 B 在 30~200℃有 5.98%、6.21%两个失重区间(一个水分子的理论失重值 4.6%，一个乙酸乙酯的理论失重值 19.1%)，可能是水合物。分解峰值温度 303.3℃。

3. 差示扫描量热分析

对应的 DSC(图 7)在该温度区间有吸热峰出现，表明该晶体含水。并且，在升温范围内没有发现熔融现象，这表明晶体 B 的熔点可能在药物分解温度以上。

4. 吸湿性分析

DVS(图 8)显示，结晶 B 在 40%RH 吸收水分 7.3%，在 65%RH 吸收水分 11.0%，在 80%RH 吸收水分 12.0%。在相对湿度 20-40 范围内，形成一水合物；在相对湿度大于 50 范围内，形成二水合物；湿度进一步增加，可形成多水合物。

实施例 5. 用缓慢挥发法制备 PQQ 二钠盐结晶 B 及所得结晶的性质研究

准备 3mg PQQ 二钠盐两份，一份与含 160μL 异丙醇+960μL 水溶剂混匀，溶解，在 25℃挥发至干；一份与含 160μL 四氢呋喃+640μL 水溶剂混匀，溶解，在 50℃挥发。溶剂挥干之后减压干燥，得到 PQQ 二钠盐结晶 B。

在实施例 1 所述条件下检测所得结晶的 X 射线粉末衍射谱图，并进行热重分析、差示扫描量热分析和吸湿性分析，所得结果同实施例 4。

比较实施例 1. PQQ 二钠盐结晶 C 的制备及所得结晶的性质研究

PQQ 二钠盐结晶 C 的获得方法详见<参考例>。

采用实施例 1 所示条件，对所得 PQQ 二钠盐结晶 C 进行 X 射线粉末衍射分析(XRPD，图 9)、热重分析(TG，图 10)、差示扫描量热分析(DSC，图 11)和吸湿性分析(DVS，图 12)：

1. X 射线粉末衍射谱图

结晶 C 的 X 射线粉末衍射谱图，在图 9 中表示结果，通过 X 射线粉末衍射使用 Cu-Kα 射线得到的 2θ 的峰出现 8.2°、8.6°、9.0°、10.1°、13.7°、17.6°、18.2°、23. 9°、26.9°、27. 3°、28.3°、31.0°、31.6°、32.6°、39.4°、45.3°(为±0.2°)。

2. 热重分析

TG(图 10)显示，实验开始阶段就已经有明显失重，表面水分较多，另外，结晶 C 在 30~180℃有 4.37%、7.06%两个失重(一个水分子的理论失重值 4.6%)，可能是水合物。

3. 差示扫描量热分析

对应的 DSC(图 11)在该温度区间有吸热峰出现，表明该晶体含水。

4. 吸湿性分析

DVS(图 12)显示，结晶 C 极具引湿性，在常规储存湿度范围内，湿度变化幅度大，在 5-15%。在 40%RH 含水分 7.8%，在 65%RH 吸收水分 13.8%，在 80%RH 吸收水分 15.7%。初步推断：在相对湿度 20-40 范围内，形成一水合物；在相对湿

度大于 50 范围内，形成二水合物；湿度进一步增加，可形成多水合物。

比较实施例 2. 单晶数据向 X 射线粉末衍射结果转换

将非专利文献 1(JACS，111 卷，6822-6828)中报道的单晶的 X 射线接近结构解析的数据，对该结晶（结晶 D）引起的 X 射线粉末衍射的峰进行模拟。使用 origin 作图软件，在图 19 中表示结果。结果表明，其峰值与本发明的结晶位置不同(详见表 2)。

比较实施例 3. 专利文献 1 所述结晶

将专利文献 1 所述结晶 1（本发明所述结晶 E）的 X 射线粉末衍射与本发明结晶 A、B 比较。结果表明，其峰值与本发明的结晶位置不同（详见表 2）。

比较例 1. PQQ 二钠盐结晶 A 和 B 与结晶 C、D 和 E 的比较

通过 XRPD、TG、DSC、DVS、拉曼光谱(Raman)和红外光谱(IR)的方法比较实施例中所得的三种晶体(即结晶 A、B 和 C)，其中 XRPD、TG、DSC、DVS 测试方法如实施例 1 所述。

Raman 光谱

仪器型号：Thermo DXR Raman Microscope

曝光时间(秒)：2.0

激光：780nm

激光功率：50mW

激光：25μm 狭缝

IR

仪器型号：Nicolet FTIR 6700

解析：4.000

样品获得：2.0

光学速度：0.6329

光圈：100.00

检测器：DTGS KBr

分光镜：KBr

表 2、表 3 和叠加图(图 13-18)中总结了实施例 1 所得结晶 A、实施例 4 所得结晶 B、比较实施例 1 所得结晶 C、比较实施例 2 所得结晶 D，比较实施例 3 所述结晶 E(专利文献 1，申请号 CN201080031945)的比较结果。

1. 【表 2】(其中粗体表示与结晶 C 相比的特征峰)

晶型名称	PQQ 二钠盐结晶 A		PQQ 二钠盐结晶 B		PQQ 二钠盐结晶 C		结晶 D	结晶 E
结晶方法	实施例 1、2、3		实施例 4、5		比较实施例 1		比较实施例 2	专利文献 1
	2θ	峰强	**2θ**	峰强	**2θ**	峰强	**2θ**	**2θ**
					7.2°	166		
			8.1°	1404	8.2°	1028	7.9°	
					8.6°	584		
	9.2°	3520	**9.0°**	517	9.0°	1125		9.1°
	9.6°	406						
			10.1°	366	10.1°	1083	10.1°	10.3°
	11.6°	208						
	13.5°	550	**13.7°**	238	13.7°	913		13.8°
							14.2°	
	14.9°	798					14.9°	
							15.7°	
	16.0°	1021	**16.4°**	107			16.2°	
			17.6°	159	17.6°	284		17.7°
	18.2°	155	18.2°	291	18.2°	728		18.3°
	18.8°	449						
	19.4°	210						
	20.4°	573			20.7	121		
							21.4°	
	21.9°	595					21.8°	
	22.7°	132					22.4°	
							23.1°	
	23.2°	166			23.2	204	23.3°	
	23.8°	585	**23.9°**	582	23.9°	2701	24.1°	24.0°
							24.6°	
							24.8°	
	25.6°	192	25.8°	116	25.8	162		
	26.4°	753			26.9°	639	26.3°	
							26.8°	
	27.3°	3924	**27.2°**	511	27.3°	1466		27.4°
							27.8°	
	28.4°	1798			28.3°	266		
							29.2°	
							29.7°	
							30.1°	
	30.7°	340						
			31.0°	136	31.0°	351	31.3°	31.2°

	31.7°	101			31.6°	271		
	32.4°	207			32.6°	241	32.4°	
	33.7°	129					33.5°	
							34.1°	
							34.4°	
							34.8°	
	35.0°	97					35.0°	
	35.8°	488					36.0°	
	36.7°	181						
							37.8°	
	38.0°	441					38.1°	
	38.6°	277					38.5°	
			39.5°	98	39.4°	388	39.4°	39.5°
					45.3°	156		

2. 【表 3】

	晶型	溶剂含量(%)	引湿性	晶型稳定性
实施例 1	结晶 A	7.4	65%RH，吸水 2.3% 80%RH，吸水 2.8%	稳定
实施例 4	结晶 B	12.2	65%RH，吸水 11.0% 80%RH，吸水 12.0%	稳定
比较实施例 1	结晶 C	11.4%	65%RH，吸水 13.8% 80%RH，吸水 15.7%	转化为晶型 B

3. 各种晶型固体表征的叠加图分析

XRPD 叠加图(图 13A-C)显示：结晶 A 在 9.2°、9.6°、14.9°、16.0°等与结晶 B 和结晶 C 有明显差别，结晶 B 在 9.0°、10.1°、16.4°、23.9°、27.2°与结晶 C 峰强有明显差别。

TG 叠加图(图 14)显示：结晶 A、B、C 均有溶剂失重。

DSC 叠加图(图 15)显示：结晶 A、B、C 均有吸热峰出现，结晶 A、B、C 的熔点在药物分解温度以上。

DVS 叠加图(图 16)显示：三种晶型的引湿性不同，其中，结晶 A 的引湿性最小，在 80%RH 吸收水分 2.8%；结晶 B 引湿性中等，在 80%RH 吸收水分 12.0%；结晶 C 引湿性最大，在 80%RH 吸收水分 15.7%。

拉曼(Raman)光谱谱图叠加(图 17A-C)结果显示：结晶 A 在 1579.70 cm^{-1}、1539.20 cm^{-1}、1327.07 cm^{-1} 等处与结晶 B、结晶 C 有差别。

红外光谱(IR)谱图叠加(图 18A-C)：结晶 A 在 3072.05 cm^{-1}、1577.49 cm^{-1}、1295.93 cm^{-1} 等处与结晶 B、结晶 C 有差别。

比较例 2. 本发明的 PQQ 二钠盐结晶与现有技术文献所公开结晶的 XRPD 比较

根据专利文献 1 实施例 1 所述方法制得结晶 E，并与本发明的结晶 A 和 B 以及非专利文献 1(JACS，111 卷，6822-6828)中报道的单晶进行 XRPD 比较。这四种晶体的比较图如图 20 所示。

由该图可明显看出：结晶 A 在 9.6°、11.6°、14.9°、16.0°、18.8°、19.4°、19.9°、20.4°等与结晶 E 有明显差别。并且，结晶 A 和结晶 B 的图谱与 JACS 所述单晶也有明显差别。

比较例 3. 本发明的 PQQ 二钠盐结晶与结晶 E 的 DVS 及性质比较

如前所述，根据专利文献 1 实施例 1 所述方法制得结晶 E。采用前述实施例中所用 DVS 测试方法和条件获得结晶 E 的吸湿性分析图(如图 21 所示)，并将其吸湿性能与本发明的结晶 A 和结晶 B 进行比较(结果如图 22 所示)。

由图 21 可知：结晶 E 具有一定的引湿性。在 40%RH 吸收水分 11.8%，在 65%RH 吸收水分 13.0%，在 80%RH 吸收水分 13.6%。在常规存储环境中，40-80%RH，吸湿性变化小于 2%，略有吸湿性。

由图 22 中的 DVS 谱图叠加比较可以看出，三种晶型的引湿性不同。其中，结晶 A 的引湿性最小，在湿度 80%时吸水约 3.3%；结晶 B 引湿性较大，在湿度 80%时吸水约 12.0%；结晶 E 引湿性最大，在湿度 80%时吸水约 13.6%。结晶 A 本发明晶体的引湿性优于现有技术的结晶 E，且结晶 A 性能尤为优异。

综上实施例中的结果表明：

本发明的结晶 A、B 通过 X 射线粉末衍射使用 Cu-K α 放射线得到的 2θ 值是全新的，提示本发明的结晶型是新型的。

并且，本发明的结晶 A、B 在结晶度、稳定性、吸湿性以及可加工性方面具有明显的优越性，因此在工业、医药和功能性食品等领域具有广泛的应用前景。

在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考，就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解，在阅读了本发明的上述讲授内容之后，本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改或对本文所描述的特征进行组合，这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

权 利 要 求

1. 一种吡咯并喹啉醌的二钠盐结晶 A，其特征在于，所述结晶 A 用 Cu-K α 射线衍射得到的 X-射线粉末衍射图谱在如下的 2θ 角度有衍射峰：9.6±0.2°、11.6±0.2°、14.9±0.2°、16.0±0.2°、18.8±0.2°、19.4±0.2°、20.4±0.2°、21.9±0.2°、22.7±0.2°、23.2±0.2°、25.6±0.2°、33.7±0.2°、35.0±0.2°、35.8±0.2°、36.7±0.2°、38.0±0.2°、38.6±0.2°。

