

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 806 737**

51 Int. Cl.:

C12P 19/02	(2006.01) A61K 31/7048	(2006.01)
C12P 19/04	(2006.01) A61K 47/40	(2006.01)
C12P 19/14	(2006.01) A23L 2/00	(2006.01)
C12P 19/18	(2006.01) A23L 2/70	(2006.01)
C07H 1/00	(2006.01) A23L 29/30	(2006.01)
C07H 17/07	(2006.01) A23L 33/00	(2006.01)
A61K 8/33	(2006.01) A23L 33/105	(2006.01)
A61K 8/60	(2006.01) A61Q 19/00	(2006.01)
A61K 9/08	(2006.01)	
A61K 9/19	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.01.2018 PCT/JP2018/003177**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **31.01.2019 WO19021510**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.01.2018 E 18799420 (7)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.06.2020 EP 3453766**

54 Título: **Método de producción de compuestos de inclusión de flavonoide**

30 Prioridad:

28.07.2017 JP 2017147121

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

18.02.2021

73 Titular/es:

**TAIYO KAGAKU CO., LTD. (100.0%)
800, Yamadacho Yokkaichi-shi
Mie 512-1111, JP**

72 Inventor/es:

**MORIWAKI, MASAMITSU;
KUMOI, KENTARO y
OZEKI, MAKOTO**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 806 737 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

Método de producción de compuestos de inclusión de flavonoide

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un método de producción de un compuesto de inclusión de flavonoide, un compuesto de inclusión de flavonoide, una composición que contiene compuesto de inclusión de flavonoide, una composición de glucósidos de isoquercitrina, una composición de glucósidos de hesperetin-7-glucósido, una composición de glucósidos de naringenin-7-glucósido, producto alimenticio, un artículo que comprende uno o más compuestos o composiciones, en donde el artículo es un producto alimenticio, un medicamento, o un cosmético, y un método para mejorar la solubilidad de un flavonoide escasamente soluble que tiene una estructura de ramnósido.

El método se caracteriza por la presencia de una ciclodextrina y el uso de una enzima que tiene una actividad ramnosidasa, y los compuestos y composiciones son como se define adicionalmente en las reivindicaciones.

Antecedentes de la técnica

Como los flavonoides tienen un efecto antioxidante, los flavonoides se han utilizado para la prevención del deterioro del sabor de los alimentos, la prevención de la decoloración del color y similares, y listas de aditivos alimentarios, aditivos y antioxidantes ya existentes de Japón han reportado numerosas sustancias que contienen flavonoides como principio activo como las catequinas, rutinas modificadas enzimáticamente, extractos de rutina, extractos de té, extractos del árbol chino de la cera. Además, como acciones fisiológicas de los flavonoides, se han informado antitumoral, reducción de colesterol, disminución de la presión arterial, reducción de azúcares en la sangre, reducción en las grasas corporales y similares, y los flavonoides se han usado ampliamente en medicamentos, producto alimenticio, alimentos sanos, alimentos para un uso médico específico, cosméticos y similares.

Los flavonoides están contenidos en vegetales, frutas, té y similares, y se conocen 3.000 o más tipos de flavonoides, pero muchos de los flavonoides son escasamente solubles en agua, de modo que es difícil usar flavonoides para los alimentos, bebidas, medicamentos o cosméticos que requerirían una capacidad fácilmente soluble en agua, como en bebidas refrescantes, agentes acuosos y similares. Por ejemplo, una solubilidad de hesperidina o rutina que es un flavonoide representativo es 0,01 % o menos, de modo que es difícil usarlo para refrescar bebidas, lociones cosméticas o similares.

Los flavonoides escasamente solubles pueden clasificarse en los que tienen una estructura de ramnósido y los que no tienen una estructura de ramnósido, y se ha informado que la isoquercitrina, hesperetin-7-glucósido, naringenina, o naringenin-7-glucósido en que se escinde la ramnosa, tiene mayor biodisponibilidad en ratas que la rutina, hesperidina, o naringina que tiene una estructura de ramnósido (Publicaciones no de patente 1 a 3).

Además, se sabe que la biodisponibilidad mejora y los efectos fisiológicos se muestran efectivamente al incluir un flavonoide escasamente soluble con una ciclodextrina o al someter un flavonoide escasamente soluble a glucosidación. En cuanto a un compuesto de inclusión, por ejemplo, se ha informado que un compuesto de inclusión de isoquercitrina (1 M)- γ -ciclodextrina (5 M) tiene una mayor velocidad de absorción corporal que la isoquercitrina (publicación de patente 1), que en una experimentación con ratones, un compuesto de inclusión de hesperetin- β -ciclodextrina o similar tiene una mayor biodisponibilidad (AUC: 0 a 9 horas), y mayores efectos de las acciones de supresión de reacciones alérgicas, acciones de mejora del torrente sanguíneo y sensibilidad a las acciones de mejora del frío que la hesperetina (publicación de patente 2), y que un compuesto de inclusión de naringeninahidroxiopropil β -ciclodextrina tiene una biodisponibilidad elevada (rata), una VLDL reducida (lipoproteína muy baja) y una mayor velocidad de eliminación de glucosa en comparación con la naringenina (Publicación no de patente 4). En cuanto a la glucosidación, por ejemplo, se ha informado que los efectos antialérgicos de los ratones están en el orden de "rutina modificada enzimáticamente < isoquercitrina < isoquercitrina modificada enzimáticamente" y una isoquercitrina modificada enzimáticamente en la que se elimina una ramnosa y que es soluble en agua muestra los efectos más elevados (Publicación no de patente 5).

Además de las publicaciones anteriores, se ha descrito un método para escindir una ramnosa de un flavonoide escasamente soluble que tiene una estructura de ramnósido, por ejemplo, las publicaciones de patente 3 a 6. Se ha descrito un método para incluir un flavonoide escasamente soluble con una ciclodextrina en, por ejemplo, las publicaciones de patente 2, 7 y 8. Se ha descrito un método para someter un flavonoide escasamente soluble a la glucosidación en, por ejemplo, las publicaciones de patente 9 y 10. Además, la publicación de patente 11 desvela un método para la solubilización que incluye permitir que un flavonoide escasamente soluble esté copresente con una saponina de soja y/o una composición de glucósidos de malonil isoflavona como método para hacer que un flavonoide escasamente soluble sea fácilmente soluble en agua.

Además, se ha desvelado un método para mejorar la solubilidad en agua caracterizado por combinar un flavonoide escasamente soluble con glucósidos flavonoides fácilmente solubles en agua como un método para mejorar la solubilidad de un flavonoide escasamente soluble (publicaciones de patentes 3 a 4 y 12), y un flavonoide soluble en

agua caracterizado por que el flavonoide contiene una flavonoide-β-ciclodextrina escasamente soluble y una glicosil hesperidina (publicación de patente 8).

5 El documento WO 2010/11328 A1 desvela una composición de isoquercitrina fácilmente soluble en agua. Y. Lee et al tratan la glucosilación de flavonol y flavanonas por la ciclodextrina glucosiltransferasa de Bacillus en "Food Chemistry" 229 (2017) 75-83.

Referencias de la técnica anterior

10 **Publicaciones de patentes**

- Publicación de patente 1: Patente japonesa n.º 5002072
- Publicación de patente 2: Patente japonesa n.º 5000884
- Publicación de patente 3: Patente japonesa n.º 4902151
- 15 Publicación de patente 4: Patente japonesa n.º 3833775
- Publicación de patente 5: Patente japonesa n.º 4498277
- Publicación de patente 6: Patente japonesa n.º 5985229
- Publicación de patente 7: Patente japonesa n.º 3135912
- Publicación de patente 8: Patente japonesa n.º 5000373
- 20 Publicación de patente 9: Patente japonesa n.º 4202439
- Publicación de patente 10: Patente japonesa n.º 3989561
- Publicación de patente 11: Patente japonesa abierta a inspección pública n.º 2011-225586
- Publicación de patente 12: Patente japonesa abierta a inspección pública n.º Hei-07-10898

25 **Publicaciones no de patente**

- Publicación no de patente 1: British Journal of Nutrition, 102, 976-984, 2009
- Publicación no de patente 2: Biological & Pharmaceutical Bulletin, 32(12), 2034-2040, 2009
- 30 Publicación no de patente 3: American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology, 279, 1148-1154, 2000
- Publicación no de patente 4: PLOS ONE (4), e18033, 2011
- Publicación no de patente 5: Journal of natural Medicines, Oct, 67(4), 881-6, 2013

35 **Sumario de la invención**

Problemas que ha de resolver la invención

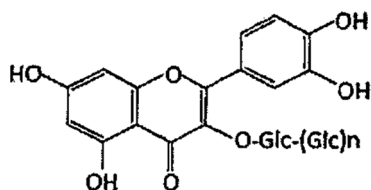
40 Sin embargo, no se dice que los métodos de producción descritos en las publicaciones anteriores de la técnica anterior sean excelentes en eficiencia de producción, y que los flavonoides obtenidos no satisfacen suficientemente la solubilidad en agua, de modo que se desean más mejoras.

45 Un objetivo de la presente invención es proporcionar un método fácil y eficiente de producción de un compuesto de inclusión de flavonoide y una composición de glucósidos flavonoides que tengan una excelente solubilidad en agua. Además, un objetivo es proporcionar un compuesto de inclusión de flavonoide que tenga una excelente solubilidad en agua, una composición que contiene compuesto de inclusión de flavonoide, una composición de glucósidos de isoquercitrina, una composición de glucósidos de hesperetin-7-glucósido, una composición de glucósidos de naringenin-7-glucósido, producto alimenticio, medicamentos o cosméticos que contienen estos compuestos o composiciones, y un método para mejorar la solubilidad de un flavonoide escasamente soluble que tiene una estructura de ramnósido.

50 **Medios para resolver los problemas**

La presente invención se refiere a:

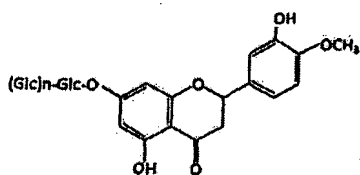
- 55 Un método de producción de un compuesto de inclusión de flavonoide, un compuesto de inclusión de flavonoide, una composición que contiene compuesto de inclusión de flavonoide,
- una composición de glucósidos de isoquercitrina que contiene un compuesto representado por la siguiente fórmula general (1):
- 60



(1)

donde en la fórmula general (1), Glc significa un residuo de glucosa, y n significa un número entero de 0 o 1 o más,

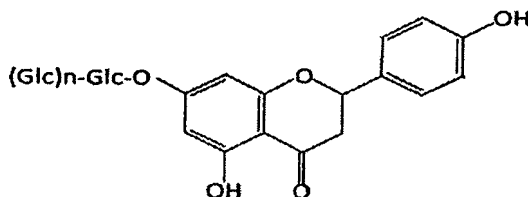
5 una composición de glucósidos de hesperetin-7-glucósido que contiene un compuesto representado por la siguiente fórmula general (2):



(2)

10 donde en la fórmula general (2), Glc significa un residuo de glucosa, y n significa un número entero de 0 o 1 o más,

una composición de glucósidos de naringenin-7-glucósido que contiene un compuesto representado por la siguiente fórmula general (3):



(3)

15

donde en la fórmula general (3), Glc significa un residuo de glucosa, y n significa un número entero de 0 o 1 o más, un artículo y

20 un método para mejorar la solubilidad de un flavonoide escasamente soluble que tiene una estructura de ramnósido, todo tal como se define en las reivindicaciones.

Efectos de la invención

25 Según la presente invención, se proporciona un método fácil y eficiente de producción de un compuesto de inclusión de flavonoide y una composición de glucósidos flavonoides que tienen una excelente solubilidad en agua. Además, se puede proporcionar un compuesto de inclusión de flavonoide que tiene una excelente solubilidad en agua, una composición que contiene compuesto de inclusión de flavonoide, una composición de glucósidos de isoquercitrina, una composición de glucósidos de hesperetin-7-glucósido, una composición de glucósidos de naringenin-7-glucósido, producto alimenticio, medicamentos o cosméticos que contengan estos compuestos o composiciones, y un método para mejorar la solubilidad de un flavonoide escasamente soluble que tiene una estructura de ramnósido.

30

Breve descripción de los dibujos

35 [FIG. 1] La figura 1 muestra un cromatograma de HPLC del Ejemplo 39.

[FIG. 2] La figura 2 muestra un cromatograma de HPLC del Ejemplo 40.

Modos para realizar la invención

40 Como resultado del estudio de los objetivos anteriores, los presentes inventores han descubierto que se puede producir un compuesto de inclusión de flavonoide al mismo tiempo que la escisión de una ramnosa a partir de un flavonoide escasamente soluble que tiene una estructura de ramnosa en presencia de una ciclodextrina para escindir la ramnosa, de modo que un compuesto de inclusión de flavonoide se pueda producir de manera más eficiente que el método

convencional en el que la etapa de escisión y la etapa de inclusión se han llevado a cabo por separado. Además sorprendentemente, los inventores han descubierto que el compuesto de inclusión de flavonoide obtenido según el método de producción tiene una solubilidad en agua más excelente que un compuesto de inclusión de flavonoide producido según el método de convención. Según la presente invención, se usa ciclodextrina, sin embargo, diversos oligosacáridos cíclicos podrían usarse de la misma manera. Tales oligosacáridos cíclicos muestran un compuesto en el que los monosacáridos están unidos en forma cíclica, y más específicamente, los ejemplos incluyen ciclodextrano, ciclofructano, cicloalternano, cluster dextrina y similares.

El método de producción de un compuesto de inclusión de flavonoide de la presente invención incluye una etapa de escisión que incluye tratar un flavonoide escasamente soluble que tiene una estructura de ramnósido con una enzima que tiene una actividad ramnosidasa en presencia de una ciclodextrina para escindir una ramnosa.

La etapa de escisión es una etapa de escisión de una ramnosa de un flavonoide escasamente soluble que tiene una estructura de ramnósido para obtener un compuesto de inclusión de un flavonoide sin una estructura de ramnósido y una ciclodextrina (también denominado "compuesto de inclusión de flavonoide"). La etapa de escisión puede llevarse a cabo mientras se deja reposar en un medio como agua o mientras se agita, o el aire en una cámara de aire de un sistema de reacción puede reemplazarse con un gas inerte como nitrógeno para evitar la oxidación o el oscurecimiento durante la reacción, y también se puede añadir un antioxidante como el ácido ascórbico a un sistema de reacción. La etapa de escisión puede terminarse mediante un método conocido tal como un método que incluye un método de desactivación de enzimas por calentamiento o similar.

El flavonoide escasamente soluble que tiene una estructura de ramnósido incluye los seleccionados de flavonoles, flavanonas, flavonas e isoflavonas, y los que tienen una estructura en la que uno o más, preferiblemente dos o más grupos hidroxilo están unidos a un anillo de benceno de una cadena principal de flavonoide y que contiene una ramnosa se puede usar. En el presente documento, "escasamente soluble" se refiere a una solubilidad en agua a 25 °C del 1,0 % en masa o menos, preferiblemente 0,1 % o menos, y más preferiblemente 0,01 % en masa o menos. Ejemplos específicos incluyen rutina, hesperidina, narirutina, naringina, diosmina, eriocitrina, micricitrina, neohesperidina, luteolin-7-rutinósido, delphinidin-3-rutinósido, cianidina-3-rutinósido, isoramnetin-3-rutinósido, campferol-3-rutinósido, apigenin-7-rutinósido, acacetin-7-rutinósido, y sus derivados. Los derivados incluyen compuestos acetilados, compuestos malonilados, compuestos metilados y similares.

La cantidad del flavonoide escasamente soluble que tiene una estructura de ramnósido utilizada no está particularmente limitada, y la cantidad utilizada puede ser preferiblemente del 0,1 al 20 % en masa, más preferiblemente del 1 al 15 % en masa, e incluso más preferiblemente del 2 al 14 % en masa en el sistema de reacción. Cuando los flavonoides escasamente solubles que tienen una estructura de ramnósido se usan en dos o más tipos, la cantidad utilizada se refiere a una cantidad total de la misma.

Las materias primas que contienen un flavonoide escasamente soluble que tienen una estructura de ramnósido utilizada en el método de producción de la presente invención no son particularmente necesarias para ser purificadas, pero las materias primas son preferiblemente purificadas. El contenido del flavonoide escasamente soluble que tiene una estructura de ramnósido en las materias primas anteriores no está particularmente limitado, y se puede usar el flavonoide escasamente soluble que tiene un contenido de preferiblemente 5 % o más, más preferiblemente 20 % o más, incluso más preferiblemente 50 % o más, incluso más preferiblemente 80 % o más e incluso más preferiblemente 90 % o más.

La ciclodextrina (CD) que está presente en la etapa de escisión no está particularmente limitada, y más preferiblemente se puede usar uno o más miembros seleccionados del grupo que consiste en β -ciclodextrina (β -CD), β -ciclodextrina ramificada (β -CD ramificada) y γ -ciclodextrina (γ -CD). La ciclodextrina es un tipo de oligosacárido cíclico en el que las D-glucosas se unen mediante un enlace α -1,4-glucósido para formar una estructura cíclica, y aquellas en las que se unen siete glucosas son la β -ciclodextrina y aquellas en las que se unen ocho glucosas son γ -ciclodextrina. La β -CD ramificada es una en la que uno o más residuos de glucosa, los grupos galactosilo o grupos hidroxipropilo están unidos a β -CD como una cadena lateral, que incluye maltosil β -CD (G2- β -CD), hidroxipropil- β -CD (HP- β -CD) y similares. En el presente documento, la frase "en presencia de una ciclodextrina" se refiere a un estado en el que una ciclodextrina está contenida en el sistema de reacción de escisión.

La cantidad de ciclodextrina que está presente no está particularmente limitada, y la cantidad puede ser preferiblemente del 0,01 al 60 % en masa, más preferiblemente del 1 al 50 % en masa, e incluso más preferiblemente del 3 al 40 % en masa en el sistema de reacción. Cuando la ciclodextrina se usa en dos o más tipos, la cantidad se refiere a una cantidad total de la misma.

La relación molar de la ciclodextrina al flavonoide escasamente soluble que tiene una estructura de ramnósido (ciclodextrina/flavonoide) es preferiblemente de 0,01 o más, más preferiblemente 0,1 o más, incluso más preferiblemente 0,9 o más, e incluso más preferiblemente 1,0 o más, desde el punto de vista de la eficiencia, y la relación molar es preferiblemente 10,0 o menos, más preferiblemente 6,0 o menos, incluso más preferiblemente 4,0 o menos, e incluso más preferiblemente 3,0 o menos, desde el punto de vista de las ventajas económicas.

