

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2012年12月20日(20.12.2012)



(10) 国際公開番号
WO 2012/173217 A1

- (51) 国際特許分類:

C07D 471/04 (2006.01)	A61P 27/12 (2006.01)
C12P 7/66 (2006.01)	A61P 35/00 (2006.01)
A61K 31/4745 (2006.01)	A61P 37/08 (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01)	A61P 43/00 (2006.01)
A61P 17/02 (2006.01)	
 - (21) 国際出願番号: PCT/JP2012/065303
 - (22) 国際出願日: 2012年6月15日(15.06.2012)
 - (25) 国際出願の言語: 日本語
 - (26) 国際公開の言語: 日本語
 - (30) 優先権データ:
特願 2011-134279 2011年6月16日(16.06.2011) JP
 - (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 三菱瓦斯化学株式会社(MITSUBISHI GAS CHEMICAL COMPANY, INC.) [JP/JP]; 〒1008324 東京都千代田区丸の内二丁目5番2号 Tokyo (JP).
 - (72) 発明者; および
 - (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 池本 一人 (IKEMOTO Kazuto) [JP/JP]; 〒9503112 新潟県新潟市北区太夫浜新割182番地 三菱瓦斯化学株式会社 新潟研究所内 Niigata (JP). 坂本 斉 (SAKAMOTO Hitoshi) [JP/JP]; 〒9503112 新潟県新潟市北区太夫浜新割182番地 三菱瓦斯化学株式会社 新潟研究所内 Niigata (JP).
 - (74) 代理人: 勝沼 宏仁, 外(KATSUNUMA Hirohito et al.); 〒1000005 東京都千代田区丸の内三丁目2番3号 富士ビル323号 協和特許法律事務所 Tokyo (JP).
 - (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, 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, KM, 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, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, 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(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーロシヤ (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (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, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告(条約第21条(3))



WO 2012/173217 A1

(54) Title: CRYSTAL OF PYRROLOQUINOLINEQUINONE DISODIUM SALT, AND METHOD FOR PRODUCING SAME

(54) 発明の名称: ピロロキノリンキノンジナトリウム塩の結晶およびその製造方法

(57) Abstract: The purpose of the present invention is to provide: a novel pyrroloquinolinequinone disodium crystal having excellent dispersibility in solvents and excellent permeability through the skin; and a method for producing the pyrroloquinolinequinone disodium crystal with high efficiency. The present invention provides: a novel pyrroloquinolinequinone disodium crystal which is produced by drying a crystal produced under specified conditions by a drying means such as lyophilization, ambient drying and vacuum drying; and a method for producing the pyrroloquinolinequinone disodium crystal.

(57) 要約: 本発明は、溶媒に対する分散性や皮膚に対する透過性に優れた、新しいピロロキノリンキノンジナトリウム結晶及びその効率的な製造方法を提供することを目的とする。本発明によれば、特定条件下で得られる結晶を凍結乾燥、常圧乾燥や減圧乾燥等の乾燥手段を用いて乾燥することによって得られる、新しいピロロキノリンキノンジナトリウム結晶およびその製造方法が提供される。

明 細 書

発明の名称：

ピロロキノリンキノンジナトリウム塩の結晶およびその製造方法

関連出願の参照

[0001] 本願は、先行する日本国特許出願である特願2011-134279（出願日：2011年6月16日）の優先権の利益を享受するものであり、その開示内容全体は引用することにより本明細書の一部とされる。

技術分野

[0002] 本発明は、ピロロキノリンキノンジナトリウム塩の結晶およびその製造方法に関する。

背景技術

[0003] ピロロキノリンキノン（以下、単に「PQQ」ということがある）は新しいビタミンの可能性があることが提案されている（例えば、非特許文献1）。PQQは、細菌に限らず、真核生物のカビ、酵母に存在し、補酵素として重要な働きを行っており、近年までに細胞の増殖促進作用、抗白内障作用、肝臓疾患予防治療作用、創傷治癒作用、抗アレルギー作用、逆転写酵素阻害作用およびグリオキサラーゼI阻害作用—制癌作用など多くの生理活性が明らかにされている。そのため、PQQは、医薬品、食品、および化粧品分野で有用な物質として注目を集めている。例えば、医薬品分野では、PQQは、心臓（特許文献1）、皮膚（特許文献2）および神経（特許文献3）等の治療薬としてその応用が期待されている。また、食品分野では、PQQは、アンチエイジング効果を有するとして、化粧品分野では、美肌効果を有する物質として、その応用が期待されている。

[0004] PQQは、有機化学的合成法および発酵法などにより製造することが可能であり、アルカリ金属塩、特にジナトリウム塩の結晶（以下、「ジナトリウム結晶」ということがある）として提供されることが多い。このPQQジナトリウム結晶は、5水和物の結晶であり、単結晶解析により構造解析がなさ

れている（非特許文献1）。PQQジナトリウム結晶の作製法としては、非特許文献1の作製法の他にも、溶液のpHを調整することにより結晶化させる方法（特許文献4）や、水溶性有機溶媒を使用する沈殿法を用いてPQQジナトリウム結晶を水溶液から析出させる方法が報告されている（特許文献5）。しかし、いずれの場合も、得られた固体の結晶性は低いか、または食用に適さない溶剤を使用する方法である。しかも、得られた結晶の保存性は必ずしも高くない。

[0005] PQQを医薬品や化粧品に応用する上では、高い結晶性を有し、不純物が少なく、溶媒に対する安定した溶解性または溶媒に対する高い分散性を有し、かつ、保存性が高いことが望まれる。また、食品や医薬品に応用する上では、人体に無害であることがさらに望まれる。皮膚用医薬品や化粧品に応用する上ではさらに、皮膚に対する高い透過性が望まれる。

先行技術文献

特許文献

- [0006] 特許文献1：特開2005-530786号公報
特許文献2：特開2011-246442号公報
特許文献3：特開2007-269769号公報
特許文献4：国際公開第2011/007633号
特許文献5：特公平7-113024号公報

非特許文献

- [0007] 非特許文献1：Ishida, T. et al., “Molecular and crystal structure of PQQ (methoxatin), a novel coenzyme of quinoproteins: extensive stacking character and metal ion interaction”, Journal of American Chemical Society, 1998, Vol. 111, p. 6822-6828