2. 如权利要求 1 所述的二钠盐结晶 A，其特征在于，所述结晶 A 用 Cu-K α 射线衍射得到的 X-射线粉末衍射图谱在如下的 2θ 角度有衍射峰：9.2±0.2°、 9.6±0.2°、11.6±0.2°、13.5±0.2°、14.9±0.2°、16.0±0.2°、18.2±0.2°、18.8±0.2°、19.4±0.2°、20.4±0.2°、21.9±0.2°、22.7±0.2°、23.2±0.2°、23.8±0.2°、25.6±0.2°、26. 4±0.2°、27.3±0.2°、28.4±0.2°、30.7±0.2°、31.7±0.2°、32. 4±0.2°、33.7±0.2°、35.0±0.2°、35.8±0.2°、36.7±0.2°、38.0±0.2°、38.6±0.2°。

3. 如权利要求 1 所述的二钠盐结晶 A，其特征在于，所述结晶 A 用 Cu-K α 射线衍射得到的 X-射线粉末衍射图谱基本上如图 1 所示。

4. 一种吡咯并喹啉醌的二钠盐结晶 B，其特征在于，所述结晶 B 用 Cu-K α 射线衍射得到的 X-射线粉末衍射图谱在如下的 2θ 角度有衍射峰：8.1±0.2°、9.0±0.2°、10.1±0.2°、13.7±0.2°、16.4±0.2°、17.6±0.2°、18.2±0.2°、23.9±0.2°、25.8±0.2°、27.2±0.2°、31.0±0.2°、39.5±0.2°。

5. 如权利要求 4 所述的二钠盐结晶 B，其特征在于，所述结晶 B 用 Cu-K α 射线衍射得到的 X-射线粉末衍射图谱基本上如图 5 所示。

6. 制备权利要求 1～3 中任一项所述的二钠盐结晶 A 的方法，其特征在于，所述制备方法选自下组：

(A) 混悬结晶法：在 20℃～60℃温度范围内，将吡咯并喹啉醌二钠盐与溶剂搅拌至平衡得到混悬液，过滤得到所述二钠盐结晶 A；

(B) 缓慢挥发法：将吡咯并喹啉醌二钠盐与溶剂搅拌、混匀至溶解，并在 20℃～60℃的条件下将溶剂挥干，得到所述二钠盐结晶 A；

(C) 反溶剂沉淀结晶法：在 20～60℃的温度范围下，将吡咯并喹啉醌二钠盐溶解在高溶解度溶剂中，在所得体系中加入低溶解度反溶剂以析出所述二钠盐结晶 A，

其中，25℃下，吡咯并喹啉醌二钠盐在所述高溶解度溶剂中的溶解度≥0.35 g/100g 溶剂，吡咯并喹啉醌二钠盐在所述低溶解度反溶剂中的溶解度≤0.15 g/100g 溶剂。

7. 如权利要求 6 所述的方法，其特征在于，所述方法(A)、(B)和(C)中所用的溶剂分别选自下组，其中的比例为体积比：

方法(A)：乙腈、甲醇、乙醇、水、乙烷、庚烷、甲醇:水、乙醇:水、丙酮:水、乙腈:水、四氢呋喃:水、甲醇:己烷、乙醇:己烷、乙腈:己烷、四氢呋喃:己烷、甲醇:甲基叔丁基醚、乙醇:甲基叔丁基醚、甲醇:甲苯、乙醇:甲苯、乙腈:甲苯、甲醇:甲基异丁基酮、甲苯:乙烷，其中各混合溶剂中各溶剂的体积比为 5:1~1:5，优选 2:1~1:2，更优选 1:1；

方法(B)：甲醇:水、乙醇:水、异丙醇:水、丙酮:水、乙腈:水、四氢呋喃:水，其中各混合溶剂中各溶剂的体积比为 10:1~1:10，优选 5:1~1:5；

方法(C)中的高溶解度溶剂为水，低溶解度反溶剂选自：甲醇、乙醇、异丙醇、丙酮、乙腈和四氢呋喃。

8. 制备权利要求 4～5 中任一项所述的二钠盐结晶 B 的方法，其特征在于，所述制备方法选自下组：

(A') 混悬结晶法：在 20℃～60℃温度范围内，将吡咯并喹啉醌二钠盐与溶剂搅拌至平衡得到混悬液，过滤得到所述二钠盐结晶 B；或

(B') 缓慢挥发法：将吡咯并喹啉醌二钠盐与溶剂搅拌、混匀至溶解，并在 20℃～60℃的条件下将溶剂挥干，得到所述二钠盐结晶 B。

9. 如权利要求 8 所述的方法，其特征在于，所述方法(A')和(B')中所用的溶剂分别选自下组，其中的比例为体积比：

方法(A')：丙酮、异丙醇、异戊醇、乙酸乙酯、乙酸异丙酯、己烷、庚烷、甲基叔丁基醚、甲基异丁基酮、二氯甲烷、氯仿、四氢呋喃、甲苯、硝基甲烷、乙醚、甲乙酮、丙酮:乙烷、甲乙酮:乙烷、硝基甲烷:乙烷、乙酸乙酯:乙烷、甲基叔丁基醚:乙烷、甲苯:乙烷、丙酮:甲基叔丁基醚、甲乙酮:甲基叔丁基醚、乙腈:甲基叔丁基醚、四氢呋喃:甲基叔丁基醚、硝基甲烷:甲基叔丁基醚、乙酸乙酯:甲基叔丁基醚、丙酮:甲苯、甲乙酮:甲苯、四氢呋喃:甲苯、硝基甲烷:甲苯、乙酸乙酯:甲苯、丙酮:甲基异丁基酮、甲乙酮:甲基异丁基酮、乙腈:甲基异丁基酮、四氢呋喃:甲基异丁基酮、硝基甲烷:甲基异丁基酮、乙酸乙酯:甲基异丁基酮、甲基叔丁基醚:甲基异丁基酮、甲苯:甲基异丁基酮、四氢呋喃:乙烷，其中各混合溶剂中各溶剂的体积比为 5:1~1:5，优选 2:1~1:2，更优选 1:1；

方法(B')：异丙醇:水、四氢呋喃:水，其中各混合溶剂中各溶剂的体积比为 10:1~1:10，优选 5:1~1:5，更优选 4:1~1:4。

10. 一种组合物或包装品，其包含：

(I) 权利要求 1～3 中任一项所述的吡咯并喹啉醌的二钠盐结晶 A、权利要求 4～5 中任一项所述的吡咯并喹啉醌的二钠盐结晶 B、通过权利要求 6～7 中任一项所述的方法制备的吡咯并喹啉醌的二钠盐结晶 A 和/或通过权利要求 8～9 中任一项所述的方法制备的吡咯并喹啉醌的二钠盐结晶 B；

(II) 药学上、生理学上或制剂学上可接受的载体和/或辅料。

11. 如权利要求 10 所述的组合物或包装品，其特征在于，所述组合物或包装品选自下组：药物组合物、功能性食品、饲料、添加剂、微生物生长抑制剂和防腐剂。

12. 权利要求 1～3 中任一项所述的吡咯并喹啉醌的二钠盐结晶 A、权利要求 4～5 中任一项所述的吡咯并喹啉醌的二钠盐结晶 B、通过权利要求 6～7 中任一项所述的方法制备的吡咯并喹啉醌的二钠盐结晶 A 和/或通过权利要求 8～9 中任一项所述的方法制备的吡咯并喹啉醌的二钠盐结晶 B 的用途，其特征在于，其用于制备用于预防、缓解或治疗选自下组的疾病或症状的药物组合物或功能性食品：

促生长、抗炎、增锌降铅、防治肝脏疾病、减少白内障形成、抗癌、促进神经再生、防治心梗、动脉粥样硬化、解酒、老年痴呆、微生物感染。

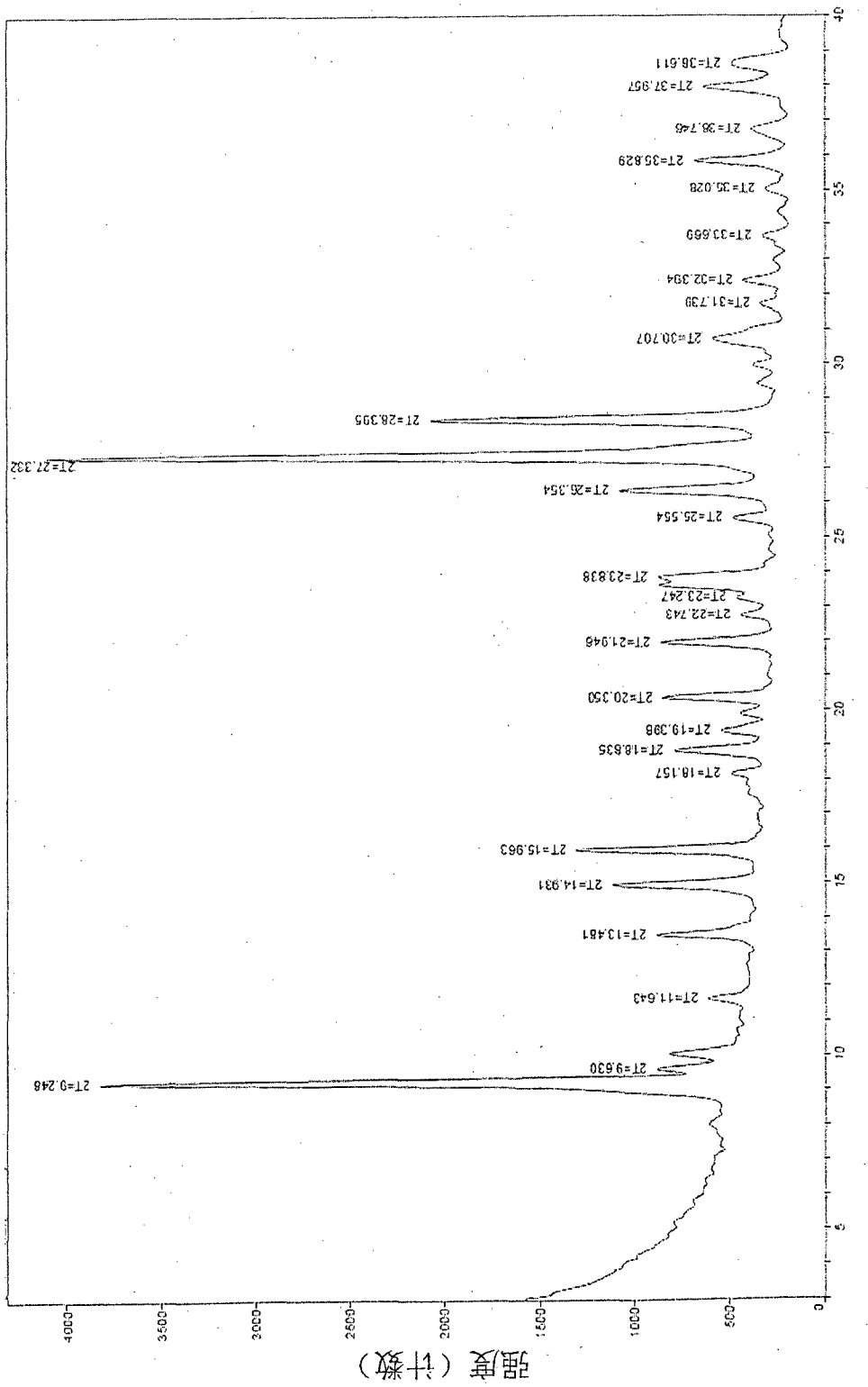

2T=9.248
2T=9.630
2T=11.643
2T=13.481
2T=14.931
2T=15.963
2T=18.157
2T=18.835
2T=19.398
2T=20.350
2T=21.946
2T=22.743
2T=23.247
2T=23.838
2T=25.554
2T=26.354
2T=27.332
2T=28.355
2T=30.707
2T=31.739
2T=32.394
2T=33.669
2T=35.028
2T=35.829
2T=36.746
2T=37.957
2T=38.611
强度（计数）
2θ(°)

