



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201319080 A1

(43)公開日：中華民國 102 (2013) 年 05 月 16 日

(21)申請案號：101127785

(22)申請日：中華民國 101 (2012) 年 08 月 01 日

(51)Int. Cl. : C07H17/07 (2006.01)

A61K9/14 (2006.01)

(30)優先權：2011/08/01 日本

2011-168720

(71)申請人：林原股份有限公司 (日本) HAYASHIBARA CO., LTD. (JP)

日本

(72)發明人：澀谷孝 SHIBUYA, TAKASHI (JP) ; 伊澤精祐 IZAWA, SEISUKE (JP)

(74)代理人：林志剛

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：6 項 圖式數：7 共 49 頁

(54)名稱

α -葡糖基橘皮苷之結晶與其用途

CRYSTALLINE α -GLUCOSYL HESPERIDIN AND USES THEREOF

(57)摘要

本發明之課題為提供一種已確定結晶構造之 α -葡糖基橘皮苷的新穎結晶與實質地由該結晶所構成之粉體、以及作為該醫藥品原料之用途。解決課題之技術手段為提供一種 α -葡糖基橘皮苷之結晶，其結晶之空間群為 $P2_1$ ，單位格子的晶格常數為 $a=13.983\text{\AA}$ 、 $b=7.620\text{\AA}$ 、 $c=20.065\text{\AA}$ ，且為 $\alpha=\gamma=90^\circ$ 、 $\beta=93.475^\circ$ 之單斜晶系(monoclinic)，實質地由該結晶所構成之粉體及作為該醫藥品原料之用途。



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201319080 A1

(43)公開日：中華民國 102 (2013) 年 05 月 16 日

(21)申請案號：101127785

(22)申請日：中華民國 101 (2012) 年 08 月 01 日

(51)Int. Cl. : C07H17/07 (2006.01)

A61K9/14 (2006.01)

(30)優先權：2011/08/01 日本

2011-168720

(71)申請人：林原股份有限公司 (日本) HAYASHIBARA CO., LTD. (JP)

日本

(72)發明人：澀谷孝 SHIBUYA, TAKASHI (JP) ; 伊澤精祐 IZAWA, SEISUKE (JP)

(74)代理人：林志剛

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：6 項 圖式數：7 共 49 頁

(54)名稱

α -葡糖基橘皮苷之結晶與其用途

CRYSTALLINE α -GLUCOSYL HESPERIDIN AND USES THEREOF

(57)摘要

本發明之課題為提供一種已確定結晶構造之 α -葡糖基橘皮苷的新穎結晶與實質地由該結晶所構成之粉體、以及作為該醫藥品原料之用途。解決課題之技術手段為提供一種 α -葡糖基橘皮苷之結晶，其結晶之空間群為 $P2_1$ ，單位格子的晶格常數為 $a=13.983\text{\AA}$ 、 $b=7.620\text{\AA}$ 、 $c=20.065\text{\AA}$ ，且為 $\alpha=\gamma=90^\circ$ 、 $\beta=93.475^\circ$ 之單斜晶系(monoclinic)，實質地由該結晶所構成之粉體及作為該醫藥品原料之用途。

發明專利說明書

(本申請書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：101127785

※申請日：101 年 08 月 01 日

※IPC 分類：C07H 17/07 (2006.01)
A61K 9/14 (2006.01)

一、發明名稱：(中文／英文)

α -葡糖基橘皮苷之結晶與其用途

Crystalline α -glucosyl hesperidin and uses thereof

二、中文發明摘要：

本發明之課題為提供一種已確定結晶構造之 α -葡糖基橘皮苷的新穎結晶與實質地由該結晶所構成之粉體、以及作為該醫藥品原料之用途。解決課題之技術手段為提供一種 α -葡糖基橘皮苷之結晶，其結晶之空間群為 $P2_1$ ，單位格子的晶格常數為 $a = 13.983 \text{ \AA}$ 、 $b = 7.620 \text{ \AA}$ 、 $c = 20.065 \text{ \AA}$ ，且為 $\alpha = \gamma = 90^\circ$ 、 $\beta = 93.475^\circ$ 之單斜晶系 (monoclinic)，實質地由該結晶所構成之粉體及作為該醫藥品原料之用途。

三、英文發明摘要：

四、指定代表圖：

(一) 本案指定代表圖為：無

(二) 本代表圖之元件符號簡單說明：無

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：無

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明，其係關於 α -葡萄糖基橘皮苷之新穎結晶與實質地由該結晶所構成之粉體、及其用途，詳細而言，係關於由 X 光結晶構造解析，決定其結晶構造之 α -葡萄糖基橘皮苷的新穎結晶與實質地由該結晶所構成之粉體、及作為該醫藥品原料之用途。

【先前技術】

α -葡萄糖基橘皮苷，係構成一種維生素 P 之橘皮苷的蘆丁糖（Rutinose）構造之葡萄糖的 4 位羥基上其 1 分子的葡萄糖通過 α -葡萄糖苷結合來結合為橘皮苷的 α -葡萄糖基衍生物。（參照日本特許第 3060227 號公報、日本特許第 2805273 號公報、日本特許第 3989561 號公報、（Y. Suzuki）等、（The First International Congress on “Vitamins and Biofactors in Life Science”（ICVB）），神戶，1991 年，講演要旨 4-IV-5）。 α -葡萄糖基橘皮苷，相對於難溶於水的橘皮苷具有極高之水溶性，同時具備發揮在生物體內容易被水解之橘皮苷本來的生理活性之優良特性。因此， α -葡萄糖基橘皮苷比橘皮苷更容易使用，作為如同橘皮苷作用之物質，主要在食品及化妝品領域上，作為黃色著色劑、抗氧化劑、品質改良劑、美肌劑、色白劑等被使用。

順道一提，現在作為市售的 α -葡萄糖基橘皮苷，係以

噴霧乾燥法製造，以酸酐換算含有 α -葡萄糖基橘皮苷 75 至 85 質量 %（以下，除非另外指明，本說明書質量 % 略記為「%」），主要係作為偏向食品之 α -葡萄糖基橘皮苷含有非晶質粉末（例如，商品名「林原橘皮苷 S」，林原商事股份有限公司販賣；商品名「 α G 橘皮苷 PA-T」，東洋精糖股份有限公司販賣等），又，藉由具有 α -L-鼠李糖苷酶活性之酵素（例如，橘皮苷酶）進行作用，將殘留水溶性差的橘皮苷進行分解進而改善其水溶性（參照日本特許第 3833775 號公報），主要作為用於化妝品之含有 α -葡萄糖基橘皮苷之非晶質粉末（例如，商品名「 α -葡萄糖基橘皮苷」，林原生物體股份有限公司化學研究所販賣；商品名「 α G 橘皮苷 PS」，東洋精糖股份有限公司販賣等。以酸酐換算含有 α -葡萄糖基橘皮苷 75% 以上）。

但是，此等市售之含有 α -葡萄糖基橘皮苷粉末，任一種都是非晶質形態的 α -葡萄糖基橘皮苷粉末，如果只是作為食品用或化妝品用還可以，若是用於醫藥品，其純度或穩定性，甚至有效性或安全性的點來說並不完全足夠。

另一方面，本申請人，在日本特許第 3833811 號公報，作為共同申請人之一人，揭示從溶解 α -葡萄糖基橘皮苷的 99%（v/v）甲醇溶液中析出 α -葡萄糖基橘皮苷之結晶，將此經分離取得 α -葡萄糖基橘皮苷高含有物的製造方法。但是，此時所得到之結晶，如同後述，勉強可以確認其結晶程度係微小結晶為多數相互固著之塊狀結晶，經由該結晶構造的解析等，結果並不能確定係由單一結晶形所構成

者。現在，依本申請人所知，有報導對於係橘皮苷配糖基之橘皮苷素的結晶構造（參照（W. Shin）等，（Acta Cryst.）C43 卷、1946-1949 頁（1987 年）及（S. Fujii）等，（Chem. Pharm. Bull.）第 42 卷，第 5 號，1143-1145 頁（1994 年））者，但對於 α -葡糖基橘皮苷，該結晶構造皆無記載之報告。

如眾所周知，關於被用於作為醫藥品之分子量相對比較小的有機化合物，有必要解明該固體物理性的理解、或製劑或保存過程中的轉移現象。在醫藥品業界，有提供良藥的使命，作為醫藥品之有機化合物若為結晶的形態時其結晶構造訊息，又，該有機化合物以天然物存在光學異構物時，關於其光學純度訊息是必需的。但是，關於 α -葡糖基橘皮苷，對於其結晶構造或光學純度等的訊息皆無，變成將 α -葡糖基橘皮苷作為醫藥品原料使用之際的障礙。

【發明內容】

本發明，其課題為提供一種 α -葡糖基橘皮苷，作為醫藥品原料使用之際去除上述障礙，作為 α -葡糖基橘皮苷之醫藥品原料的用途被大大開拓出來，已確定結晶構造之 α -葡糖基橘皮苷的新穎結晶與實質地由該結晶所構成之粉體、以及作為該醫藥品原料之用途。

為順利解決上述的課題對於 α -葡糖基橘皮苷之結晶化經過努力研究重複討論的結果，本發明者們，將 α -葡

糖基橘皮苷純度 95% 以上的含有 α -葡糖基橘皮苷之非晶質粉末，以未滿 5% (w/v) 之濃度溶解於 30 至 40% (v/v) 的甲醇水溶液中，在低溫下花時間使其結晶化，找出藉由 X 光結晶構造解析來解析結晶構造而得到具備充分性狀及大小的 α -葡糖基橘皮苷之單結晶，決定該結晶構造，完成了本發明。