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0008] 本発明は、溶媒に対する分散性や皮膚に対する透過性に優れ、医薬分野、

化粧分野または食品分野で有用な新しいPQQジナトリウム結晶及びその効率的な製造方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明者らは、PQQジナトリウム結晶を特定条件下で調製することにより、PQQジナトリウム結晶の新しい結晶形（結晶形1および結晶形2）が得られることを見出した。特に、本発明者らは、PQQジナトリウム結晶が食油中で熱安定性を有することを見出し、さらには、PQQジナトリウム結晶を食油中で加熱すると短時間で良好な結晶形1および結晶形2の結晶が得られることを見出した。本発明者らはまた、結晶形1および結晶形2のPQQジナトリウム結晶は、油中での分散性が高く、また、皮膚への透過性が高いことを見出した。本発明は、このような知見に基づく発明である。

[0010] すなわち、本発明によれば以下の発明が提供される。

[1] 水分含量が7重量%以下であるピロロキノリンキノンジナトリウム結晶。

[2] 水分含量が4.6重量%以下である、上記[1]に記載のピロロキノリンキノンジナトリウム結晶。

[3] Cu K α 放射線を用いた粉末X線回折で11.4 \pm 0.4, 13.5 \pm 0.4, 18.0 \pm 0.4, 18.7 \pm 0.4, 26.0 \pm 0.4, 28.5 \pm 0.4 $^\circ$ に2 θ 角度のピークを示す、上記[1]または[2]に記載のピロロキノリンキノンジナトリウム結晶（結晶形1）。

[4] Cu K α 放射線を用いた粉末X線回折で8.7 \pm 0.4, 11.5 \pm 0.4, 12.0 \pm 0.4, 17.4 \pm 0.4, 18.7 \pm 0.4 $^\circ$ に2 θ 角度のピークを示す、上記[1]または[2]に記載のピロロキノリンキノンジナトリウム結晶（結晶形2）。

[5] 上記[1]～[4]のいずれかに記載のピロロキノリンキノンジナトリウム結晶を含んでなる、医薬組成物。

[6] 上記[1]～[4]のいずれかに記載のピロロキノリンキノンジナトリウム結晶を含んでなる、化粧組成物。

〔7〕上記〔1〕～〔4〕のいずれかに記載のピロロキノリンキノンジナトリウム結晶を含んでなる、機能性食品または栄養剤。

〔8〕上記〔1〕～〔4〕のいずれかに記載のピロロキノリンキノンジナトリウム結晶を製造する方法であって、

前記ピロロキノリンキノンジナトリウム結晶の前駆体となる結晶（前駆体結晶）を得、次いで、前駆体結晶を乾燥させる工程を含んでなる、ピロロキノリンキノンジナトリウム結晶の製造方法。

〔9〕前記前駆体結晶が、ピロロキノリンキノンのナトリウム塩を溶解したエタノール又はイソプロパノール濃度10～90%水溶液のpHを2～5の範囲に調整することにより結晶化される、上記〔8〕に記載のピロロキノリンキノンジナトリウム結晶の製造方法。

〔10〕前記前駆体結晶が、Cu K α 放射線を用いた粉末X線回折で9.1 \pm 0.4, 10.3 \pm 0.4, 13.8 \pm 0.4, 17.7 \pm 0.4, 18.3 \pm 0.4, 24.0 \pm 0.4, 27.4 \pm 0.4, 39.5 \pm 0.4 $^\circ$ に2 θ 角度のピークを示すピロロキノリンキノンジナトリウム結晶である、上記〔8〕または〔9〕に記載のピロロキノリンキノンジナトリウム結晶の製造方法。

〔11〕乾燥が、結晶を油中で加熱することにより行われる、上記〔8〕～〔10〕のいずれかに記載のピロロキノリンキノンジナトリウム結晶の製造方法。

[0011] 本発明のPQQジナトリウム結晶は、高い純度を有するだけでなく、溶液中における分散性および皮膚への浸透性が向上しており、化粧品、医薬品または機能性食品の成分として有用である。

図面の簡単な説明

[0012] [図1]図1は、PQQジナトリウム結晶（結晶形1）の粉末X線回折の結果を示す図である。

[図2]図2は、乾燥工程の温度を変化させた場合の粉末X線回折の結果を示す図である。

[図3]図3は、エタノール沈殿法で調製したPQQジナトリウム結晶の粉末X線回折の結果を示す図である。

発明を実施するための形態

- [0013] 本発明のPQQジナトリウム結晶は、水分含量が低い結晶（以下、「低水分含量結晶」ということがある）である。具体的には、本発明のPQQジナトリウム結晶は、水分含量が7%以下であるPQQジナトリウム結晶である。結晶中の水分含量は、結晶の安定性の観点から4.6%以下がより好ましく、3%以下がさらに好ましい。本発明のPQQジナトリウム結晶は、例えば、本明細書に記載される結晶形1または結晶形2のPQQジナトリウム結晶であるが、本発明のPQQジナトリウム結晶は、結晶形1、結晶形2、およびそれ以外の結晶形の結晶から選択される1以上の結晶の混合物であってもよく、本発明の結晶形1または結晶形2のPQQジナトリウム結晶は、例えば、本発明のPQQジナトリウム結晶の前駆体となる結晶（以下、単に「前駆体結晶」ということがある）と混合していても、使用上は特に問題がない。
- [0014] 本発明のPQQジナトリウム結晶は、好ましくは、Cu K α 放射線を用いた粉末X線回折で、 11.4 ± 0.4 , 13.5 ± 0.4 , 18.0 ± 0.4 , 18.7 ± 0.4 , 26.0 ± 0.4 , $28.5 \pm 0.4^\circ$ に2 θ 角度のピークを示すPQQジナトリウム結晶（結晶形1）である。このピークは、モノクロメータが装着された一般的な粉末X線回折装置で観測することができる。測定データには測定誤差も含まれることから、本発明で規定する結晶形は、ピークの角度に関する合理的な同一性を有する結晶形である。
- [0015] 本発明のPQQジナトリウム結晶は、好ましくは、Cu K α 放射線を用いた粉末X線回折で、 8.7 ± 0.4 , 11.5 ± 0.4 , 12.0 ± 0.4 , 17.4 ± 0.4 , $18.7 \pm 0.4^\circ$ に2 θ 角度のピークを示すPQQジナトリウム結晶（結晶形2）である。なお、粉末X線回折測定において低水分含量結晶として通常の測定（常温）で観察できるのは結晶形1の結晶形態であり、結晶形2は通常の湿度環境では観察できず、180°C以上の高温状態