图 1

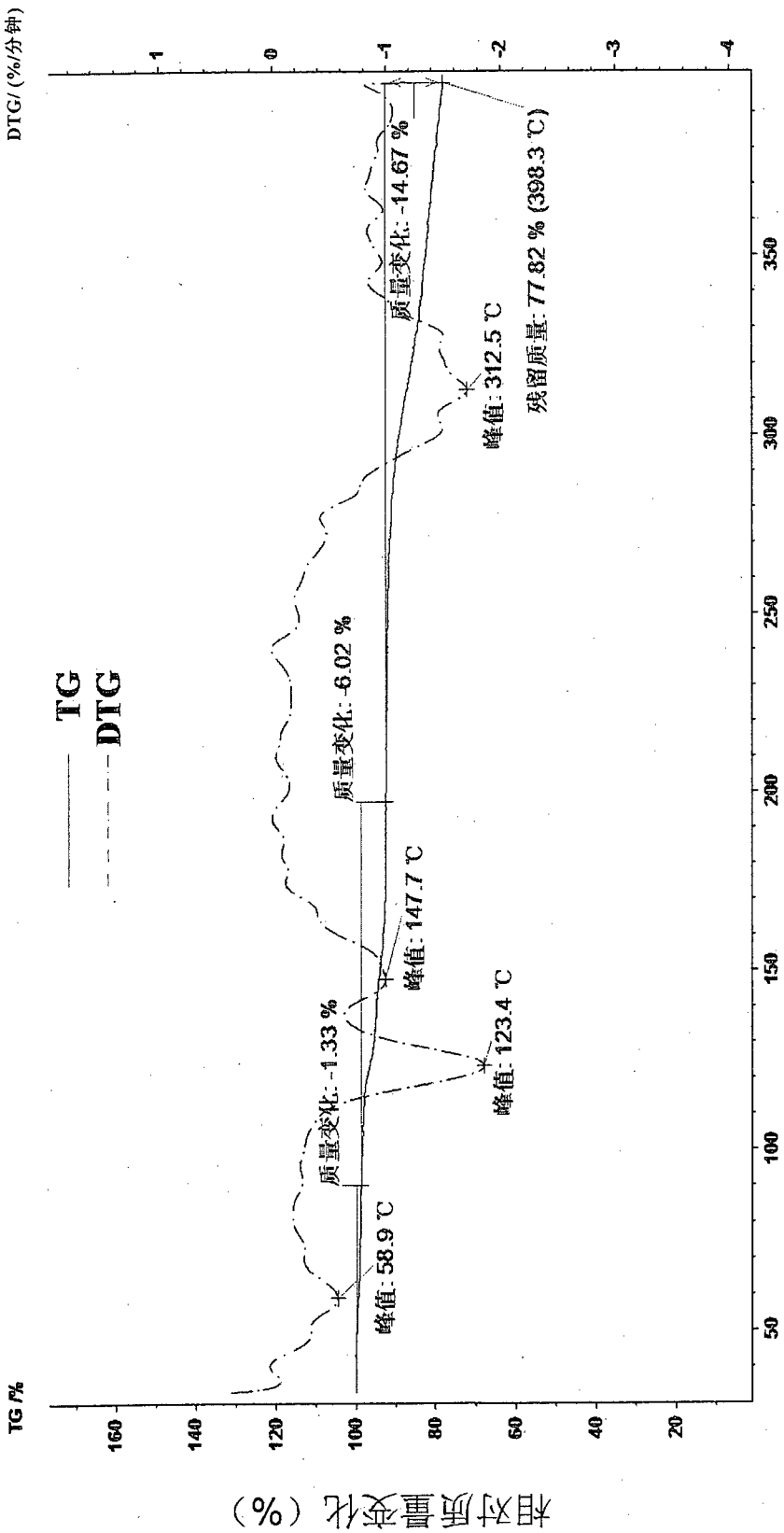

TG
DTG
TG /%
DTG/ (%/分钟)
温度℃
相对质量变化（%）
质量变化: -1.33 %
峰值: 58.9 ℃
质量变化: -6.02 %
峰值: 147.7 ℃
峰值: 123.4 ℃
质量变化: -14.67 %
峰值: 312.5 ℃
残留质量: 77.82 % (398.3 ℃)

图 2

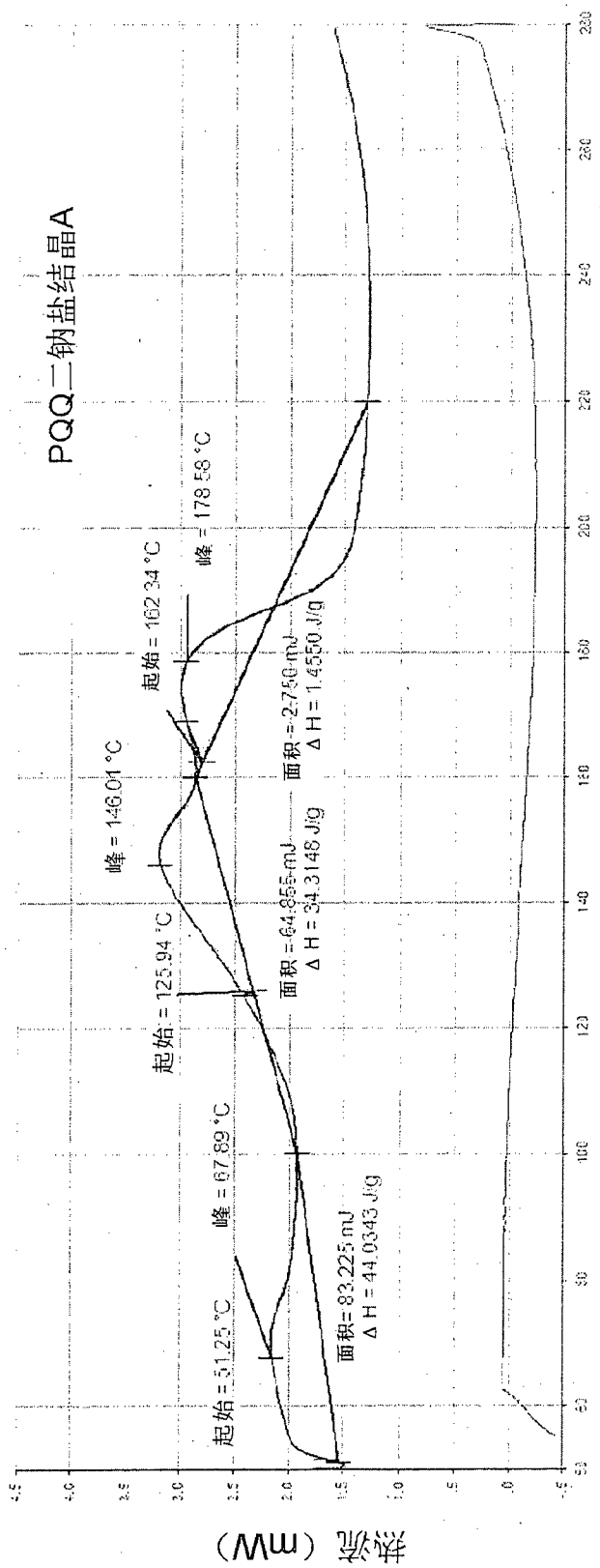

PQQ二钠盐结晶A
起始 = 31.25 °C
峰 = 67.89 °C
面积= 83.225 mJ
Δ H = 44.0343 J/g
起始 = 125.94 °C
峰 = 146.01 °C
面积 = 64.855 mJ
Δ H = 34.3148 J/g
起始 = 162.34 °C
峰 = 178.58 °C
面积 = 2.750 mJ
Δ H = 1.4550 J/g
热流（mW）
温度°C

图 3

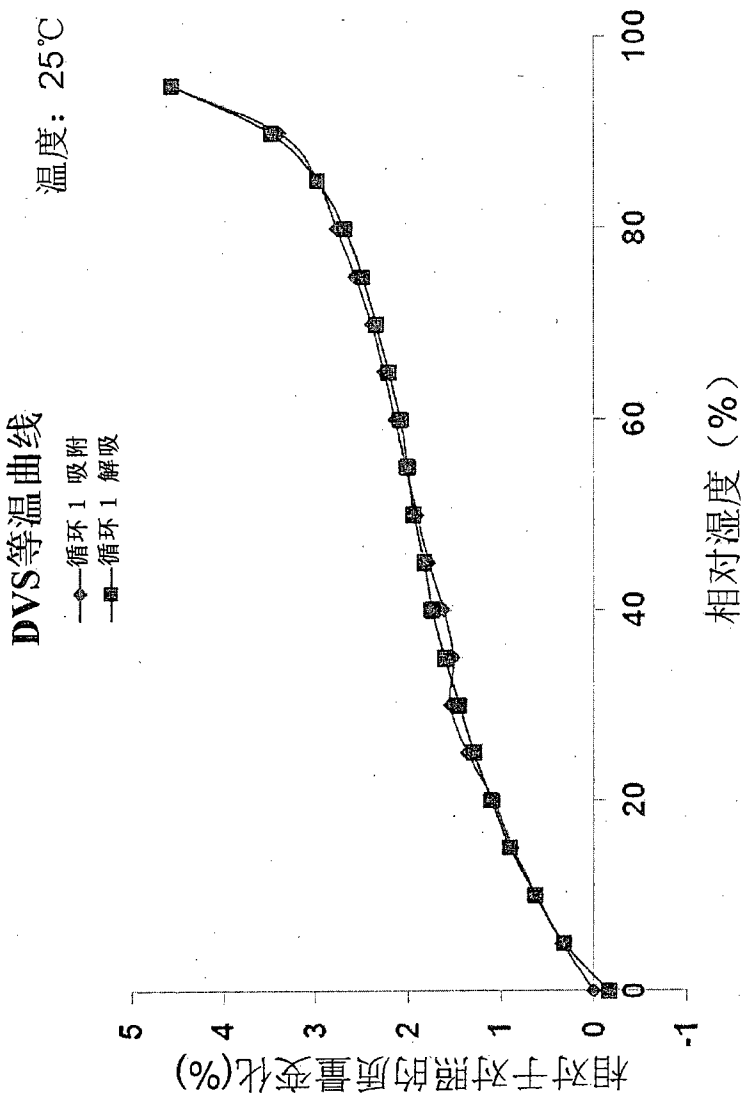

DVS等温曲线
温度：25℃
循环 1 吸附
循环 1 解吸
相对于对照的质量变化(%)
5
4
3
2
1
0
-1
0
20
40
60
80
100
相对湿度（%）

