(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 583 149**

(51) Int. CI.:

C07H 15/203 (2006.01)
C07H 1/08 (2006.01)
C07H 15/207 (2006.01)
C12Q 1/18 (2006.01)
C12Q 1/28 (2006.01)
G01N 33/15 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.10.2012 E 12844559 (0)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.05.2016 EP 2774932**

(54) Título: **Nuevo compuesto contenido en la miel de manuka y uso del mismo**

(30) Prioridad:

27.10.2011 JP 2011236137

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.09.2016

(73) Titular/es:

HEALTHCARE SYSTEMS (50.0%)
22-8 Chikusa 2-chome, Chikusa-ku
Nagoya-shi, Aichi 464-0858, JP y
KATO, YOJI (50.0%)

(72) Inventor/es:

KATO, YOJI

(74) Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

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

Nuevo compuesto contenido en la miel de manuka y uso del mismo

Campo técnico

La presente solicitud se refiere a un nuevo compuesto contenido en la miel de manuka, y a un uso del mismo.

Antecedentes

La miel de manuka es una miel única de Nueva Zelanda, derivada del néctar de las flores del manuka (*Leptospermum scoparium*), que crece solamente en Nueva Zelanda, y se sabe que tiene una fuerte actividad antibacteriana y otras funciones fisiológicas. Sin embargo, un tipo de miel de manuka (miel de arbusto gelatinosa) también se recoge de un pariente del manuka (*Leptospermum poligalifolium*) que crece en Australia.

Debido a su fuerte actividad antibacteriana, se cree que la miel de manuka puede ser capaz de eliminar el *Helicobacter pylori,* una causa del cáncer de estómago. Se cree que algunas actividades fisiológicas incluyendo esta actividad antibacteriana varían considerablemente entre diferentes mieles de manuka.

Un "Factor de Manuka Único" (UMF) basado en la actividad antibacteriana convertida en actividad de fenol se usa como un índice de la actividad antibacteriana y otra bioactividad de la miel de manuka. Se ha informado que (Bibliografía de No Patente 1, 2) que un componente antibacteriano de la miel de manuka es un aldehído denominado metilglioxal (MGO) (véase la FIG. 9). Basándose en este informe, la cantidad de MGO se usa en ocasiones como un índice de la bioactividad de la miel de manuka.

También se ha informado que la miel de manuka contiene siringato de metilo (MSYR) (mostrado a continuación), y que tiene capacidad de eliminación enzimática activa (Bibliografía de No Patente 3) (véase la FIG. 9). Aparte de la miel de manuka, este siringato de metilo también se encuentra en grandes cantidades en la miel de asphodel obtenida en Cerdeña, Italia (Bibliografía de No Patente 4). Además, se ha aislado un glicósido de un azúcar unido a siringato de metilo y se ha identificado a partir del grano de anís (Bibliografía de No Patente 5).

Listado de citas

Bibliografía de No Patente

[Bibliografía de No Patente 1] Isolation by HPLC and characterisation of the bioactive fraction of New Zealand manuka (Leptospermum scoparium) honey. Adams CJ, Boult CH, Deadman BJ, Farr JM, Grainger MN Manley-Harris M, Snow MJ. Carbohydrate Res. 2008; 343 (4): 651-659.

[Bibliografía de No Patente 2] Identification and quantification of methylglyoxal as the dominant antibacterial constituent of Manuka (Leptospermum scoparium) honeys from New Zealand. Mavric E, Wittmann S, Barth G, Henle T, Mol Nutr Food Res. 2008; 52 (4): 483-489.

[Bibliografía de No Patente 3] Identification of phenolic compound in manuka honey as specific superoxide anion radical scavenger using electron spin resonance (ESR) and liquid chromatography with coulometric array detection. Koichi Inoue, Shinho Murayama, Fumie 85, Seshimo, Kazue Takeba, Yoshihiro Yoshimura, and Hiroyuki Nakazawa. J. Sci. Food Agric. 85, 872-878, 2005.

[Bibliografía de No Patente 4] Methyl syringate: a chemical marker of asphodel (Asphodelus microcarpus Salzm. Et Viv.) monofloral honey. Tuberoso CI, Bifulco E, Jerkovic I, Caboni P, Cabras P, Floris I. JAgric Food Chem. 2009, 57 (9): 3895-3900 .

[Bibliografía de No Patente 5] Aromatic compound glucosides, alkyl glucoside and glucide from the fruit of anise. Fujimatu E, Ishikawa T, Kitajima J. Phytochemistry. 2003, 63 (5): 609-616.

Sumario

Problema técnico

Sin embargo, dado que la evaluación del UMF requiere la medida de la actividad antibacteriana, podría ser complicado y requieren mucho tiempo. Con la medida del MGO, por un lado, la evaluación rápida también es difícil porque el MGO se convierte en una quinoxalina antes de su medida mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y similares.

También se cree que la miel de manuka tiene una diversidad de otros efectos a partir de la actividad antibacteriana. Aunque el MGO y el MSYR descritos anteriormente se conocen como componentes activos, también pueden estar presentes otros componentes activos. En ese caso, esos compuestos podrían servir como índices más eficaces de la actividad antibacteriana y otra bioactividad de la miel de manuka.

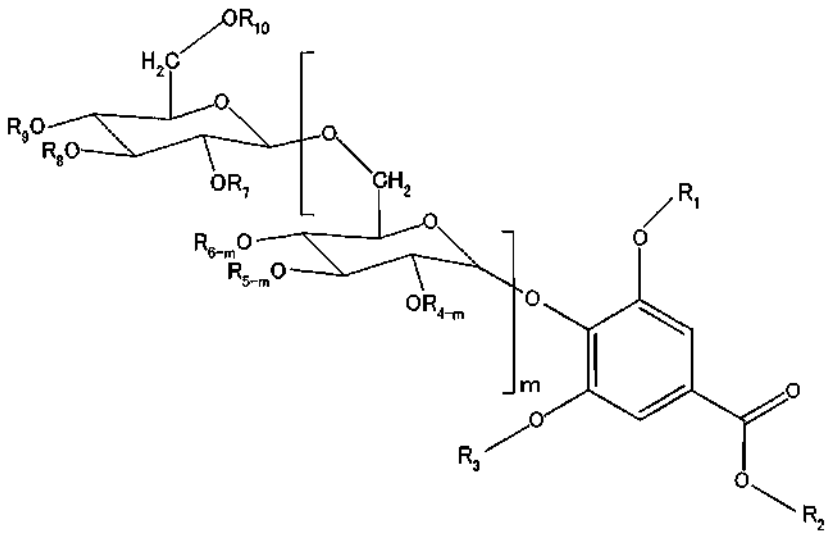
Por lo tanto, un objeto de la presente Descripción es descubrir un componente bioactivo eficaz de la miel de manuka.

Solución al Problema

Los inventores se centraron en la identificación sistemática de nuevos componentes activos de la miel de manuka usando un sistema de evaluación de la actividad de inhibición de la mieloperoxidasa (MPO) basándose en la actividad antiinflamatoria. Como resultado de la identificación sistemática, los inventores descubrieron un compuesto que presenta una fuerte actividad de inhibición de MPO, e identificaron este compuesto como 4-O-[β-D-glucopiranosil-(1→6)-[β-D-glucopiranosil]-3,5-dimetoxibenzoato de metilo (MGGD), que es un glicósido de MSYR y el disacárido gentiobiosa, y se encontró que era un compuesto nuevo. Al mismo tiempo se descubrieron un trisacárido y un tetrasacárido. Los inventores también descubrieron una correlación entre MGGD y el factor de miel de manuka UMF, y se dieron cuenta de que el MGGD se podría usar con un índice de actividad antibacteriana. Las divulgaciones de la presente Descripción proporcionan los siguientes medios.

(1) Un compuesto representado mediante la siguiente fórmula:

[C1]



en la que, cada uno de R_1, R_2 y R_3 representa independientemente un átomo de hidrógeno o grupo alquilo C_{1-4} opcionalmente sustituido, m representa un número entero de 1 a 3, cada uno de R_{4-m}, R_{5-m} y R_{6-m} representa independientemente un átomo de hidrógeno o grupo alquilo C_{1-4} opcionalmente sustituido, y cada uno de R_7, R_8, R_9 y R_{10} representa independientemente un átomo de hidrógeno o grupo alquilo C_{1-4} opcionalmente sustituido, en el que los sustituyentes opcionales se seleccionan entre grupos hidroxilo, átomos de halógeno, y grupos hidroxialquilo.

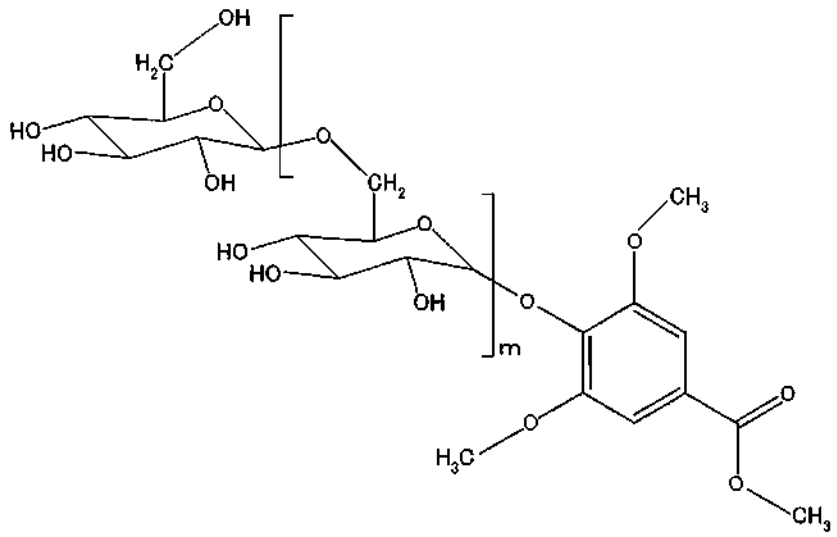
(2) El compuesto de acuerdo con (1), en el que R_1, R_2 y R_3 son todos átomos de hidrógeno.

(3) El compuesto de acuerdo con (1) o (2), en el que R_{4-m}, R_{5-m} y R_{6-m} son todos átomos de hidrógeno.

(4) El compuesto de acuerdo con cualquiera de (1) a (3), en el que R_7, R_8, R_9 y R_{10} son todos átomos de hidrógeno.

(5) El compuesto de acuerdo con cualquiera de (1) a (4), representado mediante la siguiente fórmula:

[C2]



en la que m es un número entero de 1 a 3.

(6) Un compuesto de acuerdo con cualquiera de (1) a (5) para su uso como un inhibidor de la mieloperoxidasa en el tratamiento de una infección bacteriana, aterosclerosis, cáncer de pulmón, enfermedad de Alzheimer, esclerosis múltiple, inflamación o enfermedad cardiovascular.

(7) El compuesto para su uso de acuerdo con (6) que es para su uso en el tratamiento de una infección bacteriana.

(8) El compuesto para su uso de acuerdo con (6) o (7) que es para su uso en combinación con siringato de metilo.

(9) Uso del compuesto de acuerdo con cualquiera de (1) a (5) como un marcador de evaluación de la miel, preferentemente en combinación con siringato de metilo.

(10) Un método para preparar el compuesto de acuerdo con cualquiera de (1) a (5), que comprende una primera etapa de cromatografía en la que se recoge una fracción mediante elución de una solución acuosa de una miel derivada del néctar recogido de manuka o una variedad cercana al manuka con una mezcla de agua y un alcohol C_{1-4} lineal o ramificado.

(11) El método de preparación de acuerdo con (10), en el que la primera etapa de cromatografía usa una fase sólida que consiste en un material de resina de estireno-divinil benceno.

(12) El método de preparación de acuerdo con (10) o (11), en el que la primera etapa de cromatografía es una etapa de cromatografía que usa una fase móvil que comprende agua y un alcohol C_{1-4} lineal o ramificado que se realiza mediante elución en gradiente o en etapas.