亦即，本發明，解決課題之技術手段為提供一種 α -葡糖基橘皮苷之結晶，其結晶之空間群為 $P2_1$ ，單位格子的晶格常數為 $a = 13.983\text{\AA}$ 、 $b = 7.620\text{\AA}$ 、 $c = 20.065\text{\AA}$ ，且為 $\alpha = \gamma = 90^\circ$ 、 $\beta = 93.475^\circ$ 之單斜晶系 (monoclinic)。至少具有如此結晶之 α -葡糖基橘皮苷結晶在本申請案提出前毫無知悉，前述 α -葡糖基橘皮苷之結晶為新穎結晶。

本發明的 α -葡糖基橘皮苷之結晶，更加詳細說明為構成 α -葡糖基橘皮苷分子之氧原子及碳原子具有如本說明書中表 3 及表 4 所示之原子座標。

本發明之 α -葡糖基橘皮苷結晶，在該合適的一種態樣上，實質地為單結晶形態之結晶。

又，本發明，係藉由提供一種實質地由上述 α -葡糖基橘皮苷之結晶所構成之粉體來解決上述課題。

又，本發明 α -葡糖基橘皮苷之結晶或實質地由該結晶所構成之粉體，使用光學解析管柱供於高速液體層析分析時，含有 70 質量% 以上作為光學異構物之 α -葡糖基-(R)-橘皮苷。

加上本發明，藉由提供一種作為醫藥品原料之本發明的 α -葡萄糖基橘皮苷之結晶或實質地由該結晶所構成之粉體，來解決上述的課題。亦即，已確定結晶構造之 α -葡萄糖基橘皮苷的新穎結晶或實質地由該結晶所構成之粉體，與以往的非晶質粉末相比較，因為提高純度或安定性容易，又因為有效性或安全性的確認也容易，所以作為醫藥品原料係極為有用。

順道一提，橘皮苷，因為它具血管強化作用、脂質代謝改善作用、發癌抑制作用、紫外線防禦作用、抗氧化作用、創傷治療作用等之藥理作用（吉岡晃一等，『Bioindustry』、第 20 卷、第 5 號、19 至 29 頁（2003 年）），期待本發明之 α -葡萄糖基橘皮苷之結晶或實質地由該結晶所構成之粉體也有同樣的藥理作用，可以作為醫藥品原料用於血管系疾病治療劑、關節疾病治療劑、維生素 C 缺乏症治療劑等之有效成分。

根據本發明的 α -葡萄糖基橘皮苷結晶，因為該結晶構造明確，得到作為醫藥品原料使用時所必需的 α -葡萄糖基橘皮苷之物理的、化學的性質的解明、或包含結晶多態有無之多態性解明變成極為容易的優點。又，作為本發明的 α -葡萄糖基橘皮苷之結晶或實質地由該結晶所構成之粉體使用時，其有效性或安全性的確認變為更加容易，期待具有與橘皮苷原本藥理效果同樣的藥理效果，作為與橘皮苷相比水溶性極高之醫藥品原料，可以得到更有利的優勢。

【實施方式】

1. α -葡糖基橘皮苷之結晶

本發明為 α -葡糖基橘皮苷之新穎結晶，詳細而言，係與具有後述之空間群、晶格常數、及晶系，進而其氧原子及碳原子具有後述表 3 及表 4 所示之原子座標之 α -葡糖基橘皮苷結晶相關者。本發明之 α -葡糖基橘皮苷之新穎結晶，經由 X 光結晶構造解析，具有解析其結晶構造充分的性狀之 α -葡糖基橘皮苷所構成，適用於單結晶的形態。

在本說明書所謂「解析結晶構造充分性狀的結晶」，係意味著具備例如，

(1) 固體(結晶)中同一的分子，其為具有一定的規則性以 3 次元配列者，實質地不包含附著二個以上單結晶之雙晶或微細的單結晶互相固著之多結晶；

(2) 適當的結晶形狀與大小；例如，至少 1 邊成長為約 0.1~約 0.5mm 之角型柱狀、板狀、或針狀的結晶，期望 3 邊皆同樣成長之角型柱狀、板狀的結晶或寬度、厚度為約 0.02mm 以上之結晶為佳。進而更期望以 0.1×0.1×0.1mm 至 0.3×0.3×0.3mm 程度大小的結晶為佳。

(3) 具有化學的安定性、力學的安定性、物理學的安定性；特性之結晶。

本發明之 α -葡糖基橘皮苷之結晶，經由 X 光結晶構造解析，只要它是具有解析其結晶構造充分的性狀之結晶

，藉由作為 α -葡萄糖基橘皮苷全體之純度並不限定於此，通常以具有 95% 以上純度之 α -葡萄糖基橘皮苷為佳，較佳為 98% 以上，更佳為 99% 以上。

在本說明書所謂「 α -葡萄糖基橘皮苷之純度」，係指將溶液、非晶質粉末、含有結晶粉末、結晶等形態之 α -葡萄糖基橘皮苷試料，經由純化水稀釋或溶解成 0.1% (w/v)，藉由 $0.45\ \mu\text{m}$ 膜過濾器進行過濾後，依照下述條件供給 HPLC 分析，以試藥橘皮苷（和光純藥工業股份有限公司販賣）作為標準物質使用，以在 UV280nm 色譜圖上所出現的峰值面積與 α -葡萄糖基橘皮苷、7-O- β -葡萄糖基橘皮苷素（以下，只稱為「7-葡萄糖基橘皮苷素」）、橘皮苷、其他的配糖體各成分之分子量為基礎進行計算，換算成酸酐質量的組成上 α -葡萄糖基橘皮苷之含量。

< HPLC 分析條件 >

HPLC 裝置：『LC-20AD』（島津製作所股份公司製）

除氣器：『DGU-20A3』（島津製作所股份公司製）

管柱：『CAPCELL PAK C18 UG 120』（資生堂股份公司製）

試料注入量：10 μl

洗脫液：水/乙腈/醋酸（80/20/0.01（容積比））

流速：0.7ml/分

溫度：40℃

檢出：UV 檢測器『SPD-20A』（島津製作所股份

公司製)

測定波長：280nm

資料處理裝置：『Chromatographic PackC-R7A』 (島津製作所股份公司製)

(1) α -葡萄糖基橘皮苷含量：在 HPLC 分析，以試藥橘皮苷 (和光純藥工業股份有限公司販賣) 作為標準物質以峰值面積為基礎進行定量，算出換算分子量。

(2) 橘皮苷含量：在 HPLC 分析，以試藥橘皮苷 (和光純藥工業股份有限公司販賣) 作為標準物質以峰值面積為基礎進行定量。

(3) 7-葡萄糖基橘皮苷素：在 HPLC 分析，以試藥橘皮苷 (和光純藥工業股份有限公司販賣) 作為標準物質以峰值面積為基礎進行定量，算出換算分子量。

(4) 其他的配糖體：在 HPLC 分析，以試藥橘皮苷 (和光純藥工業股份有限公司販賣) 作為標準物質以峰值面積為基礎進行定量。

一般單結晶可在偏向顯微鏡之下確認消光，如有必要，經由預先在偏光顯微鏡下觀察 α -葡萄糖基橘皮苷的結晶，可以選別出單結晶與其以外的結晶。又， α -葡萄糖基橘皮苷之結晶，直接供於 X 光結晶構造解析，亦即，該領域具備通常技術者以眾知的 X 光衍射進行單結晶構造解析 (例如，參照櫻井敏雄著「X 光構造解析指南」，裳華房發行 (1983 年) 等)，藉由是否能得到如後述圖 3 上

所示 X 光衍射圖案（衍射斑點）進行判斷，可以判斷是否具有解析其結晶構造之充分性狀。在單結晶構造解析，市售的單結晶 X 光衍射裝置，例如，可用理學股份有限公司製的成像板單結晶自動 X 光構造解析裝置「R-AXIS RAPID」等，該等市售的單結晶 X 光衍射裝置上，已先搭載構造解析用的電腦軟體。

α -葡萄糖基橘皮苷之結晶，經由 X 光結晶構造解析，若為具有解析其結晶構造之充分性狀之單結晶時，藉由該解析，在該單結晶上決定結晶學的參數，再來，可得到 α -葡萄糖基橘皮苷分子的原子座標（表示各原子空間的位置關係之值）及 3 次元構造模型。具體而言， α -葡萄糖基橘皮苷的原子座標可經由包含

（1）於本發明的 α -葡萄糖基橘皮苷結晶上照射單色化 X 光，得到 X 光衍射圖型之步驟；

（2）得到來自該 X 光衍射圖型之 X 光衍射強度數據之步驟；

（3）經由直接法（Program「SIR92」，A. Altomare 等，Journal of Applied Crystallography（J. Appl. Cryst.），第 27 卷、435 頁、（1994 年）），得到初期構造（電子密度圖）之步驟；

（4）以 α -葡萄糖基橘皮苷之化學構造為基礎，在電子密度圖上各自分配碳原子、氧原子、氫原子，以將 R 值成為最小之最小二乘法進行精密化構造之步驟；之順序，得到作為原子座標。

順便一提，關於氫原子，單結晶之規格比較的小，在 X 光衍射強度較弱時有時無法決定原子座標。即使在這樣的情況下，只有非氫原子（ α -葡萄糖基橘皮苷的情況為氧原子與碳原子）之原子座標通過分子建模的基礎，可瞭解到 α -葡萄糖基橘皮苷分子的基本 3 次元構造。

根據 X 光衍射強度數據，可決定本發明結晶的結晶學參數。本發明之結晶其空間群為 $P2_1$ ，單位格子的晶格常數為 $a = 13.983 \text{ \AA}$ 、 $b = 7.620 \text{ \AA}$ 、 $c = 20.065 \text{ \AA}$ ，且為 $\alpha = \gamma = 90^\circ$ 、 $\beta = 93.475^\circ$ 之單斜晶系（monoclinic）。本結晶，經由 X 光結晶構造解析，具有解析其結晶構造之充分性狀之單結晶，本發明之結晶，只要它是具有上述空間群、晶格常數、及晶系之結晶，並不限定於作為整體的單晶體形態上者。