图 4

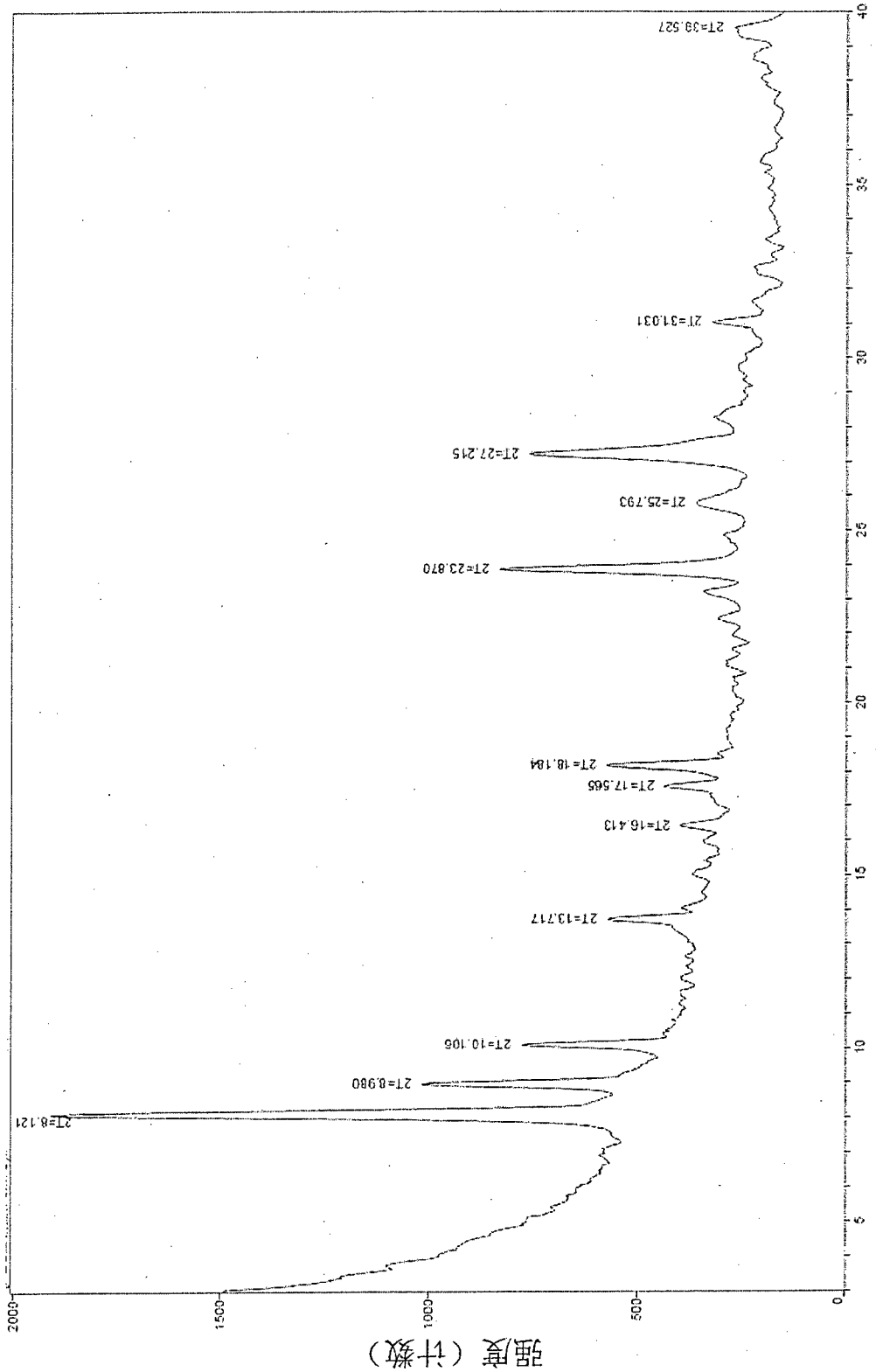

2T=8.121
2T=8.980
2T=10.105
2T=13.717
2T=16.413
2T=17.565
2T=18.184
2T=23.870
2T=25.793
2T=27.215
2T=31.031
2T=39.527
强度（计数）
2θ(°)

图 5

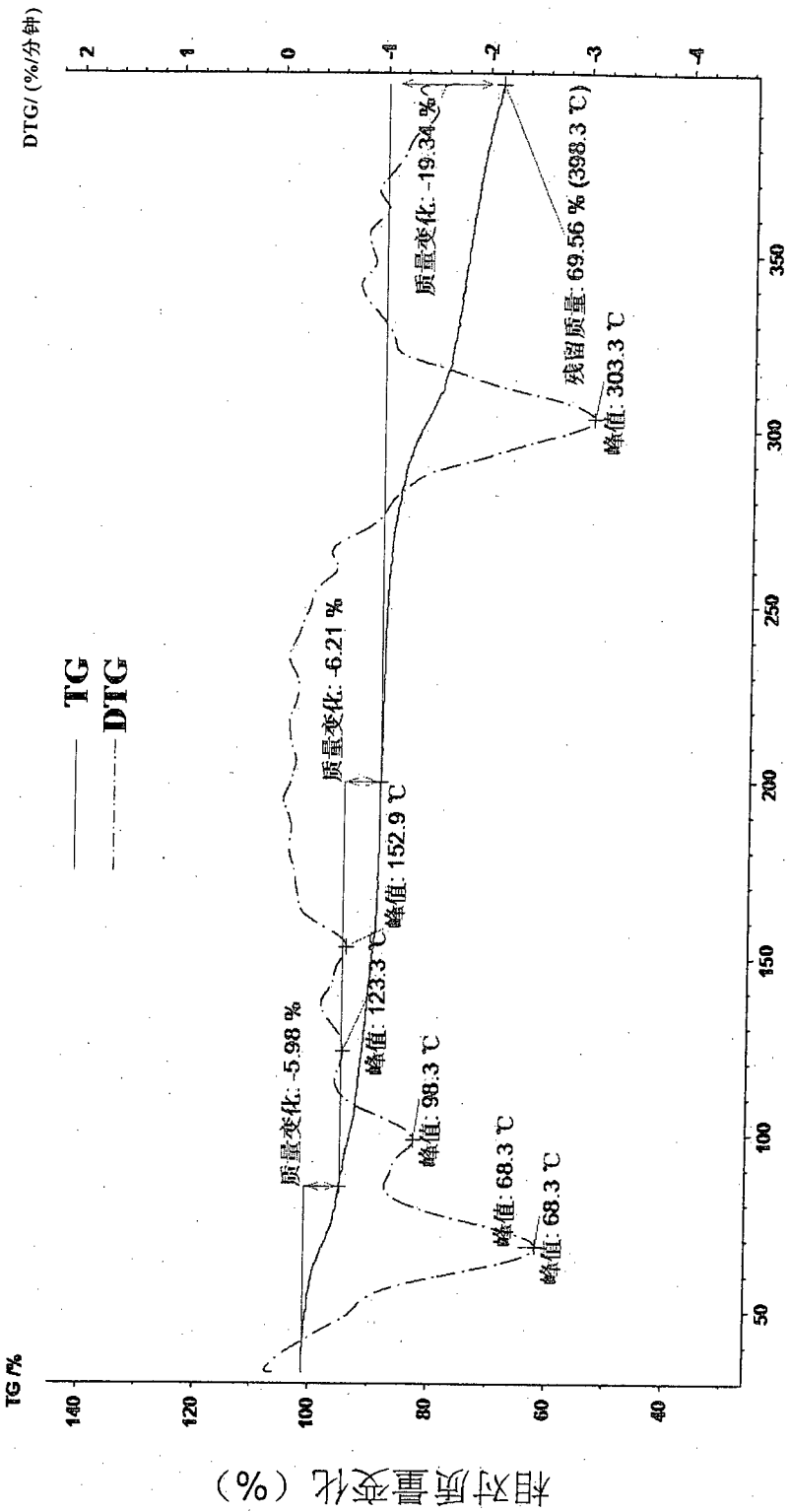

DTG/ (%/分钟)
TG /%
TG
DTG
质量变化: -5.98 %
峰值: 123.3 ℃
质量变化: -6.21 %
峰值: 152.9 ℃
质量变化: -19.34 %
残留质量: 69.56 % (398.3 ℃)
峰值: 303.3 ℃
峰值: 98.3 ℃
峰值: 68.3 ℃
峰值: 68.3 ℃
相对质量变化（%）
温度℃

图 6

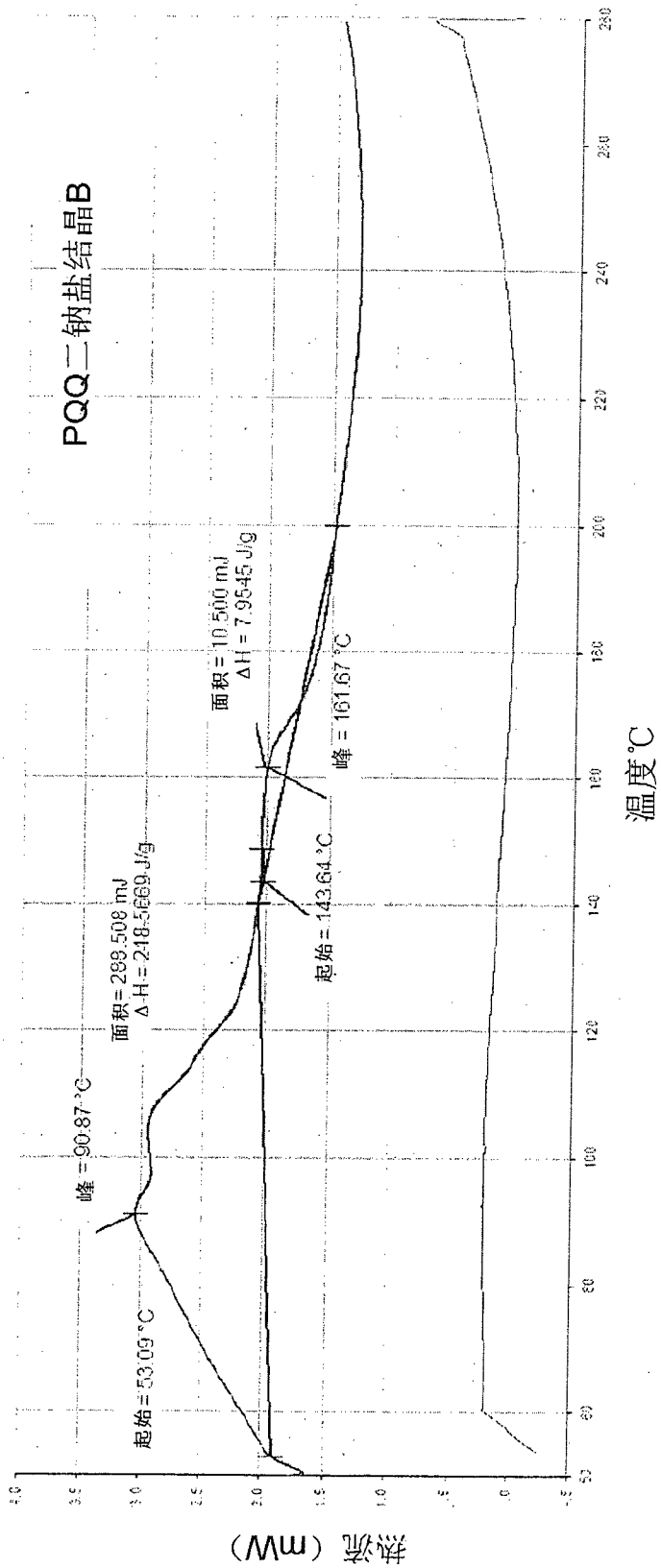

PQQ二钠盐结晶B
峰 = 90.87 °C
面积 = 289.508 mJ
ΔH = 218.5669 J/g
起始 = 53.09 °C
面积 = 10.500 mJ
ΔH = 7.9545 J/g
峰 = 161.67 °C
起始 = 143.64 °C
热流 (mW)
温度°C

图 7

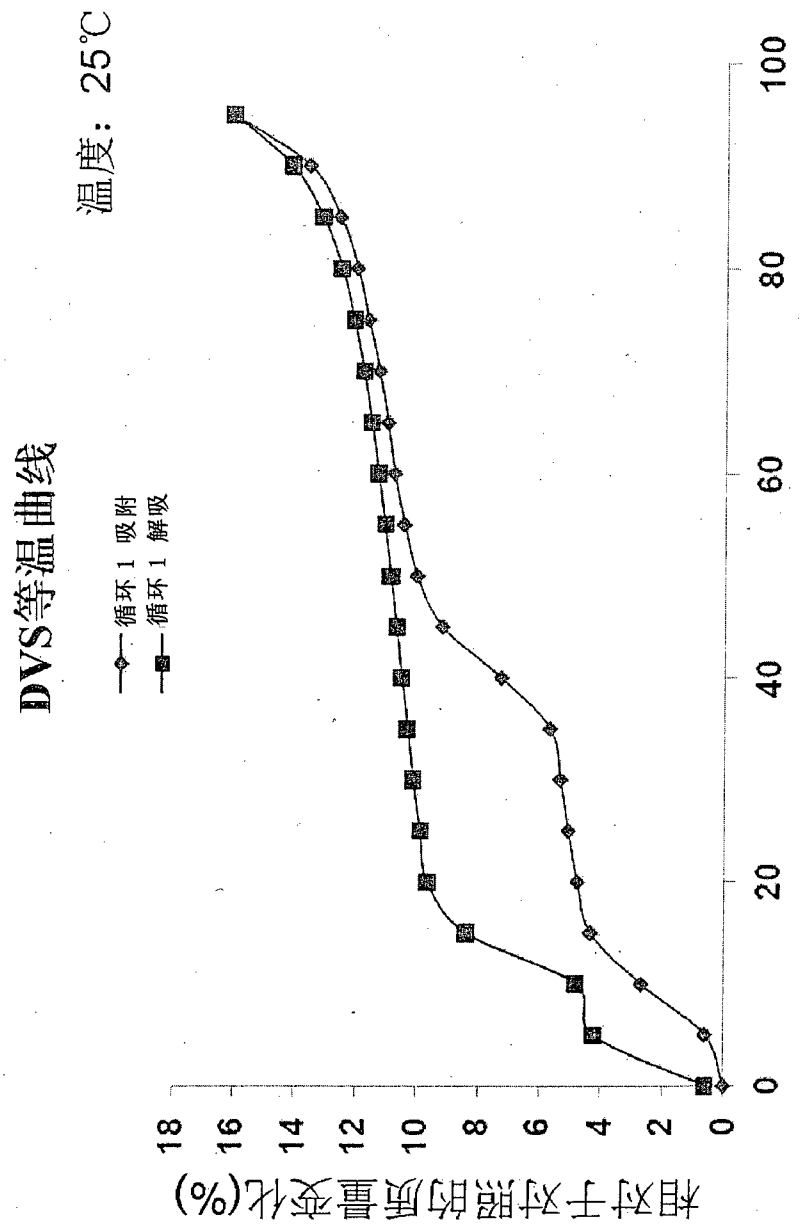

DVS等温曲线
温度：25℃
循环 1 吸附
循环 1 解吸
相对于对照的质量变化(%)
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
0
20
40
60
80
100
相对湿度（%）