(13) El método de preparación de acuerdo con cualquiera de (1) a (12), que comprende además una segunda etapa de cromatografía en la que la fracción se eluye con una fase móvil ácida, y la fracción resultante se recoge.

(14) El método de preparación de acuerdo con cualquiera de (10) a (13), en el que la segunda etapa de cromatografía es una etapa de cromatografía en fase líquida inversa.

(15) El método de preparación de acuerdo con cualquiera de (10) a (14), que comprende además: antes de la primera etapa de cromatografía,
una etapa de separación de una primera fracción más hidrófila y una segunda fracción más hidrófoba que contiene el compuesto de la solución acuosa de miel derivada del néctar recogido de manuka o una variedad cercana al manuka, y una etapa de separación de una tercera fracción más hidrófoba que contiene siringato de metilo y una cuarta fracción más hidrófila que contiene el compuesto de la segunda fracción.

(16) Un método de procesamiento para obtener el compuesto de acuerdo con cualquiera de (1) a (5) a partir de miel derivada del néctar recogido de manuka o una variedad cercana al manuka,
método que comprende:

una etapa de separación de una primera fracción más hidrófila y una segunda fracción más hidrófoba que contiene el compuesto de la solución acuosa de miel derivada del néctar recogido de manuka o una variedad cercana al manuka; y
una etapa de separación de una tercera fracción más hidrófoba que contiene siringato de metilo y una cuarta fracción más hidrófila que contiene el compuesto de la segunda fracción.

(17) Un método para medir una cantidad del compuesto de acuerdo con cualquiera de (1) a (5) en la miel, que comprende una etapa de cromatografía en la que una solución acuosa de miel se eluye con una fase móvil ácida, y la fracción resultante se recoge.

(18) Un método de evaluación de miel, que comprende una etapa de medir una cantidad del compuesto de

acuerdo con cualquiera de (1) a (5) en la miel.
(19) El método de evaluación de acuerdo con (18), que comprende además una etapa de medir una cantidad de siringato de metilo en la miel.
(20) El método de evaluación de acuerdo con (18) o (19), en el que se evalúa un efecto seleccionado entre actividad antibacteriana y actividad antiinflamatoria en la miel.

Breve descripción de las figuras

La FIG. 1 muestra las correlaciones fundamentales de HMBC a partir de espectroscopía de correlación de RMN (HMBC) del glicósido MGGD;
la FIG. 2 es un gráfico de FT-IR de espectro de infrarrojos del glicósido MGGD;
la FIG. 3 es un gráfico de espectrometría de masas (MS) obtenido mediante barrido de masas de Q1 del glicósido MGGD;
la FIG. 4 es un gráfico de espectrometría de masas (MS) obtenido mediante barrido de producto del glicósido MGGD;
la FIG. 5 es un gráfico de análisis de cromatografía líquida de alta resolución de miel de manuka;
la FIG. 6 muestra valores de UMF correlacionados con cantidades de siringato de metilo (MSYR) y el glicósido MGGD (con cantidades molares por gramo de miel mostradas en el eje vertical) gráfico de análisis de cromatografía líquida de alta resolución de miel Asphodel (siringato de metilo MSYR);
la FIG. 7 muestra resultados de detección para el glicósido MGGD en miel de manuka y grano de anís (espectrógrafo de masas LC/MS/MS);
la FIG. 8 muestran los resultados de evaluación de la actividad de inhibición de MPO de MGGD; y
la FIG. 9 muestra las estructuras de metilglioxal y siringato de metilo.

Descripción de realizaciones

Las divulgaciones de la Descripción se refieren un nuevo compuesto glicósido asociado con actividad antiinflamatoria y similares en miel de manuka, y a un uso del mismo. El nuevo glicósido de la invención (en lo sucesivo denominadas simplemente el nuevo glicósido) tiene actividad de inhibición de MPO. Al igual que el nuevo glicósido, el MSYR contenido en la miel de manuka también tiene actividad de inhibición de MPO, y el nuevo glicósido o el nuevo glicósido y MSYR se pueden usar como inhibidores de la actividad de MPO.

La cantidad del nuevo glicósido en la miel de manuka se correlaciona con UMF, que se usa como un índice de la actividad antibacteriana de la miel de manuka, y es útil como un marcador de evaluación para la miel de manuka y otras miles. Además, el nuevo glicósido se puede someter a ensayo fácilmente y en un breve periodo de tiempo mediante cromatografía líquida o similares. Por lo tanto, una evaluación equivalente a una evaluación de UMF se puede realizar sin las medidas de actividad antibacteriana complejas y que requieren tiempo o requeridas en el pasado.

También se descubrió por primera vez que la cantidad de MSYR que tiene actividad de inhibición de MPO en la miel de manuka es inversa a la correlación con UMF. Al igual que el nuevo glicósido, el MSYR se puede extraer y medir fácilmente, de modo que el MSYR también se puede usar para evaluar la miel de manuka.

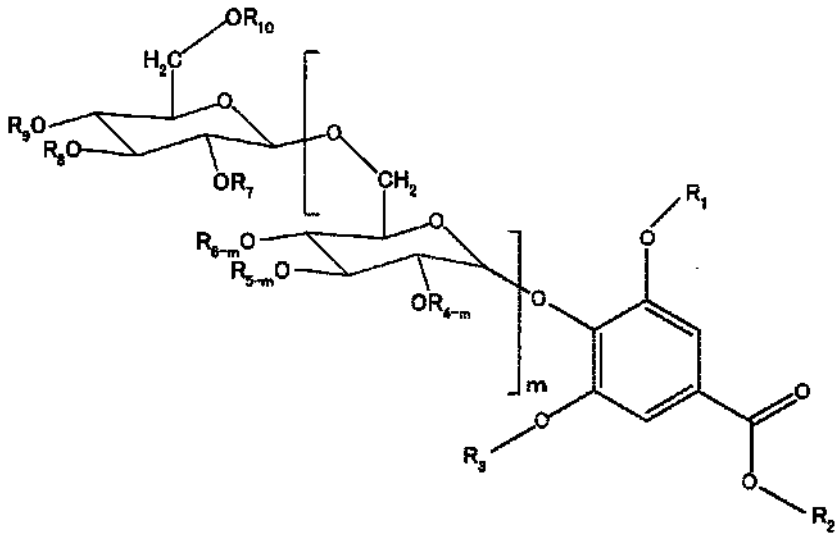
El nuevo glicósido no solamente tiene una actividad de inhibición de MPO excelente, sino que también es un marcador de bioactividad en la miel de manuka. Además, el nuevo glicósido se puede medir fácil y rápidamente en la miel. Por lo tanto, el nuevo glicósido se puede usar de forma ventajosa como un marcador que permite una evaluación fácil y rápida de la bioactividad de la miel de manuka y otras mieles. Este nuevo glicósido es superior a MGO, otro compuesto marcador contenido en la miel de manuka. Esto se debe a que MGO requiere operaciones complejas, tales como conversión en un derivado antes de la medida con HPLC.

Algunas realizaciones de las divulgaciones de la Descripción se explican con detalle a continuación.

(Nuevo glicósido)

El nuevo glicósido se representa mediante la siguiente fórmula.

[C3]



Como se muestra en la fórmula mencionada anteriormente, el nuevo glicósido es un glicósido obtenido por glicosilación de un derivado de MSYR con 2 a 4 moléculas de glucosa. Este compuesto es un nuevo compuesto que los inventores descubrieron al centrarse en la actividad antiinflamatoria de la miel de manuka e identificando sistemáticamente compuestos que tienen actividad de inhibición de MPO.

El nuevo glicósido incluye un compuesto en el que R_1, R_2 y R_3 en la fórmula mencionada anteriormente cada uno independientemente representa átomos de hidrógeno o grupos alquilo C_{1-4} opcionalmente sustituido en el que los sustituyentes opcionales se seleccionan entre grupos hidroxilo, átomos de halógeno, y grupos hidroxialquilo. Los grupos alquilo C_{1-4} pueden ser lineales o ramificados. Algunos ejemplos más específicos incluyen grupos metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, sec-butilo y terc-butilo. En estos grupos alquilo, 1 o 2 o más átomos de hidrógeno pueden estar sustituidos. En el nuevo glicósido, R_1, R_2 y R_3 son todos preferentemente grupos metilo.

El nuevo glicósido incluye un compuesto en el que m en la fórmula mencionada anteriormente es un número entero de 1 a 3. Dando a m un valor de 1 se produce un glicósido (MGGD) con dos derivados de glucosa glicosilados, mientras que dando a m un valor de 2 se produce un glicósido con tres derivados de glucosa glicosilados, y dando a m un valor de 4 se produce un glicósido con cuatro derivados de glucosa glicosilados. De forma simultánea, los inventores identificaron sistemáticamente miel de manuka para glicósidos que comprenden MSYR con 3 o 4 moléculas de glucosa glicosiladas.

El nuevo glicósido incluye un compuesto en el que R_{4-m}, R_{5-m} y R_{6-m} en la fórmula mencionada anteriormente cada uno independientemente representa átomos de hidrógeno o grupos alquilo C_{1-4} opcionalmente sustituidos. Los grupos alquilo C_{1-4} se definen de la misma manera que los grupos alquilo de R_1, R_2 y R_3. Los sustituyentes también se definen de la misma manera que los sustituyentes de los grupos alquilo en R_1, R_2 y R_3.

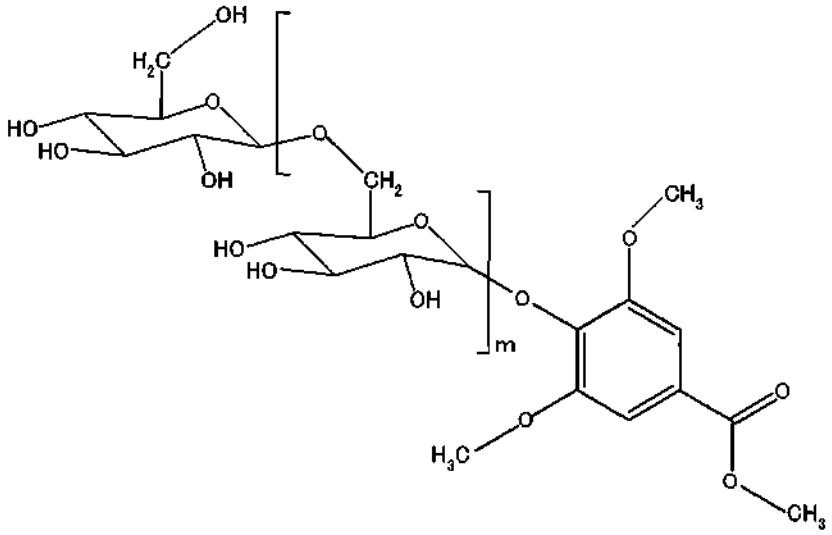
Cuando m es 1 en la fórmula mencionada anteriormente, R_{4-1}, R_{5-1} y R_{6-1} cada uno independientemente representa átomos de hidrógeno o grupos alquilo C_{1-4} opcionalmente sustituidos, mientras que cuando m es 2, R_{4-1}, R_{5-1} y R_{6-1} y R_{4-2}, R_{5-2} y R_{6-2} cada uno independientemente representa átomos de hidrógeno o grupos alquilo C_{1-4} opcionalmente sustituidos. Cuando m es 3, R_{4-1}, R_{5-1} y R_{6-1}, R_{4-2}, R_{5-2} y R_{6-2} y R_{4-3}, R_{5-3} y R_{6-3} cada uno independientemente representa átomos de hidrógeno o grupos alquilo C_{1-4} opcionalmente sustituidos.

