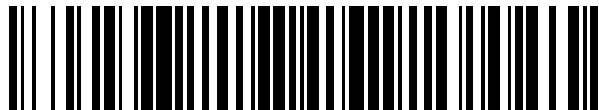


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 948 158**

51 Int. Cl.:

A61K 8/49	(2006.01) A61P 17/00	(2006.01)
A61K 8/60	(2006.01) A61Q 19/00	(2006.01)
A61K 9/08	(2006.01)	
A61K 9/16	(2006.01)	
A61K 9/20	(2006.01)	
A61K 31/19	(2006.01)	
A61K 31/198	(2006.01)	
A61K 31/353	(2006.01)	
A61K 31/702	(2006.01)	
A61K 31/7048	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.09.2016 PCT/JP2016/075718**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **09.03.2017 WO17038951**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.09.2016 E 16841980 (2)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.04.2023 EP 3342396**

54 Título: **Preparación externa para la piel para reducir el amarilleamiento de la piel**

30 Prioridad:

02.09.2015 JP 2015173358

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.09.2023

73 Titular/es:

**HAYASHIBARA CO., LTD. (100.0%)
675-1 Fujisaki, Naka-ku
Okayama-shi, Okayama 702-8006, JP**

72 Inventor/es:

**MIYAKE MASAKI;
SUZUKI MOTOYUKI;
ISHIHARA TATSUYA y
ARIYASU TOSHIO**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 948 158 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Preparación externa para la piel para reducir el amarilleamiento de la piel

5 Campo técnico

La presente invención se refiere al uso no terapéutico de una composición de glicosil hesperetina en combinación con un sacárido o un ácido orgánico en un agente dérmico externo para reducir el amarilleamiento de la piel ya generado en la piel.

10

Antecedentes de la técnica

La opacidad amarillenta en la piel, que significa que el tono de color de la piel muestra amarilleamiento con el envejecimiento, se llama simplemente "amarilleamiento de la piel", en lo sucesivo en el presente documento, salvo que se indique lo contrario, y se considera problemático en la técnica en términos del cuidado de la piel. Una vez se dijo que la desnaturalización de las proteínas en la piel era un factor importante en la inducción del amarilleamiento de la piel (es decir, sacarificación o reacción de Maillard); sin embargo, hoy en día, se dice que la desnaturalización de las proteínas en la dermis, existente en una parte más profunda de la piel (es decir, carbonilación), sería un factor tan importante.

15

20

Dado que la transparencia de la piel puede deteriorarse a medida que aumenta el amarilleamiento de la piel y esto puede tender a hacer que alguien parezca mayor de su edad real, las medidas contra el amarilleamiento de la piel son claramente importantes para mantener su apariencia juvenil. Como un ejemplo real de tales medidas, la Bibliografía de Patentes 1 divulga un agente para inhibir el amarilleamiento de la piel, que consiste en un extracto de semilla de calabaza, mientras que las Bibliografías de Patentes 2 y 3 divulgan agentes dérmicos externos que contienen un extracto vegetal que tiene un efecto inhibitorio sobre el amarilleamiento de la piel. Por lo tanto, los agentes conocidos convencionalmente, incluyendo aquellos que se divulgan en las Bibliografías de Patentes 1 a 3, son los indicados para evitar el amarilleamiento de la piel inhibiendo la desnaturalización, es decir, la sacarificación o la reacción de Maillard, de las proteínas en la piel.

25

30

La Bibliografía de Patentes 4 divulga un inhibidor de carbonilo para proteínas, que contiene uno o más ingredientes eficaces seleccionados de un extracto de hoja de olivo, hidrolizado de proteína de pera y extracto de limón y que no inhibe la reacción de glicación ni la reacción de Maillard pero inhibe la carbonilación para no inducir amarilleamiento en la piel.

35

Como se ha descrito anteriormente, las medidas convencionales contra el amarilleamiento de la piel son agentes para inhibir la sacarificación o la reacción de Maillard de las proteínas en la piel para no inducir el amarilleamiento en la piel, lo que significa que son, por así decirlo, agentes para prevenir el amarilleamiento de la piel. Por lo tanto, se han realizado esfuerzos para inhibir la formación de amarilleamiento en la piel porque se ha reconocido en la técnica que el amarilleamiento de la piel una vez generado no puede disminuirse para restaurar la piel a su condición original.

40

[Bibliografías de la técnica relacionadas]**45 [Bibliografías de Patentes]**

Bibliografía de Patentes 1: Patente japonesa Kokai N.º 2007/254345

Bibliografía de Patentes 2: Patente japonesa Kokai N.º 2006/273811

Bibliografía de Patentes 3: Patente japonesa Kokai N.º 2007/254344

50

Bibliografía de Patentes 4: Patente japonesa Kokai N.º 2012/31106

Bibliografía de Patentes 5: Patente japonesa Kokai N.º 70994/98

Bibliografía de Patentes 6: JP 2005-289913 A, que divulga un cosmético para mejorar la opacidad de la piel. El cosmético comprende del 0,01 al 0,5 % en masa de ginsenosido y del 0,0001 al 0,05 % en masa de hesperidina y/o su glucósido.

55

Bibliografía de Patentes 7: JP 2002-255827 A, que divulga una preparación para el cuidado de la piel que puede promover el flujo de sangre en un sitio de uso. La preparación para el cuidado de la piel contiene α -glicosilhesperidina en una cantidad del 0,001 al 10,0 % en peso.

Bibliografía de Patentes 8: US 2006/018862 A1, que divulga un dispositivo para el cuidado de la piel que comprende un sustrato preformado dermatológicamente aceptable y un compuesto flavonoide.

60

Bibliografía de Patentes 9: CN 104224561 A, que divulga el uso de hesperetina o un extracto vegetal que contiene hesperetina en la preparación de un producto para mejorar y/o promover la microcirculación de la piel.

Sumario**Problema técnico**

La presente invención tiene el objeto de proporcionar un agente dérmico externo no para suprimir la formación de amarilleamiento en la piel sino para reducir el amarilleamiento de la piel ya generado en la piel, y el objeto anterior es novedoso en sí mismo.

5 Solución al problema

Para superar el objeto anterior, los presentes inventores continuaron intensas investigaciones y realizaron esfuerzos. Como resultado, descubrieron recientemente que la aplicación dérmica externa de hesperetina y/o glicosil hesperetina en la piel reduce eficazmente el amarilleamiento de la piel ya generado que se creía difícil de reducir y establecieron los usos de los ingredientes anteriores. La expresión "aplicación dérmica externa" como se hace referencia en la memoria descriptiva significa que el agente dérmico externo para reducir el amarilleamiento de la piel de acuerdo con la presente divulgación puede entrar en contacto con una parte deseada de la piel de un sujeto para penetrar el ingrediente o ingredientes eficaces del agente en la epidermis, la dermis y/o los tejidos subcutáneos, en donde la piel significa membranas que cubren las superficies del cuerpo humano que tienen anexos cutáneos tales como glándulas sudoríparas, glándulas sebáceas, uñas y vello corporal. Los ejemplos de medios para poner en contacto con el agente dérmico externo para reducir el amarilleamiento de la piel incluyen aplicación, pulverización, colocación, fijación, pegar con pegamento, adherencia, prensado, empapado, etc.

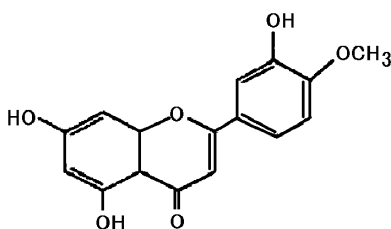
La presente invención proporciona un uso no terapéutico de una composición de glicosil hesperetina en combinación con un sacárido o un ácido orgánico en un agente dérmico externo para reducir el amarilleamiento de la piel ya generado en la piel, de acuerdo con la reivindicación 1. Determinados aspectos más específicos de la invención se exponen en las reivindicaciones dependientes.

Las composiciones descritas en el presente documento que no incluyen la combinación de una composición de glicosil hesperetina con un sacárido o ácido orgánico como se define en la reivindicación 1 se presentan como antecedentes, útiles para entender la invención.

La presente divulgación proporciona además un agente dérmico externo para reducir el amarilleamiento de la piel ya generado, que contiene hesperetina y/o glicosil hesperetina como ingrediente o ingredientes eficaces y que se denomina simplemente "el agente dérmico externo para reducir el amarilleamiento de la piel de la presente divulgación" en lo sucesivo en el presente documento, a menos que se especifique lo contrario.

El término "hesperetina" como se hace referencia en la memoria descriptiva significa un compuesto representado por la Fórmula Química 1 a continuación, contenido en frutos del género *Citrus*, y se sabe que ejerce una función fisiológica tal como un efecto de mejora del flujo sanguíneo incluso cuando se usa en una cantidad relativamente menor.

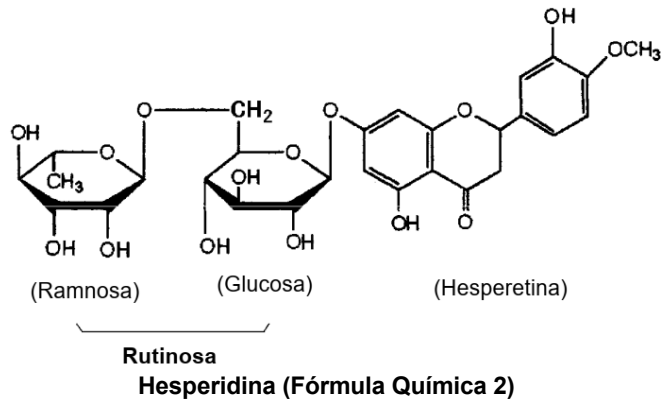
[Quím. 1]

40 **Hesperetina (Fórmula Química 1)**

La expresión "glicosil hesperetina o hesperetinas" como se hace referencia en la memoria descriptiva significa un compuesto o compuestos en general, en donde un sacárido o sacáridos se une o se unen a hesperetina, es decir, aquellos que en general tienen una cadena principal de hesperetina. Los ejemplos concretos de tales compuestos incluyen hesperidina, 7-O-β-glucosil hesperetina que tiene la estructura de hesperidina a partir de la cual se libera el resto de ramnosa como constituyente de la rutina en la hesperidina, y α-glicosil hesperidinas compuestas por hesperidina a las que al menos un sacárido equimolar, tales como D-glucosa, D-fructosa o D-galactosa, se enlaza junto a través del enlace α.

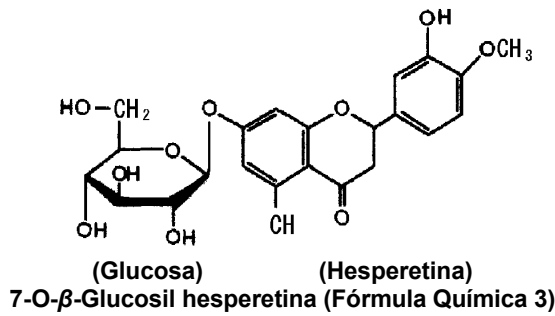
50 En particular, la hesperidina, también llamada vitamina P, es un compuesto representado por la siguiente Fórmula Química 2 que tiene la estructura, donde la rutinosa compuesta por ramnosa y glucosa se une a la hesperetina; y es un ingrediente contenido abundantemente en el pericarpio de los frutos cítricos, etc.

55 Fórmula química 2:
[Quím. 2]



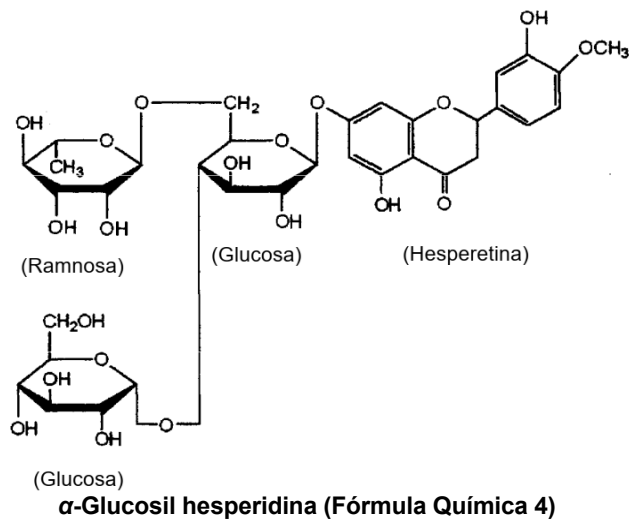
5 La 7-O- β -glucosil hesperetina, que es un compuesto representado por la siguiente Fórmula Química 3, tiene una solubilidad en agua característicamente más alta que la de la hesperidina. Como se muestra en, por ejemplo, la Bibliografía de Patentes 5, la 7-O- β -glucosil hesperetina se produce al permitir que la α -L-ramnosidasa (EC 3. 2. 1. 40), etc., actúe sobre una solución que contiene hesperidina y α -glucosil hesperidina.

10 Fórmula química 3:
[Quím. 3]



15 Además, la α -glucosil hesperidina es un compuesto que está compuesto por hesperidina a la que al menos un sacárido equimolar, tales como D-glucosa, D-fructosa o D-galactosa, se une a través del enlace α . Como un ejemplo representativo de α -glucosil hesperidina, puede mencionarse la α -glucosil hesperidina representada por la siguiente Fórmula Química 4, donde una molécula individual de glucosa se une al resto de glucosa en la estructura rutinosa de la hesperidina, también conocida como hesperidina tratada con enzimas, glucosil hesperidina, hesperidina hidrosoluble o glucosil vitamina P.

25 Fórmula química 4:
[Quím. 4]



La hesperetina y las glicosil hesperetinas mencionadas anteriormente son compuestos que se han usado comúnmente como materiales para productos alimenticios, etc. y son compuestos seguros y altamente versátiles. Entre tales glicosil hesperetinas, la α -glicosil hesperidina tiene una mayor solubilidad en agua y una manejabilidad ventajosa que la de la hesperidina y la 7-O- β -glucosil hesperetina y ejerce las actividades fisiológicas inherentes a la hesperetina en los organismos vivos, después de hidrolizarse en hesperetina por la acción de enzimas *in vivo*, de manera similar a la hesperidina y la 7-O- β -glucosil hesperetina.

Efectos ventajosos

El agente dérmico externo para reducir el amarilleamiento de la piel de la presente divulgación, que contiene hesperetina o hesperetinas glicosiladas y, opcionalmente, hesperetina como ingrediente o ingredientes eficaces, es un agente para reducir el amarilleamiento de la piel ya generado, cuando se haya reconocido que tal reducción es imposible. El agente dérmico externo para reducir el amarilleamiento de la piel de la presente divulgación no solo reduce el amarilleamiento de la piel sino que también ejerce una acción de mejora de la textura de la piel, además de ejercer efectos ventajosos para mejorar la calidad de la piel tal como la sequedad de la piel, eritema, sensación de estimulación y sensación de picor basada en la acción de glicosil hesperetina como ingredientes eficaces del agente dérmico externo. Particularmente, el agente dérmico externo para reducir el amarilleamiento de la piel de la presente divulgación tiene ventajosamente rasgos característicos de ejercer más claramente los efectos y funciones deseados, cuando los sujetos, que están ansiosos por la aspereza de su piel y la reducción de la calidad de la piel, así como por el amarilleamiento de su piel, aplican externamente el agente dérmico externo a cualquier parte de su piel con cualquiera de las ansiedades mencionadas anteriormente. El agente dérmico externo para reducir el amarilleamiento de la piel de la presente divulgación tiene la ventaja de que se proporciona de forma segura a escala industrial, es menos costoso y estable porque puede usarse por seres humanos de forma diaria, sucesiva, segura y sencilla, sin sensación desfavorable, y los ingredientes eficaces del agente se proporcionan a escala industrial, menos costosa y establemente.

Breve descripción de los dibujos adjuntos

La FIG. 1 muestra una relación residual de carbonilo de albúmina de suero bovino (BSA) en presencia de una sustancia que tiene una acción antioxidante.
 La FIG. 2 muestra una relación residual de carbonil BSA cuando se usa una composición que contiene glicosil hesperetina sola o en combinación con una composición que contiene glicosil naringenina.
 La FIG. 3 muestra una relación residual de carbonil BSA cuando se usa una composición que contiene glicosil hesperetina sola o en combinación con 2-glucósido de ácido L-ascórbico.
 La FIG. 4 muestra un resultado obtenido al restar el nivel de proteína carbonilo en "proteína del estrato córneo al iniciar la prueba" de la "proteína del estrato córneo después de completar la prueba" o "proteína del estrato córneo control después de completar la prueba" para cada sujeto en el experimento de acción de reducción de proteína carbonilo usando soluciones de prueba (la presente invención) o una solución de control (control) y tratando los datos resultantes con un procedimiento estadístico (prueba de la t unilateral, $p < 0,05$).
 La FIG. 5 muestra un resultado obtenido al calcular la relación [(Nivel de proteína carbonilo en la proteína del estrato córneo después de completar la prueba)/(Nivel de proteína carbonilo en la proteína del estrato córneo al iniciar la prueba)] en términos del nivel de proteína carbonilo en "proteína del estrato córneo después de completar la prueba" o "proteína del estrato córneo de control después de completar la prueba" para cada sujeto en el experimento de acción de reducción de proteína carbonilo usando soluciones de prueba (la presente invención) o una solución de control (control) y tratando los datos resultantes con un procedimiento estadístico (prueba de la t unilateral, $p < 0,05$).

Descripción detallada

La expresión "hesperetina y/o glicosil hesperetina o hesperetinas", contenidas como ingrediente o ingredientes eficaces en el agente dérmico externo para reducir el amarilleamiento de la piel de la presente divulgación significa aquellos que pueden aplicarse externamente a seres humanos de forma diaria, sucesiva, segura y sencilla sin ninguna sensación desagradable, y ejerce los efectos y funciones deseados; y cualquiera de los cuales puede usarse independientemente de su origen, procesos (es decir, métodos de producción), purezas, etc., sin ninguna restricción específica. Dado que la presente invención no se refiere a un proceso para producir hesperetina o glicosil hesperetina en sí mismo, las descripciones detalladas de tal proceso se omiten de la memoria descriptiva; sin embargo, puede resumirse como sigue:

Cualquier hesperetina, preparada a partir de frutos del género *Citrus* por procesos convencionales, así como la comercializada, puede usarse apropiadamente como los ingredientes eficaces usados en el agente dérmico externo para reducir el amarilleamiento de la piel de la presente divulgación. De acuerdo con la invención, una composición de glicosil hesperetina se usa en combinación con un sacárido o un ácido orgánico, como se define en la reivindicación 1. Como se ha descrito anteriormente, las glicosil hesperetinas como los ingredientes eficaces del agente dérmico externo significan compuestos en general que están compuestos por hesperetina combinada con un sacárido o sacáridos. Expresándolo de manera concreta, las glicosil hesperetinas anteriores significan hesperidina, 7-O- β -glucosil hesperetina y α -glicosil hesperidina y cualquiera de aquellas que pueden obtenerse mediante

procesos convencionales así como las comercializadas, pueden usarse para poner en práctica la presente divulgación siempre que puedan aplicarse externamente a los seres humanos de forma segura y fácil, sin inducir ningún estímulo o sensación desagradable en la piel, y proporcionado a escala industrial, menos costosa y establemente, ejerciendo los efectos y funciones deseados.

5 Los ejemplos de glicosil hesperetinas, como otros ingredientes eficaces en el agente dérmico externo para reducir el amarilleamiento de la piel de la presente divulgación, incluyen compuestos tales como hesperidina, α -glicosil hesperidina y 7-O- β -glicosil hesperetina. La hesperidina identificada anteriormente puede obtenerse en una cantidad deseada a escala industrial de tal manera que proporcione un material tales como frutas, pericarpios, 10 semillas, frutas sin madurar, etc., de cítricos como plantas que contienen hesperidina; y extraer hesperidina del material con un disolvente tal como agua y alcoholes. También, la α -glicosil hesperidina identificada anteriormente puede obtenerse en una cantidad deseada a escala industrial y a un coste menor como se divulga en la Patente Japonesa Kokai N.º 346.792/99, etc., de tal manera que permita que una glicosiltransferasa actúe sobre una solución que contiene hesperidina y un compuesto sacárido de α -glucosilo para formar α -glicosil hesperidina y 15 recoger la α -glicosil hesperidina formada. Además, la 7-O- β -glicosil hesperetina identificada anteriormente puede producirse a escala industrial, en una cantidad deseada y a un coste menor de tal manera que permita que la α -L-ramnosidasa actúe sobre una solución de reacción enzimática que contiene hesperidina y α -glicosil hesperidina, obtenida mediante la acción de una glicosiltransferasa, para formar 7-O- β -glicosil hesperetina; y recoger la 7-O- β -glicosil hesperetina formada, como se divulga en, por ejemplo, la Bibliografía de Patentes 5.

20 Como se ha descrito anteriormente, cualquier hesperetina y glicosil hesperetina, que puede obtenerse por procesos convencionales, así como las comercializadas pueden usarse en la práctica de la presente divulgación, pero no son parte de la invención; sin embargo, son más deseables aquellas que tienen una menor impureza o una mayor pureza. A continuación se explica el motivo con referencia a glicosil hesperetina. La presente invención se refiere 25 únicamente al uso de hesperidina, alfa-glicosil hesperidina o 7-O-beta-glicosil hesperetina como principio activo.

Los presentes inventores han descubierto nuevamente que, además de una glicosil hesperetina de calidad reactivo obtenida a través de una etapa de cristalización, las glicosil hesperetinas convencionales que contienen, además de 30 glicosil hesperetinas, concomitantes derivados de los materiales de producción, materiales intactos restantes y compuestos iónicos fisiológicamente aceptables formados como subproductos durante sus etapas de producción, independientemente de sus cantidades; y que contienen ingredientes como causantes de gustos misceláneos, coloración, olor, etc. A lo largo de la memoria descriptiva, las composiciones que contienen glicosil-hesperetina, que contienen glicosil hesperetinas como ingredientes principales y concomitantes derivados de sus materiales de producción, materiales intactos restantes o compuestos iónicos fisiológicamente aceptables como subproductos 35 formados durante sus etapas de producción, se denominan simplemente glicosil hesperetinas en lo sucesivo en el presente documento, a menos que se especifique lo contrario. Las glicosil hesperetinas usables en la práctica de la presente divulgación, suficientemente naturales, incluyen glicosil hesperetinas de alta pureza obtenidas a través de una etapa de cristalización.

40 Con el fin de superar los defectos de las glicosil hesperetinas convencionales tales como sus diversos sabores y coloración, los presentes inventores establecieron las glicosil hesperetinas deseadas reducidas en gustos misceláneos y coloraciones (llamadas "glicosil hesperetinas mejoradas" en lo sucesivo en el presente documento, a menos que se especifique lo contrario) y el método de producción de los mismos y los divulgaron en la Solicitud de Patente Japonesa N.º 2014-41066 y la Solicitud de Patente Internacional N.º PCT/JP2015/056230. Las glicosil 45 hesperetinas mejoradas tienen la ventaja de que pueden usarse externamente sin una sensación desagradable y proporcionarse a escala industrial, menos costosa y establemente. Por lo tanto, son las glicosil hesperetinas más adecuadas en la práctica de la presente divulgación.

50 A continuación se explica el proceso para producir glicosil hesperetinas mejoradas y las propiedades de las mismas. Dichos procesos no son parte de la invención y se analizan en el presente documento solo para información.

Las glicosil hesperetinas mejoradas se preparan mediante el proceso que contiene las etapas de: (a) preparar una solución acuosa que contiene hesperidina y un hidrolizado de almidón parcial; (b) permitir que una glicosiltransferasa actúe sobre la solución acuosa resultante para formar una composición que contiene glicosil hesperetinas junto con 55 α -glicosil hesperidina; y (c) recoger la composición formada; en donde una o más de las etapas (a) a (c) se llevan a cabo en presencia de un agente o agentes reductores o se añade o se añaden un material o materiales de partida antes de llevar a cabo una o más de las etapas (a) a (c) y/o se añaden al producto o productos resultantes de cualquiera de las etapas anteriores. Las siguientes son explicaciones secuenciales de los materiales de producción para las glicosil hesperetinas mejoradas que pueden obtenerse mediante los métodos de producción con los 60 agentes reductores anteriores (en donde las glicosil hesperetinas, preparadas mediante la etapa anterior de tratamiento con un agente o agentes reductores), podrán denominarse "productos tratados con un agente o agentes reductores", en lo sucesivo en el presente documento); así como reacciones enzimáticas tales como transglicosilación/reacción de transferencia de sacáridos, tratamientos con agentes reductores y métodos de purificación para las glicosil hesperetinas mejoradas.