Como la enzima que tiene una actividad ramnosidasa, sus orígenes no están limitados, y se pueden usar todas las derivaciones, como la derivación animal, derivación vegetal y derivación de microorganismos. Además, la enzima puede ser una enzima genéticamente recombinante. Además, la forma de la enzima no está particularmente limitada.

- 5 Los ejemplos específicos de la enzima que tiene una actividad ramnosidasa incluyen hesperiginasa, naringinasa y pectinasa.

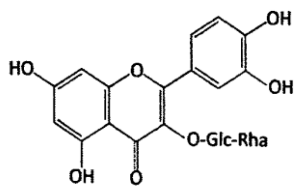
10 La cantidad de enzima que tiene una actividad de ramnosidasa utilizada varía según los tipos de enzimas utilizadas, condiciones de reacción, los tipos de flavonoides escasamente solubles que tienen una estructura de ramnósido de materias primas. Cuando la enzima es, por ejemplo, hesperiginasa y naringinasa, la cantidad es preferiblemente de 0,01 a 1.000 U basado en 1 g de los flavonoides escasamente solubles que tienen una estructura de ramnósido. En cuanto a las condiciones de reacción, la temperatura de reacción o el pH de la mezcla líquida de reacción se puede seleccionar dependiendo de las propiedades de la enzima utilizada, y el pH es preferiblemente de 3 a 7, y el pH es más preferiblemente de 3,5 a 6,5. Además, el flavonoide escasamente soluble que tiene una estructura de ramnósido puede disolverse en una región alcalina, y luego someterse a una reacción enzimática a un pH de 7 o menos. El disolvente usado en el sistema de reacción incluye un medio acuoso. El medio acuoso como se usa en el presente documento se refiere a agua o una solución acuosa de un disolvente orgánico. Ejemplos de agua incluyen agua corriente, agua destilada, agua de intercambio iónico y agua purificada. El disolvente orgánico no está particularmente limitado, siempre que el disolvente orgánico sea uniformemente miscible con agua. Preferentemente, el disolvente orgánico es etanol, desde el punto de vista de que el disolvente orgánico es aplicable a los alimentos. Además, la temperatura de reacción es preferiblemente de 10 °C a 80 °C, y más preferiblemente de 40 °C a 75 °C. Adicionalmente, el tiempo de reacción varía según los tipos de enzimas o similares, y el tiempo de reacción puede ser, por ejemplo, de 1 a 100 horas, y preferiblemente de 2 a 24 horas.

- 25 La enzima que tiene una actividad ramnosidasa puede tener una actividad glucosidasa, y la obtención de un compuesto de inclusión de aglicona (un compuesto de inclusión de quercetina, un compuesto de inclusión de hesperetina, un compuesto de inclusión de naringenina, un compuesto de inclusión de miricetina o similar) de un flavonoide escasamente soluble que tiene una estructura de ramnósido (hesperidina, rutina, naringina, micricitrina o similar) mediante una actividad glucosidasa tampoco está limitada, de modo que estos también están incluidos en el compuesto de inclusión de flavonoide de acuerdo con la presente invención.

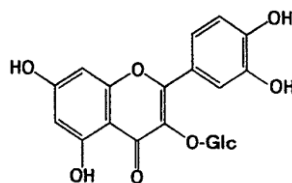
35 El compuesto de inclusión de flavonoide formado es un compuesto de inclusión de un flavonoide sin una estructura de ramnósido y una ciclodextrina, tal como se mencionó anteriormente. En el presente documento, un compuesto de inclusión se refiere a un compuesto formado de tal manera que una especie química forma un espacio de escala molecular y la otra especie química se incluye en el espacio haciendo coincidir el espacio con la forma y las dimensiones.

40 El flavonoide sin estructura de ramnósido incluye isoquercitrina, quercetina, hesperetin-7-glucósido, hesperetina, naringenin-7-glucósido (prunina), naringenina, quercetol-7-glucósido, diosmetin-7-glucósido, miricetina, eriodictiol-7-glucósido, delfinidin-3-glucósido, cianidin-3-glucósido, isoramnetin-3-glucósido, campferol-3-glucósido, apigenin-7-rutinósido, acacetin-7-glucósido y similares.

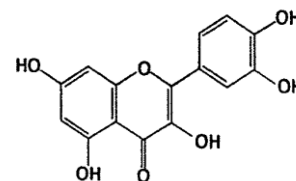
45 A continuación, se muestran ejemplos específicos de fórmulas estructurales del flavonoide escasamente soluble que tiene una estructura de ramnósido y el flavonoide sin una estructura de ramnósido. Las fórmulas estructurales de la rutina (RTN), hesperidina (HSP) y naringina (NRG), cada una con una estructura de ramnósido e isoquercitrina (IQC), quercetina (QCT), hesperetin-7-glucósido (HPT-7G), hesperetina (HPT), naringenin-7-glucósido (prunina) (NGN-7G, prunina) y naringenina (NGN), sin tener una estructura de ramnósido están representadas por las siguientes fórmulas.



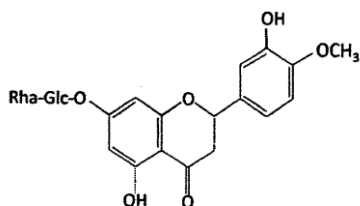
Rutina



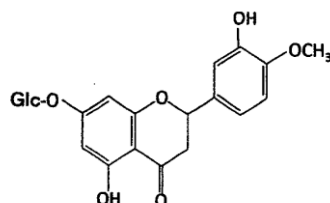
Isoquercitrina



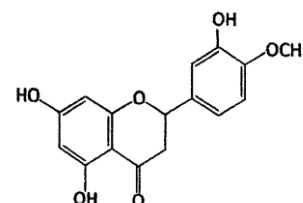
Quercetina



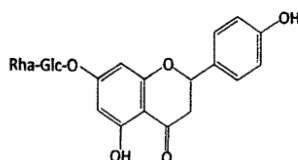
Hesperidina



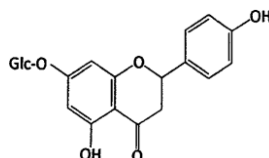
Hesperetin-7-glucósido



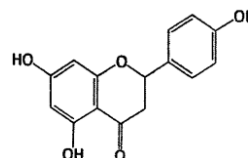
Hesperetina



Naringina



**Naringin-7-glucósido
(prunina)**



Naringenina

Rha; ramnosa, Glc; glucosa

5 La relación molar de una ciclodextrina en un compuesto de inclusión y un flavonoide sin una estructura de ramnósido (ciclodextrina/flavonoide) es preferiblemente 0,01 o más, más preferiblemente 0,1 o más, incluso más preferiblemente 0,9 o más, e incluso más preferiblemente 1,0 o más, desde el punto de vista de la eficiencia, y la relación molar es preferiblemente 10,0 o menos, más preferiblemente 6,0 o menos, incluso más preferiblemente 4,0 o menos, e incluso más preferiblemente 3,0 o menos, desde el punto de vista de las ventajas económicas.

10 Los compuestos de la invención son como se definen en las reivindicaciones.

El rendimiento del compuesto de inclusión de flavonoide formado es preferiblemente del 10 al 100 %, más preferentemente del 40 al 100 %, más preferiblemente del 70 al 100 %, e incluso más preferiblemente del 90 al 100 %. El rendimiento es una conversión porcentual de un flavonoide escasamente soluble que tiene una estructura de ramnósido a un flavonoide sin una estructura de ramnósido, y el rendimiento se puede calcular de acuerdo con un método descrito en los ejemplos expuestos a continuación. En el presente documento, la proporción del compuesto de inclusión de flavonoide formado no está limitada, incluso cuando el compuesto de inclusión de flavonoide formado es una mezcla de un flavonoide de materia prima que tiene una estructura de ramnósido (por ejemplo, rutina, hesperidina, naringina o similar), o un flavonoide que puede estar contenido en materias primas (por ejemplo, quercetina, campferol-3-rutinósido, campferol-3-glucósido, hesperetina, naringenina y similares), dependiendo del contenido de flavonoides o del porcentaje de conversión de las materias primas utilizadas.

En el compuesto de inclusión de flavonoide formado o la composición que contiene el compuesto de inclusión de flavonoide descrita más adelante (ambos pueden denominarse colectivamente "compuesto de inclusión de flavonoide y similares"), una solubilidad de una porción de flavonoide en agua puede depender de los tipos o de las cantidades del flavonoide escasamente soluble que tiene una estructura de ramnósido y la ciclodextrina utilizada, y la solubilidad es preferiblemente 0,01 % o más, más preferiblemente 0,015 % o más, incluso más preferiblemente 0,02 % o más, incluso más preferiblemente 1,0 % o más, incluso más preferiblemente 2,0 % o más, incluso más preferiblemente 2,5 % o más, e incluso más preferiblemente 3 % o más. Aunque el límite superior no está particularmente limitado, el límite superior se puede definir como, por ejemplo, 20 % o menos. La solubilidad de una porción de flavonoide en agua, como se usa en el presente documento, es una concentración de porcentaje en masa a 25 °C, y la solubilidad

se puede medir de acuerdo con un método descrito en los Ejemplos expuestos a continuación.

A continuación se darán realizaciones específicas.

5 Realización 1-1

10 Un compuesto de inclusión de flavonoide que contiene isoquercitrina incluida por γ -ciclodextrina, en donde una relación molar de la isoquercitrina y la γ -ciclodextrina en un compuesto de inclusión (γ -ciclodextrina/isoquercitrina) es de 0,9 a 4,0, y más preferiblemente de 0,9 a 1,8, desde el punto de vista de reducir los costes de producción, en cuyo caso la solubilidad de la isoquercitrina en agua es preferiblemente del 0,01 % o más, más preferiblemente 2 % o más, incluso más preferiblemente 2,5 % o más, e incluso más preferiblemente 3 % o más.

Realización 1-2

15 Un compuesto de inclusión de flavonoide que contiene isoquercitrina incluida por β -ciclodextrina, en donde una relación molar de la isoquercitrina y la β -ciclodextrina en un compuesto de inclusión (β -ciclodextrina/isoquercitrina) es de 1,0 a 3,0, en cuyo caso la solubilidad de la isoquercitrina en agua es preferiblemente del 0,01 % o más, más preferiblemente 0,02 % o más, incluso más preferiblemente 0,03 % o más, e incluso más preferiblemente 0,05 % o más.

20 Realización 1-3

25 Un compuesto de inclusión de flavonoide que contiene hesperetin-7-glucósido incluido por una ciclodextrina, en donde una relación molar de hesperetin-7-glucósido y la ciclodextrina en un compuesto de inclusión (ciclodextrina/hesperetin-7-glucósido) es de 1,0 a 3,0, en cuyo caso la solubilidad de hesperetin-7-glucósido en agua es preferiblemente del 0,01 % o más, más preferiblemente 0,02 % o más, e incluso más preferiblemente 0,03 % o más.

Realización 1-4

30 Un compuesto de inclusión de flavonoide que contiene naringenin-7-glucósido incluido por β -ciclodextrina, en donde una relación molar de naringenin-7-glucósido y la β -ciclodextrina en un compuesto de inclusión (ciclodextrina/naringenin-7-glucósido) es de 1,0 a 3,0, en cuyo caso la solubilidad de naringenin-7-glucósido en agua es preferiblemente del 0,01 % o más, más preferiblemente 0,02 % o más, e incluso más preferiblemente 0,03 % o más.

35 De acuerdo con el método de producción de un compuesto de inclusión de flavonoide de la presente invención, en un caso de compuesto no purificado, se obtiene una composición que contiene un compuesto de inclusión de flavonoide que contiene un compuesto de inclusión de flavonoide y una ramnosa. En este caso, una relación molar del flavonoide en el compuesto de inclusión de flavonoide y la ramnosa escindida (ramnosa/flavonoide) es de 0,8 a 1,2.

40 De acuerdo con el método de producción de un compuesto de inclusión de flavonoide de la presente invención, en un caso donde el rendimiento anterior no es del 100 %, el compuesto de inclusión contendría un flavonoide escasamente soluble que tiene una estructura de ramnósido como material sin reaccionar. La relación molar del flavonoide en el compuesto de inclusión de flavonoide y el flavonoide escasamente soluble en la composición que contiene el compuesto de inclusión de flavonoide que contiene el material no reaccionado anterior (flavonoide/flavonoide escasamente soluble en el compuesto de inclusión) es preferiblemente de 0,1 o menos, más preferiblemente 0,08 o menos, e incluso más preferiblemente 0,05 o menos, desde el punto de vista de la estabilidad a largo plazo. El límite inferior no está particularmente limitado, y el límite inferior puede ser 0,001 o más, 0,003 o más, 0,004 o más, y 0,01 o más.

50 Además, de manera sorprendente, se ha encontrado que la solubilidad de un flavonoide escasamente soluble que tiene una estructura de ramnósido puede mejorarse mediante el compuesto de inclusión de flavonoide obtenido por el método de producción de la presente invención. De manera más específica, la solubilidad de un flavonoide escasamente soluble que tiene una estructura de ramnósido es mejorable mezclando un flavonoide escasamente soluble que tiene una estructura de ramnósido con un compuesto de inclusión de flavonoide obtenido por el método de producción de la presente invención en un medio tal que una relación molar del flavonoide en el compuesto de inclusión de flavonoide al flavonoide escasamente soluble (flavonoide en el compuesto de inclusión/flavonoide escasamente soluble) es preferiblemente de 0,1 a 0,9, más preferiblemente de 0,1 a 0,7, e incluso más preferiblemente de 0,1 a 0,3. En el presente documento, el término en el medio se refiere a un medio acuoso, o en una solución acuosa que contiene aditivos alimentarios como sacárido, sales, acidulantes, edulcorantes, agentes aromatizantes, glicerol o propilenglicol, y alimentos o hierbas medicinales chinas como extractos de limón o extractos de hierbas medicinales chinas. El método para mejorar la solubilidad puede llevarse a cabo utilizando directamente una composición que contiene compuestos de inclusión de flavonoide que contiene materiales sin reaccionar, o puede llevarse a cabo añadiendo un compuesto de inclusión de flavonoide o similar al flavonoide escasamente soluble que tiene una estructura de ramnósido. En el presente documento, el flavonoide escasamente soluble que tiene una estructura de ramnósido y el compuesto de inclusión de flavonoide obtenido por el método de producción de la presente invención

son como se mencionó anteriormente, que incluyen una combinación de, por ejemplo, rutina y un compuesto de inclusión de isoquercitrin- γ -ciclodextrina, hesperidina y un compuesto de inclusión de hesperetin-7-glucósido- β -ciclodextrina, naringina y un compuesto de inclusión de narigenin-7-glucósido- β -ciclodextrina, y rutina y un compuesto de inclusión de narigenin-7-glucósido- β -ciclodextrina.

5 El método de producción de un compuesto de inclusión de flavonoide de la presente invención no está particularmente limitado para llevar a cabo la purificación según sea necesario, aparte de una etapa de escisión, y la purificación puede llevarse a cabo mediante una etapa de tratamiento con resina (método de adsorción, método de intercambio iónico y similares), una etapa de tratamiento de membrana (método de tratamiento de membrana de ultrafiltración, método de tratamiento de membrana de ósmosis inversa, método de tratamiento de membrana potencial zeta o similar), método de electrodiálisis, extracción por saturación de sal, precipitación ácida, recristalización, método de fraccionamiento con disolvente o similar. Por ejemplo, la composición que contiene el compuesto de inclusión de flavonoide obtenida en la etapa de escisión se adsorbe con un adsorbente poroso sintético, la ramnosa o similar se elimina lavando con agua, y luego la composición se eluye con un alcohol y se seca por pulverización, por lo que se pueden proporcionar polvos purificados. Además, después de la elución con un alcohol, un diluyente u otros aditivos pueden estar contenidos como componentes distintos de la composición. En el presente documento, la ramnosa o similar se puede fraccionar y utilizar en los campos de los alimentos, medicamentos, cuasifármacos, cosméticos y similares. Además, un flavonoide solo puede purificarse del compuesto producido de inclusión de flavonoide producido.

20 El diluyente no está particularmente limitado siempre que el diluyente no perjudique los efectos de las presentes invenciones, y el diluyente incluye, por ejemplo, sacáridos como el azúcar, glucosa, dextrina, almidones, trehalosa, lactosa, maltosa, jarabe de glucosa y azúcar líquido; alcoholes tales como etanol, propilenglicol y glicerol; alcoholes de azúcar tales como sorbitol, manitol, xilitol, eritritol, maltitol, jarabe de glucosa reducido y manita; o agua. Además, los aditivos incluyen auxiliares como fosfatos, ácidos orgánicos y quelatos; antioxidantes como el ácido ascórbico y similares.

A continuación, se describirá el método de producción de una composición de glucósidos flavonoides de la presente invención.

30 El método de producción de una composición de glucósidos flavonoides de la presente invención incluye una etapa de glucosidación que incluye tratar un compuesto de inclusión de flavonoide obtenido de acuerdo con el método de producción de un compuesto de inclusión de flavonoide de la presente invención con una glicosiltransferasa para someter el compuesto de inclusión de flavonoide a glucosidación. En otras palabras, el método incluye una etapa de escisión que incluye el tratamiento de un flavonoide escasamente soluble que tiene una estructura de ramnósido con una enzima que tiene una actividad ramnosidasa en presencia de una ciclodextrina para escindir ramnosa, y una etapa de glucosidación que incluye el tratamiento del compuesto de inclusión de flavonoide obtenido a través de la etapa de escisión anterior con una glicosiltransferasa para someter el compuesto de inclusión de flavonoide a glicosidación.

40 La etapa de escisión y el compuesto de inclusión de flavonoide obtenido a través de la etapa de escisión son como se mencionó anteriormente. En el presente documento, la frase obtenida a través de la etapa de escisión no tiene la intención de excluir métodos que incluyen etapas distintas a la etapa de escisión, pero también incluye las obtenidas mediante la etapa de purificación opcional o similar.