En el nuevo glicósido, los átomos de hidrógeno dominan preferentemente en R_{4-m}, R_{5-m} y R_{6-m}, y más preferentemente todos de R_{4-m}, R_{5-m} y R_{6-m} son átomos de hidrógeno.

El nuevo glicósido incluye un compuesto en el que R_7, R_8, R_9 y R_{10} en la fórmula mencionada anteriormente son cada uno independientemente un átomo de hidrógeno o grupo alquilo C_{1-4} opcionalmente sustituido. Los grupos alquilo C_{1-4} se definen de la misma manera que los grupos alquilo de R_1, R_2 y R_3. Los sustituyentes también se definen de la misma manera que los sustituyentes de los grupos alquilo en R_1, R_2 y R_3. En el nuevo glicósido, R_7, R_8, R_9 y R_{10} son todos preferentemente átomos de hidrógeno.

Un ejemplo del nuevo glicósido es un compuesto representado por la siguiente fórmula (en la que m es un número entero de 1 a 3). Por lo general, se trata del 4-O-[β-D-glucopiranosil-(1→6)-β-D-glucopiranosil]-3,5-dimetoxibenzoato

de metilo (MGGD), en el que m es 1 en la fórmula que sigue a continuación:



(en la que m representa un número entero de 1 a 3).

(Inhibidor de actividad de MPO)

El nuevo glicósido de la invención se puede usar como un inhibidor de la actividad de MPO. El nuevo glicósido tiene actividad de inhibición de MPO. Los inventores descubrieron actividad de inhibición de MPO para MGGD, y teniendo en cuenta que MSYR tiene actividad de inhibición de MPO y que las enzimas se escinden los enlaces β-1-6 glicosídicos están muy extendidas, parece que el nuevo glicósido (incluyendo MGGD) es un compuesto o un precursor de un compuesto que tiene actividad de inhibición de MPO, y se puede decir que todos los nuevos glicósidos funcionan como inhibidores de la actividad de MPO.

La actividad de inhibición de MPO del nuevo glicósido se puede medir por ejemplo con los métodos descritos en la bibliografía (Biosci. Biotechnol. Biochem. 2003, 67 (5), pp 1136-1139). Es decir, la L-tirosina se disuelve como un sustrato en tampón fosfato (pH 7,4), a esto se le añade enzima mieloperoxidasa junto con un compuesto inhibidor candidato, se añade peróxido de hidrógeno para iniciar una reacción enzimática, y después de 15 minutos a 37ºC se añade una catalasa, y el peróxido de hidrógeno restante se retira para terminar la reacción. El componente de bajo peso molecular solo se retira con una membrana de ultrafiltración en centrífuga, y la fluorescencia de la ditirosina se detecta a una longitud de onda de excitación de 300 nm y una longitud de onda de fluorescencia de 400 nm mediante HPLC en fase inversa usando una columna de ODS. La actividad de inhibición de MPO se puede evaluar midiendo el aumento y la disminución en el pico de la ditirosina.

La mieloperoxidasa (MPO) es una enzima encontrará principalmente en neutrófilos, y está muy asociada con el control biológico en infecciones bacterianas. En presencia de peróxido de hidrógeno y halógenos, se informa que la MPO eliminan los invasores microbianos del organismo produciendo las especies activas resistentes como se representa mediante ácido hipocloroso y ácido hipobromoso. También se ha informado de asociaciones entre MPO y aterosclerosis, cáncer de pulmón, enfermedad de Alzheimer y esclerosis múltiple. La MPO también está presente en sitios de aterosclerosis, y se informa que está implicada en el inicio de mecanismos de inflamación y enfermedad cardiovascular. Por lo tanto, es posible deducir una asociación entre la actividad de inhibición de MPO por un lado y una acción antiinflamatoria y (la prevención, tratamiento y similares de) diversas enfermedades que incluyen las enumeradas anteriormente. Se puede esperar que un compuesto que tiene actividad de inhibición de MPO tenga un efecto antiinflamatorio.

Ya se ha informado que el MSYR (siringato de metilo) de la miel de manuka tiene actividad de inhibición de MPO. El MSYR se puede separar de la miel de manuka al mismo tiempo que MGGD. Un inhibidor de la actividad de MPO que contiene a ambos es útil.

(Marcador de evaluación de la miel, kit y método de evaluación de la miel)

(Marcador de evaluación de la miel)

El nuevo glicósido desvelado en la presente descripción se puede usar como un marcador de evaluación de la miel (en lo sucesivo denominados simplemente "el marcador"). El nuevo glicósido se correlaciona con UMF, un marcador

de evaluación conocido para la bioactividad y similares de la miel de manuka. Es decir, la miel de manuka con un valor de UMF elevado también tiene un valor elevado para el nuevo glicósido. Por lo tanto, el nuevo glicósido se puede usar como un índice para la evaluación de UMF. De acuerdo con los inventores y otros, el nuevo glicósido apenas se encuentra fuera del ambiente manuka. Aparte de las mieles derivadas del manuka *(Leptospermum scoparium),* que crece solamente en Nueva Zelanda, y su variedad cercana, *Leptospermum poligalifolium,* [el nuevo glicósido] se encuentra solamente en cantidades traza en otras mieles de Nueva Zelanda. Por lo tanto, la bioactividad, calidad y similares de una miel se puede evaluar determinando si contiene o no el nuevo glicósido, y en qué cantidad. Además de determinar si una miel es miel de manuka, también se puede poner en práctica la identificación sistemática de nuevas mieles que contienen el nuevo glicósido.

Dado que el nuevo glicósido se correlaciona con UMF en particular, que es un índice de actividad antibacteriana, el marcador se puede usar para evaluar la actividad antibacteriana. Dado que el nuevo glicósido tiene actividad de inhibición de MPO, además, el marcador se puede usar para evaluar la actividad de inhibición de MPO y otra actividad antiinflamatoria de la miel.

Para el nuevo glicósido acusan con un marcador, este se aísla de la miel se identifica o se somete a ensayo. El aislamiento, identificación y ensayo del nuevo glicósido de la miel se explican a continuación. Los métodos que usan equipo de análisis conocido desvelado en los ejemplos y similares se pueden usar para identificar el nuevo glicósido, o el nuevo glicósido se puede preparar con una sustancia patrón y comparar por cromatografía similares. También se pueden aplicar diversos métodos para someter al ensayo el nuevo glicósido. Cuando el MSYR se usa como un marcador, este también se puede aislar, identificar y someter a ensayo de la misma manera que el nuevo glicósido.

(Kit de evaluación)

Un kit de evaluación de miel puede contener el nuevo glicósido y siringato de metilo. Los inventores descubrieron que la cantidad de siringato de metilo (MSYR) se correlaciona de forma inversa con el

UMF de la miel de manuka. Por lo tanto, una evaluación más específica se puede conseguir mediante la combinación del nuevo glicósido (que se correlaciona con el UMF) con el MSYR (que se correlaciona de forma inversa con el UMF).

(Método de evaluación de la miel)

El método de evaluación de la miel desvelado en la presente Descripción puede comprender una etapa de identificar el nuevo glicósido o medir la cantidad del nuevo glicósido en la miel. Esto se debe a que el nuevo glicósido es útil para evaluar la bioactividad de la miel como se ha discutido anteriormente. El método también puede comprender una etapa de identificar el MSYR o medir la cantidad de MSYR, porque esto puede hacer que la evaluación sea más específica. La actividad antibacteriana, actividad antiinflamatoria y otra bioactividad de la miel se puede evaluar con este método.

(Método de preparación del nuevo glicósido)

El método de preparación del nuevo glicósido puede comprender una primera etapa de cromatografía en la que una fracción se recoge mediante elución de una solución acuosa de miel derivada del néctar recogido de manuka o una planta relacionada con una mezcla de agua y un alcohol inferior en el que el alcohol inferior es un alcohol C_{1-4} lineal o ramificado. El compuesto se puede obtener fácilmente con este método de preparación.

(Primera etapa de cromatografía)

En la mezcla de agua y un alcohol inferior, el agua también puede ser un líquido ácido. El ácido puede ser un ácido inorgánico u orgánico tal como ácido acético, ácido fórmico o ácido trifluoracético. El agua también puede contener una sal tal como amonio* ácido, acetato amónico o similares. El alcohol inferior es un alcohol C_{1-4} lineal o ramificado. Algunos ejemplos incluyen metanol, etanol, n-propanol, isopropanol, n-butanol, 2-butanol y terc-butanol.

La forma de cromatografía en la primera etapa de cromatografía no está limitada en particular. No se limita a cromatografía en columna, y puede tomar otras diversas formas. Un vehículo capaz de fraccionar compuestos de bajo peso molecular en general se puede usar como el material de separación. Por lo general, se puede usar un vehículo hidrófobo (fase inversa) que tenga una estructura de hidrocarburo aromático y/o ramificado. Por ejemplo, se puede usar un vehículo que consiste en un material de resina de estireno-divinilbenceno. El vehículo también puede tener poros adecuados. La forma externa del vehículo no está limitada en particular.

El nuevo glicósido está contenido en una fracción eluida o extraída con la mezcla de agua y un alcohol inferior en el que el alcohol inferior es un alcohol C_{1-4} lineal o ramificado. Variando las proporciones relativas del agua y el alcohol inferior de forma apropiada a la vez que se recoge el nuevo glicósido, es posible determinar las proporciones más apropiadas para elución o similares del glicósido, aunque éstas se diferencien de acuerdo con el tipo de vehículo. También se pueden realizar separación y purificación si fuera necesario, pero la purificación parcial también es

posible ya que en algunos casos es útil incluso una fracción en bruto.

Por ejemplo, usando un vehículo hidrófobo habitual (tal como un material de resina de estireno-divinilbenceno), si se realiza cromatografía mediante elución en gradiente con una fase móvil (gradiente) que tenga una composición de gradiente temporal de agua y metanol u otro alcohol inferior, o mediante elución en etapas con una fase móvil en la que la proporción de composición varía en las etapas, el nuevo glicósido se fracciona fácilmente en una fracción con una proporción de volumen de 7:3 a 4:6 de la mezcla de agua y un alcohol inferior. De forma más específica, la fracción tiene una proporción de volumen de 7:3 a 5:5, o incluso de forma más específica de 7:3 a 6:4, o lo más particularmente 6:4.

(Segunda etapa de cromatografía)

También se puede incluir una segunda etapa de cromatografía en la que esta fracción se eluye con una fase móvil ácida para recoger una fracción. De este modo, es posible obtener el nuevo glicósido con una pureza más elevada. La identificación y la detección del compuesto se pueden realizar al mismo tiempo.

Para esta segunda etapa de cromatografía se usa preferentemente cromatografía líquida en fase inversa. Un vehículo de fase inversa que tiene grupos alquilo con aproximadamente 8 a 20 átomos de carbono se usa preferentemente como el vehículo. La fase móvil se puede establecer de forma apropiada de acuerdo con el vehículo, pero dado que el compuesto es un glicósido, es preferente una fase móvil que contenga agua, y considerando la estructura del nuevo glicósido, se recomienda una fase móvil ácida para facilitar la elución. Por lo tanto, una mezcla o gradiente de de una fase acuosa ácida y una fase orgánica se usa preferentemente como fase móvil. La fase acuosa para la fase móvil puede ser agua ácida que contenga ácido trifluoracético, ácido acético, ácido fórmico o similares. La fase orgánica puede ser acetonitrilo, metanol, butanol, DMSO, DMF o similares.

La cromatografía líquida de interacción hidrófila (HILIC) diseñada para retener un compuesto hidrófilo por medio de grupos hidrófilos mantenidos en una fase estacionaria se puede usar para la segunda etapa de cromatografía.

Para separar el nuevo glicósido, la presencia del nuevo glicósido en las fracciones eluidas se detecta con un método de detección adecuado, la fracción que contiene el nuevo glicósido se identifica, y el nuevo glicósido se aísla de esta fracción se espera necesario y se purifica si era necesario. Los expertos en la materia conocen bien algunos métodos para purificación adicional y similares de glicósidos tales como el nuevo glicósido después de que se hayan fraccionado por cromatografía.