の環境下または乾燥雰囲気下などで測定する必要がある。

[0016] 本発明のPQQジナトリウム結晶は、本発明のPQQジナトリウム結晶の前駆体結晶を得てその前駆体結晶を乾燥させる工程を含んでなる方法により製造される。本発明において、PQQジナトリウム結晶の前駆体結晶とは、水分含有量が4.6%を超える、好ましくは7%を超えるPQQジナトリウム結晶をいう。本発明において、PQQジナトリウム結晶の前駆体結晶の水分含有量は、好ましくは、14%以下である。

[0017] 本発明のPQQジナトリウム結晶の原料としては、PQQナトリウム塩（すなわち、PQQモノナトリウム塩、PQQジナトリウム塩およびPQQトリナトリウム塩）を使用することができ、好ましくは、PQQトリナトリウムを使用することができる。PQQナトリウム塩には、製造工程上含みうる不純物として食塩等が含まれていてもよく、この場合、不純物は、本発明の製造過程で適宜除去して、生成物の純度を上げることが可能である。PQQジナトリウム結晶の前駆体結晶は、エタノールまたはイソプロパノール濃度10～90重量%の水溶液に、PQQナトリウム塩の固体が完全に溶解してしまわない条件（すなわち、PQQナトリウム塩が飽和する条件）でPQQナトリウム塩（例えば、PQQナトリウム塩の固体）を添加し、次いで、酸を添加して、水溶液のpHを2～5の範囲に調整することで結晶化させることができる。水溶液中のエタノールまたはイソプロパノール濃度は、好ましくは35～65重量%の濃度である。また、PQQナトリウム塩が完全に溶解してしまわない条件（すなわち、PQQが飽和する条件）とは、使用するアルコール濃度によって範囲が変わるが、PQQナトリウム塩としてトリナトリウム塩を用いる場合、PQQトリナトリウム濃度が、0.5～800g/L、より好ましくは0.5～100g/L、さらに好ましくは5～60g/Lである条件であり、アルコール濃度が高いと低いPQQ濃度で使用できる。具体的には、水溶液が、50%エタノール水溶液である場合には、使用できるPQQトリナトリウム濃度は、1～200g/Lである。また、水溶液のpHは、より好ましくは2.5～3.5の範囲に調整することができる

- 。
- [0018] 前駆体結晶は、水溶液のpHを所定の値にしてから0.1～96時間反応させることにより得ることができる。大きな結晶を得るためには、より好ましくは、反応時間は6～72時間とすることができる。また、反応温度は0～90℃、より好ましくは10～60℃で行うことができる。結晶化の条件は、できる結晶の品質に対する攪拌の有無や強弱の影響を勘案して、自由に選択できる。
- [0019] 得られた前駆体結晶は、ろ過、遠心分離、デカンテーションで得ることができる。さらにこれをアルコール等で洗って前駆体結晶として提供することも可能であるが、こういった分離操作を行わずに、析出した結晶をそのままの状態の前駆体結晶として提供することも可能である。このようにして得られる前駆体結晶は、好ましくは、Cu K α 放射線を用いた粉末X線回折で、9.1 \pm 0.4、10.3 \pm 0.4、13.8 \pm 0.4、17.7 \pm 0.4、18.3 \pm 0.4、24.0 \pm 0.4、27.4 \pm 0.4、39.5 \pm 0.4°に2 θ 角度のピークを示すPQQジナトリウム結晶であり、好ましくは、結晶水として水分が12.7%含まれている。
- [0020] 本発明の製造方法では、PQQジナトリウム結晶の前駆体結晶を結晶化させた後は、前駆体結晶を乾燥させる。これにより、本発明のPQQジナトリウム結晶を得ることができる。具体的には、前駆体結晶の乾燥は、凍結乾燥、常圧乾燥や減圧乾燥により行うことができる。乾燥工程では、乾燥時間や乾燥温度などの乾燥条件を調整することにより、前駆体結晶から結晶形1または結晶形2のPQQジナトリウム結晶への結晶形の変換が進み、本発明のPQQジナトリウム結晶を得ることができる。乾燥温度は、方法によって異なるが、例えば、-80～250℃、好ましくは、-60～250℃とすることができる。乾燥温度の下限は、凍結乾燥する際の出発温度であり、上限はPQQジナトリウムの分解が生じない温度である。例えば、乾燥温度は、凍結乾燥では、-80～0℃、好ましくは、-60～0℃とすることができる、常圧乾燥では、40～250℃とすることができ、減圧乾燥では、0～2

50℃とすることができる。より具体的には、結晶形1のPQQジナトリウム結晶を得るためには、減圧乾燥では、特に限定されないが、例えば、50℃で20時間以上、好ましくは、70時間以上乾燥させることができ、常圧乾燥では、120℃以上180℃未満で30分以上加熱することができる。また、結晶形2のPQQジナトリウム結晶を得るためには、例えば、常圧乾燥では、180℃以上で30分以上加熱することができる。なお、PQQジナトリウムの結晶形1は、大気圧下では180℃にて相転移し、結晶形2に変化する。従って、PQQジナトリウムの結晶形2は、まず結晶形1を作成し、その後結晶を相転移させることにより得ることもできる。また、乾燥工程は、結晶中の水分含量を指標として終了させることができる。例えば、本発明では、乾燥は、結晶の水分含量が7重量%以下、好ましくは4.6重量%以下、より好ましくは3%重量以下になることを指標として乾燥を終了させることができる。PQQジナトリウムの分解の程度は周りの環境によって変わり得るが、分解を少なくする観点では、乾燥は、窒素ガス雰囲気下で行う方が、通常の空気下で行うよりも好ましく、また、窒素ガス雰囲気下では、乾燥温度をあげやすく、乾燥時間を短縮させやすい。

