

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580021939.5

[51] Int. Cl.

A23L 1/08 (2006.01)

A61K 35/64 (2006.01)

[43] 公开日 2007 年 6 月 13 日

[11] 公开号 CN 1980577A

[22] 申请日 2005.6.8

[21] 申请号 200580021939.5

[30] 优先权

[32] 2004.6.8 [33] NZ [31] 533368

[86] 国际申请 PCT/NZ2005/000118 2005.6.8

[87] 国际公布 WO2005/120250 英 2005.12.22

[85] 进入国家阶段日期 2006.12.29

[71] 申请人 瓦卡托大学

地址 新西兰汉密尔顿

[72] 发明人 梅拉妮·简·斯诺

梅里琳·曼利-哈里斯

朱迪·马里·法尔

[74] 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司

代理人 顾晋伟 刘继富

权利要求书 2 页 说明书 33 页 附图 7 页

[54] 发明名称

独特麦卢卡因子 (UMF) 强化蜂蜜

[57] 摘要

本发明涉及由 UMF 改进的食品和药物。尤其是, 尽管不是唯一地, 本发明涉及 UMF 强化蜂蜜、制备 UMF 强化蜂蜜的方法以及制备蜂蜜的含 UMF 级份的方法。

1. 一种 UMF 强化蜂蜜。
2. 根据权利要求 1 的蜂蜜，其中该蜂蜜是麦卢卡蜂蜜。
3. 根据权利要求 1 或 2 的蜂蜜，其中强化蜂蜜具有的 UMF 值高于非强化麦卢卡蜂蜜。
4. 根据权利要求 1-3 中任一项的蜂蜜，其中强化蜂蜜具有的 UMF 值高于 25，更优选高于 35。
5. 制备 UMF 强化蜂蜜的方法，其包括混合蜂蜜和含 UMF 级份的步骤。
6. 制备含 UMF 级份的方法，其包括以下步骤：
  - a) 施加某一量的麦卢卡蜂蜜到色谱基质；
  - b) 用溶剂从基质中洗脱样品；并且
  - c) 收集含 UMF 级份。
7. 根据权利要求 6 的方法，其中所述量的麦卢卡蜂蜜具有的 UMF 值高于 25，更优选高于 35。
8. 根据权利要求 6 或 7 的方法，其中基质是大小排阻基质或反相基质。
9. 根据权利要求 6-8 中任一项的方法，其中溶剂是水。
10. 根据权利要求 6-9 中任一项的方法，其中在洗脱了基本上所有的存在于样品中的单糖后，开始收集含 UMF 级份。
11. 根据权利要求 6-10 中任一项的方法，其中收集的含 UMF 级份基本上无单糖。
12. 根据权利要求 6-11 中任一项的方法，其中基质是柱形式。
13. 根据权利要求 6-12 中任一项的方法，其中基质是大小排阻和离子交换基质。
14. 根据权利要求 13 的方法，其中平衡离子是  $\text{Na}^+$ 。
15. 根据权利要求 13 或 14 的方法，其中基质具有  $10^4$  的大小排阻限度。
16. 根据权利要求 13-15 中任一项的方法，其中基质是苯乙烯二乙烯

基苯共聚物。

17. 根据权利要求 6-12 中任一项的方法，其中基质是 C18。

18. 根据权利要求 17 的方法，其中基质具有 15 $\mu$ m 粒子大小和 100Å 孔大小。

19. 麦卢卡蜂蜜的含 UMF 级份。

20. 根据权利要求 19 的含 UMF 级份，其中该级份基本上无单糖。

21. 根据权利要求 19 或 20 的含 UMF 级份，其中该含 UMF 级份的抗菌活性在碱性 pH 中不稳定。

22. 根据权利要求 19-21 中任一项的含 UMF 级份，其中所述碱性 pH 大于 9。

23. 根据权利要求 19-22 中任一项的含 UMF 级份，其中所述含 UMF 级份是通过权利要求 6-18 中任一项的方法制备的。

24. 根据权利要求 19-23 中任一项的含 UMF 级份，其中所述含 UMF 级份具有描述在实施例 2 中的色谱特征。

25. 根据权利要求 19-23 中任一项的含 UMF 级份，其中当将包含有含 UMF 级份的蜂蜜样品 (20 $\mu$ L) 施加到串联和处于钠形式的 Shodex<sup>TM</sup> Sugar KS-801 和 KS-802 分析柱、并在 50°C 的温度下操作、用 Milli-Q 水以 1mL/分钟速率洗脱时，所述含 UMF 级份具有 19.4-25 分钟的停留时间。

26. 根据权利要求 25 的含 UMF 级份，其中所述含 UMF 级份具有 19.4-21.7 分钟的停留时间。

27. 用权利要求 19-26 中任一项的含 UMF 级份改进的药物。

28. 根据权利要求 27 的药物，其中该药物是创伤敷料。

29. 用权利要求 19-26 中任一项的含 UMF 级份改进的食品。

30. 根据权利要求 29 的食品，其中该食品是蜂蜜。

## 独特麦卢卡因子（UMF）强化蜂蜜

### 技术领域

本发明涉及由 UMF 改进的食品和药物。尤其是，尽管不是唯一地，本发明涉及 UMF 强化蜂蜜、制备 UMF 强化蜂蜜的方法和制备蜂蜜的含 UMF 级份的方法。

### 背景技术

麦卢卡树土生土长在新西兰，并且出产具有浓郁风味的蜂蜜。除了数千年用作食品外，蜂蜜已经用于医学目的，其主要作为抗菌剂。抗菌活性的主要原因是由于通过葡萄糖氧化酶在蜂蜜中产生的过氧化氢。除所述抗菌活性之外，已经发现麦卢卡蜂蜜还拥有一些活性。该额外的活性称为非过氧化物活性，并且商业上称为独特麦卢卡因子（unique manuka factor, UMF）。

已经作了很多研究以鉴定非过氧化物活性的特，并进行了鉴定负责所述额外活性的级份的尝试，但迄今为止尚未成功。

蜂蜜已经被使用了数千年，最初涉及蜂蜜的书面文件追溯到大约 4000 年前。蜂蜜是仅有的不需要处理或加工以使其可被食用的增甜材料（White, 1992）。

麦卢卡树，澳洲茶树（*Leptospermum scoparium*），土生土长在新西兰。它喜较潮湿和低肥渗滤性土壤，可存活大约 60 年。该树可长成 6-8m 高度和 7-10cm 直径。花宽 10-12mm 并且通常是白色（Ward, 2000）。麦卢卡树出产的蜂蜜具有草本、木本特征的浓郁风味并且颜色是黑色。

已经实施了很多研究以确定蜂蜜中存在的化合物。原因包括创建蜂蜜的“指纹”数据库以便可以确定其地理和植物来源，并且也可查明蜂蜜的掺假货。

大多数化合物包括在碳水化合物、酶、芳香酸、碳氢化合物、直

链一元和二元酸以及水的种类之内。

尽管蜂蜜主要由糖类、葡萄糖、果糖、蔗糖和麦芽糖组成 (White, 1978), 但是也已经鉴定出许多其他低聚糖。

在麦卢卡蜂蜜中经鉴定重要的低聚糖包括 maltulose、曲二糖、松二糖、黑霉糖、麦芽糖、海藻糖、帕拉金糖、蔗糖、erlose 和潘糖、松三糖和麦芽三糖 (Weston & Brocklebank, 1999; Wu, 2000)。Wu (2000) 发现松二糖是麦卢卡蜂蜜中的主要低聚糖, 然而 Weston & Brocklebank (1999) 发现麦芽糖是其中的主要低聚糖。

通过蜜蜂添加到蜂蜜中的其他物质是氨基酸, 最丰富的是脯氨酸, 和较少量的过氧化氢酶 (White, 1992)。过氧化氢酶降解过氧化氢成为水和氧。

麦卢卡蜂蜜包含高浓度的芳香酸, 其中占主要的是 2-羟基-3-苯基丙酸 (Tan *et. al.*, 1988; Wilkins *et.al.*, 1993), 并且麦卢卡中的芳香酸浓度大大高于新西兰苜蓿蜜 (高 1000 倍) (Tan *et. al.*, 1988)。已被鉴定的芳香酸是 2-甲氧基苯甲酸、2'-甲氧基苯乙酮、2-癸烯二酸(2-decenedioic acid)、4-羟基-3-5-二甲氧基苯甲酸、2-羟基-3-(4'-甲氧基苯基)丙酸、丁香酸、3,4,5 三甲氧基苯甲酸和苯乙酮 (Tan *et. al.*, 1988; Wilkins *et.al.*, 1993)。

不考虑季节和地理来源, 单花麦卢卡蜂蜜的样品的特征是丙酸的组合浓度高于 700mg/kg 蜂蜜、组合的苯甲酸浓度高于 35mg/kg 蜂蜜、和组合的苯乙酮浓度高于 20mg/kg 蜂蜜 (Wilkins *et.al.*, 1993)。

Tan *et. al.* (1989) 也鉴定出 2-羟基-3-苯基丙酸是主要的特征性化合物, 并且举例说明了高水平的该化合物与 2-甲氧基苯甲酸和 2'-甲氧基苯乙酮作为标记以确定麦卢卡植物来源的应用。

Wilkins *et.al.* (1993) 指出经常在麦卢卡蜂蜜中发现比在其他蜂蜜中具有更高浓度的癸二酸和反式-2-癸二酸。已经在蜂蜜中有二价酸, 包括辛二酸、壬二酸、癸二酸和反式-2-癸烯二酸 (Tan *et. al.*, 1988; Wilkins *et.al.*, 1993)。

White *et.al.* (1962) 在其他蜂蜜中鉴定的其他化合物包括内脂、淀

粉酶、自由酸度(free acidity)和灰分。该文献不包含麦卢卡蜂蜜中任何关于这些的信息,也没有任何麦卢卡蜂蜜水分含量的已公开信息。

从古时起蜂蜜已经被很多文明用于医学(Ransom, 1937, Adcock, 1962)。由于了解到明确的抗菌作用,最近蜂蜜作为有报道价值的药剂的兴趣已经增加。蜂蜜的抗菌作用基本上由蜂蜜种类而定(Dustmann, 1979)。

也已经观察到,麦卢卡(澳洲茶树:桃金娘科)蜂蜜具有更高水平的抗菌活性,其不能仅仅由蜂蜜渗透压、pH 和葡萄糖氧化酶活性来解释(Russell, 1983)。活性的贡献者现被称为“非过氧化物活性”或“UMF”。

Dustman (1979)已经注意到并非因为葡萄糖氧化酶活性或高渗透压所致的抗菌活性的存在。然而,他的观点是后一活性仅仅是总活性的一小部分。

Molan & Russell (1988)给出了在麦卢卡蜂蜜中抗菌活性的存在不是由于过氧化氢所致的证据,并且也发现具有高总体活性的麦卢卡蜂蜜也具有高水平的非过氧化物活性。

有关蜂蜜非过氧化物活性的研究已经发现它具有一些有趣且明显矛盾的特性。Verge (1951)在水、醇、醚和丙酮中获得了活性组分。Schuler 和 Vogel (1956)用醚提取了该活性。Lavie (1960)发现有可能使用丙酮而不是醚提取活性。Gonnet 和 Lavie (1960)发现冷醚提取物中的活性在 95℃是挥发性的。Mladenov (1974)报道了蜂蜜包含挥发性、强挥发性和非挥发性的抗菌物质。

已经发现麦卢卡蜂蜜的活性是热和光稳定性的(Molan & Russell, 1988, Tan *et. al.*, 1988, Russell *et. al.*, 1990),并且 Tan *et. al.* (1988)的初步研究显示该额外的活性在有机溶液例如乙醇和醚中是可溶的。

芳香酸和酚类化合物是除了过氧化氢和溶菌酶之外已从蜂蜜中分离的具有抗菌活性的仅有其他物质(Weston *et. al.*, 2000)。

咖啡酸和阿魏酸,这两种酚酸,已经被确定为具有抗微生物活性(Cizmarik and Matel, 1970, Cizmarik, 2000),并且已经从蜂蜜中分离出来(Wahdan, 1998, Weston, 2000)。然而,发现它们仅仅是低浓度,