El medio para detectar el nuevo glicósido no está limitado de forma particular. Se puede usar un detector de absorción ultravioleta ordinario, o se puede usar un medio de detección (tal como MS) adecuado para la estructura del nuevo glicósido. La longitud de onda de detección no está limitada en particular, pero una longitud de onda de 262 mm (característica del nuevo glicósido) y longitudes de onda aproximadas (± 20~50 nm) son preferentes.

El nuevo glicósido se puede detectar, identificar y también someter al ensayo con gran precisión con la segunda etapa de cromatografía. Usando cromatografía líquida de alta resolución, es posible detectar y separar el nuevo glicósido y MSYR en el tiempo a partir de las fracciones eluidas con un medio de detección adecuado, y se puede identificar y someter a ensayo usando sustancias convencionales o similares.

En el método de preparación del nuevo glicósido mencionado anteriormente, el MSYR también se separa de la miel. En la primera etapa de cromatografía, el MSYR se puede aislar al mismo tiempo que el nuevo glicósido, o a una concentración más elevada cambiando la mezcla de agua-alcohol inferior de modo que la proporción del alcohol inferior sea más elevada que la del nuevo glicósido, tal como cambiando la proporción de volumen de agua con respecto a alcohol inferior de 6:4 a 4:6 aproximadamente, por ejemplo. El MSYR también se puede aislar, detectar, identificar y someter a ensayo incluso en presencia del nuevo glicósido aplicando la segunda etapa de cromatografía al igual que para el nuevo glicósido. En una segunda etapa de cromatografía habitual, el MSYR se aísla de forma eficaz del nuevo glicósido.

Las siguientes etapas también se pueden adoptar antes de aplicar la solución acuosa de miel en la primera etapa de cromatografía. Es decir, es posible incluir tanto una primera etapa de separación para separar una primera fracción hidrófila y una segunda fracción hidrófoba que contiene el nuevo glicósido de una solución acuosa de miel derivada del néctar recogido del manuka o una planta relacionada, y una segunda etapa de separación para separar una tercera fracción hidrófoba que contiene siringato de metilo y una cuarta fracción hidrófila que contiene el nuevo glicósido de la segunda fracción. Este tratamiento previo permite ampliar el proceso, y ayuda a mejorar la separación y similares en la primera etapa de cromatografía posterior y segunda etapa de cromatografía. Además, a continuación la segunda etapa de cromatografía se puede omitir o acelerar.

En la primera etapa de separación, los compuestos solubles en agua y azúcares en la solución acuosa de miel se separan de la primera fracción mientras que el nuevo glicósido se separa en la segunda fracción. Los métodos de la primera etapa de separación no se ven limitados en particular, y se pueden seleccionar de forma apropiada de acuerdo con la polaridad y similares del nuevo glicósido y los azúcares y otros compuestos solubles en agua en la

miel. Por ejemplo, se pueden adoptar los siguientes métodos.

La primera etapa de separación se puede realizar por ejemplo aplicando la solución al vehículo usado en la primera etapa de cromatografía. El modo de aplicación está limitado en particular, y puede ser por cromatografía en columna, o por mezcla del vehículo y la solución juntos en un recipiente adecuado. El nuevo glicósido y el siringato de metilo se reparten de este modo en el vehículo hidrófobo (segunda fracción), mientras que los compuestos y azúcares solubles en agua más hidrófilos se reparten en la fase acuosa (primera fracción). A continuación, los compuestos los azúcares solubles en agua se pueden retirar de forma eficaz mediante lavado y retirada de la fase acuosa, a la vez que se retiene el nuevo glicósido y el siringato de metilo en el vehículo. La retirada de los compuestos y azúcares solubles en agua por la fase acuosa se repite un número de veces según sea necesario. El nuevo glicósido y el siringato de metilo se pueden recoger a continuación del vehículo lavando y eluyendo el vehículo con metanol para obtener la segunda fracción.

En la segunda etapa de separación, una tercera fracción más hidrófoba que contiene siringato de metilo y una cuarta fracción más hidrófila que contiene el nuevo glicósido se separan de la segunda fracción. Los métodos de la segunda etapa de separación no están limitados en particular, y se pueden seleccionar de forma apropiada de acuerdo con la polaridad y similares del nuevo glicósido y los azúcares y otros compuestos solubles en agua en la miel. Por ejemplo, se pueden adoptar los siguientes métodos.

En la segunda etapa de separación, por ejemplo el metanol u otro disolvente se retira primero por evaporación o similares de la segunda fracción, se añade un disolvente compatible con MSYR tal como acetato de etilo que disuelve a MSYR a la fracción concentrada junto con agua u otro disolvente compatible con el nuevo glicósido que disuelve el nuevo glicósido pero que separa la fase porque no es compatible con el disolvente compatible con MSYR, y el reparto de líquido-líquido se realiza con un embudo de separación. Dado que el nuevo glicósido se reparte en la fase acuosa (cuarta fracción) mientras que el MSYR se desplaza a la fase de acetato de etilo (tercera fracción), el MSYR y el nuevo glicósido se puede separar de esta manera.

El disolvente compatible con MSYR y el disolvente compatible con el nuevo glicósido se pueden seleccionar de forma apropiada a partir de disolventes conocidos usados en el reparto habitual de líquido-líquido, teniendo en cuenta la solubilidad del MSYR y del nuevo glicósido, the la compatibilidad de los disolventes y similares.

Estas etapas de separación se pueden realizar con el mismo tipo de cromatografía que en la primera etapa de cromatografía, pero también se pueden realizar mediante un proceso discontinuo en un recipiente adecuado.

Después de la segunda etapa de separación, el MSYR de la tercera fracción se puede separar adicionalmente y se puede purificar por cromatografía o similares al igual que en la segunda etapa de cromatografía usando un vehículo hidrófobo adecuado. Por lo tanto, el MSYR se puede recoger, detectar, someter a ensayo y similares. Después de la segunda etapa de separación, el nuevo glicósido se puede separar adicionalmente y se puede purificar realizando una primera etapa de cromatografía y una segunda etapa de cromatografía si fuera necesario. Cuando la cuarta fracción se aplica a la primera etapa de cromatografía, también se puede concentrar de forma apropiada.

La primera etapa de separación y la segunda etapa de separación explicadas anteriormente se pueden realizar de forma independiente como métodos previos al procesamiento para obtener el nuevo glicósido y/o siringato de metilo.

(Método para medir el nuevo glicósido en la miel)

El método para medir el nuevo glicósido en la miel desvelado en la presente Descripción puede comprender una etapa de recogida de la fracción eluida en una fase móvil ácida por cromatografía de una solución acuosa de miel. El nuevo glicósido se puede separar fácilmente de la miel y detectar e identificar con este método de medida. El contenido de la segunda etapa de cromatografía para el nuevo glicósido se puede aplicar al igual que se hace con la recogida, detección y ensayo del nuevo glicósido. Es decir, se puede detectar y someter a ensayo usando los métodos de detección aplicados a la fracción eluida de la fase móvil ácida.

Este nuevo glicósido, como se ha mencionado anteriormente, no se encuentra en otra miel que no sea la derivada del néctar recogido del manuka o una planta relacionada. Por lo tanto, se cree que la detección y ensayo del nuevo glicósido es útil como un marcador de miel de manuka, o en otras palabras, para verificar el lugar de origen y la proporción de mezcla.

Ejemplos

Las divulgaciones de la presente Descripción se explican con más detalle a continuación usando ejemplos, pero el transcurso de estas divulgaciones no se limita solamente a los ejemplos.

[Ejemplo 1]

Un glicósido se purificó usando miel de manuka disponible en el mercado. Se añadieron 40 g de miel de manuka disponible en el mercado (preferentemente un producto con un valor de UMF elevado) a 200 ml de agua, que se calentó para disolver la unión. Una columna abierta de vidrio se empaquetó con las Diaion Sepabeads HP20 en resina de intercambio iónico de Mitsubishi Chemical (usando aproximadamente 300 ml en un estado hinchado), y la miel de manuka y suelta se pasó a través de la columna, seguido de 500 ml de agua. 500 ml de cada una de las soluciones de agua y metanol en proporciones de 8/2, 6/4, 4/6 y 2/8 y una solución de metanol solo se pasaron a través de la columna, y solamente se recogieron las soluciones de agua/metanol de 6/4 y 4/6 y se concentraron con un rotavapor, se disolvieron de nuevo en una pequeña cantidad de mezcla de agua/metanol, y se separaron y purificaron en condiciones de HPLC.

Condiciones de separación de HPLC

Columna:	Combi-RP (20 x 100 mm)
Caudal:	5 ml/min
Disolvente de elución:	ácido acético al 0,1 %/acetonitrilo = 85/15
Longitud de onda de detección:	262 nm

La sustancia purificada resultante se concentró, y el MGGD se confirmó usando diversos tipos de análisis con máquina. Se obtuvieron 30 mg a partir de 63,5 g (peso en húmedo) de la miel de manuka, para un rendimiento de un 0,047 %.

Los resultados de RMN se muestran en la FIG. 1. Los resultados de FTIR se muestran en la FIG. 2, y los resultados de espectroscopía de masas se muestran en la FIG. 3 y en la FIG. 4. Además, los valores físicos para la sustancia resultante fueron los que siguen a continuación.

[α]D = -30,1 (c = 0,69, MeOH)
ESI-MS m/z 535 $[M-H]^-$, peso molecular 536
λ máx
262 nm

A partir de los resultados en las FIGS. 1 a 4, el compuesto resultante se especificó como 4-O β-D-glucopiranosil-(1→6)-β-D-glucopiranosil]-3,5-dimetoxibenzoato de metilo (MGGD).

[Ejemplo 2]

Usando el nuevo glicósido MGGD obtenido en el Ejemplo 1 y el MSYR disponible en el mercado como patrones de referencia, los dos compuestos se sometieron a ensayo en la miel de manuka. Éstos también se sometieron a ensayo de la misma manera en miel de asphodel (de Cerdeña, Italia), de la que se ha informado que contiene grandes cantidades de MGGD (Bibliografía de No Patente 4). Las cantidades de MGGD y MSYR también se sometieron a ensayo en múltiples mieles de manuka con diferentes valores de UMF. De forma específica, esto se realizó como sigue a continuación.

La miel se pesa y se disuelve en agua (aproximadamente 100 mg/ml), y parte (aproximadamente 5 µl) se inyecta en un sistema de HPLC equipado con un detector de absorción de UV (detector de UV). Los resultados se muestran en la FIG. 5 y en la FIG. 6.

Condiciones del análisis de HPLC

Columna:	Develosil ODS-HG-5 (4,6 x 150 mm)
Caudal:	0,8 ml/min
Disolvente de elución:	A: ácido acético al 0,1 %, B: acetonitrilo
Longitud de onda de detección:	262 nm

(Condiciones del gradiente)

[Tabla 1]

Tiempo, min	Disolvente A %
0	100
30	70
35	100
50	100

El cromatograma en la parte superior de la FIG. 5 muestra los resultados para la miel de manuka. Como se muestra en esta figura, MGGD y MSYR estaban claramente aislados mediante cromatografía. El cromatograma en la parte inferior de la FIG. 5 muestra los resultados para la miel de asphodel. Dado que el nuevo glicósido MGGD tiene MSYR en su marco básico, esto muestra que la miel de asphodel, que contiene grandes cantidades de MSYR, no contiene MGGD en absoluto. Por lo tanto, parece que MGGD es altamente específica con respecto a la miel de manuka, y está muy asociada con su bioactividad. También muestra que simplemente porque una miel contenga grandes cantidades de MSYR no significa que también contenga MGGD necesariamente.