[0021] 本発明の製造方法のより好ましい態様では、前駆体結晶の乾燥は、前駆体を油中で加熱する（例えば、油で揚げる）方法により行うことができる。前駆体結晶を油中で加熱する場合、結晶形1または結晶形2への変換を進行させる観点から、加熱温度は常圧下では120～200℃が好ましい。油温は、結晶形1のPQQジナトリウム結晶を得るためには、特に限定されないが、例えば、120℃以上180℃未満とすることができ、結晶形2のPQQジナトリウム結晶を得るためには、それ以上の温度、すなわち、180～200℃とすることができる。加熱温度は、油が発火せず、かつPQQジナトリウム結晶が分解しない限り、200℃を超えても良い。また、加熱時間は30分以上とすることが好ましい。油は、食用できるものであれば特に制限はなく、大豆油、中鎖脂肪酸油、コーン油、魚油、オリーブオイル、菜種油、米油、魚油、ヤシ油等の食用油を使用することができる。この工程により

得られた油とPQQジナトリウム結晶の混合物は、低水分含量のPQQジナトリウム結晶のスラリーとして、例えば、ソフトカプセル用にそのまま使用してもよく、あるいは、ヘキサン等により油を除去してから使用してもよい。これまで、PQQは反応性が高いことで知られており、食用油中での熱安定性に関しては知られていなかったが、本発明によれば、PQQジナトリウム結晶は、高温安定性を有し、しかも、驚くべきことに、加熱により新しい結晶形1または結晶形2に変換される。前駆体結晶を油中で加熱する方法は、短時間で結晶形1または結晶形2のPQQジナトリウム結晶を得ることができる点で有利である。

[0022] 本発明の結晶形1および結晶形2のPQQジナトリウム結晶は、食用油中での分散性が高く、また、皮膚への浸透性が高い。また、本発明の結晶形1および結晶形2のPQQジナトリウム結晶は、低水分含量結晶であり、高い保存性を有し得る。本発明で得られるPQQジナトリウム結晶はさらに、結晶であることから高純度であるという利点を有している。なお、結晶形2のPQQジナトリウム結晶は、湿潤雰囲気下では比較的吸湿しやすい結晶であるため、乾燥雰囲気下で保存することが好ましい。

[0023] 従って、本発明のPQQジナトリウム結晶は、ヒト用または動物用として、食品、機能性食品、栄養剤、化粧品、医薬品または医薬部外品として好適に使用することができる。ここでいう機能性食品とは、健康食品、栄養補助食品、栄養機能食品、栄養保健食品、および特定保健用食品等、健康の維持あるいは食事にかわり栄養補給の目的で摂取する食品を意味している。食品、機能性食品、栄養剤、化粧品、医薬品または医薬部外品の具体的な形態としては、カプセル剤（例えば、ゼラチンカプセル、ソフトカプセル）、タブレット、チュアブル、錠剤、ドリンク剤等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。本発明の結晶形1および結晶形2のPQQジナトリウム結晶は、水分含量が少ないため、錠剤成型や保存等に対して有利である。本発明の結晶形1および結晶形2のPQQジナトリウム結晶はまた、上述のように、油脂中における分散性や、皮膚に対する浸透性に優れる。従って、本

発明では、本発明のPQQジナトリウム結晶を含んでなる、医薬組成物、化粧組成物、機能性食品および栄養剤が提供される。特に本発明の結晶は皮膚に対する浸透性に優れることから、本発明の医薬組成物は、経皮投与用の医薬組成物とすることができる。また、本発明の結晶は油脂中における分散性に優れることから、オイル分散系の製剤への処方に適している。従って、本発明の医薬組成物や化粧組成物は、好ましくは、乳剤や懸濁剤のような分散製剤の形態、軟膏剤やクリーム剤のような半固形製剤の形態あるいはソフトカプセルのような成形製剤の形態で提供されうる。

[0024] 本発明のPQQジナトリウム結晶を機能性食品として製品化する場合には、添加剤として、例えば、甘味料、着色料、保存料、増粘安定剤、酸化防止剤、発色剤、漂白剤、防菌防黴剤、ガムベース、苦味料、酵素、光沢剤、酸味料、調味料、乳化剤、強化剤、製造用剤、香料、香辛料抽出物等を用いることができる。また、本発明のPQQジナトリウム結晶は、一般的には、通常の食品、例えば、味噌、醤油、インスタントみそ汁、ラーメン、焼きそば、カレー、コーンスープ、マーボー豆腐、マーボーなす、パスタソース、プリン、ケーキ、パン等に加えることが可能である。また、本発明の医薬組成物は、本発明のPQQジナトリウム結晶と少なくとも1以上の製剤用添加剤を含んでいてもよい。また、本発明の化粧組成物は、本発明のPQQジナトリウム結晶と少なくとも1以上の化粧品添加剤を含んでいてもよい。製剤用添加剤や化粧品添加剤は、医薬組成物や化粧組成物の処方形態に従って、当業者であれば適宜選択することができる。

実施例

[0025] 以下、参考例、実施例及び比較例によって本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれらの例にのみ限定されるものではない。

[0026] 粉末X線回折は、株式会社マックスサイエンス製M18XCE装置または株式会社RIGAKU製RINT2500を使用し、

X線：Cu／管電圧40kV／管電流100mA

スキャンスピード：4.000°／min

サンプリング幅：0.020°

で行った。

[0027] 結晶の水分含量（重量％）の測定は、カールフィッシャー法により行った。

[0028] 参考例 1：前駆体結晶

特許第 2751183 号公報の記載に従って、原料の PQQ トリナトリウムを培養法で得た。PQQ 20 g を含む含水 PQQ トリナトリウム塩の固体 60 g をエタノール濃度 50 重量％の水溶液 1 L に加え、飽和させた。このとき、固体は溶け切っていなかった。ここに室温下で塩酸を加え、pH を 3.5 に調整した。塩酸の添加は、約 2 時間かけてゆっくり滴下して行った。塩酸添加後は、2 日間攪拌し、その後、得られたエタノール水溶液を濾過して含水 PQQ ジナトリウム結晶を収率 99 mol % で得た。粉末 X 線回折を行ったところ、得られた結晶は、 9.1 ± 0.4 , 10.3 ± 0.4 , 13.8 ± 0.4 , 17.7 ± 0.4 , 18.3 ± 0.4 , 24.0 ± 0.4 , 27.4 ± 0.4 , $39.5 \pm 0.4^\circ$ に 2θ 角度のピークを示した。温度 40°C、相対湿度 (RH) 75% の環境に得られた結晶を置き、水分含量を測定した結果、得られた結晶の水分含量は 12.7% であり、純度は 87.3% であった。