并且当与过氧化氢所起的作用相比时，它们对蜂蜜的抗菌活性贡献很少 (Weston, 2000)。

Marhuenda Requenda *et. al.* (1987) 报道了其他酚酸的抗菌活性，其包括咖啡酸、香草酸、对香豆酸、对羟基苯甲酸和丁香酸。

由蜂蜜分离的类黄酮包括 pinocembrine、短叶松素(pinohanksin)、柯因和二氢黄酮 (Wahdan, 1998, Ferreres *et. al.*, 1994)。它们具有充分论证的抗菌活性 (Rivera-Vargas *et. al.*, 1993, Itoh *et. al.*, 1994)，而且在蜂蜜中的浓度不够高，不具有显著抗菌作用 (Weston, 2000)。

Russell (1983) 鉴定了两种芳香化合物是来自蜂蜜的主要抗菌组分。它们是 4-羟基-3-5-二甲氧基苯甲酸 (酯) 和甲基-3,4,5-三甲氧基苯甲酸 (酯)。

蜂胶，一种通过蜜蜂从树的树脂渗出物中收集的、并且在蜂巢中用作抗菌剂的树脂材料，包括取代的苯甲酸和肉桂酸类以及类黄酮 (Marcucci, 1995)。Wahdan (1998) 指出在抗菌蜂胶中类黄酮是主要物质。

发现负责该抗菌活性的组分已经被鉴定为良姜素、松属素 (pinocembrin)、咖啡酸和阿魏酸。(Lavie, 1960, Ghisalbert, 1979, Russell *et. al.*, 1990)。Weston (2000) 已经证明单个组分缺乏抗微生物活性，而仅仅对全蜂胶观察到生物活性。

蜂毒肽 (mellitin) 和磷脂酶被认为是引起其弱抗菌活性的蜂毒的组分。这两者都是蛋白质，并且凝胶过滤色谱已经显示麦卢卡蜂蜜中的抗菌物质具有低于 1000amu 的分子量 (Russell *et. al.*, 1990)。

对麦卢卡蜂蜜的非过氧化物活性可能有贡献的其他产物可能是由蜜蜂体液鉴定的抗生素肽。已经鉴定的产物是蜂毒素、多肽抗生素、hymenoptaecin、王浆素、和溶菌酶。所述肽拥有强的抗生素活性，并且如果它们存在于蜂蜜中，则它们能显著地贡献非过氧化物活性 (Weston *et. al.*, 2000)。

尽管已进行了多年的研究，麦卢卡蜂蜜抗菌活性的非过氧化物级份 (UMF) 尚未被分离或鉴定。确实，一些研究者认为不存在麦卢卡蜂

蜜组分的可分离级份。

Russell *et. al.*, (1990)认为关于额外抗菌活性(即不是因为过氧化氢或高渗透压所致的活性)重要性的观点的差异,有可能是由于所述活性的量中的差异所致。Molan 和 Russell (1988)发现,对于一系列新西兰蜂蜜样品,该额外的活性从一些样品中的零变化到其他样品中几乎全部的活性。他们也注意到在额外抗菌活性的水平和单个蜂蜜样品的总体抗菌活性间存在密切相关性。

Bogdanov (1997)尝试通过分离挥发性、非极性和非挥发性、酸性、和碱性级分以测定在哪个级份中存在非过氧化物活性。他通过测试样品的活性、取出级份、然后再测试该活性而完成此项工作。如果样品中没有保留该活性,那么他可以得出抗菌组分存在于被取出的级份中的结论。通过在转子蒸发器中在 60℃下加热 2 小时提取挥发性物质。通过 C-18 柱提取非极性、非挥发性物质。在阳离子交换柱上以 H 形式提取碱,并且在阴离子交换柱上以 OH 形式提取酸。为了移除酸,调整蜂蜜到 pH11,以使酸以离解的阴离子形式存在。

Bogdanov 指出,在初始蜂蜜中将 pH 调到 pH11 对抗菌活性没有影响,因为回滴定到原始的 pH 可导致初始抗菌活性的恢复。对于麦卢卡蜂蜜,Bogdanov 指出,当针对金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)测试时,100%活性在酸性级分中,当针对嗜黄微球菌(*Micrococcus luteus*)测试时,75%活性在酸性级份中、10%在碱性级份中、5%在非极性级份中、和 10%在挥发性级份中。因此得出结论,蜂蜜中的非过氧化物抗菌活性存在于酸性级份中,并且与酸含量显著相关,但与 pH 无关。

通过比较糖类溶液和未稀释蜂蜜的渗透作用,Wahdan (1998)发现,该高糖浓度是抗菌活性的重要因素,但当它被稀释时,显然也存在其它的贡献因素。其中也指出,在该研究中 pH 不是这样的因素,因为蜂蜜是用营养肉汤(pH7.2)稀释的,因此必然有其他物质存在。

Weston & Brocklebank (1999)尝试通过测试数种方法,包括在酸性和中性条件下进行聚(辛基)酰胺、Sephadex G-10、Biogel P-2、和

XAD-2 树脂的色谱，从而从抗菌材料中分离单糖。同样测试了使用 2-丁醇进行分离。在聚酰胺和 Sephadex G-10 上的色谱指示活性材料位于后期组分中，HPLC 分析暗示存在类黄酮类。

通过薄层色谱在酚提取物中鉴定出主要产物为丁香酸甲酯，次要产物是苯基乳酸。HPLC 分析显示，甲基丁香酸甲酯构成超过 45% 的总酚提取物。该文件也进行了测试，并得出了麦卢卡蜂蜜中丁香酸甲酯和苯基乳酸的水平本身不负责所有的非过氧化氢活性这一结论。而且，丁香酸甲酯水平在活性和非活性麦卢卡蜂蜜中是相同的，因此不是引起所观察到的差异的原因。

在 XAD-22 上，用碳水化合物洗脱下了所有活性，而用酚类未洗脱下显著的活性。在 Biogel-P2 上得到了相同的结果。因为单糖没有抗菌特性，所以暗示糖类携带了该抗菌组分。

Weston *et. al.* (1999) 证明了酚类级份整体而言在活性和非活性蜂蜜中具有相同的抗菌作用，所以结论是，尽管麦卢卡蜂蜜的酚类组分各自地和共同地具有抗菌活性，但是它们不引起该“观察到”的活性。

Weston & Brocklebank (1999) 假设活性麦卢卡蜂蜜可能具有类似于四糖唾液酸化路易斯 X 的独特低聚糖，其是介导可以引起胃胃溃疡的细菌黏附到胃内层的抗原决定簇。他们测试了活性和非活性麦卢卡蜂蜜的低聚糖组成，并且发现在活性和无活性麦卢卡蜂蜜间无差异。

Perry *et. al.* (1997) 发现在新西兰存在三种化学型的麦卢卡，并且它们可以通过来自叶的精油的组成区分开来。一种包含大部分萜烯类，另一种包含大部分倍半萜烯类，生长在东部陆地区域的第三种包含高比例的环三酮——纤精酮。该油具有这三种中最强的抗微生物活性。

Weston *et. al.* (2000) 尝试通过三种不同方法在非常高的非过氧化物活性的麦卢卡蜂蜜样品中检测纤精酮。一种方法中使用 XAD-2 树脂吸收酚类，另一种使用 2-丁醇进行提取，第三种是液-液提取。对所有三种提取物进行的分析未能检测到任何三酮。其结论是因为纤精酮在水中不容，所以它不太可能存在于花蜜中，故不存在于蜂蜜中。

Weston *et. al.* (2000) 比较了抗菌麦卢卡蜂蜜和无活性麦卢卡蜂蜜

中的酚组分，并且显示其在定性或定量上无差异。桂皮酸和类黄酮的水平也非常相似，并且与很多欧洲蜂蜜相当。通过测试 19 种麦卢卡蜂蜜，显示了所有样品中酚类特征谱是同样的，因此地理不影响酚类特征谱。

Weston (2000) 指出：

( i ) 在蜂蜜中过氧化氢是有任何重要性的唯一抗菌物质，并且其他物质，例如蜂胶衍生的酚类物质，与过氧化氢比较而言都是无关紧要的。

( ii ) 在蜂蜜中过氧化氢的水平基本上是通过蜂蜜中由植物衍生的过氧化氢酶的量确定的；并且

( iii ) 基于 White *et. al.* (1963) 和 Dustmann (1971) 的发现，在蜂蜜样品或其级分中过氧化氢由葡萄糖氧化酶产生。当稀释它们并且为抗菌试验准备时，以现在的方法 ( Allen, Molan and Reid, 1991, Molan and Russell, 1988 ) 加入到这些样品中的过氧化氢酶的量是不足以破坏所有由这种方式产生的过氧化氢。

同样指出的是，通过 GC-MS 分析的挥发物通常是花蜜的组分，并且贡献花的香味。尽管存在多种挥发物，但是在蜂蜜中它们的量小，并且对于特定花源和蜂蜜独特的组分似乎在蜂蜜中以它们的水平不具有任何抗菌特性。同样，用于鉴定蜂蜜为单花来源的花蜜酚类成分确实具有抗氧化剂特性，但并未鉴定为具有适当水平的抗菌活性。

因此 Weston (2000) 的结论是迄今为止的工作忽视了 UMF 存在的可能性，并且建议更有可能这是因为因添加过氧化氢酶而被不完全破坏的异常高水平过氧化氢所致。事实上，该“独特因子”可能是在麦卢卡蜂蜜中是否存在或缺乏大量过氧化氢酶，这可以区分活性和非活性麦卢卡蜂蜜。

有高 UMF 值的蜂蜜，和从这种蜂蜜衍生的产物，是消费者所寻求的。这与有高 UMF 值的蜂蜜的有益特性是否归因于可分离的含 UMF 级分无关。

如果与 UMF 活性有关的麦卢卡蜂蜜级分能够被分离，那么能够制备 UMF 强化蜂蜜和其他改进的食品和药物。还能够增强麦卢卡蜂蜜的

已知有利特性和有益作用。

本发明的目的是提供一种制备麦卢卡蜂蜜的含 UMF 级份、或者至少向公众提供有用选择的方法。

## 发明内容

在本发明的第一个方面中，提供了 UMF 强化蜂蜜。

优选蜂蜜是麦卢卡蜂蜜。

优选蜂蜜具有的 UMF 值高于任何未经强化的麦卢卡蜂蜜的 UMF 值。更优选强化蜂蜜具有高于 25 的 UMF 值，更优选高于 35。

在本发明的第二个方面中，提供一种制备 UMF 强化蜂蜜的方法，其包括混合蜂蜜与含 UMF 级份的步骤。

在本发明的第三个方面中，提供一种制备含 UMF 级份的方法，其通过从获得该级份的样品中基本上所有的总单糖中分离该级份。

优选该方法包括如下步骤：

- 施加一定量的蜂蜜到基质中；
- 用溶剂从该基质上洗脱样品；和
- 收集含 UMF 级份。

优选在洗脱样品中存在的基本上所有单糖后开始收集含 UMF 级份。更优选所收集的含 UMF 级份是基本上没有样品中存在的总量单糖。

优选蜂蜜是麦卢卡蜂蜜。

优选麦卢卡蜂蜜的量具有高于 25 的 UMF 值，更优选高于 35。

优选基质是大小排阻基质或反相基质。

优选溶剂是水。

优选基质是色谱柱的形式。

在本发明第三个方面的第一个实施方案中，基质是大小排阻和离子交换基质。优选平衡离子是  $\text{Na}^+$ 。更优选基质具有  $10^4$  的大小排阻限。更优选基质是苯乙烯二乙烯基苯共聚物。

在本发明第三个方面的第二个实施方案中，基质是 C18。优选基质具有  $15\mu\text{m}$  粒子大小和  $100\text{\AA}$  孔大小。

尽管优选使用全蜂蜜，但是事先从蜂蜜分离的级份或者部分，包括筛分的蜂蜜，也可用在本方法中。

在本发明的第四个方面中，提供了麦卢卡蜂蜜的含 UMF 级份。

优选该级份是基本上无单糖。

优选含 UMF 级份的抗菌活性在碱性 pH 下是不稳定的。更优选该碱性 pH 大于 9。

优选含 UMF 级份是根据本发明第三个方面的方法制备的。

优选含 UMF 级份具有在实施例 2、3 和 4 中所述的色谱特征。

优选地，当将包含含 UMF 级份的蜂蜜样品（20 $\mu$ L）施加到串联和处于钠形式的 Shodex<sup>TM</sup> Sugar KS-801 和 KS-802 分析柱上、在 50℃ 下操作、并用 Milli-Q 水以 1mL/分钟的速率洗脱时，该含 UMF 级份具有 19.4-25 分钟的停留时间。更优选该含 UMF 级份具有 19.4-21.7 分钟的停留时间。