本發明之 α -葡萄糖基橘皮苷結晶，更具體而言，為在結晶上具有 α -葡萄糖基橘皮苷分子之各氧原子及各碳原子如後述表 3 及 4（續表 3）所示之原子座標者，提供於圖 4 所示之 ORTEP 圖。

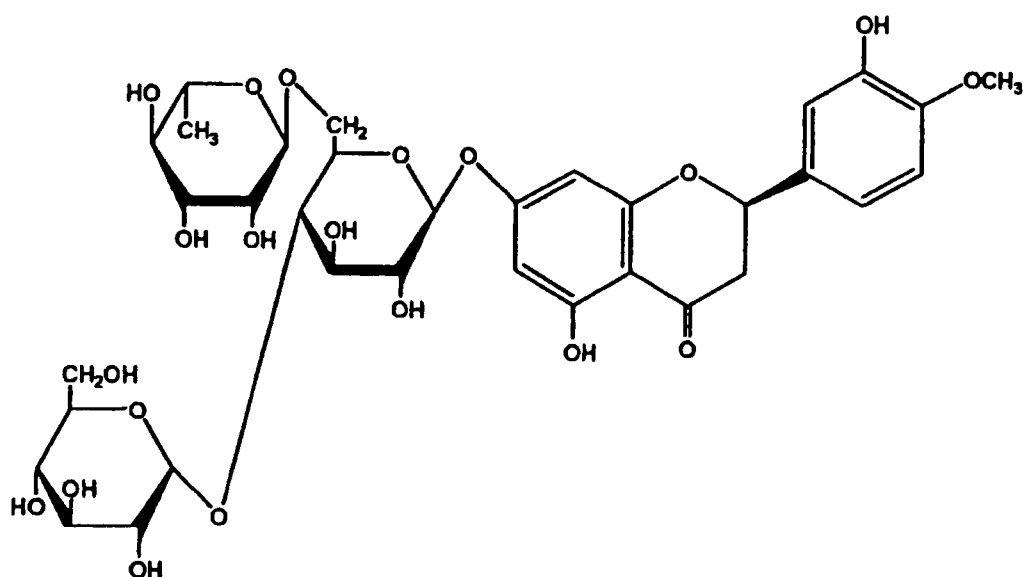
還有，本說明書所謂「實質地由 α -葡萄糖基橘皮苷之結晶所構成之粉體」，在製法上或是技術上的理由無法完全排除其存在之雜物以外，係意味幾乎其全量具有上述結晶學的參數之本發明的 α -葡萄糖基橘皮苷結晶所構成之粉體，在如此粉體上 α -葡萄糖基橘皮苷的純度，通常為 95.0% 以上，理想為 98.0% 以上，更加理想為 99.0% 以上。又，在本說明書所謂「粉體」，係意味比粉末，例如、包

含粒體、造粒物、成形體之固體粒子的集合體。

順便一提，在橘皮苷，藉由其 3'-羥基-4'-甲氧基苯基的立體配置不同存在 R 體與 S 體之 2 種光學異構物，S 體為天然存在，在水溶液中經由加熱等其立體配置容易反轉變成與 R 體之混合物。從而，從橘皮苷經由糖轉移反應所製造之 α -葡萄糖基橘皮苷，通常作為光學異構物之 R 體與 S 體成為混合存在。 α -葡萄糖基橘皮苷之 R 體及 S 體如下述化學式 1 及 2 所示。

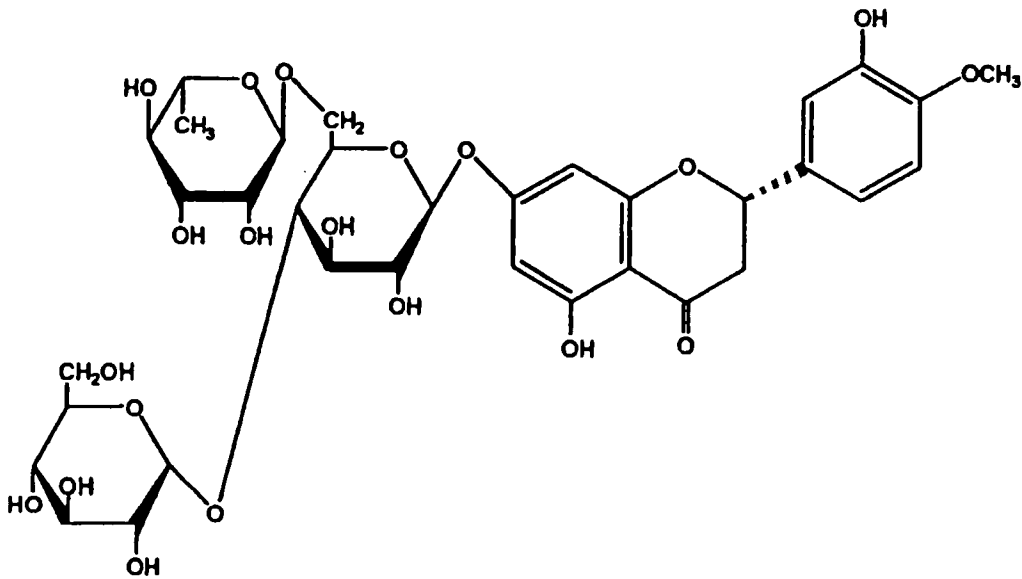
化學式 1： α -葡萄糖基-(R)-橘皮苷

【化 1】



化學式 2： α -葡萄糖基-(S)-橘皮苷

【化2】



爲橘皮苷之光學異構物之 R 體與 S 體，可用光學解析管柱經由 HPLC 進行分離定量， α -葡萄糖基橘皮苷之 R 體、S 體可依相同方法進行分析。還有，本發明之 α -葡萄糖基橘皮苷之結晶或實質地由該結晶所構成之粉體，如在後述實驗所示，作爲光學異構物之 R 體爲 70% 以上，詳細而言，含有 70% 以上未滿 80%。

2. α -葡萄糖基橘皮苷結晶之製造方法

以下，對於本發明之 α -葡萄糖基橘皮苷結晶之製造方法進行說明。

製造本發明之 α -葡萄糖基橘皮苷結晶之原料的 α -葡萄糖基橘皮苷由來必沒有特別限定，可藉由有機合成法所得到者，亦可藉由酵素合成法所得到者。通常，在橘皮苷共存下用環麥芽糊精葡聚糖轉移酶作用在澱粉之部分分解物上（以下，簡稱為「CGTase」），接著，使葡萄糖轉化酶

素作用，進而經由純化所得到之 α -葡萄糖基橘皮苷為合適的。藉由此酵素合成法所得到之含有 α -葡萄糖基橘皮苷粉末，含有來自其製造方法之雜物。本說明書所謂「來自製造方法之雜物」，係意味為製造原料之橘皮苷以微量狀態本來就混合在類似橘皮苷之配糖體（以下，本說明書單簡稱為「其他之配糖體」），在糖轉移反應所殘留之未反應的橘皮苷、未反應橘皮苷使具有 α -L-鼠李糖苷酶活性之酵素作用進行分解時該分解產物為 7-葡萄糖基橘皮苷素等。

調製本發明結晶所用之 α -葡萄糖基橘皮苷，只要具有形成結晶充分高之純度即可。 α -葡萄糖基橘皮苷之純度，可經由慣用的純度確認手段（例如，前述 HPLC 分析）進行確認。做為為了製造結晶之原料之 α -葡萄糖基橘皮苷含有物，通常具有純度為 90% 以上之 α -葡萄糖基橘皮苷者為佳，理想為 95% 以上、更理想為 98% 以上，進而更理想為 99% 以上。

有機化合物之結晶化，通常含有該有機化合物之溶液經由在過飽和狀態，從溶液狀態變成非溶解狀態，滿足特定條件時，基於作為結晶析出之性質進行。 α -葡萄糖基橘皮苷之結晶化，具體為可藉由

（1）添加 α -葡萄糖基橘皮苷於醇水溶液，加熱使其溶解；

（2）降低溶解 α -葡萄糖基橘皮苷溶液之溫度，成為過飽和狀態；

(3) 在過飽和狀態之 α -葡萄糖基橘皮苷溶液，保持在一定溫度使其析出結晶；之操作來進行。又，如有必要可經由添加種結晶促進結晶化。

順便一提，在前述日本第 3833811 號公報，純化至純度 81% 或 85% 之 α -葡萄糖基橘皮苷之凍結乾燥固形物（非晶質粉末）加入 99%（v/v）甲醇溶液，在 80℃ 下加熱溶解後，放置於室溫下使其析出結晶，以 99%（v/v）甲醇溶液洗淨，經由使其乾燥之方法製造含有 α -葡萄糖基橘皮苷結晶之 α -葡萄糖基橘皮苷高含有物。但是，再現此日本特許第 3833811 號公報所記載之結晶化方法時， α -葡萄糖基橘皮苷，如圖 7 所示，係微小結晶成為相互固著之塊狀結晶。用如此之結晶，解析 α -葡萄糖基橘皮苷之結晶構造是不可能的，又該結晶也並不能確定係由單一結晶形所構成者。

作為用於調製本發明結晶之溶劑，以使用甲醇、乙醇、丙醇、異丙醇、n-丁醇、異丁醇、t-丁醇等之碳數為 1 至 4 之低級醇與水混合之醇水溶液為佳。例如，作為溶劑使用甲醇水溶液時，甲醇濃度，通常為 80%（v/v）以下，較佳為 60%（v/v）以下，更佳為 30 至 40%（v/v）。甲醇濃度超過 80%（v/v）時，也依據 α -葡萄糖基橘皮苷之濃度，結晶急遽析出，因為微小結晶生成為相互固著之塊狀結晶故不適宜。又，醇濃度太低時會發生結晶不析出或析出成長需要長時間等之不便。