图 8

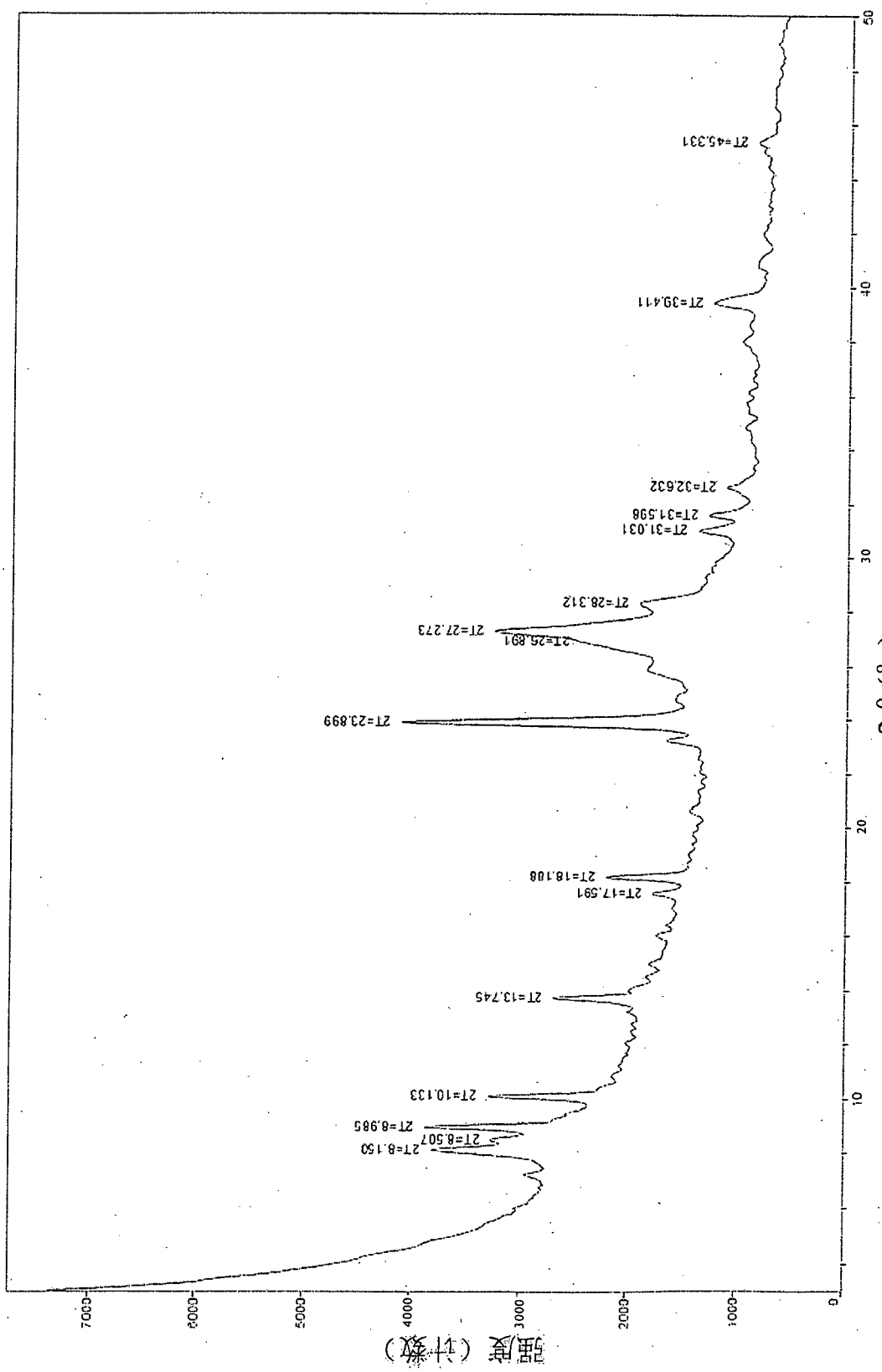

2T=8.150
2T=8.507
2T=8.985
2T=10.133
2T=13.745
2T=17.591
2T=18.108
2T=23.899
2T=25.891
2T=27.273
2T=28.312
2T=31.031
2T=31.598
2T=32.632
2T=39.411
2T=45.331
强度（计数）
2θ(°)

图 9

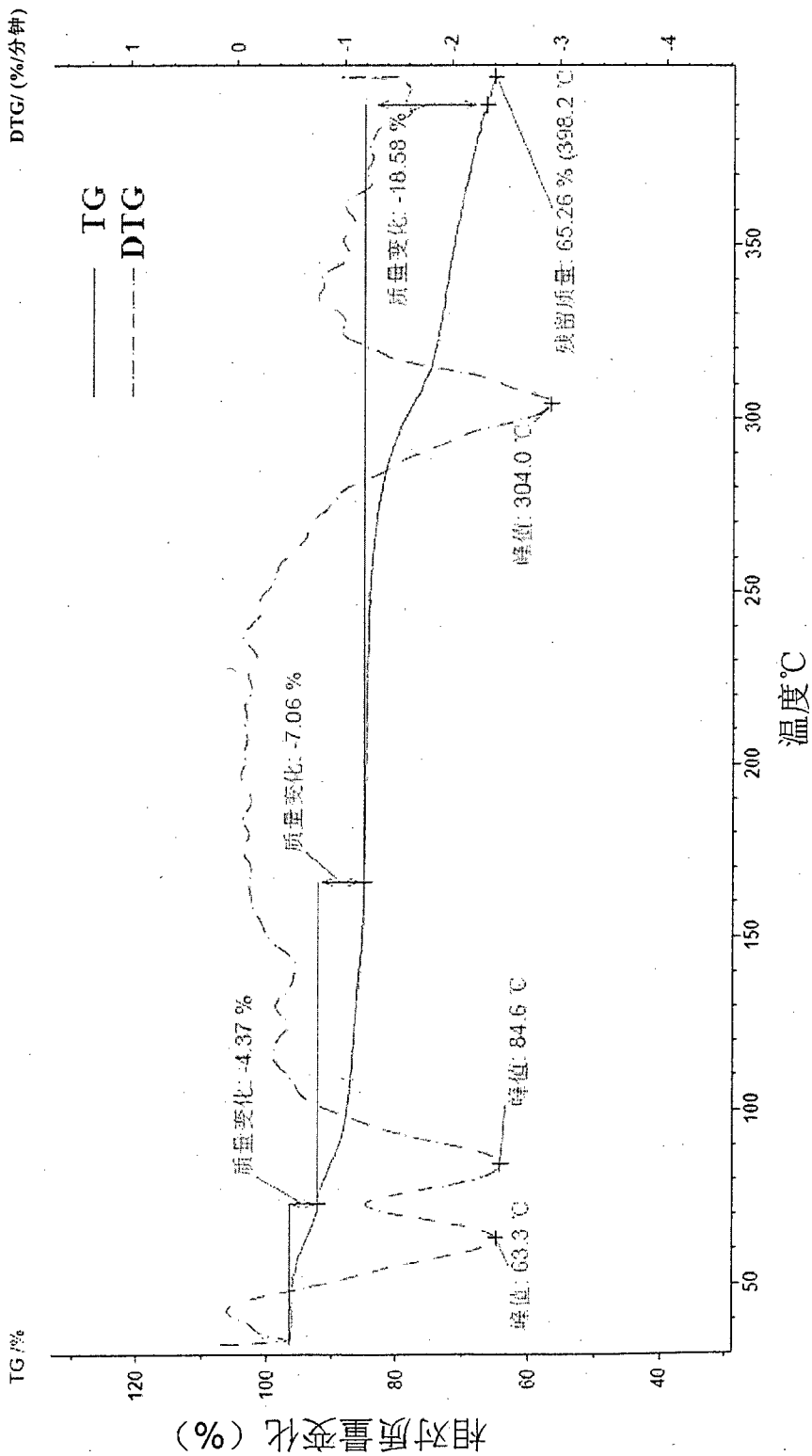

TG
DTG
DTG/ (%/分钟)
TG /%
温度℃
相对质量变化（%）
质量变化: -4.37 %
峰值: 63.3 ℃
质量变化: -7.06 %
峰值: 84.6 ℃
质量变化: -18.58 %
峰值: 304.0 ℃
残留质量: 65.26 % (398.2 ℃)

图 10

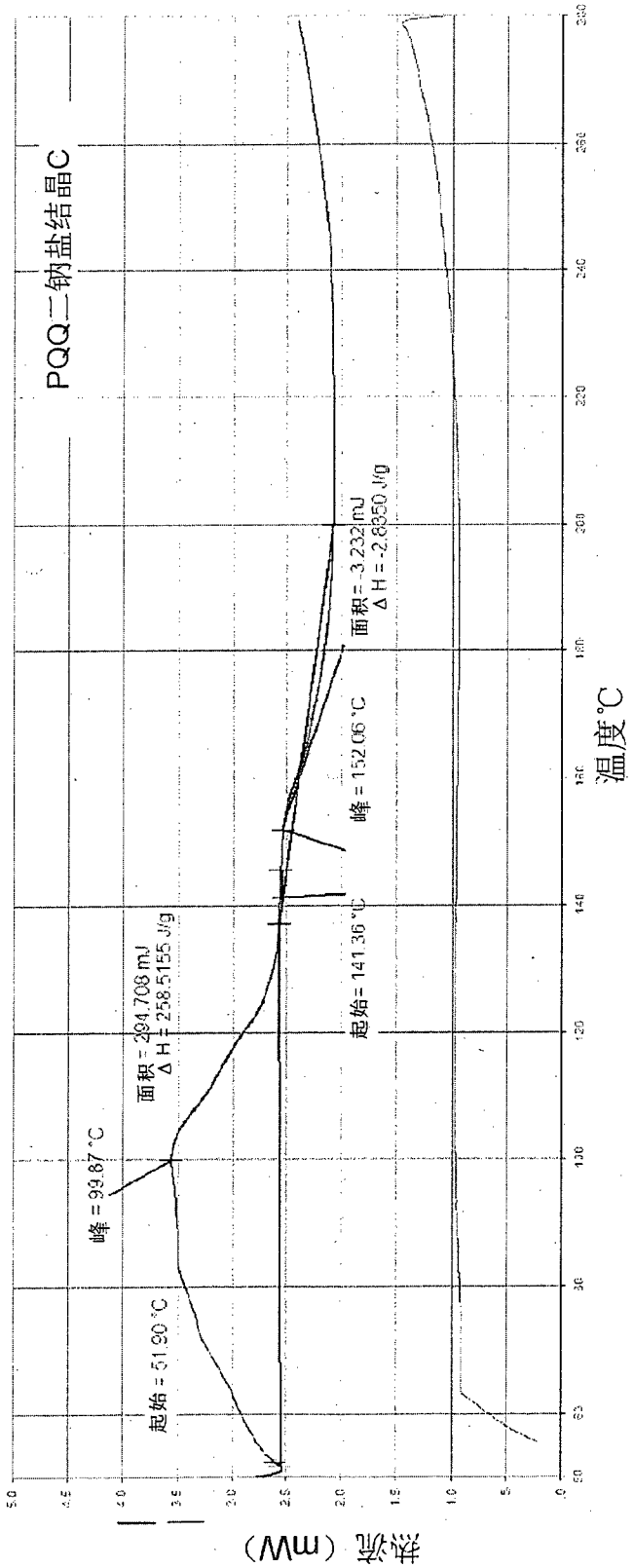

PQQ二钠盐结晶C
峰 = 99.87 °C
面积 = 294.708 mJ
ΔH = 258.5155 J/g
起始 = 51.90 °C
起始= 141.36 °C
峰 = 152.06 °C
面积 = -3.232 mJ
ΔH = -2.8350 J/g
热流（mW）
温度°C