La FIG. 6 muestra los resultados para la medida de MGGD y MSYR en las mieles de manuka con diferentes valores de UMF. Como se muestra en la FIG. 6, hay una fuerte correlación entre el contenido de MGGD y el valor de UMF. Sin embargo, el contenido de MSYR está inversamente correlacionado con el valor de UMF.

[Ejemplo 3]

El MGGD comprende el disacárido gentiobiosa unido a MSYR, y en el grano de anís se ha informado de MSYR con un monosacárido unido al mismo (formas de glucósidos de compuesto aromático, alquil glucósido y glúcido del fruto del anís. Fujimatu E, Ishikawa T, Kitajima J. Phytochemistry. 2003, 63 (5): 609-616.). Por lo tanto, es posible que el grano de anís también contenga MGGD. Por lo tanto, el MGGD se midió en la miel de manuka y en el grano de anís usando un espectrógrafo de masas de LC/MS/MS. Las condiciones del análisis fueron las que siguen a continuación. Los resultados se muestran en la FIG. 7. (condiciones del análisis de LC/MS/MS).

Espectrógrafo de masas:	API3000
Columna:	Develosil ODS-HG-5 (2 x 150 nm)
Caudal:	0,2 ml/min
Disolvente de elución:	A: ácido acético al 0,1 %, B: acetonitrilo
Inyección	5 µl
Modo:	Ionización con electronebulización negativa, Control de Reacción Múltiple 535,1/211,1

(Condiciones del gradiente)

[Tabla 2]

Tiempo, min	Disolvente A %
0	100
18	70
18,4	100
30	100

Como se muestra en la FIG. 7, el MGGD se detectó en la miel de manuka mediante análisis altamente sensible usando un espectrógrafo de masas de LC/MS/MS, pero no se detectó nada en el grano de anís. Esto muestra que el MGGD es altamente específico para la miel de manuka, y está muy asociado con su actividad. También muestra es simplemente porque una miel contenga grandes cantidades de MSYR no significa que también contenga MGGD necesariamente.

En el análisis de LC/MS de la miel de manuka, se confirmaron picos a pesos moleculares de 697,2 y 859,2, correspondientes, respectivamente, a un triglicósido y tetraglicósido de MSYR. Esto muestra que además del diglicósido MGGD de MSYR, la miel de manuka también contiene su triglicósido y tetraglicósido. La investigación adicional de otras mieles de manuka reveló que el triglicósido y el tetraglicósido estaban presentes en cantidades más pequeñas que el diglicósido, y estaban ausentes o no se detectaban en algunas de las otras mieles de manuka.

[Ejemplo 4]

Las actividades de inhibición de la MPO del MGGD aislado y su MSYR de aglicón se midieron mediante evaluación de la inhibición de la halogenación de los restos de tirosina de una proteína etiquetada con biotina (albúmina de suero bovino). Por lo tanto, es posible medir cualquiera de la inhibición de la enzima MPO por sí misma o la capacidad para agotar o capturar el ácido hipobromoso (HOBr) y otras especies activas producidas por la enzima.

Las soluciones necesarias y similares para la reacción se prepararon como sigue a continuación.

(1) 0,5 µM de MPO humana.

(2) Xantina oxidasa (XOD) (Sigma X4500-25UN) diluida 100x con agua.
(3) 5,61 µl de acetoaldehído (ALD) (Merck A4907704746) diluido en 1 ml de agua a 100 mM.
(4) Biotina-BSA (Sigma-A6043-10MG) disuelta hasta 1 mg/ml en tampón fosfato 0,1 M con NaBr 200 µM y NaCl 200 mM añadido con anterioridad, a continuación liofilizar para almacenamiento, y diluir a 0,4 mg/ml antes de su uso.
(5) Muestra preparada a 5 mM.
(6) Glutatión reducido (GSH) (Sigma G-6529) como un control positivo.
(7) L-metionina, disuelta en agua a 10 mM.

Se añadieron 50 µl de Biotina-BSA y 10 µl cada uno de la muestra, MPO y XOD a un tubo Eppendorf, se añadió agua hasta un total de100 µl, y se añadieron 10 µl de ALD para iniciar la reacción. Una mezcla sin una muestra añadida se preparó con un control, y una reacción comenzó de la misma manera. Después de 30 minutos de reacción a 37 ºC, se añadieron 75 µl de la solución de reacción a una columna de microcentrifugación (BioRad), y se centrifugó durante 4 minutos a 1000 g para recoger la Biotina-BSA, a la vez que se añadían 75 µl de L-metionina al sobrenadante para determinar la reacción.

50 µl de un anticuerpo 3A5 de concentración de 10 µg/ml (Nikken Seil) que reconoce tirosinas dihalogenadadas se revistió como un anticuerpo primario en cada microplaca, y se dejó en reposo durante una noche a 4 ºC. Esto se lavó tres veces con PBS que contenía Tween 20 al 0,05 % (TPBS), y se bloqueó con 200 µl de solución acuosa de leche desnatada al 1 % (Block Ace powder, Yukijirushi) disuelta en agua. Después de reposar durante 30 minutos a 37 ºC esto se lavó, la muestra (Biotina-BSA recogida) se diluyó 5 veces con TPBS, y se añadieron 100 µl y se deja en reposo durante 45 minutos a 37 ºC. A continuación, esto se lavó, y como un anticuerpo secundario se añadieron 100 µl de Estreptavidina Ultrasensible, Polímero (HRP) (Sigma) diluido 7500 veces en TPBS. A continuación esto se dejó de nuevo en reposo durante 45 minutos a 37 ºC y se lavó, tras lo que se añadieron 100 µl de un reactivo colorante de TMB (3,3'-5,5'-tetrametilbentidina) (líquido A/líquido B = 1/1), y la absorbancia se midió a 450 nm/550 nm durante aproximadamente 10 minutos con un lector de microplacas. Los resultados muestran en la FIG. 9.

Como se muestra en la FIG. 9, el MGGD presentaba actividad de inhibición enzimática de MPO en comparación con la coloración (producción de tirosina halogenada) del control (no Anti) sin antioxidante añadido.

[Ejemplo 5]

En este ejemplo, el MSYR y el MGGD se purificaron a partir de miel de manuka disponible en el mercado. En primer lugar, se añadieron 500 ml de agua a 500 g de miel de manuka disponible en el mercado, y se agitó bien para obtener una solución de miel que a continuación se mezcló bien con 400 ml de la resina HP20 usada en el Ejemplo 1 (hinchada con agua), y se lavó minuciosamente con agua en un embudo Buchner. A continuación, se proporcionó metanol a la resina HP20 en el embudo Buchner, y se recogió un eluato de metanol. El eluato de metanol se secó. El producto seco se disolvió en 50 ml de agua y se transfirió a un embudo de separación de líquido, al embudo de separación se añadieron acetato de etilo y agua y se mezcló para obtener 100 ml de una mezcla de acetato de etilo/agua a 1:1 (proporción de volumen) en el embudo de separación, la fase de acetato de etilo se descartó, y las etapas de adición de una cantidad adicional de 50 ml de acetato de etilo, mezclando bien y descartando la fase de acetato de etilo se repitieron dos veces. La buena distribución del MSYR en la fase de acetato de etilo se confirmó por cromatografía. La distribución de MGGD en la fase acuosa también se confirmó. Las condiciones de HPLC fueron las que siguen a continuación.

(Condiciones del análisis de HPLC)

Columna:	Chromolith HR (4,6 x 100 mm)
Caudal:	1,0 ml/min
Disolvente de elución:	A: ácido fórmico al 0,1 %, B: acetonitrilo
Longitud de onda de detección:	262 nm
Programa:	0 min, A 90 %, 10 min, A 70 %, 11 min, A 90 %, 20 min, A 90 %

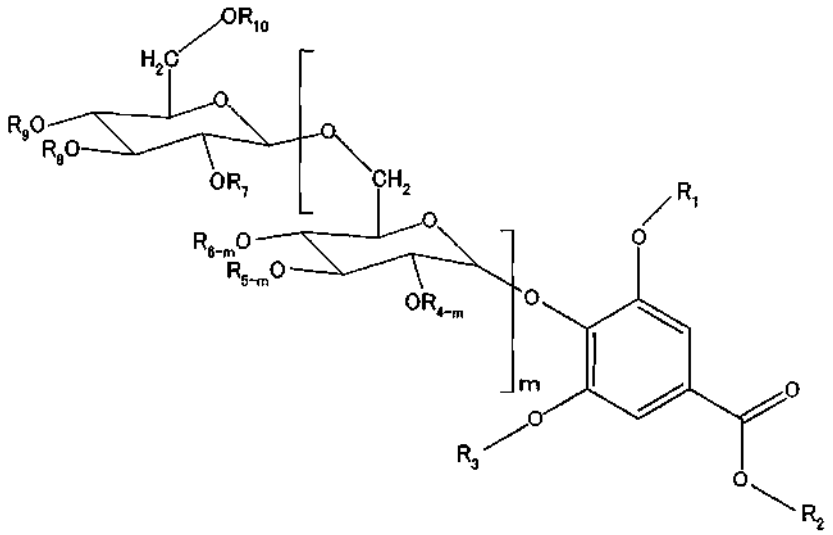
A continuación, la fase acuosa en el embudo de separación se concentró con un evaporador de centrífuga, se aplicó a una columna abierta empaquetada con resina HP20 y se lavó con agua y una mezcla de agua:metanol (8:2), tras lo cual el MGGD se eluyó con una mezcla de agua:metanol (1:1), y el reparto del MGGD en el líquido recogido se confirmó por cromatografía. Las condiciones de HPLC fueron las que siguen a continuación.

(Condiciones del análisis de HPLC)

Columna:	Chromolith HR (4,6 x 100 mm)
Caudal:	1,0 ml/min
Disolvente de elución:	A: ácido fórmico al 0,1 %, B: acetonitrilo
Longitud de onda de detección:	262 nm

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto representado mediante la siguiente fórmula:



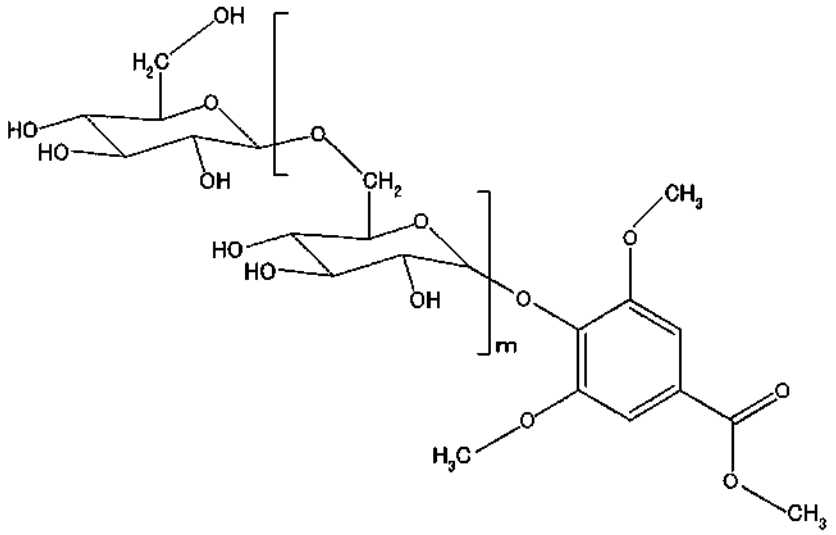
en la que, cada uno de R_1, R_2 y R_3 representa independientemente un átomo de hidrógeno o grupo alquilo C_{1-4} opcionalmente sustituido, m representa un número entero de 1 a 3, cada uno de R_{4-m}, R_{5-m} y R_{6-m} representa independientemente un átomo de hidrógeno o grupo alquilo C_{1-4} opcionalmente sustituido, y cada uno de R_7, R_8, R_9 y R_{10} representa independientemente un átomo de hidrógeno o grupo alquilo C_{1-4} opcionalmente sustituido, en el que los sustituyentes opcionales se seleccionan entre grupos hidroxilo, átomos de halógeno, y grupos hidroxialquilo.

2. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que R_1, R_2 y R_3 son todos átomos de hidrógeno.

3. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que R_{4-m}, R_{5-m} y R_{6-m} son todos átomos de hidrógeno.

4. El compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que R_7, R_8, R_9 y R_{10} son todos átomos de hidrógeno.

5. El compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, representado mediante la siguiente fórmula:



en la que m es un número entero de 1 a 3.

6. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para uso como un inhibidor de la mieloperoxidasa en el tratamiento de una infección bacteriana, aterosclerosis, cáncer de pulmón, enfermedad de Alzheimer, esclerosis múltiple, inflamación o enfermedad cardiovascular.

7. El compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 6 que es para uso en el tratamiento de una infección bacteriana.

8. El compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 6 o 7, que es para uso en combinación con siringato de metilo.

9. Uso del compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 como un marcador de evaluación de la miel, preferentemente en combinación con siringato de metilo.

10. Un método de fabricación del compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende una primera etapa de cromatografía en la que se recoge una fracción mediante elución de una solución acuosa de una miel derivada del néctar recogido de manuka, o una variedad cercana al manuka, con una mezcla de agua y un alcohol C_{1-4} lineal o ramificado.

11. El método de fabricación de acuerdo con la reivindicación 10, en el que:

(a) la primera etapa de cromatografía usa una fase sólida que consiste en un material de resina de estireno-divinil benceno; o
(b) la primera etapa de cromatografía es una etapa de cromatografía que usa una fase móvil que comprende agua y un alcohol C_{1-4} lineal o ramificado que se realiza mediante elución en gradiente o en etapas; o
(c) comprende adicionalmente una segunda etapa de cromatografía en la que la fracción se eluye con una fase móvil ácida, y la fracción resultante se recoge, preferentemente en el que la segunda etapa de cromatografía es una etapa de cromatografía en fase líquida inversa; o
(d) comprende adicionalmente: antes de la primera etapa de cromatografía,

una etapa de separación de una primera fracción más hidrófila y una segunda fracción más hidrófoba que contiene el compuesto de la solución acuosa de miel derivada del néctar recogido de manuka o una variedad cercana al manuka, y
una etapa de separación de una tercera fracción más hidrófoba que contiene siringato de metilo y una cuarta fracción más hidrófila que contiene el compuesto de la segunda fracción.

12. Un método de procesamiento para obtener el compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 a partir de miel derivada del néctar recogido de manuka o una variedad cercana al manuka,
comprendiendo el método:

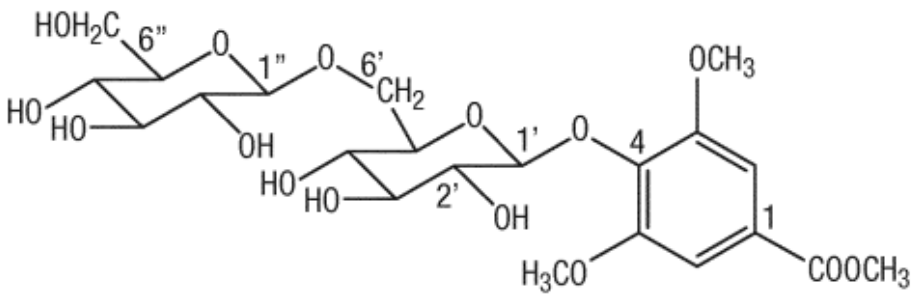
una etapa de separación de una primera fracción más hidrófila y una segunda fracción más hidrófoba que contiene el compuesto de la solución acuosa de miel derivada del néctar recogido de manuka o una variedad cercana al manuka;
y
una etapa de separación de una tercera fracción más hidrófoba que contiene siringato de metilo y una cuarta fracción más hidrófila que contiene el compuesto de la segunda fracción.

13. Un método para medir una cantidad del compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en la miel, que comprende una etapa de cromatografía en la que una solución acuosa de miel se eluye con una fase móvil ácida, y la fracción resultante se recoge.

14. Un método de evaluación de la miel, que comprende una etapa de medir una cantidad del compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en la miel, y que comprende además, de forma opcional, una etapa de medir una cantidad de siringato de metilo en la miel.

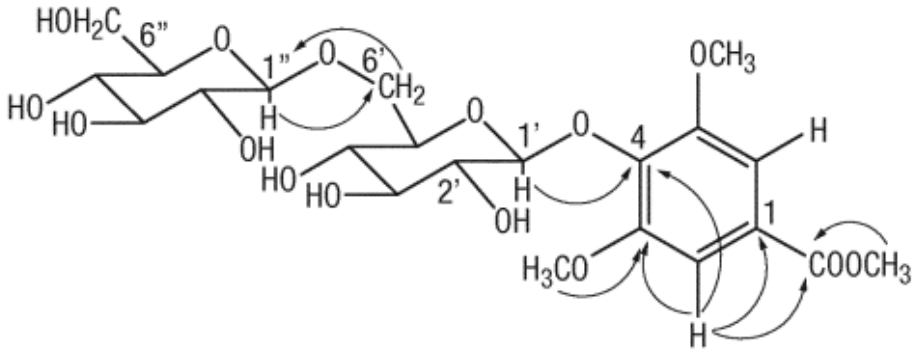
15. El método de evaluación de acuerdo con la reivindicación 14, en el que un efecto seleccionado entre actividad antibacteriana y actividad antiinflamatoria se evalúa en la miel.

Fig. 1



Datos de RMN (en CD_3OD)

n.° de Carbonos	δ_c(ppm) 125 MHz	δ_H [ppm, multiplicidad, J (Hz)] 500 MHz	HMBC (δ_H)
1	127,2		7,34
2,6	108,3	7,34 (2H, s)	
3,5	154,3		7,34; 3,887
4	140,0		7,40; 5,07
3,5-OCH_3	57,0	3,887 (6H, s)	
CO OCH_3	168,1		7,04; 3,885
COOCH3	52,8	3,885 (3H, s)	
1'	104,1	5,07 (d, 7,8)	3,50
2'	75,6	3,50 (dd, 7,8, 9,3)	3,40
3'	77,7	3,40 (m)	5,07; 3,50
4'	71,3	3,40 (m)	4,01; 3,40
5'	78,0	3,40 (m)	5,07; 4,01; 3,77; 3,40
6'	69,1	3,77 (dd, 4,9, 12,0) 4,01 (d a, 12,0)	4,20; 3,40
1"	104,3	4,20 (d, 7,8)	4,01; 3,77; 3,10
2"	75,1	3,10 (dd, 7,8,9,3)	3,20
3"	77,8	3,20 (m)	4,20; 3,10
4"	71,5	3,20 (m)	3,80; 3,66; 3,20; 3,05
5"	77,8	3,05 (ddd, 2,2, 5,9, 9,0)	4,20; 3,60; 3,20
6"	62,7	3,66 (dd, 5,9, 12,0) 3,80 (dd, 2,2, 12,0)	3,20



Correlaciones fundamentales de HMBC

Fig. 2

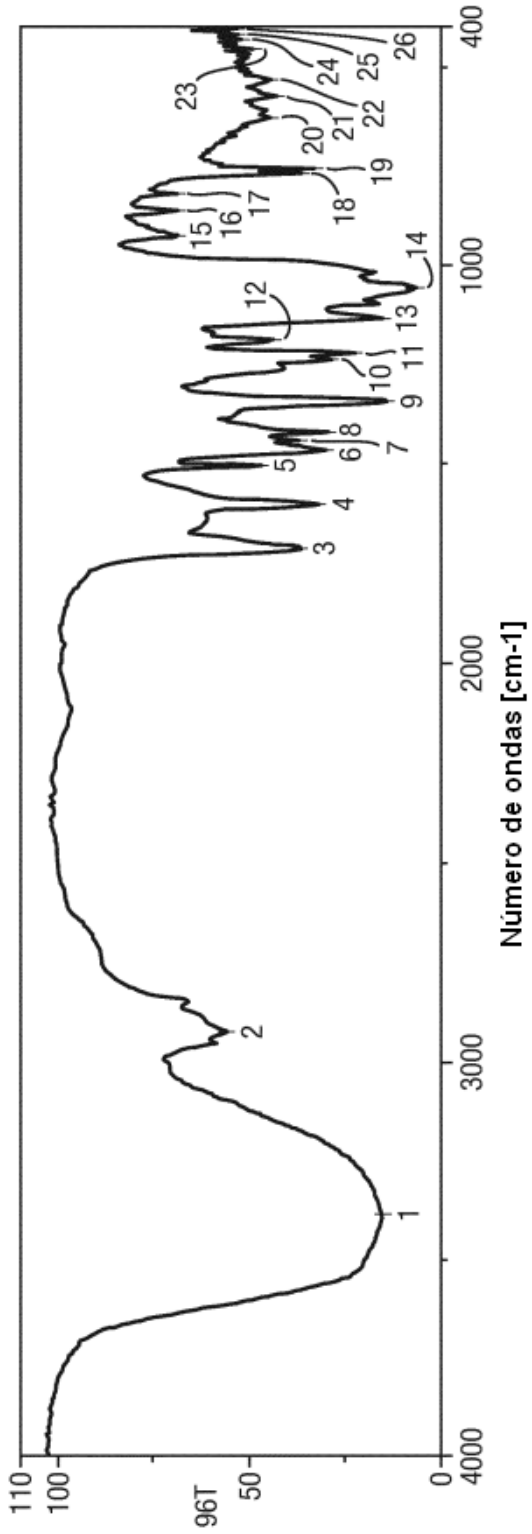

110
100
96T
50
0
4000
3000
2000
1000
400
Número de ondas [cm-1]
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26