65 Aunque se analizará más adelante en detalle, los productos tratados con agentes reductores significan glicosil

hesperetinas sustancialmente exentas de furfural, lo que significa que son glicosil hesperetinas significativamente reducidas en contenido de furfural en comparación con los productos convencionales. Expresándolo de manera concreta, significa que el contenido de furfural es habitualmente inferior a 200 ppm, donde un ppm significa partes por mil millones, preferentemente menos de 100 ppm, más preferentemente menor de 50 ppm, además preferentemente menos de 30 ppm, adicionalmente menos de 20 ppm, en particular preferentemente menos de 15 ppm y lo más preferentemente menos de 10 ppm, cuando se determina mediante el método analítico descrito más adelante usando una espectrometría de masas cromatográfica de gases (abreviado como "análisis CG/EM", en lo sucesivo en el presente documento) que se muestra en el elemento "(1) Contenido de furfural" en el Experimento 4 descrito más tarde. Entre las glicosil hesperetinas usadas en la práctica de la presente divulgación, aquellas que tienen un contenido de furfural con un nivel reducido por debajo del límite de detección del análisis CG/EM son glicosil hesperetinas claramente de alta calidad que tienen sabores misceláneos significativamente reducidos y coloración claramente reducida, en comparación con los productos convencionales. Las glicosil hesperetinas usadas en la práctica de la presente divulgación no deben tener necesariamente la mayor pureza posible, lo que significa que no necesariamente deben ser los que tienen un contenido de furfural reducido a un nivel por debajo del límite de detección o los que están libres de furfural. En consecuencia, puede usarse cualquier glicosil hesperetina en la práctica de la presente divulgación siempre que no contenga sustancialmente furfural y también puede usarse lo siguiente siempre que se logre el objeto deseado: aquellas que contienen furfural en un nivel significativamente más bajo en comparación con los productos convencionales o en un nivel por debajo del límite de detección.

20 (Materiales de producción)

Los ejemplos de hesperidinas usables como materiales de producción para productos tratados con agentes reductores incluyen cualquier hesperidina usada para producir glicosil hesperetinas convencionales y hesperidinas de alta pureza, así como extractos y jugos, derivados de plantas que contienen hesperidina, con una pureza relativamente baja de hesperidina y productos parcialmente purificados de los mismos, uno o más de los cuales pueden usarse apropiadamente en combinación.

Los ejemplos concretos de las plantas que contienen hesperidina mencionadas anteriormente incluyen, por ejemplo, cítricos pertenecientes al género *Citrus* de la familia *Rutaceae* tales como mandarinas, naranjas, cítricos ácidos amargos, cítricos de cruce mixto, tangores, tangelos, shaddocks y kumquats; donde las partes representativas que contienen hesperidina de los cítricos mencionados son sus frutos, pericarpios, semillas, frutas sin madurar, etc.

Los ejemplos de hidrolizados parciales de almidón como los materiales de producción mencionados anteriormente incluyen aquellos que forman α -glicosil hesperidina como glicosil hesperetina a través de la glicosiltransferencia de hesperidina, cuando se somete a la acción de la glicosiltransferasa descrita más tarde: hidrolizados parciales de almidón tales como amilosas, dextrinas, ciclodextrinas, maltooligosacáridos; y almidones licuados y gelatinizados; uno o más de los cuales pueden seleccionarse arbitrariamente.

La cantidad de un hidrolizado de almidón parcial usado en la reacción enzimática descrita más tarde es habitualmente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 150 veces, preferentemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 veces, y más preferentemente de aproximadamente 2 a aproximadamente 50 veces la cantidad de un material de hesperidina en masa. En la reacción enzimática, los sacáridos derivados de hidrolizados parciales de almidón se glicosiltransferen a hesperidina para formar eficientemente α -glicosil hesperidina, en donde los hidrolizados parciales de almidón deben usarse preferentemente en una cantidad excesiva a la hesperidina para no mantener la hesperidina intacta lo más baja posible en un sistema de reacción enzimática. El motivo es que, en la etapa de purificación descrita más tarde, los hidrolizados parciales de almidón y los sacáridos o similares derivados de los mismos pueden separarse con relativa facilidad de la α -glicosil hesperidina; sin embargo, dado que la hesperidina muestra la misma dinámica que la α -glicosil hesperidina y es difícilmente separable de la α -glicosil hesperidina, la solubilidad en agua de la glicosil hesperetina resultante disminuirá inconvenientemente en su conjunto, cuando la hesperidina intacta con una solubilidad en agua claramente baja todavía permanece en una cantidad considerablemente grande.

(Reacción enzimática)

La expresión "reacción enzimática" como se hace referencia en el presente documento significa una reacción enzimática, donde se permite que la glicosiltransferasa actúe tanto sobre la hesperidina como sobre un hidrolizado de almidón parcial como los materiales de producción mencionados anteriormente, para formar α -glicosil hesperidina.

Los ejemplos de la glicosiltransferasa usada en la reacción enzimática anterior incluyen α -glucosidasa (EC 3.2.1.20), ciclomaltodextrina gluco-transferasa (EC 2.4.1.19, denominada "CGTasa", en lo sucesivo) y α -amilasa (EC 3.2.1.1), etc. Los ejemplos de la α -glucosidasa anterior incluyen aquellas que derivan de tejidos animales y vegetales tales como hígado de cerdo y semilla de trigo sarraceno; y los que derivan de cultivos de hongos pertenecientes a los géneros *Mucor*, *Penicillium* y *Aspergillus* incluyendo *Aspergillus niger*, etc. u otros cultivos obtenidos por cultivo de microorganismos tales como levaduras del género *Saccharomyces* en medios de cultivo nutritivos. Los ejemplos de la CGTasa incluyen aquellos que derivan de los géneros *Bacillus*, *Geobacillus*, *Klebsiella*, *Paenibacillus*,

- 5 *Thermococcus*, *Thermoanaerobacter*, *Brevibacterium*, *Pyrococcus*, *Brevibacillus* y *Saccharomyces*. Los ejemplos de la α -amilasa anterior incluyen aquellas que derivan de cultivos de bacterias del género *Geobacillus* u hongos del género *Aspergillus* incluyendo *Aspergillus niger*, uno o más de los cuales pueden usarse en una combinación apropiada. Puede usarse cualquiera de las glicosiltransferasas naturales o recombinantes, siempre que alcancen los objetos de la presente divulgación y si están disponibles comercializadas, también pueden usarse apropiadamente. Todas las glicosiltransferasas anteriores no deben usarse necesariamente después de la purificación y normalmente pueden usarse incluso en forma de enzima bruta siempre que alcancen los objetos de la presente divulgación.
- 10 En el caso de usar las glicosiltransferasas naturales o recombinantes anteriores, el rendimiento de producción de α -glicosil hesperidina puede incrementarse seleccionando hidrolizados de almidón parciales adecuados para las enzimas anteriores.
- 15 Cuando se usa la α -glucosidasa anterior, maltooligosacáridos como la maltosa, maltotriosa y maltotetraosa o hidrolizados de almidón parciales con un equivalente de dextrosa (DE) de aproximadamente 10 a aproximadamente 70 pueden usarse adecuadamente; en el caso de usar la CGTasa anterior, α -, β -, o γ -ciclodextrina o hidrolizados parciales de almidón con un DE que varía de uno o menos, es decir, almidón gelatinizado, a aproximadamente 60, es decir, hidrolizados parciales de almidón, pueden usarse de manera adecuada; y en el caso de usar la α -amilasa anterior, pueden usarse preferentemente hidrolizados parciales de almidón con un DE que varía de uno o menos, es decir, almidones gelatinizados, a aproximadamente 30, es decir, dextrinas.
- 20 Los ejemplos de la solución que contiene hesperidina preferentemente usada en la reacción enzimática incluyen aquellas que contienen hesperidina en concentraciones tan altas como sea posible; son preferibles las suspensiones de hesperidina o las soluciones que contienen hesperidina en concentraciones relativamente altas, preparadas disolviendo hesperidina en disolventes tales como agua a temperaturas relativamente altas no inferiores a la temperatura ambiente o en condiciones de pH alcalino de más de 7,0 usando agentes alcalinos. Como tales agentes alcalinos, los siguientes se usan adecuadamente; una o más soluciones acuosas fuertemente alcalinas de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1,0 N de hidróxido sódico, hidróxido potásico, carbonato sódico, hidróxido de calcio, amoníaco acuoso o similares.
- 25 La concentración de hesperidina en forma de solución, preparada con hesperidina y un agente o agentes alcalinos, es habitualmente de aproximadamente el 0,005 % p/v o más alta, preferentemente de aproximadamente el 0,05 al 10 % p/v, más preferentemente de aproximadamente el 0,5 a aproximadamente el 10 % p/v y además preferentemente de aproximadamente el 1 a aproximadamente el 10 % p/v.
- 30 Cuando la hesperidina se usa en forma de suspensión sin usar ningún agente alcalino, la hesperidina se suspende en un disolvente tal como agua en forma de suspensión, en donde la concentración de hesperidina es habitualmente de aproximadamente el 0,1 a aproximadamente el 2 % p/v, preferentemente de aproximadamente el 0,2 a aproximadamente el 2 % p/v y más preferentemente de aproximadamente el 0,3 a aproximadamente el 2 % p/v.
- 35 Aunque la temperatura y el tiempo, en el que se permite que la glicosiltransferasa actúe sobre la hesperidina y un hidrolizado de almidón parcial, varían dependiendo de las concentraciones de hesperidina y un hidrolizado de almidón parcial usado en una reacción enzimática tal, así como del tipo, la temperatura óptima, el pH óptimo o la cantidad de enzima usada, la temperatura es habitualmente de aproximadamente 50 a aproximadamente 100 °C, preferentemente de aproximadamente 60 a aproximadamente 90 °C, más preferentemente de aproximadamente 70 a aproximadamente 90 °C; y el tiempo es de aproximadamente 5 a aproximadamente 100 horas, preferentemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 80 horas y más preferentemente de aproximadamente 20 a aproximadamente 70 horas.
- 40 Aunque el pH y la temperatura, en el que se permite que la glicosiltransferasa actúe sobre una solución alcalina con una concentración relativamente alta de hesperidina, varían dependiendo del tipo, el pH óptimo, la temperatura óptima o la cantidad de enzima usada, así como en la concentración de hesperidina, deben ajustarse al pH y la temperatura más altos posibles a los que la enzima es activa; en donde el pH es de aproximadamente 7,5 a aproximadamente 10 y preferentemente de aproximadamente 8 a aproximadamente 10; y la temperatura es de aproximadamente 40 a aproximadamente 80 °C y preferentemente de aproximadamente 50 a aproximadamente 80 °C. Dado que la hesperidina en una solución alcalina es susceptible de descomponerse, debe mantenerse preferentemente en condiciones anaeróbicas y protegidas de la luz tanto como sea posible para evitar tal descomposición.
- 45 Cuando se permite que la glicosiltransferasa actúe sobre la hesperidina en forma de suspensión, el pH de la reacción enzimática varía dependiendo del tipo, la temperatura óptima, el pH óptimo o la cantidad de enzima usada y de la concentración de hesperidina en forma de suspensión; sin embargo, habitualmente se ajusta a un pH que varía de aproximadamente 4 a aproximadamente 7, preferentemente de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 6,5.
- 50 Además, si es necesario, la solubilidad de la hesperidina antes de la reacción enzimática puede aumentarse y la reacción de glicosiltransferencia o transferencia de sacáridos en la hesperidina puede facilitarse mediante la
- 55
- 60
- 65

coexistencia de una cantidad adecuada de uno o más disolventes orgánicos altamente compatibles con el agua tales como alcoholes inferiores o cetonas inferiores incluyendo metanol, etanol, *n*-propanol, isopropanol, *n*-butanol, acetol y acetona en soluciones con alto contenido de hesperidina, particularmente, soluciones acuosas con alto contenido de hesperidina.

5 Dado que la cantidad de una enzima y el tiempo de reacción enzimática están estrechamente relacionados entre sí, la cantidad de glicosiltransferasa está, en términos de aspectos económicos, habitualmente establecida adecuadamente en una condición suficiente para terminar la reacción enzimática en aproximadamente 5 a 10 aproximadamente 150 horas, preferentemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 100 horas, más preferentemente de aproximadamente 20 a aproximadamente 80 horas, dependiendo del tipo de enzima usada. Mediante el uso de una glicosiltransferasa inmovilizada, una reacción enzimática deseada puede llevarse a cabo apropiadamente mediante un uso repetido de dicha enzima de manera discontinua o consecutiva.

15 Si es necesario, la solución de reacción enzimática que contiene hesperidina y α -glicosil hesperidina, obtenida después de la reacción de transferencia de glicosil mencionada anteriormente, puede usarse intacta o después de purificarse sucesivamente con resinas adsorbentes sintéticas porosas e hidrolizarse parcialmente con amilasa tales como glucoamilasa (EC 3.2.1.3) o β -amilasa (EC 3.2.1.2) para reducir el número de restos de α -D-glucosilo de α -glicosil hesperidina. Por ejemplo, en el caso de permitir que la glucoamilasa anterior actúe sobre la solución de reacción enzimática, la α -maltosil hesperidina o moléculas superiores pueden hidrolizarse para formar y acumular α -glucosil hesperidina junto con la glucosa. Mientras que, en el caso de permitir que la β -amilasa anterior actúe sobre la solución de reacción enzimática, la α -maltotriosil hesperidina o moléculas superiores pueden hidrolizarse para formar y acumular una mezcla de α -glucosil hesperidina y α -maltosil hesperidina junto con maltosa.

25 La glicosil hesperetina con una solubilidad en agua relativamente alta en conjunto puede prepararse permitiendo que la glucoamilasa y la α -L-ramnosidasa actúen simultánea o sucesivamente en un orden aleatorio en una solución de reacción enzimática que contiene hesperidina y α -glicosil hesperidina obtenida después de la reacción de glicosiltransferencia, mediante la cual se liberan glucosas equimolares o más enlazadas a través de un enlace α a la glucosa en la estructura rutinosa de la α -glicosil hesperidina para convertir la α -glicosil hesperidina en α -glucosil hesperidina, dando como resultado un aumento del contenido de α -glucosil hesperidina y una conversión de hesperidina con una solubilidad en agua relativamente baja en 7-O- β -monoglucosil hesperetina con una solubilidad en agua relativamente alta.

35 Al igual que en la glicosiltransferasa, la glucoamilasa y la α -L-ramnosidasa también tienen una estrecha relación entre sus cantidades de enzimas y los tiempos de reacción enzimática y, habitualmente, en vista de los aspectos económicos, la cantidad de cualquiera de las enzimas anteriores usadas se ajusta preferentemente a un nivel suficiente para terminar sus reacciones enzimáticas en aproximadamente 5 a aproximadamente 150 horas, preferentemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 100 horas, más preferentemente de aproximadamente 20 a aproximadamente 80 horas, dependiendo de los tipos de las enzimas usadas. Mediante el uso de una α -L-ramnosidasa inmovilizada, una reacción enzimática deseada puede llevarse a cabo de forma apropiada repetidamente por lotes o llevarse a cabo continuamente de manera consecutiva.

(Tratamiento con agente reductor)

45 La expresión "tratamiento con agente reductor" como se menciona en el presente documento significa un tratamiento para reducir de manera significativa o distinta los sabores misceláneos y la coloración (puede abreviarse como "sabores misceláneos/coloración" en lo sucesivo en el presente documento), así como olor a glicosil hesperetina, con un agente o agentes reductores prescritos; o se usa una cantidad prescrita del agente o agentes reductores descritos más adelante en una o más de las siguientes etapas de (a) preparar una solución acuosa que contiene hesperidina y un hidrolizado de almidón parcial, (b) permitir que la glicosiltransferasa actúe sobre la solución acuosa resultante para formar una composición que contiene glicosil hesperetina con α -glucosil hesperidina y (c) recoger la composición formada; o se añade a los materiales de partida antes de una o más de las etapas anteriores (a) a (c) y/o se añade a los productos resultantes en estas etapas.

55 Los agentes reductores que pueden usarse en el método para producir glicosil hesperetinas mejoradas no deben restringirse específicamente siempre que alcancen los objetivos deseados y puede usarse cualquier agente reductor orgánico o inorgánico convencional usado generalmente en la técnica. Dado que las glicosil hesperetinas, incluyendo los productos tratados con agentes reductores o glicosil hesperetinas de alta pureza que pueden usarse en la práctica de la presente divulgación se presupone que se usan principalmente para seres humanos, los agentes reductores que son de alta seguridad y superiores en estabilidad y manejabilidad se usan deseablemente en la producción de glicosil hesperetinas.

65 Los ejemplos concretos de los agentes reductores preferentemente usados en el método anterior incluyen agentes reductores inorgánicos tales como hidroxilaminas, dióxido de cloro, hidrógeno, compuestos de hidrógeno (incluyendo sulfuro de hidrógeno, borohidruro sódico, hidruro de litio y aluminio, hidruro de potasio y aluminio, etc.), compuestos de azufre (incluyendo dióxido de azufre, dióxido de tiourea, tiosulfato, sulfito, sulfato ferroso, persulfato sódico, persulfato potásico, persulfato amónico, sulfito cálcico, etc.), nitrito, cloruro de estaño, cloruro ferroso, yoduro

potásico, peróxido de hidrógeno, peróxido de benzoilo diluido, hidroperóxido y clorito tal como clorito sódico; y agentes reductores orgánicos tales como fenoles, aminas, quinonas, poliaminas, ácido fórmico y sales del mismo, ácido oxálico y sales del mismo, ácido cítrico y sales del mismo, dióxido de tiourea, compuestos de hidrazina, 5 quercetina, tocoferol, ácido gálico y ésteres del mismo, etilendiaminotetraacetato (EDTA), ditiotreitól, glutatión reducido y polifenoles. Uno o más de los agentes reductores orgánicos e inorgánicos anteriores pueden usarse en combinaciones apropiadas.

10 Entre los agentes reductores inorgánicos y orgánicos anteriores, el primero reduce más significativamente los diversos sabores inherentes a la glicosil hesperetina sin tratamiento con ningún agente reductor y proporciona glicosil hesperetinas de alta calidad cuya coloración y olor desagradable se reducen más claramente. La razón no es segura, pero puede especularse como sigue: Se presume que, en comparación con los agentes reductores inorgánicos, los agentes reductores orgánicos tienen poca capacidad para reducir los sabores misceláneos y la coloración o son sustancias orgánicas en sí mismas susceptibles de provocar sabores misceláneos/coloraciones y sus descomposiciones, productos modificados y similares aún permanecen en los productos resultantes sin 15 eliminarse completamente en las etapas de purificación para productos tratados con agentes reductores, y son susceptibles de afectar negativamente a la calidad de la glicosil hesperetina como producto final.

20 Entre los agentes reductores inorgánicos, lo que llaman subsulfatos (pueden llamarse sulfitos) que están compuestos por un ion metálico y un ion SO_2^- , HSO_3^- , SO_3^{2-} , $\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$ o $\text{S}_2\text{O}_7^{2-}$ son superiores en seguridad, estabilidad y manejabilidad y se usan más preferentemente como agentes reductores. En particular, los siguientes agentes reductores inorgánicos pueden usarse lo más preferentemente: subsulfatos tales como sulfito sódico, sulfito potásico, hidrogenosulfito sódico, hiposulfito sódico, hiposulfito potásico, pirosulfito sódico, pirosulfito potásico, 25 metasulfito sódico, metasulfito potásico, metabisulfito sódico y metabisulfito potásico.

30 Los agentes reductores mencionados anteriormente se usan en cualquiera de las etapas para producir la glicosilhesperetina mejorada, o se usan en el material de partida antes de cualquiera de las etapas y/o el producto resultante después de cualquiera de las etapas; sin embargo, los objetos deseados pueden lograrse con una cantidad menor del agente o agentes reductores, cuando el agente o agentes se usan en porciones en dos o más de las etapas o se añaden al material o materiales de partida antes de practicar cualquiera de las etapas y/o se añaden al producto o productos resultantes después de cualquiera de las etapas.

35 La cantidad total de aditivo del agente o agentes reductores anteriores, usada en las etapas respectivas (a) a (c) anteriores, es habitualmente al menos el 0,001 % en masa ("% en masa" se abreviará en lo sucesivo como "%", salvo que se indique lo contrario), preferentemente del 0,01 al 3 %, más preferentemente del 0,01 al 1 % y además preferentemente del 0,01 al 0,5 % de la masa de la solución de reacción enzimática, obtenida después de la etapa (b) anterior u obtenida después de la finalización de todas las reacciones enzimáticas siempre que se use o usen cualquier enzima o enzimas distintas de la glicosiltransferasa. En el caso de añadir el agente o agentes reductores a cualquiera de las etapas antes de la etapa (c), el agente o agentes reductores restantes se elimina o eliminan 40 sustancialmente en la etapa de purificación; en consecuencia, no se detecta sustancialmente ningún agente reductor en la glicosilhesperetina mejorada resultante obtenida como un producto final. La cantidad total de los agentes reductores, añadida a la vez o en varios lotes durante las etapas anteriores, es habitualmente al menos el 0,001 % en masa, preferentemente al menos el 0,01 % y más preferentemente el 0,01 a 1 % de la masa de la solución de reacción enzimática obtenida después de la reacción enzimática anterior. Con referencia a las temperaturas a las 45 que se añade o añaden el agente o agentes reductores, generalmente significan las temperaturas empleadas en las etapas (a) a (c) anteriores u opcionalmente incluyen otras temperaturas que exceden las temperaturas anteriores. Los ejemplos concretos de tales temperaturas son aquellas que no son inferiores a la temperatura ambiente, preferentemente temperaturas de al menos 50 °C, más preferentemente al menos 70 °C, más preferentemente al menos 80 °C y además preferentemente de 90 a 120 °C.

50 (Método de purificación)

55 Las soluciones de reacción enzimática obtenidas de esta manera pueden usarse preferentemente intactas como la glicosil hesperetina mejorada de la presente divulgación; sin embargo, generalmente se preparan en glicosil hesperetinas en forma de un líquido, un sólido o un polvo empleando adecuadamente ya sea solo o en combinación con uno o más medios de métodos de separación, métodos de filtración, métodos de purificación usando resinas sintéticas porosas, métodos de concentración, métodos de pulverización, métodos de secado, etc., todos los cuales se conocen convencionalmente en la técnica.

60 Los ejemplos de las resinas sintéticas porosas anteriores significan resinas sintéticas que tienen un área superficial porosa y grande y que no son iónicas: copolímeros de estireno-divinilbenceno, resinas de fenol-formalina, resinas de acrilato y resinas de metacrilato; resinas con nombres comerciales de AMBERLITE XAD-1, AMBERLITE XAD-2, AMBERLITE XAD-4, AMBERLITE XAD-7, AMBERLITE XAD-8, AMBERLITE XAD-11, AMBERLITE XAD-12, etc., comercializadas por Rohm & Hass Company, Philadelphia, EE.UU.; resinas con nombres comerciales de DIAION 65 HP-10, DIAION HP-20, DIAION HP-30, DIAION HP-40, DIAION HP-50, DIAION HP-2MG, SEPABEADS SP70, SEPABEADS SP207, SEPABEADS SP700, SEPABEADS SP800, etc., comercializadas por Mitsubishi Chemical

Industries Ltd., Tokio, Japón; y otras resinas con nombres comerciales de IMACTI Syn-42, IMACTI Syn-44, IMACTI Syn-46, etc., comercializadas por IMPACTI Company, Amsterdam, el Reino de los Países Bajos.

5 De acuerdo con los métodos de purificación que usan resinas sintéticas porosas, las glicosil hesperetinas se adsorben sobre las resinas sintéticas porosas, mientras que los restantes hidrolizados de almidón parciales, sacáridos hidrosolubles, etc., se eluyen de las columnas empaquetadas con las resinas sintéticas sin adsorberse sobre las resinas, cuando las soluciones de reacción enzimática se suministran a las columnas. En este caso, la hesperidina, la 7-O- β -glicosil hesperetina y la α -glicosil hesperidina como glicosil hesperetinas se comportan habitualmente de manera similar y, por lo tanto, no podrán separarse entre sí siempre que se usen las resinas sintéticas porosas; sin embargo, aunque los manejos se complican y los rendimientos disminuyen, las glicosil hesperetinas, que se adsorben selectivamente en columnas empaquetadas con cualquiera de las resinas sintéticas porosas, se lavan con disolventes tales como álcalis diluidos o agua, seguido de la alimentación a las columnas de cantidades relativamente pequeñas de disolventes orgánicos o soluciones mixtas de disolventes orgánicos y agua, es decir, soluciones acuosas de metanol/etanol, eluir en primer lugar la α -glicosil hesperidina de las columnas y después la hesperidina intacta aumentando los volúmenes de suministro o las concentraciones de los disolventes orgánicos. Los eluatos resultantes que contienen glicosil hesperetinas se evaporan para eliminar los disolventes orgánicos restantes, seguido de la concentración de las soluciones resultantes hasta dar las concentraciones prescritas para obtener las glicosil hesperetinas reducidas en sabores misceláneos, etc. y el contenido de hesperidina. Dado que la etapa anterior de eluir glicosil hesperetinas con los disolventes orgánicos mencionados anteriormente también actúa como una etapa de regeneración de las resinas sintéticas porosas, permite el uso repetido de tales resinas como mérito.

25 Los productos líquidos tratados con agentes reductores, tienen una pureza aumentada de glicosil hesperetinas, pueden producirse de una manera tal que, después de completar las reacciones enzimáticas y antes de poner en contacto las soluciones de reacción enzimática resultantes con las resinas sintéticas porosas, por ejemplo, eliminando los insolubles formados cuando las soluciones de reacción enzimática se calientan, eliminando las sustancias proteicas o similares en las soluciones de reacción tratando las soluciones con aluminosilicato de magnesio, aluminato de magnesio, etc.; o desalando las soluciones con resinas de intercambio iónico de ácido fuerte (forma H), resinas de intercambio iónico medianamente básicas o débilmente básicas (forma OH) o similares.