图 11

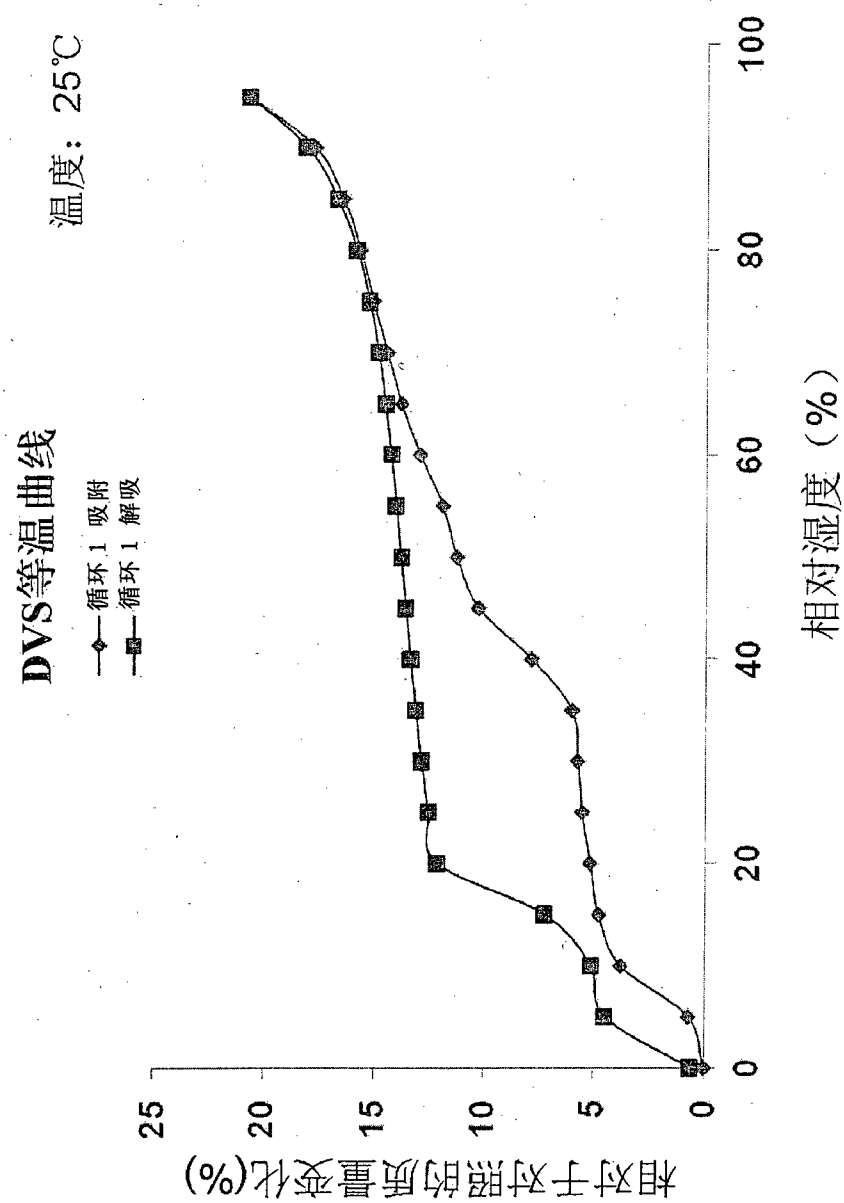

DVS等温曲线
温度：25℃
循环 1 吸附
循环 1 解吸
相对于对照的质量变化(%)
0
5
10
15
20
25
0
20
40
60
80
100
相对湿度（%）