在本发明的第五个方面中，提供一种被本发明第四个方面的含 UMF 级份改进的药物。

优选地，该药物是创伤敷料，例如在新西兰专利公开 no. 501687 中所述的创伤敷料。

在本发明的第六个方面中，提供一种被本发明第四个方面的含 UMF 级份改进的食品。

优选该食品是蜂蜜。

“UMF 强化蜂蜜”指添加了分离的含 UMF 级份的蜂蜜。

“麦卢卡蜂蜜”指主要从麦卢卡花（澳洲茶树）衍生的植物蜂蜜。

“UMF 值”指在琼脂平板扩散试验中，相对于酚相当物测量的全或筛分蜂蜜或其级份的抗菌活性测定值。

“含 UMF 级份”指包含非过氧化物抗菌活性的全或筛分麦卢卡蜂蜜的级份。

针对级份而言的“基本上无单糖”指在该级份中单糖的量按重量计只占获得该级份的样品中总单糖的一小部分或可忽略的部分，例如小于总单糖的 5%（w/w），更典型小于 1%（w/w）。

应该认识到, 采用本发明可以明确检测早先并不知道其表现非过氧化物活性的全蜂蜜中的含 UMF 级份。可进一步认识到, 除了麦卢卡蜂蜜外的、目前尚未测试含 UMF 级份的存在情况的蜂蜜也可以表现非过氧化物活性。

#### 附图说明

本发明将参照附图详细描述如下:

图 1 使用配体交换和大小排阻色谱进行麦卢卡蜂蜜的 HPLC 折射率分析。

图 2 通过配体交换和大小排阻色谱扩大麦卢卡蜂蜜 HPLC 折射率分析的基线区域。

图 3 在 KS-2002 柱上筛分蜂蜜的 HPLC。来自 300mg/mL 筛分蜂蜜的 200 $\mu$ l 注射液的洗脱物折射率监测。

图 4 来自 KS-2002 柱的再注射活性级份的 HPLC。来自级份 4 的 200 $\mu$ l 注射液 (其浓度相当于在 200mg/ml 筛分蜂蜜中出现的浓度) 的洗脱物折射率监测。

图 5 来自 KS-2002 柱的再注射活性级份的 HPLC。扩大来自级份 4 的 200 $\mu$ l 注射液 (其浓度相当于在 200mg/mL 筛分蜂蜜中出现的浓度) 的洗脱物折射率监测。

图 6 在 KS-2002 柱上来自级份 4 的 20.5-25 分钟级份的 HPLC。来自 200 $\mu$ L 注射液 (其浓度相当于在 100mg/mL 筛分蜂蜜中出现的浓度) 的洗脱物折射率监测。

图 7 在 KS-2002 柱上来自级份 4 再注射的 20.5-25 分钟级份的 HPLC 光谱。扩大来自该级份的 200 $\mu$ L 注射液 (其浓度相当于在 100mg/mL 筛分蜂蜜中出现的浓度) 的洗脱物折射率监测。

图 8. C18 柱上的 HPLC。来自 0.5g/mL 筛分蜂蜜的 2ml 注射液的洗脱物折射率监测。

图 9. C18 柱上的 HPLC。扩大来自 0.5g/mL 筛分蜂蜜的 2ml 注射液的洗脱物折射率监测。

图 10 验证来自 C18 柱的收集在 Milli-Q 和 MeCN 中的级份。

图 11 活性级份的非过氧化物活性的存储效果。

图 12 调查强化筛分蜂蜜的比例。

图 13 来自平板分组的强化试验的数据。(1<sup>2</sup> 是清除区, 单位 mm<sup>2</sup>, 比率是级份 C 对筛分蜂蜜的比率, 单位 g/g)。

具体实施方式

本发明确定了通常构成干重中不到百分之一的蜂蜜小级份事实上包含所有非过氧化物活性, 并且其能够从大体积蜂蜜源中作为含 UMF 级份分离出来。

含 UMF 级份可以由技术人员已知的多种方式从大体积蜂蜜中分离出来。然而, 尽管早先已经尝试用 HPLC 分开和分离对蜂蜜赋予非过氧化物生物活性的活性剂, 但是在现有技术中所用柱和溶剂的选择妨碍了这种目标实现。

现有技术中的尝试可能已经不知不觉地使用错误的实验条件或者使用不允许适当分离从而鉴定分离级份的柱而破坏了蜂蜜的生物活性。

此外, 因为 UMF 级份是蜂蜜的一小部分, 也有可能即使早先已经实现了分离, 但洗脱峰被无意中忽略了或者被其他化合物掩盖。

在本发明优选的实施方案中, 使用了为分离蜂蜜中存在的主要单糖而设计的分离柱。这些主要单糖是葡萄糖和果糖。所述柱的实例包括 Rezex<sup>TM</sup>、Nucleosil<sup>TM</sup> 和 Shodex<sup>TM</sup>。应当理解, 它们只是一些实例。

在通过柱洗脱蜂蜜期间, 优选收集小级份, 并且使用 UV 吸收和折射率检测之一或二者进行分析以监测感兴趣级份的洗脱。

Shodex<sup>TM</sup> (混合模式的配体交换和大小排阻) 色谱柱已经用于将葡萄糖和果糖与蜂蜜的其他组分分离开。已发现通过折射率监测以小峰形式检测的级份在果糖峰后洗脱。

所述级份具有 UV 吸收, 然而果糖没有。已经测试了该级份, 并且发现其中包含了蜂蜜的几乎所有非过氧化物抗菌活性。该级份被称为含 UMF 级份。当使用过氧化氢酶破坏蜂蜜的任何基于过氧化物的抗菌活性时, UMF 级份的活性仍被保留。

使用醚对蜂蜜进行的液-液提取也可以用于简化含 UMF 级份的分

离。在这些试验中，醚可以除去蜂蜜中的很多非糖、有机化合物，而在剩余样品中保留非过氧化物活性。

为了进一步纯化 UMF 级份，可以使其多次通过柱以消除越来越多的杂质，或者使之通过有其他种类填充树脂的色谱柱，例如反相柱，其可以分离该级份的组分。

UMF 级份早先根本没有被分离出来，或者甚至没有被认识到作为可分离的级份存在，尽管许多不同的研究组进行了众多尝试。以前已在现有技术中使用了反相、生物胶 P-2、XAD-40 和阴离子交换柱，以尝试分离和鉴定有非过氧化物生物活性的化合物。

在这些条件下，或者不能分离所述级份，或者因为其较小而没有被认识到，也许在早先的 HPLC 蜂蜜研究中被大的单糖峰所掩盖，或者色谱条件破坏了蜂蜜的生物活性。

本发明人的初步调查已经发现，分离的 UMF 级份不能出现在需要碱性 pH 的柱中，例如阴离子交换柱。已发现碱性条件破坏蜂蜜的活性。因此必须使用在中性 pH 或接近中性 pH 下运行的柱。

已发现含 UMF 级份在 pH9 下 30 分钟后损失其大部分生物活性。在 pH10 下 5 分钟后该级份被破坏。HPLC 分离法一般都比这花费更长时间。在 pH11 下蜂蜜的生物活性立即被破坏。

使用标准技术，用醚提取显示非过氧化物活性（UMF）的麦卢卡蜂蜜样品，以除去可能干扰色谱的脂肪酸。使用抗菌试验测试水相和醚相，以确定 UMF 活性被分离在哪一相中。发现 UMF 活性保留在水相中，在醚相中没有发现显著的生物活性。

为检测蜂蜜样品中非过氧化物活性的水平，使用过氧化氢酶破坏过氧化氢赋予给蜂蜜的任何抗菌活性。通过溶解过氧化氢酶（0.02g）在蒸馏水中（10ml）来制备过氧化氢酶溶液。将蜂蜜溶解在蒸馏水中形成 1g 蜂蜜/ml 水的浓度，以 1ml 等分。然后将 1ml 蒸馏水（对于总活性）或者 1ml 过氧化氢酶溶液（单独对于非过氧化物活性）加入到每个样品瓶。

#### 实施例 1-抗菌活性的孔扩散试验

通过在蒸馏水中 (1L) 溶解琼脂 (23g) 制备营养琼脂, 并且在高压灭菌前以 150ml 的量倒入烧瓶。当需要时, 在水浴中 (30min, 100℃) 蒸烧瓶, 然后使琼脂温度在另一个水浴中降低至细菌培养物耐受的温度 (30min, 50℃)。

用玻珠培养物无菌接种胰蛋白酶豆胨培养液 (30g/L), 然后培养 (18h, 37℃), 得到金黄色葡萄球 (*S. aureus*) 培养物。使用 Thermo Spectronic Helios γ 分光光度计 (540nm), 用胰蛋白酶豆胨培养液调整金黄色葡萄球菌培养物到 0.5AU 的光密度。胰蛋白酶豆胨培养液用作空白。

在水平面上通过倾注接种有金黄色葡萄球菌培养物 (100μl, 0.5OD 如上制备) 的 150ml 营养琼脂制备大方格试验平板 (Corning®431111 无菌生物测试皿, 245mm × 245mm × 18mm)。一旦凝固, 在 4℃ 下倒立储存该平板过夜。

通过称重全蜂蜜 (1.00g) 并溶解在蒸馏水 (1mL) 中制备全蜂蜜样品。为了试验的重现性, 对该方法辅以培养 (37℃, 30 分钟) 以软化蜂蜜, 同时保持可使 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 产量恒定的时间。对于不测定 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 活性的其他试验, 在室温下搅拌样品直至溶解。

所得的 50% (w/v) 溶液进一步通过将等体积 (1:1) 的样品与或者蒸馏水或者过氧化氢酶溶液 (20mg/10mL 蒸馏水) 合并而稀释, 其取决于是否需要总非过氧化物活性。

将来自 HPLC 和液/液提取的蜂蜜级份在蒸馏水中稀释 (1:1), 以达到在分离蜂蜜前存在的相同浓度。所得的 50% 溶液用过氧化氢酶溶液进一步稀释 (1:1), 因为仅仅对非过氧化物活性感兴趣。

从苯酚的 10% 原液 (10g 苯酚/100mL 蒸馏水) 制备 2、3、4、5、6 和 7% 的苯酚标准液。这些溶液在被替换之前在 4℃ 暗处储存长达一个月。

使用 8mm 穿孔器和接种针在规格 8 × 8 载网上打孔, 以移除琼脂。用于在平板上放置样品的模板是在平板上有 16 个编号并重复 4 次的孔的准拉丁方, 其在每对行和列中一次。这就允许在平板上随意地放置样

品以消除边缘效应的偏差。

在每个孔中（11 $\mu$ l）以分配的位置放置 25 % 浓度的蜂蜜样品和苯酚标准液。

## 实施例 2

在使用 515 HPLC 泵、2410 折射率检测器、996 光电二极管阵列检测器和 Millennium 操作软件的 Waters HPLC 系统上实施高效液相色谱（HPLC）。

在起始的研究中，发现 Shodex™ Sugar KS800 系列柱在所有使用的柱中提供最好分离。在此，串联使用 Shodex™ Sugar KS801 和 KS802 以通过结合大小排阻和配体交换色谱对蜂蜜样品分级分离。

KS801 是钠的形式，排阻限度为  $10^3$ 。KS802 也是钠的形式并具有  $10^4$  的排阻限度。两者都填充苯乙烯二乙烯基苯。按照厂商的建议使用的操作温度开始是 80℃，流速为 1mL/分钟。洗脱液是 Milli-Q 水。

将 20mg/20 $\mu$ l 注射液的蜂蜜样品加样到 KS800 系列 HPLC 柱上。图 1 和 2 显示了用折射率检测获得的绘图。从 20 次注射中收集用于抗菌试验的级份。

在图 1 中，级份 A 从 0-12 分钟收集，级份 B 从 12-19.4 分钟间收集，级份 C 从 19.4-25 分钟收集。该绘图显示葡萄糖（1）峰之后是果糖（2）峰。同样显示了低聚糖（3）峰。

使用孔扩散技术，用金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*）作为测试培养物，测试所述分离级份的抗菌活性。