溶解於上述低級醇水溶液之 α -葡萄糖基橘皮苷的濃度只要為適合結晶化之濃度即可，通常為 0.1~20% (w/v)，較佳為 0.5~10% (w/v)，更佳為 1~5% (w/v)。結晶化時 α -葡萄糖基橘皮苷濃度比 20% (w/v) 高時，依據溶劑之醇濃度，結晶急劇析出，因為微小結晶生成為相互固著之塊狀結晶故不適宜。又， α -葡萄糖基橘皮苷濃度低於 0.1% (w/v) 時會發生結晶不析出或析出成長需要長時間等之不便。

溫度條件， α -葡萄糖基橘皮苷之濃度，也依據溶劑之醇濃度，通常為 0~50℃，較佳為 3~30℃，更佳為 4~10℃。

得到結晶之後，用實體顯微鏡從出品之結晶選別適合於 X 光結晶構造解析尺寸之結晶。要極力避開由複數結晶所貼合者、具龜裂者、察覺到白濁者、表面上有微結晶固著者。又，為了避開在結晶之表面從母液進而析出微結晶，可以有利地實施以結晶為目的來塗佈巴拉東油 (Paratone oil)。如此所得到之結晶可用於 X 光結晶構造解析。

本發明之 α -葡萄糖基橘皮苷之結晶或實質地由該結晶所構成之粉體，高度地純化該結晶構造到可以解析水準之純度，為被結晶化，被調製之高品質 α -葡萄糖基橘皮苷。本發明之 α -葡萄糖基橘皮苷之結晶及實質地由該結晶所構成之粉體，其本身，作為有效且安全之穩定醫藥品原料，與橘皮苷同樣作為各種疾病的預防或治療劑使用不只是對

病毒性疾病、細菌性疾病、心血管疾病、惡性腫瘤等橘皮苷為有效，同樣對於作為解釋 α -葡萄糖基橘皮苷之溶解性、安定性等之固體物理性、或結晶多態的有無或轉移現象之試藥亦極為有用。

本發明之 α -葡萄糖基橘皮苷之結晶及實質地由該結晶所構成之粉體作為醫藥品原料使用時之劑形並沒有特別制限，可依固狀、粉末、顆粒、錠劑等之形態使用，也可以與其他醫藥品原料之組成物形態來使用。

以下，以參考例及實施例為基礎對本發明作進一步更詳細說明。但是，本發明並非藉由這些實例被限定於此。

< 參考例：高純度 α -葡萄糖基橘皮苷非晶質粉末之調製 >

用於化妝品之含有 α -葡萄糖基橘皮苷之非晶質粉末（商品名「 α 葡萄糖基橘皮苷」， α -葡萄糖基橘皮苷含量 83.8%，林原股份公司生物體化學研究所販賣）（以下，稱為「試料 1」）作為高純度 α -葡萄糖基橘皮苷非晶質粉末之調製原料來使用。亦即，將 200g 的試料 1 懸濁在 134ml 80%（v/v）乙醇水溶液中，加熱至 80℃ 同時進行攪拌在完全使其溶解後，冷卻至室溫並在室溫放置 5 天後析出結晶，結晶變成相互固著之嵌段狀。得到之結晶嵌段以 80%（v/v）乙醇水溶液約 200ml 進行洗淨，經由利用濾紙（No.131，Advantech 東洋股份有限公司製）過濾回收結晶，於 45℃ 乾燥 5 小時之後，用研鉢進行粉碎得到 15.3g 之含有 α -葡萄糖基橘皮苷結晶之粉末（以下，稱為「試料

2」)。在試料 2 上其 α -葡萄糖基橘皮苷純度為 96.3%。

上述所得到 15g 的試料 2 溶解於濃度調製成 12.5% (w/v) 之純化水中，0.22 μ m 的膜過濾器所過濾後之物分成 3 次約各 5g 經由下述條件供於 ODS 管柱層析。

< ODS 管柱層析條件 >

裝置：『CCCP-D』（東曹股份公司製）

管柱：『YMC-Pak ODS-AQ』（內徑 50mm×長 500mm）
(YMC 股份有限公司製)

試料注入量：40ml

洗脫液：35% (v/v) 甲醇水溶液

流速：40ml/分

溫度：40℃

檢出：差示折射計『Shodex RI-102』（昭和電工股份有限公司製）

數據處理裝置：『Chromatographic PackC-R7A』（島津製作所股份公司製）

餾分：50ml/分餾物

在以 ODS 管柱層析所得到之各分餾物對 α -葡萄糖基橘皮苷純度以 HPLC 分析進行測定，收集純度 98% 以上之分餾物，經由普通方法進行凍結乾燥，得到 13.2g 純度 99.0% 含有 α -葡萄糖基橘皮苷之非晶質凍結乾燥粉末（以下，稱為「試料 3」）。

上述試料 1 至 3，亦即，用於化妝品之含有 α -葡萄糖基橘皮苷之非晶質粉末、含有 α -葡萄糖基橘皮苷結晶之粉末、以及含有 α -葡萄糖基橘皮苷之非晶質凍結乾燥粉末的組成總結在表 1。

[表1]

No.	試料	組成 (質量%)			
		α -葡萄糖基 橘皮苷	橘皮苷	7-葡萄糖基 橘皮苷素	其他配糖體
1	含有 α -葡萄糖基橘皮苷之非晶質 粉末(化妝品用)	83.8	0.6	12.3	3.3
2	含有 α -葡萄糖基橘皮苷結晶之粉末	96.3	0.1	0.5	3.1
3	含有 α -葡萄糖基橘皮苷之非晶質 凍結乾燥粉末	99.0	0.0	0.1	0.9

在試料 1 經由用 80% (v/v) 乙醇之結晶化使 α -葡萄糖基橘皮苷純度從 83.8 % 上昇至 96.3%，為雜物之 7-葡萄糖基橘皮苷素含量從 12.3% 下降至 0.5%，其他的配糖體的含量只有少許下降。接著由進行 ODS 管柱層析使 α -葡萄糖基橘皮苷純度從 96.3% 上昇至 99.0%，其他的配糖體的含量下降至 0.9%。最終得到為了調製結晶所使用之純度 99.0% 含有 α -葡萄糖基橘皮苷之非晶質凍結乾燥粉末（試料 3）。

[實施例 1]

< α -葡萄糖基橘皮苷單結晶之調製 >

添加上述參考例所得 3g 含有 α -葡萄糖基橘皮苷之非晶質凍結乾燥粉末（試料 3）於 150ml 之 30% (v/v) 甲醇水溶液，進行攪拌同時加熱至 80℃ 使其完全溶解，接著，所得到之溶液經由於 4℃ 保持 14 天而結晶化。所得到之結晶懸濁液的顯微鏡照片例示於圖 1。如圖 1 所看到一般，觀察到比較大的無色板狀的結晶析出。從長出結晶的 α -葡萄糖基橘皮苷之結晶，收集適當的大小者於接續數位顯微鏡（「MX-1200II/NDL」，Nakaden 股份有限公司製）之實體顯微鏡下，立刻於巴拉東油（Paratone oil）塗佈之後，搭載於試料支持器上，作為 X 光結晶構造解析用試料。

取得 X 光結晶構造解析用之結晶所殘留之結晶懸濁液，用濾紙（No.4，Advantech 東洋股份有限公司製）經

由桐山漏斗進行過濾而回收結晶之後，乾燥而得到 α -葡萄糖基橘皮苷之結晶約 1.2g。還有，本結晶品之 α -葡萄糖基橘皮苷純度為 99.3%。

[實施例 2]

< α -葡萄糖基橘皮苷之單結晶 X 光結晶構造解析 >

在實施例 1 搭載試料支持器之 α -葡萄糖基橘皮苷之單結晶，設定在單結晶 X 光衍射裝置（「R-AXIS RAPID-R」，理學股份有限公司製），於氮氣（ -170°C ）環境下，經由振動照片法以下述之條件測定 X 光衍射圖案。

< X 光衍射圖案測定條件 >

X 光源：Cu

出力：50kV，100mA

入射 X 光：CuK α 線（ $\lambda = 1.54187\text{\AA}$ ）

入射 X 光尺寸：約 0.5mm ϕ

結晶尺寸：0.10×0.10×0.03mm

檢測器：成像板

測定溫度：約 -170°C （氮氣噴塗法）

經由 X 光衍射用於單結晶構造解析的 α -葡萄糖基橘皮苷結晶之實體顯微鏡照片在圖 2 上，各自展示其 X 光衍射圖案之一例於圖 3 上。在 X 光衍射圖案，多數衍射斑點（Spot）被確認，確認出該結晶為單結晶。還有，X 光

衍射峰值的形狀為比較良好者，其峰值強度為弱化。觀測到在 39,960 個的反射（衍射）內，固有的反射為 7,806 個。

以上述 X 光衍射圖案的 X 光衍射強度為基礎，按直接法求得初期構造的同時，以 α -葡萄糖基橘皮苷之構造式作為參考作成構造模型，進而基於 4,739 個的反射經由最小二乘法使其精密化。還有，作為解析軟體，使用理學股份有限公司製的「Crystal Structure Ver. 3.8.2」。藉由 X 光結晶構造解析所得到之 α -葡萄糖基橘皮苷之結晶學的數據總結在表 2。

[表2]