图 12

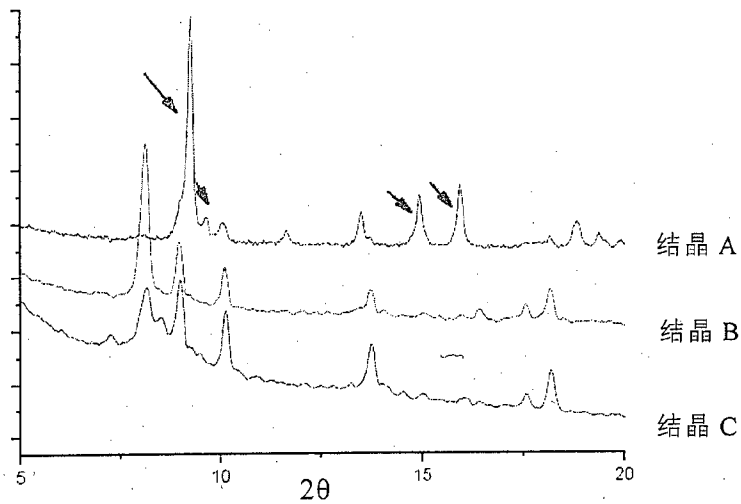


图 13A

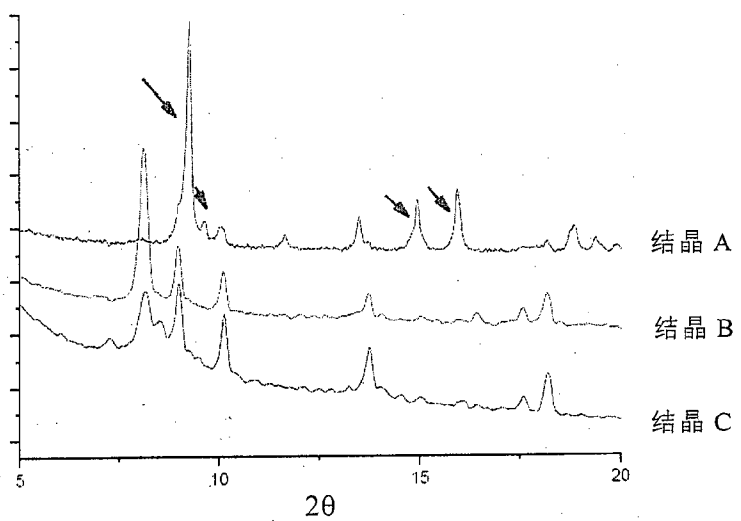


图 13B

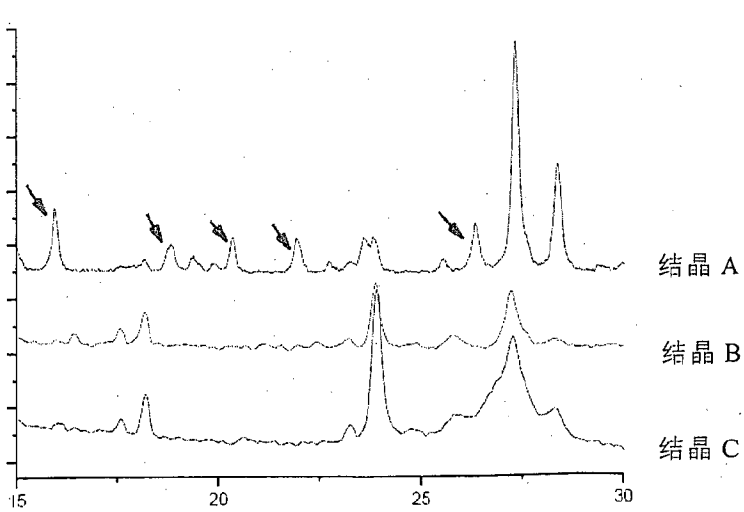


图 13C

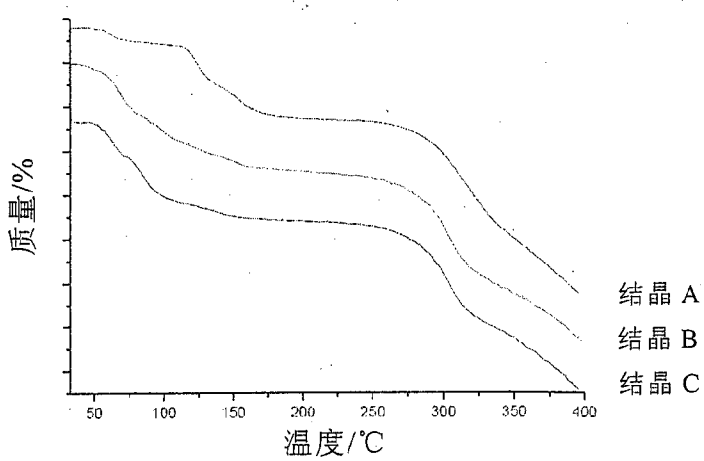

质量/%
50
100
150
200
250
300
350
400
温度/℃
结晶 A
结晶 B
结晶 C

图 14

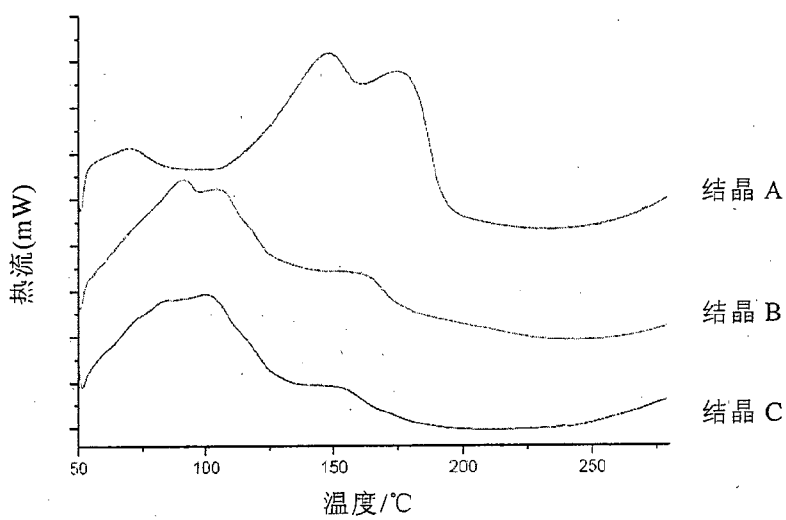

热流(mW)
50
100
150
200
250
温度/℃
结晶 A
结晶 B
结晶 C

图 15

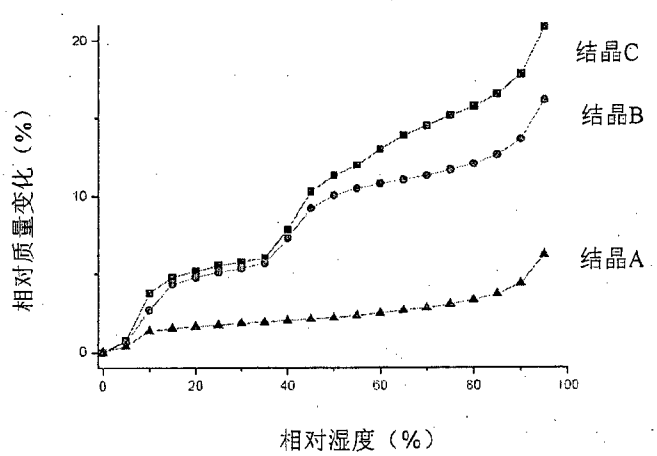

相对质量变化（%）
0
10
20
0
20
40
60
80
100
相对湿度（%）
结晶C
结晶B
结晶A

图 16

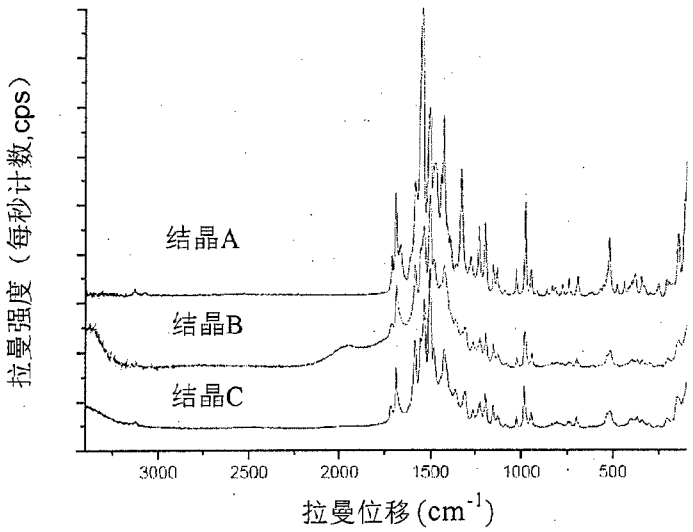


图 17A

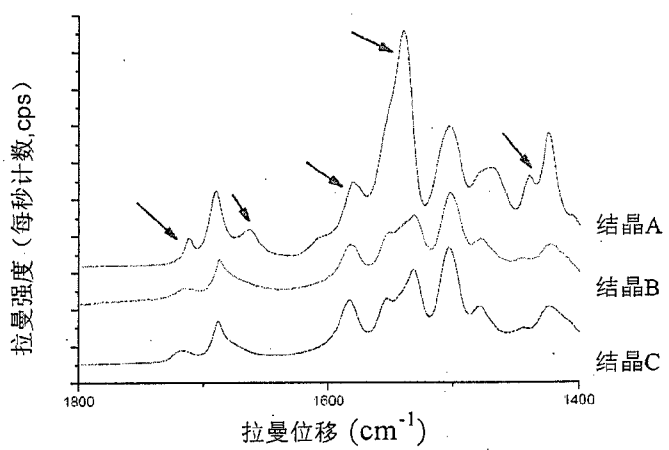


图 17B

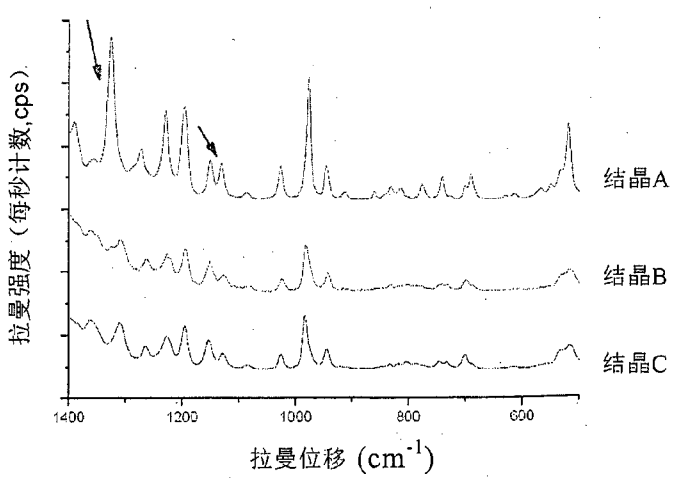


图 17C

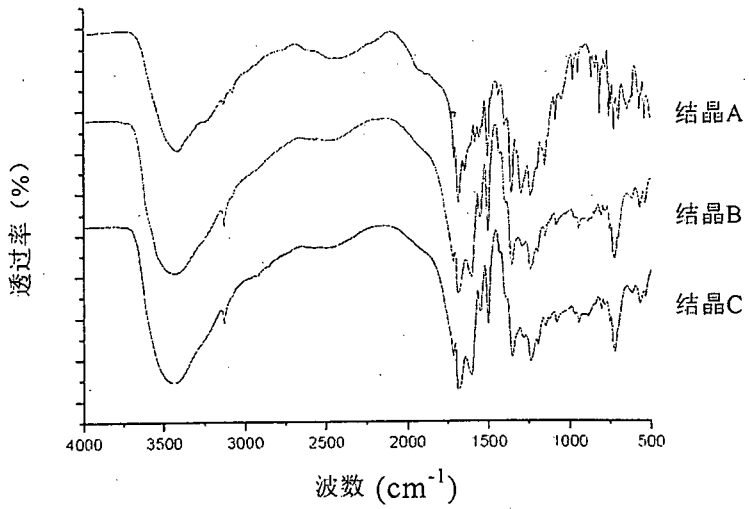


图 18A

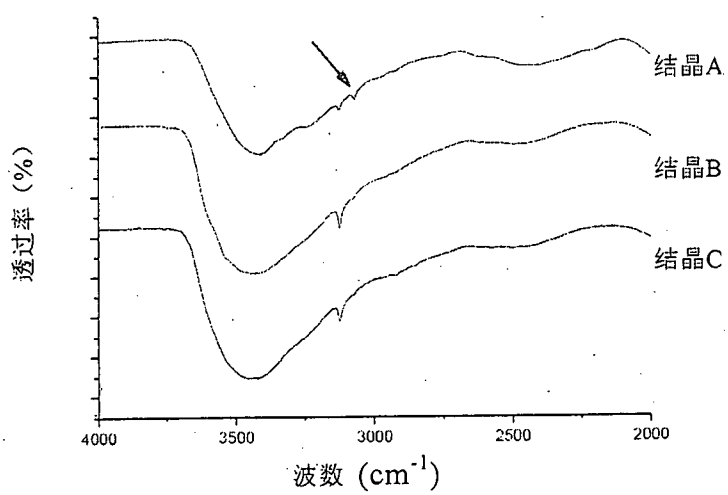


图 18B

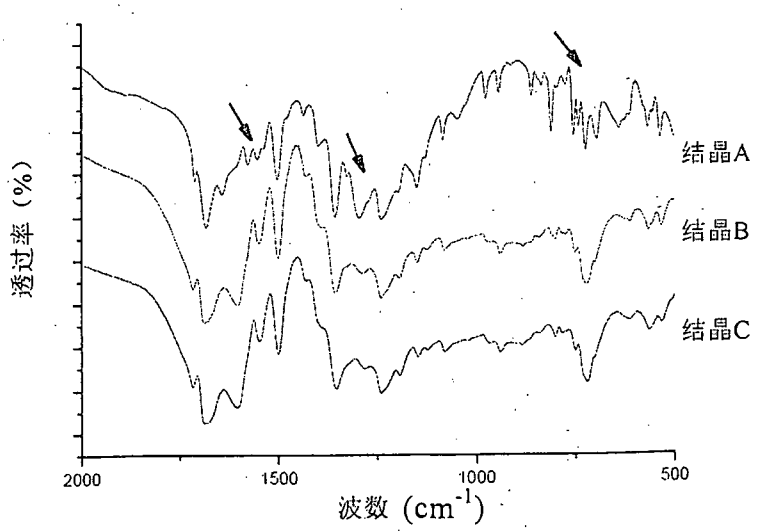


图 18C

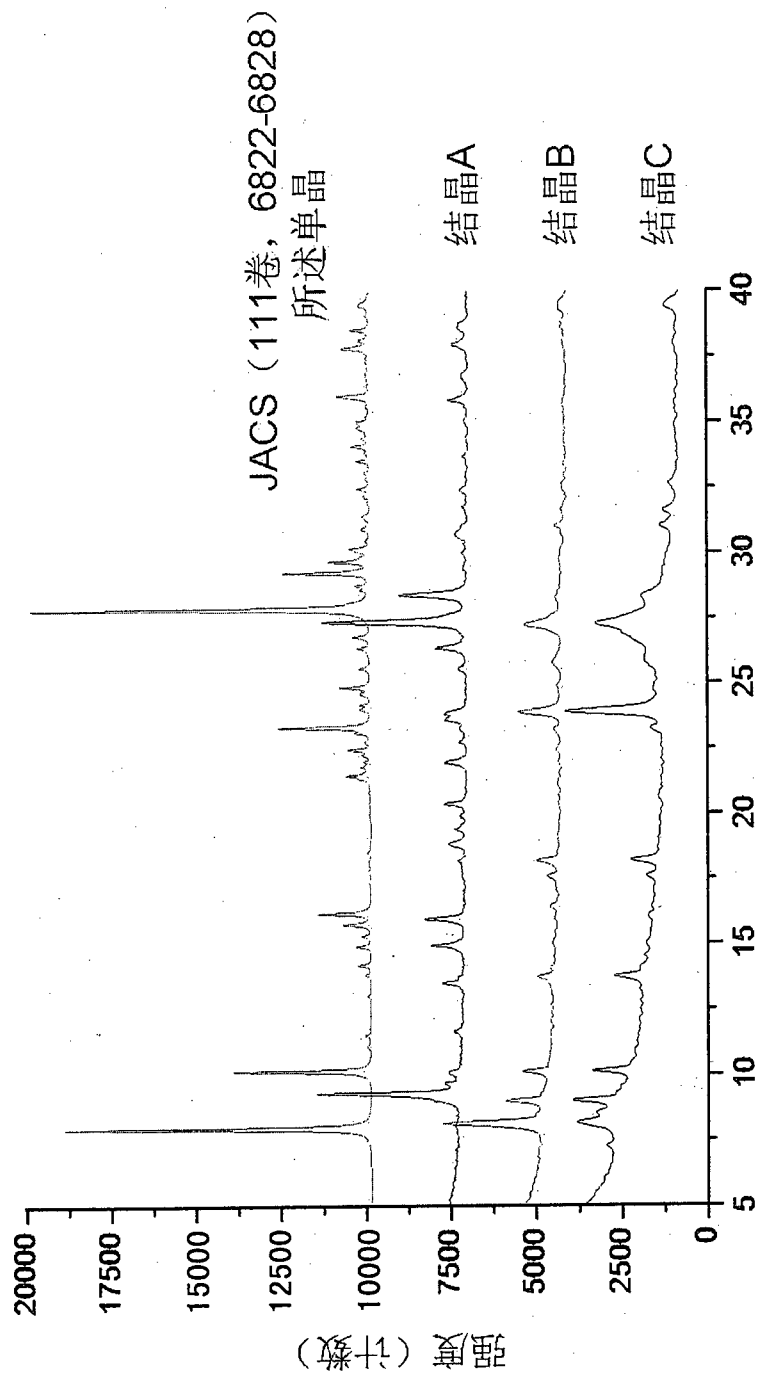

JACS（111卷，6822-6828）
所述单晶
结晶A
结晶B
结晶C
强度（计数）
2θ（°）
20000
17500
15000
12500
10000
7500
5000
2500
0
5
10
15
20
25
30
35
40

图 19

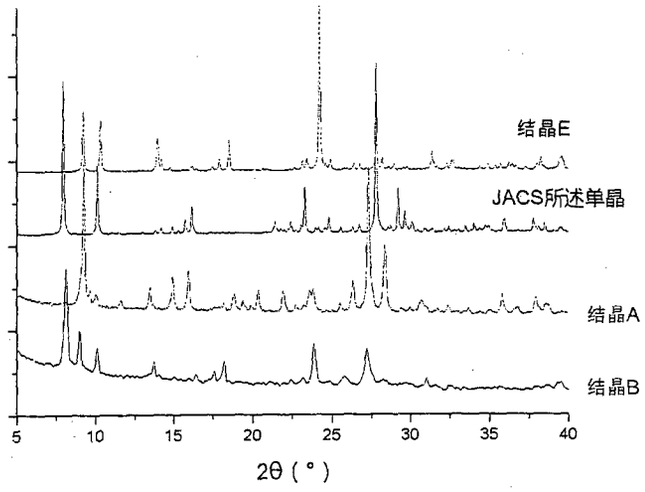

结晶E
JACS所述单晶
结晶A
结晶B
5
10
15
20
25
30
35
40
2θ (°)