在耦联了 40℃ 下 Büchi 461 水浴的 Büchi RE111 旋转蒸发器上，在减压下蒸发从 HPLC 收集用于测试的级份。该样品在包含 200 $\mu$ L 蒸馏水和 200 $\mu$ L 过氧化氢酶溶液中再次溶解，以确保仅有非过氧化物活性存在。

以 25 % 的浓度测试蜂蜜样品的抗菌活性。使用范围为 2 %-6 % 的 3 个重复苯酚标准液实施抗菌试验，并且将 3-5 个重复的测试样品引入到琼脂平板上已记录的任意孔中。

在 37℃ 下培养所述平板过夜，以使细菌在可能的情况下生长。培

养后，使用数字游标卡尺测量孔周围抑制区域的直径。

蜂蜜的非过氧化物抗菌活性完全包含在级份 C 中（图 1）。

当聚焦在 HPLC 绘图的基线区域时，在级份 C 的活性区域中可见两个峰（图 2）。为了确定哪个峰与活性有关，设计级份收集时间的另一个方案：级份 D 0-19.4 分钟，级份 E 19.4-21.7 分钟，和级份 F 21.7-25 分钟。

在这些试验中，所有的抗菌活性均分离在级份 E 中。

重复该测试另外两次，获得了相同的结果。

### 实施例 3-蜂蜜的半制备分级分离（结合大小排阻和离子交换）

先前的研究（实施例 2 和 Snow(2001)）已确定了串联使用 Shodex™ SUGAR KS-801 和 KS-802 分析柱可以从单糖的主要部分中拆分出含 UMF 级份。

因为比较合乎需要的是增加可以通过柱的样品的量，所以使用所述柱的制备型（KS-2002 柱）。被筛分蜂蜜的洗脱谱的特征在于早期的酚物质、接着二糖和低聚糖、最后是单糖。

Shodex™ SUGAR KS2002（20mm × 300mm, 20μm 粒子大小, 60Å 孔大小）制备级柱结合了大小排阻和配体交换。该柱是以钠（Na<sup>+</sup>）的形式并具有  $1 \times 10^4$  排阻限度。在室温下使用 Milli-Q 水作为洗脱液实施色谱，其以 3mL/分钟的流速运行。

注射 300mg/mL 高加样量的蜂蜜到 200μL 环路中。使用 996 PDA 和 2410 RI 检测监测光谱。在大蒸发皿中冷冻干燥任何收集的级份。

图 3 提供了从 300mg/mL 筛分蜂蜜溶液的 200μL 注射液所获得的洗脱谱。由于在注射前筛分蜂蜜，故与果糖峰相比而言葡萄糖峰缩小，而不是它们在全蜂蜜中所存在的大约相等浓度(White *et al.*, 1962)。

大小排阻基质通常是轻微疏水性和弱阴离子性，其导致不能理想地分离，由此分离不是严格的分子大小的函数（Cunico *et al.*, 1998）。该柱子使用苯乙烯二乙烯基苯作为大小排阻聚合物，其可与酚类相互作用从而进行离子交换。因此，停留时间不是必然地意味着分子大小。

开始以四个级份的形式收集柱的洗脱液：

- 1 0.0-13.0 分钟 酚类
- 2 13.0-18.4 分钟 二糖和低聚糖
- 3 18.4-22.6 分钟 葡萄糖和果糖
- 4 22.6-30.0 分钟 后期洗脱物质

在 18.4 和 30 分钟间的级份内一致地发现有活性。然后尝试将所有活性集中在一个级份中。

表1: 从KS-2002柱收集的级份的活性

| 样品     |           | 清除区 a (mm) |      |    | 酚相当物 b (%) |      |   |
|--------|-----------|------------|------|----|------------|------|---|
| 级份     | 分钟        | 平均量        | SE   | n  | 平均量        | SE   | n |
| 1      | 0.0- 13.5 | NA         | -    | 12 | NA         | -    | 2 |
| 2      | 13.0-18.4 | NA         | -    | 12 | NA         | -    | 2 |
| 3      | 18.4-22.6 | 11.19      | 0.09 | 12 | 10.71      | 0.03 | 2 |
| 4      | 22.6-30.0 | 15.07      | 0.16 | 12 | 17.06      | 0.12 | 2 |
| 全蜂蜜    | -         | 18.72      | 0.18 | 20 | 24.67      | 0.92 | 2 |
| 1      | 0.0- 13.5 | NA         | -    | 10 | NA         | -    | 2 |
| 2      | 13.5-18.4 | NA         | -    | 10 | NA         | -    | 2 |
| 3      | 18.4-21.5 | 15.47      | 0.27 | 10 | 17.63      | 0.40 | 2 |
| 4      | 21.5-25.0 | 17.79      | 0.13 | 7  | 21.91      | 0.54 | 2 |
| 5      | 25.0-30.0 | NA         | -    | 10 | NA         | -    | 2 |
| 筛分的蜂蜜1 | -         | 20.78      | 0.15 | 16 | 28.26      | 0.68 | 2 |
| 1-3    | 0.0-19.5  | NA         | -    | 10 | NA         | -    | 2 |
| 4      | 19.5-25.0 | 19.15      | 0.16 | 9  | 25.20      | 1.00 | 2 |
| 筛分的蜂蜜1 | -         | 19.15      | 0.12 | 16 | 26.86      | 0.25 | 2 |

各值基于: a) 所有平板上的单个孔, 和b) 各平板的酚活性的计算值。

表 1 显示三种不同级份收集时间的试验结果, 和所得级份的非过氧化物活性。注意所示的第一试验使用全蜂蜜, 然而后两者使用筛分的

蜂蜜。

所有可检测的活性最终被限制在 19.5-25.0 分钟的级份中。这两种级份的 95% 置信区间 ( $CI = \text{平均数} \pm 2 \times SE$ ) 给于表 2。

置信区间不与清除区或者酚相当物重叠，其显示了级份 4 的活性在统计学上与筛分蜂蜜的情况并不相同。这指示在低于试验的检测限度的水平下有活性的部分损失，其或者通过吸收到柱或者分配到其他级份中而导致。级份 4 中的活性的平均量是筛分蜂蜜对应酚活性的 90%。

表2: 在KS-2002柱上,  
最后试验的活性的清除区和酚相当物95%的置信区间

| 样品    | 清除区 (mm)    | 酚相当物 (%)    |
|-------|-------------|-------------|
| 级份4   | 18.97-19.25 | 23.20-27.20 |
| 筛分的蜂蜜 | 20.04-20.65 | 27.50-28.50 |

清除区的值基于单个孔, 而酚相当物的值基于从平板计算的数据。

由图 3 可见, 该级份包含几乎所有果糖。除了减低水活性的物理作用和为葡萄糖氧化酶提供底物以产生  $H_2O_2$  和葡萄糖酸外, 单糖本身不具有抗菌活性。因此, 显然有其他化合物以低浓度存在于该级份中。

Snow (2001) 在使用所述柱的分析级型的研究中观察到果糖峰尾部的小峰。Snow (2001) 尝试分离该级份, 并且通过 GC-MS 和 NMR 鉴定其组成。然而, 样品中组分多表明该结果不是结论性的。也尝试将该峰的大小和全蜂蜜的活性联系起来, 但并未发现任何关系。这指示该峰由很多化合物组成, 其中至少有一种没有活性。

Snow (2001) 注意到与所述活性级份相关的峰是 UV 活性的。因为柱的制备性特征降低了分辨率, 以及该区域中弱 UV 活性开链单糖的高浓度造成的干扰, 所以该操作不能鉴定这些 UV 活性峰。

决定再次注射级份 4 以获得无单糖的级份。被再次注射的级份的光谱 (图 4) 没有显示在单糖峰尾部有集中峰的证据, 但注意到在 10.5 分钟出现新的峰。单糖峰开始处的凸起可能是残留的葡萄糖。基线的扩大显示在图 5。

糖类通常会提高有限可溶分子在水性体系中的溶解度。因此，有可能存在与所述糖类结合或者被其溶解化的化合物。当糖类浓度降低时，它们离解并且更早地被洗脱。

有可能所这一峰就是活性因子，并且该峰的大小与负责该非过氧化物活性的化合物以异常低的浓度存在的观点一致。或者，它可能是降解产物，因为所用的样品已经在冷冻机中储存了一个月。

然而，在再次注射前对样品中的活性进行的测试显示无活性损失，这得到了活性级份在分离后在冷冻机中储存超过2个月仍然保持稳定这些发现的支持。有可能所述峰反映非抗菌组分的降解。

收集来自再次注射的级份4的20.5-25.0分钟级份，并且再次注射以调查 Snow (2001) 观察到的活性峰是否仍然能被鉴定出来。显然在10.5分钟处观察到的新峰在光谱中也出现(图6和图7中的扩大图)，但是大为降低。

这暗示该峰不是储存的降解产物，并且的确可以反映活性由糖类所解离。

对于再次注射级份的活性的生物试验，没有收集到足够大的量(为了非常粗略的指示活性，需要最少200mg蜂蜜通过柱，或者对于严格的活性试验需要800mg)。

对于再次注射后色谱行为的变化无法下任何结论。决定不继续该方法，代之以尝试不同方法的分离和更高容量的柱。

#### 实施例4-蜂蜜的半制备分级分离(反相)

C18 25mm 反相柱的优点是具有显著更大的容量，从而一次可以注射1g在柱子上，而不象在KS-2002柱上仅注射60mg。

所用的反相制备柱是3个串联的Delta-Pak C18柱体(25mm × 100mm, 15μm 粒子大小, 100Å 孔大小)。其装配了Delta-C18保护内插件(25mm × 10mm, 15μm 粒子大小, 100Å 孔大小)。在室温下以10mL/分钟的流速，用0.5g/mL高加样量进入2mL环路实施色谱。

使用两种不同的洗脱液体系。第一种中仅使用Milli-Q水。然而，后来决定以100% Milli-Q水开始运行，然后在糖类被洗脱后转换成100

% 乙腈。由于所用的高流速，只可能使用大口径垂直的 Waters 410 差示折射计检测。

水中收集的级份在大蒸发皿中冷冻干燥。MeCN 中收集的级份在减压真空下浓缩，然后在冷冻干燥机上完全干燥。

这样大量地减少了为活性生物试验收集足够样品所花费的时间。此外，比较感兴趣的是是否所述柱能够更有效地从单糖中拆分出该活性。图 8 显示了在高柱加样量下（0.5g/ml, 2mL 注射液）以 Milli-Q 水运行，使用该柱获得的光谱。

单糖峰在光谱中占主要。该柱不能从果糖中拆分出葡萄糖，但是它确实显示在单糖后马上洗脱的一组峰，大约 14-25 分钟。

这些峰中的某些归因于低聚糖，其在活性麦卢卡蜂蜜中以大约总蜂蜜 8% 的水平存在（Weston and Brocklebank, 1999）。图 9 显示了证实这些峰的基线扩大。

初始时以四个级份的形式收集柱的洗脱液：

A 0.0-8.3 分钟 初期洗脱物质

B 8.3-11.8 分钟 糖类

C 11.8-25.0 分钟 后期洗脱物质

发现所有可检测的活性洗脱在级份 C 中（表 3）。

表3: C18柱上起始收集的级份的活性.

| 样品          | 级份<br>(分钟) | 清除区 <sup>a</sup> (mm) |      |    | 酚相当物 <sup>b</sup> (%) |      |   |
|-------------|------------|-----------------------|------|----|-----------------------|------|---|
|             |            | 平均量                   | SD   | n  | 平均量                   | SD   | n |
| 级份<br>A     | 0.0-8.2    | NA                    | -    | 16 | NA                    | -    | 2 |
| 级份<br>B     | 8.2-11.8   | NA                    | -    | 17 | NA                    | -    | 2 |
| 级份<br>C     | 11.8-30.0  | 17.51                 | 1.31 | 8  | 21.10                 | 2.40 | 2 |
| 筛分的<br>蜂蜜 5 | -          | 20.91                 | 0.48 | 15 | 28.15                 | 0.21 | 2 |

各值基于: a) 所有平板上的单个孔, 和b) 各平板上酚活性的计算值.