45 La etapa de glucosidación incluye el tratamiento de un compuesto de inclusión de flavonoide obtenido mediante la etapa de escisión con una glicosiltransferasa para someter el compuesto de inclusión de flavonoide a glucosidación, para proporcionar una composición de glucósidos flavonoides. Además, la etapa de glucosidación puede llevarse a cabo mientras se deja reposar en un disolvente como agua, o mientras se agita, de la misma manera que la etapa de escisión, el aire en una cámara de aire en el sistema de reacción puede reemplazarse con un gas inerte como el nitrógeno para evitar la oxidación o el oscurecimiento en la reacción, y también se puede añadir un antioxidante como el ácido ascórbico al sistema de reacción. La etapa de glucosidación puede terminarse mediante un método conocido tal como un método que incluye un método de desactivación de enzimas por calentamiento o similar.

50 En la etapa de glucosidación, una ciclodextrina del compuesto de inclusión de flavonoide sirve como donante de azúcar, y se puede producir una composición de glucósidos flavonoides, y no hay limitaciones en donaciones adicionales del donante de azúcar. Ejemplos específicos del donante de azúcar que se donan adicionalmente incluyen almidón, dextrina, hidrolizados parciales de almidón como maltooligosacárido, xilooligosacárido, productos que los contienen y similares.

60 La glicosiltransferasa no está particularmente limitada, siempre que la enzima tenga una actividad de glicosiltransferasa contra el compuesto de inclusión de flavonoide obtenido a través de la etapa de escisión. Como la glicosiltransferasa, sus orígenes no están limitados, y se pueden usar todas las derivaciones, como la derivación animal, derivación vegetal y derivación de microorganismos. Además, la enzima puede ser una enzima sintética mediante técnica genéticamente recombinante, hidrólisis parcial, o similares. Además, la forma de la glicosiltransferasa no está particularmente limitada, y se puede usar un producto seco de una proteína enzimática, una enzima inmovilizada con un vehículo insoluble, un líquido que contiene una proteína enzimática o similar.

Los ejemplos específicos de la glicosiltransferasa incluyen la ciclodextrina glucanotransferasa, glicosiltransferasa, α -glucosidasa, β -glucosidasa, α -galactosidasa, β -galactosidasa, α -amilasa, xilanasa, pululanasa, arabinofuranosidasa, y similares.

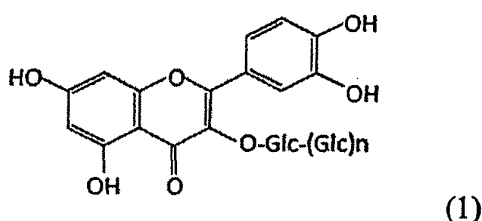
5 La cantidad de glicosiltransferasa utilizada varía según los tipos de enzimas usadas, las condiciones de las reacciones de transferencia de glicosilación, los tipos de sacáridos y similares. Por ejemplo, en un caso de ciclodextrina glucanotransferasa, la cantidad utilizada es preferiblemente de 1 a 10.000 U basado en 1 g de un compuesto de inclusión de flavonoide. Cuando un flavonoide escasamente soluble se somete a glucosidación, una reacción enzimática se lleva a cabo generalmente en una región alcalina para solubilizar un flavonoide escasamente soluble.

10 Sin embargo, la estabilidad del flavonoide empeora en una región alcalina de pH superior a 7, para que el flavonoide se descomponga o se dore, y se requeriría una etapa más para eliminar los productos dorados y una etapa de desalación mediante neutralización con un álcali. Sin embargo, en el compuesto de inclusión de flavonoide obtenido de acuerdo con el método de producción de la presente invención, el flavonoide escasamente soluble se solubiliza en una alta concentración incluso a un pH de 7 o menos, para que una reacción enzimática procese eficientemente la glucosidación incluso a un pH de 7 o menos. En consecuencia, el pH es preferiblemente de 3 a 7, y más preferiblemente de 6 a 6,8, desde el punto de vista de la eficiencia o calidad de la producción. Sin embargo, la transferencia de glicosilación puede llevarse a cabo en una región alcalina, o la transferencia de glicosilación puede llevarse a cabo mediante un ajuste de pH a una región alcalina, seguido de un ajuste a un pH de 7 o menos. El disolvente usado en el sistema de reacción incluye un medio acuoso. Además, la temperatura de reacción es preferiblemente de 40 °C a 70 °C, y más preferiblemente de 50 °C a 65 °C. Adicionalmente, el tiempo de reacción varía según los tipos de enzimas y similares, y el tiempo de reacción puede ser, por ejemplo, de 0,5 a 120 horas, y preferiblemente de 1 a 30 horas. Además, es preferible que después de la etapa de escisión, la temperatura y el pH cambien continuamente a condiciones óptimas, y se añada una glicosiltransferasa a la misma para llevar a cabo la etapa de glucosidación, desde el punto de vista de la eficiencia de producción.

25 La forma de unión de los sacáridos a un flavonoide puede ser uno de un enlace α o un enlace β . Los tipos de sacáridos que se deben unir no están particularmente limitados, y se prefieren uno o más miembros seleccionados de pentosas y hexosas como la glucosa, galactosa y fructosa. Además, el número de enlaces de sacáridos es preferiblemente de 1 a 30, más preferentemente de 1 a 25, incluso más preferentemente de 1 a 20, incluso más preferentemente de 1 a 15, e incluso más preferentemente de 1 a 10. La composición de glucósidos flavonoides se refiere a los que contienen una mezcla de glucósidos en los que los sacáridos anteriores están unidos a un flavonoide, y la proporción del número de enlaces de cada glucósido no está limitada, y se prefieren las siguientes realizaciones, desde el punto de vista de no alterar el sabor de los productos alimenticios o similares.

35 Realización 2-1

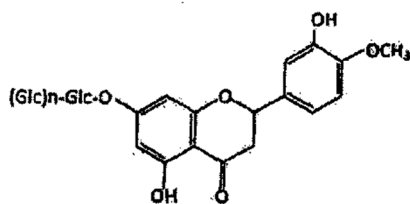
Una composición de glucósidos de isoquercitrina que contiene un compuesto representado por la siguiente fórmula general (1):



40 donde en la fórmula general (1), Glc significa un residuo de glucosa, y n significa un número entero de 0 o 1 o más, y en donde el contenido de glucósidos que tienen $n = 0$ es 10 % en moles o más y 30 % en moles o menos, el contenido de glucósidos que tienen $n = 1$ a 3 es del 50 % en moles o menos, y el contenido de glucósidos que tienen $n = 4$ o más es del 30 % en moles o más, de la composición anterior de glucósidos. Preferentemente, el contenido de glucósidos que tienen $n = 0$ es 10 % en moles o más y 30 % en moles o menos, el contenido de glucósidos que tienen $n = 1$ a 3 es 35 % en moles o más y 45 % en moles o menos, y el contenido de glucósidos que tienen $n = 4$ o más es 30 % en moles o más y 50 % en moles o menos.

50 Realización 2-2

Una composición de glucósidos de hesperetin-7-glucósido que contiene un compuesto representado por la siguiente fórmula general (2):

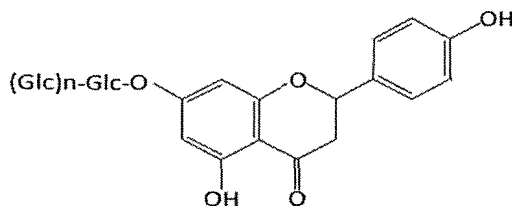


(2)

donde en la fórmula general (2), Glc significa un residuo de glucosa, y n significa un número entero de 0 o 1 o más, y en donde el contenido de glucósidos que tienen $n = 0$ es 10 % en moles o más y 30 % en moles o menos, el contenido de glucósidos que tienen $n = 1$ a 3 es del 50 % en moles o menos, y el contenido de glucósidos que tienen $n = 4$ o más es del 30 % en moles o más, de la composición anterior de glucósidos. Preferentemente, el contenido de glucósidos que tienen $n = 0$ es 10 % en moles o más y 25 % en moles o menos, el contenido de glucósidos que tienen $n = 1$ a 3 es 35 % en moles o más y 50 % en moles o menos, y el contenido de glucósidos que tienen $n = 4$ o más es 30 % en moles o más y 50 % en moles o menos.

Realización 2-3

Una composición de glucósidos de naringenin-7-glucósido que contiene un compuesto representado por la siguiente fórmula general (3):



(3)

donde en la fórmula general (3), Glc significa un residuo de glucosa, y n significa un número entero de 0 o 1 o más, y en donde el contenido de glucósidos que tienen $n = 0$ es 10 % en moles o más y 30 % en moles o menos, el contenido de glucósidos que tienen $n = 1$ a 3 es del 50 % en moles o menos, y el contenido de glucósidos que tienen $n = 4$ o más es del 30 % en moles o más, de la composición anterior de glucósidos.

En el presente documento, el número de enlaces de un grupo de glucosa (número n) se puede ajustar opcionalmente. Por ejemplo, después de formar una composición de glucósidos flavonoides, el número de cadenas de glucosa y azúcar en la molécula de la composición de glucósidos flavonoides puede reducirse llevando a cabo el tratamiento con varias amilasas (α -amilasa, β -amilasa, glucoamilasa, α -glucosidasa y similares) solas o en una combinación de las mismas, para proporcionar una composición de glucósidos flavonoides que tienen una longitud de cadena de azúcar de glucosa opcional.

El método de la presente invención de producción de una composición de glucósidos flavonoides no está particularmente limitado para llevar a cabo la purificación según sea necesario, aparte de la etapa de escisión y la etapa de glucosidación, y la purificación puede llevarse a cabo mediante una etapa de tratamiento con resina (método de adsorción, método de intercambio iónico y similares), una etapa de tratamiento de membrana (método de tratamiento de membrana de ultrafiltración, método de tratamiento de membrana de ósmosis inversa, método de tratamiento de membrana potencial zeta o similar), método de electrodiálisis, extracción por saturación de sal, deposición ácida, recristalización, método de fraccionamiento con disolvente o similar. Por ejemplo, la composición de glucósidos flavonoides obtenida en la etapa de glucosidación se adsorbe con un adsorbente poroso sintético para adsorber la composición de glucósidos, se lava con agua, se eluye con un alcohol, y luego se seca por pulverización, para proporcionar polvos purificados. Además, después de la elución con un alcohol, un diluyente u otros aditivos pueden estar contenidos como componentes distintos de la composición.

Los ejemplos específicos del diluyente son los mismos que se enumeran en el método de producción de un compuesto de inclusión de flavonoide.

La solubilidad de la composición de glucósidos flavonoides obtenidos según el método de producción de la presente invención en agua, calculado como un flavonoide, es preferiblemente 0,01 % o más, más preferiblemente 0,015 % o más, incluso más preferiblemente 0,02 % o más, incluso más preferiblemente 0,1 % o más, e incluso más preferiblemente 0,5 % o más. El límite superior no está particularmente limitado, y el límite superior se puede definir como, por ejemplo, 20 % o menos.

El compuesto de inclusión de flavonoide y la composición de glucósidos flavonoides obtenidos de acuerdo con el método de producción de la presente invención se pueden proporcionar en forma de alimentos para los que la biodisponibilidad se mejora de forma sostenible mediante una combinación con un flavonoide escasamente soluble que tiene una estructura de ramnósido que se dice que tiene una biodisponibilidad retardada o una composición de glucósidos flavonoides que tienen una estructura de ramnósido. Las combinaciones, por ejemplo, incluyen una combinación de un compuesto de inclusión de isoquercitrina y rutina, una combinación de una composición de glucósidos de isoquercitrina y una composición de glucósidos de rutina (por ejemplo, α G rutina, Toyo Sugar Refining Co., Ltd.), una combinación de un compuesto de inclusión de hesperetin-7-glucósido y una composición de glucósidos de hesperidina (por ejemplo, α G Hesperidina, Toyo Sugar Refining Co., Ltd.), y una combinación de una composición de glucósidos de hesperetin-7-glucósido y una composición de glucósidos de hesperidina (por ejemplo, Monoglucosil hesperidina, HAYASHIBARA CO., LTD.).

Además, la composición de glucósidos flavonoides obtenidos según el método de producción de la presente invención se combina con otro flavonoide escasamente soluble, por lo que se puede mejorar la solubilidad del otro flavonoide escasamente soluble. Las combinaciones son, por ejemplo, una combinación de una composición de glucósidos de isoquercitrina y rutina, una combinación de una composición de glucósidos de hesperetin-7-glucósido y hesperidina, y una combinación de una composición de glucósidos de hesperetin-7-glucósido y micricitrina. Además, la relación molar de los mismos (composición de glucósidos/otro flavonoide escasamente soluble) es preferiblemente de 0,1 a 0,5, más preferiblemente de 0,1 a 0,3, e incluso más preferiblemente de 0,1 a 0,15.

El compuesto de inclusión de flavonoide y/o la composición de glucósidos flavonoides obtenidos de acuerdo con el método de producción de la presente invención es excelente en la velocidad de absorción corporal y adicionalmente excelente en la prevención de la decoloración, prevención del deterioro de sabores y estabilidad de almacenamiento, para que el compuesto de inclusión de flavonoide y/o la composición de glucósidos flavonoides se puedan usar adecuadamente como una composición para alimentos, una composición para medicamentos, una composición para cosméticos y una composición para aditivos alimentarios. De manera más específica, el compuesto de inclusión de flavonoide y/o la composición de glucósidos flavonoides se pueden usar como material antialérgico, antioxidante, anticancerígeno, antiinflamatorio, mejora en la flora intestinal, desodorización, supresión de la elevación del colesterol en plasma, supresión de la elevación de la presión arterial, supresión de la elevación del nivel de azúcar en la sangre, supresión de la agregación plaquetaria, prevención de la demencia, combustión de grasa corporal, supresión de la acumulación de grasa corporal, mejora en el poder de permanencia, antifatiga, mejora en la sensibilidad al frío, mejora de las condiciones de la piel, restauración capilar, supresión de la amiotrofia, o sueño, y también se usa como antioxidante, preventivo de la decoloración, preventivo del deterioro del sabor de los aditivos alimentarios. La composición para aditivos alimentarios se agrega para prevenir el deterioro de un edulcorante, un colorante, un conservante, un estabilizador espesante, un agente revelador de color, un agente blanqueador, un agente a prueba de moho, una base de goma, un agente amargante, un agente abrillantador, un acidulante, un sazonador, un agente emulsionante, un agente de refuerzo, un agente de producción, un sabor, o similar, y se puede proporcionar en forma de una formulación mixta. En otras palabras, la presente invención puede proporcionar productos alimenticios, medicamentos, cosméticos y similares, conteniendo cada uno un compuesto de inclusión de flavonoide y/o una composición de glucósidos flavonoides obtenidos de acuerdo con el método de producción de la presente invención.

Los productos alimenticios incluyen alimentos y bebidas, que incluyen, por ejemplo, complementos nutricionales, alimentos sanos, alimentos para un uso médico específico, alimentos con declaraciones de función, alimentos para terapia dietética, alimentos integrales para la salud, complementos, bebidas de té, bebidas de café, zumos, bebidas refrescantes, bebidas saludables y similares.

El medicamento incluye fármacos o cuasifármacos, y los medicamentos son preferiblemente formulaciones orales o agentes aplicables externamente por vía dérmica, y pueden estar en forma de solución, comprimido, gránulo, cápsula, jarabe, loción, spray o ungüento.

Los cosméticos pueden estar en forma de crema, loción líquida, loción de emulsión lechosa o spray.

La cantidad del compuesto de inclusión de flavonoide y/o la composición de los glucósidos flavonoides mezclados en el producto alimenticio, el medicamento o cosméticos no están particularmente limitados, y la cantidad mezclada puede diseñarse adecuadamente, con referencia a una ingesta diaria preferida de flavonoides, teniendo en cuenta la solubilidad, sabor o similar. Por ejemplo, la cantidad del compuesto de inclusión de flavonoide y/o la composición de glucósidos flavonoides obtenidos de acuerdo con el método de producción de la presente invención mezclado en la composición para alimentos como una porción de flavonoides puede ser preferiblemente del 0,001 al 30 % en masa, más preferiblemente del 0,01 al 20 % en masa, e incluso más preferiblemente del 0,02 al 10 % en masa, y la cantidad mezclada en la composición para alimentos puede determinarse de modo que el compuesto de inclusión de flavonoide y/o la composición de glucósidos flavonoides pueda ser ingerida en una cantidad preferiblemente de 10 mg a 20 g, más preferiblemente de 30 mg a 10 g, y aún más preferiblemente de 100 mg a 5 g por día a la vez o dividido en varias veces (por ejemplo, tres veces). Además, la cantidad del compuesto de inclusión de flavonoide y/o la composición de glucósidos flavonoides mezclados con la formulación de aditivos alimentarios se puede usar en una cantidad preferiblemente del 0,001 al 50 % en masa, más preferiblemente del 0,01 al 40 % en masa, e incluso más

preferiblemente del 0,1 al 30 % en masa como un volumen en el que los flavonoides exhiben efectos.

Ejemplos

5 En el presente documento, "%" significa "% en masa", a menos que se indique lo contrario en particular.

Preparación de la composición que contiene el compuesto de inclusión de flavonoide

Ejemplos 1 a 31

10 A un vaso de precipitados de 1.000 ml se añadieron un flavonoide escasamente soluble que tenía una estructura de ramnósido (rutina o hesperidina) y una ciclodextrina como se enumera en la Tabla 1 o 2, y se añadió agua a la misma para formar una masa de 1.000 g. La mezcla líquida se ajustó a 70 °C y un pH de 4. Después de eso, se añadieron
15 de 3 a 30 g de una naringinasa (Amano Enzyme Inc., 155 u/g) mientras se agitaba, y se hizo reaccionar una mezcla de reacción durante 24 horas. La temperatura se volvió a poner a temperatura ambiente, y la mezcla se filtró con un papel de filtro, para dar un compuesto de inclusión de un flavonoide sin una estructura de ramnósido (isoquercitrina o hesperetin-7-glucósido) y una ciclodextrina, y una composición que contiene un compuesto de inclusión de flavonoide que contiene una ramnosa escindida.

Ejemplos Comparativos 1 a 3

20 Cada una de las composiciones de los Ejemplos comparativos 1 y 3 se preparó de la misma manera que los Ejemplos 16 y 17, excepto que no se añadió una ciclodextrina. Además, se preparó una composición del Ejemplo comparativo 2 de la misma manera que en el Ejemplo 16, excepto que se añadió una dextrina en lugar de una ciclodextrina.

Ejemplo Comparativo 101

25 A un vaso de precipitados de 100 ml se añadieron isoquercitrina y γ -ciclodextrina como se enumera en la Tabla 1-2, cada una de las cuales se preparó de la siguiente manera, y se añadió agua a la misma para formar una masa de 100
30 g. La mezcla líquida se agitó durante 24 horas a 70 °C y un pH de 4,5. La temperatura se volvió a poner a temperatura ambiente y la mezcla se filtró con un papel de filtro, para dar una composición que contiene un compuesto de inclusión de isoquercitrina y γ -ciclodextrina.