分子式	$C_{34}H_{44}O_{20}$
分子量	772.71
結晶 (外觀)	無色、板狀
結晶大小	$0.10 \times 0.10 \times 0.03 \text{ mm}$
結晶系	單斜晶系 (monoclinic)
空間群	$P2_1$
晶格常數	
a	$13.9834(6) \text{ \AA}$
b	$7.6197(3) \text{ \AA}$
c	$20.0647(10) \text{ \AA}$
α	90°
β	$93.475(3)^\circ$
γ	90°
V	$2133.95(16) \text{ \AA}^3$
Z (molecules/cell)	2
D_{calc}	1.202 g/cm^3
$\mu(\text{CuK}\alpha)$	8.620 cm^{-1}
輻射	$\text{CuK}\alpha (\lambda=1.54187 \text{ \AA})$ 石墨單色
R, R_w	0.2295, 0.2988
max/min diff. peaks	$7.42/-2.13 \text{ e}^-/\text{ \AA}^3$

(* : 在晶格常數之各數值上括弧內之數值係意味標準偏差值。)

如表 2 所示，從所得到之 X 光衍射強度數據，結晶所屬的晶系決定為單斜晶系 (monoclinic)，空間群為 $P2_1$ ，晶格常數為 $a = 13.983 \text{ \AA}$ 、 $b = 7.620 \text{ \AA}$ 、 $c = 20.065 \text{ \AA}$ 、 $\alpha = \gamma = 90^\circ$ 、 $\beta = 93.475^\circ$ 、 $V = 2133.95 \text{ \AA}^3$ 。又，表示每結晶之單位格子的 α -葡萄糖基橘皮苷分子數之 Z 值成為 2，在本結晶，判斷每結晶之單位格子含有 2 分子的 α -葡

糖基橘皮苷。

< 分子構造及結晶構造之解析 >

按照直接法解析之結果，在 α -葡糖基橘皮苷分子上其氫原子雖為無法鑑別者，對於非氫原子（碳原子及氧原子）之基本骨架，可基於 α -葡糖基橘皮苷之構造訊息於各原子位置上配置元素。經由座標數據之精密化得到在 α -葡糖基橘皮苷分子上之各氧原子及碳原子的原子座標（ x ， y ， z ）與各自之各向同性（Isotropy）溫度因子（ B_{eq} ）之值表示於表 3 及 4（續表 3）上。又，展示在 α -葡糖基橘皮苷分子上除氫原子之外各原子間的距離於表 5 上，又，各自展示除氫原子之外各原子間的結合角度於表 6 及表 7（續表 6）上。

進而，展示從精密化座標數據來計算表示 α -葡糖基橘皮苷之 ORTEP 圖於圖 4。又，每結晶單位格子之 α -葡糖基橘皮苷分子的包裝構造，作為從 b 軸方向所見情形之結晶構造圖表示於圖 5。還有，在表 3 至 7 其氧原子及碳原子之號碼各自對應記載於圖 4 之 α -葡糖基橘皮苷的 ORTEP 圖上之氧原子及碳原子的號碼。又，在表 3 至 7 上各數值其括號內的數值意味著標準偏差。

[表3]

原子	x	y	z	Beq
O(1)	0.3042(13)	0.348(2)	0.3276(8)	4.8(3)
O(2)	0.4486(12)	0.552(2)	0.3465(8)	4.2(3)
O(3)	0.6939(8)	0.2378(15)	0.4907(5)	2.1(2)
O(4)	0.7977(9)	-0.2655(17)	0.4865(6)	2.6(2)
O(5)	0.9475(10)	-0.1662(19)	0.5588(7)	3.2(2)
O(6)	0.9653(8)	0.4410(16)	0.6123(6)	2.3(2)
O(7)	1.1175(8)	0.7012(16)	0.6116(6)	2.4(2)
O(8)	1.1782(9)	0.7876(16)	0.7435(6)	2.6(2)
O(9)	1.0317(7)	0.3330(15)	0.7103(5)	1.85(19)
O(10)	1.0173(8)	0.2544(15)	0.8459(5)	2.1(2)
O(11)	0.9186(8)	0.2479(15)	1.0086(6)	2.1(2)
O(12)	0.7641(9)	0.3557(16)	0.9273(6)	2.5(2)
O(13)	0.7313(9)	0.0281(18)	0.8578(6)	2.8(2)
O(14)	0.9873(7)	-0.0011(14)	0.9076(5)	1.59(19)
O(15)	1.2258(9)	0.4873(17)	0.8273(6)	2.7(2)
O(16)	1.2815(7)	0.8224(14)	0.8686(5)	1.52(18)
O(17)	1.4612(8)	0.7237(16)	0.9385(6)	2.3(2)
O(18)	1.4860(9)	0.3382(18)	0.9384(6)	2.9(2)
O(19)	1.2258(7)	0.3959(13)	0.9359(5)	1.36(18)
O(20)	1.2346(9)	0.0395(17)	0.9624(6)	2.5(2)
C(1)	0.2251(18)	0.239(3)	0.3094(13)	4.5(4)
C(2)	0.380(2)	0.278(4)	0.3703(15)	5.7(6)
C(3)	0.381(2)	0.104(3)	0.3950(13)	4.9(5)
C(4)	0.4644(14)	0.074(2)	0.4287(10)	2.8(3)
C(5)	0.5425(12)	0.166(2)	0.4365(9)	2.2(3)
C(6)	0.5377(16)	0.331(3)	0.4094(11)	3.8(4)
C(7)	0.4597(14)	0.390(2)	0.3765(9)	2.6(3)
C(8)	0.6348(15)	0.090(2)	0.4753(10)	3.3(3)
C(9)	0.6733(14)	-0.048(2)	0.4523(10)	2.9(3)
C(10)	0.7616(12)	-0.110(2)	0.4865(9)	2.3(3)
C(11)	0.8164(14)	0.022(2)	0.5255(9)	2.7(3)
C(12)	0.7835(11)	0.198(2)	0.5190(7)	1.5(2)
C(13)	0.8296(12)	0.336(2)	0.5508(8)	2.1(2)
C(14)	0.9223(11)	0.299(2)	0.5873(8)	1.7(2)
C(15)	0.9623(12)	0.131(2)	0.5861(8)	1.9(2)
C(16)	0.9152(11)	0.002(2)	0.5542(8)	1.8(2)
C(17)	1.0498(12)	0.430(2)	0.6540(9)	2.1(3)

[表4]

原子	x	y	z	Beq
C(18)	1.0796(12)	0.611(2)	0.6663(8)	1.8(2)
C(19)	1.1669(14)	0.613(2)	0.7262(9)	2.6(3)
C(20)	1.1429(11)	0.500(2)	0.7797(8)	1.8(2)
C(21)	1.1195(10)	0.309(2)	0.7534(7)	1.4(2)
C(22)	1.0949(12)	0.176(2)	0.8122(8)	2.0(2)
C(23)	1.0094(10)	0.1832(19)	0.9088(7)	1.3(2)
C(24)	0.9351(11)	0.296(2)	0.9395(8)	1.9(2)
C(25)	0.8384(10)	0.257(2)	0.8986(7)	1.4(2)
C(26)	0.8154(11)	0.056(2)	0.8949(8)	1.7(2)
C(27)	0.8985(13)	-0.044(2)	0.8676(9)	2.3(3)
C(28)	0.8881(17)	-0.251(3)	0.8756(12)	4.0(4)
C(29)	1.2142(12)	0.537(2)	0.8939(9)	2.2(3)
C(30)	1.2939(11)	0.665(2)	0.9124(8)	1.8(2)
C(31)	1.3902(12)	0.598(2)	0.9112(9)	2.2(3)
C(32)	1.3966(11)	0.429(2)	0.9518(8)	1.8(2)
C(33)	1.3188(11)	0.305(2)	0.9328(8)	1.9(2)
C(34)	1.3095(12)	0.149(2)	0.9833(8)	2.0(2)

[表5]

原子	原子	距離 (Å)	原子	原子	距離 (Å)
O(1)	C(1)	1.41(3)	O(1)	C(2)	1.42(3)
O(2)	C(7)	1.38(2)	O(3)	C(8)	1.42(2)
O(3)	C(12)	1.377(19)	O(4)	C(10)	1.29(2)
O(5)	C(16)	1.36(2)	O(6)	C(14)	1.32(2)
O(6)	C(17)	1.41(2)	O(7)	C(18)	1.42(2)
O(8)	C(19)	1.39(2)	O(9)	C(17)	1.39(2)
O(9)	C(21)	1.470(18)	O(10)	C(22)	1.44(2)
O(10)	C(23)	1.386(19)	O(11)	C(24)	1.47(2)
O(12)	C(25)	1.43(2)	O(13)	C(26)	1.37(2)
O(14)	C(23)	1.438(18)	O(14)	C(27)	1.47(2)
O(15)	C(20)	1.46(2)	O(15)	C(29)	1.41(2)
O(16)	C(30)	1.49(2)	O(17)	C(31)	1.46(2)
O(18)	C(32)	1.47(2)	O(19)	C(29)	1.37(2)
O(19)	C(33)	1.479(19)	O(20)	C(34)	1.38(2)
C(2)	C(3)	1.42(4)	C(2)	C(7)	1.40(3)
C(3)	C(4)	1.33(3)	C(4)	C(5)	1.30(2)
C(5)	C(6)	1.37(3)	C(5)	C(8)	1.58(2)
C(6)	C(7)	1.32(3)	C(8)	C(9)	1.28(3)
C(9)	C(10)	1.46(2)	C(10)	C(11)	1.46(2)
C(11)	C(12)	1.42(2)	C(11)	C(16)	1.47(2)
C(12)	C(13)	1.37(2)	C(13)	C(14)	1.48(2)
C(14)	C(15)	1.40(2)	C(15)	C(16)	1.33(2)
C(17)	C(18)	1.46(2)	C(18)	C(19)	1.66(2)
C(19)	C(20)	1.43(2)	C(20)	C(21)	1.57(2)
C(21)	C(22)	1.61(2)	C(23)	C(24)	1.51(2)
C(24)	C(25)	1.57(2)	C(25)	C(26)	1.57(2)
C(26)	C(27)	1.52(2)	C(27)	C(28)	1.59(3)
C(29)	C(30)	1.51(2)	C(30)	C(31)	1.44(2)
C(31)	C(32)	1.52(2)	C(32)	C(33)	1.47(2)
C(33)	C(34)	1.57(2)			