比较感兴趣的是是否该活性的一部分能够通过 MeCN 洗脱下来，因为这可以显示该级份的差别溶解度。此外，有必要确定用 Milli-Q 水是否从柱中洗脱下所有活性。

在反相色谱中 MeCN 是比  $H_2O$  更强的溶剂，所以它能用于从柱中冲洗下任何残留的物质。收集的级份如图 10 所示。

如前面所述，开始用 Milli-Q 水运行柱，然后收集级份 A 和 B。在横跨级份 B 到级份 C 处（11.8 分钟），停止泵，并且将溶剂直接转换为 100 % MeCN。

正如通过溶剂折射率变化引起的在基线中的快速升高所指示，从 11.8 分钟开始收集级份  $C_{H_2O}$  直至 MeCN 达到检测器（大概 13 分钟或者在 24 分钟停留时间处）。从此时起，通过柱冲洗 MeCN 的 3 个柱体积，并且收集洗脱液作为级份  $C_{MeCN}$ 。

如表 4 所示，所有可检测的活性保留在级份  $C_{H_2O}$  中，并且不与  $C_{MeCN}$  相关联。这显示活性未被柱可逆地保留。

级份 C 和  $C_{H_2O}$  仅分别占筛分蜂蜜相当物苯酚活性的 72 % 和 75 %，没有其他级份显示可检测的活性。这暗示该活性可能已经不可逆地结合在柱上。

所用柱是制备型的，并且由在非封端的硅支持物上的 C18 链组成，有可能该物质已经黏附到硅上，或者甚至通过与活性硅烷醇基团反应而已经分解。此外，该级份一贯地显示部分活性的变化水平。在这种特定情况中，这可能是由于当糖类含量降低时，在试验中缺乏非过氧化物活性的扩散性所致。

表 4. 来自 C18 柱反相色谱的级份的重量和活性.

|                         | 级份<br>(分钟) | 重量 <sup>a</sup> (% 杆重) |      |   | 清除区 <sup>b</sup> (mm) |      |    | 酚相当物 (%) |      |   |
|-------------------------|------------|------------------------|------|---|-----------------------|------|----|----------|------|---|
|                         |            | 平均量                    | SE   | n | 平均量                   | SD   | n  | 平均量      | SD   | n |
| 级份 A                    | 0.0-8.2    | 忽略                     | -    | 4 | NA                    | -    | 36 | NA       |      | 4 |
| 级份 B                    | 8.2-11.8   | 86.27                  | 1.25 | 4 | NA                    | -    | 36 | NA       | -    | 4 |
| 级份 C (H <sub>2</sub> O) | 11.8-27.0  | 9.52                   | 2.91 | 4 | 17.75                 | 0.33 | 28 | 19.98    | 1.45 | 4 |
| 级份 C (MeCN)             | 27.0-45.0  | 2.14                   | 0.04 | 2 | NA                    | -    | 36 | NA       | -    | 4 |
| 筛分的<br>蜂蜜 5             | -          | -                      | -    | - | 20.83                 | 0.09 | 24 | 27.91    | 2.40 | 3 |
| 筛分的<br>蜂蜜 6             | -          | -                      |      |   | 20.16                 | 0.13 | 10 | 23.91    | 0.27 | 2 |

值基于: a) 重复的 HPLC 试验, b) 所有平板上的单个孔, 和 c) 单个平板上酚活性的测定值.

### 比较 KS-2002 和 C18

Delta-Pak C18 活性级份包含比 KS-2002 活性级份少得多的糖类，并且反映了该活性与所述糖类的更好分离。相反，从 KS-2002 柱回收了更高比例的活性，这可能反映了活性物质与 C18 柱中硅支持物的化学相互作用。

与 C18 柱级份中的部分活性相反，在来自 KS-2002 柱的活性级份中观察到全部活性。然而，这可能与试验中 KS-2002 级份的更高糖类含量帮助扩散有关。

### 实施例 5-在含 UMF 级份中非过氧化物活性的稳定性

早先的作者已注意到，在加热 (Bogdanov, 1984; Molan and Russell, 1988; Roth *et al.*, 1986) 或储存 (Bogdanov, 1984; Sealey, 1988) 蜂蜜后，具有非过氧化物活性的蜂蜜剩余有显著的活性，并且这是导致提议非过氧化物活性的观察的部分。

该研究着眼于在室温和冰箱温度下经短期 (8-24 小时)，和在冷冻机温度下经中等时期 (1-8 周) 储存时在分离的 HPLC 级份中的稳定性。

与试验期间一样，这是具有实际的意义，我们希望确定该级份不是正在降解，因而活性的任何损失都是由于非活性组分的去除。此外，知道多少样品能被“贮存堆积”以便用于测试是有用的。

附带的兴趣是观察在储存中该活性是否由于在工业中暗示储存能增加全蜂蜜活性的轶事证据而确实能够增加。

表 5 给出该试验的综合结果，并且该结果直观地显示在图 11。

表5. 稳定性试验的综合数据.

| 处理          | 清除区 <sup>a</sup> (mm) |      |    | 酚相当物 <sup>b</sup> (%) |      |    |
|-------------|-----------------------|------|----|-----------------------|------|----|
|             | 平均量                   | SE   | n  | 平均量                   | SE   | n  |
| 室温<br>8h    | 16.18                 | 0.14 | 8  | 17.88                 | 0.45 | 2  |
| 室温<br>24h   | 16.65                 | 0.05 | 8  | 18.75                 | 0.52 | 2  |
| 冰箱<br>8h    | 16.44                 | 0.09 | 8  | 18.38                 | 0.38 | 2  |
| 冰箱<br>24h   | 16.82                 | 0.15 | 8  | 19.06                 | 0.24 | 2  |
| 冷冻机<br>1wk  | 17.95                 | 0.20 | 8  | 23.06                 | 0.57 | 2  |
| 冷冻机<br>2wks | 17.92                 | 0.29 | 8  | 23.83                 | 0.42 | 2  |
| 冷冻机<br>4wks | 18.33                 | 0.19 | 7  | 22.29                 | 0.52 | 2  |
| 冷冻机<br>8wks | 17.78                 | 0.14 | 8  | 21.06                 | 0.41 | 2  |
| 对照          | 17.28                 | 0.27 | 34 | 20.86                 | 1.55 | 8  |
| 筛分的<br>蜂蜜 4 | 19.88                 | 0.11 | 72 | 26.62                 | 0.65 | 10 |
| 冷冻干燥测试      | 20.34                 | 0.23 | 17 | 27.27                 | 0.72 | 4  |

值基于: a) 所有平板上的单个孔, 和b) 单个平板的酚活性的计算值.

在 KS-2002 柱上分离筛分蜂蜜, 并且收集 19.5-25 分钟间的级份, 然后立即转移至冷冻机。当完成当天的注射后, 冷冻干燥该级份。

一旦干燥, 用蒸馏水将它们重溶成 50 % 的强度, 然后或者在室温或者在冰箱或冷冻机中储存一段时间。每个样品相当于 480mg 的筛分蜂蜜。

储存后, 将样品稀释成 25 % 的强度, 并且在双份板上的四个孔中

测试，以调查是否出现活性的任何损失或获得。该结果与在相同平板上测试的新鲜收集活性级份的活性相比较。此外，冷冻干燥两个重复的筛分蜂蜜以调查冷冻干燥过程对蜂蜜活性的影响。

表 6 给出原始级份的保留百分数原始活性的保留在清除区中是 94-106%，在酚相当物这是 86-114%。因此，各种形式的储存已经对分离的活性级份中的非过氧化物活性产生某些影响。

表6. 在储存的级份中非过氧化物的活性的保留。  
原始活性的百分表。

| 储存条件      | 清除区 <sup>a</sup><br>(%) | 酚相当物 <sup>a</sup><br>(%) |
|-----------|-------------------------|--------------------------|
| 室温, 8h    | 93.7                    | 85.7                     |
| 室温, 24h   | 96.3                    | 89.9                     |
| 冰箱, 8h    | 95.2                    | 88.1                     |
| 冰箱, 24h   | 97.3                    | 91.4                     |
| 冷冻机, 1wks | 103.9                   | 110.5                    |
| 冷冻机, 2wks | 103.8                   | 114.2                    |
| 冷冻机, 4wks | 106.1                   | 106.9                    |
| 冷冻机, 8wks | 102.9                   | 100.9                    |

表 7 提供这些结果的 REML 分析。该结果显示储存中活性的某些改变在统计学上比较显著。使用清除区数据，室温和冰箱样品都显著地低于对照。

在这些处理中酚相当物没有显示统计学显著性，这很可能是由于数据组的重复更少，所以较大的标准误差模糊了预计平均值间的任何差异。

在八周冷冻级份的清除区数据中，以及在四周冷冻级份的酚相当物数据中也可见活性在统计学上显著的增加。

然而，本实验中的局限是没有重复地实施这些处理，并且是在同一天在双份板上进行测试。因此，各日之间的变化可以在确定显著性中发挥重要作用。使用酚标准曲线产生酚相当物可给出比使用清除区甚至

更宽范围的值，暗示酚标准物没有补偿这些日之间效果。

尽管这些结果的统计学显著性，仍然可观察活性的良好保留。在冷冻机中储存的某些样品也有增加活性的统计学显著性证据。然而，由于没有重复进行这些处理，在该实验中日之间和板之间效果的影响仍然未知。

表7. 有关储存活性HPLC级份后，非过氧化物的活性变化的显著性的统计信息。

| 处理        | 清除区 <sup>a</sup> (mm) |        |     | 酚相当物 <sup>b</sup> (%) |        |     |
|-----------|-----------------------|--------|-----|-----------------------|--------|-----|
|           | 平均值间的差异               | 2 x SE | 显著性 | 平均值间的差异               | 2 x SE | 显著性 |
| 室温, 24h   | -1.87                 | 0.78   | 是   | -1.46                 | 7.68   | 否   |
| 室温, 8h    | -2.33                 | 0.78   | 是   | -2.33                 | 7.68   | 否   |
| 冰箱, 8h    | -2.07                 | 0.78   | 是   | -1.83                 | 7.68   | 否   |
| 冰箱, 24h   | -1.7                  | 0.78   | 是   | -1.15                 | 7.68   | 否   |
| 冷冻机, 1wks | 0.28                  | 0.46   | 否   | 1.96                  | 2.88   | 否   |
| 冷冻机, 2wks | -0.49                 | 0.62   | 否   | -0.5                  | 3.44   | 否   |
| 冷冻机, 4wks | 0.44                  | 2.5    | 否   | 3.71                  | 2.84   | 是   |
| 冷冻机, 8wks | 0.85                  | 0.6    | 是   | 3.18                  | 3.44   | 否   |

平均值间的差异用处理的预测平均值减去对照的预测平均值表示  
值基于: a) 所有平板上的单个孔, 和b) 单个平板上酚活性的计算值。

#### 实施例 6-蜂蜜的强化

有格外高抗菌活性的蜂蜜通常不会天然出现，故它们的要价很高。因此，如果能够开发一种方法来浓缩因活性太低而在医学上没有用处的

蜂蜜的活性，或者将已经具有高活性的蜂蜜的潜力提高到天然条件下不能常规获得的水平，将会有商业上的优势。

这仅仅对浓缩非过氧化物活性（UMF）有用，因为蜂蜜的过氧化物活性是原位产生的，并且其取决于过氧化物破坏物的浓度和葡萄糖过氧化物酶的稳定性。

由于反相 HPLC 能够拆分 UMF，并且该柱能处理大加样量的样品，因此，与大小排阻/离子交换上的级份 4 相反，收集级份 C（用 100 % Milli-Q 水洗脱），并且用于强化筛分蜂蜜。

为产生强化的样品，向在 1ml 蒸馏水中的 1g 未加工的筛分蜂蜜添加级份 C（从 1g 筛分蜂蜜的分离中产生）。该 50 % 溶液进一步用过氧化氢酶稀释成 25 % 溶液。因此，样品在技术上具有双倍于筛分蜂蜜对照的 UMF 量。

初步试验（表 8）显示与筛分蜂蜜的活性相比获得了少量的增加。

表8. 初始调查筛分蜂蜜的强化

| 样品                        | 清除区 <sup>a</sup> (mm) |      |    | 酚 <sup>b</sup> (%) |      |   |
|---------------------------|-----------------------|------|----|--------------------|------|---|
|                           | 平均量                   | SE   | n  | 平均量                | SE   | n |
| 筛分的蜂蜜 / A<br>级份 C (1:1) B | 22.68                 | 0.14 | 16 | 28.75              | 1.26 | 2 |
|                           | 22.52                 | 0.10 | 15 | 28.43              | 1.01 | 2 |
| 筛分的蜂蜜 6                   | 20.16                 | 0.13 | 10 | 23.91              | 0.27 | 2 |
| 级份 C                      | 19.12                 | 0.33 | 10 | 21.19              | 0.74 | 2 |