30 Además, las glicosil hesperetinas líquidas mencionadas anteriormente pueden secarse y pulverizarse arbitrariamente mediante métodos de secado convencionales en glicosil hesperetinas en partículas que se usan preferentemente en la práctica de la presente divulgación.

35 De este modo, pueden prepararse productos tratados con agentes reductores, que se reducen significativamente en los sabores misceláneos peculiares como un defecto de glicosil hesperetinas que se preparan sin emplear ninguno de los pasos de tratamiento anteriores con el agente o agentes reductores prescritos (pueden denominarse "productos sin tratamiento con ningún agente reductor", en lo sucesivo en el presente documento) y cuya coloración y olor se reducen eficazmente. Mientras que, los presentes inventores confirmaron que la diversidad de sabores/coloraciones u olores característicos de los productos sin tratamiento con ningún agente reductor no cambian sustancialmente con el mero uso de los métodos de purificación mencionados anteriormente: Métodos de purificación convencionales, que usan, por ejemplo, las resinas sintéticas porosas mencionadas anteriormente comúnmente usadas en la producción de productos sin tratamiento con ningún agente reductor, ventajosamente, eliminan simultáneamente los concomitantes tales como sales hidrosolubles, así como hidrolizados parciales de almidón y sacáridos hidrosolubles; sin embargo, es difícil reducir significativa o claramente los sabores misceláneos/coloraciones y olores que son característicos de los productos sin tratamiento con ningún agente reductor, independientemente de cómo se usen los métodos de purificación anteriores. Es estimable que cualquier sustancia causante de los sabores misceláneos, etc., contenida en las glicosil hesperetinas, exhibe dinámicas similares de adsorción y desorción de resinas sintéticas porosas similares a las de las glicosil hesperetinas y, por lo tanto, dicha sustancia causante no podría separarse de las glicosil hesperetinas.

55 La glicosil hesperetina usada adecuadamente en la práctica de la presente invención, particularmente, los productos tratados con agentes reductores están siendo significativamente reducidos en varios sabores así como en conductividad eléctrica y el contenido de compuestos iónicos responsables de la conductividad eléctrica. Los ejemplos de tales compuestos iónicos incluyen compuestos tales como narirutina, diosmina y neoponcirina, que están contenidos intrínsecamente en la hesperidina como un material para la glicosil hesperetina; glicosil narirutina, glicosil neoponcirina, etc., como subproductos de reacciones enzimáticas, así como descomposiciones y compuestos estrechamente relacionados con tales descomposiciones; furfurales tales como el furfural usado como un índice, alcohol furfurílico e hidroximetil furfural, así como las sales de los mismos, etc.; y otros compuestos que liberan cationes metálicos tales como calcio, potasio, magnesio, sodio, etc., cuando están en forma de solución; todos los cuales se derivan de los materiales de producción para la glicosilhesperetina mejorada o se forman como subproductos durante sus etapas de producción. Habitualmente, los productos tratados con agentes reductores usados adecuadamente en la práctica de la presente invención contienen solo ligeramente los ingredientes anteriores tales como narirutina, diosmina, neoponcirina, glicosil narirutina y glicosil neoponcirina. Los compuestos iónicos mencionados anteriormente se denominan compuestos iónicos fisiológicamente aceptables a lo largo de la memoria descriptiva.

Es incierto que, en el método mencionado anteriormente para producir productos tratados con agentes reductores, el mecanismo de cómo la glicosilhesperetina mejorada, cuyos sabores misceláneos y coloración, particularmente, sabores misceláneos, se reducen significativamente, se obtiene con los agentes reductores prescritos; sin embargo, puede especularse como sigue:

- 5
- (1) Al producir los productos tratados con agentes reductores, los agentes reductores prescritos actúan sobre las sustancias, como causantes potenciales de sabores misceláneos derivados de los materiales de producción, para enmascarar, descomponer o modificar las sustancias para obtener glicosil hesperetinas mejoradas que se reducen significativamente en sabores misceláneos;
- 10
- (2) En la etapa o etapas de producción de productos tratados con agentes reductores, los agentes reductores prescritos reducen o inhiben la formación de sustancias como causantes potenciales de sabores variados; o enmascaran, descomponen o modifican las sustancias formadas para obtener glicosil hesperetinas mejoradas que se reducen significativamente en sabores misceláneos; o
- 15
- (3) Las sustancias como causantes potenciales de sabores misceláneos como se muestra en los artículos (1) y (2) anteriores se modifican con los agentes reductores prescritos para facilitar la separación de glicosil hesperetina en la etapa de purificación usando adsorbentes sintéticos porosos, etc., dando como resultado la obtención de glicosil hesperetinas que se reducen significativamente en sabores misceláneos.

20

Las glicosil hesperetinas usadas adecuadamente en la práctica de la presente divulgación incluyen además aquellas que reducen significativamente los sabores misceláneos y el olor desagradable de las composiciones que contienen glicosil hesperetinas al permitir que dichas composiciones entren en contacto con los agentes reductores prescritos. Tales composiciones también están incluidas en los productos tratados con agentes reductores a los que se hace referencia en la memoria descriptiva. Cuando entran en contacto con los agentes reductores prescritos, los sabores misceláneos de tales composiciones se reducen significativamente y la coloración y el olor se reducen de forma eficaz y clara. La puesta en contacto de las composiciones que contienen glicosil hesperetinas con los agentes reductores prescritos debe realizarse preferentemente en un estado de solución o suspensión usando un disolvente apropiado tal como agua, en lugar de en un estado sólido. Los ejemplos de tales composiciones que contienen glicosil hesperetinas para poner en contacto con los agentes reductores prescritos incluyen glicosil hesperetinas que contienen una o más de hesperidina, α -glicosil hesperidina y 7-O- β -glucosil hesperetina. Los ejemplos de tales composiciones incluyen aquellas que contienen glicosil hesperetinas en una cantidad de, habitualmente, al menos el 50 % pero menos del 100 %, preferentemente al menos el 60 % pero menos del 100 %, más preferentemente al menos el 70 % pero menos del 100 %, en particular preferentemente al menos el 80 % pero menos del 100 % y además preferentemente al menos el 90 % pero menos del 100 %.

35

Los mismos agentes reductores que se usan en la producción de productos tratados con agentes reductores pueden usarse cuando se les permite ponerse en contacto con las composiciones anteriores que contienen glicosil hesperetinas. La cantidad de los respectivos agentes reductores que se añaden a las glicosil hesperetinas es habitualmente de al menos el 0,00001 %, preferentemente del 0,0001 al 0,5 %, más preferentemente del 0,001 al 0,4 % y además preferentemente del 0,001 al 0,3 % de la masa de las glicosil hesperetinas, en una base sólida seca (d.s.b.), en donde la mezcla resultante se mezcla hasta la homogeneidad para permitir que las glicosil hesperetinas se pongan en contacto con los agentes reductores para reducir significativa o claramente los sabores misceláneos, etc., como una característica de las glicosil hesperetinas, que incluso son productos sin tratamiento con cualquier agente reductor.

45

Los productos anteriores tratados con agentes reductores en forma líquida pueden concentrarse arbitrariamente mediante métodos de concentración convencionales en forma de jarabe o pasta o pueden secarse adicionalmente mediante métodos de secado convencionales en forma de un sólido, un gránulo o un polvo.

50

Como se ha descrito anteriormente, pueden obtenerse productos tratados con agentes reductores, que se reducen significativa o claramente en sabores misceláneos, etc., como defectos característicos de los productos sin tratamiento con cualquier agente reductor.

55

Entre los productos mejorados de glicosil hesperetinas tratados con agentes reductores, que se obtienen mediante el método de producción anterior y sustancialmente libres de furfural y 4-vinil anisol (abreviado "4-VA", en lo sucesivo en el presente documento y también se conoce como 4-metoxiestileno), una especie de fenol éter, se reducen más significativamente en sabores misceláneos, además de estar marcadamente reducidos en coloración y olor. El 4-VA identificado anteriormente, que es un ingrediente que se especula que se genera a partir de los materiales de producción para las glicosil hesperetinas mejoradas, generalmente está contenido en las glicosil hesperetinas resultantes en una cantidad de menos de 30 ppm a la masa de cada una de las glicosil hesperetinas, d.s.b.; entre los cuales, aquellos con un contenido de furfural de menos de 200 ppm son característicos porque el contenido de 4-VA y el contenido de furfural suelen estar en una relación directamente proporcional. La expresión "sustancialmente no contiene 4-VA" como se hace referencia en la presente divulgación significa que, de manera similar al furfural, el contenido de 4-VA es de nivel significativamente bajo, en comparación con composiciones que contienen otras glicosil hesperetinas, tales como productos sin tratamiento con ningún agente reductor, excepto los productos tratados con agentes reductores. Más concretamente, cuando se determina mediante el método analítico usando el analizador CG/EM que se muestra en "(2) Contenido de 4-VA" en el Experimento 4 descrito más adelante,

65

el contenido de 4-VA en productos tratados con agentes reductores es habitualmente menos de 30 ppm, preferentemente menos de 15 ppm, más preferentemente menor de 10 ppm, más preferentemente menos de 5 ppm, además preferentemente menos de 3 ppm y además preferentemente menos de 2 ppm a la masa seca de cualquiera de los productos tratados con agentes reductores.

5 En comparación con productos sin tratamiento con ningún agente reductor, los productos tratados con agentes reductores tienen un rasgo característico ventajoso en el sentido de que la coloración (puede denominarse "grado de coloración" en lo sucesivo en el presente documento) se reduce claramente. El grado de coloración de glicosil hesperetina se determina mediante el método que se muestra en "(3) Tono de color y grado de coloración" en el Experimento 4 descrito más adelante y descrito como sigue: Una solución acuosa que tiene una concentración prescrita de glicosil hesperetina se somete a un tratamiento térmico en un recipiente sellado y la solución resultante se observa macroscópicamente para el tono de color y se mide para sus absorbancias de $DO_{420\text{ nm}}$ y $DO_{720\text{ nm}}$ a longitudes de onda respectivas de 420 nm y 720 nm, seguido de calcular la diferencia entre las absorbancias anteriores, es decir, $DO_{420\text{ nm}}$ menos $DO_{720\text{ nm}}$, para obtener un valor para su uso como un grado de coloración. Las glicosil hesperetinas preferidas usadas en la práctica de la presente invención incluyen aquellas que tienen la diferencia de absorbancia anterior siendo menos de 0,24, preferentemente 0,20 o menos, más preferentemente 0,17 o menos y además preferentemente por encima de 0 pero 0,15 o menos. En vista del hecho de que los productos sin tratamiento con ningún agente reductor tienen el defecto de aumentar claramente sus grados de coloración por calentamiento, la solución acuosa anterior debe calentarse a propósito en este ensayo para evaluar de manera realista la coloración de las glicosil hesperetinas inducidas por el calentamiento.

Los productos mencionados anteriormente tratados con agentes reductores son composiciones que contienen glicosil hesperetinas, que contienen glicosil hesperetinas y compuestos iónicos fisiológicamente aceptables y que tienen una conductividad eléctrica inferior a 10 $\mu\text{S/cm}$, preferentemente menos de 8 $\mu\text{S/cm}$, más preferentemente menos de 6 $\mu\text{S/cm}$, además preferentemente por encima de 0 $\mu\text{S/cm}$ pero por debajo de 4,5 $\mu\text{S/cm}$, cuando se determina de tal manera que se prepara en soluciones acuosas al 1 % p/v, calentando las soluciones acuosas a 100 °C durante 30 min en los respectivos recipientes sellados y enfriando las soluciones calentadas a 20 °C para determinar sus conductividades eléctricas.

Los productos tratados con agentes reductores, obtenidos mediante el método de producción anterior, son composiciones que se componen principalmente de una o más glicosil hesperetinas seleccionadas de hesperidina, α -glicosil hesperidina y 7-O- β -glucosil hesperetina; son más preferibles aquellas que contienen glicosil hesperetinas en una cantidad total de al menos el 90 % pero menos del 100 %, preferentemente al menos el 93 % pero menos del 100 %, más preferentemente al menos el 95 % pero menos del 100 %, además preferentemente al menos el 97 % pero menos del 100 % y adicionalmente al menos el 98 % pero menos del 100 %, a la masa de cada una de las composiciones, d.s.b.

La expresión "contenido de α -glicosil hesperidina" como se menciona en el presente documento significa lo siguiente: El contenido de α -glicosil hesperidina en una composición que contiene α -glicosil hesperidina se determina tomando muestras de la composición; diluyendo o disolviendo la muestra con agua refinada en una solución al 0,1 % p/v; filtrando la solución con un filtro de membrana de 0,45 μm ; sometiendo el filtrado a un análisis de cromatografía líquida de alta resolución (denominado "análisis HPLC" en lo sucesivo en el presente documento) usando una hesperidina de calidad reactivo, comercializada por Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Tokio, Japón, como una sustancia patrón en las condiciones a continuación; y calculando, basándose en una base de sólido seco, los contenidos de glicosil hesperetinas basados en las áreas de los picos aparecieron en un cromatograma a una longitud de onda UV de 280 nm y los pesos moleculares correspondientes a los respectivos picos para glicosil hesperetinas tales como hesperidina y α -glicosil hesperidina incluyendo α -glucosil hesperidina. Los siguientes (1) a (4) describen la cuantificación en el análisis HPLC de las glicosil hesperetinas:

<Condiciones de análisis mediante HPLC>

Aparato de HPLC: "LC-20AD", comercializado por SHIMADZU CORPORATION, Kioto, Japón

Desgasificador: "DGU-20A3", comercializado por SHIMADZU CORPORATION, Kioto, Japón

Columna: "CAPCELL PAK C18 Y 120", comercializada por Shiseido Co., Ltd., Tokio, Japón

Volumen de inyección de muestra: 10 μl

Eluyente: Agua/acetronitrilo/ácido acético (80/20/0,01 (por relación en volumen))

Caudal: 0,7 ml/min

Temperatura: 40 °C

Detección: "SPD-20A", un detector UV, comercializado por SHIMADZU CORPORATION, Kioto, Japón

Medición de longitud de onda: 280 nm

Procesador de datos: "CHROMATOPAC C-R7A", comercializado por SHIMADZU CORPORATION, Kioto, Japón

(1) Contenido de hesperidina: Se determina analizando una muestra en HPLC y calculando el contenido de hesperidina basándose en la relación entre el área del máximo de la hesperidina en la muestra y la de una hesperidina de calidad reactivo como una sustancia patrón, comercializada por Wako Pure Chemical Industries, Tokio, Japón, a una concentración prescrita.

(2) Contenido de α -glucosil hesperidina: Se determina analizando una muestra en HPLC y calculando el contenido de α -glucosil hesperidina basándose en la relación entre el área del máximo de la α -glucosil hesperidina en la muestra y la de una hesperidina de calidad reactivo como una sustancia patrón, comercializada por Wako Pure Chemical Industries, Tokio, Japón, a una concentración prescrita; y en la relación en peso molecular de la α -glucosil hesperidina a la hesperidina.

(3) Contenido de 7-O- β -glucosil hesperetina: Se determina analizando una muestra en HPLC y calculando el contenido de 7-O- β -glucosil hesperetina basándose en la relación entre el área del máximo de la 7-O- β -glucosil hesperetina en la muestra y la de una hesperidina de calidad reactivo como una sustancia patrón, comercializada por Wako Pure Chemical Industries, Tokio, Japón, a una concentración prescrita; y en la relación de peso molecular de la 7-O- β -glucosil hesperetina a la hesperidina.

(4) Contenido de otras glicosil hesperetinas: Se determina analizando una muestra en HPLC y calculando los contenidos de otras glicosil hesperetinas basándose en la relación entre el área del máximo de las otras glicosil hesperetinas en la muestra y la de una hesperidina de calidad reactivo como una sustancia patrón, comercializada por Wako Pure Chemical Industries, Tokio, Japón, a una concentración prescrita; y en las relaciones en peso molecular de las otras α -glucosil hesperetinas a la hesperidina.

Entre los productos tratados con agentes reductores obtenidos por el método de producción anterior, las glicosil hesperetinas que contienen o consisten en α -glucosil hesperidina como α -glucosil hesperidina son preferibles porque tales glicosil hesperetinas ejercen más claramente las funciones y efectos deseados de la presente invención, es decir, un efecto satisfactorio de mejorar el amarilleamiento de la piel ya generado. Los contenidos preferibles de α -glucosil hesperidinas en las glicosil hesperetinas mencionadas anteriormente son habitualmente del 60 al 90 %, preferentemente del 70 al 90 % y más preferentemente del 75 al 90 % de la masa sólida de cada uno de los productos anteriores, porque cuanto mayor sea el límite inferior del contenido de α -glucosil hesperidina, más claramente se ejercerán las funciones y efectos identificados anteriormente.

Entre los productos tratados con agentes reductores obtenidos por el método de producción anterior, son preferibles aquellos que tienen las siguientes propiedades porque ejercen más claramente las funciones y efectos deseados de la presente invención, es decir, una acción de reducción del amarilleamiento de la piel ya generado: Cualquiera de los productos tratados con agentes reductores tiene una diferencia de absorbancia, es decir, $DO_{420\text{ nm}}$ menos $DO_{720\text{ nm}}$, siendo menos de 0,24, preferentemente 0,20 o menos, más preferentemente 0,17 o menos y además preferentemente 0 o más alto pero 0,15 o menos, cuando se miden absorbancias a longitudes de onda de 420 nm ($DO_{420\text{ nm}}$) y 720 nm ($DO_{720\text{ nm}}$) con un espectrofotómetro después de preparar una solución acuosa al 1 % p/v y calentarla a 100 °C durante 30 min en un recipiente sellado, ajustando la solución acuosa calentada a temperatura ambiente y colocando una muestra de la solución acuosa en una cubeta de 1 cm de ancho. En comparación con las glicosil hesperetinas obtenidas por los métodos de producción sin tratamiento con ninguno de los agentes reductores prescritos, los productos específicos anteriores también son superiores en sus sabores misceláneos/coloraciones y olores significativamente o claramente reducidos.

Entre los productos tratados con agentes reductores obtenidos por el método de producción anterior, son preferibles aquellos que tienen las siguientes propiedades porque ejercen más claramente las funciones y efectos deseados de la presente invención, es decir, acciones de mejora del amarilleamiento de la piel ya generado: Cuando se determina en un análisis espectrométrico de emisión de plasma acoplado inductivamente de alta frecuencia, las composiciones que contienen glicosil hesperetinas que contienen calcio, potasio, magnesio y sodio en las cantidades dentro de los intervalos a continuación, en donde el calcio, potasio, magnesio y sodio están contenidos en cantidades respectivas de 1 ppm o menos, 0,1 ppm o menos, 0,2 ppm o menos y 0,4 ppm o menos; más preferentemente en cantidades respectivas de 0,6 ppm o menos, 0,06 ppm o menos, 0,1 ppm o menos y 0,3 ppm o menos; y más preferentemente, en cantidades respectivas de 0 ppm o más pero 0,5 ppm o menos, 0 ppm o más pero 0,05 ppm o menos, 0 ppm o más pero 0,08 ppm o menos y 0 ppm o más pero 0,2 ppm o menos a la masa sólida de cada uno de los productos tratados con agentes reductores. En comparación con las composiciones que contienen glicosil hesperetinas obtenidas mediante métodos de producción convencionales, los productos específicos anteriores también son superiores en sus sabores misceláneos/coloraciones y olores significativamente o claramente reducidos.

Dado que los productos tratados con agentes reductores se reducen significativamente en sabores misceláneos y también se reducen claramente en coloración y olor, así como mejorándose en termoestabilidad, en comparación con sus propiedades justo después de su procesamiento, aún se mantienen intactos en sabores misceláneos/coloraciones y olores inherentes a los productos tratados con agentes reductores sin provocar ninguna diferencia sustancial o se suprimen efectivamente en cualquier aumento de los mismos, incluso cuando se calienta a una temperatura alta de 80 a 100 °C durante 30 min o más, durante las etapas de incorporarse con agentes reductores, o después de incorporarse en el agente dérmico externo para reducir el amarilleamiento de la piel y almacenarse a temperatura ambiente o temperatura ligeramente superior de la misma durante varias decenas de minutos a varios meses. Los productos tratados con agentes reductores también tienen el mérito de tener una tolerancia a los ácidos y una termoestabilidad satisfactorias.

Como se ha descrito anteriormente, las glicosil hesperetinas usadas en la práctica de la presente invención significan composiciones que contienen, como ingrediente o ingredientes principales, uno o ambos de (1) α -glucosil hesperidina (α -glucosil hesperidina, etc.) y (2) hesperidina y 7-O- β -glucosil hesperetina, es decir, mezclas de glicosil

hesperetinas; y que además pueden contener (3) flavonoides tales como narirutina, diosmina, neoponcirina y glucosil narirutina y (4) ingredientes traza tales como sales, todos los cuales se presume que derivan de sus materiales de producción o se forman como subproductos durante sus procesos de producción. Entre estas glicosil hesperetinas, se usan preferentemente en la práctica de la presente invención las glicosil hesperetinas mejoradas que contienen los ingredientes anteriores (1) y (2) en un porcentaje total (%) (simplemente llamado "contenido de glicosil hesperetina") de, en una base en sólido seco, al menos el 90 % pero menos del 100 %, preferentemente al menos el 93 % pero menos del 100 %, más preferentemente al menos el 95 % pero menos del 100 %, además preferentemente al menos el 97 % pero menos del 100 % y además preferentemente al menos el 98 % pero menos del 100 %. Las hesperetinas glicosiladas mejoradas pueden contener hesperetina.

La pureza de las glicosil hesperetinas mejoradas usadas en la práctica de la presente invención o el límite superior del contenido de glicosilhesperetina en las glicosil hesperetinas, d.s.b., es habitualmente el 99 % lo que facilita una producción industrial de glicosil hesperetinas en una cantidad relativamente grande y a un coste menor; preferentemente, aquellos con un 98 % se pueden proporcionar a un coste menor y, más preferentemente, aquellos con un contenido tan bajo como 97 % o menos se pueden proporcionar a un coste aún menor. Cuanto menor sea el contenido de glicosil hesperetina en las glicosil hesperetinas, d.s.b., mayor será el uso inevitable de glicosil hesperetinas en comparación con aquellas con un mayor contenido de glicosil hesperetina, dando como resultado un manejo complicado y mala manejabilidad. En consecuencia, el límite inferior del contenido de glicosil hesperetina debe ser habitualmente de al menos el 90 %, preferentemente al menos el 93 %, más preferentemente al menos el 95 %, aún más preferentemente al menos el 97 % y además preferentemente al menos el 98 %.

Los ejemplos más preferidos de glicosil hesperetinas mejoradas usadas en la práctica de la presente invención incluyen, por ejemplo, aquellas con un contenido de α -glicosil hesperidina de al menos el 50 % pero menos del 100 %, d.s.b., entre las que contienen, como glicosil hesperetina, α -glicosil hesperidina tal como α -glucosil hesperidina.

En el caso de proporcionar el agente dérmico externo para reducir el amarilleamiento de la piel de la presente divulgación a un coste menor, el límite superior del contenido de α -glucosil hesperidina en las glicosil hesperetinas mejoradas usadas en la práctica de la presente invención preferentemente debería ser, habitualmente, el 90 % o menos y aquellos con dicho contenido pueden proporcionarse fácilmente a escala industrial en una cantidad relativamente mayor y a un coste menor; preferentemente, aquellos con un contenido del 85 % o menos se pueden proporcionar a un coste menor y, más preferentemente, aquellos con un contenido del 80 % o menos se pueden proporcionar a un coste aún menor. Debido a una razón similar a la mencionada en el contenido de glicosil hesperetina anterior, el límite inferior del contenido de α -glucosil hesperidina en las glicosil hesperetinas mejoradas debe ser normalmente del 60 % o más, preferentemente el 65 % o más y más preferentemente el 70 % o más.

El agente dérmico externo para reducir el amarilleamiento de la piel de la presente divulgación puede incorporarse con otros ingredientes además de la hesperetina y/o glicosil hesperetinas como el ingrediente o ingredientes eficaces. Los ejemplos de los otros ingredientes incluyen naringenina, glicosil naringeninas tales como naringina y glucosil naringina; ácidos L-ascórbicos tales como ácido L-ascórbico y sus sales y derivados que incluyen 2-glucósido de ácido L-ascórbico y similares; polifenoles tales como resveratrol, quercetina, ácido clorogénico, antocianina, curcumina, kaempferol y flavonoides; extractos de plantas tales como extracto foliar de *Cynara scolymus*, extracto de *Angelica keiskei*, extracto de semilla de *Fragaria*, extracto foliar de *Ginkgo biloba*, extracto de *Citrus unshiu*, extracto de *Ribes nigrum*, extracto de *Actinidia deliciosa*, extracto de *Vaccinium macrocarpon*, extracto de *Malpighia emarginata*, extracto de *Embilica officinalis* y extracto de *Aronia*; carotenoides tales como astaxantina y β -caroteno; extractos de plantas o compuestos que tienen una acción inhibidora de la glicación en sí misma (llamada "acción inhibidora de la reacción de glicación"); y sacáridos; ácidos orgánicos; y aminoácidos. Particularmente, las glicosil hesperetinas como el ingrediente o ingredientes eficaces del agente dérmico externo para reducir el amarilleamiento de la piel de la presente divulgación ejercen de manera cooperativa y eficaz una acción de reducción del amarilleamiento de la piel cuando se usan con uno o más de los siguientes ingredientes: naringenina, glicosil naringenina incluyendo naringina y glucosil naringina; ácidos L-ascórbicos; sacáridos tales como manitol, N-acetil glucosamina, maltosa, maltotriitol, rafinosa y maltotetraosa; ácidos orgánicos tales como ácido láctico, ácido málico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido salicílico, ácido ferúlico, ácido glucurónico, ácido glucónico, glucuronolactona, ácido sórbico y ácido benzoico; y aminoácidos tales como glicina y glutamato sódico. Los otros ingredientes identificados anteriormente mejoran de eficazmente la acción de reducir el amarilleamiento de la piel ejercida por la hesperetina y/o glicosil hesperetinas como los ingredientes eficaces del agente dérmico externo para reducir el amarilleamiento de la piel de la presente divulgación, o ejercen de forma aditiva o sinérgica la acción de reducción del amarilleamiento deseado de la piel junto con la acción de reducción del amarilleamiento de la piel ejercida por los ingredientes en sí mismos.