[0029] 実施例 1：結晶形 1

参考例 1 で得られた前駆体結晶を減圧乾燥器（アドバンテック社製、製品名：FS-420）に入れて、ダイヤフラム型真空ポンプ（A Gardner Denver Product 社製 DRYFAST ULTRA、製品番号：2032）で装置限界（2 トル）まで減圧してから、50°C で 77 時間乾燥させた。

[0030] 粉末 X 線回折を行ったところ、得られた結晶は、 11.4 ± 0.4 , 13.5 ± 0.4 , 18.0 ± 0.4 , 18.7 ± 0.4 , 26.0 ± 0.4 , $28.5 \pm 0.4^\circ$ に 2θ 角度のピークを示す PQQ ジナトリウム結晶（結晶形 1）であることが分かった（図 1）。図 1 に示されるように、本実施例で得られた PQQ ジナトリウム結晶は、含水量の多い前駆体結晶の結晶形と

は異なる新たな結晶形（結晶形1）の結晶であった。水分含量を測定した結果、得られた結晶の水分含量は0.7%であり、結晶の水分含量が前駆体結晶と比べて大幅に低減していた。得られた結晶の純度は99.3%であった。

[0031] 実施例2：結晶形1

参考例1で得られた前駆体結晶を減圧乾燥器（アドバンテック社製、製品番号：FS-420）に入れ、大気圧下120℃で1日乾燥させた。粉末X線回折を行ったところ、得られた結晶は、実施例1で得られた結晶形1と同一であることが分かった。水分含量を測定した結果、得られた結晶の水分含量は2.2%であり、純度は97.8%であった。

[0032] 実施例3：結晶形1（油中、150℃で0.5時間）

参考例1で得られた前駆体結晶9.6gを日清オイリオ製食用油ODO65gに加えて、150℃で30分間加熱した（揚げた）。粉末X線回折を行ったところ、得られた結晶は、実施例1で得られた結晶形と同一であることが分かった。加熱時間は実施例1や2と比較して短かったが、前駆体結晶を油中で加熱することにより、短時間で結晶形1が得られた。

[0033] 得られた結晶を高速液体クロマトグラフィーで分析した結果、結晶に含まれる不純物量は増えておらず、得られた結晶は99%以上の純度を有していることが分かった。また、水分含量を測定した結果、得られた結晶の水分含量は1.9%であった。加熱時間は実施例1や2と比較して短かったが、得られた結晶の水分含量は、前駆体結晶より大きく低減しており、実施例1または2の結晶形の水分含量と同等であった。

[0034] 実施例4：水分含量7%の結晶混合物

参考例1で得られた前駆体結晶を減圧乾燥器に入れて、ダイヤフラム型真空ポンプ（A Gardner Denver Product社製DRYFAST ULTRA、製品番号：2032）で装置限界（2トル）まで減圧してから、50℃で22時間乾燥させた。

[0035] 粉末X線回折を行ったところ、得られた結晶は、 11.4 ± 0.4 , 13.5 ± 0.4 , 18.0 ± 0.4 , 18.7 ± 0.4 , 26.0 ± 0.4 ,

28.5 ± 0.4° に 2θ 角度のピークを示す結晶形 1 の PQQ ジナトリウム結晶と、参考例 1 の前駆体結晶との混合物であることが分かった。水分含量を測定した結果、得られた結晶の水分含量は 7% であり、純度は 93% であった。得られた結晶混合物は、その後、水分含量を減少させることで逐次的に結晶形 1 の結晶に変換することができた（例えば、同じ条件で 77 時間乾燥させた実施例 1 を参照）。

[0036] 実施例 5：加熱温度と得られる結晶形との関係

本実施例では、乾燥工程における加熱温度と得られる結晶形との関係を調べた。

[0037] 参考例 1 で得られた前駆体結晶を温度変化速度 20°C/min で加熱し、各設定温度に達してから 15 分後に測定を開始した。粉末 X 線：5 ~ 60°，4°/min

[0038] 各設定温度における結晶の結晶形を調べたところ、30°C では前駆体結晶と同様の結晶、120°C では実施例 4 の水分含量 7% の結晶混合物と同様の前駆体結晶と結晶形 1 が混合した結晶混合物、150°C では結晶形 1 の結晶、180°C では、8.7 ± 0.4，11.5 ± 0.4，12.0 ± 0.4，17.4 ± 0.4，18.7 ± 0.4° に 2θ 角度のピークを示す新たな結晶形の PQQ ジナトリウム結晶（結晶形 2）となっていた。それぞれの温度で処理した結晶の粉末 X 線回折の結果を図 2 に示す。結晶形 2 の結晶の熱重量分析を行ったところ、結晶形 2 の結晶の水分含量はほぼ 0% であることが明らかとなった。しかし、この結晶は不安定であり、30°C にしばらく（例えば、半日以上）静置すると吸湿して前駆体結晶と同様の結晶形の結晶になっていた（図 2）。

[0039] 比較例 1：参考例 1 とは異なる PQQ ジナトリウム結晶

参考例 1 の前駆体結晶を水に溶解し、エタノールを加えることで赤色の PQQ ジナトリウム結晶を析出させた。水分含量を測定した結果、得られた結

晶の水分含量は14.5%であった。その後さらに、得られた結晶を実施例1と同様に減圧下で96時間乾燥させ、粉末X線解析を行った。しかしながら、この方法により得られた結晶は、9.4, 22.4°に2θ角度のピークを示す結晶性の低い構造を有することが分かった(図3)。また、水分含量を測定した結果、得られた結晶の水分含量は9.6%であり、純度は90.4%であった。