Preparación de isoquercitrina

35 Se añadieron diez gramos de rutina usados en la Tabla 1 para obtener 100 L de una solución acuosa, y la solución se ajustó a 70 °C y un pH de 4,5. Después de eso, se añadió a la misma 1 g de una naringinasa (Amano Enzyme Inc., 155 u/g) mientras se agitaba la solución, y la mezcla líquida se recuperó y se secó, para dar 7,2 g de isoquercitrina
40 con un contenido de 96 % o más. Se confirmó que el producto era idéntico a un reactivo de isoquercitrina (Wako) por HPLC.

Ejemplos 101 a 109

45 Cada una de las composiciones que contenían un compuesto de inclusión de naringenin-7-glucósido y β -ciclodextrina se preparó de la misma manera que los Ejemplos 1 a 31, excepto que se usaron las materias primas enumeradas en la Tabla 2-2.

Ejemplo Comparativo 102

50 Se preparó una composición del Ejemplo comparativo 102 de la misma manera que en el Ejemplo 104, excepto que no se añadió ciclodextrina.

Los detalles utilizados en las Tablas 1, 1-2, 2 y 2-2 se muestran a continuación. RTN: Rutina preparada de la siguiente manera.

55 Cincuenta kilogramos de brotes de *Sophora* perteneciendo a *Fabaceae* se sumergieron en 500 l de agua caliente durante 3 horas y luego se obtuvo un filtrado después de la filtración. Después de eso, el filtrado se enfrió a temperatura ambiente y los componentes precipitados se separaron por filtración. Los precipitados se lavaron con agua, se
60 recrystalizaron y secaron, para dar 3.190 g de rutina con un contenido del 96 % o más. Se confirmó que el producto tenía picos idénticos a los de una rutina de reactivo (Wako) por HPLC.

HSP: Hesperidina (contenido: 97 % o más, fabricado por Hamari Chemicals., Ltd.)

NRG: Naringina (contenido: 95 % o más, fabricado por SIGMA)

β -CD: β -ciclodextrina (fabricado por PEARL ACE CORPORATION)

γ -CD: γ -ciclodextrina (fabricado por PEARL ACE CORPORATION)

65 Dextrina: Sandec n.º 70 (fabricado por Sanwa Starch Co., Ltd.)

Conversión porcentual de rutina a isoquercitrina

Las mezclas líquidas terminadas en reacción antes de la filtración de los ejemplos 1 a 16 y los ejemplos comparativos 1 y 2 se usaron como muestras de medición. A partir de una relación de área según HPLC (SHIMADZU) (área de pico de isoquercitrina/área de pico de rutina) en <las condiciones de HPLC:

Columna: CAPCELL PAK C18, TAMAÑO 4,6 mm X 250 mm (SHISEIDO),
 Eluyente: 20 % (v/v) de acetonitrilo/0,1 % de solución acuosa de ácido fosfórico,
 Detección: 351 nm,
 Caudal: 0,4 ml/min,
 Temperatura de la columna: 70 °C >,
 un porcentaje de conversión se calculó de la siguiente manera:

$$\text{porcentaje de conversión (\%)} = \frac{\text{área de pico de isoquercitrina} \times 100}{\text{área de pico de rutina} + \text{área de pico de isoquercitrina}}$$

Se confirmó que la isoquercitrina tenía picos idénticos a los de un reactivo isoquercitrina (Wako) por HPLC. Todas las conversiones porcentuales de los ejemplos 1 a 16 fueron del 96 % o más. Por otro lado, el porcentaje de conversión del ejemplo comparativo 1 fue tan bajo como 56 % y el porcentaje de conversión del ejemplo comparativo 2 fue tan bajo como 57%, en comparación con el ejemplo 16 con la misma cantidad de enzima.

Conversión porcentual de hesperidina a hesperetin-7-glucósido

Las mezclas líquidas terminadas en reacción antes de la filtración de los ejemplos 17 a 31 y el ejemplo comparativo 3 se usaron como muestras de medición. A partir de una relación de área de acuerdo con HPLC (SHIMADZU) (área de pico de hesperetin-7-glucósido/área de pico de hesperidina) en <las condiciones de HPLC:

Columna: CAPCELL PAK C18, TAMAÑO 4,6 mm X 250 mm (SHISEIDO),
 Eluyente: 40 % (v/v) de acetonitrilo/0,1 % de solución acuosa de ácido fosfórico,
 Detección: 280 nm,
 Caudal: 0,4 ml/min,
 Temperatura de la columna: 70 °C >,
 un porcentaje de conversión se calculó de la siguiente manera:

un porcentaje de conversión (%) = área de pico de hesperetin-7-glucósido X 100/(área de pico de rutina + área de pico de hesperetin-7-glucósido). Se confirmó que el hesperetin-7-glucósido tenía picos idénticos a los de un producto seco que NMR confirmó que era hesperetin-7-glucósido. Todas las conversiones porcentuales de los ejemplos 17 a 31 fueron del 96 % o más. Por otro lado, la conversión porcentual del ejemplo comparativo 3 era tan baja como 57 %.

Conversión porcentual de naringina a naringenin-7-glucósido

Las mezclas líquidas terminadas en reacción antes de la filtración de los ejemplos 101 a 109 y el ejemplo comparativo 102 se usaron como muestras de medición. A partir de una relación de área según HPLC (SHIMADZU) (área de pico de naringenin-7-glucósido/área de pico de naringina) en <las condiciones de HPLC:

Columna: CAPCELL PAK C18, TAMAÑO 4,6 mm X 250 mm (SHISEIDO),
 Eluyente: 25 % (v/v) de acetonitrilo/0,1 % de solución acuosa de ácido fosfórico,
 Detección: 280 nm,
 Caudal: 0,4 ml/min,
 Temperatura de la columna: 70 °C >,
 se calculó un porcentaje de conversión.

De manera específica, un porcentaje de conversión se calculó de la siguiente manera:

$$\text{porcentaje de conversión (\%)} = \frac{\text{área de pico de naringenin-7-glucósido} \times 100}{\text{área de pico de naringina} + \text{área de pico de naringenin-7-glucósido}}$$

Se confirmó que el naringenin-7-glucósido tenía picos idénticos a los de un reactivo naringenin-7-glucósido (Wako) por HPLC. Las conversiones porcentuales de los ejemplos 101 a 109 y el ejemplo comparativo 102 fueron del 95 % o más.

Concentración de isoquercitrina (IQC) (análisis de absorciometría)

Las mezclas líquidas terminadas en reacción de los ejemplos 1 a 16 y los ejemplos comparativos 1, 2 y 101 se dejaron reposar a temperatura ambiente, y luego se filtró 1 ml de sobrenadante para usar como muestras de medición. Se dibujó una curva de calibración a una absorbancia de 351 nm (solución de ácido fosfórico al 0,1 %) utilizando un reactivo de rutina (Wako), luego se calculó una concentración de rutina a partir de la absorbancia de las muestras de

medición, se obtuvo un valor calculado compensando con un porcentaje y multiplicando el producto con un factor de 0,761 (relación de peso molecular de isoquercitrina/rutina ($464,38/610,52 = 0,761$)) como una concentración de isoquercitrina. Los resultados se muestran en la tabla 1 y 1-2. En el presente documento, el porcentaje de conversión en el momento del cálculo de la concentración se calculó después de someter las mismas muestras que las del análisis de concentración a la determinación por HPLC.

Concentración de hesperetin-7-glucósido (HPT-7G) (Análisis absorciométrico)

Las mezclas líquidas terminadas en reacción de los ejemplos 17 a 31 y el ejemplo comparativo 3 se dejaron reposar a temperatura ambiente, y luego se filtró 1 ml de sobrenadante para usar como muestras de medición. Se dibujó una curva de calibración a una absorbancia de 280 nm (solución de ácido fosfórico al 0,1 %) usando un reactivo hesperidina (Wako), luego se calculó una concentración de hesperidina a partir de la absorbancia de las muestras de medición, y se calculó un valor al compensar con un porcentaje de conversión de acuerdo con el análisis de HPLC, y multiplicando el producto por un factor de 0,761 (relación de peso molecular de hesperetin-7-glucósido/hesperidina ($464,42/610,56 = 0,761$)) se obtuvo como una concentración de hesperetin-7-glucósido. Los resultados se muestran en la Tabla 2. En el presente documento, el porcentaje de conversión en el momento del cálculo de la concentración se calculó después de someter las mismas muestras que las del análisis de concentración a la medición por HPLC.

Concentración de naringenin-7-glucósido (NGN-7G) (análisis de absorciométrico)

Las mezclas líquidas terminadas en reacción de los ejemplos 101 a 109 y el ejemplo comparativo 102 se dejaron reposar a temperatura ambiente, y luego se filtró 1 ml de sobrenadante para usarse como muestras de medición. Se dibujó una curva de calibración a una absorbancia de 280 nm (solución de ácido fosfórico al 0,1 %) utilizando un reactivo naringina (fabricado por SIGMA, en adelante, NRG), luego se calculó una concentración de naringina a partir de la absorbancia de las muestras de medición, y se calculó un valor al compensar con un porcentaje de conversiones de acuerdo con el análisis de HPLC, y multiplicando el producto por un factor de 0,748 (proporción del peso molecular de naringina/naringenin-7-glucósido ($434,39/580,54 = 0,748$)) se obtuvo como una concentración de naringenin-7-glucósido. Los resultados se muestran en la Tabla 2-2. En el presente documento, el porcentaje de conversión en el momento del cálculo de la concentración se calculó después de someter las mismas muestras que las del análisis de la concentración a la determinación por HPLC.

Relación molar (CD/IQC (relación molar). CD/HPT-7G (relación molar) y CD/NGN-7G (relación molar)) (análisis de sacárido por HPLC)

Las mezclas líquidas terminadas en reacción de los ejemplos 1 a 31 y 101 a 109, y el ejemplo comparativo 101 se dejaron reposar a temperatura ambiente, y luego se filtró 1 ml de sobrenadante para usarse como muestras de medición. Se dibuja una curva de calibración con β -ciclodextrina (Wako) y γ -ciclodextrina (Wako), según el análisis de HPLC (SHIMADZU) en < Condiciones de HPLC:

Columna: Inertsil NH₂ (4,6 x 150 mm (GL Science Inc.),
Eluyente: 65 % de acetonitrilo/agua (v/v),
Detección: refractómetro diferencial, RID-10A (SHIMADZU),
Caudal: 1 ml/min,
Temperatura de la columna: 40 °C>, y

luego se calculó una concentración molar de ciclodextrina de las muestras y una relación molar de ciclodextrina/isoquercitrina, la ciclodextrina/hesperetin-7-glucósido y la ciclodextrina/naringenin-7-glucósido se calcularon con una concentración molar de isoquercitrina, hesperetin-7-glucósido y naringenin-7-glucósido. Los resultados se muestran en las Tablas 1, 1-2, 2 y 2-2. En el presente documento, la relación molar del filtrado después de la terminación de la reacción fue la misma en el caso de los productos liofilizados.

Solubilidad (solubilidad de IQC, solubilidad de HPT-7G y solubilidad de NGN-7G)

Las mezclas líquidas terminadas por reacción de los ejemplos 1 a 31 y 101 a 109, y los ejemplos comparativos 1 a 3, 101 y 102 se dejaron reposar a temperatura ambiente, luego se filtraron y se liofilizaron para dar productos secos. Los productos secos preparados anteriormente se añadieron a un vaso de precipitados de 100 ml que contenía 50 ml de agua a 50 °C con agitación hasta que los productos secos ya no se disolvieron ni precipitaron. La mezcla líquida se dejó reposar a temperatura ambiente (25 °C), luego se filtró 1 ml del sobrenadante y se calculó una concentración de isoquercitrina, una concentración de hesperetin-7-glucósido y una concentración de naringenin-7-glucósido según el análisis de absorciometría, para obtener solubilidad. Sin embargo, cuando la cantidad de productos secos era insuficiente en el momento de la determinación de la solubilidad, se realizaron repetidamente experimentos del mismo ejemplo para obtener la cantidad requerida y se midió la solubilidad. Además, se confirmó con un calorímetro de barrido diferencial (DSC), resonancia magnética nuclear (RMN) y un espectrofotómetro infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR) que en los ejemplos 1 a 31 y 101 a 109, y en el ejemplo comparativo 101 se incluyó un flavonoide con una ciclodextrina. Los resultados de la solubilidad se muestran en las Tablas 1, 1-2, 2 y 2-2. En el presente documento, los productos liofilizados de los compuestos de inclusión de flavonoide en los que se eliminó la ramnosa por diálisis del filtrado a temperatura ambiente después de la terminación de la reacción en los ejemplos 1 a 31 y 101 a 109

también mostraron casi los mismos niveles de solubilidad.

[Tabla 1]

5

Tabla 1

	(1) RTN (% en masa)	(2) β -CD (% en masa)	(3) γ -CD (% en masa)	(4) Dextrina (% en masa)	(5) CD/RTN (relación molar)	(6) Con. de IQC. (% en masa)	(7) CD/IQC (relación molar)	(8) Solubilidad de IQC (% en masa)
Ej. 1	2,0	5,6	0	0	1,5	1,5	1,5	1,6
Ej. 2	2,0	7,4	0	0	2,0	1,6	2,0	1,1
Ej. 3	3,0	11,2	0	0	2,0	2,4	1,9	1,0
Ej. 4	3,0	16,7	0	0	3,0	2,3	3,0	0,8
Ej. 5	4,0	14,9	0	0	2,0	3,0	2,0	1,2
Ej. 6	4,0	22,3	0	0	3,0	3,1	2,9	0,8
Ej. 7	4,0	0,15	0	0	0,02	0,03	2,0	1,1
Ej. 8	4,0	0	0,08	0	0,01	0,03	1,0	9,9
Ej. 9	4,0	0	7,6	0	0,9	3,0	0,9	10,2
Ej. 10	4,0	0	8,5	0	1,0	3,0	1,0	10,2
Ej. 11	4,0	0	12,7	0	1,5	3,0	1,5	8,9
Ej. 12	4,0	0	15,3	0	1,8	3,1	1,8	7,7
Ej. 13	4,0	0	17,0	0	2,0	3,1	2,0	6,4
Ej. 14	4,0	0	25,4	0	3,0	3,0	3,0	4,2
Ej. 15	4,0	0	33,9	0	4,0	3,1	4,0	3,2
Ej. 16	8,0	0	17,0	0	1,0	6,2	1,0	9,6
Ej. comp. 1	8,0	0	0	0	-	0,01	-	0,01
Ej. comp. 2	8,0	0	0	17,0	-	0,01	-	0,01

Notas de la tabla 1

- (1) Concentración de rutina en el momento del comienzo de la reacción (% en masa)
- (2) Concentración de β -ciclodextrina en el momento del comienzo de la reacción (% en masa)
- (3) Concentración de γ -ciclodextrina en el momento del comienzo de la reacción (% en masa)
- (4) Concentración de dextrina en el momento del comienzo de la reacción (% en masa)
- (5) Ciclodextrina/rutina en el momento del comienzo de la reacción (relación molar)
- (6) Concentración de isoquercitrina del filtrado después de la terminación de la reacción (% en masa)
- (7) Ciclodextrina/isoquercitrina del filtrado después de la terminación de la reacción (relación molar)
- (8) Solubilidad en isoquercitrina del producto liofilizado del filtrado después de la terminación de la reacción (% en masa)

[Tabla 1-2]

Tabla 1-2

	(11) IQC (% en masa)	(12) γ -CD (% en masa)	(13) CD/IQC (relación molar)	(14) Con. de IQC. (% en masa)	(15) CD/IQC (relación molar)	(16) Solubilidad de IQC (% en masa)
Ej. comp. 101	3,0	8,4	1,0	0,36	8,4	0,8

Notas de la tabla 1-2

(11) Concentración de isoquercitrina en el momento del comienzo del calentamiento mientras se agita (% en masa)

(12) Concentración de γ -ciclodextrina en el momento del comienzo del calentamiento mientras se agita (% en masa)

(13) Ciclodextrina/isoquercitrina en el momento del comienzo del calentamiento mientras se agita (relación molar)

(14) Concentración de isoquercitrina del filtrado después de calentar mientras se agita (% en masa)

(15) Ciclodextrina/isoquercitrina del filtrado después de calentar mientras se agita (relación molar)

(16) Solubilidad en isoquercitrina del producto liofilizado del filtrado después de calentar mientras se agita (% en masa)

- 5 Como se desprende de la Tabla 1, podría verse que un compuesto de inclusión de isoquercitrina y una ciclodextrina se puede obtener de manera eficiente junto con la reacción de escisión de ramnosa a partir de rutina de acuerdo con el método de producción de la presente invención. Por otro lado, los ejemplos comparativos 1 y 2 tuvieron bajas conversiones porcentuales y también bajas solubilidades. En el presente documento, las mezclas líquidas de reacción y las mezclas líquidas terminadas en reacción de los ejemplos 7 y 8 y los ejemplos comparativos 1 a 3 estaban en estado suspendido. Sin embargo, las mezclas líquidas de reacción de los Ejemplos 1 a 6 y 9 a 16 estaban en estado suspendido en una etapa temprana de la reacción y una etapa media de la reacción, pero las mezclas líquidas de reacción se disolvieron en el momento de la terminación de la reacción y el tiempo posterior de permitir que las mezclas líquidas de reacción reposaran a temperatura ambiente. Por lo tanto, el porcentaje de inclusión de un compuesto de inclusión de isoquercitrina-ciclodextrina (concentración de isoquercitrina en un compuesto de inclusión (concentración de filtrado que se deja reposar a temperatura ambiente después de la terminación de la reacción) x 100/concentración de isoquercitrina en la mezcla líquida terminada en reacción (mezcla líquida antes de la filtración)) fue casi del 100 %. Sin embargo, como el ejemplo comparativo 101 de la tabla 1-2, la simple mezcla y calentamiento de isoquercitrina y γ -ciclodextrina de la misma composición que el ejemplo 10 siempre estaría en estado suspendido desde el principio hasta el final de la reacción, y la relación de inclusión (concentración de isoquercitrina en un compuesto de inclusión (concentración de filtrado que se deja reposar a temperatura ambiente después de la terminación de la reacción) x 100/concentración de isoquercitrina en la mezcla líquida terminada en reacción (mezcla líquida antes de la filtración)) también fue tan baja como 12 %, y también la solubilidad del producto liofilizado del filtrado fue baja.