Los ejemplos de extractos de plantas o compuestos que tienen una acción inhibidora de la glicación incluyen extractos de plantas tales como *Euphrasia officinalis*, *Pilea mongolica*, *Elaeagnus umbellata*, *Agrimonia eupatoria*, fruto de *Agni*, *Akebia quinata*, fruto de *Euterpe oleracea*, *Withania somnifera*, *Thujopsis dolabrata*, *Acacia catechu*, *Quercus variabilis*, *Gynostemma pentaphyllum*, *Pimpinella anisum* L., *Hamamelis virginiana*, *Alistin*, *Epimedium grandiflorum* var. *thunbergianum*, *Fallopia japonica* (Houtt.) Ronse Deer. var. *japonica*, *Ginkgo biloba*, *Pyrola japonica*, *Fragaria*, *Lilium tenuifolium* Fischer, *Gloiosiphonia capillaris*, *Ficus erecta*, corteza de *Tabebuia* spp., *Acer*

palmatum, *Lilium maculatum* Thunb., *Foeniculum vulgare*, *Hamamelis virginiana*, *Gaultheria procumbens*, *Curcuma longa* Linn, *Prunus mume*, *Quercus salicina*, *Epimedium brevicornum* Maxim, fruto seco de *Rosa multiflora*, *Echinacea angustifolia*, *Eleutherococcus senticosus*, *Cytisus scoparius*, *Gentianella alborosea* (Gilg) Fabris, *Sambucus nigra*, *Ilex paraguariensis*, *Borassus flabellifer*, *Phellodendron amurense*, *Coptis japonica* (Thunb.) Makino, *Silybum marianum*, *Avena sativa*, *Cardamine scutata*, *Salsola komarovii*, *Lilium rubellum*, *Lapsana apogonoides*, *Lilium lancifolium*, *Origanum vulgare*, *Citrus sinensis*, semilla de *Cucurbita*, corteza de *Erythroxylum catuaba*, *Lilium speciosum*, *Paullinia cupana*, *Hibiscus sabdariffa*, *Asarum nipponicum*, *Tussilago farfara*, *Platycodon grandiflorus*, *Rumex japonicus*, *Clerodendron trichotomum*, *Mallotus philippinensis*, *Lilium medeoloides* A. Gray, *Juglans*, *Vaccinium vitis-idaea* L., *Monochoria vaginalis* var. *plantaginea*, *Eisenia arborea* J. E. Areschoug, *Punica granatum*, *Ipomoea batatas*, *Smilax regellii* Killip & Morton, *Crataegus cuneata*, *Pellionia minima*, *Perilla frutescens* var. *crispa*, *Psophocarpus tetragonolobus* (L.) D.C., *Filipendula multijuga*, *Paeonia lactiflora*, *Rheum palmatum*, *Aster scaber*, *Chenopodium album*, *Aster ageratoides* ssp. *Leiophyllus*, *Plantago major*, *Centella asiatica*, *Fagopyrum esculentum*, *Lilium formosanum* A. Wallace, *Cardamine scutata* Thunb., *Davilla rugosa*, *Lilium nobilissimum* Makino, *Cordia salicifolia*, *Syzygium aromaticum* Merr. et Perry, *Cassia angustifolia*, *Centella asiatica* (L.) Urb., *Bellis perennis*, *Anethum graveolens*, *Harpogophytum procumbens*, *Farfugium japonicum* (L.) Kitam, *Lilium longiflorum*, raíz de *Harpogophytum procumbens*, *Rubus suavissimus* S. Lee, *Prunus persica*, *Houttuynia cordata*, *Rosa roxburghii*, hojas de *Eucommia ulmoides*, *Solanum lycopersicum*, *Potentilla tormentilla* Schrk (Rosaceae), *Rumex crispus*, *Sambucus racemosa* subsp. *sieboldiana*, *Trapaeolum majus* Linn., *Aster microcephalus* var. *ovatus*, *Mentha*, *Lilium longiflorum*, *Lespedeza*, *Colocasia gigantea*, *Passiflora incarnata*, *Passiflora edulis* Sims, raíces de *Paffia*, *Artocarpus heterophyllus*, *Prunus cerasoides* var. *campanulata*, *Helianthus annuus*, *Elatostema japonicum* var. *japonicum*, *Lilium concolor*, *Lapsana* spp., *Areca catechu*, *Petasites japonicus* (Siebold et Zucc.) Maxim, *Lablab purpureus* (L.) Sweet, *Cimicifuga racemosa*, *Crassocephalum crepidioides*, *Actinidia polygama*, *Machilus odoratissima*, *Pinus*, *Lithocarpus edulis*, *Ilex paraguariensis*, *Lilium candidum*, aquenios de *Silybum marianum*, *Staphylea bumalda*, *Stauntonia hexaphylla*, *Nemacystus decipiens*, *Salicaceae*, *Hemerocallis fulva* var. *kwanso*, *Annona montana* Macfady, *Lilium auratum*, *Ipomoea aquatica*, *Aster yomena*, semillas de *Litchi chinensis*, *Lilium regale*, *Pleioblastus linearis*, *Rubus rosaefolius*, fruto sin madurar de *Malus pumila*, flores de *Tilia cordata*, *Aspalathus linearis*, *Lactuca sativa*, *Citrus limon*, *Cymbopogon citratus*, *Thymus X citriodorus*, *Aloysia citrodora*, *Melissa officinalis*, *Rosa canina*, botones florales de *Rosa damascena*, *Rosmarinus officinalis* L., *Rosa X centifolia* L., *Laurus nobilis*, *Aerides rosea*, *Haematoxylum campechianum*, *Sanguisorba officinalis*, *Astragalus sinicus*, hojas de *Diospyros kaki* Thunberg, hojas de *Glycyrrhiza uralensis*, epispermos de *Glycine max*, semillas de *Oryza sativa* subsp. *javanica*, hojas de *Alpinia zerumbet*, *Lilium tenuifolium* Fischer, *Salix* sp. y hojas de *Eucommia ulmoides*; extractos de algas marinas tales como *Gloiopeltis complanata* (Harvey) Yamada, *Gloiopeltis furcata* (Postels et Ruprecht) J. Agardh y *Gloiopeltis tenax* (Turner) J. Agardh; extractos de granos de café crudos, posos de licor destilado de batatas, micelios de *Agaricus blazei*, etc.; ecuol; isoflavona; 1,4-antraquinona; 1-amino-2-hidroimetil antraquinona; 4-aminofenol; 1,3,5-trihidroxibenceno, ácido kójico; 3,4-dihidroxi-fenilacetato; ácido de cafeína; ifenprodil; 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxilato; 6-hidroxiindol; 7-hidroxi-4,6-dimetiltalida; ácido α -lipoico; 4-hidroxicalcona; hidrolizados de proteínas de perlas; aminoguanidina, eritrosina sódica, L-ergotioneína, resveratrol; hidroxiestilbenos tales como 3,3',5,5'-tetrahidroxiestilbeno; oxindol; carnosina; ácido salicílico; bromhidrato de salsolinol; ácido sinapínico; tocoferilnicotinato; amida de ácido nicotínico; ácido nordihidroguayarático; proantocianina; manitol; caseína hidrolizada; tanino hidrolizable; catecol; ácido clorogénico y derivados del mismo tales como ácido clorogénico, ácido isoclorogénico, ácido neoclorogénico, ácido criptoclorogénico y ácido feruloil cafeoilquínico; y otros tales como leucocianidina, prunina, oligómero de procianidol y glicosilrutina. Entre los ingredientes anteriores, los siguientes se ejemplifican como extractos o compuestos de plantas, que tienen una acción inhibidora de la glicación, usados adecuadamente en la práctica de la presente invención: Extractos de *Withania somniferous*, *Thujopsis dolabrata*, *Acacia catechu*, *Ginkgo biloba*, *Gaultheria procumbens*, *Phellodendron amurense*, *Citrus sinensis*, semillas de *Cucurbita*, cortezas de *Erythroxylum catuaba*, *Mallotus philippinensis*, glucosil rutina, *Vaccinium vitis-idaea* L., *Perilla frutescens* var. *crispa*, hojas de *Fagopyrum esculentum*, *Davilla rugosa*, *Houttuynia cordata*, *Elatostema japonicum* Wedd., *Crassocephalum crepidioides*, *Actinidia polygama*, *Pleioblastus linearis*, *Rubus croceacanthus*, fruto sin madurar de *Malus pumila*, hojas de *Diospyros kaki* Thunberg, hojas de *Glycyrrhiza glabra* (regaliz), hojas de *Alpinia zerumbet* y extractos foliares de *Eucommia ulmoides*, así como ecuol, isoflavona, ifenprodil, hidrolizados de proteínas de perlas, catecol, ácido cafeico y prunina. Los contenidos respectivos de los otros ingredientes mencionados anteriormente que se incorporarán al agente dérmico externo para reducir el amarilleamiento de la piel de la presente invención son habitualmente el 0,001 % o más, preferentemente del 0,01 al 50 %, más preferentemente del 0,01 al 30 %, además preferentemente del 0,01 al 20 % y además preferentemente del 0,01 al 10 % de la masa total del agente.

El agente dérmico externo para reducir el amarilleamiento de la piel de la presente divulgación puede estar opcionalmente en forma de, por ejemplo, un polvo, sólido, líquido, crema o pasta. Los ejemplos de tales formas incluyen pomadas, lociones lechosas, cremas, comprimidos, gránulos, polvos, pulverizaciones, suspensiones, pastas, gelatinas, líquidos, geles, sales de baño, lociones, aceites corporales, esencias, polvos faciales, envases, etc. Los ejemplos de los métodos para incorporar hesperetina y/o hesperetinas glicosiladas en el agente dérmico externo para reducir el amarilleamiento de la piel incluyen, por ejemplo, adjuntar y mezclar, amasar, mezclar, añadir, disolver, empapado, permear, burbujear, aplicar, pulverización, inyectar, etc., uno o más de los cuales pueden usarse en cualquier etapa antes de completar la preparación del agente dérmico externo.

El agente dérmico externo para reducir el amarilleamiento de la piel de la presente divulgación puede ejemplificarse

en forma de un cosmético, como se mencionó anteriormente y puede usarse arbitrariamente después de incorporarse a los cosméticos en una cantidad adecuada.

5 La cantidad de hesperetina y/o glicosil hesperetinas contenida en el agente dérmico externo para reducir el amarilleamiento de la piel de la presente divulgación puede establecerse apropiadamente en un nivel deseado, dependiendo de la frecuencia de aplicación del agente y las condiciones de la piel de los usuarios; sin embargo, cuando una o más hesperetinas y/o glicosil hesperetinas se consideran hesperetinas al calcular sus cantidades (simplemente denominadas "conversión de hesperetina", en lo sucesivo en el presente documento), pueden incorporarse al agente en una cantidad total superior al 0,0001 % pero menos del 100 %, preferentemente por encima del 0,001 % pero menos del 100 %, más preferentemente 0,01 % o más pero menos del 100 %, adicionalmente del 0,01 al 60 %, además preferentemente del 0,01 al 40 % y además preferentemente del 0,01 al 20 %, d.s.b. Una frecuencia de aplicación externa preferible y el plazo del agente dérmico externo para reducir el amarilleamiento de la piel habitualmente son, sucesivamente de una a cinco veces al día, preferentemente de una a tres veces al día (por la mañana, al mediodía, o por la tarde/noche) durante al menos varios días, preferentemente al menos varias semanas, más preferentemente al menos un mes, además al menos dos meses, además preferentemente al menos tres meses al día o con un intervalo de al menos un día. Cuando la dosis está por debajo del límite inferior anterior, las funciones y efectos deseados claramente disminuyen o incluso se vuelven inválidos; mientras que cuando la dosis está por encima del límite superior anterior, es posible que no se ejerzan las funciones y efectos correctos acordes con tal sobredosis y tampoco es preferible en términos de un punto de vista económico.

20 El agente dérmico externo para reducir el amarilleamiento de la piel se aplica preferentemente a la piel exterior, particularmente, a la piel excluyendo las mucosas.

Incluso cuando se mantiene o se almacena a temperatura ambiente o a una temperatura ligeramente más alta durante decenas de minutos a varios meses, el agente dérmico externo para reducir el amarilleamiento de la piel de la presente divulgación obtenido de esta manera en sí mismo y las composiciones incorporadas de esta manera tienen olor reducido hasta un nivel completamente libre de olor o incluso hasta un nivel imperceptible.

El agente dérmico externo para reducir el amarilleamiento de la piel de la presente divulgación se explica con más detalle con referencia a los siguientes experimentos:

30 <Experimento 1: Selección de sustancias capaces de reducir la proteína carbonilo>

(1) Sumario

35 Se sabe que la piel aparentemente se vuelve amarillenta tenue, es decir, se induce amarilleamiento de la piel, cuando las proteínas en la parte más profunda de la dermis de la piel se desnaturalizan/se carbonilan por peróxidos, etc. En este experimento, se seleccionaron sustancias capaces de reducir el amarilleamiento de la piel usando el modelo de proteína carbonilo descrito más tarde.

40 (2) Modelo de proteína carbonilo

Una proteína carbonilo, obtenida carbonilando seroalbúmina bovina (denominada "BSA", en lo sucesivo en el presente documento), se preparó como un modelo de proteína carbonilo (denominado "carbonil BSA", en lo sucesivo en el presente documento) y se usó en este experimento.

45 <Preparación de carbonil BSA>

En solución salina tamponada con fosfato (denominada "PBS (-)", en lo sucesivo en el presente documento) que contenía 100 µM de hipoclorito sódico como iniciador de carbonilo, se disolvió BSA para dar una concentración final de 40 mg/ml, seguido de mantener la solución resultante a 37 °C durante la noche para formar carbonil BSA, como un modelo de proteína carbonilo, usado como sustancia para causar amarillamiento de la piel y retirando el hipoclorito de sodio restante con "AMICON ULTRA 10K", un nombre de producto de membrana de ultrafiltración, comercializado por Merck Millipore Corporation, Tokio, Japón, para obtener un carbonil BSA. En este experimento, el carbonil BSA se usó como un modelo de proteína carbonilo.

55 (3) Muestra de prueba

Las siguientes se usaron como muestras de prueba: una composición particulada que contiene glicosil hesperetina obtenida en el Ejemplo 1 descrito más tarde (llamada simplemente "composición que contiene glicosil hesperetina", en lo sucesivo en el presente documento); una composición que contiene glicosil naringenina o una composición que contiene el 67,6 % de monoglucosil naringina y el 22,4 % de naringina preparada mediante el método divulgado en la Patente japonesa N.º 3967563; "AA2G", un nombre de producto de ácido L-ascórbico 2-glucósido comercializado por Hayashibara Co., Ltd., Okayama, Japón; una niacinamida de calidad reactivo especial con una pureza del 98,0 % o más alta, comercializada por Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japón; y un glutatión reducido con una pureza del 99 % o más alta, comercializado por Sigma Aldrich Co., LLC, Osaka, Japón.

(4) Selección de sustancias que tienen una acción de reducción de la proteína carbonilo o una acción de reducción del amarilleamiento de la piel (una prueba de uso único)

Mediante el uso de una prueba anti-carbonilo bien conocida que se usa como método para seleccionar sustancias capaces de inhibir la formación de proteínas carbonilo, los presentes inventores examinaron las muestras de prueba enumeradas en la Tabla 1 para determinar sus acciones de reducción de proteína carbonilo de acuerdo con los siguientes procedimientos: Una solución de 100 µl que contiene 10 mg/ml de carbonil BSA, preparado en el (2) anterior, se añadió a PBS (-) para dar un volumen total de un mililitro en el cual cualquiera de las muestras de prueba en el (3) anterior, como candidatos a sustancias capaces de inhibir la formación de proteína carbonilo, se disolvió para dar una concentración de 0,1 % p/v. Todo el contenido de una solución, que contiene el carbonil BSA preparado en el (2) anterior y una cualquiera de las muestras de prueba en una relación de masa de 1:1 (llamada "una solución de prueba para la prueba de reducción de proteína carbonilo", en lo sucesivo en el presente documento), se mantuvo a 37 °C durante 16 horas y se filtró con la membrana de ultrafiltración anterior, seguido de la eliminación de los antioxidantes restantes. Basándose en el análisis de transferencia Western, la concentración de carbonil BSA se analizó con el método de transferencia por puntos usando un kit, "Kit de Detección de Oxidación de Proteínas OxyBlot™", un nombre de producto de un kit para analizar el nivel de oxidación de proteínas, comercializado por Merck Millipore Corporation, Tokio, Japón. Los valores medidos resultantes (intensidad de emisión) se analizaron con "Image J", un software de procesamiento de imágenes explorado por National Institutes of Health (NIH), Maryland, EE.UU. Mientras que, una solución de PBS (-) (denominada "control", en lo sucesivo en el presente documento) que contiene carbonil BSA, obtenida de manera similar a la anterior, excepto por no usar ninguna de las muestras de prueba, se midió de manera similar a anteriormente, seguido de la determinación de las proporciones de los valores medidos para aquellos con las muestras de prueba contra el control. Los resultados se muestran en la Tabla 1 y la FIG. 1. En comparación con la proporción de carbonil BSA en el control sin adición de ninguna de las muestras de prueba, significa que cuanto menor sea la proporción de carbonil BSA, mayor es la acción de reducir la proteína carbonilo. Los números en la tabla muestran respectivamente las proporciones de carbonil BSA cuando las muestras de prueba se usaron respectivamente solas frente al valor medido de carbonil BSA, considerado como 1, para Control sin adición de ninguna de las muestras de prueba.

[Tabla 1]

Muestra de prueba	Relación de carbonil BSA
Control	1
Composición que contiene glicosil hesperetina	0,46
Composición que contiene glicosil naringenina	0,77
Ácido L-ascórbico 2-glucósido	0,73
Niacinamida	1,05
Glutación (forma reducida)	1,19

Como está claro a partir de la Tabla 1 y la FIG. 1, cuando la proporción de carbonil BSA del control se consideró como 1, las relaciones de carbonil BSA para la composición que contiene glicosil hesperetina, la composición que contenía glicosil naringenina y el ácido L-ascórbico 2-glucósido fueron respectivamente 0,46, 0,77 y 0,73, que eran evidentemente inferiores a la de Control; revelando que la composición que contiene glicosil hesperetina, la composición que contiene glicosil naringenina y el ácido L-ascórbico 2-glucósido tienen una acción de reducción de carbonil BSA, es decir, una acción de reducir la proteína carbonilo. Entre estas, se reveló que la composición que contenía glicosil hesperetina tenía la mayor acción de reducción de la proteína carbonilo. Mientras que, las proporciones de carbonil BSA para niacinamida y glutación (forma reductora) fueron más altas que las del Control, revelando que no tienen acción de reducir la proteína carbonilo.

(5) Prueba de reducción de proteína carbonilo - 1 (una prueba de combinación de una composición que contiene glicosil hesperetina y otros ingredientes)

Se experimentó una prueba de combinación de la composición que contenía glicosil hesperetina, que mostró la mayor acción de reducción de carbonil BSA y la composición que contenía glicosil naringenina o el ácido L-ascórbico 2-glucósido, cuyas acciones fueron inferiores a las de la composición que contenía glicosil hesperetina con la mayor acción de reducción de carbonil BSA como se encuentra en la anterior (4). Se probó de manera similar al anterior (4), excepto que se usaron las soluciones de prueba para la prueba de reducción de proteína carbonilo que tenían una concentración del 0,1, 0,5 o 1,0 % p/v de la composición que contenía glicosil hesperetina o las soluciones de prueba para la prueba de reducción de proteína carbonilo que tiene una concentración del 0,1 % p/v de la composición que contiene glicosil naringenina o el ácido L-ascórbico 2-glucósido, en lugar de la solución de prueba para la prueba de reducción de proteína carbonilo usada en el anterior (4). Los resultados están respectivamente en las Tablas 2 y 3 y en las FIG. 2 y 3. Los números sin símbolo "%" en cada tabla muestran proporciones de carbonil BSA obtenidas de tal manera de calcular la cantidad de carbonil BSA para el sistema con una o ambas muestras de prueba que se usaron respectivamente solas o en combinación con respecto a uno la cantidad de carbonil BSA en cada sistema de control sin adición de ninguna de las composiciones que contienen glicosil hesperetina o glicosil

naringenina.

[Tabla 2]

Muestra de prueba	Relación de carbonil BSA	
	Composición que contiene glicosil naringenina	
	Sin adición	Añadido en una cantidad del 0,1 % p/v
Control	1	0,70
Composición que contiene glicosil hesperetina (0,1 % p/v)	0,53	0,40
Composición que contiene glicosil hesperetina (0,5 % p/v)	0,24	0,10
Composición que contiene glicosil hesperetina (1,0 % p/v)	0,07	0,06

5

[Tabla 3]

Muestra de prueba	Relación de carbonil BSA	
	Composición que contiene ácido L-ascórbico 2-glucósido	
	Sin adición	Añadido en una cantidad del 0,1 % p/v
Control	1	0,70
Composición que contiene glicosil hesperetina (0,1 % p/v)	0,53	0,81
Composición que contiene glicosil hesperetina (0,5 % p/v)	0,24	0,04
Composición que contiene glicosil hesperetina (1,0 % p/v)	0,07	0,02

Como queda claro a partir de los resultados de la Tabla 2 y la FIG. 2, el uso combinado de la composición que contenía glicosil hesperetina (0,1 % p/v) y la composición que contenía glicosil naringenina (0,1 % p/v) marcó una proporción de carbonil BSA de 0,40 que se había reducido del 0,53 original para el uso único de la primera composición. De forma similar, el uso combinado de la composición que contenía glicosil hesperetina (0,5 % p/v o 1,0 % p/v) y la composición que contenía glicosil naringenina (0,1 % p/v) marcó 0,10 o 0,06 que se había reducido desde el 0,24 o 0,07 original, respectivamente, para el único uso de la composición anterior. Estos resultados revelaron que el uso combinado de la composición que contiene glicosil hesperetina y la composición que contiene glicosil naringenina potencia la acción de reducción de carbonil BSA, es decir, la acción de reducir la proteína carbonilo.

Además, como queda claro a partir de los resultados de la Tabla 3 y la FIG. 3, el uso combinado de la composición que contiene glicosil hesperetina (0,1 % p/v) y el ácido L-ascórbico 2-glucósido (0,1 % p/v) aumentó con respecto a la proporción original de carbonil BSA de 0,53 para el uso único de la composición anterior a 0,81. Bajo las condiciones, no se observó ninguna acción de reducción de carbonil BSA debido al uso combinado de la composición que contiene glicosil hesperetina y el ácido L-ascórbico 2-glucósido; sin embargo, el uso en combinación de la composición que contiene glicosil hesperetina (0,5 % p/v o 1,0 % p/v) y el ácido L-ascórbico 2-glucósido (0,1 % p/v) se redujo de la proporción de carbonil BSA de 0,24 o 0,07 para el uso único de la composición anterior a 0,04 o 0,02, respectivamente. Estos resultados revelaron que el uso combinado de la composición de glicosil hesperetina y el 2-glucósido del ácido L-ascórbico mejora la acción reductora del carbonil BSA, es decir, la acción de reducción de proteína carbonilo ejercida por la composición anterior.

Todos los descubrimientos, que se hicieron en base a los auto-descubrimientos de los presentes inventores, son novedosos.

Aunque no se muestran datos concretos, cualquiera de las composiciones que contienen glicosil hesperetinas en los Ejemplos 2 a 6, como se muestra a continuación, tiene una acción similar a la de la composición que contiene glicosilhesperetina usada en este experimento.

(6) Prueba de reducción de proteína carbonilo - 2 (una prueba de combinación de una composición que contiene glicosil hesperetina y cualquiera de los sacáridos)

En el (5) anterior, cuando la composición que contiene glicosil hesperetina y la composición que contiene naringenina o el ácido L-ascórbico 2-glucósido se usan en combinación, actuaron cooperativamente para mostrar una acción de reducción de proteína carbonilo. Además, en este experimento, los sacáridos se centraron y se probaron como candidatos para potenciar la acción de reducción de la proteína carbonilo cuando se usaban en

combinación con la composición que contenía glicosil hesperetina.