[0040] 実施例6：結晶形1および結晶形2のPQQジナトリウム結晶の分散性試験

本実施例では、結晶形1および結晶形2のPQQジナトリウム結晶と従来の結晶の食用油脂中での分散性を比較した。

[0041] まず、結晶形1および結晶形2のPQQジナトリウム結晶を以下のように調製した。結晶形1の結晶は、参考例1のPQQジナトリウム塩の前駆体結晶3gをガラス製容器に加え、ダイヤフラム型真空ポンプ(A Gardner Denver Product社製DRYFAST ULTRA、製品番号：2032)で装置限界(2トル)まで減圧してから150°Cで4時間減圧乾燥して暗茶色の固体として得た。乾燥後は、容器内を大気圧に戻し、すぐにガラス製容器のふたを閉めた。結晶形2の結晶は、参考例1のPQQジナトリウム塩の前駆体結晶3gを200mLのナスフラスコに加え、窒素ガスを100mL/minの流速で還流しながら200°Cで4時間加熱して、暗茶色の固体として得た。乾燥後は、窒素を還流しながらフラスコ内の温度を室温にまで下げた。本実施例では、対照として、参考例1のPQQジナトリウム結晶(前駆体結晶)を用いた。

[0042] 得られた結晶(前駆体結晶、結晶形1および結晶形2)5mgをそれぞれ、大豆油200μLに添加し、ポリプロピレン製容器に移して激しく混合した。その後、室温で静置し、大豆油中に浮遊している結晶のすべてが容器の底面に沈降するまでの時間を計測し、各結晶の分散性の指標とした。

[0043] 結果は表1に示される通りであった。

[表1]

	沈降時間(分)
結晶形 1	30
結晶形 2	45
前駆体結晶	0.5

[0044] 表1に示されるように、前駆体結晶は、0.5分ですべての結晶が容器の底面に沈降したが、結晶形1および結晶形2の結晶は、沈降するまでにそれぞれ30分および45分の時間を要した。このことから、結晶形1および結晶形2の結晶は、食用油脂中における分散性が、前駆体結晶よりも向上していることが示唆された。表1からは、結晶形1および結晶形2の結晶の食用油脂中における分散性は、前駆体結晶の50倍以上も向上していることが示唆される。

[0045] 通常、ソフトカプセルの製造においては、有効成分は食用油脂と混合して製剤化される。本発明の低水分含量のPQQジナトリウム結晶は、従来の結晶よりも分散性が高く、例えば、ソフトカプセル製剤の製造に適していると考えられる。

[0046] 実施例7：結晶形1および結晶形2のPQQジナトリウム結晶の皮膚への浸透試験

本実施例では、実施例6で調製した結晶形1および結晶形2のPQQジナトリウム結晶を用いて、皮膚に対する浸透性を比較した。

[0047] 実施例6で調製した結晶形1および結晶形2のPQQジナトリウム結晶並びに参考例1の前駆体結晶のそれぞれを、L-アスコルビン酸の粉末（和光社製、特級）と1：4の重量比で混合して試験用組成物を作製し、浸透試験に用いた。対照としては、L-アスコルビン酸の粉末を用いた。

[0048] 浸透試験は、ブタの皮膚を用いて行った。ブタの皮膚を水道水で洗浄し、水分を完全に拭き取った。このブタの皮膚に試験用組成物を5mgずつ接触させ、その後、テープで皮膚に固定した。80分間後に、テープを剥がし、皮膚を水道水で洗浄して皮膚表面に付着した試験用組成物を除去した。PQ

Qの結晶の皮膚に対する浸透性の高さは、皮膚の着色の程度により評価した。具体的には、本実施例では、処置後の皮膚の写真をコンピュータに取り込み、画像処理ソフト（製品名：ペイント（ウィンドウズXP付属ソフト）、マイクロソフト社製）を用いて皮膚の明るさの変化を測定することにより評価した。この際、皮膚の明るさの変化は、下記式：

[数1]

$$\frac{[\text{未処置の皮膚の明るさ}] - [\text{処置後の皮膚の明るさ}]}{[\text{未処置の皮膚の明るさ}]} \times 100$$

により算出した。

[0049] 結果は表2に示される通りであった。

[表2]

	皮膚浸透性
結晶形1	44
結晶形2	59
前駆体結晶	32
L-アスコルビン酸粉末	0

[0050] 表2に示されるように、結晶形1および結晶形2の結晶は、前駆体結晶と比べて、皮膚に対して高い浸透性を示した。このことから、結晶形1および結晶形2のPQQジナトリウム結晶は、化粧品や経皮投与用の医薬品などへの使用により適していることが示唆された。

[0051] 処方例1：ゼラチンカプセル製剤

コエンザイムQ10（三菱瓦斯化学社製）8g、大豆タンパク加水分解物（日清オイリオ社製）2g、および実施例1のPQQジナトリウム結晶（結晶形1）2gをポリ袋に入れ、良く振って混合して経口摂取用組成物を調製した。得られた組成物をゼラチンカプセルに10mgずつ封入し、ゼラチンカプセル製剤を得た。

[0052] 処方例2：オイル分散液のソフトカプセル製剤

サフラワーサラダ油（日清オイリオ社製）2700g、グリセリン脂肪酸エステル（理研ビタミン社製）300g、および蜜蝋（横浜油脂工業社製）300gを合わせて70℃で攪拌した後、実施例1のPQQジナトリウム結晶（結晶形1）を加えてミキサーで混合した。得られた混合物をソフトカプセルに封入して、ソフトカプセル製剤を得た。