[表6]

原子	原子	原子	角度 (°)	原子	原子	原子	角度 (°)
C(1)	O(1)	C(2)	119(2)	C(8)	O(3)	C(12)	114.8(13)
C(14)	O(6)	C(17)	121.6(13)	C(17)	O(9)	C(21)	110.9(11)
C(22)	O(10)	C(23)	111.6(12)	C(23)	O(14)	C(27)	113.6(11)
C(20)	O(15)	C(29)	118.1(13)	C(29)	O(19)	C(33)	114.6(12)
O(1)	C(2)	C(3)	123(2)	O(1)	C(2)	C(7)	113(2)
C(3)	C(2)	C(7)	123(2)	C(2)	C(3)	C(4)	109(2)
C(3)	C(4)	C(5)	132(2)	C(4)	C(5)	C(6)	115.5(18)
C(4)	C(5)	C(8)	120.8(17)	C(6)	C(5)	C(8)	123.7(17)
C(5)	C(6)	C(7)	122(2)	O(2)	C(7)	C(2)	115.8(19)
O(2)	C(7)	C(6)	126.1(19)	C(2)	C(7)	C(6)	118(2)
O(3)	C(8)	C(5)	105.1(15)	O(3)	C(8)	C(9)	118.5(19)
C(5)	C(8)	C(9)	118.3(18)	C(8)	C(9)	C(10)	117.5(18)
O(4)	C(10)	C(9)	128.5(16)	O(4)	C(10)	C(11)	116.1(15)
C(9)	C(10)	C(11)	115.4(16)	C(10)	C(11)	C(12)	116.4(15)
C(10)	C(11)	C(16)	125.9(16)	C(12)	C(11)	C(16)	115.1(15)
O(3)	C(12)	C(11)	121.6(14)	O(3)	C(12)	C(13)	114.6(14)
C(11)	C(12)	C(13)	122.7(15)	C(12)	C(13)	C(14)	117.2(15)
O(6)	C(14)	C(13)	113.2(14)	O(6)	C(14)	C(15)	125.7(14)
C(13)	C(14)	C(15)	120.5(15)	C(14)	C(15)	C(16)	119.9(15)
O(5)	C(16)	C(11)	115.1(15)	O(5)	C(16)	C(15)	120.7(15)
C(11)	C(16)	C(15)	122.7(16)	O(6)	C(17)	O(9)	109.0(13)
O(6)	C(17)	C(18)	105.5(14)	O(9)	C(17)	C(18)	115.6(15)
O(7)	C(18)	C(17)	116.1(14)	O(7)	C(18)	C(19)	105.3(13)
C(17)	C(18)	C(19)	108.6(13)	O(8)	C(19)	C(18)	104.7(14)
O(8)	C(19)	C(20)	114.7(16)	C(18)	C(19)	C(20)	110.2(15)
O(15)	C(20)	C(19)	108.5(14)	O(15)	C(20)	C(21)	107.4(12)
C(19)	C(20)	C(21)	110.8(14)	O(9)	C(21)	C(20)	103.5(11)
O(9)	C(21)	C(22)	107.5(11)	C(20)	C(21)	C(22)	112.8(12)
O(10)	C(22)	C(21)	106.3(12)	O(10)	C(23)	O(14)	113.3(12)
O(10)	C(23)	C(24)	104.1(12)	O(14)	C(23)	C(24)	114.3(12)
O(11)	C(24)	C(23)	113.3(13)	O(11)	C(24)	C(25)	105.5(12)
C(23)	C(24)	C(25)	105.7(12)	O(12)	C(25)	C(24)	108.2(12)
O(12)	C(25)	C(26)	112.4(12)	C(24)	C(25)	C(26)	112.3(12)
O(13)	C(26)	C(25)	110.1(12)	O(13)	C(26)	C(27)	112.3(14)
C(25)	C(26)	C(27)	110.4(13)	O(14)	C(27)	C(26)	109.2(13)
O(14)	C(27)	C(28)	104.2(14)	C(26)	C(27)	C(28)	112.6(15)
O(15)	C(29)	O(19)	110.9(14)	O(15)	C(29)	C(30)	106.4(14)

[表7]

原子	原子	原子	角度 (°)	原子	原子	原子	角度 (°)
O(19)	C(29)	C(30)	107.3(13)	O(16)	C(30)	C(29)	108.4(12)
O(16)	C(30)	C(31)	110.7(13)	C(29)	C(30)	C(31)	116.1(14)
O(17)	C(31)	C(30)	111.7(14)	O(17)	C(31)	C(32)	109.7(13)
C(30)	C(31)	C(32)	108.5(14)	O(18)	C(32)	C(31)	108.8(13)
O(18)	C(32)	C(33)	106.0(13)	C(31)	C(32)	C(33)	112.6(13)
O(19)	C(33)	C(32)	109.0(13)	O(19)	C(33)	C(34)	102.7(12)
C(32)	C(33)	C(34)	114.0(13)	O(20)	C(34)	C(33)	110.6(13)

還有，在圖 4 所示 ORTEP 圖上，各自展示碳號碼 C1 至 C16 在 α -葡萄糖基橘皮苷分子上之橘皮苷素構造、碳號碼 C17 至 C28 蘆丁糖 (Rutinose) (L-吡喃鼠李糖基 (rhamnopyranosyl) (α 1 $\rightarrow$ 6) 葡萄糖) 之構造、又碳號碼 C29 至 C34 構成蘆丁糖 (Rutinose) 構造之葡萄糖 4 位羥基上通過 α -葡萄糖苷結合所結合之葡萄糖構造。另一方面，從圖 5 所示結晶構造圖，在本結晶，可理解每單位格子係由 2 分子之 α -葡萄糖基橘皮苷所包裝。

[實施例 3]

< α -葡萄糖基橘皮苷結晶之調製 >

添加上述參考例所得 2g 含有 α -葡萄糖基橘皮苷之非晶質凍結乾燥粉末 (試料 3) 於 50ml 之 40% (v/v) 甲醇水溶液，進行攪拌同時加熱至 80℃ 使其完全溶解，接著，所得到之溶液經由於 10℃ 保持 10 天而結晶化。得到與實施例 1 所得同樣無色、板狀之結晶。本結晶也與實施例 1 得到之結晶同樣可用於 X 光結晶構造解析。結晶懸濁液

，利用濾紙（No.4，Advantech 東洋股份有限公司製）經由桐山漏斗進行過濾而回收，得到 α -葡萄糖基橘皮苷之結晶約 0.9g。還有，本結晶品之 α -葡萄糖基橘皮苷純度為 99.1%。

[實施例 4]

< 在 α -葡萄糖基橘皮苷結晶上其光學異構物存在比之測定 >

於實施例 1 及 3 所得到 α -葡萄糖基橘皮苷結晶上其 α -葡萄糖基橘皮苷之光學異構物存在比，用光學解析管柱調查。

各結晶品約 2mg，各自溶解於 10ml 洗脫液（20mm 磷酸 1 鉀水溶液（pH3.0）／乙腈（86／14）），在下述所示條件供於光學解析 HPLC，測定光學異構物之存在比。作為實施例 1 之結晶色譜圖一個例子表示於圖 6。又，各結晶品之分析結果表示於表 8。

< HPLC 分析條件 >

HPLC 裝置：

管柱：『SUMICHIRAL OA-7000』（4.6×250mm）

（住化股份有限公司分析中心製）

試料注入量：10 μ l

洗脫液：20mm 磷酸 1 鉀水溶液（pH3.0）／乙腈（86/14）

流速：0.4ml/分

管柱溫度：35℃

檢出：UV280nm

數據處理裝置：『Chromatographic PackCR-4A』（
島津製作所股份有限公司製）

在色譜圖上將 α -葡萄糖基橘皮苷之 R 體及 S 體的峰值面積比作為存在比。

[表8]

α -葡萄糖基橘皮苷 之結晶品	存在比 (%)	
	R 體	S 體
實施例 1	79.6	20.4
實施例 3	71.2	28.8

如圖 6 所示，在本分析條件下其 α -葡萄糖基橘皮苷之 R 體及 S 體峰值經由光學解析管柱完全分離，各自於保持時間（Rt）31.4 分鐘及 34.9 分鐘溶出。從表 8 可清楚瞭解，在實施例 1 所得到的 α -葡萄糖基橘皮苷之結晶品作為光學異構物之 R 體與 S 體之比率約為 8：2，實施例 3 之結晶品同比率為約 7：3，所以 R 體之存在比較高。

[實施例 5]

< 實質上由 α -葡萄糖基橘皮苷之結晶所構成之粉體的製造方法 >

添加以參考例之方法所得到之含有 α -葡萄糖基橘皮苷之非晶質凍結乾燥粉末 4 質量份於 100 質量份 35% (v/v) 甲醇水溶液，經由進行攪拌同時加熱至 80℃ 使其完全溶解，接著，所得到之溶液經由於 10℃ 保持 14 天而結晶化。得到與實施例 1 所得同樣無色、板狀之結晶。結晶懸濁液經由進行過濾而回收之後，乾燥後得到實質上由 α -葡萄糖基橘皮苷之結晶所構成的粉體約 2 質量份。還有，本品之 α -葡萄糖基橘皮苷純度為 99.2%。本品，可適合用於作為醫藥品原料等。

[實施例 6]