值基于: a) 所有平板上的单个孔, 和 b) 单个平板上酚活性的计算值。

这占了筛分蜂蜜的对应酚活性的 23.5 % 增加。因为没有观察到双倍的活性，所以扩展本实验到包括强化的增加水平，以调查是否有可能对增加剂量的活性级份产生正比例的应答。

每个剂量包括向 1g 如上所述未加工的筛分蜂蜜中以相当于 1、2 和 3g 筛分蜂蜜中的浓度添加级份 C。

表 9 显示所得样品的活性, 图 12 以图表形式显示了清除区的结果。

表9. 调查强化的筛分蜂蜜的比例性。

| 样品        | 清除区 <sup>a</sup> (mm) |      |   | 酚 <sup>b</sup> (%) |      |   |
|-----------|-----------------------|------|---|--------------------|------|---|
|           | 平均量                   | SE   | n | 平均量                | SE   | n |
| 1:3       | 24.60                 | 0.14 | 8 | 33.61              | 0.87 | 2 |
| 筛分的蜂蜜/1:2 | 23.44                 | 0.10 | 8 | 31.00              | 0.40 | 2 |
| 级份C       | 22.33                 | 0.07 | 8 | 28.64              | 0.00 | 2 |
| 1:1       | 14.87                 | 0.11 | 8 | 15.75              | 0.34 | 2 |
| 筛分的蜂蜜7    | 20.39                 | 0.11 | 8 | 24.80              | 0.05 | 2 |
| 级份C       |                       |      |   |                    |      |   |

值基于: a) 所有平板上的单个孔, 和b) 单个平板上酚活性的计算值。

观察到强关联性 ( $R^2 = 0.9874$ ), 指示出现了正比例的应答。这确定有可能增加蜂蜜的非过氧化物活性。

然而, 线性回归分析显示, 在测试这些样品中所用的双份板在梯度上具有统计学上显著的差异 ( $p$  值 = 0.011)。由图 13 的 Minitab 结果可见这些曲线。

观察到象这样的平板效果并非不寻常。如已讨论的, 在 WDA 方法中平板变化是最重要变量之一, 因此所有样品都在双份板上进行测试, 对其平均以补偿这种作用。

作为替代, 相比于其他三种强化水平, 在 1:3 强化 (比率 3, 图 13) 的数据点在两条曲线之间显示更多的变化。因此可能某些局限于该点的某些因素使曲线歪斜。

这可能是简单地因为当加入到两个平板时该样品不均一。然而, 在高活性下本实验没有如此敏感。对此的原因有三层:

- (i) 清除区可能重叠, 其趋向引起清除区延长, 使测量困难。
- (ii) 分散更加易变。
- (iii) 清除区能超过最高标准。

在本研究中, 小心地隔开各级份以减小清除区重叠的机会, 然而, 1:3 的强化样品接近活性的最高标准。

不管这些考虑, 现已经证实了制备麦卢卡蜂蜜的含 UMF 级份的方

法和它在强化蜂蜜中的应用。

在前面的描述中提及具有已知相当物的整数或组分之处，这样的相当物象单独列出一样引入本文中。

尽管已经通过实施例并参考其可能的实施方案描述了本发明，但是应当理解，可以对其进行改良和/或修改而不离开本发明的范围或精神。

### 参考文献

Abuharfeil, N.; Al-Oran, R.; Abo-Shehada, M. (1999) The effect of bee honey on proliferative activity of human B- & T- lymphocytes and the activity of phagocytes Food & Agri. Invn. 11, 169- 177

Adcock, D. (1962) The effect of catalase on the inhibine and peroxide values of various honeys J. Apic. Res. 1, 38-40

Allen, K. L.; Molan, P.C.; Reid, G. M. (1991) A Survey of the Antibacterial Activity of Some New Zealand Honeys J. Pharm. Pharmacol. 43, 817-822

Benj B.; Sunshine, G.; Leskowitz, S. (1996) Immunology 3rd edition New York Wiley-Liss

Bogdanov, S. (1997) Nature and Origin of the Antibacterial Substances in Honey Lebensm- Wiss. U. -Technol. 30, 1, 748-753

Breitmaier, B.; Voelter, W. (1987) Carbon-13 NMR Spectroscopy 3<sup>rd</sup> edition Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany

Bulman, M. W. (1955) Honey as a surgical dressing Middlesex Hospital Journal 5, 188- 189

Chirife, J.; Scarmato, G.; Herszagel, L. (1982) Scientific basis for use of granulated sugar in treatment of infected wounds Lancet, March 6, 560-561

Cizmarik, L; Matel, I. (1970) Examination of the chemical composition of propolis. I. Isolation and identification of the 3 4-dihydroxycinnamic

acid (caffeic acid) from propolis *Experientia* 26, 7, 713

Cizmarik, L; Matel, I. (1973) Chemical composition of propolis. 2. Isolation and identification of 4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid (ferulic acid) from propolis *J. Apicult. Res.* 12, 1, 52-54

Cooper, R.A.; Molan, P. C; Harding, K.G. (1999) Antibacterial activity of honey against strains of *Staphylococcus aureus* from infected wounds *Journal of the Royal Society of Medicine* 92, 283-285

Cotton, F A , Wilkinson, G F R S (1972) Advanced inorganic chemistry A comprehensive text 3<sup>rd</sup> edition, John Wiley & Sons, Inc., USA

Dustmann, J H (1971) Catalase activity in honey of heather plant (*Ericacea*) flow *Z Lebensm - Unters -Forsch* 145, 5, 294-5

Dustmann, J H (1979) Antibacterial effect of honey *Apiacta* 14 7-1 1

Efem, S B B (1988) Clinical Observations on the Wound Healing Properties of Honey *Brit J Surgery* 75, 679-681

Efem, S B E (1993) Recent Advances in the Management of Fournier's Gangrene Preliminary Observations *Surgery* 113, 2, 200-204.

El-Banby, M , Kandil, A , Abou-Sehly, G, Ei-Shenf, M E , Abel-Wahed, K (1989) Healing effect of floral honey and honey from sugar-fed bees on surgical wound (animal model) Fourth International Conference on Apiculture in Tropical Climates, Cairo, International Bee Research Association London, 46-49

Farr, J M. (2005\*) An Investigation into some properties of the non-peroxide antibacterial activity of manuka honey Waikato University Masters Thesis (\* embargoed).

Ferreres, F, Tomas-Barberan, F A , Soler, C , Garcia-Viguera, C , Ortiz, A , Tomas- Lorentz, F (1994) A simple extractive technique for honey flavonoid BIPLC analysis *Apidologie* 25, 1, 21-30

Ghisalbert, E L (1979) Propolis A review *Bee World* 60, 59-84

Gonnet, M.; Lavie, P. (1960) The influence of heat on the antibiotic

**factor present in Honey Ann. Abeille 34, 349-364**

**Gupta, S. K.; Singh, H.; Varshney, A.C.; Prakash, P. (1992) Therapeutic efficacy of honey in infected wounds in buffaloes Indian Journal of Animal Science 62, 6, 521- 523**

**Hodges, R.; White, E.P. (1966) Detection and isolation of tutin and hyenanchin in toxic honey New Zealand J. Sci. 9, 1, 233-35**

**Hutton, D.J. (1966) Treatment of pressure sores Nursing Times 62, 46, 1533-1534**

**Itoh, K.; Amamiya, I.; Ikeda, S.; Konishi, M. (1994) Anti-Helicobacter pylori substances in propolis Honeybee Science 15, 4, 171-173**

**Jones, K. P.; Blair, S.; Tonks, A.; Price, A.; Cooper, R. (2000) Honey and the stimulation of inflammatory cytokine release from a monocytic cell line First World Wound Healing Congress, Melbourne, Australia**

**Kandil, A.; El-Bnby, M.; Abdel-Wahed, K.; Abou-Sehly, G.; Ezzat, N. (1987) Healing effect of true floral and false non-floral honey on medical wounds J. Drug Res.(Cairo) 17, 1-2, 71-75**

**Lavie, P. (1960) Antibacterial substances in the honeybee colony Ann. Abaille 3, 103-183**

**Majno, G. (1975) The Healing Hand. Man and Wound in the Ancient World Cambridge, Massachusetts, Harvard University Press**

**Marcucci, M. C. (1995) Propolis: Chemical Composition, Biological Properties and Therapeutic Activity Apidologie 26, 89-99**

**Marhuenda Requena E.; Alarcon de Ia Lastra, C; Garcia Gimenez, M. D. (1987) Demonstration of antibacterial properties of phenolic acids from Thymus carnosus Boiss. Isolation of caffeic, vanillic, p-coumaric, p-hydroxybenzoic and syringic acids Plant. Med. Phytother. 21, 2, 153-9**

**Maurizio, A. (1962) From the raw material to the finished product: Honey Bee World 43 66-81**

**McInemey, R.J.F. (1990) Honey - a remedy rediscovered Journal of the**

**Royal Society of Medicine 83, 127**

**Mladenov, S. (1974) Present problems of Apitherapy. Hive products: Food health and beauty Proceedings of the international Symposium on Apitherapy Apimonida Publishing House, Madrid**

**Molan, P.C.; Russell, K.M.; (1988) Non-peroxide antibacterial activity in some New Zealand Honeys J. Apic. Res. 27, 1, 62-67**

**Molan, P.C. (1992a) The antibacterial activity of honey 1. The nature of the antibacterial activity Bee World 73, 1, 5-28**

**Molan, P.C. (1992b) The antibacterial activity of honey 2. Variation in the potency of the antibacterial activity Bee World 73, 2, 59-76**

**Molan, P.C. (2001) Why honey is effective as a medicine 2. The scientific explanation of its effects Bee World 82, 1, 22-40**

**Morales, C.F. (1991) Margarodidae (Insecta:Hemiptera Fauna of New Zealand/Ko te Aitanga Pepeke o Aotearoa 21, 16-17**

**Oryan, A.; Zaker, S.R.; (1998) Effects of topical application of honey on cutaneous wound healing in rabbits J. Vet. Med. Series A 45, 3, 181-188**

**Perry, N.B.; Brennan, N.J.; Van Klink, J.W.; Harris, W.; Douglas, M.H.; McGimpsey, J.A.; Smalifield, B.M.; Anderson, R.E. (1997) Essential oils from New Zealand manuka and kanuka: chemotaxonomy of Leptospermum Phytochemistry 44, 8, 1485-1494**

**Ransome, H.M. (1937) The sacred bee in ancient times and folklore London, George Allen and Unwin**

**Rivera-Vargas, L.I.; Schmitthenner, G.F.; Graham, T.I. (1993) Soybean flavonoids effects on and metabolism by Phytophthora sojae Phytochemistry 32, 4, 851-857**

**Russell, K.M. (1983) The antibacterial properties of honey Waikato University Masters Thesis**

**Russell, K.M.; Molan, P.C; Wilkins, A.L.; Holland, P.T. (1990) Identification of Some Antibacterial Constituents of New Zealand**

**Manuka Honey J. Agric. Food Chem. 38, 1, 10-13**

**Schepartz, A.I. (1966) Honey catalase: occurrence and some kinetic properties J. Apic. Res. 5, 3, 167-176**

**Schepartz, A.I.; Subers, M..H. (1966) Catalase in honey J. Apic. Res. 5, 1, 37-43**

**Schuler, R.; Vogel, R. (1956) Active ingredients of bee honey. I Arzneimittel-Forsch. 6, 661-663**

**Snow, M J. (2001\*) An Investigation into the non-peroxide antibacterial activity of manuka honey Waikato University Masters Thesis (\* embargoed). Steeg, E.; Montag, A. (1988) Minor components of honey with significance for the aroma. II. Organoleptic decomposition products of aromatic carboxylic acids and glycosidically bound aromatic compounds Dtsch. Lebensm.-Rundsch. 84, 5, 147- 150**

**Stinson, E.E.; Subers, M.H.; Petty, J.; White J.W., Jr. (1960) The composition of honey V. Separation and identification of the organic acids Archives of Biochemistry and Biophysics 89, 6-12**

**Tan, S.T.; Holland, P.T.; Wilkins, A.L.; Molan, P.C. (1988) Extractives from New Zealand Honeys. 1. White Clover, Manuka, and Kanuka Unifloral Honeys J. Agric. Food Chem. 36, 453- 460**