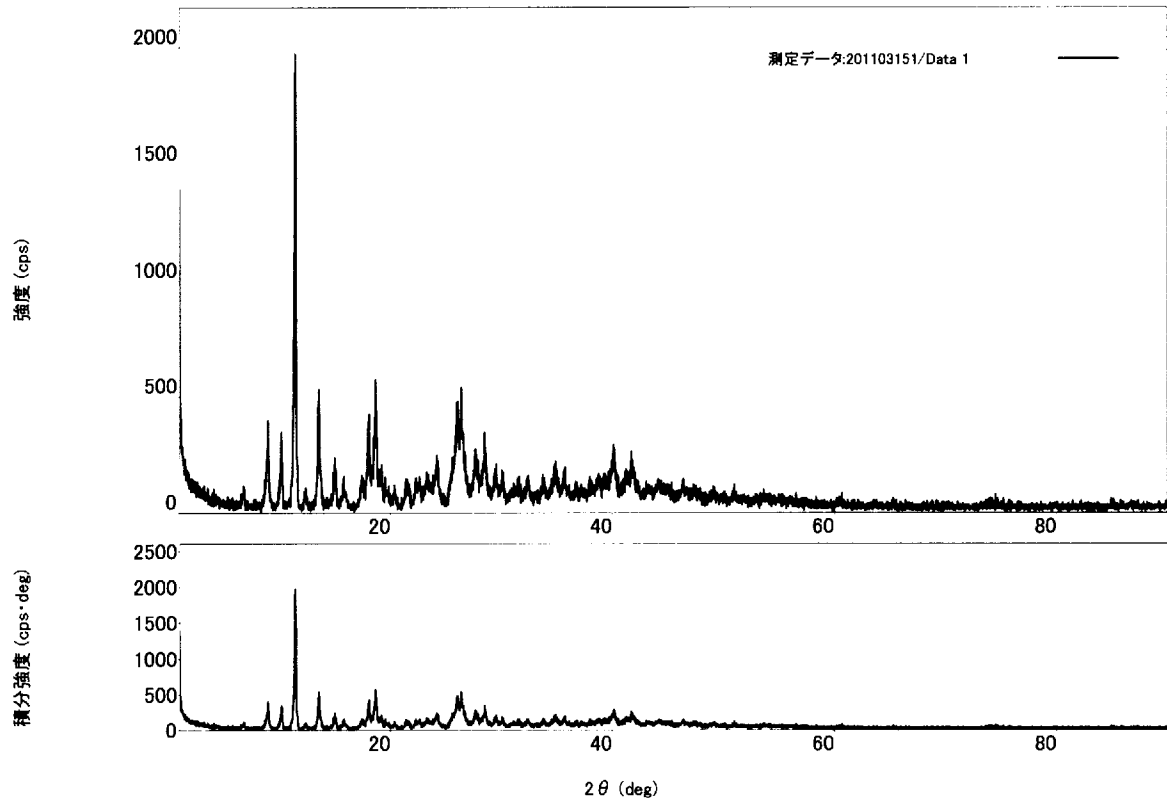
請求の範囲

- [請求項1] 水分含量が7重量%以下であるピロロキノリンキノンジナトリウム結晶。
- [請求項2] 水分含量が4.6重量%以下である、請求項1に記載のピロロキノリンキノンジナトリウム結晶。
- [請求項3] Cu K α 放射線を用いた粉末X線回折で11.4 \pm 0.4, 13.5 \pm 0.4, 18.0 \pm 0.4, 18.7 \pm 0.4, 26.0 \pm 0.4, 28.5 \pm 0.4 $^\circ$ に2 θ 角度のピークを示す、請求項1または2に記載のピロロキノリンキノンジナトリウム結晶（結晶形1）。
- [請求項4] Cu K α 放射線を用いた粉末X線回折で8.7 \pm 0.4, 11.5 \pm 0.4, 12.0 \pm 0.4, 17.4 \pm 0.4, 18.7 \pm 0.4 $^\circ$ に2 θ 角度のピークを示す、請求項1または2に記載のピロロキノリンキノンジナトリウム結晶（結晶形2）。
- [請求項5] 請求項1～4のいずれか一項に記載のピロロキノリンキノンジナトリウム結晶を含んでなる、医薬組成物。
- [請求項6] 請求項1～4のいずれか一項に記載のピロロキノリンキノンジナトリウム結晶を含んでなる、化粧組成物。
- [請求項7] 請求項1～4のいずれか一項に記載のピロロキノリンキノンジナトリウム結晶を含んでなる、機能性食品または栄養剤。
- [請求項8] 請求項1～4のいずれかに記載のピロロキノリンキノンジナトリウム結晶を製造する方法であって、
前記ピロロキノリンキノンジナトリウム結晶の前駆体となる結晶（前駆体結晶）を得、次いで、前駆体結晶を乾燥させる工程を含んでなる、ピロロキノリンキノンジナトリウム結晶の製造方法。
- [請求項9] 前記前駆体結晶が、ピロロキノリンキノンのナトリウム塩を溶解したエタノール又はイソプロパノール濃度10～90%水溶液のpHを2～5の範囲に調整することにより結晶化される、請求項8に記載のピロロキノリンキノンジナトリウム結晶の製造方法。

[請求項10] 前記前駆体結晶が、Cu K α 放射線を用いた粉末X線回折で9.1 \pm 0.4, 10.3 \pm 0.4, 13.8 \pm 0.4, 17.7 \pm 0.4, 18.3 \pm 0.4, 24.0 \pm 0.4, 27.4 \pm 0.4, 39.5 \pm 0.4 $^{\circ}$ に2 θ 角度のピークを示すピロロキノリンキノンジナトリウム結晶である、請求項8または9に記載のピロロキノリンキノンジナトリウム結晶の製造方法。