<錠劑>

以實施例 5 之方法所得到實質上由 α -葡萄糖基橘皮苷之結晶所構成之粉體 20 質量份、麥芽糖 30 質量份、及玉米澱粉 4 質量份均勻地混合之粉末經以一般方法在壓錠機上製造 1 錠 0.5g 之錠劑。本品，不只作為維生素 P 補給劑、作為血管系疾病治療劑、關節疾病治療劑等可有利地使用。

[實施例 7]

<複合維生素劑>

對於 L-抗壞血酸鈉（試藥級，和光純藥工業股份有限公司販賣）10 質量份，加上以實施例 5 之方法所得到之實質上由 α -葡萄糖基橘皮苷之結晶所構成之粉體 15 質量

份，以通用攪拌機混合後，放置一晚，進行粉碎，調製粉末狀之複合維生素劑。本品，經由 α -葡糖基橘皮苷使 L-抗壞血酸安定化，不只是維生素 C 缺乏症及維生素 P 缺乏症的預防或治療，也可利用在對微血管的強化、胃腸疾病的改善等目的上。

[實施例 8]

< 使用前溶解型注射劑 >

添加以參考例的方法所得到之 α -葡糖基橘皮苷含有非晶質凍結乾燥粉末 3 質量份於 150 質量份 35% (v/v) 甲醇水溶液，經由進行攪拌同時加熱至 80℃ 使其完全溶解後，依從普通方法進行精密過濾以去除致熱質，全部操作除了擔心致熱質的混入之外，與實施例 1 以同樣方式將 α -葡糖基橘皮苷進行結晶化，乾燥之後進行粉碎，得到實質上由 α -葡糖基橘皮苷之結晶所構成的無熱原的粉體約 1 質量份。還有，本品之 α -葡糖基橘皮苷純度為 99.3%。將此 50mg 粉體置入無菌的 20ml 容安瓿瓶中，以氮氣取代之後，進行封管，成為包含安瓿瓶之使用前溶解型注射劑。本品，以單體，或與其他維生素、礦物質等混合可投藥於筋肉內或靜脈內，不只是作為維生素 P 補給劑，作為血管系疾病治療劑、關節疾病治療劑等可有利地使用。

[實施例 9]

< α - 葡萄糖基橘皮苷對細胞的自噬作用之影響效果 >

使用以實施例 3 的方法所得到之 α - 葡萄糖基橘皮苷其純度為 99% 以上之結晶 α - 葡萄糖基橘皮苷標品，調查 α - 葡萄糖基橘皮苷對細胞的自噬作用，亦即，細胞經由積極地排除蓄積在細胞內不要蛋白質、損傷的線粒體等預防疾病現象上之影響效果。以係免疫系細胞之 HOZOT 細胞（參照再公表專利 WO2007/105797）或為神經細胞株之 SH-SY-5 株作為試驗對象，將 α - 葡萄糖基橘皮苷，添加成在 HOZOT 細胞時最終濃度為 1 或 10 μ M，在 SH-SY-5 株時最終濃度為 10 或 25 μ M 之培養液，經 24 小時處理後回收細胞，各自調製細胞萃取液。接著，將細胞萃取液供於 SDS-PAGE 之後，藉由西方氏轉漬法測定係自噬作用標記蛋白的 LC-3B 之表現量。作為試驗細胞使用 HOZOT 細胞時的結果如表 9，使用 SH-SY-5 株時的結果如表 10 各自所示。

[表9]

試料	處理濃度(μ M)	自噬作用標記蛋白之 相對表現量(LC-3B)
無添加(對照1)	-	100
MG-132*(對照2)	1	300
噻唑烷二酮**(對照3)	1	460
α - 葡萄糖基橘皮苷	1	460
α - 葡萄糖基橘皮苷	10	210

*: 已知有自噬作用促進效果之藥劑(陽性對照)
**: Thiazolidinedione (TZD)、噻唑烷二酮已知對自噬作用促進效果之藥劑(陽性對照)

[表10]

試料	處理濃度 (μM)	自噬作用標記蛋白之 相對表現量(LC-3B)
無添加(對照1)	-	100
氯化奎寧*(對照2)	50	360
噻唑烷二酮**(對照3)	1	523
α -葡萄糖基橘皮苷	10	630
α -葡萄糖基橘皮苷	25	746

*: 抗瘧疾藥、誘導LC-3B表現之藥劑(陽性對照)

** : Thiazolidinedione (TZD)、噻唑烷二酮已知對自噬作用促進效果之藥劑(陽性對照)

從表 9 可清楚理解，在 HOZOT 細胞時，以 $1\mu\text{M}$ 之 α -葡萄糖基橘皮苷進行處理，其 LC-3B 之表現量增加為無處理（對照 1）的 4.6 倍。此 α -葡萄糖基橘皮苷的效果，比所知具自噬作用之促進作用的藥劑 MG-132（對照 2）更強，又，與噻唑烷二酮（對照 3）為相同程度。另一方面，從表 10 清楚理解，在 SH-SY-5 株時，以 $10\mu\text{M}$ 或 $25\mu\text{M}$ 之 α -葡萄糖基橘皮苷進行處理，其 LC-3B 之表現量增加為無處理（對照 1）之約 6.3 倍或約 7.5 倍。此效果，比以 $1\mu\text{M}$ 之噻唑烷二酮（對照 3）所處理的情形更強。從此等之結果，可判斷 α -葡萄糖基橘皮苷作為細胞之自噬作用促進劑係有用的。自噬作用，已知與亨廷頓氏病所代表之神經變性疾病或 2 型糖尿病等相關連，具有細胞的自噬作用促進作用之 α -葡萄糖基橘皮苷可應用於對此等疾病之治療。

[產業上的利用可能性]

本發明，其係提供一種已確定結晶構造之 α -葡萄糖基橘皮苷的新穎結晶與實質地由該結晶所構成之粉體、以及作為該醫藥品原料用途者。與本發明相關之 α -葡萄糖基橘皮苷之結晶及實質地由該結晶所構成之粉體，其本身作為有效且安全的穩定醫藥品原料，與橘皮苷同樣、不僅可用作為橘皮苷有效的病毒性疾病、細菌性疾病、心血管疾病、惡性腫瘤等各種疾病的預防或治療劑使用，同樣對於作為解析 α -葡萄糖基橘皮苷之溶解性、安定性等之固體物理性、或結晶多態的有無或轉移現象之試藥也極為有用。本發明，作為 α -葡萄糖基橘皮苷之醫藥品原料的用途被大大開拓出來，其產業上的有用性極大。

【圖式簡單說明】

[圖 1] 為用 30% (v/v) 甲醇水溶液藉由結晶化所得到的 α -葡萄糖基橘皮苷結晶之顯微鏡照片之一例（倍率：250 倍）。

[圖 2] 為用於 X 光結晶構造解析之 α -葡萄糖基橘皮苷結晶（ $0.1 \times 0.1 \times 0.03 \text{ mm}$ ）的實體顯微鏡照片。

[圖 3] 為 α -葡萄糖基橘皮苷結晶的 X 光衍射圖案之一個例子。

[圖 4] 為去除氫原子之 α -葡萄糖基橘皮苷之 ORTEP 圖。

[圖 5] 為在結晶單位格子上表示 α -葡萄糖基橘皮苷分子包裝的結晶構造圖（b 軸方向）。

[圖 6] 為用於 X 光結晶構造解析之 α -葡萄糖基橘皮苷結晶供於光學解析 HPLC 時之色譜圖。

[圖 7] 為使用 99% (v/v) 甲醇溶液經由結晶化所得之 α -葡萄糖基橘皮苷結晶之顯微鏡照片之一例 (倍率：500 倍)。

七、申請專利範圍：

1. 一種 α -葡萄糖基橘皮苷之結晶，其結晶之空間群為 $P2_1$ ，單位格子的晶格常數為 $a = 13.983 \text{ \AA}$ 、 $b = 7.620 \text{ \AA}$ 、 $c = 20.065 \text{ \AA}$ ，且為 $\alpha = \gamma = 90^\circ$ 、 $\beta = 93.475^\circ$ 之單斜晶系 (monoclinic)。

2. 如申請專利範圍第 1 項之結晶，其中構成 α -葡萄糖基橘皮苷分子之氧原子及碳原子具有如表 3 及表 4 所示之原子座標。

3. 如申請專利範圍第 1 項或第 2 項之結晶，其為單結晶之形態。

4. 一種粉體，其係實質地由申請專利範圍第 1 項至第 3 項之任一項所記載之結晶所構成。

5. 如申請專利範圍第 1 至 3 項所記載之結晶或如申請專利範圍第 4 項之粉體，其中，供於使用光學解析管柱之高速液體層析分析時，含有 70 質量%以上作為光學異構物之 α -葡萄糖基-(R)-橘皮苷。