图 20

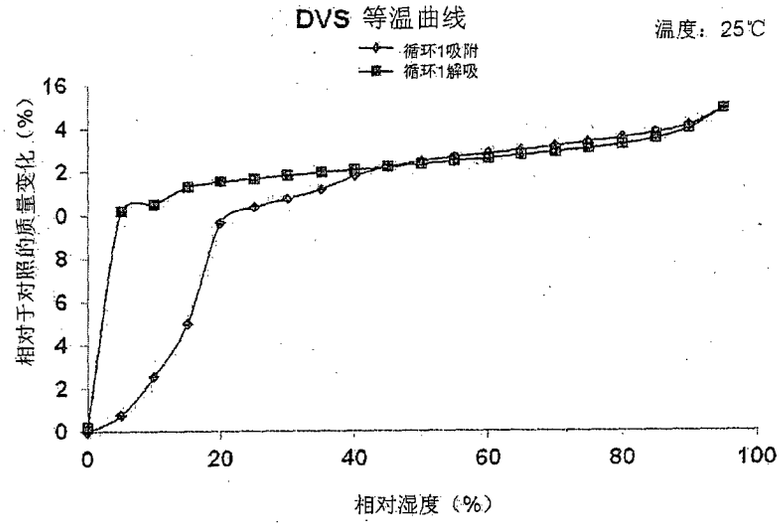

DVS 等温曲线
温度：25℃
循环1吸附
循环1解吸
相对于对照的质量变化（%）
16
4
2
0
8
6
4
2
0
0
20
40
60
80
100
相对湿度（%）

图 21

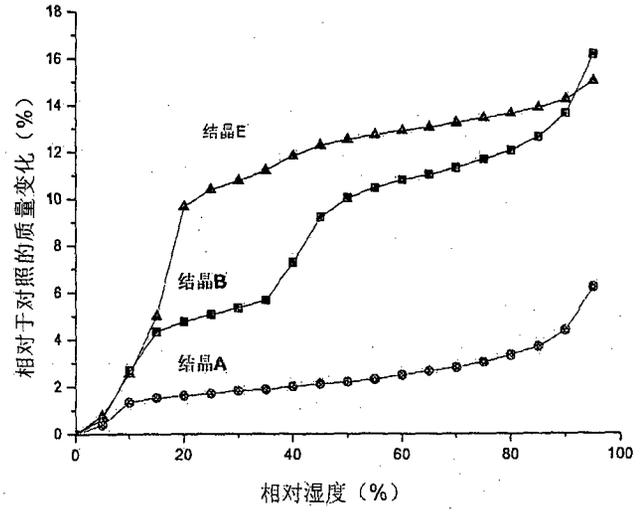

相对于对照的质量变化（%）
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
结晶E
结晶B
结晶A
0
20
40
60
80
100
相对湿度（%）

图 22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2013/083195

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See the extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC: C07D 471/-, A61K 31/-

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS; CNKI; WPI; EPODOC; CA; STN REGISTRY; STN CAPLUS; pyrroloquinoline quinine, disodium, crystal, 122628-50-6

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 102942567 A (ZHUCHENG HAOTIAN PHARM CO LTD) 27 February 2013 (27.02.2013) , see claims 1-12	1-12
PX	JP 2013112677 A (MITSUBISHI GAS CHEMICAL COMPANY, INC.) 10 June 2013 (10.06.2013) , see claims 1-5, description, paragraphs [0002], example 1, and fig. 4	1-3, 6-7, 10-12
PX	WO 2012173217 A1 (MITSUBISHI GAS CHEMICAL COMPANY, INC. et al.) 20 December 2012 (20.12.2012) , see description, paragraphs [0010]-[0011], [0023]-[0024], example 1, and fig. 1	1-3, 6-7, 10-12
PX	CN 103261197 A (MITSUBISHI GAS CHEMICAL COMPANY, INC.) 21 August 2013 (21.08.2013) , see example 1	1-12

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&"document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
22 November 2013 (22.11.2013)	12 December 2013 (12.12.2013)
Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10) 62019451	Authorized officer FENG, Shuwen Telephone No. (86-10) 82246763

Form PCT/ISA /210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2013/083195

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Invention 1: claims 1-3, 6-7, claims 10-12 (the technical solution relates to crystal A) ;
Invention 2: claims 4-5, 8-9, claims 10-12 (the technical solution relates to crystal B) .

Invention 1 relates to pyrroloquinolinequinone disodium crystal A. Invention 2 relates to pyrroloquinolinequinone disodium crystal B. The same or corresponding technical feature involved in the two inventions is "pyrroloquinolinequinone disodium". The above technical feature has apparently been disclosed in the prior art (e.g. CN 102471336 A), and cannot be considered special technical feature that makes a contribution over the prior art. Therefore, the invention 1 and invention 2 are not so linked as to form a single general inventive concept and do not meet the requirement of unity as defined in PCT Rule 13.1 and 13.2.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2013/083195

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2011219388 A (MITSUBISHI GAS CHEMICAL COMPANY, INC.) 04 November 2011 (04.11.2011) , see description, paragraphs [0002], [0017] and [0018], example 2, and fig. 2	4-5, 8-12
X	JP 2692167 B2 (MITSUBISHI GAS CHEMICAL COMPANY, INC.) 17 December 1997 (17.12.1997) , see examples 1 and 2	1-12
X	CN 101885725 A (JIANGSU DAOQI BIOTECHNOLOGY CO LTD) 17 November 2010 (17.11.2010) , see claims 1 and 8, description, paragraphs [0007]-[0009], [0019], and examples 2 and 5	1-12
A	CN 102471336 A (MITSUBISHI GAS CHEMICAL COMPANY, INC.) 23 May 2012 (23.05.2012) , see description, paragraphs [0037]-[0072], example 1 and 2, and fig. 1	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2013/083195

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 102942567 A	27.02.2013	None	
JP 2013112677 A	10.06.2013	None	
WO 2012173217 A1	20.12.2012	None	
CN 103261197 A	21.08.2013	WO 2012070649 A	31.05.2012
		US 2013253001 A	26.09.2013
JP 2011219388 A	04.11.2011	None	
JP 2692167 B2	17.12.1997	JP H0267284 A	07.03.1990
CN 101885725 A	17.11.2010	None	
CN 102471336 A	23.05.2012	WO 2011007633 A1	20.01.2011
		US 2012116087 A1	10.05.2012
		EP 2455379 A1	23.05.2012
		JP WO2011007633 A1	27.12.2012
		JP 5240362 B	17.07.2013

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2013/083195

Continuation of : A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07D 471/04 (2006.01) i

A61K 31/4745 (2006.01) i

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2013/083195

A. 主题的分类

参见附加页

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC: C07D 471/-, A61K 31/-

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称，和使用的检索词（如使用）)

CNABS; CNKI; WPI; EPODOC; CA; STN REGISTRY; STN CAPLUS; 吡咯并喹啉醌，钠盐，结晶，pyrroloquinoline quinine, disodium, crystal, 122628-50-6

C. 相关文件

类　型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
PX	CN102942567A（诸城市浩天药业有限公司）27.2 月 2013（27.02.2013），参见权利要求 1-12	1-12
PX	JP2013112677A（三菱瓦斯化学株式会社）10.6 月 2013（10.06.2013），参见权利要求 1-5，说明书第 2 段，实施例 1，图 4	1-3、6-7、10-12
PX	WO2012173217A1（MITSUBISHI GAS CHEMICAL COMPANY, INC. et al.）20.12 月 2012（20.12.2012），参见说明书第 10-11、23-24 段，实施例 1，图 1	1-3、6-7、10-12
PX	CN103261197A（三菱瓦斯化学株式会社）21.8 月 2013（21.08.2013），参见实施例 1	1-12

☒ 其余文件在 C 栏的续页中列出。　　☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：

"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

"L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件，或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件（如具体说明的）

"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

"T" 在申请日或优先权日之后公布，与申请不相抵触，但为了理解发明之理论或原理的在后文件

"X" 特别相关的文件，单独考虑该文件，认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

"Y" 特别相关的文件，当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时，要求保护的发明不具有创造性

"&" 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
22.11 月 2013（22.11.2013）	**12.12 月 2013 (12.12.2013)**
ISA/CN 的名称和邮寄地址： 中华人民共和国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088 传真号：　(86-10)62019451	受权官员 冯姝雯 电话号码：(86-10) **82246763**

C(续). 相关文件

类　型	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
X	JP2011219388A（三菱瓦斯化学株式会社）04.11 月 2011（04.11.2011），参见说明书第 2、17-18 段，实施例 2，图 2	4-5、8-12
X	JP2692167B2（三菱瓦斯化学株式会社）17.12 月 1997（17.12.1997），参见实施例 1、2	1-12
X	CN101885725A（江苏道琪生物科技有限公司）17.11 月 2010（17.11.2010），参见权利要求 1、8，说明书第 7-9、19 段，实施例 2、5	1-12
A	CN102471336A（三菱瓦斯化学株式会社）23.5 月 2012（23.05.2012），参见说明书第 37-72 段，实施例 1、2，图 1	1-12

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2013/083195

第II栏　某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第 1 页第 2 项)

根据条约第 17 条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. ☐ 权利要求：

因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：

2. ☐ 权利要求：

因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索，

具体地说：

3. ☐ 权利要求：

因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则 6.4(a)第 2 句和第 3 句的要求撰写。

第III栏　缺乏发明单一性的意见(续第 1 页第 3 项)

本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明，即：

发明 1：权利要求 1-3、6-7、权利要求 10-12（其中涉及结晶 A 的技术方案）；

发明 2：权利要求 4-5、8-9、权利要求 10-12（其中涉及结晶 B 的技术方案）。

发明 1 涉及吡咯并喹啉醌的二钠盐结晶 A，发明 2 涉及吡咯并喹啉醌的二钠盐结晶 B，两组发明之间相同或相应的技术特征为“吡咯并喹啉醌二钠盐”，该特征显然已被现有技术公开（例如 CN102471336A），不能构成本发明对现有技术做出贡献的技术特征，不属于特定技术特征，因此发明 1 和发明 2 没有通过一个总的发明构思相互联系，不具备 PCT 实施细则 13.1 和 13.2 规定的发明单一性。

1. ☐ 由于申请人按时缴纳了被要求缴纳的全部附加检索费，本国际检索报告涉及全部可作检索的权利要求。

2. ☒ 由于无需付出有理由要求附加费的劳动即能对全部可检索的权利要求进行检索，本单位未通知缴纳任何附加费。

3. ☐ 由于申请人仅按时缴纳了部分被要求缴纳的附加检索费，本国际检索报告仅涉及已缴费的那些权利要求。具体地说，是权利要求：

4. ☐ 申请人未按时缴纳被要求缴纳的附加检索费。因此，本国际检索报告仅涉及权利要求书中首先提及的发明；包含该发明的权利要求是：

关于异议的说明： ☐ 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，适用时，缴纳了异议费。

☐ 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，但未在通知书规定的时间期限内缴纳异议费。

☐ 缴纳附加检索费时未提交异议书。

国际检索报告

关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2013/083195

检索报告中引用的专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
CN102942567A	27.02.2013	无	
JP2013112677A	10.06.2013	无	
WO2012173217A1	20.12.2012	无	
CN103261197A	21.08.2013	WO2012070649A	31.05.2012
		US2013253001A	26.09.2013
JP2011219388A	04.11.2011	无	
JP2692167B2	17.12.1997	JPH0267284A	07.03.1990
CN101885725A	17.11.2010	无	
CN102471336A	23.05.2012	WO2011007633A1	20.01.2011
		US2012116087A1	10.05.2012
		EP2455379A1	23.05.2012
		JPWO2011007633A1	27.12.2012
		JP5240362B	17.07.2013

续：主题的分类

C07D 471/04 (2006.01) i

A61K 31/4745 (2006.01) i