[Tabla 2]

25

Tabla 2

	(21) HSP (% en masa)	(22) β -CD (% en masa)	(23) γ -CD (% en masa)	(24) CD/HSP (relación molar)	(25) Con. de HPT-7G. (% en masa)	(26) CD/HPT-7G (relación molar)	(27) Solubilidad de HPT-7G (% en masa)
Ej. 17	3,0	0,08	0	0,01	0,022	1,5	3,5
Ej. 18	3,0	7,3	0	1,3	2,3	1,3	3,8
Ej. 19	3,0	8,4	0	1,5	2,3	1,5	3,6
Ej. 20	3,0	11,2	0	2,0	2,3	2,0	2,8
Ej. 21	3,0	16,7	0	3,0	2,3	3,0	2,0
Ej. 22	4,0	11,2	0	1,5	2,9	1,6	3,5
Ej. 23	4,0	14,9	0	2,0	3,0	2,0	2,7
Ej. 24	2,0	0	6,4	1,5	1,4	1,6	4,0
Ej. 25	2,0	0	8,5	2,0	1,6	1,9	3,8
Ej. 26	4,0	0	0,08	0,01	0,015	2,0	3,7

(continuación)

	(21) HSP (% en masa)	(22) β -CD (% en masa)	(23) γ -CD (% en masa)	(24) CD/HSP (relación molar)	(25) Con. de HPT-7G. (% en masa)	(26) CD/HPT-7G (relación molar)	(27) Solubilidad de HPT-7G (% en masa)
Ej. 27	4,0	0	12,7	1,5	3,1	1,5	4,2
Ej. 28	4,0	0	17,0	2,0	2,9	2,1	3,7
Ej. 29	5,0	0	15,9	1,5	3,7	1,5	4,1
Ej. 30	5,0	0	21,2	2,0	3,9	1,9	3,8
Ej. 31	5,0	0	31,8	3,0	3,8	3,0	2,7
Ej. comp. 3	3,0	0	0	-	0,007	-	0,007

Notas de la tabla 2

(21) Concentración de hesperidina en el momento del comienzo de la reacción (% en masa)

(22) Concentración de β -ciclodextrina en el momento del comienzo de la reacción (% en masa)(23) Concentración de γ -ciclodextrina en el momento del comienzo de la reacción (% en masa)

(24) Ciclodextrina/hesperidina en el momento del comienzo de la reacción (relación molar)

(25) Concentración de hesperetin-7-glucósido del filtrado después de la terminación de la reacción (% en masa)

(26) Ciclodextrina/hesperetin-7-glucósido del filtrado después de la terminación de la reacción (relación molar)

(27) Solubilidad de hesperetin-7-glucósido del producto liofilizado del filtrado después de la terminación de la reacción (% en masa)

Tal como resulta evidente a partir de la Tabla 2, se pudo ver que un compuesto de inclusión de hesperetin-7-glucósido y una ciclodextrina se obtuvo eficientemente junto con la reacción de escisión de ramnosa a partir de hesperidina de acuerdo con el método de producción de la presente invención. Por otro lado, el ejemplo comparativo 3 tenía un bajo porcentaje de conversión y también una baja solubilidad. En el presente documento, las mezclas líquidas de reacción y las mezclas líquidas terminadas en reacción de los ejemplos 17 y 26, y el ejemplo comparativo 3 estaban en estado suspendido. Sin embargo, las mezclas líquidas de reacción de los ejemplos 18 a 25, y los ejemplos 27 a 31 estaban en estado suspendido en una etapa temprana de la reacción y una etapa media de la reacción, pero las mezclas líquidas de reacción se disolvieron en el momento de la terminación de la reacción y en el momento en que la mezcla líquida se dejó reposar a temperatura ambiente. Además, el porcentaje de inclusión en el que se formó un compuesto de inclusión de hesperetin-7-glucósido-ciclodextrina (concentración de hesperetin-7-glucósido en el compuesto de inclusión (concentración del filtrado que se deja reposar a temperatura ambiente después de la terminación de la reacción) x 100/concentración de hesperetin-7-glucósido del líquido terminado en reacción (mezcla líquida antes de la filtración) fue casi del 100 %.

15

[Tabla 2-2]

Tabla 2-2

	(31) NRG (% en masa)	(32) β -CD (% en masa)	(33) CD/NGR (relación molar)	(34) Con. de NGN-7G. (% en masa)	(35) CD/NGN- 7G (relación molar)	(36) Solubilidad de NGN-7G (% en masa)
Ej. 101	1,0	2,0	1,0	0,75	1,0	10,1
Ej. 102	1,0	3,9	2,0	0,75	2,0	5,5
Ej. 103	1,0	5,9	3,0	0,75	3,0	3,7
Ej. 104	2,0	3,9	1,0	1,5	1,0	10,6
Ej. 105	2,0	7,8	2,0	1,5	2,0	5,2
Ej. 106	2,0	11,8	3,0	1,5	3,0	3,5
Ej. 107	4,0	7,8	1,0	3,0	1,0	10,5
Ej. 108	5,0	9,8	1,0	3,7	1,0	10,3

(continuación)

	(31) NRG (% en masa)	(32) β -CD (% en masa)	(33) CD/NRG (relación molar)	(34) Con. de NGN-7G. (% en masa)	(35) CD/NGN- 7G (relación molar)	(36) Solubilidad de NGN-7G (% en masa)
Ej. 109	6,0	11,8	1,0	4,5	1,0	10,7
Ej. comp. 102	2,0	0	0	0,3	0	0,2

Notas de la tabla 2-2
 (31) Concentración de naringina en el momento del comienzo de la reacción (% en masa)
 (32) Concentración de β -ciclodextrina en el momento del comienzo de la reacción (% en masa)
 (33) Ciclodextrina/naringina en el momento del comienzo de la reacción (relación molar)
 (34) Concentración de naringenin-7-glucósido del filtrado después de la terminación de la reacción (% en masa)
 (35) Ciclodextrina/naringenin-7-glucósido del filtrado después de la terminación de la reacción (relación molar)
 (36) Solubilidad en naringenin-7-glucósido del producto liofilizado del filtrado después de la terminación de la reacción (% en masa)

Como se desprende de la Tabla 2-2, de acuerdo con el método de producción de la presente invención, se obtuvo eficientemente un compuesto de inclusión de naringenin-7-glucósido y β -ciclodextrina junto con la reacción de escisión de ramnosa a partir de naringina, y también se mejoró la solubilidad. Aunque el ejemplo comparativo 102 tuvo un porcentaje de conversión del 95 % o más, dado que se formaron precipitados inmediatamente después de que la mezcla líquida se dejó reposar a temperatura ambiente después de la terminación de la reacción, la solubilidad fue baja. Sin embargo, después de la terminación de las reacciones de los ejemplos 101 a 109, los filtrados que se dejaron reposar a temperatura ambiente se disolvieron, y el porcentaje de inclusión en el que se formó un compuesto de inclusión de naringenin-7-glucósido-ciclodextrina (concentración de naringenin-7-glucósido en el compuesto de inclusión (concentración del filtrado que se permite permanecer a temperatura ambiente después de la terminación de la reacción) x 100/concentración de naringenin-7-glucósido de la mezcla líquida terminada en reacción (mezcla líquida antes de la filtración) fue casi del 100 %.

Relación molar en la composición que contiene compuestos de inclusión de flavonoide (ramnosa/flavonoide)

Además, se midió el contenido de ramnosa de los filtrados después de la terminación de la reacción de los ejemplos 18 a 25, 27 a 31 y 101 a 109 (se dibujó una curva de calibración con ramnosa (Wako) en las mismas condiciones que el análisis de sacáridos por HPLC), luego se calculó una concentración molar de ramnosa. Como resultado, una relación molar con flavonoide en un compuesto de inclusión (ramnosa/flavonoide) fue de 0,8 a 1,2.

Evaluaciones del sabor del compuesto de inclusión de flavonoide

Cien mililitros de cada una de las mezclas líquidas terminadas en reacción de los ejemplos 10 a 15 se colocaron en una membrana de diálisis (Spectra/Por CE, tubo de diálisis, MWCO 500/-1000, fabricado por Funakoshi), la diálisis se realizó en 10 l de agua (intercambiada cinco veces con agua a 10 °C) para eliminar la ramnosa, y cada mezcla líquida se liofilizó, para dar de 10 g a 30 g de productos secos. Los productos secos obtenidos se añadieron a un agua carbonatada disponible comercialmente (sin azúcar) ("*Minami-Alps Tennensui, Sparkling*", fabricado por Suntory), bebida de café (sin azúcar) ("*Wonda Gold Black*", fabricado por Asahi Soft Drinks Co., Ltd.) y té verde ("*Oi Ocha*" fabricado por Ito En Ltd.) en una concentración, que es un valor calculado como 0,1 % en masa en términos de conversión de isoquercitrina, y cinco panelistas realizaron evaluaciones sensoriales (sabor desagradable y dulzura) utilizando un producto sin aditivos como control. De acuerdo con los siguientes criterios de evaluación, se calculó una puntuación promedio de cada uno. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

Criterios de evaluación de sabor desagradable

- 1: Sabor fuertemente desagradable
- 2: Sabor ligeramente fuerte desagradable
- 3: Sabor desagradable
- 4: Sabor ligeramente desagradable
- 5: Sabor no desagradable

Criterios de evaluación de dulzura

- 1: Sabor dulce fuerte

2: Sabor dulce ligeramente fuerte

3: Sabor dulce

5

4: Sabor ligeramente dulce

5: Sabor no dulce

10 [Tabla 3]

Tabla 3

	γ CD/IQC (relación molar)	Bebida carbonatada		Bebida de café		Té verde	
		Sin sabor	Dulce	Sin sabor	Dulce	Sin sabor	Dulce
Ej. 10	1,0	4,1	4,0	4,0	3,9	4,1	4,0
Ej. 11	1,5	4,0	3,9	3,8	3,7	4,0	4,0
Ej. 12	1,8	3,7	3,6	3,8	3,7	3,5	3,4
Ej. 13	2,0	1,3	2,6	1,3	2,5	1,4	2,7
Ej. 14	3,0	1,3	2,2	1,2	2,3	1,3	2,4
Ej. 15	4,0	1,1	1,9	1,1	2,1	1,1	1,9

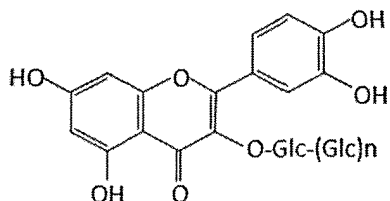
15 Tal como resulta evidente a partir de la Tabla 3, se puede ver que cuando los productos tienen relaciones molares (γ CD/IQC) de 1,0 a 1,8, el sabor desagradable y la dulzura se reducen en comparación con los que tienen relaciones molares de 2,0 a 4,0, de modo que los productos sean preferidos, desde el punto de vista de reducir los efectos a los sabores de alimentos como las bebidas. Además, aunque no se muestra en la tabla, cuando se trata de un compuesto de inclusión de hesperetin-7-glucósido, cuando la relación molar (CD/HPT-7G) es de 1,0 a 1,9, el sabor desagradable (sabor diferente del sabor del producto sin aditivos) y la dulzura se reducen en comparación con aquellos que tienen relaciones molares de 2,0 a 3,0, de modo que los productos puedan ser utilizados adecuadamente en los productos alimenticios.

Preparación de la composición de glucósidos flavonoides

25 Ejemplos 32 a 39

Se añadió una pequeña cantidad de un álcali a la mezcla líquida de reacción preparada en el ejemplo 4 (70 °C, pH 4,5 y concentración de isoquercitrina: 2,3 % en masa) para ajustar su pH de 6,5 a 60 °C. Después de eso, 20 g de ciclodextrina glucanotransferasa (CGTasa: Amano Enzyme Inc., nombre comercial "Contizyme" 600 U/ml) se añadieron a la misma para iniciar la reacción, y la reacción se mantuvo durante 24 horas. La mezcla líquida de reacción obtenida se esterilizó y filtró térmicamente, y la mezcla líquida de reacción se liofilizó, para dar 158 g de una composición de glucósidos de isoquercitrina que contienen un compuesto representado por la fórmula general (1) (Muestra 1). La solubilidad de la composición obtenida de glucósidos de isoquercitrina (muestra 1) en agua fue un valor calculado como 2,7 %, en términos de conversión de isoquercitrina. La composición obtenida de glucósidos de isoquercitrina (muestra 1) se disolvió en agua, luego se permitió que la solución fluyera a través de una columna empacada con Diaion HP-20 (resina de adsorción sintética porosa, fabricada por Mitsubishi Chemical Corporation), para permitir que la composición de glucósidos de isoquercitrina se adsorba a la columna, y la columna se lavó con agua en un volumen dos veces mayor que la resina para eliminar sacáridos tales como ramnosa de la columna. Después de eso, la solución eluida en la que el componente adsorbido se eluyó con un 65 % (v/v) de etanol en un volumen dos veces mayor que el de la resina se concentró, y los componentes concentrados se liofilizaron luego, para dar una composición de glucósidos del ejemplo 39. El cromatograma de HPLC del Ejemplo 39 se muestra en la figura 1. Los resultados fueron los mismos que los del cromatograma de HPLC de la muestra 1. Además, la composición de glucósidos de isoquercitrina (muestra 1) se adsorbió y se lavó con agua de la misma manera que en el ejemplo 39, y la composición se eluyó luego con etanol a una concentración de 10 a 60 % (v/v). Las soluciones en las que se ajustó una relación molar combinando esas soluciones eluidas (10, 20, 30, 40, 50 y 60 % (v/v) soluciones eluidas) se concentraron y luego se liofilizaron, para dar composiciones de glucósidos de los ejemplos 32 a 38. La solubilidad de las composiciones de glucósidos de los ejemplos 32 a 39 en agua fue un valor calculado como 10 % o más, en términos de conversión de isoquercitrina. En el presente documento, en el momento de la reacción de transglucosilación, cuando se prepararon mezclas líquidas de reacción a pH de 7,5 y 8,5 con la misma cantidad de enzima, se produjeron las composiciones de glucósidos de isoquercitrina en casi las mismas cantidades. Sin embargo, el color de la solución se volvió marrón oscuro debido a una descomposición parcial del flavonoide, de modo que se usó la composición a un pH de 6,5. En el presente documento, también en las mezclas líquidas de reacción preparadas en los ejemplos 1 a 3 y 10 a 16, se produjeron composiciones de glucósidos de isoquercitrina que tenían el mismo cromatograma de HPLC

que la Muestra 1 (Figura 1) en las mismas condiciones.

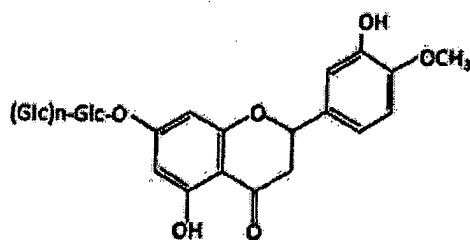


(1)

5 donde en la fórmula general (1), Glc significa un residuo de glucosa, y n significa un número entero de 0 o 1 o más.

Ejemplos 40 a 46

10 Se añadió una pequeña cantidad de un álcali a la mezcla líquida de reacción preparada en el ejemplo 22 (70 °C, pH 4,5, concentración de hesperetin-7-glucósido: 2,9 % en masa) para ajustar su pH de 6,5 a 60°. Después de eso, 5 g de ciclodextrina gluconotransferasa (CGTasa: Amano Enzyme Inc., nombre comercial "Contizyme" 600 U/ml) se añadieron a la misma para iniciar la reacción, y la reacción se mantuvo durante 24 horas. La mezcla líquida de reacción obtenida se esterilizó y filtró térmicamente, y la mezcla líquida de reacción se secó luego por pulverización, para dar 136 g de una composición de glucósidos de hesperetin-7-glucósido que contiene un compuesto representado por la 15 fórmula general (2) (muestra 2). La solubilidad de la composición obtenida de glucósidos de hesperetin-7-glucósido (muestra 2) en agua fue un valor calculado como 5,1 %, en términos de conversión de hesperetin-7-glucósido. La composición de glucósidos de hesperetin-7-glucósido obtenida (muestra 2) se disolvió en agua, luego se permitió que la solución fluyera a través de una columna empacada con Diaion HP-20 (resina de adsorción sintética porosa, fabricada por Mitsubishi Chemical Corporation), para permitir que la composición de glucósidos de hesperetin-7-glucósido se adsorba a la columna, y la columna se lavó con agua en un volumen dos veces mayor que el de los 20 sacáridos como la ramnosa de la columna. Después de eso, la solución eluida en la que el componente adsorbido se eluyó con un etanol al 65 % (v/v) en volumen dos veces mayor que la resina se concentró, y los componentes concentrados se liofilizaron, para dar una composición de glucósidos del ejemplo 40. El cromatograma de HPLC del ejemplo 40 se muestra en la figura 2. Los resultados fueron los mismos que los del cromatograma de HPLC de la muestra 2. Además, la composición de glucósidos de hesperetin-7-glucósido (muestra 2) se adsorbió y se lavó con agua de la misma manera que en el ejemplo 40, y la composición se eluyó con etanol a una concentración de 10 a 25 60 % (v/v) que se usó en elución. Las soluciones en las que se ajustó una relación molar combinando esas soluciones eluidas (10, 20, 30, 40, 50 y 60 % (v/v) de soluciones eluidas) se concentraron y luego se liofilizaron, para dar composiciones de glucósidos de los ejemplos 41 a 46. La solubilidad de las composiciones de glucósidos de los ejemplos 40 a 46 en agua fue un valor calculado como 10 % o más, en términos de conversión de hesperetin-7-glucósido. En el presente documento, en el momento de la reacción de transglicosilación, cuando se prepararon mezclas líquidas de reacción a pH de 7,5 y 8,5 con la misma cantidad de enzima, se produjeron las composiciones de glucósidos de hesperetin-7-glucósido en las mismas cantidades. Sin embargo, el color de la solución se volvió marrón oscuro debido a una descomposición parcial del flavonoide, de modo que se usó la composición a un pH de 6,5. En el presente documento, también en las mezclas líquidas de reacción preparadas en los ejemplos 21, 23 y 27 a 31, se produjeron composiciones de glucósidos de isoquercitrina que tenían el mismo cromatograma de HPLC que la muestra 2 (figura 2) en las mismas condiciones.