5 Excepto por el uso de cualquiera de manosa, N-acetilglucosamina, "MALTOSA HHH" como nombre de producto de maltosa, rafinosa, maltotetraosa y "TORNARE®" como nombre de producto de glicosil trehalosa usada como material base cosmético, que se muestran en la Tabla 4 a continuación, en lugar de la composición que contiene glicosil naringenina y el ácido ascórbico 2-glucósido usado en el anterior (4) y prepararlo en una solución que contiene 0,1 % p/v de cualquiera de los sacáridos anteriores para su uso como una solución de prueba para la prueba de reducción de proteína carbonilo, se examinó la acción de reducción de la proteína carbonilo de la combinación usando la composición que contiene glicosil hesperetina y cualquiera de los sacáridos identificados anteriormente de forma similar al anterior (4). Los resultados están en la Tabla 5.

[Tabla 4]

Sacárido	Fuente
Manosa (un reactivo de calidad especial)	Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japón
N-acetil glucosamina (un reactivo de calidad especial)	Kishida Chemical Co., Ltd., Osaka, Japón
"MALTOSE HHH", un nombre de producto de maltosa con una pureza de al menos el 99 %	Hayashibara Co., Ltd., Okayama, Japón
Rafinosa (un reactivo de calidad especial)	Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japón
Maltotetraosa	Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japón
"TORNARE®", un nombre de producto de glicosil trehalosa como un material base cosmético que contiene glicosil trehalosa como un ingrediente principal	Hayashibara Co., Ltd., Okayama, Japón

[Tabla 5]

15 (Efecto de combinación)

	Control (Sin adición)	Composición que contiene glicosil hesperetina (0,1 % p/v)	Uso combinado de una composición que contiene glicosil hesperetina (0,1 % p/v) y cualquiera de los sacáridos a continuación (0,1 % p/v)					
			Manosa	N-acetil glucosamina	Maltosa	Rafinosa	Malto-tetraosa	Glicosil trehalosa
Relación de carbonil BSA	1	0,51	1,3	0,79	0,11	0,54	0,13	0,13

(Referencia: Efecto del sacárido solo)

	Control (Sin adición)		Sacárido de un solo uso (0,1 % p/v)					
			Manosa	N-acetil glucosamina	Maltosa	Rafinosa	Malto-tetraosa	Glicosil trehalosa
Relación de carbonil BSA	1		0,51	0,48	0,18	0,23	0,71	0,37

20 Como está claro a partir de los resultados en la Tabla 5, el uso único de la composición que contiene glicosil hesperetina claramente reducida en su relación original de carbonil BSA de 0,51 a 0,11, 0,13 o 0,13 cuando la composición se usó en combinación con maltosa, maltotetraosa o glicosiltrehalosa, respectivamente. Este resultado reveló que maltosa, maltotetraosa y glicosil trehalosa tienen la acción de potenciar claramente la acción reductora de carbonil BSA de la composición que contiene glicosil hesperetina. Mientras que, se reveló que la maltosa y la rafinosa en sí mismas tienen una acción de reducción de la proteína carbonilo basada en el hecho de que manosa, N-acetil glucosamina, maltosa, rafinosa, maltotetraosa y glicosil trehalosa dieron proporciones de carbonil BSA de 0,51, 0,48, 0,18, 0,23, 0,71 y 0,37, respectivamente, cuando se usaron solas. Se reveló que un solo uso de maltotetraosa simplemente marcó una proporción de carbonil BSA de 0,71; sin embargo, dio una proporción de carbonil BSA de 0,13 (reducida considerablemente de 0,71) para ejercer una acción reductora de carbonil BSA distinta, cuando se usa en combinación con la composición que contiene glicosil hesperetina.

30 (7) Prueba de reducción de proteína carbonilo - 3 (una prueba de combinación de una composición que contiene glicosil hesperetina y otros ácidos orgánicos o aminoácidos)

35 Este experimento se llevó a cabo con ácidos orgánicos y aminoácidos, que se enfocaban como compuestos para usar con la composición que contiene glicosil hesperetina. Excepto por el uso de una solución que contiene el

0,05 % p/v de cualquiera de ácido láctico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido salicílico, ácido ferúlico, ácido glucurónico, glucuronolactona, ácido acético, ácido sórbico, ácido benzoico, glicina y glutamato sódico como se enumeran en la Tabla 6, en lugar de la composición que contenía glicosil naringenina o el ácido L-ascórbico 2-glucósido usada en el (4) anterior, se usó una como solución de prueba para la prueba de reducción de proteína carbonilo para examinar la acción reductora de proteína carbonilo del uso combinado del composición que contiene glicosil hesperetina y cualquiera de los ácidos orgánicos anteriores o los aminoácidos de forma similar al anterior (4). Los resultados están en la Tabla 7.

[Tabla 6]

Ácido orgánico y aminoácido	Fuente
Ácido láctico (para aditivo alimentario)	Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japón
Ácido tartárico (un reactivo de calidad especial)	Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., Tokio, Japón
Ácido cítrico (un reactivo de calidad especial)	Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japón
Ácido salicílico (un reactivo de calidad especial)	Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japón
Ácido ferúlico (con una pureza del 99 %)	Sigma-Aldrich, Japón, Tokio, Japón
Ácido glucurónico (un reactivo de calidad especial)	Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japón
Glucuronolactona (un reactivo de calidad especial)	Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japón
Ácido acético (para aditivo alimentario)	KISHIDA CHEMICAL Co., Ltd, Osaka, Japón
Ácido sórbico (un reactivo de calidad especial)	Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japón
Ácido benzoico (un reactivo de calidad especial)	Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japón
Glicina (un reactivo de calidad especial)	Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japón
Glutamato sódico (un reactivo de calidad especial)	Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japón

10

[Tabla 7]
(Efecto de combinación)

	X	Y	Composición que contiene glicosil hesperetina (0,1 % p/v) usada en combinación con cualquiera de los siguientes ácidos orgánicos o aminoácidos (0,1 % p/v)											
			A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
Relación de carbonil BSA	1	0,59	0,35	0,51	0,52	0,51	0,35	0,16	0,49	0,25	0,26	0,44	0,32	0,28

15

Nota: El símbolo "X" significa control (Sin adición), mientras que el símbolo "Y" significa una composición que contiene glicosil hesperetina (0,1 % p/v). Los símbolos "A", "B", "C", "D", "E", "F", "G", "H", "I", "J", "K" y "L" significan ácido láctico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido salicílico, ácido ferúlico, ácido glucurónico, glucuronolactona, ácido acético, ácido sórbico, ácido benzoico, glicina y glutamato sódico, respectivamente.

(Referencia: Efecto del ácido orgánico o aminoácido cuando se usa solo)

	X	Uso individual de ácido orgánico o aminoácido (0,1 % p/v)											
		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
Relación de carbonil BSA	1	0,89	0,95	0,96	1,02	0,82	1,01	1,07	1,08	1,04	0,95	0,71	0,77

20

Nota: El símbolo "X" significa control (Sin adición). Los símbolos "A", "B", "C", "D", "E", "F", "G", "H", "I", "J", "K" y "L" significan ácido láctico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido salicílico, ácido ferúlico, ácido glucurónico, glucuronolactona, ácido acético, ácido sórbico, ácido benzoico, glicina y glutamato sódico, respectivamente.

25

Como está claro a partir de los resultados en la Tabla 7, se reveló que la composición que contenía glicosil hesperetina daba una proporción de carbonil BSA de 0,59 cuando se usaba sola, pero la proporción se redujo claramente a 0,35, 0,35, 0,16, 0,49, 0,25, 0,26, 0,44, 0,32 y 0,28 cuando se usó en combinación con ácido láctico, ácido ferúlico, ácido glucurónico, glucuronolactona, ácido acético, ácido sórbico, ácido benzoico, glicina o glutamato sódico. Por lo tanto, ácido láctico, ácido ferúlico, ácido glucurónico, glucuronolactona, ácido acético, ácido sórbico, ácido benzoico, glicina y glutamato sódico se revelaron tener una acción de aumento distintivo de la acción reductora de carbonil BSA de una composición que contiene glicosil hesperetina. El uso único de cualquiera de los ácidos orgánicos y los aminoácidos empleados en este experimento dio una proporción de carbonil BSA que oscilaba entre 0,71 y 1,08 que era mayor que la del uso único de la composición que contenía glicosilhesperetina.

30

Basándose en los resultados experimentales mencionados anteriormente, el uso combinado de la composición que contiene glicosil hesperetina y uno cualquiera de ácido L-ascórbico 2-glucósido, maltosa, maltotetraosa, glicosil trehalosa, ácido láctico, ácido ferúlico, ácido glucurónico, glucuronolactona, ácido acético, ácido sórbico, ácido benzoico, glicina, glutamato sódico y una composición que contiene glicosil naringenina actúa de manera cooperativa y ejerce una acción reductora de proteína carbonilo distinta en comparación con el uso único de la composición que contiene glicosil hesperetina. Particularmente, cuando se usa en combinación con maltotetraosa, ácido láctico, ácido ferúlico, ácido glucurónico, glucuronolactona, ácido acético, ácido sórbico, ácido benzoico, glicina o glutamato sódico, la composición que contiene glicosilhesperetina ejerce una acción reductora de la proteína carbonilo significativamente alta.

Aunque no se muestran datos concretos, cualquiera de las composiciones que contienen glicosil hesperetina divulgadas en los Ejemplos 2 a 6 mencionados más tarde exhibe la misma acción que la composición que contiene glicosil hesperetina usada en este experimento.

<Experimento 2: Prueba de aplicación externa en piel humana - 1>

(1) Sumario

Dado que se reveló que la composición que contiene glicosil hesperetina tiene una acción reductora de proteína carbonilo distinta en la prueba *in vitro* llevada a cabo en el Experimento 1, se examinó si el efecto de la composición sobre la proteína carbonilo ya generada cuando se aplica prácticamente a la piel externamente.

(2) Prueba de aplicación

Once voluntarios sanos (siete hombres y cuatro mujeres), de 24 a 38 años de edad, como sujetos, respectivamente, se les permitió por sí mismos aplicar las soluciones de prueba (pH 5,7) con las composiciones que se muestran en la Tabla 8 en tres sitios en la parte superior de sus brazos opuestos a sus brazos dominantes, es decir, tres partes internas de la piel (3 cm x 3,5 cm) denominadas sitios de prueba A, B y C, respectivamente: Mediante el uso de aplicadores de algodón, las soluciones de prueba se aplicaron al sitio de prueba B de cada sujeto dos veces al día (por la mañana y por la noche después de tomar un baño) durante siete días. El día ocho después de iniciar la prueba de aplicación, los voluntarios fueron sometidos a pelado de cinta de tal manera de fijar "Corneum. Checker": AST-01, una cinta para "stripping corneum" comercializada por Asahi Biomed, Co., Ltd., Tokio, Japón, a cada sitio de prueba para recolectar proteína córnea (denominada "proteína córnea después de completar la prueba", en lo sucesivo en el presente documento). Como control, excepto por aplicar la solución de control (pH 5,7) en la Tabla 8 al sitio de aplicación C, el procedimiento anterior se llevó a cabo para recoger proteína córnea (denominada "proteína córnea control" en lo sucesivo en el presente documento). En cuanto al sitio de prueba A, inicialmente se sometió a una extracción con cinta usando la cinta para extraer la córnea para recoger la proteína córnea (denominada "proteína córnea al iniciar la prueba", en lo sucesivo).

[Tabla 8]

Ingrediente	Solución de control	Solución de prueba
Glicerina	2,2 g	2,2 g
Butilenglicol (BG)	2,0 g	2,0 g
PEG-60 Aceite de ricino hidrogenado	0,2 g	0,2 g
Polisorbato 20	0,2 g	0,2 g
Metilparabeno	0,1 g	0,1 g
Composición que contiene glicosil hesperetina obtenida en el Ejemplo 1	0,0 g	0,5 g
Ácido cítrico	c.s.	c.s.
Hidróxido potásico	c.s.	c.s.
Agua refinada	c.s.	c.s.
Total	100 g	100 g

<Método de Evaluación>

La acción reductora de la proteína carbonilo se evaluó cuantificando la proteína carbonilo como sustancia causante de la inducción del amarilleamiento de la piel en la "proteína córnea después de completar la prueba" en el sitio de prueba B aplicada con cualquiera de las soluciones de prueba y en la "proteína córnea al iniciar la prueba" en el sitio de prueba A, de manera similar al ensayo para la concentración de carbonil BSA divulgado en "(2) Ensayo para reducir la proteína carbonilo (una prueba de uso único)". Como control, la proteína carbonilo en el sitio de prueba C

aplicada con la solución de control (llamada "proteína córnea de control") se cuantificó de manera similar a la anterior.

5 Los siguientes se determinaron y se trataron estadísticamente (prueba t unilateral); para cada sujeto, la diferencia entre el nivel de proteína carbonilo en "proteína córnea después de completar la prueba" en cualquiera de los sitios de prueba aplicados con cualquiera de las soluciones de prueba o en "proteína córnea de control" aplicado con la solución de control y el nivel de proteína carbonilo en "proteína córnea al iniciar la prueba", es decir, (Nivel de proteína carbonilo en la proteína córnea después de completar la prueba o la proteína córnea de control) - (Nivel de proteína carbonilo en la proteína córnea al iniciar la prueba)], y la proporción de (Nivel de proteína carbonilo en la proteína córnea después de completar la prueba)/(Nivel de proteína carbonilo en proteína córnea al iniciar la prueba).

<Resultado>

15 Las FIGS. 4 y 5 son los resultados del nivel de proteína carbonilo (una sustancia causante del amarilleamiento de la piel) en cualquiera de los sitios de prueba aplicados con cualquiera de las soluciones de prueba en cada sujeto. Como se muestra en la FIG. 4, los sujetos a los que se les aplicó la solución de control aumentaron sus niveles de proteína carbonilo en la proteína córnea después de completar la prueba, en comparación con aquellos al iniciar la prueba, lo que significa que los niveles de proteína carbonilo en la piel de los sujetos habían aumentado durante este experimento. Por el contrario, los sujetos que recibieron alguna de las soluciones de prueba redujeron los niveles de proteína carbonilo en las proteínas córneas después de completar la prueba, en comparación con aquellos al iniciar la prueba. A partir de la FIG. 5, los sujetos a los que se les aplicó la solución de control aumentaron sus niveles de proteína carbonilo en aproximadamente 1,1 veces en comparación con los que iniciaron la prueba, mientras que los sujetos aplicados con cualquiera de las soluciones de prueba redujeron sus niveles de proteína carbonilo en comparación con aquellos al iniciar la prueba, lo que significa que los sujetos con cualquiera de las soluciones de prueba de forma distintiva, significativamente reducidos en los niveles de proteína carbonilo. Esto reveló que la aplicación de la composición que contiene glicosil hesperetina a la piel reduce significativamente la proteína carbonilo ya generada en la piel.

30 A pesar de este experimento o una prueba de aplicación con solo un corto período de tiempo de siete días, el hecho de que la glicosil hesperetina diera un efecto tan distinto, significativo muestra claramente que distintiva, significativa y eficazmente reduce la proteína carbonilo ya formada en la piel. Después de completar este experimento, ya que no se encontró ninguna anomalía en la piel, etc., en cada sujeto, debido a este experimento, puede juzgarse que glicosil hesperetina es una sustancia segura que puede aplicarse sucesiva, segura y diariamente de forma externa a los seres humanos. Cualquiera de las otras glicosil hesperetinas y hesperetinas divulgadas en la memoria descriptiva, así como las composiciones que contienen glicosil hesperetinas divulgadas en los Ejemplos 2 a 6 divulgados más tarde, tienen una acción de reducción de la proteína carbonilo ya formada en la piel, de manera similar a la composición que contiene glicosil hesperetina usada en este experimento.

40 Este experimento reveló el hecho de que la glicosil hesperetina tiene la acción de reducir la proteína carbonilo ya formada en la piel usando sujetos sanos, de 24 a 38 años de edad. De acuerdo con un resultado experimental llevado a cabo aparte del experimento, la acción reductora de la proteína carbonilo ejercida por la glicosilhesperetina se observa más claramente en los ancianos (no menos de 40 años) que en la generación joven. Es una perogrullada que la aplicación de glicosil hesperetina a los ancianos, que tienen un nivel de proteína carbonilo relativamente alto, muestra una acción reductora de la proteína carbonilo más distinta ejercida por la glicosil hesperetina, considerando que la proteína carbonilo, como un causante del amarilleamiento de la piel, se acumula gradualmente en la piel para provocar amarilleamiento de la piel con el envejecimiento como la disminución del metabolismo de la piel.

<Experimento 3: Prueba de aplicación externa en seres humanos - 2>

50 (1) Sumario

55 Siguiendo la "Prueba de aplicación externa en seres humanos - 1" del Experimento 2, se examinó el efecto de glicosilhesperetina sobre el amarilleamiento de la piel usando la piel alrededor de los ojos de los sujetos como sitio de aplicación.

(2) Prueba de aplicación

60 Dieciséis mujeres, que tenían entre 25 y 49 años de edad, sujetos sanos pero que se sentían estresadas en la vida diaria, se dividieron aleatoriamente en dos grupos (llamados grupos A y B) que consistían en ocho sujetos y se les indicó aplicar la Loción cosmética A para su uso en el Grupo A o la Loción cosmética B como control para su uso en el Grupo B, que estaban compuestas por la composición que se muestra en la Tabla 9, al sitio de prueba dos veces al día (mañana y tarde, cuando cualquier sujeto que se bañe por la noche, debe aplicarse la Loción Cosmética A o B después de tomar el baño) de tal manera que se coloquen tres mililitros de cualquiera de las lociones cosméticas por dosis (llamada "aplicación", en lo sucesivo en el presente documento) y aplicarla en el sitio prescrito todos los días durante ocho semanas en total, seguido de medir sus colores de piel como se indica a continuación antes de iniciar

la aplicación, cuatro semanas antes de la aplicación y ocho semanas después de la aplicación para examinar el efecto de las lociones cosméticas A y B sobre el amarilleamiento de la piel. Durante el experimento, a todos los sujetos se les permitió estrictamente evitar (a) estrés físico tal como rascarse el sitio de prueba, (b) bronceado excesivo, (c) ejercicio excesivo, (d) tomar cualquier cuidado de la piel que no sean las Lociones cosméticas A y B, y (e) beber en la víspera de realizar la medición del color de la piel antes de iniciar la aplicación, a las cuatro semanas de iniciada la aplicación y a las ocho semanas de iniciada la aplicación.

<Método de juicio: Medición de la diferencia de color (medición del color de la piel)>

- 10 Los colores de la piel de los sitios de prueba se midieron con "Cm-2600d de Konica Minolta", un nombre de producto de un espectrofotómetro o un medidor de diferencia de color, comercializado por Konica Minolta, Tokio, Japón. Los objetos de análisis se hicieron "valor L*" y "valor b*" en el sistema de color L*a*b*, en donde el valor L* representa el brillo y el valor b* es una indicación del grado de amarilleamiento de la piel.
- 15 Entre los ocho sujetos, dos se retiraron durante el experimento debido a sus circunstancias personales y, por lo tanto, el análisis de datos del Grupo A se realizó basándose en los resultados de medición de seis sujetos, mientras que la del Grupo B se hizo basándose en las de ocho sujetos. Las Tablas 10 y 11 muestran respectivamente el valor medido del valor L* basado en la medición de la diferencia de color (medición del color de la piel) en la piel debajo del ojo de cada sujeto y la variación (valor ΔL^*) entre cada valor medido anterior y el que se produjo al iniciar la aplicación a cada sujeto. Las Tablas 12 y 13 muestran respectivamente el valor medido del valor b* basado en la medición de la diferencia de color en la piel debajo del ojo de cada sujeto y la variación (valor ΔL^*) entre cada valor medido anterior y el que se produjo antes de iniciar la aplicación a cada sujeto.

[Tabla 9]

Ingrediente	Loción cosmética A (Solución de prueba)	Loción cosmética B (Control)
Glicerina	2,2	2,2
Butilenglicol (BG)	2,0	2,0
PEG-60 Aceite de ricino hidrogenado	0,2	0,2
Polisorbato 20	0,2	0,2
Composición que contiene glicosil hesperetina obtenida en el Ejemplo 1	0,5	0
Ácido cítrico	c.s.	c.s.
Hidróxido potásico	c.s.	c.s.
Metilparabeno	0,1	0,1
Agua purificada	c.s.	c.s.
Total	100	100

- 25 En la tabla, la unidad de los números es gramo.

[Tabla 10]

Cambio en el valor L* (la piel debajo del ojo de cada sujeto, valor medido)							
Valor L*							
Grupo con Loción cosmética A (n=6)				Grupo con Loción cosmética B (n=8)			
N.º de sujeto	X	Y	Z	N.º de sujeto	X	Y	Z
1	63,77	65,50	64,56	1	62,85	62,93	62,34
2	64,01	64,95	62,57	2	65,68	65,00	64,58
3	63,81	64,24	66,08	3	57,29	57,83	58,00
4	63,32	63,43	64,67	4	64,61	64,97	66,13
5	62,52	62,85	63,50	5	66,45	67,16	66,44
6	63,07	64,89	64,27	6	63,84	65,10	63,99
				7	63,41	63,52	63,60
				8	62,85	63,63	64,50

(continuación)

Cambio en el valor L* (la piel debajo del ojo de cada sujeto, valor medido)							
Valor L*							
Grupo con Loción cosmética A (n=6)				Grupo con Loción cosmética B (n=8)			
Valor medio Desviación estándar	63,42	64,31	64,27		63,37	63,77	63,70
	0,56	1,01	1,19		2,78	2,73	2,65
p ¹⁾	0,030 [※] 0,150				0,093 0,360		
p ²⁾					0,970	0,653	0,631.

1) Diferencia significativa al valor antes de iniciar la aplicación (prueba t pareada)
 2) Diferencia significativa al valor del grupo con Loción cosmética A (prueba t de Student)
 ※: Aumento significativo en el valor
 X: Antes de iniciar la aplicación
 Y: Cuatro semanas después de iniciar la aplicación
 z: Ocho semanas después de iniciar la aplicación

[Tabla 11]

Cambio en el valor L* (la piel debajo del ojo de cada sujeto, variación entre antes y después de iniciar la aplicación)							
Valor ΔL*							
Grupo con Loción cosmética A (n=6)				Grupo con Loción cosmética B (n=8)			
N.º de sujeto	X	Y	Z	N.º de sujeto	X	Y	Z
1	0,00	1,73	0,79	1	0,00	0,09	-0,51
2	0,00	0,95	-1,44	2	0,00	-0,68	-1,10
3	0,00	0,43	2,27	3	0,00	0,55	0,72
4	0,00	0,12	1,35	4	0,00	0,36	1,51
5	0,00	0,34	0,98	5	0,00	0,71	-0,01
6	0,00	1,82	1,20	6	0,00	1,26	0,15
				7	0,00	0,11	0,19
				8	0,00	0,78	1,65
Valor medio Desviación estándar	0,00	0,90	0,86		0,00	0,40	0,33
	0,00	0,73	1,24		0,00	0,58	0,94
p ¹⁾	0,030 [※] 0,150				0,093 0,360		
p ²⁾					0,179 0,377		

1) Diferencia significativa al valor antes de iniciar la aplicación (prueba t pareada) 2) Diferencia significativa al valor del grupo con Loción cosmética A (prueba t de Student)
 ※: Aumento significativo en el valor
 X: Antes de iniciar la aplicación
 Y: Cuatro semanas después de iniciar la aplicación
 z: Ocho semanas después de iniciar la aplicación

[Tabla 12]

Cambio en el valor L* (la piel debajo del ojo de cada sujeto, valor medido)							
Valor b*							
Grupo con Loción cosmética A (n=6)				Grupo con Loción cosmética B (n=8)			
N.º de sujeto	X	Y	Z	N.º de sujeto	X	Y	Z
1	17,38	17,65	17,05	1	16,06	15,42	14,96
2	17,71	16,98	16,77	2	16,07	15,37	15,57
3	18,18	17,06	16,69	3	16,77	17,59	17,29
4	18,87	17,99	19,07	4	17,01	16,10	16,06
5	19,03	17,92	17,66	5	17,07	16,63	16,30
6	19,27	19,42	18,96	6	17,25	16,97	18,38

(continuación)

Cambio en el valor L* (la piel debajo del ojo de cada sujeto, valor medido)							
Valor b*							
Grupo con Loción cosmética A (n=6)				Grupo con Loción cosmética B (n=8)			
N.º de sujeto	X	Y	Z	N.º de sujeto	X	Y	Z
				7	18,50	18,36	19,52
				8	19,88	19,79	19,91
Valor medio Desviación estándar	18,41	17,84	17,70		17,33	17,03	17,25
	0,77	0,88	1,07		1,28	1,52	1,85
p ¹⁾		0,076	0,049 [✱]			0,156	0,804
p ²⁾					0,095	0,270	0,603

Diferencia significativa al valor antes de iniciar la aplicación (prueba t pareada) 2) Diferencia significativa al valor del grupo con Loción cosmética A (prueba t de Student)

✱: Reducción significativa en el valor
X: Antes de iniciar la aplicación
Y: Cuatro semanas después de iniciar la aplicación
z: Ocho semanas después de iniciar la aplicación

[Tabla 13]

Cambio en el valor b* (la piel debajo del ojo de cada sujeto, variación entre antes y después de iniciar la aplicación)							
Valor Δb*							
Grupo con Loción cosmética A (n=6)				Grupo con Loción cosmética B (n=8)			
N.º de sujeto	X	Y	Z	N.º de sujeto	X	Y	Z
1	0,00	0,28	-0,32	1	0,00	-0,64	-1,11
2	0,00	-0,74	-0,94	2	0,00	-0,70	-0,51
3	0,00	-1,12	-1,48	3	0,00	0,81	0,52
4	0,00	-0,88	0,20	4	0,00	-0,91	-0,95
5	0,00	-1,11	-1,37	5	0,00	-0,44	-0,77
6	0,00	0,15	-0,31	6	0,00	-0,28	1,12
				7	0,00	-0,14	1,02
				8	0,00	-0,09	0,03
Valor medio Desviación estándar	0,00	-0,57	-0,70		0,00	-0,30	-0,08
	0,00	0,62	0,67		0,00	0,53	0,89
p ¹⁾		0,076	0,049 [✱]			0,156	0,804
p ²⁾						0,398	0,176

1) Diferencia significativa al valor antes de iniciar la aplicación (prueba t pareada) 2) Diferencia significativa al valor del grupo con Loción cosmética A (prueba t de Student)

✱: Reducción significativa en el valor
X: Antes de iniciar la aplicación
Y: Cuatro semanas después de iniciar la aplicación
z: Ocho semanas después de iniciar la aplicación

5 <Resultado>

Como se muestra en la Tabla 10, el valor medio de los valores L* de las pieles debajo de los ojos de todos los sujetos con la loción cosmética B como control fue de 63,37 antes de iniciar la aplicación y se convirtió en 63,77 a las cuatro semanas de iniciar la aplicación y a 63,70 a las ocho semanas después de iniciar la aplicación, en donde no se encontró ningún cambio sustancial en el valor L*. Mientras que, los valores medios de los valores L* de las pieles debajo de los ojos de todos los sujetos con la loción cosmética A que contiene glicosil hesperetina fue de 63,42 antes de iniciar la aplicación y se convirtió en 64,31 a las cuatro semanas de iniciar la aplicación y a 64,27 a las ocho semanas después de iniciar la aplicación, que eran claramente superiores a los de sus valores L* antes de iniciar la aplicación. También, como se muestra en la Tabla 11, las variaciones de los valores L* (valores ΔL*) de los sujetos con Loción cosmética B como control fueron 0,40 y 0,33 a las cuatro y ocho semanas después de iniciar la

5 aplicación, respectivamente, basándose en el valor estándar "0" antes de iniciar la aplicación. Por el contrario, los valores de ΔL^* de los sujetos con Loción cosmética A fueron 0,90 y 0,86 a las cuatro y ocho semanas después de iniciar la aplicación, respectivamente, basándose en el valor estándar "0" antes de iniciar la aplicación. En consecuencia, los valores ΔL^* , es decir, 0,90 y 0,86, de los sujetos con la Loción cosmética A anterior fueron tan altos como al menos dos veces más altos que los de 0,40 y 0,33, de los sujetos con la Loción cosmética B como control. Teniendo en cuenta que el valor L^* es un índice de la luminosidad de la piel, se reveló que la Loción cosmética A incorporada con la composición que contiene glicosil hesperetina tiene una acción de mejora eficaz del brillo de la piel.