6. 如申請專利範圍第 1 至 3 項所記載之結晶或如申請專利範圍第 4 項之粉體，其係作為醫藥品原料。

圖 1

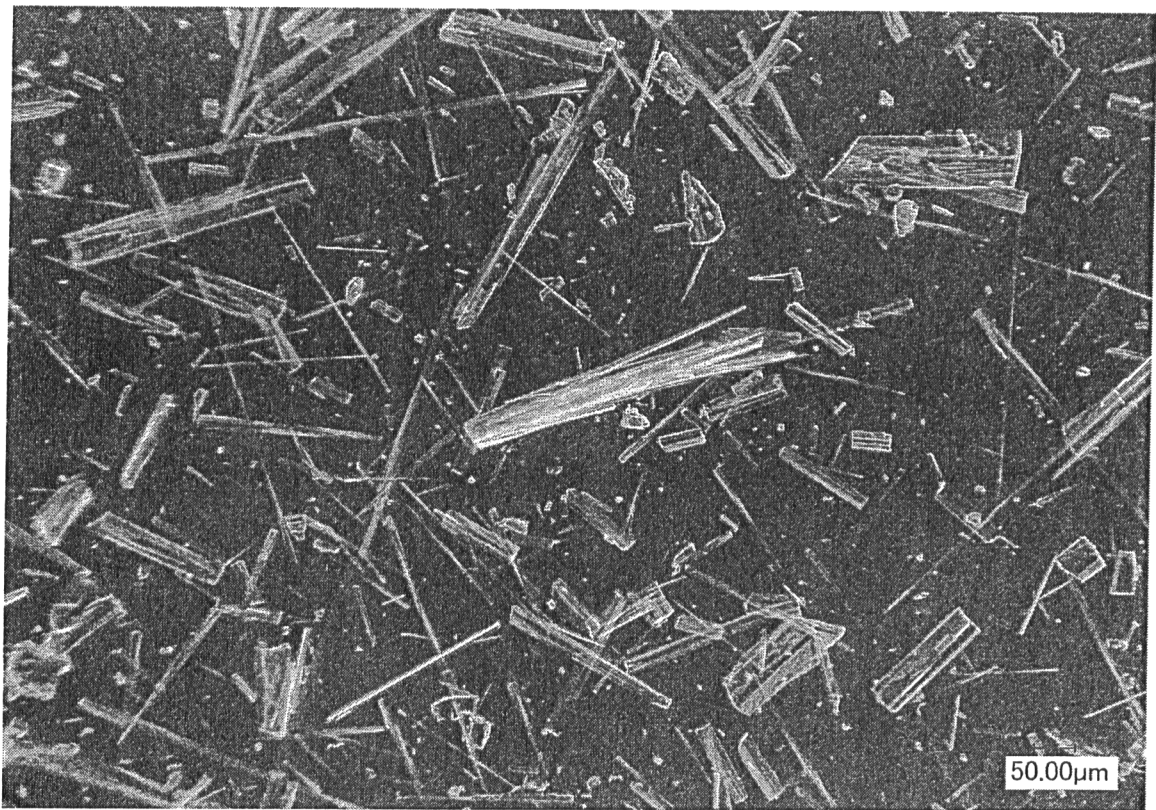


圖 2



圖3

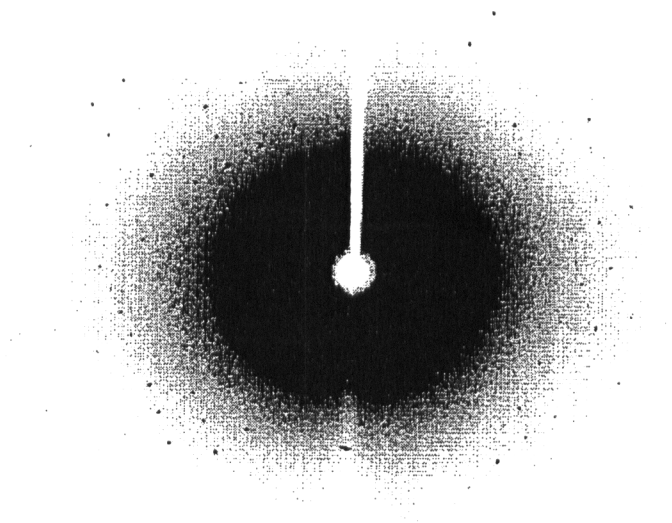


圖4

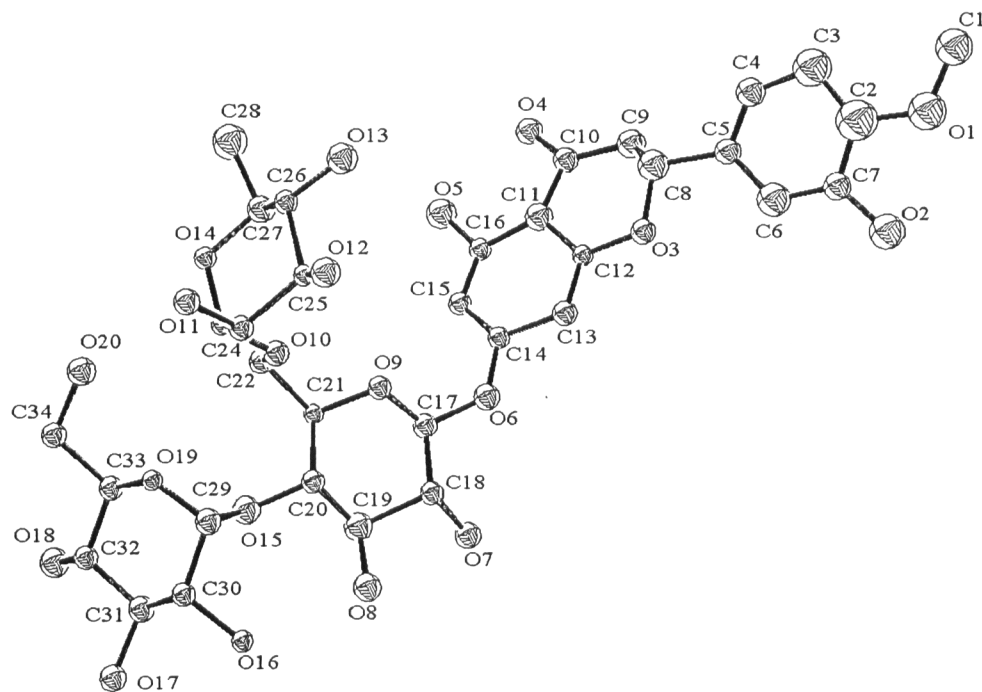


圖5

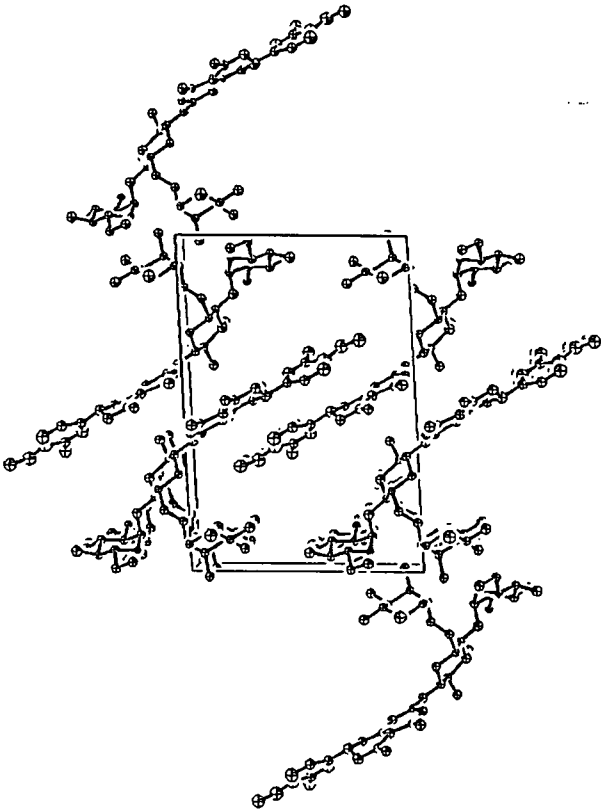


圖6

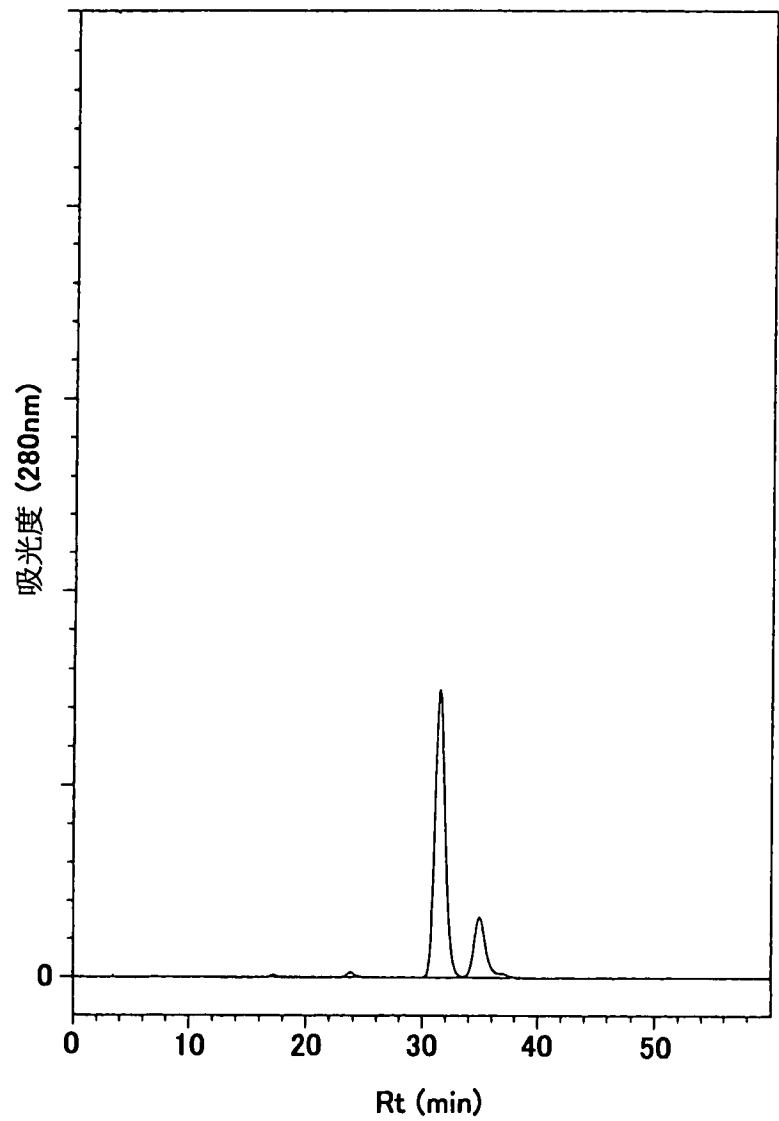


圖7