(2)

40 donde en la fórmula general (2), Glc significa un residuo de glucosa, y n significa un número entero de 0 o 1 o más.

Solubilidad (valor calculado como IQC, valor calculado como HPT-7G)

45 Las solubilidades de las muestras 1 y 2, y las composiciones de glucósidos flavonoides de los ejemplos 32 a 46 se obtuvieron calculando una concentración de isoquercitrina y una concentración de hesperetin-7-glucósido de acuerdo con los mismos métodos que los de la solubilidad de IQC y la solubilidad de HPT-7G mencionada anteriormente para definir un valor calculado en términos de conversión de isoquercitrina y un valor calculado en términos de conversión

de hesperetin-7-glucósido. En el presente documento, las composiciones en las que cada valor calculado fue del 10 % o más y no se observaron precipitados se describieron como composiciones que tienen una solubilidad del 10 % o más.

- 5 Las relaciones molares (%) en las composiciones de glucósidos flavonoides de los ejemplos 32 a 46 se calcularon de acuerdo con la siguiente fórmula a partir de los resultados analíticos en las siguientes condiciones de HPLC (SIMADZU). Los resultados se muestran en la Tabla 4. En el presente documento, cada pico de $n = 0$ a $n = 7$ en las figuras 1 y 2 se analizaron por LC/MS (espectroscopía de masas por cromatografía líquida, SHIMADZU), para confirmar la cantidad de glucósidos.

10

$$\text{Relación molar (\%)} = \frac{\text{cada área pico de composición de glucósidos flavonoides} \times 100}{\text{área pico total de composición de glucósidos flavonoides}}$$

<Condiciones de HPLC: Ejemplos 32 a 39 >

15

Columna: CAPCELL PAK C18, TAMAÑO 4,6 mm X 250 mm (SHISEIDO)
 Eluyente: agua/acetonitrilo/ácido fosfórico = 799/200/1 (relación de volumen)
 Detección: Análisis de absorción a longitud de onda de 351 nm
 Caudal: 0,4 ml/min
 Temperatura de la columna: 70 °C

20

<Condiciones de HPLC: Ejemplos 40 a 46 >

25

Columna: CAPCELL PAK C18, TAMAÑO 4,6 mm X 250 mm (SHISEIDO)
 Eluyente: agua/acetonitrilo/ácido fosfórico = 849/150/1 (relación de volumen)
 Detección: Análisis de absorción a longitud de onda de 280 nm
 Caudal: 0,4 ml/min
 Temperatura de la columna: 70 °C

30

Evaluaciones de sabores de composiciones de glucósidos flavonoides

35

Los productos liofilizados de las composiciones de glucósidos flavonoides de los ejemplos 32 a 46 se añadieron a una solución de azúcar ácida (pH 3,1, Brix 10°) de modo que los términos calculados de concentración de isoquercitrina fueron 0,05 % (ejemplos 32 a 39) o los términos calculados de concentración de hesperetin-7-glucósido fue del 0,05 % (ejemplos 40 a 46). Siete panelistas hicieron evaluaciones sensoriales (amargor, acritud y astringencia). De acuerdo con los siguientes criterios de evaluación, se calculó cada puntuación promedio. En el presente documento, se hicieron comparaciones definiendo las puntuaciones de evaluación para el amargor, acritud y astringencia en una solución de azúcar ácida que contiene isoquercitrina al 0,05 % preparada en el ejemplo comparativo 101 (solución inmediatamente después de la preparación) como una puntuación más fuerte de 1. Además, ya que en la solución de azúcar ácida que contiene isoquercitrina al 0,05 %, no se observaron precipitados durante 30 minutos a temperatura ambiente después de la preparación, las evaluaciones sensoriales se llevaron a cabo durante ese tiempo. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

40

Criterios de evaluación de amargor

45

- 1: Sabor amargo fuerte
- 2: Sabor amargo ligeramente fuerte
- 3: Sabor amargo
- 4: Sabor ligeramente amargo
- 5: Sabor no amargo

50

Criterios de evaluación de acritud

55

- 1: Sabor fuertemente acre
- 2: Sabor acre levemente fuerte
- 3: Sabor acre
- 4: Sabor ligeramente acre
- 5: Sabor no acre

60

Criterios de evaluación de astringencia

65

- 1: Sabor astringente fuerte
- 2: Sabor astringente ligeramente fuerte
- 3: Sensación astringente
- 4: Sabor ligeramente astringente
- 5: Sabor no astringente

[Tabla 4]

Tabla 4

	Figuras numéricas de n en fórmulas generales (1) y (2) (relación molar (%))								Amargor	Acritud	Astringencia
	0	1	2	3	4	5	6	7 o más			
Ej. 32	47,3	14,4	10,6	7,8	5,6	7,3	6,0	1,0	1,5	1,2	1,5
	47,3	32,8			19,9						
Ej. 33	9,0	27,7	23,2	20,1	6,8	5,2	8,0	0,0	1,8	1,8	1,9
	9,0	71,0			20,0						
Ej. 34	31,0	23,6	22,1	10,1	5,9	5,9	0,9	0,5	1,9	1,6	2,0
	31,0	55,8			13,2						
Ej. 35	22,0	21,0	23,0	13,0	8,5	5,0	3,1	4,4	1,9	2,5	1,8
	22,0	57,0			21,0						
Ej. 36	27,0	18,0	13,0	7,0	12,7	13,2	4,9	4,2	4,2	4,1	3,9
	27,0	38,0			35,0						
Ej. 37	18,2	20,0	18,0	18,0	8,1	6,9	6,7	4,1	2,0	2,1	2,2
	18,2	56,0			25,8						
Ej. 38	20,9	14,7	12,8	11,1	8,8	7,3	6,1	18,2	4,8	4,5	3,9
	20,9	38,5			40,6						
Ej. 39	16,2	14,7	13,9	12,1	9,1	7,9	6,7	19,3	4,0	4,9	4,8
	16,2	40,7			43,1						
Ej. 40	19,5	16,2	13,8	10,9	9,5	7,0	5,5	17,6	4,1	4,0	4,1
	19,5	40,9			39,6						
Ej. 41	15,1	17,3	16,3	12,7	8,4	7,0	5,0	18,2	4,2	4,3	4,2
	15,1	46,3			38,6						
Ej. 42	8,0	25,0	20,0	14,8	7,5	5,9	4,7	14,1	2,3	2,5	2,5
	8,0	59,8			32,2						
Ej. 43	22,0	20,6	17,0	16,5	7,0	5,5	5,0	6,4	1,9	2,0	2,1
	22,0	54,1			23,9						
Ej. 44	35,0	21,3	18,1	12,6	4,3	3,0	2,7	3,0	1,9	2,1	1,8
	35,0	52,0			13,0						
Ej. 45	46,7	17,2	9,3	4,6	5,0	4,1	4,8	8,3	1,2	1,3	1,5
	46,7	31,1			22,2						
Ej. 46	13,4	29,8	28,2	16,7	2,2	1,5	2,2	6,0	1,8	1,9	1,8
	13,4	74,7			11,9						

5 Tal como resulta evidente a partir de la Tabla 4, las composiciones de glucósidos de los ejemplos 36, 38, 39, 40 y 41 en las que el contenido de glucósidos que tienen n = 0 es 10 % en moles o más y 30 % en moles o menos, el contenido de glucósidos que tienen n = 1 a 3 es del 50 % en moles o menos, y el contenido de glucósidos que tienen n = 4 o más es del 30 % en moles o más en las fórmulas generales (1) y (2) han reducido significativamente el amargor, la acritud y la astringencia en las evaluaciones sensoriales con soluciones ácidas de azúcar, de modo que las

10

composiciones puedan usarse adecuadamente en las aplicaciones de productos alimenticios. En el presente documento, como todas las composiciones de glucósidos de los ejemplos 32 a 46 tienen excelentes solubilidades, estas composiciones pueden usarse adecuadamente en aplicaciones irrelevantes de sabores, por ejemplo, aplicaciones de cosméticos y similares. Además, aunque no se muestra en las tablas, en cuanto a las composiciones de glucósidos de naringenin-7-glucósido obtenidas usando las mezclas líquidas de reacción preparadas en los ejemplos 104 a 106, el amargor, la acritud y la astringencia se redujeron significativamente de acuerdo con las evaluaciones sensoriales mediante una concentración de un valor calculado como 0,05 % en términos de conversión de naringenin-7-glucósido en una solución de azúcar ácida cuando el contenido de glucósidos que tienen n = 0 es 10 % en moles o más y 30 % en moles o menos, el contenido de glucósidos que tienen n = 1 a 3 es 50 % en moles o menos, y el contenido de glucósidos que tienen n = 4 o más es 30 % en moles o más.

Relación molar en composiciones de glucósidos flavonoides (ramnosa/flavonoide)

La relación molar de una concentración molar calculada después de las mediciones del contenido de ramnosa de las muestras 1 y 2 (se dibujó una curva de calibración con ramnosa (WAKO) en las mismas condiciones que el análisis de sacárido por HPLC), a una concentración molar calculada a partir de un valor calculado en términos de conversión de isoquercitrina y un valor calculado en términos de conversión de hesperetin-7-glucósido (ramnosa/flavonoide) fue de 0,8 a 1,2.

Evaluaciones de efectos de prevención de decoloración

Una composición que contiene un compuesto de inclusión de flavonoide del ejemplo 16 y una composición de glucósidos flavonoides del ejemplo 39 se añadieron a una solución de azúcar ácida que contiene formulación de color de col roja al 0,05 % (pH 3,0) para tener una concentración del 0,005 % calculada en términos de conversión de isoquercitrina. La mezcla se sometió a un tratamiento con medidor de decoloración ultravioleta durante 4 horas, y luego se comparó un porcentaje residual de color. Como resultado, los efectos de prevención de la decoloración se observaron en comparación con un producto sin aditivos. Los resultados se muestran en la Tabla 5.

[Tabla 5]

Tabla 5

	Porcentaje de color residual (%)
Ejemplo 16	96
Ejemplo 39	95
Producto sin aditivos	56

Tal como resulta evidente a partir de la Tabla 5, los efectos que previenen la decoloración contra el color de la col roja se observaron en la composición que contiene el compuesto de inclusión isoquercitrin-γ-ciclodextrina y la composición de glucósidos de isoquercitrina.

Evaluaciones de los efectos de prevenir el deterioro del sabor (leche) Se colocaron cien mililitros de una mezcla líquida terminada en reacción del Ejemplo 16 en una membrana de diálisis (Spectra/Por CE, tubo de diálisis, MWCO 500/1000, fabricado por Funakoshi), La diálisis se realizó en 10 l de agua (intercambiada cinco veces con agua a 10 °C) para eliminar la ramnosa, y la solución se liofilizó para dar 22 g de productos secos. Los productos secos obtenidos y la composición de glucósidos flavonoides del ejemplo 39 se añadieron a una leche disponible comercialmente (3,5 % de grasa láctea, "Meiji Nyugyo", fabricado por Meiji Co., Ltd.) para tener una concentración de un valor calculado como 0,005 % en términos de conversión de isoquercitrina en una botella de vidrio transparente de 100 ml. Los sabores después de la iluminación de la lámpara fluorescente (20.000 lx, 5 horas, 10 °C) se compararon como una puntuación promedio de diez panelistas de acuerdo con los siguientes criterios de evaluación. Como resultado, se observaron los efectos para prevenir el deterioro del sabor. Los resultados se muestran en la Tabla 6.

< Criterios de evaluación >

- 1: Cambio notable del producto no iluminado
- 2: Cambio considerable del producto no iluminado
- 3: Cierta cambio del producto no iluminado
- 4: Cambio muy ligero del producto no iluminado
- 5: Sin cambio del producto no iluminado

[Tabla 6]

Tabla 6

	Efectos de prevenir el deterioro del sabor (leche)
Ejemplo 16	3,8
Ejemplo 39	3,9
Producto sin aditivos	2,2

5 Tal como resulta evidente a partir de la Tabla 6, Los efectos de prevenir el deterioro del sabor se observaron en la leche con un compuesto de inclusión de isoquercitrin- γ -ciclodextrina y una composición de glucósidos de isoquercitrina.

Evaluaciones de los efectos de prevenir el deterioro del sabor (gelatina)

10 Gelatina de pomelo, un producto sin aditivos, se preparó usando 0,5 % de zumo de pomelo (1/6), 3 % de gelatina, 1 % de saco de zumo de pomelo, 6 % de maltitol y 0,025 % de formulación de color amarillo cártamo como materia prima. Se colocaron cien mililitros de la mezcla líquida terminada en reacción del ejemplo 22 o 28 en una membrana de diálisis (Spectra/Por CE, tubo de diálisis, MWCO 500/-1000, fabricado por funakoshi), La diálisis se llevó a cabo en 10 l de agua (intercambiada cinco veces con agua a 10 °C) para eliminar la ramnosa, y la solución se liofilizó para dar 12 g de productos secos del ejemplo 22 y 16 g de productos secos del ejemplo 28. Cada uno de los productos secos obtenidos y la composición de glucósidos flavonoides del ejemplo 40 se añadieron a la gelatina de pomelo, el producto sin aditivos, para tener una concentración de un valor calculado como 0,005 % en términos de conversión de hesperetin-7-glucósido para dar una gelatina de pomelo que es un producto que incluye aditivos, respectivamente. Después de eso, la gelatina se calentó a 93 °C, el producto calentado se introdujo en una botella de vidrio transparente y estos contenidos se sellaron herméticamente en la botella, y la botella se enfrió y se almacenó durante un mes en una habitación que se iluminó con una lámpara fluorescente normal a temperatura ambiente. Después de eso, diez panelistas compararon el sabor en puntuaciones promedio de acuerdo con los siguientes criterios de evaluación. Como resultado, se observaron los efectos de prevenir el deterioro del sabor en cada producto que incluye aditivos. Los resultados se muestran en la Tabla 7.

25 < Criterios de evaluación >

- 30 1: Cambio notable del producto no iluminado
2: Cambio considerable del producto no iluminado
3: Cierta cambio del producto no iluminado
4: Cambio ligero del producto no iluminado
5: Producto no iluminado sin cambios

[Tabla 7]

Tabla 7

	Efectos de prevenir el deterioro del sabor (gelatina)
Ejemplo 22	4,1
Ejemplo 28	4,0
Ejemplo 40	4,2
Producto sin aditivos	1,9

35 Tal como resulta evidente a partir de la Tabla 7, los efectos de prevenir el deterioro del sabor en la gelatina de pomelo se observaron con un compuesto de inclusión de hesperetin-7-glucósido- β -ciclodextrina, un compuesto de inclusión de hesperetin-7-glucósido- γ -ciclodextrina y una composición de glucósidos de hesperetin-7-glucósido.

Evaluación de la estabilidad de almacenamiento (solución de azúcar ácida)

40 La isoquercitrina preparada en el ejemplo comparativo 101, la composición que contiene el compuesto de inclusión de flavonoide del ejemplo 16 y la composición de glucósidos flavonoides del ejemplo 39 se disolvieron en una solución de azúcar ácida que tiene un pH de 3 compuesto por las siguientes composiciones para tener una concentración calculada como 0,03 % en términos de conversión de isoquercitrina, y la solución se sometió a llenado en paquete caliente en una botella de vidrio de 100 ml (93 °C). Después de enfriar el aire, las soluciones preparadas se dejaron reposar durante 4 meses en condiciones de 4 °C, 25 °C y 40 °C, respectivamente, y se observó visualmente la presencia o ausencia de los precipitados. Las soluciones que eran transparentes en las que no se observaron los precipitados se evaluaron como O y aquellas en las que se observaron los precipitados se evaluaron como x. Los

resultados se muestran en la Tabla 8.

Composición de la solución de azúcar ácida

5 [Tabla 8]

	(% en masa)
1. Azúcar	10
2. Ácido cítrico (cristalino)	0,08
3. Citrato trisódico	pH ajustado (pH 3)
4. Agua	Balanza

Tabla 8

	4 °C	25 °C	40 °C
Isoquercitrina	X	X	X
Ejemplo 16	O	O	O
Ejemplo 39	O	O	O

10 Tal como se muestra en la Tabla 8, cuando se añadió isoquercitrina a la solución de azúcar ácida, los precipitados se observaron inmediatamente después del almacenamiento en toda la refrigeración (4 °C), temperatura ambiente (25 °C) y 40 °C. Sin embargo, en el caso en que se añadieron el compuesto de inclusión isoquercitrin-γ-ciclodextrina y la composición de glucósidos de isoquercitrina, los precipitados no se observaron incluso cuando las soluciones se dejaron reposar durante 4 meses, y además los precipitados no se observaron incluso en un almacenamiento a largo
15 plazo de 5 meses.

Evaluación de la estabilidad de almacenamiento (té verde)

20 Se añadió hesperidina (fabricada por Hamari Chemicals., Ltd.), hesperetin-7-glucósido (preparado a continuación), un compuesto de inclusión de flavonoide del ejemplo 22 o una composición de glucósidos flavonoides del ejemplo 40 a un té verde disponible comercialmente ("Oi Ocha", fabricado por ITO EN, LTD.) Para tener una concentración calculada como 0,03 % en términos de conversión de hesperetin-7-glucósido. Se dejó reposar la mezcla durante 7 días a 4 °C y 25 °C, y se observó visualmente la presencia o ausencia de los precipitados. Las soluciones que eran transparentes en las que no se observaron los precipitados se evaluaron como O, y aquellas en las que se observaron los
25 precipitados se evaluaron como x. Los resultados se muestran en la Tabla 9.

30 se añadieron siete gramos de hesperidina (fabricada por Hamari Chemicals., Ltd.) a 100 l de una solución acuosa, y la solución se ajustó a 70 °C y un pH de 4,5. Después de eso, a esto se añadieron 0,5 g de naringinasa (Amano Enzyme Inc. 155 u/g) mientras se agitaba, y la solución se recuperó y se secó, para dar 4,2 g de hesperetin-7-glucósido que tiene un contenido de 96 % o más. La identificación como hesperetin-7-glucósido y su contenido se analizaron por RMN y HPLC de la misma manera que se mencionó anteriormente.

[Tabla 9]

35

Tabla 9

	4 °C	25 °C
Hesperidina	X	X
Hesperetin-7-glucósido	X	X
Ejemplo 22	O	O
Ejemplo 40	O	O

40 Tal como se muestra en la Tabla 9, cuando se añadió hesperidina o hesperetin-7-glucósido a un té verde, los precipitados se observaron inmediatamente después del almacenamiento tanto en refrigeración (4 °C) como a temperatura ambiente (25 °C). Sin embargo, en el caso en que se añadieron la composición que contiene el compuesto de inclusión de hesperetin-7-glucósido y la composición de glucósidos de hesperetin-7-glucósido, los precipitados no se observaron incluso cuando se dejó reposar el té verde durante 7 días.