10 Como se muestra en la Tabla 12, los valores b^* de las pieles debajo de todos los ojos de los sujetos con la loción cosmética B como control antes de iniciar la aplicación, a las cuatro semanas después de iniciar la aplicación y a las ocho semanas después de iniciar la aplicación fueron respectivamente 17,33, 17,03 y 17,25, indicando que no hubo cambio sustancial en los valores de b^* antes y después de iniciar la aplicación. Por el contrario, el valor medio de los valores b^* de la piel debajo de todos los ojos de los sujetos con la loción cosmética A que contiene glicosil hesperetina se redujo claramente de 18,41 antes de iniciar la aplicación a 17,84 y 17,70 a las cuatro semanas y ocho semanas después de iniciar la aplicación, respectivamente. Como se muestra en la Tabla 13, el grado de reducción fue como sigue: los valores medios de las variaciones de los valores b^* (valores Δb^*) de los sujetos con la Loción cosmética B como control fueron -0,30 y -0,08, mientras que los de los sujetos con la Loción cosmética A incorporada con la composición que contiene glicosil hesperetina fueron -0,57 y -0,70 a las cuatro semanas y ocho semanas después de iniciar la aplicación, respectivamente. Por lo tanto, las variaciones de los valores de Δb^* de los sujetos con la Loción Cosmética A aumentaron aproximadamente dos veces y aproximadamente nueve veces a las cuatro y ocho semanas después de iniciar la aplicación, respectivamente, en comparación con los de los sujetos con la Loción cosmética B como control. En consecuencia, se reveló que la loción cosmética A tiene una acción de mejora bastante distinta del amarilleamiento de la piel.

25 A partir del resultado experimental, dado que la composición para reducir el amarilleamiento de la piel de la presente divulgación reduce distintivamente el valor b^* como índice del amarilleamiento de la piel y mejora el valor L^* como índice del brillo de la piel, la composición mejora el amarilleamiento de la piel y hace que la piel sea transparente y tenga un tono saludable. La acción de mejorar el amarilleamiento de la piel ejercida por el agente dérmico externo para reducir el amarilleamiento de la piel de acuerdo con la presente divulgación tendió a observarse más claramente en sujetos con un amarilleamiento de la piel aumentado antes de iniciar la aplicación del agente dérmico externo.

35 <Experimento 4: Propiedad física de glicosil hesperetina>

Las siguientes se usaron como glicosil hesperetinas: cuatro tipos diferentes de glicosil hesperetinas pulverizadas (muestras de prueba 1 a 4) que se prepararon de manera similar mediante los métodos divulgados más tarde en los Ejemplos 2, 4, 5 y 6, excepto por no usar ningún agente reductor; y cuatro tipos diferentes de glicosil hesperetinas pulverizadas (Muestras de prueba 5 a 8) que se prepararon de manera similar mediante el método en el Ejemplo 2, excepto por usar como agente reductor el 0,1, el 0,09, el 0,07 o el 0,04 % de metabisulfito sódico. La muestra de prueba 1, que se preparó sin usar ninguno de los agentes reductores prescritos, es un producto similar a la glicosil hesperetina pulverizada obtenida en el Ejemplo 1 porque contenía α -glucosil hesperidina, hesperidina y otros ingredientes en cantidades sustancialmente iguales a las de la glicosil hesperetina pulverizada anterior.

45 (1) Contenido de furfural

Se cuantificó el contenido de furfural de las muestras de prueba 1 a 8, respectivamente, mediante los siguientes protocolos y aparatos:

50 <A. Preparación de muestras>

(a) Se colocó medio gramo de glicosil hesperetina como una muestra de prueba en un matraz Erlenmeyer con tapón de 50 ml.

55 (b) Se añadieron al matraz 5,0 ml de agua ionizada para disolver la glicosil hesperetina y 20 μ l de ciclohexanol al 0,0025 % como sustancia sustituta (un índice para determinar el rendimiento de la muestra de ensayo tras el análisis).

(c) A la mezcla resultante se añadieron 1,5 g de cloruro sódico y 3 ml de éter dietílico, seguido de mezclar la mezcla resultante a 700 rpm durante 10 min.

60 (d) Toda la mezcla resultante se transfirió a un embudo de decantación y se dejó reposar durante 10 min, seguido de la recogida de la capa de éter dietílico, deshidratando la solución resultante con sulfato sódico y concentrando el producto resultante hasta dar un volumen de aproximadamente 200 μ l en una corriente de gas nitrógeno.

(e) El concentrado se muestreó en un microlitro y se sometió a un analizador CG/EM.

65 (f) Como un control, excepto por el uso de un furfural de calidad reactivo en lugar de la glicosil hesperetina, se trató con los protocolos (a) a (e) de manera similar a la muestra de prueba.

<Condiciones de análisis CG/EM>

- Analizador CG/EM: "Clarus 680 GC" y "Clarus SQ8T GC/MS", ambos comercializados por PerkinElmer, Inc., MA, EE.UU.
- 5 • Columna: VF-WAXms, con una longitud de 30 m, un diámetro interno de 0,25 mm y un espesor de membrana de 0,25 µm, comercializado por Agilent Technologies Inc., CA, EE.UU.
- Detector: analizador de masas
- Gas vehículo: gas helio
- Velocidad lineal: 35 cm/s
- 10 • Condiciones de aumento de la temperatura: Mantener la temperatura de la columna a 40 °C durante tres minutos, aumentar la temperatura de la columna de 40 °C a 80 °C a una velocidad de 5 °C/min, aumentar la temperatura de la columna de 80 °C a 200 °C a una velocidad de 10 °C/min, mantener la temperatura de la columna a 200 °C durante siete minutos, aumentar la temperatura de la columna de 200 °C a 220 °C a una velocidad de 10 °C/min y después mantener la temperatura de la columna a 220 °C durante ocho minutos.
- 15 • Sustancia sustituta: ciclohexanol
- Sustancia de patrón interno: heneicosano
- Disolvente de extracción: éter dietílico

<B. Cuantificación de furfural en la muestra>

- 20 Se trazó una curva de calibración con los datos de furfural, como control, un reactivo de calidad especial, comercializado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japón, determinado por análisis CG/EM; basado en esto, se determinó el contenido de furfural en las muestras de prueba.

25 (2) Contenido de 4-VA

- Las muestras de prueba 1 a 8 se determinaron respectivamente para contenido de 4-VA usando los siguientes reactivos, protocolos y aparatos. La medición se realizó de acuerdo con "About benzene in soft drinks" de la Notificación N.º 0728008, del 28 de julio de 2006, emitido por el Jefe de la Primera División de Evaluación y Registro, Departamento de Seguridad Alimentaria, División de Normas y Evaluación, Oficina de Seguridad Farmacéutica y Alimentaria, Organización del Ministerio de Salud, Trabajo y Bienestar, Tokio, Japón.

<A. Reactivos y soluciones preparadas con los mismos>

- 35 (a) Cloruro sódico, un espécimen para la prueba de calidad del agua, comercializado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japón.
- (b) Preparación de la solución madre patrón de ciclohexanol

- 40 Ciclohexanol, un reactivo de primera calidad, comercializado por Katayama Chemical Industries, Co., Ltd., Osaka, Japón, se disolvió en metanol de la Farmacopea Japonesa (JP) para su uso en pruebas generales en una solución de ciclohexanol al 0,01 % p/p (denominada "solución madre patrón de ciclohexanol", en lo sucesivo en el presente documento).

45 (c) Solución de patrón interno

- Usando la solución madre patrón de ciclohexanol anterior y metanol, se prepararon una solución de ciclohexanol al 0,0004 % p/p (denominada "solución de patrón interno 1", en lo sucesivo en el presente documento) y una solución de ciclohexanol al 0,00004 % p/p (denominada "solución de patrón interno 2", en lo sucesivo en el presente documento).

50 (d) Preparación de la solución madre patrón

- 4-VA, comercializada por Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japón, se disolvió en metanol en una solución de 4-VA al 0,0005 % p/p (denominada "solución patrón A", en lo sucesivo en el presente documento) o solución de 4-VA al 0,00005 % p/p (denominada "solución patrón B", en lo sucesivo en el presente documento).

(e) Preparación de la solución madre patrón para la curva de calibración

- 60 Cinco soluciones diferentes de mezcla madre patrón para la curva de calibración, que tienen concentraciones respectivas de 4-VA de 0,05, 0,1, 0,2, 0,5 y 1,0 µg/ml, se prepararon usando las soluciones patrón A y B anteriores, la solución de patrón interno 1 anterior y metanol.

(f) Preparación de la solución patrón para la curva de calibración

- 65 Se prepararon cinco soluciones patrón diferentes para la curva de calibración como sigue: Se colocaron alícuotas de diez mililitros de agua ultrapura en cinco viales con espacio de cabeza de 20 ml, se añaden 10 µl de cualquiera de

las cinco soluciones de mezcla madre patrón diferentes anteriores para la curva de calibración y se añaden 3,0 g de cloruro sódico, seguido del sellado inmediato de los viales y la agitación de las soluciones en los viales para disolver el contenido en los mismos.

5 <B. Preparación de la muestra de prueba>

Las muestras de prueba 1 a 8 fueron respectivamente, pesadas con precisión por 0,20 g, d.s.b., se colocaron en ocho viales de espacio de cabeza de 20 ml, se les añadió agua ultrapura para dar un peso neto total de 10,0 g en cada vial y se disolvió en el mismo mediante agitación. A cada una de las soluciones acuosas resultantes se añadieron 10 µl de la solución de patrón interno 2 anterior y 3,0 g de cloruro sódico, seguido de sellar inmediatamente los viales, disolviendo el contenido de los viales agitando para obtener ocho tipos diferentes de muestras de prueba que contenían cualquiera de las muestras de prueba 1 a 8.

15 <C. Método cuantitativo para 4-VA>

(a) Condiciones de medición

<Condiciones de análisis CG/EM>

- 20 • Analizador CG/EM: "Clarus SQ8T GC/MS", comercializado por PerkinElmer, Inc., MA, EE.UU.
- Muestreador de espacio de cabeza: "TurboMatrix Trap 40", comercializado por PerkinElmer, Inc., MA, EE.UU.
- Columna: VF-WAXms, que tiene una longitud de columna de 30 m, un diámetro interno de 0,25 mm y un espesor de membrana de 0,25 µm, comercializada por Agilent Technologies Inc., CA, EE.UU.
- Detector: analizador de masas
- 25 • Gas vehículo: gas helio
- Velocidad lineal: 35 cm/s
- Temperatura de inyección de la columna: 200 °C
- Condiciones de aumento de la temperatura: Mantener la temperatura de la columna a 40 °C durante tres minutos, aumentar la temperatura de la columna de 40 °C a 80 °C a una velocidad de 5 °C/min, aumentar la temperatura de la columna de 80 °C a 200 °C a una velocidad de 10 °C/min, mantener la temperatura de la columna a 200 °C durante siete minutos, aumentar la temperatura de la columna de 200 °C a 220 °C a una velocidad de 10 °C/min y después mantener la temperatura de la columna a 220 °C durante ocho minutos.
- 30 • Temperatura del horno de viales: 60 °C
- Temperatura de la aguja: 140 °C
- 35 • Temperatura de la línea de transferencia: 205 °C
- Tiempo de calentamiento del vial: 30 min

<Método de detección>

- 40 • Método de ionización (impacto de electrones (EI))
- Monitorización de iones seleccionados (SIM)

m/z 134, 119 (4-VA)

- 45 • m/z 82, 57 (ciclohexanol, un reactivo de primera calidad, comercializado por Katayama Chemical Industries Co., Ltd, Osaka, Japón)

(b) Cuantificación de 4-VA

Basándose en la relación de las alturas de los picos de 4-VA y ciclohexanol, como un patrón interno, para las ocho muestras de prueba anteriores y las cinco soluciones de mezcla patrón para generar una curva de calibración, así como en una curva de calibración de 4-VA creada por separado, las muestras de prueba 1 a 8 se determinaron para sus concentraciones de 4-VA para calcular sus contenidos de 4-VA.

55 (3) Tono de color y grado de coloración

Las muestras de prueba 1 a 8 en formas de solución acuosa respectivamente se observaron macroscópicamente sus tonos de color y se determinaron los grados de coloración mediante los siguientes procedimientos: Las muestras de prueba 1 a 8 se prepararon respectivamente en soluciones acuosas al 1 % p/p y se colocaron 40 ml de cada una en un recipiente sellado de 50 ml y se calentaron a 100 °C durante 30 min. Después de eso, cada una de las soluciones resultantes se ajustó a 27 °C, se colocó en una cubeta con 1 cm de ancho y se midió para absorbancias de DO_{420 nm} y DO_{720 nm} a longitudes de onda de 420 nm y 720 nm usando "UV-2600", un nombre de producto de un espectrofotómetro, comercializado por Shimadzu Corporation, Kioto, Japón, seguido de la determinación de la diferencia entre las dos absorbancias (DO_{420 nm} - DO_{720 nm}) para su uso como un grado de coloración, donde cuanto menor sea la diferencia entre las dos absorbancias, menor es el grado de coloración.

65

(4) Conductividad eléctrica

Las muestras de prueba 1 a 8 se disolvieron respectivamente en agua refinada en soluciones acuosas al 1 % p/v, que después se calentaron respectivamente a 100 °C durante 30 min en un recipiente sellado, se enfriaron a 20 °C y se midieron para la conductividad eléctrica a 20 °C usando "CM-50AT", un nombre de producto de un medidor de conductancia, comercializado por DKK Toa Corporation, Tokio, Japón.

(5) Contenido de compuesto iónico

Dado que los compuestos iónicos no pueden cuantificarse fácilmente, se cuantificaron basándose en los contenidos de elementos metálicos catiónicos mediante el siguiente procedimiento como un método fácil: Cada una de las muestras de prueba 1 a 8 se pesó con precisión en aproximadamente 0,5 g en un "Tubo Falcon", un nombre de producto de un envase de 50 ml, comercializado por Japan, Becton Dickinson and Company, Tokio, Japón, se les añadió y se disolvieron con 20 ml de agua ultrapura mediante calentamiento, se añadieron 0,54 ml de solución acuosa de ácido nítrico al 60 % p/p para ensayos de precisión, se calentaron a 70 °C durante 14 horas, se enfriaron a temperatura ambiente, se ajustaron para dar un volumen total de 50 ml con agua ultrapura y se cuantificaron para elementos metálicos usando el siguiente analizador en las condiciones a continuación. Como control, se usó una muestra que consistía en agua ultrapura.

<Aparato y condiciones de medición>

- Espectrofotómetro de emisión de plasma acoplado inductivamente: "CIROS-120", comercializado por SPECTRO Analytical Instruments GmbH, Boschstrasse, Alemania
- Potencia de plasma: 1.400 W
- Gas de plasma (Ar): 13,0 l/min
- Gas auxiliar (Ar): 1,0 l/min
- Gas nebulizador (Ar): 1,0 l/min
- Funcionamiento de la bomba: 1,0 ml/min
- Método de cálculo del contenido de elementos metálicos (ppm): $\{(Valor\ medido\ de\ una\ muestra\ de\ prueba) - (Valor\ medido\ del\ Control)\} \times Tasa\ de\ dilución$

La Tabla 14 muestra los resultados de los puntos anteriores (1) a (5). Dado que las composiciones de las glicosil hesperetinas de las muestras de ensayo 1 a 8 eran sustancialmente las mismas que las divulgadas en los Ejemplos 1, 3, 4 o 5, se omitieron de la Tabla 14.

[Tabla 14]

	Muestra de prueba	Contenido de furfural (ppmm)	Contenido de 4-VA (ppmm)	Tono de color	Grado de coloración (DO _{420 nm} - DO _{720 nm})	Conductividad eléctrica (pS/cm)	Contenido de elemento metálico (ppm)			
							Ca	K	Mg	Na
Producto sin tratamiento con ningún agente reductor	1 *	308	40,2	Amarillo pálido	0,24	10,59	2,948	0,172	0,464	0,975
	2	322	46,6	Amarillo pálido	0,26	11,77	3,038	0,186	0,560	1,175
	3	343	55,1	Amarillo pálido	0,26	10,94	3,248	0,192	0,564	1,205
	4	385	63,8	Amarillo pálido	0,26	11,46	4,538	0,242	0,732	1,205
Producto tratado con agente reductor	5	8	1,2	Amarillo pálido**	0,15	2,86	0,374	0,039	0,052	0,072
	6	10	1,5	Amarillo pálido**	0,17	4,54	0,385	0,042	0,063	0,088
	7	11	1,8	Amarillo pálido**	0,20	6,19	0,400	0,043	0,063	0,087
	8	12	2,1	Amarillo pálido**	0,20	6,59	0,455	0,050	0,077	0,092

Nota: El símbolo "*" significa que es sustancialmente igual a la glicosil hesperetina convencional preparada mediante el método del Ejemplo 1. El símbolo "**" significa que tiene un tono de color amarillo más pálido que los de las muestras de prueba 1 a 4 como productos sin tratamiento con ningún agente reductor.

Como está claro a partir de la Tabla 14, los contenidos de furfural en las muestras de prueba 1 a 4 fueron todos superiores a 300 ppm, mientras que los de las muestras de prueba 5 a 8 tenían todas aproximadamente 10 ppm. Los contenidos de 4-VA en las muestras de prueba 1 a 4 fueron todos superiores a 40 ppm, mientras que los de las muestras de prueba 5 a 8 tenían todas aproximadamente 2 ppm o menos.

5 Como se muestra en la Tabla 14, las muestras de prueba 1 a 4, como productos sin tratamiento con ningún agente reductor, se observaron macroscópicamente que mostraban tonos de color amarillo pálido en formas de solución acuosa; mientras que las muestras de prueba 5 a 8, como productos tratados con agente reductor, dieron tonos de color aparentemente más pálidos en formas de solución acuosa, en comparación con los de las muestras de prueba 1 a 4. Cuando se determina con un espectrofotómetro, todas las muestras de prueba 1 a 4 en formas de solución acuosa dieron grados de coloración de 0,24 o más altos, mientras que las de las muestras de prueba 5 a 8 en formas de solución acuosa eran tan bajas como 0,20 o menores. Cuanto mayor sea la cantidad de un agente reductor usado, más bajos se vuelven los grados de coloración de las muestras de ensayo 5 a 8.

15 Como está claro a partir de la Tabla 14, las muestras de prueba 1 a 4 en formas de solución acuosa tenían conductividades eléctricas de aproximadamente 11 a aproximadamente 12 $\mu\text{S}/\text{cm}$ por encima de 10 $\mu\text{S}/\text{cm}$, mientras que las muestras de prueba 5 a 8 en formas de solución acuosa tenían conductividades eléctricas de aproximadamente 3 a aproximadamente 7 $\mu\text{S}/\text{cm}$ por debajo de 10 $\mu\text{S}/\text{cm}$.

20 Además, como está claro a partir de la Tabla 14, cualquiera de los contenidos de calcio, potasio, magnesio y sodio como elementos metálicos en las muestras de prueba 5 a 8 eran evidentemente bajos en comparación con los de las muestras de prueba 1 a 4 y estos resultados coincidían bien con los resultados de sus conductividades eléctricas medidas.

25 Estos resultados revelaron que, en comparación con productos sin tratamiento con ningún agente reductor, los productos tratados con agentes reductores redujeron significativamente el contenido de furfural y también redujeron claramente el contenido de 4-VA, el grado de coloración, la conductividad eléctrica y el contenido de elementos metálicos.

30 <Experimento 5: Relación entre los sabores misceláneos y la coloración de la glicosil hesperetina y el contenido de furfural y 4-VA de la misma>

Se llevó a cabo el siguiente experimento para examinar la relación entre los sabores misceláneos y la coloración de la glicosilhesperetina y los contenidos de furfural y 4-VA de la misma.

35 (1) Preparación de las muestras de prueba

De acuerdo con los métodos en el Ejemplo 5 y el Ejemplo 1 divulgados más tarde, se proporcionó una glicosil hesperetina como producto tratado con un agente reductor (denominada "Muestra A", en lo sucesivo en el presente documento) y otra muestra como un producto sin tratamiento con ningún agente reductor (denominada "Muestra B", en lo sucesivo en el presente documento). Por conveniencia, las Muestras A y B se mezclaron en proporciones apropiadas para obtener tres tipos de muestras de glicosil hesperetina con diferentes contenidos de furfural paso a paso (llamadas "muestras de prueba 9 a 11") como se muestra en la Tabla 16.

45 (2) Contenidos de furfural y 4-VA

Los contenidos de furfural y 4-VA en las muestras de prueba 9 a 11 se determinaron respectivamente de acuerdo con los métodos de medición que se muestran en los puntos "(1) Contenido de furfural" y "(2) Contenido de 4-VA" en el Experimento 4.

50 (3) Prueba de juicio de coloración

Nueve mujeres y hombres sanos, que consistían en dos mujeres y siete hombres, de 28 a 57 años de edad, como panelistas, se sometieron a una prueba de evaluación de la coloración usando las muestras de prueba 9 a 11 y la muestra B (denominada "Control", en lo sucesivo en el presente documento). Estas muestras de prueba 9 a 11 y el control se disolvieron respectivamente en agua destilada a temperatura ambiente en soluciones acuosas al 1 % p/p, que después se observaron macroscópicamente y se juzgaron por los panelistas como sigue: Se juzgó como "Juicio A1", cuando la solución o soluciones se evaluaron y se juzgaron por los panelistas "estando reducidas en coloración" en comparación con el Control; y se juzgó como "Juicio B1", cuando la solución o soluciones se evaluaron y se juzgaron "estando reducidas en coloración" en comparación con el Control. Los resultados están en la Tabla 15.

(4) Prueba sensorial

65 Los nueve hombres y mujeres anteriores como panelistas se sometieron a una prueba sensorial sobre los sabores misceláneos de las muestras de prueba mencionadas 9 a 11 y Control. Estas muestras de prueba 9 a 11 y el control se disolvieron respectivamente en agua destilada a temperatura ambiente en soluciones acuosas al 1 % p/p, que

después se probaron por los panelistas, seguido de permitir que los panelistas juzguen las muestras de prueba 9 a 11 como sigue: Se juzgó como "Juicio A2" cuando la solución o soluciones acuosas se evaluaron "estando mejoradas en sabores misceláneos", en comparación con el Control; y se juzgó como "Juicio B2" cuando la solución o soluciones acuosas se evaluaron "no estando mejoradas en sabores misceláneos", en comparación con el Control.