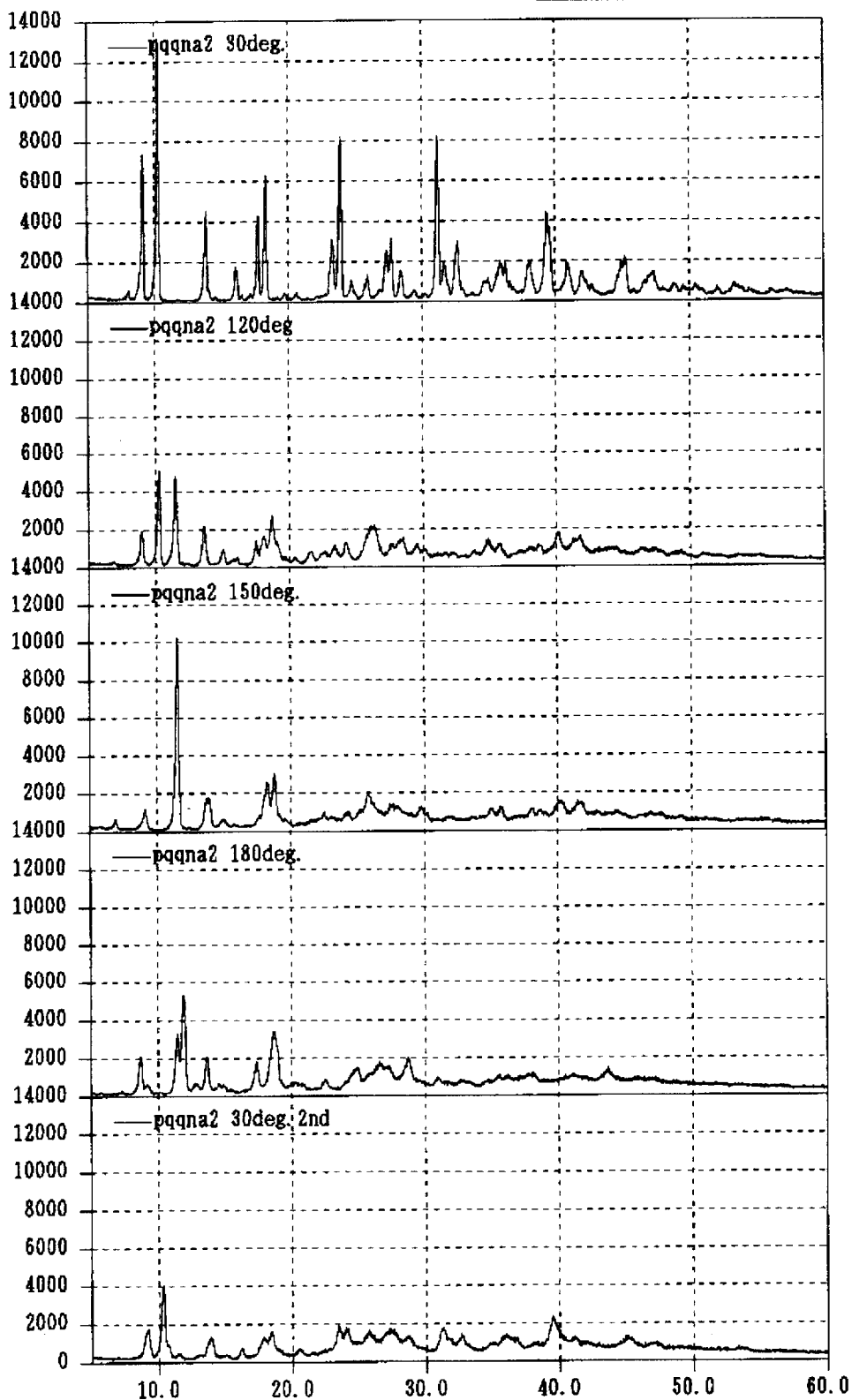
[請求項11] 乾燥が、結晶を油中で加熱することにより行われる、請求項8～10のいずれか一項に記載のピロロキノリンキノンジナトリウム結晶の製造方法。

[図1]



[圖2]

Apr 26, 2011



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/065303

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07D471/04(2006.01)i, C12P7/66(2006.01)i, A61K31/4745(2006.01)n, A61P1/16(2006.01)n, A61P17/02(2006.01)n, A61P27/12(2006.01)n, A61P35/00(2006.01)n, A61P37/08(2006.01)n, A61P43/00(2006.01)n

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)

C07D471/04, C12P7/66, A61K31/4745, A61P1/16, A61P17/02, A61P27/12, A61P35/00, A61P37/08, A61P43/00

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2012
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2012	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2012

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDREAMII), CAPLUS (STN), REGISTRY (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X, Y	WO 2011/007633 A1 (Mitsubishi Gas Chemical Co., Inc.), 20 January 2011 (20.01.2011), examples 1 to 2 (Family: none)	1-2, 5-11
X, Y	WO 2011/055796 A1 (Mitsubishi Gas Chemical Co., Inc.), 12 May 2011 (12.05.2011), example 1 (Family: none)	1-2, 5-11
X, Y	JP 62-246575 A (Mitsubishi Gas Chemical Co., Inc.), 27 October 1987 (27.10.1987), example 2 (Family: none)	1-2, 5-11

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
03 September, 2012 (03.09.12)

Date of mailing of the international search report
11 September, 2012 (11.09.12)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/065303

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 02-067284 A (Mitsubishi Gas Chemical Co., Inc.), 07 March 1990 (07.03.1990), entire text (Family: none)	1-11
A	ISHIDA, T. et al, "Molecular and Crystal Structure of PQQ (Methoxatin), a Novel Coenzyme of Quinoproteins: Extensive Stacking Character and Metal Ion Interaction" J. Am. Chem. Soc., 1989, Vol.111, p.6822-6828	1-11

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C07D471/04(2006.01)i, C12P7/66(2006.01)i, A61K31/4745(2006.01)n, A61P1/16(2006.01)n, A61P17/02(2006.01)n, A61P27/12(2006.01)n, A61P35/00(2006.01)n, A61P37/08(2006.01)n, A61P43/00(2006.01)n

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C07D471/04, C12P7/66, A61K31/4745, A61P1/16, A61P17/02, A61P27/12, A61P35/00, A61P37/08, A61P43/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2012年
日本国実用新案登録公報	1996-2012年
日本国登録実用新案公報	1994-2012年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII), CAplus(STN), REGISTRY(STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X, Y	WO 2011/007633 A1 (三菱瓦斯化学株式会社) 2011.01.20, 実施例1~2等 (ファミリーなし)	1-2, 5-11
X, Y	WO 2011/055796 A1 (三菱瓦斯化学株式会社) 2011.05.12, 実施例1等 (ファミリーなし)	1-2, 5-11
X, Y	JP 62-246575 A (三菱瓦斯化学株式会社) 1987.10.27, 実施例2等	1-2, 5-11

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

03.09.2012

国際調査報告の発送日

11.09.2012

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
 郵便番号100-8915
 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

早川 裕之

電話番号 03-3581-1101 内線 3492

4P

4500

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
	(ファミリーなし)	
A	JP 02-067284 A (三菱瓦斯化学株式会社) 1990.03.07, 全文 (ファミリーなし)	1-11
A	ISHIDA, T. et al, "Molecular and Crystal Structure of PQQ (Methoxatin), a Novel Coenzyme of Quinoproteins: Extensive Stacking Character and Metal Ion Interaction" J. Am. Chem. Soc., 1989, Vol.111, p.6822-6828	1-11