Evaluación de la estabilidad del almacenamiento (bebida de limón)

Se añadió naringina (fabricada por SIGMA), naringenin-7-glucósido (preparado a continuación) o una composición que contiene un compuesto de inclusión de flavonoide del ejemplo 109 a una bebida de limón disponible comercialmente (C1000 Lemon Water, fabricado por HOUSE WELLNESS FOODS CORPORATION) para tener una concentración calculada como 0,3 % en términos, de conversión de naringenin-7-glucósido, se dejó reposar la bebida durante 1 mes a 4 °C o 25 °C, y luego se observó visualmente la presencia o ausencia de los precipitados. Las soluciones que eran transparentes en las que no se observaron los precipitados se evaluaron como O y aquellas en las que se observaron los precipitados se evaluaron como X. Los resultados se muestran en la Tabla 9-2.

Después de la terminación de la reacción de acuerdo con el ejemplo comparativo 102, los precipitados que previamente se dejaron reposar a temperatura ambiente se recuperaron, se lavaron con agua, se recrystalizaron y secaron, para dar 13 g de naringenin-7-glucósido con un contenido del 95 % o más. Se analizó la identidad del producto con un reactivo naringenin-7-glucósido (Wako) por HPLC y un contenido del mismo.

[Tabla 9-2]

Tabla 9-2

	4 °C	25 °C
Naringina	X	X
Naringenin-7-glucósido	X	X
Ejemplo 109	O	O

Tal como se muestra en la Tabla 9-2, cuando se añadió naringina o naringenin-7-glucósido a una bebida de limón, los precipitados se observaron tanto en los almacenamientos en refrigeración (4 °C) como a temperatura ambiente (25 °C). Sin embargo, en un caso donde se añadió la composición que contiene el compuesto de inclusión de naringenin-7-glucósido, los precipitados no se observaron incluso cuando la bebida se dejó reposar durante 1 mes.

Evaluación de biodisponibilidad

Se administró a las ratas Wister (macho) de nueve semanas de edad MF (Oriental Yeast Co., Ltd.) y se criaron durante 7 días, y las ratas se sometieron a ayuno desde el día anterior a la administración de una sustancia de prueba. Después de eso, 100 µmol/kg (calculado como IQC) de un producto seco del Ejemplo 16 preparado en la evaluación de los efectos de prevenir el deterioro del sabor, una suspensión de rutina (Alps Pharmaceutical Ind., Co., Ltd., 100 µmol/kg (calculado como IQC)), 1.000 µmol/kg (calculado como HPT-7G) del producto seco del ejemplo 22 preparado en las evaluaciones de los efectos de prevenir el deterioro del sabor y una suspensión de hesperidina (Hamari Chemicals, Ltd., se administraron 1.000 µmol/kg (calculado como HPT-7G) por vía oral a las ratas en una dosis única (administrada por sonda, n = 2). La extracción de sangre en tubos heparinizados se realizó a partir de venas de la cola de ratas durante 30 minutos, 1 hora y 3 horas después de la administración, y la sangre se centrifugó para obtener plasma. En la muestra de suero extraída, las cantidades de derivados de quercetina se midieron de acuerdo con un método de Makino et al (Biol. Pharm. Bull., 32(12) 2034, 2009), y las cantidades de derivados de hesperetina se midieron según un método de Yamada et al (Biosci. Biotechnol. Biochem, 70(6), 1386, 2006), y el análisis se realizó aplicando a la muestra cromatografía líquida de alto rendimiento (SHIMADZU) y utilizando un detector de matriz de fotodiodos (SPD-M30A, SHIMADZU). Los resultados se muestran en las Figuras 10 y 11. La Tabla 10 mostró las concentraciones de quercetina y derivados de quercetina (isoramnetina, tamarixetina) (µM) en el tiempo de 0 a 3 horas, y el área bajo la curva (AUC) de concentración de sangre-tiempo de una cantidad total de la misma (µM•h). Además, como no se detectó el derivado de hesperetina, la Tabla 11 mostró una concentración de hesperetina (µM) en el tiempo de 0 a 3 horas, y el área bajo la curva (AUC) del tiempo de concentración en sangre de la misma (µM•h).

[Tabla 10]

Tabla 10

	Tiempo de extracción de sangre	Suspensión de rutina	Ejemplo 16
Quercetina (µM)	0	0	0
	0,5	0	9,3
	1	0,004	10,3
	3	0	6,9
Isoramnetina (µM)	0	0	0

(continuación)

	Tiempo de extracción de sangre	Suspensión de rutina	Ejemplo 16
	0,5	0	0,3
	1	0,004	0,3
	3	0	0,2
Tamarixetina (μM)	0	0	0
	0,5	0	2,1
	1	0,01	3,6
	3	0,08	4,2
Total (μM)	0	0	0
	0,5	0	11,6
	1	0,018	14,2
	3	0,08	11,3
AUC ($\mu\text{M}\cdot\text{h}$)	Total	0,1	34,9

[Tabla 11]

Tabla 11

	Tiempo de extracción de sangre	Suspensión de hesperidina	Ejemplo 22
	0	0	0
Hesperetina (μM)	0,5	0,003	113,5
	1	0,064	130,2
	3	0	52,6
	AUC ($\mu\text{M}\cdot\text{h}$)	Total	0,082

5

Como se muestra en las figuras 10 y 11, se pudo ver en la comparación de AUC de 0 a 3 horas que las ratas absorbieron eficientemente el compuesto de inclusión de isoquercitrina- γ -ciclodextrina o el compuesto de inclusión de hesperetin-7-glucósido- β -ciclodextrina, en comparación con la rutina o la hesperidina. Además, aunque no se muestra en las tablas, la biodisponibilidad de 100 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ (calculada como IQC) de la composición de glucósidos de isoquercitrina del ejemplo 39 fue casi la misma que la del ejemplo 16, y la biodisponibilidad de 1.000 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ (calculada como HPT-7G) de la composición de los glucósidos de hesperetin-7-glucósido del ejemplo 40 fue casi igual a la del ejemplo 22.

10

Efectos de mejora de la solubilidad del flavonoide escasamente soluble

15

Ejemplos 110 a 113

Se disolvió un compuesto de inclusión de rutina (RTN) e isoquercitrina con γ -ciclodextrina (IQC-rCD) en una solución de azúcar ácida (pH 3,1, Brix10°) en cantidades de los componentes enumerados en la Tabla 12, y la solución se sometió a un relleno de bolsa de calor en una botella de vidrio de 100 ml. La solución preparada se enfrió al aire y se sometió a almacenamiento en refrigeración (4 °C, 6 meses), y luego se observó visualmente la presencia o ausencia de los precipitados. Los resultados se muestran en la Tabla 12.

20

Ejemplos comparativos 103 a 106, y ejemplo de referencia

25

Se llevaron a cabo los mismos procedimientos que en los ejemplos 110 a 113 en la preparación, enfriamiento por aire y almacenamiento por refrigeración, excepto que la rutina (RTN) y la isoquercitrina (IQC) se disolvieron en una solución de azúcar ácida en cantidades de los componentes enumerados en la Tabla 13, y se observó visualmente la presencia o ausencia de los precipitados. Los resultados se muestran en la Tabla 13.

30

En las Tablas 12 y 13, se obtuvo IQC/RTN (relación molar) analizando HPLC (SHIMADZU, las mismas condiciones

que las de la velocidad de conversión) usando 1 ml de una solución de azúcar ácida inmediatamente después de disolver los componentes de preparación como una muestra de medición, y luego expresando una relación de área (área de pico de isoquercitrina/área de pico de rutina) como una relación molar.

5 [Tabla 12]

Tabla 12

	(41) RTN (% en masa)	(42) IQC-γCD (% en masa)	(43) IQC (% en masa)	(44) γCD (% en masa)	(45) Solubilidad	(46) IQC/RTN (relación molar)
Ej. 110	0,05	0,02	0,005	0,014	-	0,13
Ej. 111	0,05	0,04	0,01	0,028	-	0,26
Ej. 112	0,05	0,08	0,02	0,056	-	0,53
Ej. 113	0,05	0,09	0,025	0,070	-	0,66

10 [Tabla 13]

Tabla 13

	(41) RTN (% en masa)	(42) IQC-γCD (% en masa)	(43) IQC (% en masa)	(44) γCD (% en masa)	(45) Solubilidad	(46) IQC/RTN (relación molar)
Ej. comp. 103	0,05	0	0,005	0	++	0,13
Ej. comp. 104	0,05	0	0,01	0	++	0,26
Ej. comp. 105	0,05	0	0,02	0	++	0,53
Ej. comp. 106	0,05	0	0,025	0	++	0,66
Ej. de ref.	0,05	0	0	0	+++	0,003

Notas de las tablas 12 y 13

(41) Concentración de rutina en una solución de azúcar ácida (% en masa)

(42) Concentración de compuesto de inclusión de isoquercitrin-γ-ciclodextrina en una solución de azúcar ácida (% en masa)

(43) Concentración de isoquercitrina en una solución de azúcar ácida (% en masa)

(44) Concentración de γ-ciclodextrina en una solución de azúcar ácida (% en masa)

(45) Solubilidad:

No se observaron los precipitados: - La cantidad de precipitados fue pequeña: +

La cantidad de precipitados fue ligeramente grande: ++

La cantidad de precipitados fue grande: +++

(46) Isoquercitrina/rutina en una solución de azúcar ácida (relación molar)

15 Como se muestra en las figuras 12 y 13, en los ejemplos 110 a 113 en los que se añadió el compuesto de inclusión isoquercitrin-γ-ciclodextrina, se mejoró la solubilidad de la rutina y no se observaron los precipitados, especialmente cuando la relación molar de isoquercitrina y rutina (isoquercitrina/rutina) estaba dentro de un intervalo de 0,1 a 0,7. Los mismos resultados que estos también se mostraron en los productos liofilizados de los compuestos de inclusión de flavonoide de los ejemplos 10, 13 y 14 (productos en los que se eliminó la ramnosa por diálisis) y el producto liofilizado de la composición que contiene el compuesto de inclusión de flavonoide que contiene ramnosa. Por otro lado, tal como se muestra en la Tabla 13, en los productos en los que solo se añadió isoquercitrina, se observaron precipitados en todos los casos.

20

Además, en las Tablas 12 y 13, también se obtuvieron los mismos resultados en isoquercitrina e isoquercitrin-β-

ciclodextrina (productos liofilizados de los ejemplos 1 a 7), o hesperidina y hesperetin-7-glucósido-β-ciclodextrina (productos liofilizados de los ejemplos 18 a 23) en lugar de rutina, o hesperetin-7-glucósido-γ-ciclodextrina (productos liofilizados de los ejemplos 27 a 31).

5 Evaluación de la estabilidad a largo plazo y la astringencia del compuesto de inclusión de isoquercitrin-γ-ciclodextrina

Ejemplos 114 a 117

10 Las soluciones se prepararon de la misma manera que los ejemplos 110 a 113, excepto que se usaron las cantidades de componentes enumeradas en la Tabla 14. Inmediatamente después del enfriamiento por aire, se llevaron a cabo evaluaciones sensoriales de astringencia. Además, las soluciones que tienen las mismas cantidades de componentes se prepararon por separado y se sometieron a almacenamiento en refrigeración (4 °C, 12 meses), y se observó visualmente la presencia o ausencia de los precipitados. Los resultados se muestran en la Tabla 14.

15 Ejemplos comparativos 107 a 110

20 Las soluciones se prepararon de la misma manera que los ejemplos 103 a 106, excepto que se usaron las cantidades de componentes enumerados en la tabla 15 inmediatamente después del enfriamiento por aire, Se llevaron a cabo evaluaciones sensoriales de astringencia. Además, las soluciones que tienen las mismas cantidades de componentes se prepararon por separado, las soluciones se almacenaron en refrigeración (4 °C, 12 meses). Después de eso, se observó visualmente la presencia o ausencia de los precipitados. Los resultados se muestran en la Tabla 15.

25 En las Tablas 14 y 15, se obtuvo RTN/IQC (relación molar) analizando HPLC (SHIMADZU, las mismas condiciones que las de la velocidad de conversión) usando 1 ml de una solución de azúcar ácida inmediatamente después de disolver los componentes de preparación como una muestra de medición, y luego expresando una relación de área (área de pico de rutina/área de pico de isoquercitrina) como una relación molar.

[Tabla 14]

30

Tabla 14

	(51) IQC-γCD (% en masa)	(52) IQC (% en masa)	(53) γCD (% en masa)	(54) RTN (% en masa)	(55) Solubilidad	(56) RTN/IQC (relación molar)	(57) Astringencia
Ej. 114	0,38	0,1	0,28	0,0004	-	0,003	1,2
Ej. 115	0,38	0,1	0,28	0,001	-	0,01	1,3
Ej. 116	0,38	0,1	0,28	0,005	-	0,04	1,3
Ej. 117	0,38	0,1	0,28	0,01	-	0,08	1,3

[Tabla 15]

Tabla 15

	(51) IQC-γCD (% en masa)	(52) IQC (% en masa)	(53) γCD (% en masa)	(54) RTN (% en masa)	(55) Solubilidad	(56) RTN/IQC (relación molar)	(57) Astringencia
Ej. comp. 107	0	0,1	0	0,0004	+++	0,003	2,7
Ej. comp. 108	0	0,1	0	0,001	++	0,01	2,8
Ej. comp. 109	0	0,1	0	0,005	++	0,04	2,8

35

(continuación)

	(51) IQC-γCD (% en masa)	(52) IQC (% en masa)	(53) γCD (% en masa)	(54) RTN (% en masa)	(55) Solubilidad	(56) RTN/IQC (relación molar)	(57) Astringencia
Ej. comp. 110	0	0,1	0	0,01	++	0,08	3,0

Notas de las tablas 14 y 15

(51) Concentración de compuesto de inclusión de isoquercitrin-γ-ciclodextrina en una solución de azúcar ácida (% en masa)

(52) Concentración de isoquercitrina en una solución de azúcar ácida (% en masa)

(53) Concentración de γ-ciclodextrina en una solución de azúcar ácida (% en masa)

(54) Concentración de rutina en una solución de azúcar ácida (% en masa)

(55) Solubilidad:

No se observaron los precipitados: - La cantidad de precipitados fue pequeña: +

La cantidad de precipitados fue ligeramente grande: ++

La cantidad de precipitados fue grande: +++

(56) Rutina/isoquercitrina en una solución ácida de azúcar (relación molar)

(57) Inmediatamente después de la preparación y enfriamiento por aire de una solución de azúcar ácida, diez panelistas calificaron una muestra en la que la astringencia tenía un sabor más fuerte en comparación con la solución de azúcar ácida libre de aditivos como 3 puntos, y seguido de 2 puntos y 1 punto, y se mostró un promedio de la misma.

En el presente documento, como no se observaron los precipitados después de la preparación y el enfriamiento con aire de los ejemplos comparativos 107 a 110 durante 30 minutos a temperatura ambiente, se llevaron a cabo evaluaciones sensoriales durante ese tiempo.

5 Tal como se muestra en la Tabla 14, se confirmó que incluso cuando la rutina estaba contenida en una cantidad especificada en una composición que contenía un compuesto de inclusión de isoquercitrina y γ-ciclodextrina obtenida en el método de producción de la presente invención, no hubo inconvenientes en la estabilidad a largo plazo del compuesto de inclusión. Además, se confirmó que la astringencia sería débil, de modo que las influencias en los
10 sabores cuando se añaden a los productos alimenticios son pequeñas. Cuando la RTN/IQC (relación molar) estaba dentro de un intervalo de 0,08 o menos (Ejemplos 114 a 117), la astringencia fue particularmente débil. Los mismos resultados también se muestran en los productos liofilizados de los compuestos de inclusión de flavonoide de los ejemplos 10, 13 y 14 (en los que se eliminó la ramnosa por diálisis) y los productos liofilizados de una composición que contiene el compuesto de inclusión de flavonoide que contiene ramnosa. Por otro lado, tal como se muestra en la
15 Tabla 15, en una composición que contiene isoquercitrina, cuando la composición contenía rutina, se observaron precipitados en todas las composiciones y la astringencia también fue fuerte.

Además, en las Tablas 14 y 15, también se obtuvieron los mismos resultados en isoquercitrina e isoquercitrin-β-ciclodextrina (productos liofilizados de los ejemplos 1 a 7), hesperidina y hesperetin-7-glucósido-β-ciclodextrina
20 (productos liofilizados de los ejemplos 18 a 23) en lugar de rutina, o hesperetin-7-glucósido-γ-ciclodextrina (productos liofilizados de los ejemplos 27 a 31).

Los detalles de los componentes utilizados en los ejemplos 110 a 117, Los ejemplos comparativos 103 a 110 y el ejemplo de referencia se muestran a continuación.

25 RTN: Producto disuelto por calor de 90 g de etanol al 99,5 % en volumen y 10 g de rutina (producto de preparación: siendo la relación molar de isoquercitrina/rutina 0,3/99,7)

IQC-rCD: Producto liofilizado del ejemplo 16 (producto en el que se eliminó la ramnosa por diálisis (siendo la relación molar de rutina/isoquercitrina 0,3/99,7))

30 IQC: Producto disuelto térmicamente de 18 g de etanol al 99,5 % en volumen y 2 g de isoquercitrina (producto de preparación: siendo la relación molar de rutina/isoquercitrina 0,3/99,7)

Ejemplos de formulación de composición que contiene compuestos de inclusión de flavonoide y composición de glucósidos flavonoides Ejemplo de formulación 1: Bebida De Pomelo

35 Con el fin de prevenir el deterioro del sabor, se preparó una bebida que contenía un producto seco de una composición que contiene un compuesto de inclusión de isoquercitrin-γ-ciclodextrina del ejemplo 16. El presente producto puede utilizarse adecuadamente como bebida.

Componente	% en masa
Zumo de pomelo concentrado	5,0

(continuación)

Componente	% en masa
Jarabe de glucosa-fructosa	0,9
Maltitol	2,0
Acidulante	0,3
vitamina C	0,02
Sabor	0,1
Producto seco del ejemplo 16	0,02
Agua	Balanza
Total	100

Ejemplo de formulación 2: Gelatina

5 Con el fin de prevenir el deterioro del sabor, se preparó una gelatina que contenía un producto seco de una composición que contenía compuesto de inclusión de hesperetin-7-glucósido- β -ciclodextrina del ejemplo 22. El presente producto puede utilizarse adecuadamente como alimento (gelatina).