Fig. 3

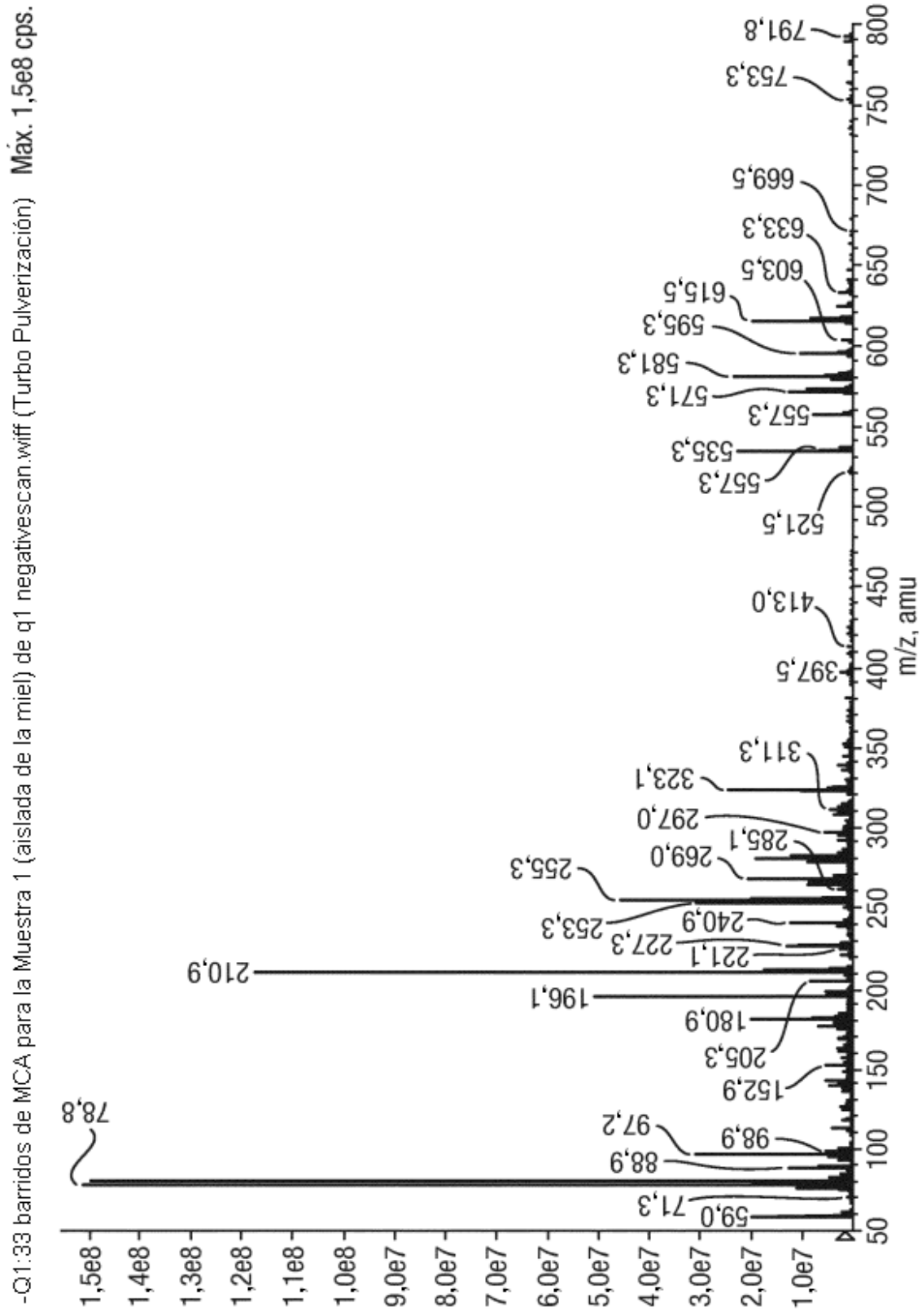

-Q1:33 barridos de MCA para la Muestra 1 (aislada de la miel) de q1 negativescan.wiff (Turbo Pulverización) Máx. 1,5e8 cps.
m/z, amu
78,8
59,0
71,3
88,9
97,2
98,9
152,9
205,3
180,9
196,1
210,9
221,1
227,3
240,9
253,3
255,3
269,0
285,1
297,0
311,3
323,1
397,5
413,0
521,5
557,3
535,3
557,3
571,3
581,3
595,3
615,5
603,5
633,3
669,5
753,3
791,8

Fig. 4

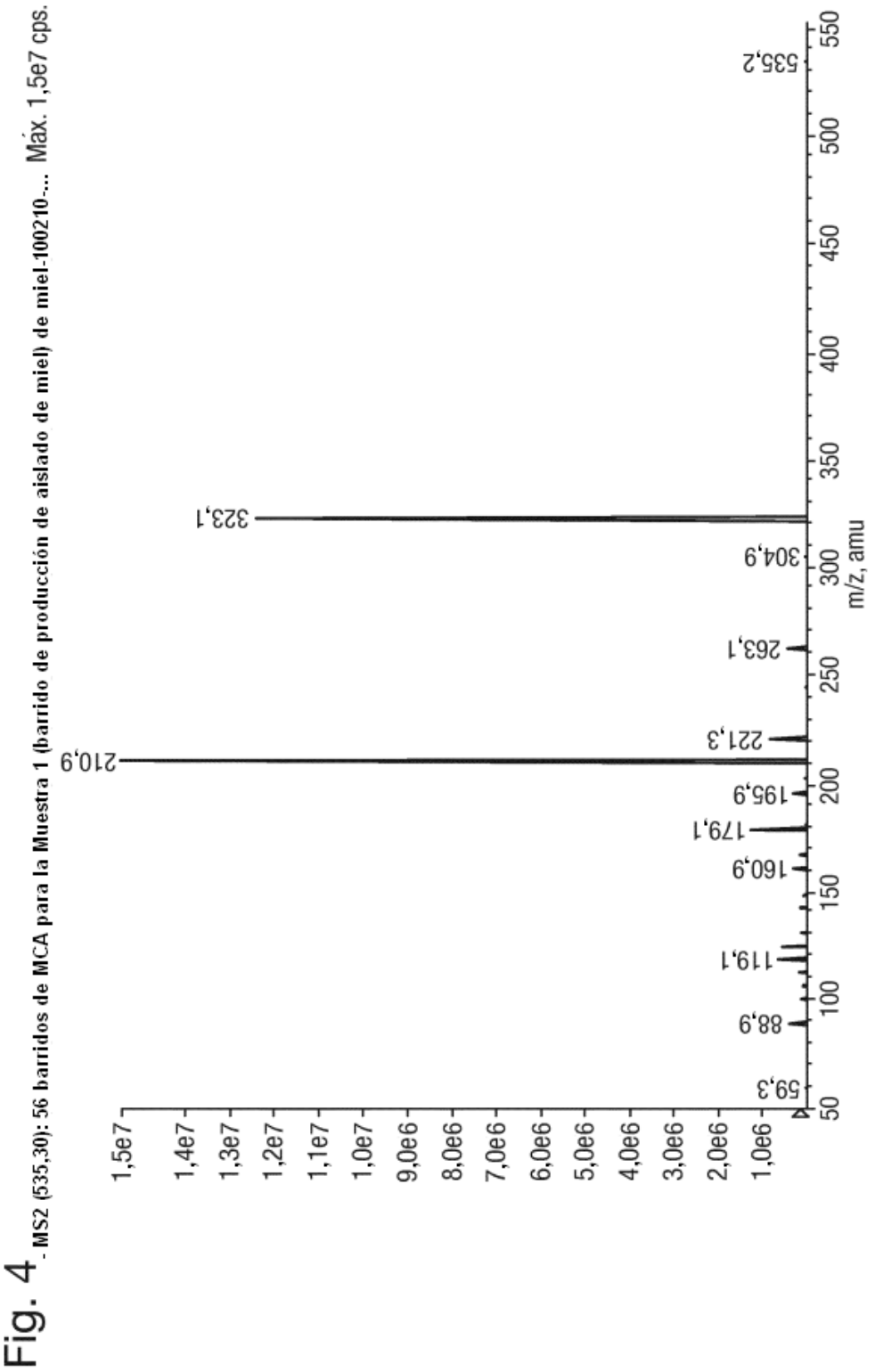

- MS2 (535,30): 56 barridos de MCA para la Muestra 1 (barrido de producción de aislado de miel) de miel-100210-... Máx. 1,5e7 cps.
1,5e7
1,4e7
1,3e7
1,2e7
1,1e7
1,0e7
9,0e6
8,0e6
7,0e6
6,0e6
5,0e6
4,0e6
3,0e6
2,0e6
1,0e6
59,3
88,9
119,1
160,9
179,1
195,9
210,9
221,3
263,1
304,9
323,1
535,2
50
100
150
200
250
300
350
400
450
500
550
m/z, amu

Fig. 5A

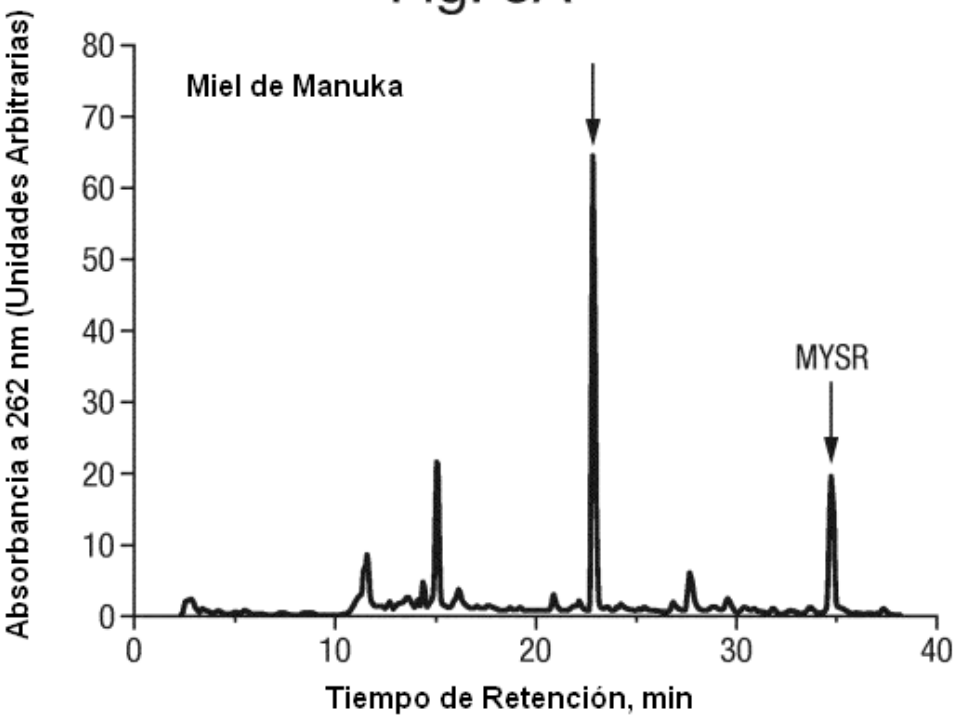

Miel de Manuka
MYSR
Absorbancia a 262 nm (Unidades Arbitrarias)
Tiempo de Retención, min
0
10
20
30
40
50
60
70
80

Fig. 5B

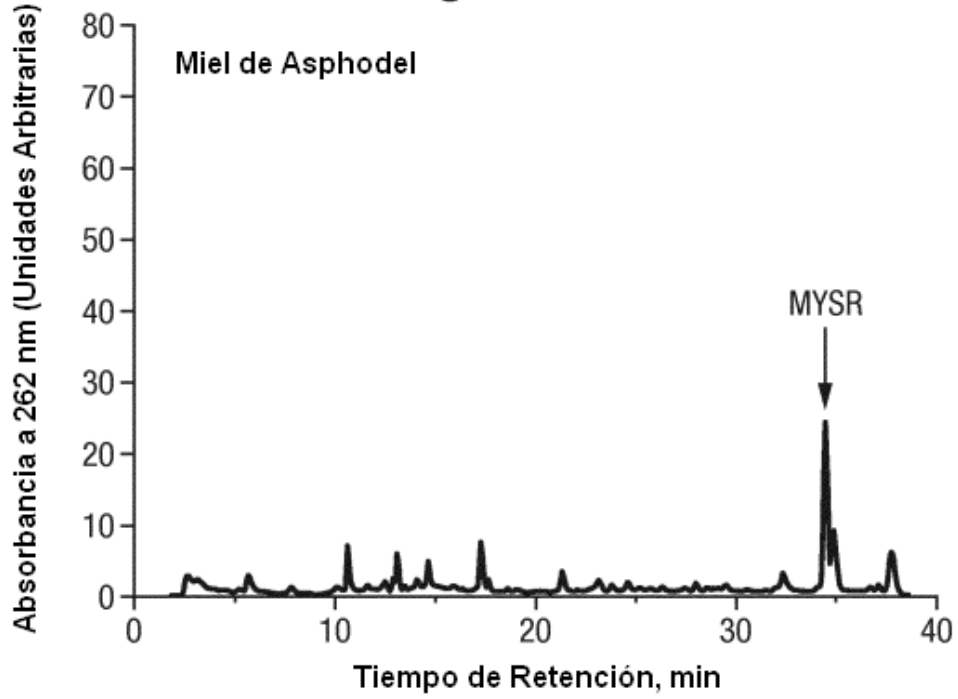

Miel de Asphodel
MYSR
Absorbancia a 262 nm (Unidades Arbitrarias)
Tiempo de Retención, min
0
10
20
30
40
50
60
70
80