5

[Tabla 15]

Muestra de prueba	Contenido de furfural (ppmm)	Contenido de 4-VA (ppmm)	Número de panelistas			
			Prueba de coloración		Prueba sensorial	
			Juicio A1	Juicio B1	Juicio A2	Juicio B2
Muestra B (Control)	330	45,0				
9	234	39,4	4	5	4	5
10	171	29,1	9	0	8	1
11	108	10,2	9	0	9	0
Muestra A	56	2,0				

Nota: En la tabla, "Juicio A1" y "Juicio B1" significan que, en la prueba de juicio de coloración, cada panelista evaluó una muestra de prueba "estando reducida en coloración" y "no estando reducida en coloración" en comparación con el Control, respectivamente. Mientras que, "Juicio A2" y "Juicio B2" significan que, en la prueba sensorial, cada panelista evaluó una muestra de prueba "estando mejorada en sabores misceláneos" y "no estando mejorada en sabores misceláneos" en comparación con el Control, respectivamente.

10 Como está claro a partir de los resultados en la Tabla 15, los sabores misceláneos de glicosil hesperetinas mejoraron significativa y distintivamente con el contenido de furfural de aproximadamente 200 ppmm como límite y mejoraron significativa y distintivamente con el contenido de 4-VA de aproximadamente 30 ppmm como límite. Lo mismo se aplica a la coloración de glicosil hesperetinas.

15 Estos resultados revelaron que las glucosil hesperetinas con un contenido de furfural inferior a 200 ppmm y un contenido de 4-VA no superior a 30 ppmm son las que presentan una reducción significativa en los sabores misceláneos en comparación con los productos convencionales. En otras palabras, se reveló que el contenido de furfural y el contenido de 4-VA pueden hacerse como índices para distinguir con seguridad glicosil hesperetinas que están significativamente reducidas en sabores misceláneos y distintivamente reducidas en coloración. Las glicosil hesperetinas de acuerdo con la presente divulgación pueden obtenerse fácilmente usando una glicosil hesperetina con un contenido de furfural de menos de 200 ppmm y un contenido de 4-VA no superior a 30 ppmm como un índice.

25 De forma incidental, las siguientes Tablas 14 y 16 son respectivamente los resultados del Experimento 4 anterior y el resumen de la relación entre los diversos sabores de las composiciones en partículas que contienen glicosil hesperetinas y los contenidos de furfural y 4-VA de las mismas divulgados en los Ejemplos 1 a 8 descritos más tarde. En la Tabla 16, las muestras de prueba 5 a 8 como productos tratados con agentes reductores y las composiciones pulverizadas que contienen glicosil hesperetinas en los Ejemplos 2 a 8 (denominadas "muestras tratadas con agentes reductores" en conjunto en lo sucesivo en el presente documento) tenían contenidos de furfural no más altos que 191 ppmm y contenidos de 4-VA no más altos que 28,7 ppmm, lo que significa que los productos tratados con agentes reductores se redujeron significativamente en los gustos misceláneos como una característica de los productos sin tratamiento con ningún agente reductor. Por el contrario, las muestras de prueba 1 a 5, es decir, las glicosil hesperetinas particuladas, como productos sin tratamiento con ningún agente reductor (denominadas "muestras sin tratamiento con ningún agente reductor" en conjunto, en lo sucesivo en el presente documento) tenían contenidos de furfural de 308 ppmm o más y contenidos de 4-VA de 40,0 ppmm o más, y todos tenían sabores misceláneos característicos de productos sin tratamiento con ningún agente reductor.

40 Los resultados de la Tabla 16 a continuación coinciden con los del Experimento 4. Basándose en estos resultados, puede juzgarse que las glicosil hesperetinas, que tienen contenidos de furfural de menos de 200 ppmm y/o contenidos de 4-VA de menos de 30 ppmm, pueden seleccionarse usando el contenido de furfural y/o el contenido de 4-VA, como índices, para obtener las glicosil hesperetinas deseadas que se reducen significativamente en sabores misceláneos, en comparación con productos sin tratamiento con ningún agente reductor.

45

[Tabla 16]

Muestras de prueba		Contenido de furfural (ppmm)	Contenido de 4-VA (ppmm)	Sabores misceláneos
Muestras sin tratamiento con ningún agente reductor	1*	308	40,2	x
	2*	322	46,6	x
	3*	343	55,1	x
	4 *	385	63,8	x
	5 (Ejemplo 1)	310	40,0	x
Muestras tratadas con agente reductor	Ejemplo 8	191	28,7	o
	Ejemplo 7	180	20,0	o
	8 *	12	2,1	o
	Ejemplo 2	12	2,0	o
	7*	11	1,8	o
	Ejemplo 3	11	1,5	o
	Ejemplo 4	10	3,0	o
	6*	10	1,5	o
	Ejemplo 6	10	1,5	o
	Ejemplo 5	9	2,0	o
5*	8	1,2	o	

Nota: En la tabla, las muestras de prueba marcadas con el símbolo "*" se citan de la Tabla 14 en la memoria descriptiva. Aquellas con los símbolos "o" y "x" significan que están reducidas en sabores misceláneos como una característica de los productos sin tratamiento con ningún agente reductor y que tienen sustancialmente el mismo nivel de sabores misceláneos que los de los productos, respectivamente.

Los resultados de la Tabla 16 revelaron que las glucosil hesperetinas como productos tratados con agentes reductores se reducen significativamente en sabores misceláneos y se reducen claramente en coloración y olor desagradable, en comparación con glicosil hesperetinas sin tratamiento con ningún agente reductor; por lo tanto, pueden incorporarse arbitrariamente en el agente dérmico externo para reducir el amarilleamiento de la piel de la presente invención.

<Experimento 6: Prueba sensorial>

(1) Preparación de la muestra de prueba

Se realizó una prueba sensorial que se muestra en el siguiente punto (2) con ocho panelistas sanos, que consistían en dos mujeres y seis hombres, de 28 a 59 años de edad, usando ambos de la muestra de prueba 6, que dio un valor intermedio de cada uno del contenido de furfural, el grado de coloración, la conductividad eléctrica y el contenido de elementos metálicos, entre las muestras de prueba 5 a 8 como productos tratados con agentes reductores usados en el Experimento 4; y la muestra de prueba 1, que dio el valor mínimo para cada uno del contenido de furfural, el grado de coloración, la conductividad eléctrica y el contenido de elementos metálicos, entre las muestras de prueba 1 a 4 como productos tratados con agentes reductores usados en el Experimento. La muestra de prueba 1 como producto sin tratamiento con ningún agente reductor y la muestra de prueba 6 como producto tratado con agente reductor se disolvieron respectivamente a temperatura ambiente en agua RO, obtenida a través de una membrana de ósmosis inversa, para obtener soluciones acuosas al 1 % p/v para su uso como muestras no calentadas de las muestras de prueba 1 y 6, respectivamente, que después se almacenaron en recipientes sellados hasta someterse a la siguiente prueba. Mientras que, las muestras de prueba 1 y 6 sin tratamiento térmico se colocaron respectivamente en un recipiente, sellado en el mismo, se calienta en un baño de agua hirviendo durante 30 min y se enfría a temperatura ambiente para obtener las muestras de prueba 1 y 6 calentadas.

(2) Prueba sensorial

Antes de la degustación, se pidió a cada panelista que evaluara individualmente (a) la coloración y (b) el olor de alícuotas de 10 ml de las muestras de prueba 1 y 6 sin calentar y las muestras de prueba 1 y 6 calentadas, todo lo cual había sido obtenido en el punto de evaluación anterior (1) y ajustado a temperatura ambiente. En lo sucesivo, a cada panelista se le permitió hacer gárgaras con agua hervida antes de probar cada muestra de prueba y se le permitió evaluar individualmente (c) amargor (incluyendo aspereza, dureza o astringencia), (d) regusto y (e) olor al probar. El criterio de evaluación para los elementos anteriores se muestra en la Tabla 17 a continuación. A cada

miembro del panel se le permitió evaluar la muestra de prueba 6 sin calentar o calentada en términos de los puntos de evaluación anteriores (a) a (e), donde la muestra de prueba 6 sin calentar y la muestra de prueba 6 calentada se evaluaron con, como controles, la muestra de prueba 1 sin calentar y la muestra de prueba 1 calentada, respectivamente. Los resultados están respectivamente en las Tablas 18 y 19.

5

Criterio de evaluación:

[Tabla 17]

		Puntuación de evaluación (juzgada en una escala de evaluación de 5 puntos)	
Antes de la degustación	(a) Coloración	Comparación con productos sin tratamiento con ningún agente reductor	1: Distintivamente baja
			2: Ligeramente baja
			3: Comparable
			4: Ligeramente alta
Antes de la degustación	(b) Olor	Comparación con productos sin tratamiento con ningún agente reductor	5: Distintivamente alta
			1: Distintivamente débil
			2: Ligeramente débil
			3: Comparable
Al degustar	(c) Amargor	Comparación con productos sin tratamiento con ningún agente reductor	4: Ligeramente agudo
			5: Distintivamente agudo
			1: Distintivamente preferible
			2: Ligeramente preferible
Al degustar	(d) Retrogusto	Comparación con productos sin tratamiento con ningún agente reductor	3: Indeciso
			4: Bastante desfavorable
			5: Distintivamente desfavorable
			1: Distintivamente preferible
Al degustar	(e) Olor	Comparación con productos sin tratamiento con ningún agente reductor	2: Ligeramente preferible
			3: Indeciso
			4: Bastante desfavorable
			5: Distintivamente desfavorable
			1: Distintivamente débil
			2: Ligeramente débil
			3: Comparable
			4: Ligeramente agudo
			5: Distintivamente agudo

10 (3) Resultado de la prueba sensorial

[Tabla 18]

Distribución de puntuación de la muestra de prueba 6 sin calentar (un producto tratado con agente reductor)					
Puntuación	Número de panelistas				
	Antes de la degustación		Al degustar		
	(a) Coloración	(b) Olor	(c) Amargor	(d) Retrogusto	(e) Olor
1	4	3	0	3	4
2	4	5	7	4	4
3	0	0	1	1	0
4	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0

[Tabla 19]

Distribución de puntuación de la muestra de prueba 6 calentada, un producto tratado con agente reductor					
Puntuación	Número de panelistas				
	Antes de la degustación		Al degustar		
	(a) Coloración	(b) Olor	(c) Amargor	(d) Retrogusto	(e) Olor
1	6	4	3	4	5
2	2	3	4	1	1
3	0	1	1	3	2
4	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0

5 Los resultados de la evaluación en las Tablas 18 y 19 no muestran los resultados de la evaluación de (a) coloración, (b) olor, (c) amargor, (d) regusto y (e) olor para el producto sin tratamiento con ningún agente reductor (la muestra de prueba 1 calentada/no calentada) en sí misma; sin embargo, como se indica en el criterio de evaluación, los resultados de la evaluación en las Tablas 18 y 19 fueron para el producto tratado con agente reductor evaluado basándose en los del producto sin tratamiento con ningún agente reductor y, por lo tanto, los resultados de la evaluación del producto sin tratamiento con ningún agente reductor en sí mismo corresponden al punto medio de "3" para cada punto de evaluación, cuando se evalúa basándose en la escala de evaluación de 5 puntos que se muestra en el criterio de evaluación.

15 Por el contrario, como está claro a partir de los resultados de evaluación en la Tabla 18, la muestra de prueba 6 sin calentar, es decir, un producto sin calentar tratado con agente reductor dio el número de panelistas, que había juzgado como "1 punto" la puntuación más alta en la escala de evaluación de 5 puntos para los puntos de evaluación de (a) coloración, (b) olor, (c) amargor, (d) regusto y (e) olor, siendo cuatro, tres, cero, tres y cuatro (14 sujetos en total), respectivamente, entre cada uno de los ocho panelistas. Mientras que, la muestra de prueba 6 calentada que se muestra en los resultados de la evaluación en la Tabla 18, es decir, un producto calentado tratado con agente reductor tuvo el número de panelistas, que había juzgado como "1 punto" la puntuación más alta en la escala de evaluación de 5 puntos para los puntos de evaluación de (a) coloración, (b) olor, (c) amargor, (d) regusto y (e) olor, siendo seis, cuatro, tres, cuatro y cinco (22 sujetos en total), respectivamente, entre cada uno de los ocho panelistas. Estos resultados indican que el producto tratado con el agente reductor es una hesperetina glicosilada de calidad relativamente alta que está eficazmente reducida en el olor, así como el amargor y la coloración, que son características de los productos sin tratamiento con ningún agente reductor.

25 De forma similar, como está claro a partir de los resultados de evaluación en la Tabla 19, la muestra de prueba 6 sin calentar, es decir, un producto sin calentar tratado con agente reductor dio el número de panelistas, que había juzgado como "4 puntos" siendo 1 punto más alto que el nivel más bajo de 5 puntos en la escala de evaluación de 5 puntos para los puntos de evaluación de (a) coloración, (b) olor, (c) amargor, (d) regusto y (e) olor, fueron respectivamente todos cero (cero en total). Mientras que, como está claro a partir de los resultados de evaluación en la Tabla 18, la muestra de prueba 6 calentada, es decir, un producto calentado con agente reductor dio el número de panelistas, que había juzgado "4 puntos" siendo 1 punto más alto que el nivel más bajo de 5 puntos en la escala de evaluación de 5 puntos para los puntos de evaluación de (a) coloración, (b) olor, (c) amargor, (d) regusto y (e) olor, fueron respectivamente todos cero (cero en total). Estos resultados muestran que los productos tratados con agentes reductores son composiciones de calidad relativamente alta que contienen glicosil hesperetina que están eficazmente reducidas en olor, así como en sabores misceláneos y coloración, en comparación con productos sin tratamiento con ningún agente reductor.

40 Estos resultados aclararon que, en comparación con productos sin tratamiento con ningún agente reductor, los productos tratados con agentes reductores, independientemente de que se calienten o no, son claramente ventajosos en términos de todos los puntos de evaluación de (a) coloración, (b) olor, (c) amargor, (d) regusto y (e) olor, que son característicos de los productos sin tratamiento con ningún agente reductor, en donde la diferencia de calidad entre los productos calentados y no calentados se vuelve más clara cuando se calientan.

45 Cuando se somete a "(2) Prueba sensorial" como en este Experimento 6, las muestras de prueba 5, 7 y 8 como en el Experimento 4 anterior dieron sustancialmente los mismos resultados que en la muestra de prueba 6 anterior.

50 Por lo tanto, se reveló que los productos tratados con agentes reductores están significativamente reducidos en amargor y regusto, es decir, sabores misceláneos, que son característicos de los productos sin tratamiento con ningún agente reductor, y también tienen una coloración y un olor claramente reducidos en comparación con los de los productos sin tratamiento con ningún agente reductor.

Ejemplo de referencia 1

<Agente dérmico externo para reducir el amarilleamiento de la piel>

5 De manera similar al método divulgado en el Ejemplo A-2 en la patente japonesa Kokai N.º 346792/99, se usaron siete partes en masa de dextrina con un equivalente de dextrosa (DE) de 20 por una parte en masa de hesperidina y se añadió a la mezcla dextrina 20 unidades/g de una ciclomaltodextrina glucanotransferasa derivada de *Bacillus*
 10 *stearothermophilus*, comercializado por Hayashibara Co., Ltd., Okayama, Japón, se hizo reaccionar enzimáticamente durante 24 horas manteniendo el pH en 6,0 y la temperatura en 75 °C para obtener una composición de jarabe que contenía glicosil hesperetina, que después se le añadió "GLUCOZYME", un nombre de
 15 producto de un espécimen de glucoamilasa, comercializado por Nagase ChemteX Corporation, Osaka, Japón, en una cantidad de 100 unidades por gramo de los sólidos, d.s.b., de la composición del jarabe para efectuar una reacción enzimática a 50 °C durante cinco horas. La composición resultante que contenía α -glicosil hesperetina se concentró al vacío y se pulverizó para obtener una composición particulada que contenía glicosil hesperetina con un
 20 rendimiento de aproximadamente el 60 % de la masa, d.s.b., del material hesperidina. El producto contenía un 77,0 % de α -glucosil hesperidina, un 15,5 % de hesperidina y un 7,5 % de otros ingredientes.

El producto tenía un contenido de furfural de 310 ppm, un contenido de 4-VA de 40,0 ppm, un grado de coloración de 0,24 y una conductividad eléctrica de aproximadamente 11 μ S/cm. También, el producto contenía calcio, potasio, magnesio y sodio en cantidades respectivas de aproximadamente 3 ppm, aproximadamente
 25 0,2 ppm, aproximadamente 0,4 ppm y aproximadamente 1 ppm, en una base en sólido seco.

Quando se aplica externamente a seres humanos intactos o después de transformarse en cosméticos, casi fármacos o productos farmacéuticos, el producto reduce eficazmente el amarilleamiento de la piel ya generado, cuya
 30 reducción se ha reconocido ser difícil. El producto se usa ventajosamente de manera segura y fácil durante un período de tiempo relativamente largo.

Ejemplo de referencia 2

30 <Agente dérmico externo para reducir el amarilleamiento de la piel>

Cuatro partes en masa de una solución acuosa de hidróxido sódico 1 N se calentaron a 80 °C y, mientras se mantiene la temperatura, se añade una parte en masa de hesperidina y siete partes en masa de dextrina (DE 20), seguido de agitación de la mezcla para disolver el contenido en ella durante 30 min, ajustando la solución resultante a pH 9,0, añadiendo 30 unidades/g de dextrina de una CGTasa, derivada de *Geobacillus stearothermophilus* Cepa
 35 Tc-91 (FERM BP-11273 depositada el 30 de julio de 1973) depositado para el Organismo Internacional de Patentes Depositario en el Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industriales Avanzadas, Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305-8566 Japón, y haciendo reaccionar enzimáticamente la mezcla a pH 6,9 y 50 °C durante 18 horas para convertir aproximadamente el 70 % de la hesperidina en α -glicosil hesperidina. En lo
 40 sucesivo, a la solución de reacción enzimática resultante se le añadió piro-sulfito sódico como un agente reductor en una cantidad del 0,05 % en masa a la solución, se calienta a 100 °C durante 30 min para inactivar las enzimas restantes, se añaden 100 unidades/g de sólidos, d.s.b., de la solución de reacción enzimática de "GLUCOZYME", un nombre de producto de un espécimen de glucoamilasa, comercializado por Nagase ChemteX Corporation, Osaka, Japón, y se hizo reaccionar enzimáticamente durante cinco horas manteniendo el pH en 5,0 y la temperatura en
 45 55 °C para formar α -glucosil hesperidina. La solución de reacción enzimática resultante se calentó para inactivar la enzima restante y se filtró, seguido del suministro del filtrado resultante a una columna empaquetada con "DIAION HP-10", un nombre de producto de un adsorbente sintético poroso, comercializado por Mitsubishi Chemical Corporation, Tokio, Japón, a una velocidad espacial (SV) de 2. Como resultado, la α -glucosil hesperidina y la hesperidina intacta en la solución se adsorbieron en el adsorbente sintético poroso, pero la D-glucosa restante, las sales y similares se eluyeron de la columna sin adsorción. En lo sucesivo, la columna se suministró con agua refinada para el lavado y se suministró adicionalmente con una solución acuosa de etanol mientras se aumentaba gradualmente la concentración de etanol para recolectar fracciones que contenían α -glucosil hesperidina, seguido de la combinación de las fracciones, concentrando las fracciones agrupadas al vacío y pulverizando el concentrado para obtener una composición particulada amarillo pálido que contiene glicosil hesperetina con un rendimiento de
 50 aproximadamente el 70 % de la masa, d.s.b., del material hesperidina. La composición de partículas resultante que contenía glicosil hesperetina contenía un 80,0 % de α -glucosil hesperidina, un 12,3 % de hesperidina y un 7,7 % de otros ingredientes.

El producto tenía un contenido de furfural de 12 ppm, un contenido de 4-VA de 2 ppm, un grado de coloración de 0,19 y una conductividad eléctrica de aproximadamente 6 μ S/cm. También, el producto contenía calcio, potasio, magnesio y sodio en cantidades respectivas de aproximadamente 0,4 ppm, aproximadamente 0,05 ppm, aproximadamente 0,1 ppm y aproximadamente 0,1 ppm, en una base en sólido seco.

En comparación con la composición en partículas que contiene glicosil hesperetina obtenida en el Ejemplo 1 sin usar ningún agente reductor prescrito, el producto anterior tiene rasgos característicos ventajosos en el sentido de que se reduce significativamente en sabores misceláneos y coloraciones y se reduce claramente en olor, en donde el olor y
 65

los sabores misceláneos/coloración se reducen eficazmente incluso cuando se calientan durante 30 min en condiciones de temperatura relativamente alta de 90 a 100 °C.

5 Cuando se usa externamente solo o después de ser procesado en cosméticos, casi fármacos o productos farmacéuticos, el producto reduce eficazmente el amarilleamiento de la piel ya generado que se ha considerado difícil de lograr. El producto tiene el mérito ventajoso de que puede usarse de forma segura y fácil durante un período de tiempo relativamente largo. Incluso cuando se mantiene o se almacena a una temperatura dentro del intervalo de temperatura anterior o una temperatura más baja del mismo durante varias decenas de minutos a varios meses, el producto ejerce un efecto ventajoso y función de ser efectivamente reducido en los diversos gustos y coloración, así como el olor, que le son inherentes.

Ejemplo de referencia 3

15 <Agente dérmico externo para reducir el amarilleamiento de la piel>

15 Cuatro partes en masa de una solución acuosa de hidróxido sódico 1 N se calentaron a 80 °C y, mientras se mantiene la temperatura, se añadieron sucesivamente con una parte en masa de hesperidina, cuatro partes en masa de dextrina (DE 10) y 0,06 partes en masa de sulfito sódico, seguido de disolver el contenido en la mezcla mientras se agita durante 30 min, neutralizando la solución resultante con solución de ácido clorhídrico 0,01 N, añadiendo rápidamente 20 unidades/g de dextrina de una CGTasa derivada de *Geobacillus stearothermophilus* Cepa Tc-91 (FERM BP-11273) depositada para el Depositario del Organismo Internacional de Patentes en el Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industriales Avanzadas, Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305-8566 Japón, y manteniendo la mezcla a pH 6,0 y 75 °C durante 24 horas en condiciones de agitación para efectuar una reacción enzimática. La solución de reacción enzimática resultante se muestreó y se analizó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), revelando que aproximadamente el 69 % de la hesperidina se convirtió en α -glicosil hesperidina. A la solución de reacción enzimática obtenida se le añadió un 0,03 % en masa de pirosulfito sódico, calentado a 90 °C durante 120 min, se añadió "GLUCOZYME", un nombre de producto de un espécimen de glucoamilasa, comercializado por Nagase ChemteX Corporation, Osaka, Japón, en una cantidad de 50 unidades por gramo de α -glicosil hesperidina, d.s.b., como un producto intermedio y reaccionó durante 10 horas manteniendo el pH en 5,0 y la temperatura en 55 °C para formar α -glucosil hesperidina. La solución de reacción enzimática resultante se calentó para inactivar las enzimas restantes y se filtró, seguido del suministro del filtrado resultante a una columna empaquetada con "DIAION HP-10", un nombre de producto de un adsorbente sintético poroso, comercializado por Mitsubishi Chemical Corporation, Tokio, Japón, en SV 2. Como resultado, la α -glucosil hesperidina y la hesperidina intacta en la solución se adsorbieron en el adsorbente sintético poroso, pero los sacáridos restantes, las sales y similares se eluyeron de la columna sin adsorción. En lo sucesivo, la columna se suministró con agua refinada para el lavado y se suministró adicionalmente con una solución acuosa de etanol mientras se aumentaba gradualmente la concentración de etanol para recolectar fracciones que contenían α -glucosil hesperidina, seguido de la combinación de las fracciones, concentrando las fracciones agrupadas al vacío y pulverizando el concentrado para obtener una composición particulada amarillo pálido que contiene glicosil hesperetina con un rendimiento de aproximadamente el 68 % de la masa, d.s.b., del material hesperidina. La composición en partículas que contiene glicosil hesperetina, obtenida en este ejemplo, contenía un 79,0 % de α -glucosil hesperidina, un 14,0 % de hesperidina y un 7,0 % de otros ingredientes.

45 El producto tenía un contenido de furfural de 11 ppm, un contenido de 4-VA de 1,5 ppm, un grado de coloración de 0,14 y una conductividad eléctrica de aproximadamente 4 μ S/cm. También, el producto contenía calcio, potasio, magnesio y sodio en cantidades respectivas de aproximadamente 0,4 ppm, aproximadamente 0,06 ppm, aproximadamente 0,1 ppm y aproximadamente 0,1 ppm, en una base en sólido seco.

50 En comparación con la composición en partículas que contiene glicosil hesperetina obtenida en el Ejemplo 1 sin usar ningún agente reductor prescrito, el producto anterior tiene ventajosamente rasgos característicos: El producto está significativamente reducido en sabores misceláneos y coloración y distintivamente reducido en olor y también se reduce eficazmente en olor así como sabores misceláneos/coloraciones incluso cuando se calienta durante 30 minutos en condiciones de temperatura relativamente alta de 90 a 100 °C.