Componente	% en masa
Azúcar	10,0
Zumo concentrado de limón	8,5
Preparación de Gardenia amarilla	0,004
Acidulante	1,0
Agente gelificante	1,5
vitamina C	0,02
Sabores	0,2
Producto seco del ejemplo 22	0,04
Agua	Balanza
Total	100

Ejemplo de formulación 3: Productos cosméticos

10 Con el fin de mejorar la piel en la opacidad y la hinchazón relacionada con el edema, se prepararon cosméticos que contenían un producto seco de una composición de glucósidos de hesperetin-7-glucósido del ejemplo 40. El presente producto puede utilizarse adecuadamente como cosméticos para el cuidado de la piel.

Componente	% en masa
Glicerol	5,0
Propilenglicol	4,0
Alcohol oleílico	0,1
Tensioactivo	2,0
Alcohol etílico	10,0
Perfume	0,1
Producto seco del ejemplo 40	0,26
Agua purificada	Balanza
Total	100

Ejemplo de formulación 4: Comprimido

15
20 Con el fin de moderar la temperatura corporal, se preparó un comprimido que contenía un producto seco de una composición que contenía compuesto de inclusión de hesperetin-7-glucósido- β -ciclodextrina del ejemplo 22. El presente producto puede utilizarse adecuadamente como alimentos saludables.

Componente	% en masa
Maltitol	69,0

(continuación)

Componente	% en masa
Trehalosa	12,9
Acidulante	2,5
Estearato de calcio	0,5
vitamina C	0,02
Sabores	0,08
Producto seco del ejemplo 22	15,0
Total	100

Ejemplo de formulación 5: Bebida de café

5 Con el fin de reducir la grasa corporal, se preparó una bebida de café que contenía un producto seco de una composición de glucósidos de isoquercitrina del ejemplo 39. El presente producto puede utilizarse adecuadamente como alimentos para un uso específico para la salud.

Componente	% en masa
Extracto de café	32,6
Azúcar	6,0
Sabores	0,06
Producto seco del ejemplo 39	0,06
Agua	Balanza
Total	100

Ejemplo de formulación 6: Bebida de té negro

10 Con el fin de reducir la grasa neutra, se preparó una bebida de té negro que contenía un producto seco de una composición de glucósidos de hesperetin-7-glucósido del Ejemplo 40. El presente producto puede utilizarse adecuadamente como alimentos con declaraciones de función.

Componente	% en masa
Extracto de té negro	18,6
Hidrogenocarbonato de sodio	0,002
Sucralosa	0,003
vitamina C	0,03
Sabores	0,1
Producto seco del ejemplo 40	0,06
Agua	Balanza
Total	100

Ejemplo de formulación 7: Restaurador de cabello

15
20 Con el fin de mejorar el cuero cabelludo, se preparó un restaurador de cabello que contenía un producto seco de una composición que contenía compuesto de inclusión de hesperetin-7-glucósido- β -ciclodextrina del ejemplo 22.

Componente	% en masa
Alcohol etílico	60,0
Extracto de <i>Swertia japonica</i>	5,0
Acetato de tocoferol	0,2
Etil éter de pantenilo	0,2
Propilenglicol	5,0
Conservante	0,1
Perfume	0,2
Producto seco del ejemplo 22	0,03

(continuación)

Componente	% en masa
Agua purificada	Balanza
Total	100

Ejemplo de formulación 8: Champú para el cabello

5 Con el fin de prevenir la inflamación, se preparó un champú para el cabello que contenía un producto seco de una composición que contenía compuesto de inclusión de hesperetin-7-glucósido- γ -ciclodextrina del Ejemplo 27.

Componente	% en masa
Polioxietileno de sodio (2) Lauril éter sulfato	9,0
Laurilsulfato sódico	4,0
Cocamidopropil Betaína	3,0
Metilpolisiloxano altamente polimerizado	2,0
Ácido graso de aceite de coco metilpolisiloxano	1,0
Monoetanolamida	1,0
Propilenglicol	2,0
Diestearato de etilenglicol	2,0
Conservante	0,1
Perfume	0,1
Producto seco del ejemplo 27	0,03
Agua	Balanza
Total	100

Ejemplo de formulación 9: Comprimido para dieta

10 Con el propósito de una dieta, se preparó un comprimido que contenía un producto seco de una composición que contenía compuesto de inclusión de naringenin-7-glucósido- β -ciclodextrina del ejemplo 109. El presente producto puede utilizarse adecuadamente como alimentos saludables.

Componente	% en masa
Maltitol	64,0
Trehalosa	12,9
Acidulante	2,5
Estearato de calcio	0,5
vitamina C	0,02
Sabores	0,08
Producto seco del ejemplo 109	20,0
Total	100

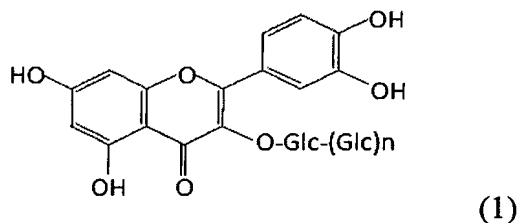
15 **Aplicabilidad industrial**

20 De acuerdo con el método de producción de la presente invención, un compuesto de inclusión de flavonoide y una composición de glucósidos flavonoides que tienen una excelente solubilidad en agua se pueden producir de manera eficiente, para que el compuesto y la composición puedan utilizarse adecuadamente en los campos de los medicamentos, producto alimenticio, alimentos sanos, alimentos para un uso médico específico, cosméticos y similares.

REIVINDICACIONES

1. Un método de producción de un compuesto de inclusión de flavonoide, que comprende una etapa de escisión que comprende tratar un flavonoide escasamente soluble que tiene una estructura de ramnósido con una enzima que tiene una actividad ramnosidasa en presencia de una ciclodextrina para escindir una ramnosa; en donde escasamente soluble se refiere a una solubilidad en agua a 25 °C del 1,0 % en masa o menos.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el flavonoide escasamente soluble que tiene una estructura de ramnósido es uno o más miembros seleccionados del grupo que consiste en rutina, hesperidina, narirutina, naringina, diosmina, eriocitrina, micricitrina, neohesperidina, luteolin-7-rutinósido, delfinidin-3-rutinósido, cianidina-3-rutinósido, isoramnetin-3-rutinósido, campferol-3-rutinósido, apigenin-7-rutinósido y acacetin-7-rutinósido.
3. El método según las reivindicaciones 1 o 2, en donde la ciclodextrina está presente en una proporción de 0,01 mol o más basada en 1 mol del flavonoide escasamente soluble que tiene una estructura de ramnósido.
4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el compuesto de inclusión de flavonoide es un compuesto de inclusión de flavonoide que comprende el flavonoide escasamente soluble sin una estructura de ramnósido incluida por una ciclodextrina, y en donde una relación molar de la ciclodextrina y el flavonoide escasamente soluble sin una estructura de ramnósido (ciclodextrina/flavonoide) es de 1,0 a 3,0.
5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el compuesto de inclusión de flavonoide se selecciona de:
- (i) un compuesto de inclusión de flavonoide que comprende isoquercitrina incluida por γ -ciclodextrina, y en donde una relación molar de la γ -ciclodextrina y la isoquercitrina (γ -ciclodextrina/isoquercitrina) es de 0,9 a 4,0;
 - (ii) un compuesto de inclusión de flavonoide que comprende isoquercitrina incluida por β -ciclodextrina, y en donde una relación molar de la β -ciclodextrina y la isoquercitrina (β -ciclodextrina/isoquercitrina) es de 1,0 a 3,0;
 - (iii) un compuesto de inclusión de flavonoide que comprende hesperetin-7-glucósido incluido por una ciclodextrina, y en donde una relación molar de la ciclodextrina y el hesperetin-7-glucósido (ciclodextrina/hesperetin-7-glucósido) es de 1,0 a 3,0; y
 - (iv) un compuesto de inclusión de flavonoide que comprende naringenin-7-glucósido incluido por β -ciclodextrina, y en donde una relación molar de la β -ciclodextrina y el naringenin-7-glucósido (β -ciclodextrina/naringenin-7-glucósido) es de 1,0 a 3,0.
6. El método de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además una etapa de glucosidación que comprende tratar un compuesto de inclusión de flavonoide obtenido a través de la etapa de escisión con una glucosiltransferasa para someter el compuesto de inclusión de flavonoide a glucosidación.
7. Un compuesto de inclusión de flavonoide seleccionado de:
- (i) un compuesto de inclusión de flavonoide que comprende isoquercitrina incluida por γ -ciclodextrina, en donde una relación molar de la γ -ciclodextrina y la isoquercitrina (γ -ciclodextrina/isoquercitrina) es de 0,9 a 1,8, y en donde la solubilidad de la isoquercitrina en agua a 25 °C es del 2 % o más;
 - (ii) un compuesto de inclusión de flavonoide que comprende isoquercitrina incluida por γ -ciclodextrina, en donde una relación molar de la γ -ciclodextrina y la isoquercitrina (γ -ciclodextrina/isoquercitrina) es de 0,9 a 4,0, y en donde la solubilidad de la isoquercitrina en agua a 25 °C es del 2,5 % o más;
 - (iii) un compuesto de inclusión de flavonoide que comprende isoquercitrina incluida por β -ciclodextrina, en donde una relación molar de la β -ciclodextrina y la isoquercitrina (β -ciclodextrina/isoquercitrina) es de 1,0 a 3,0, y en donde la solubilidad de la isoquercitrina en agua a 25 °C es del 0,1 % o más;
 - (iv) un compuesto de inclusión de flavonoide que comprende hesperetin-7-glucósido incluido por una ciclodextrina, en donde una relación molar de la ciclodextrina y el hesperetin-7-glucósido (ciclodextrina/hesperetin-7-glucósido) es de 1,0 a 3,0, y en donde la solubilidad del hesperetin-7-glucósido en agua a 25 °C es del 0,01 % o más; y
 - (v) un compuesto de inclusión de flavonoide que comprende naringenin-7-glucósido incluido por β -ciclodextrina, en donde una relación molar de la β -ciclodextrina y el naringenin-7-glucósido (β -ciclodextrina/naringenin-7-glucósido) es del 1,0 al 3,0, y en donde una solubilidad del naringenin-7-glucósido en agua a 25 °C es del 0,01 % o más.
8. Una composición que contiene un compuesto de inclusión de flavonoide que comprende:
- (i) un compuesto de inclusión de flavonoide como se define en la reivindicación 7 y una ramnosa, en donde una relación molar de la ramnosa y un flavonoide en el compuesto de inclusión de flavonoide (ramnosa/flavonoide) es de 0,8 a 1,2; o
 - (ii) un compuesto de inclusión de flavonoide como se define en la reivindicación 7 y un flavonoide escasamente soluble que tiene una estructura de ramnósido, en donde una relación molar del flavonoide escasamente soluble y un flavonoide en el compuesto de inclusión de flavonoide (flavonoide escasamente soluble/flavonoide en el compuesto de inclusión) es de 0,001 a 0,1.

9. Una composición de glucósidos de isoquercitrina que comprende un compuesto representado por la siguiente fórmula general (1):

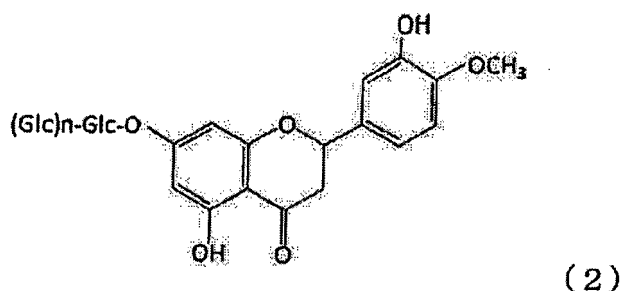


5

donde en la fórmula general (1), Glc significa un residuo de glucosa, y n significa un número entero de 0 o 1 o más, y en donde el contenido de glucósidos que tienen n = 0 es del 10 % en moles o más y del 30 % en moles o menos, el contenido de glucósidos que tienen n = 1 a 3 es del 50 % en moles o menos, y el contenido de glucósidos que tienen n = 4 o más es del 30 % en moles o más, de la composición de glucósidos.

10

10. Una composición de glucósidos de hesperetin-7-glucósido que comprende un compuesto representado por la siguiente fórmula general (2):

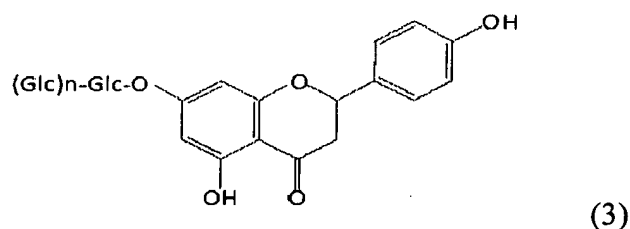


15

donde en la fórmula general (2), Glc significa un residuo de glucosa, y n significa un número entero de 0 o 1 o más, y en donde el contenido de glucósidos que tienen n = 0 es del 10 % en moles o más y del 30 % en moles o menos, el contenido de glucósidos que tienen n = 1 a 3 es del 50 % en moles o menos, y el contenido de glucósidos que tienen n = 4 o más es del 30 % en moles o más, de la composición de glucósidos.

20

11. Una composición de glucósidos de naringenin-7-glucósido que comprende un compuesto representado por la siguiente fórmula general (3):



25

donde en la fórmula general (3), Glc significa un residuo de glucosa, y n significa un número entero de 0 o 1 o más, y en donde el contenido de glucósidos que tienen n = 0 es del 10 % en moles o más y del 30 % en moles o menos, el contenido de glucósidos que tienen n = 1 a 3 es del 50 % en moles o menos, y el contenido de glucósidos que tienen n = 4 o más es del 30 % en moles o más, de la composición de glucósidos.

30

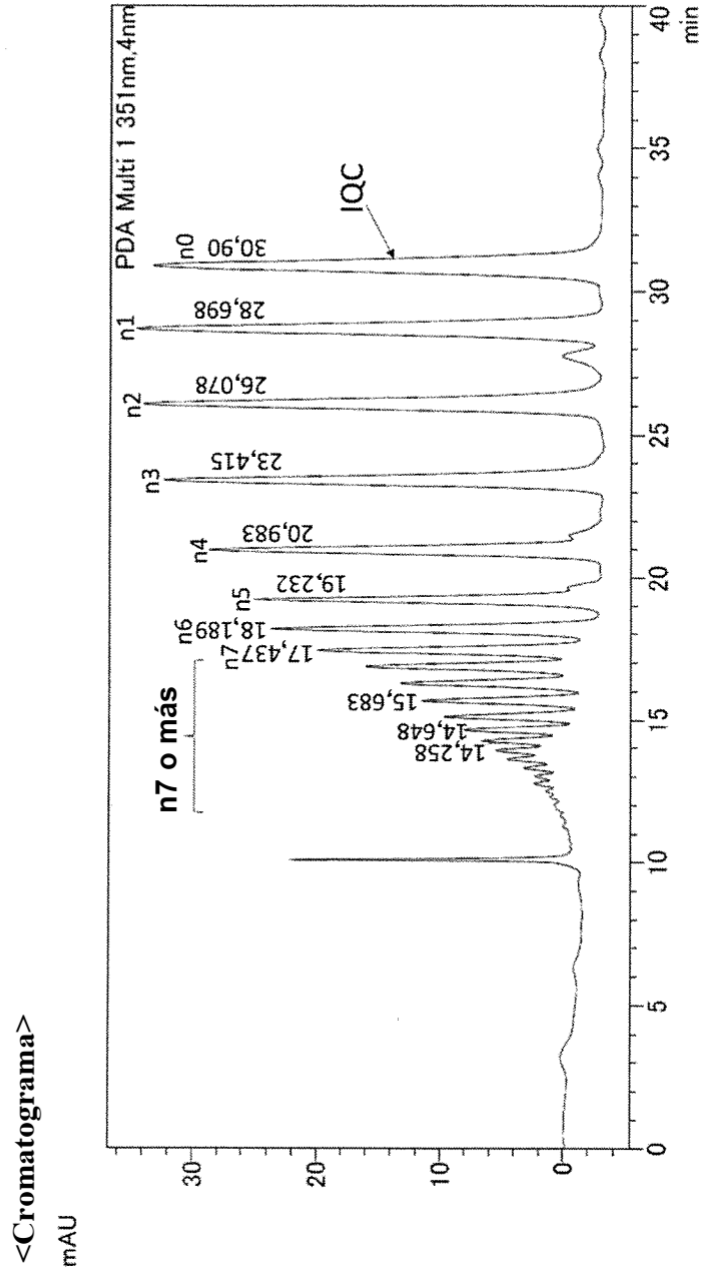
12. Un artículo que comprende uno o más compuestos o composiciones seleccionados del grupo que consiste en un compuesto de inclusión de flavonoide obtenido de acuerdo con un método como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, una composición de glucósidos flavonoides obtenida según un método como se define en la reivindicación 6, un compuesto de inclusión de flavonoide como se define en la reivindicación 7, una composición que contiene un compuesto de inclusión de flavonoide como se define en la reivindicación 8, una composición de glucósidos de isoquercitrina como se define en la reivindicación 9, una composición de glucósidos de hesperetin-7-glucósido como se define en la reivindicación 10, y una composición de glucósidos de naringenin-7-glucósido como se define en la reivindicación 11, en donde el artículo es un producto alimenticio, un medicamento o un cosmético.

35

- 5 13. Un método de mejora de la solubilidad de un flavonoide escasamente soluble que tiene una estructura de ramnósido, que comprende mezclar el flavonoide escasamente soluble que tiene una estructura de ramnósido con un compuesto de inclusión de flavonoide obtenido de acuerdo con un método como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o un compuesto de inclusión de flavonoide como se define en la reivindicación 7 en un medio tal que una relación molar de un flavonoide en el compuesto de inclusión de flavonoide al flavonoide escasamente soluble (flavonoide en el compuesto de inclusión/flavonoide escasamente soluble) es de 0,1 a 0,9.

[FIG. 1]

FIG. 1 Cromatograma de HPLC del ejemplo 39



n0 a n7 es un valor de n en la fórmula general (1) y n0 es IQC.

[FIG. 2]

FIG. 2 Cromatograma de HPLC del ejemplo 40