Fig. 6

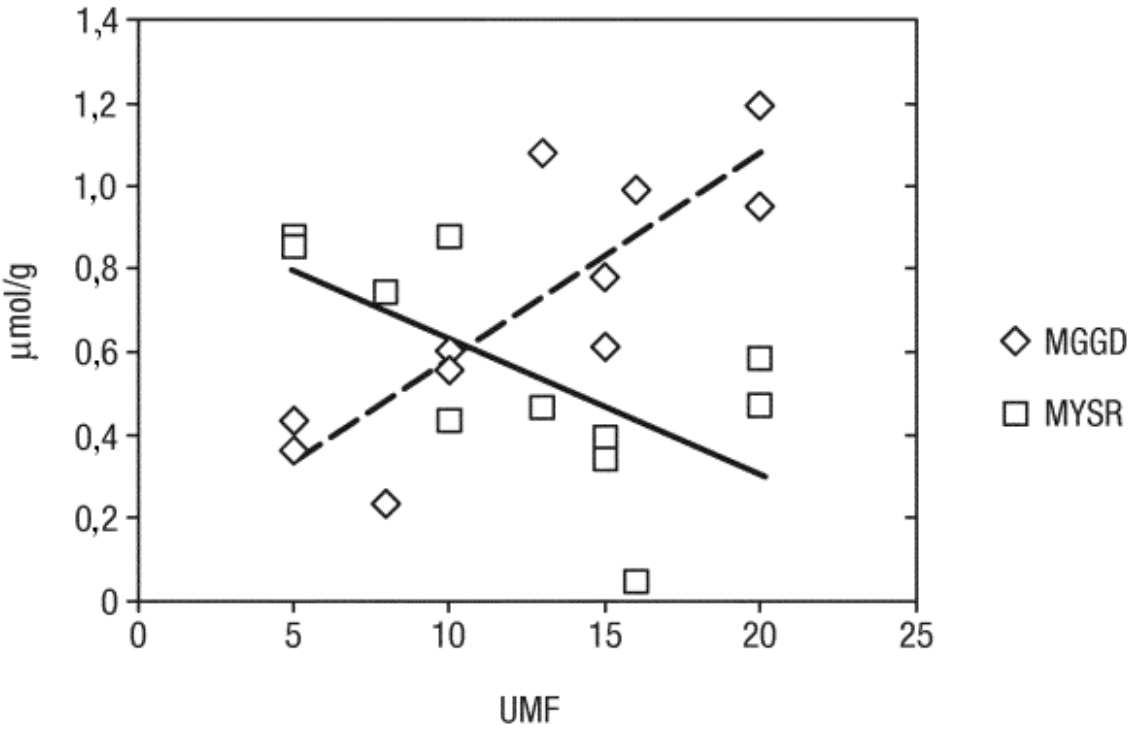


Fig. 7A

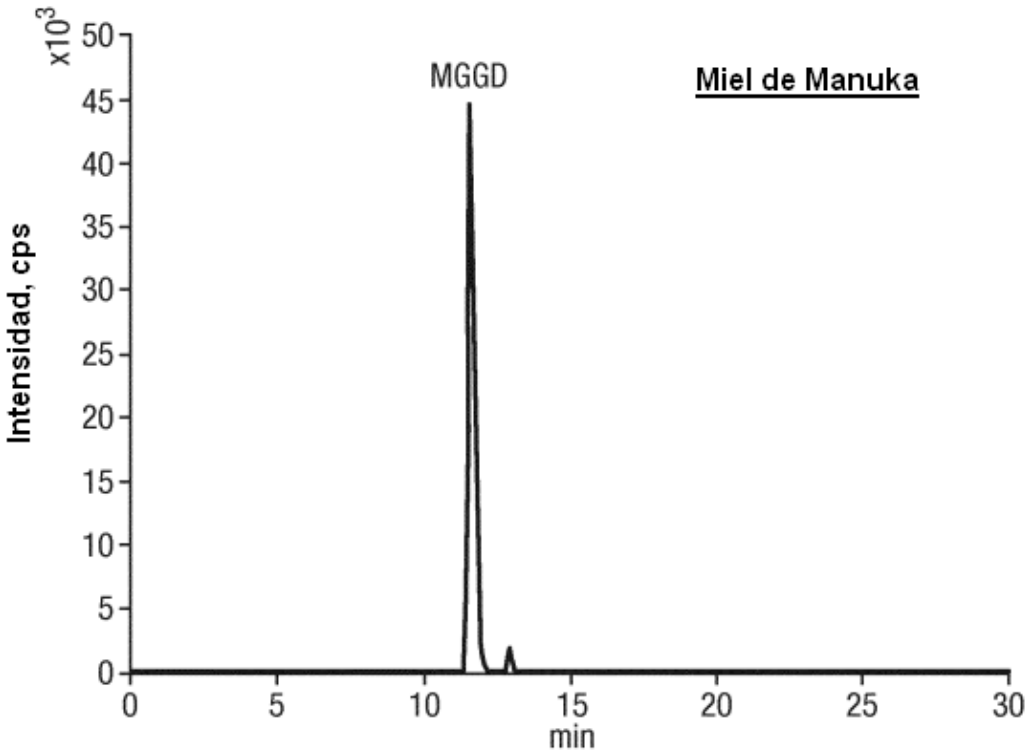

x10^3
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
Intensidad, cps
MGGD
Miel de Manuka
0
5
10
15
20
25
30
min

Fig. 7B

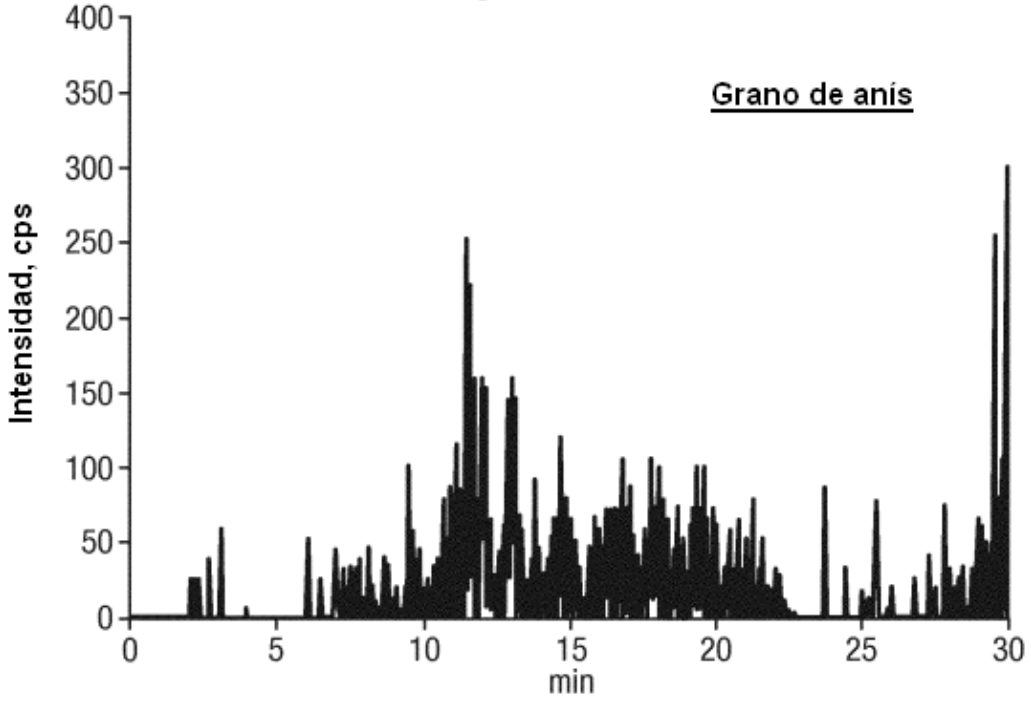

400
350
300
250
200
150
100
50
0
Intensidad, cps
Grano de anís
0
5
10
15
20
25
30
min

Fig. 8

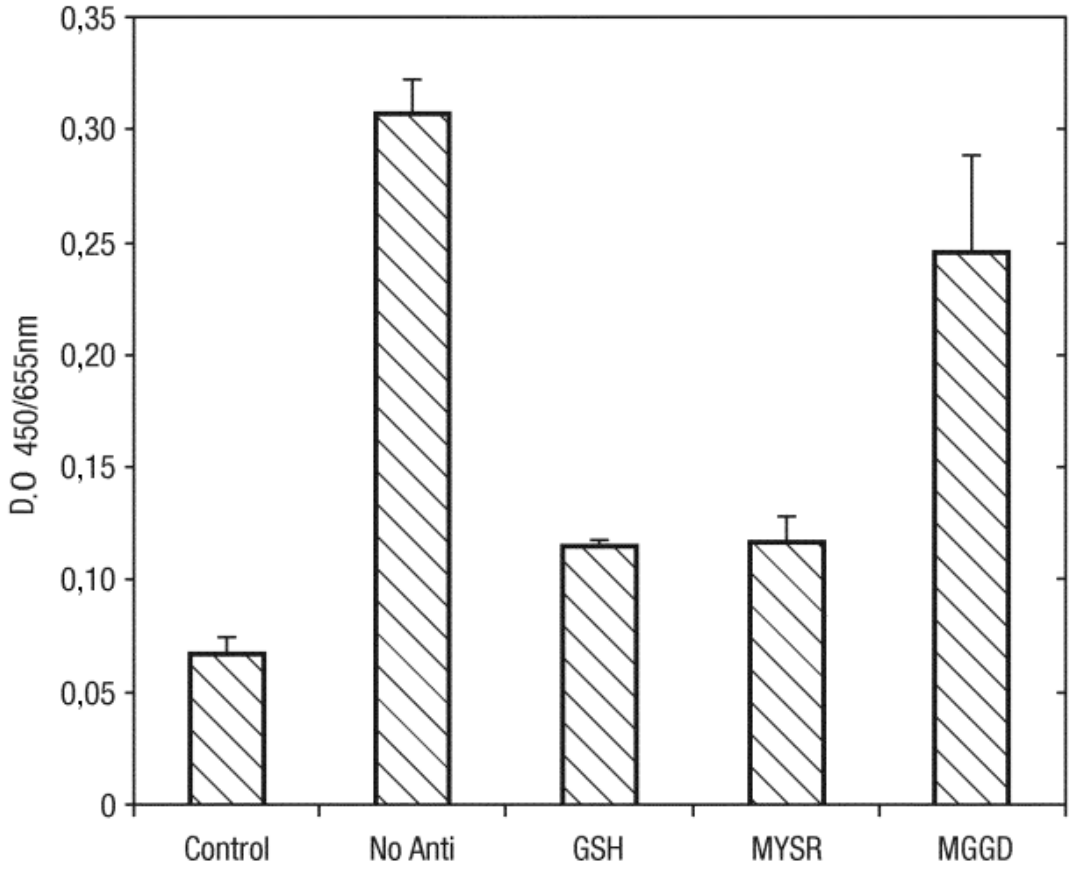
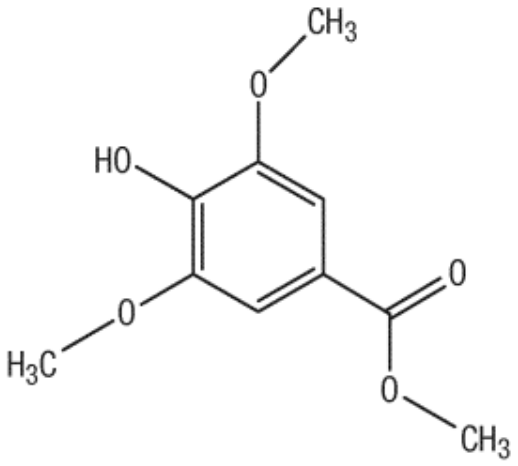
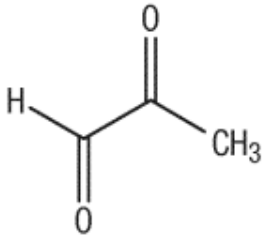

0,35
0,30
0,25
0,20
0,15
0,10
0,05
0
D.O 450/655nm
Control
No Anti
GSH
MYSR
MGGD

Fig. 9



MYSR



MGO