55 Cuando se usa externamente solo o después de ser procesado en cosméticos, casi fármacos o productos farmacéuticos, el producto reduce eficazmente el amarilleamiento de la piel ya generado que se ha considerado difícil de lograr. El producto tiene el mérito ventajoso de que puede usarse de forma segura y fácil durante un período de tiempo relativamente largo. Incluso cuando se mantiene o se almacena a una temperatura dentro del intervalo de temperatura anterior o una temperatura más baja del mismo durante varias decenas de minutos a varios meses, el producto ejerce un efecto ventajoso y función de ser efectivamente reducido en los diversos gustos y coloración, así como el olor, que le son inherentes.

Ejemplo de referencia 4

65 <Agente dérmico externo para reducir el amarilleamiento de la piel>

Cuatro partes en masa de una solución acuosa de hidróxido sódico 1 N se calentaron a 80 °C y, mientras se mantiene la temperatura, se añadieron sucesivamente con 0,1 partes en masa de sulfito sódico como un agente reductor, una parte en masa de hesperidina y cuatro partes en masa de dextrina (DE 10), seguido de disolución del contenido en la mezcla mientras se agita durante 30 min, neutralizando la solución resultante con una solución de ácido clorhídrico 0,01 N, añadiendo rápidamente 20 unidades/g de dextrina, d.s.b., de una CGTasa, derivada de *Geobacillus stearothermophilus* Cepa Tc-91 (FERM BP-11273) depositado para el Organismo Internacional de Patentes Depositario en el Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industriales Avanzadas, Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305-8566 Japón, y manteniendo la mezcla a pH 6,0 y 75 °C durante 24 horas en condiciones de agitación para efectuar una reacción enzimática. Por lo tanto, aproximadamente el 72 % de la hesperidina se convirtió en α -glicosil hesperidina. La solución de reacción enzimática obtenida de esta manera se calentó para inactivar la enzima restante y se filtró, seguido del suministro del filtrado resultante a una columna empaquetada con "DIAION HP-20", un nombre de producto de un adsorbente sintético poroso, comercializado por Mitsubishi Chemical Corporation, Tokio, Japón, en SV 2. Como resultado, la α -glicosil hesperidina y la hesperidina intacta en la solución se adsorbieron en el adsorbente sintético poroso, pero la D-glucosa restante, las sales y similares se eluyeron de la columna sin adsorción. En lo sucesivo, la columna se suministró con agua refinada para el lavado y se suministró adicionalmente con una solución acuosa de etanol mientras se aumentaba gradualmente la concentración de etanol para recolectar fracciones que contenían α -glicosil hesperidina, seguido de la combinación de las fracciones, concentrando las fracciones agrupadas al vacío y pulverizando el concentrado para obtener una composición particulada amarillo pálido que contiene α -glicosil hesperidina con un rendimiento de aproximadamente el 71 % de la masa, d.s.b., del material hesperidina. La composición particulada que contenía glicosil hesperetina obtenida en este ejemplo contenía un 76,0 % de α -glucosil hesperidina, un 18,5 % de hesperidina y un 5,5 % de otros ingredientes.

El producto tenía un contenido de furfural de 10 ppm, un contenido de 4-VA de 3,0 ppm, un grado de coloración de 0,17 y una conductividad eléctrica de aproximadamente 4 μ S/cm. También, el producto contenía calcio, potasio, magnesio y sodio en cantidades respectivas de aproximadamente 0,3 ppm, aproximadamente 0,04 ppm, aproximadamente 0,1 ppm y aproximadamente 0,05 ppm, en una base en sólido seco.

En comparación con la composición en partículas que contiene glicosil hesperetina obtenida en el Ejemplo 1 sin usar ningún agente reductor prescrito, el producto anterior tiene ventajosamente rasgos característicos: El producto está significativamente reducido en sabores misceláneos y coloración y distintivamente reducido en olor y también se reduce eficazmente en olor así como sabores misceláneos y coloraciones incluso cuando se calienta durante 30 minutos en condiciones de temperatura relativamente alta de 90 a 100 °C.

Cuando se usa externamente solo o después de ser procesado en cosméticos, casi fármacos o productos farmacéuticos, el producto reduce eficazmente el amarilleamiento de la piel ya generado que se ha considerado difícil de lograr. El producto tiene el mérito ventajoso de que puede usarse de forma segura y fácil durante un período de tiempo relativamente largo. Incluso cuando se mantiene o se almacena a una temperatura dentro del intervalo de temperatura anterior o una temperatura más baja del mismo durante varias decenas de minutos a varios meses, el producto ejerce un efecto ventajoso y función de ser efectivamente reducido en los diversos gustos y coloración, así como el olor, que le son inherentes.

Ejemplo de referencia 5

<Agente dérmico externo para reducir el amarilleamiento de la piel>

Una parte en masa de hesperidina, 10 partes en masa de dextrina (DE 8) y 0,05 partes en masa de piro-sulfito sódico como un agente reductor se añadieron a 500 partes en masa de agua. La mezcla se calentó a pH 9,5 y 90 °C durante 70 min, se añadieron 30 unidades/g de dextrina, d.s.b., de una CGTasa, derivada de *Geobacillus stearothermophilus* Cepa Tc-91 (FERM BP-11273) depositado para el Organismo Internacional de Patentes Depositario en el Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industriales Avanzadas, Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305-8566 Japón, se mantuvo durante 40 horas manteniendo el pH a 8,2 y la temperatura a 65 °C en condiciones de agitación, se añadieron 0,05 partes en masa de piro-sulfito sódico como un agente reductor a la solución de reacción enzimática justo antes de que se complete la reacción enzimática, se calentó a 85 °C para inactivar la enzima restante, se añaden 100 unidades/g de sólidos, d.s.b., de la solución de "GLUCOZYME", un nombre de producto de un espécimen de glucoamilasa, comercializado por Nagase ChemteX Corporation, Osaka, Japón, y se hizo reaccionar durante cinco horas manteniendo el pH en 5,0 y la temperatura en 55 °C para formar α -glucosil hesperidina. La solución de reacción enzimática obtenida de esta manera se calentó para inactivar las enzimas restantes. A la solución de reacción enzimática resultante se le añadieron 0,5 partes en masa de "HESPERIDINASA SOLUBLE <Tanabe> N.º 2", un nombre de producto de una muestra de hesperidinasa, comercializado por Mitsubishi Tanabe Pharma Corporation, Osaka, Japón, se ajustó a pH 4 y se hizo reaccionar enzimáticamente a 55 °C durante 24 horas. A la solución de reacción enzimática resultante se le añadieron 0,01 partes en masa de piro-sulfito sódico, se calentó para inactivar la enzima restante y se filtró, seguido del suministro del filtrado a una columna empaquetada con "DIAION HP-10", un nombre de producto de un adsorbente sintético poroso, comercializado por Mitsubishi Chemical Corporation, Tokio, Japón, en SV 2. Como resultado, la α -glucosil hesperidina, la 7-O- β -glucosil hesperetina y la hesperidina intacta en la solución se adsorbieron en el

adsorbente sintético poroso, pero la D-glucosa restante, las sales y similares se eluyeron de la columna sin adsorción. En lo sucesivo, la columna se suministró con agua refinada para el lavado y se suministró adicionalmente con una solución acuosa de etanol mientras se aumentaba gradualmente la concentración de etanol para recolectar fracciones que contenían α -glucosil hesperidina, seguido de la combinación de las fracciones, concentrando las fracciones agrupadas al vacío y pulverizando el concentrado para obtener una composición particulada amarillo pálido que contiene glicosil hesperetina con un rendimiento de aproximadamente el 70 % de la masa, d.s.b., del material hesperidina. La composición particulada que contenía glicosil hesperetina obtenida en este ejemplo contenía un 81,9 % de α -glucosil hesperidina, un 0,5 % de hesperidina, un 8,9 % de 7-O- β -glucosil hesperetina y un 8,7 % de otros ingredientes.

El producto tenía un contenido de furfural de 9 ppm, un contenido de 4-VA de 2,0 ppm, un grado de coloración de 0,16 y una conductividad eléctrica de aproximadamente 4 μ S/cm. También, el producto contenía calcio, potasio, magnesio y sodio en cantidades respectivas de aproximadamente 0,3 ppm, aproximadamente 0,03 ppm, aproximadamente 0,05 ppm y aproximadamente 0,05 ppm, en una base en sólido seco.

En comparación con la composición en partículas que contiene glicosil hesperetina obtenida en el Ejemplo 1 sin usar ningún agente reductor prescrito, el producto anterior tiene ventajosamente rasgos característicos: El producto está significativamente reducido en sabores misceláneos y coloración y distintivamente reducido en olor y también se reduce eficazmente en olor así como sabores misceláneos y coloraciones incluso cuando se calienta durante 30 minutos en condiciones de temperatura relativamente alta de 90 a 100 °C.

Cuando se usa externamente solo o después de ser procesado en cosméticos, casi fármacos o productos farmacéuticos, el producto reduce eficazmente el amarilleamiento de la piel ya generado que se ha considerado difícil de lograr. El producto tiene el mérito ventajoso de que puede usarse de forma segura y fácil durante un período de tiempo relativamente largo. Incluso cuando se mantiene o se almacena a una temperatura dentro del intervalo de temperatura anterior o una temperatura más baja del mismo durante varias decenas de minutos a varios meses, el producto ejerce un efecto ventajoso y función de ser efectivamente reducido en los diversos gustos y coloración, así como el olor, que le son inherentes.

30 Ejemplo de referencia 6

<Agente dérmico externo para reducir el amarilleamiento de la piel>

Cincuenta partes en masa de hesperidina y una parte en masa de hiposulfito sódico se disolvieron calentando a 80 °C en 0,9 partes en masa de solución acuosa de hidróxido sódico 0,25 N. Se añadieron ciento cincuenta partes en masa de una dextrina con DE 8 y se disolvieron en la solución anterior, seguido de ajustar la solución resultante a pH 9,0, añadiendo a la solución 15 unidades por una parte en masa de dextrina de una CGTasa, derivada de *Geobacillus stearothermophilus* Cepa Tc-91 (FERM BP-11273) depositado para el Organismo Internacional de Patentes Depositario en el Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industriales Avanzadas, Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305-8566 Japón, ajustando la mezcla a pH 8,3 mientras se calienta a 60 °C y sometiendo la mezcla resultante a una reacción enzimática durante seis horas. En lo sucesivo, la mezcla de reacción enzimática se ajustó a pH 7,0, se calentó a 68 °C y después se hizo reaccionar enzimáticamente durante 40 horas. Después de completar la reacción enzimática, la mezcla de reacción enzimática resultante se calentó para inactivar la enzima restante y se filtró para obtener una solución de reacción enzimática. Un análisis HPLC de la solución de reacción enzimática reveló que el 72 % de la hesperidina en la solución antes de la reacción enzimática se convirtió en α -glucosil hesperidina y el 28 % restante de hesperidina permaneció intacto. La solución de reacción enzimática se mezcló con dos partes en masa de "Hesperidinasa soluble <TANABE> 2", un nombre de producto de un espécimen de hesperidinasa como α -L-ramnosidasa, comercializado por Tanabe Seiyaku Co., Ltd., Tokio, Japón, se ajustó a pH 4, reaccionó enzimáticamente a 55 °C durante 24 horas, adicionado con una parte en masa de "GLUCOZYME", un nombre de producto de un espécimen de glucoamilasa, comercializado por Nagase ChemteX Corporation, Osaka, Japón, y después reaccionó enzimáticamente a 55 °C durante 24 horas. Después de completar la reacción enzimática, la solución de reacción enzimática resultante se calentó para inactivar las enzimas restantes, se suministró a una columna empaquetada con "AMBERLITE XAD-7", un nombre de producto de una resina adsorbente porosa con una polaridad media, comercializadas por Rohm & Hass Company, Philadelphia, EE.UU., seguido de lavado de la columna con agua y elución de los ingredientes adsorbidos en la resina con solución acuosa de etanol al 80 % v/v. Después de eliminar el etanol en el eluato, el eluato resultante se liofilizó para obtener una composición en partículas que contenía glicosil hesperetina con un 82,0 % de α -glucosil hesperidina, un 8,0 % de 7-O- β -glucosil hesperetina, un 1,0 % de hesperidina y un 9,0 % de otros ingredientes.

El producto tenía un contenido de furfural de 10 ppm, un contenido de 4-VA de 1,5 ppm, un grado de coloración de 0,15 y una conductividad eléctrica de menos de 10 μ S/cm. También, el producto contenía calcio, potasio, magnesio y sodio en cantidades respectivas de aproximadamente 0,4 ppm, aproximadamente 0,04 ppm, aproximadamente 0,1 ppm y aproximadamente 0,2 ppm, en una base en sólido seco.

En comparación con la composición en partículas que contiene glicosil hesperetina obtenida en el Ejemplo 1 sin usar ningún agente reductor prescrito, el producto anterior tiene ventajosamente rasgos característicos: Está

significativamente reducido en sabores misceláneos y coloración y distintivamente reducido en olor y también se reduce eficazmente en olor así como sabores misceláneos y coloraciones incluso cuando se calienta durante 30 minutos en condiciones de temperatura relativamente alta de 90 a 100 °C.

- 5 Cuando se usa externamente solo o después de ser procesado en cosméticos, casi fármacos o productos farmacéuticos, el producto reduce eficazmente el amarilleamiento de la piel ya generado que se ha considerado difícil de lograr. El producto tiene el mérito ventajoso de que puede usarse de forma segura y fácil durante un período de tiempo relativamente largo. Incluso cuando se mantiene o se almacena a una temperatura dentro del intervalo de temperatura anterior o una temperatura más baja del mismo durante varias decenas de minutos a varios meses, el producto ejerce un efecto ventajoso y función de ser efectivamente reducido en los diversos gustos y coloración, así como el olor, que le son inherentes.

Ejemplo de referencia 7

- 15 <Agente dérmico externo para reducir el amarilleamiento de la piel>

Se obtuvo una composición particulada de color amarillo pálido que contenía glicosil hesperetina de forma similar a la del Ejemplo 1, excepto por añadir un 0,001 % de piro-sulfito potásico como un agente reductor a una solución de reacción enzimática, en un rendimiento de aproximadamente el 69 % a la masa, d.s.b., del material hesperidina. La composición particulada que contenía glicosil hesperetina obtenida en este ejemplo contenía un 79,5 % de α -glicosil hesperidina, un 13,8 % de hesperidina y un 6,7 % de otros ingredientes.

El producto tenía un contenido de furfural de 180 ppmm, un contenido de 4-VA de 20,0 ppmm, un grado de coloración de 0,23 y una conductividad eléctrica de menos de 10 μ S/cm. También, el producto contenía calcio, potasio, magnesio y sodio en cantidades respectivas de aproximadamente 0,5 ppm, aproximadamente 0,08 ppm, aproximadamente 0,1 ppm y aproximadamente 0,3 ppm, en una base en sólido seco.

Aunque el producto es bastante inferior a las composiciones en partículas que contienen glicosil hesperetina obtenidas en los Ejemplos 2 a 5, el producto está, en comparación con productos sin tratamiento con ningún agente reductor, distintivamente reducido en coloración y olor y significativamente reducido en sabores misceláneos; y también está eficazmente reducido en coloración y olor así como sabores misceláneos incluso después de calentarlo durante 30 min en condiciones de temperatura relativamente alta de 90 a 100 °C, en comparación con productos sin tratamiento con ningún agente reductor.

Cuando se usa externamente solo o después de ser procesado en cosméticos, casi fármacos o productos farmacéuticos, el producto reduce eficazmente el amarilleamiento de la piel ya generado que se ha considerado difícil de lograr. El producto tiene el mérito ventajoso de que puede usarse de forma segura y fácil durante un período de tiempo relativamente largo. Incluso cuando se mantiene o se almacena a una temperatura dentro del intervalo de temperatura anterior o una temperatura más baja del mismo durante varias decenas de minutos a varios meses, el producto ejerce un efecto ventajoso y función de ser efectivamente reducido en los diversos gustos y coloración, así como el olor, que le son inherentes.

Ejemplo de referencia 8

- 45 <Agente dérmico externo para reducir el amarilleamiento de la piel>

Se obtuvo una composición particulada de color amarillo pálido que contenía glicosil hesperetina de forma similar a la del Ejemplo 7, excepto por la sustitución del piro-sulfito potásico por hidrogenosulfito sódico, en un rendimiento de aproximadamente el 65 % a la masa, d.s.b., del material hesperidina. La composición particulada obtenida en este ejemplo contenía un 77,2 % de α -glicosil hesperidina, un 16,5 % de hesperidina y un 6,3 % de otros ingredientes.

El producto tenía un contenido de furfural de 191 ppmm, un contenido de 4-VA de 28,7 ppmm, un grado de coloración de 0,23 y una conductividad eléctrica de menos de 10 μ S/cm. También, el producto contenía calcio, potasio, magnesio y sodio en cantidades respectivas de aproximadamente 0,5 ppm, aproximadamente 0,07 ppm, aproximadamente 0,09 ppm y aproximadamente 0,4 ppm, en una base en sólido seco.

Aunque el producto es bastante inferior a las composiciones en partículas que contienen glicosil hesperetina obtenidas en los Ejemplos 2 a 6, el producto está, en comparación con productos sin tratamiento con ningún agente reductor, distintivamente reducido en coloración y olor y significativamente reducido en sabores misceláneos; y también está eficazmente reducido en coloración y olor así como sabores misceláneos incluso después de calentarlo durante 30 min en condiciones de temperatura relativamente alta de 90 a 100 °C, en comparación con productos sin tratamiento con ningún agente reductor.

Cuando se usa externamente solo o después de ser procesado en cosméticos, casi fármacos o productos farmacéuticos, el producto reduce eficazmente el amarilleamiento de la piel ya generado que se ha considerado difícil de lograr. El producto tiene el mérito ventajoso de que puede usarse de forma segura y fácil durante un

período de tiempo relativamente largo. Incluso cuando se mantiene o se almacena a una temperatura dentro del intervalo de temperatura anterior o una temperatura más baja del mismo durante varias decenas de minutos a varios meses, el producto ejerce un efecto ventajoso y función de ser efectivamente reducido en los diversos gustos y coloración, así como el olor, que le son inherentes.

5

Ejemplo de referencia 9

<Agente dérmico externo para reducir el amarilleamiento de la piel>

10 Una parte en masa de cualquiera de los siete tipos de agentes dérmicos externos particulados para reducir el amarilleamiento de la piel obtenidos en los Ejemplos 2 a 8, 0,001 partes en masa de antocianina, 30 partes en masa de agua refinada y una cantidad adecuada de un agente controlador de pH, y la mezcla se agitó, se ajustó a pH 7,0, microfiltrado e inyectado antisépticamente en recipientes esterilizados para obtener siete tipos de agentes dérmicos externos para reducir el amarilleamiento de la piel en forma líquida de acuerdo con la presente divulgación.

15

Los productos sustancialmente libres de coloración y olor se aplican externamente a seres humanos diaria, sucesiva y fácilmente sin sensación desagradable. Cuando se aplica externamente a la piel diariamente a una dosis de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,05 ml/cm², los productos ejercen efectivamente una acción de reducción del amarilleamiento de la piel ya generado.

20

Ejemplo de referencia 10

<Agente dérmico externo para reducir el amarilleamiento de la piel>

25 A 50 partes en masa de agua refinada se añadieron 0,01 partes en masa de cualquiera de las composiciones pulverizadas que contenían glicosil hesperetina obtenidas en los Ejemplos 2 a 8 y 0,0001 partes en masa de hesperetina y la mezcla se mezcló hasta homogeneidad, se esterilizó por calentamiento y se inyectó antisépticamente en recipientes esterilizados para obtener siete tipos de agentes dérmicos externos para reducir el amarilleamiento de la piel.

30

Todos los productos están sustancialmente libres de coloración y olor y pueden usarse diaria, sucesiva y fácilmente sin sensación desfavorable. Cuando se aplica externamente de forma diaria a la piel a una dosis de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,05 ml/cm², los productos ejercen efectivamente una acción de reducción del amarilleamiento de la piel ya generado.

35

Ejemplo de referencia 11

<Agente dérmico externo para reducir el amarilleamiento de la piel>

40 A una parte en masa de la composición pulverizada que contiene glicosil hesperetina, que se había preparado en el Ejemplo 1 sin usar ninguno de los agentes reductores prescritos, se añadieron uno o más agentes reductores seleccionados de sulfito sódico, hiposulfito sódico, piro-sulfito potásico, piro-sulfito sódico y dióxido de azufre en una cantidad total de 0,0005 partes en masa. La mezcla resultante se disolvió homogéneamente en 50 partes en masa de agua refinada, se microfiltró y se inyectó antisépticamente en recipientes esterilizados para obtener agentes dérmicos externos para reducir el amarilleamiento de la piel en una forma líquida.

45

Estos productos son ventajosos en estabilidad de almacenamiento y termoestabilidad sin ningún aumento o cambio sustancial en sabores misceláneos/coloración y olor, que son todos derivados de los mismos, incluso después de almacenarse durante varias decenas de minutos a varios meses a temperatura ambiente o en condiciones de temperatura relativamente alta.

50

Los productos están sustancialmente libres de coloración y olor y se aplican externamente a seres humanos diaria, sucesiva y fácilmente sin sensación desfavorable. Cuando se aplica a la piel a una dosis de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,05 ml/cm², los productos ejercen efectivamente una acción de reducción del amarilleamiento de la piel ya generado.

55

Ejemplo 12

<Agente dérmico externo para reducir el amarilleamiento de la piel>

60

Se produjeron ocho tipos de agentes dérmicos externos para reducir el amarilleamiento de la piel en un tipo de aerosol mezclando los siguientes ingredientes, que cumplen los criterios de las Normas japonesas de ingredientes cosméticos o el Codex japonés de ingredientes cosméticos (JCIC), de manera habitual de acuerdo con la siguiente proporción de composición:

65

<Proporción de composición>

• Una composición pulverizada que contiene glicosil hesperetina obtenida en cualquiera de los Ejemplos 1 a 8.	0,1 partes en masa
• Solución de hialuronato sódico (1 %, JCIC)	15 partes en masa
• Trehalosa (JCIC)	0,5 partes en masa
• L-cistina (JCIC)	0,05 partes en masa
• Extracto de <i>Salvia officinalis</i> (Salvia) (JCIC)	1,0 partes en masa
• Extracto foliar de melocotón (<i>Prunus persica</i>) (JCIC)	0,5 partes en masa
• Éter cetílico de polioxietilen (20) polioxipropileno (8) (JCIC)	0,3 partes en masa
• Agua refinada (JCIC)	c.s.
Total	100 partes en masa

5 El producto se inyectó en un recipiente de pulverización de 100 ml para obtener una pulverización líquida. Cuando se aplica a una parte prescrita de la piel para reducir el amarilleamiento de la piel en una cantidad eficaz con una frecuencia de una a cinco veces al día todos los días o cada dos días durante varios días a varios meses, el producto reduce eficazmente el amarilleamiento de la piel ya generado, tiene una permeabilidad a la humedad superior a la piel, tiene una capacidad de retención de humedad mejorada y tiene una útil sensación refrescante de uso. El producto tiene una acción de limpieza suave y es útil como un pulverizador de bajo estímulo para la limpieza.

10 **Aplicabilidad industrial**

15 El agente dérmico externo para reducir el amarilleamiento de la piel de la presente divulgación reduce eficazmente el amarilleamiento de la piel ya generado. En particular, los ejemplos de glicosil hesperetinas para su uso en el agente dérmico externo para reducir el amarilleamiento de la piel de acuerdo con la presente divulgación, las glicosil hesperetinas preparadas usando los agentes reductores prescritos pueden usarse por seres humanos diaria, sucesiva, segura y fácilmente sin inducir sentimientos desfavorables, porque tienen una coloración y un olor desfavorables claramente reducidos en comparación con las glicosil hesperetinas convencionales preparadas sin usar ninguno de los agentes reductores prescritos.

20

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso no terapéutico de una composición de glicosil hesperetina en combinación con un sacárido o un ácido orgánico en un agente dérmico externo para reducir el amarilleamiento de la piel ya generado en la piel;
- 10 en donde dicha composición de glicosil hesperetina comprende uno o más miembros seleccionados del grupo que consiste en hesperidina, α -glicosil hesperidina y 7-O- β -glucosil hesperetina; en donde dicho sacárido es uno o más sacáridos seleccionados del grupo que consiste en maltosa, maltotetraosa y glicosil trehalosa; y
- 15 en donde dicho ácido orgánico es uno o más ácidos orgánicos seleccionados del grupo que consiste en ácido ferúlico, ácido glucurónico, ácido acético, ácido sórbico, glicina y glutamato sódico.
2. El uso no terapéutico de la reivindicación 1, en donde dicha α -glicosil hesperidina es α -glucosil hesperidina.
- 15 3. El uso no terapéutico de la reivindicación 1, en donde el contenido de dicha α -glicosil hesperidina en dicha composición de glicosil hesperetina es de al menos el 50 % en masa pero menos del 100 % en masa, en una base en sólido seco.
- 20 4. El uso no terapéutico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicho agente dérmico externo está en forma de pomada, loción lechosa, crema, comprimido, gránulo, polvo, pulverización, suspensión, pasta, gelatina, líquido, gel, sal de baño, loción, aceite corporal, esencia, polvo facial o paquete.