**Tan, S.T.; Wilkins, A.L.; Molan, P.C; Holland, P.T.; Reid, M. (1989) A Chemical Approach to the Determination of Floral Sources of New Zealand Honeys J. Apic. Res. 28, 4, 212-222**

**Thimann, K.V. (1963) The life of bacteria 2<sup>nd</sup> edition New York, Macmillan**

**Verge, J. (1951) The antibacterial activity of propolis in honey and royal jelly Apiculteur 95, section scientifique, 13-20**

**Wahdan, H.A.L. (1998) Causes of the Antimicrobial Activity of Honey Infection 26, 1, 26-31**

**Ward, C. (2000) Kanuka and Manuka Forest & Bird 295 24-27**

**Weston, R.J. ; Brocklebank, L.K. (1999) The oligosaccharide composition of some New Zealand honeys Food Chemistry 64, 33-37**

**Weston, R.J. ; Brocklebank, L.K. ; Lu, Y. (2000) Identification and quantitative levels of antibacterial components of some New Zealand honeys Food Chemistry 70, 427-435**

**Weston, R.J.; Mitchell, K.R.; Allen, K.L. (1999) Antibacterial phenolic components of New Zealand manuka honey Food Chemistry 64, 295-301**

**Weston, R.J. (2000) The contribution of catalase and other natural products to the antibacterial activity of honey: A review Food Chemistry 71 , 235-239**

**White, J.W. Jr.; Riethof, M.L; Suber M.H.; Kushnir, I. (1962) Composition of American Honeys Technical Bulletin No 1261 U S Government Printing Office, Washington D C**

**White, LW., Jr.; Subers, MR.; Schepartz, A.J. (1963) The identification of inhibine, the antibacterial factor in honey as hydrogen peroxide and its origin in a honey glucose oxidase system Biochem. Biophys. Acta 73, 57-70**

**White, LW. Jr. (1975) " of Honey" Honey: A comprehensive survey E Crane, Ed London, Heinemann, 157-206**

**White, J W , Jr (1978) Honey [in food research] Adv Food Res 24, 287-374**

**White, J W Jr (1992) The hive and the honey bee Ch 21 869-925**

**Wilkins, A L, Lu, Y, Molan, P C (1993) Extractable organic substances from New Zealand unifloral manuka (Leptospermum scoparium) honeys J Apic Res 32, 1,**

**Wu, J. (2000) A chemical investigation of oligosaccharides in some New Zealand unifloral honeys Waikato University Masters Thesis**

**Websites: www Airborne Honey Ltd, PO Box 28, Leeston, New Zealand**

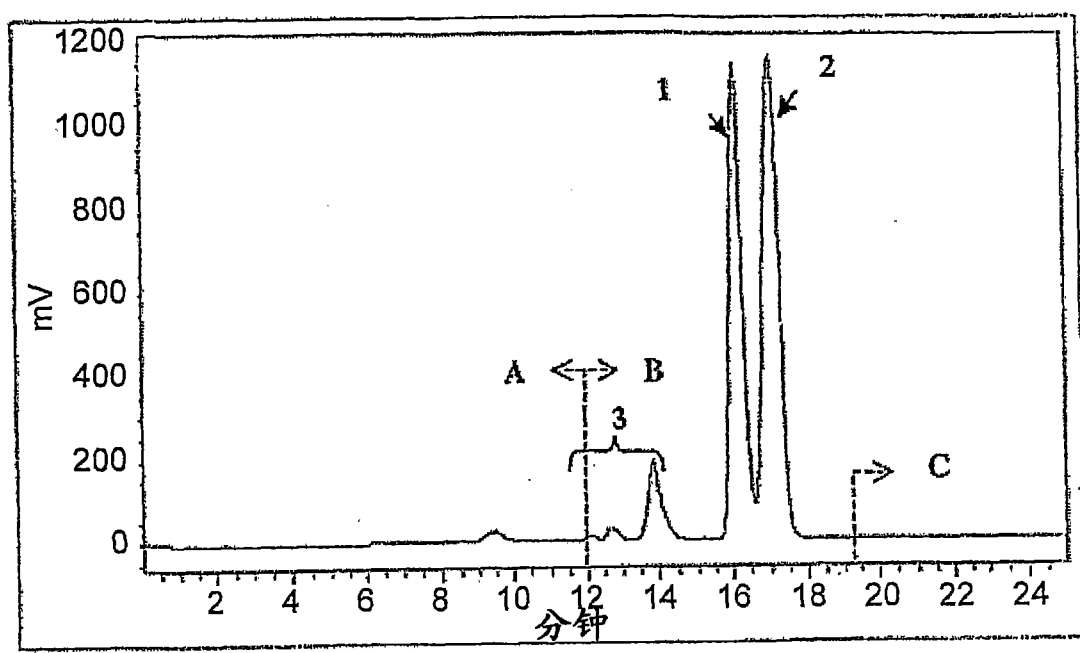


图 1

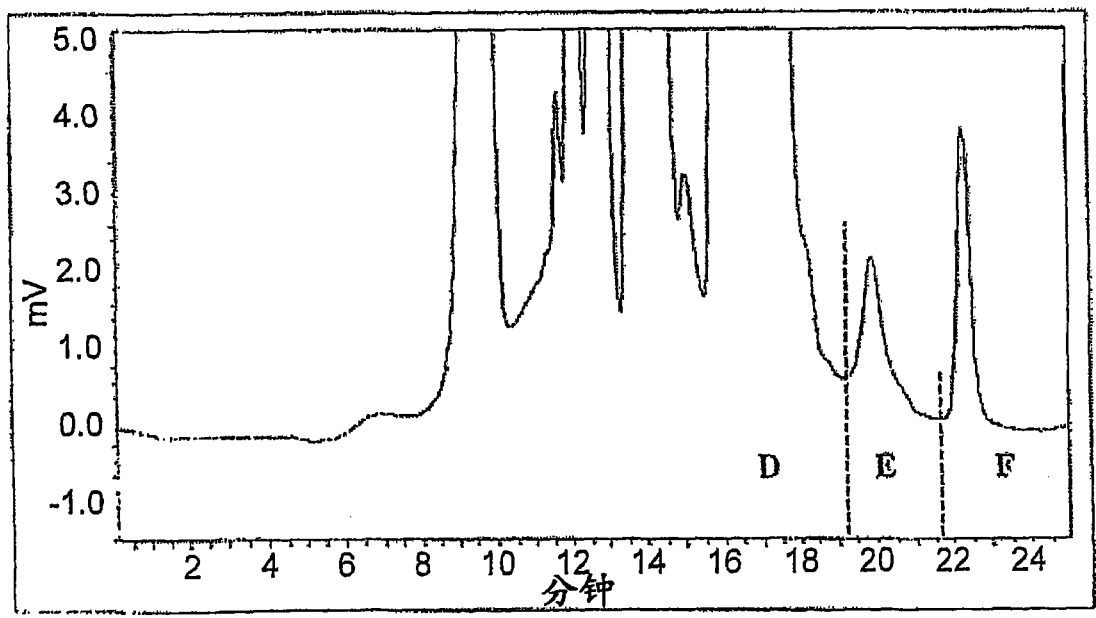


图 2

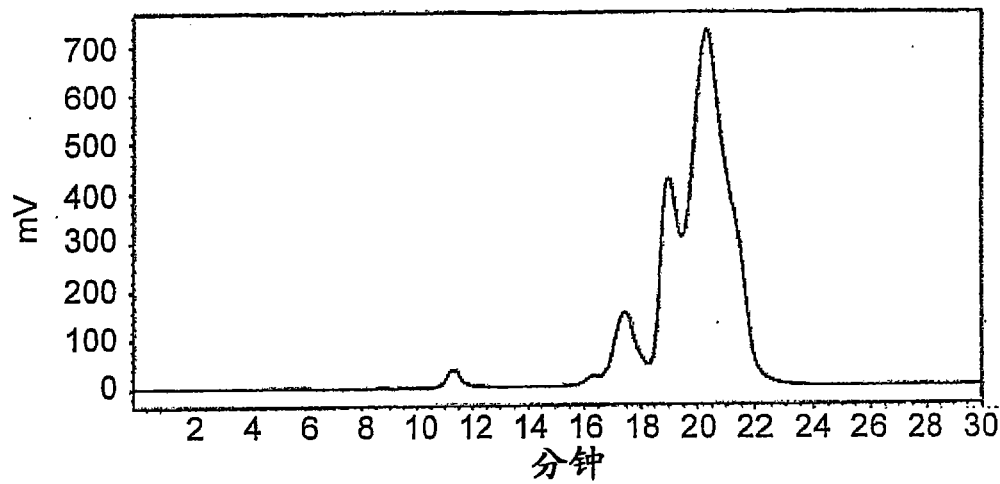


图 3

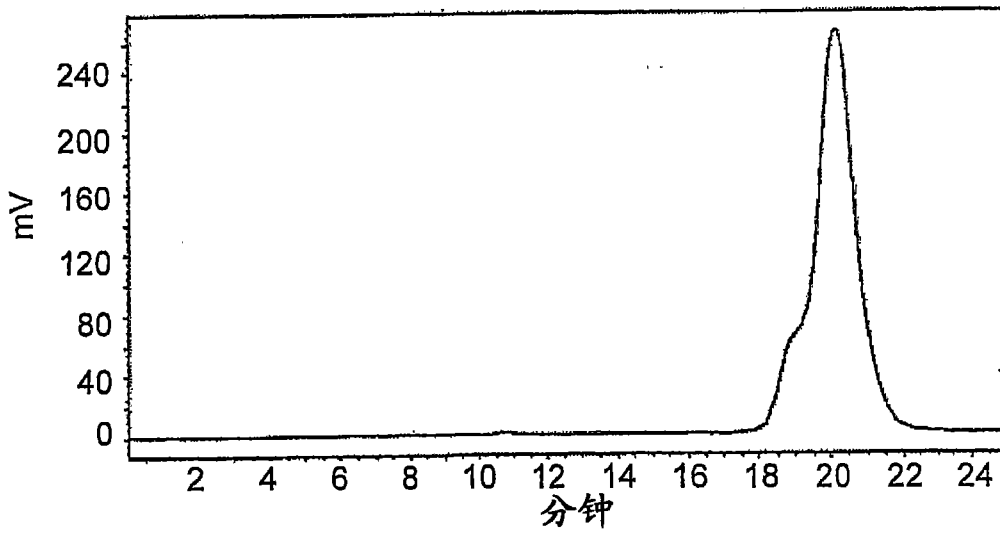


图 4

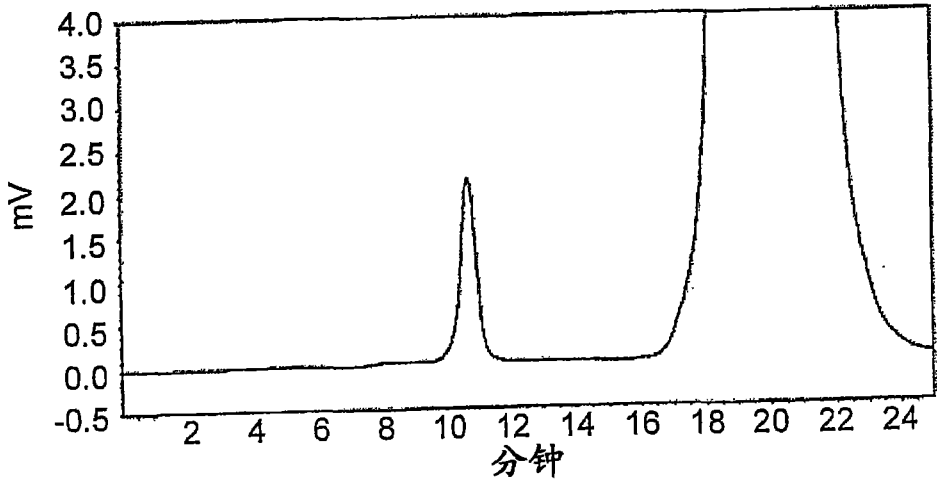


图 5

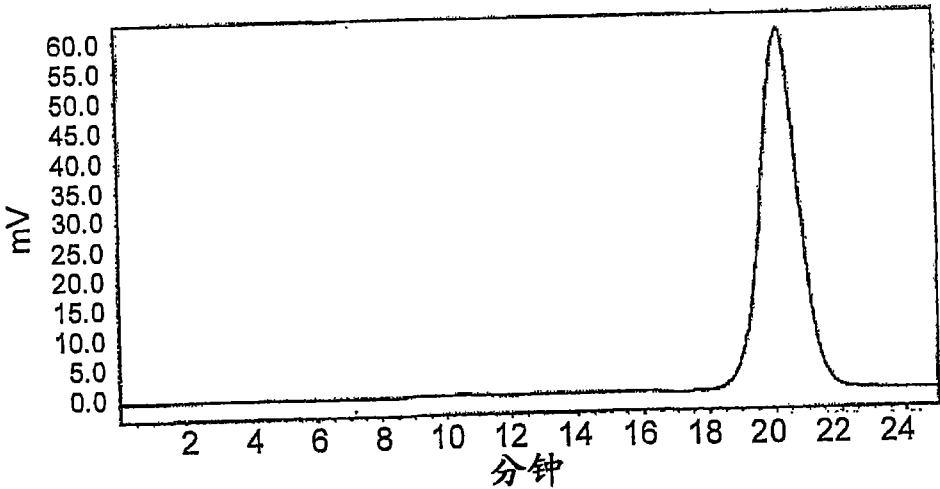


图 6

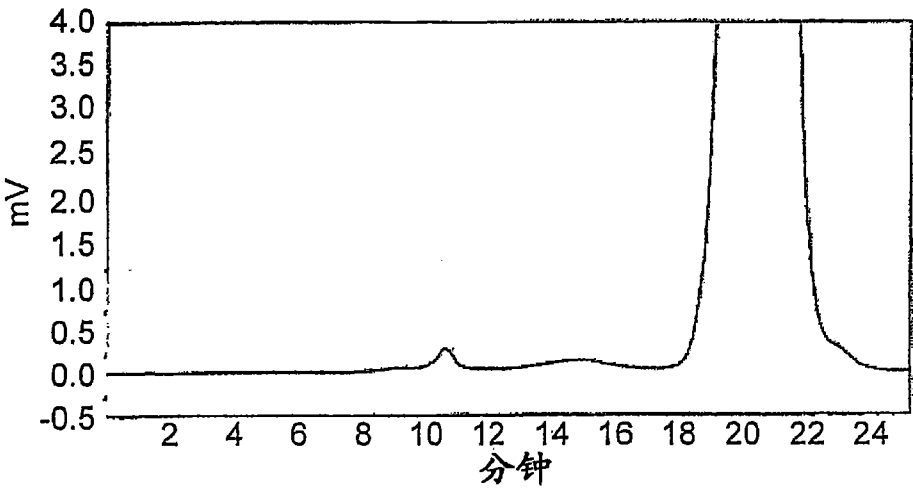


图 7

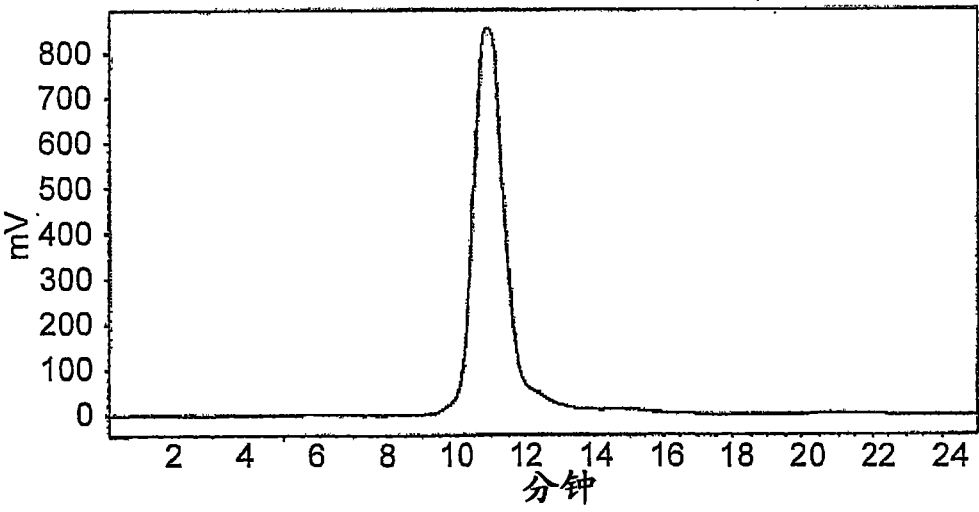


图 8

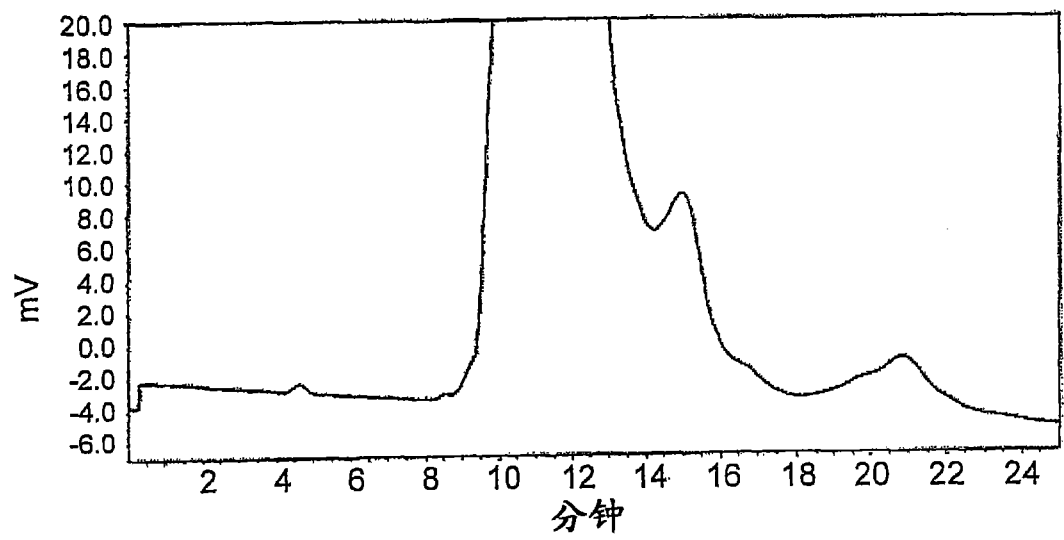


图 9

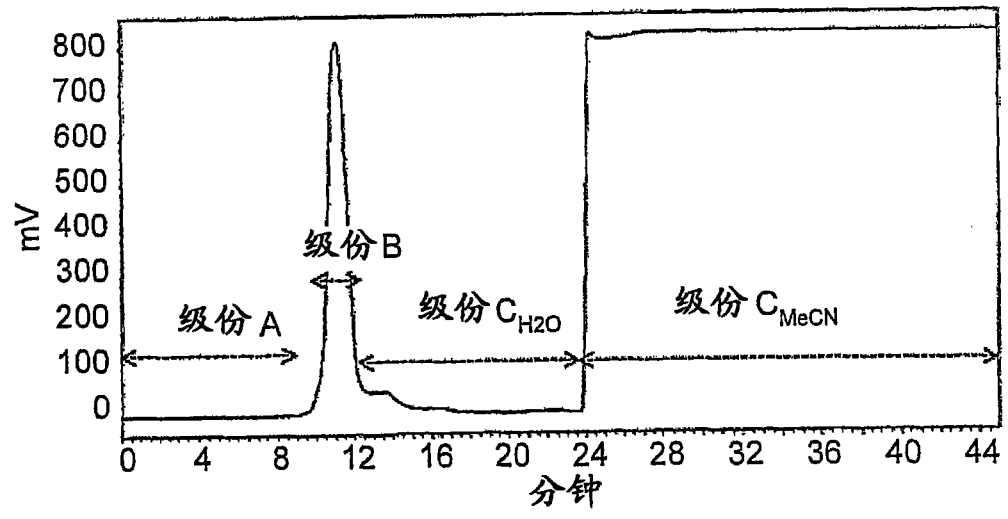


图 10

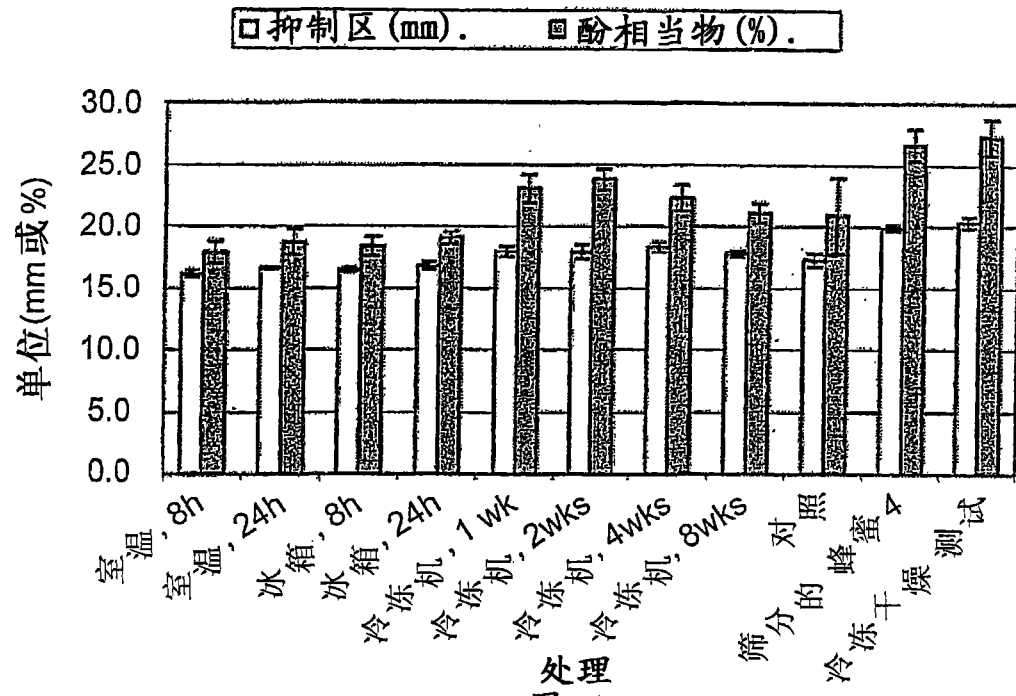


图 11

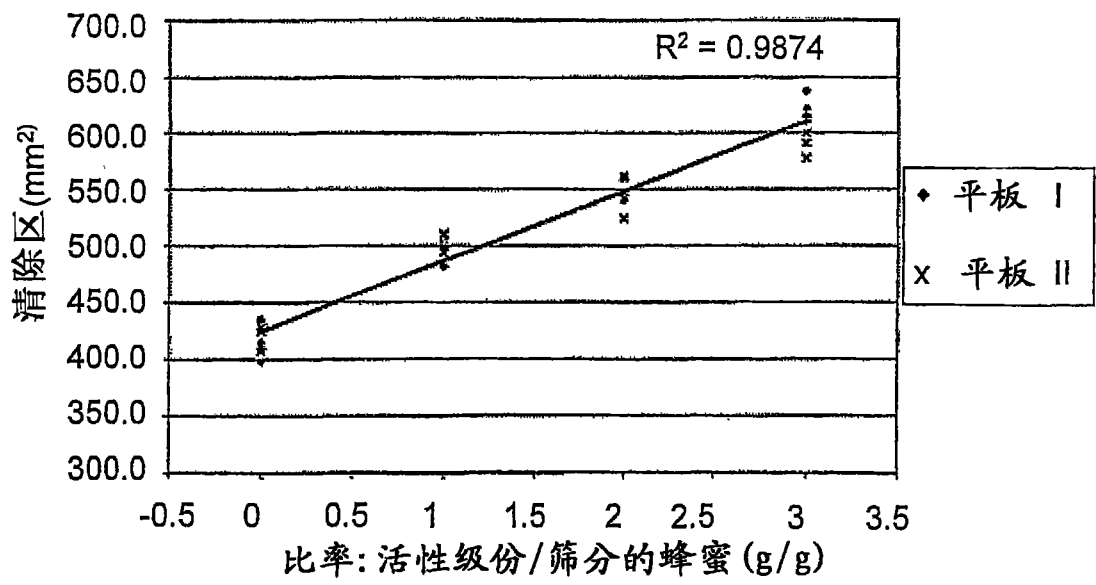


图 12

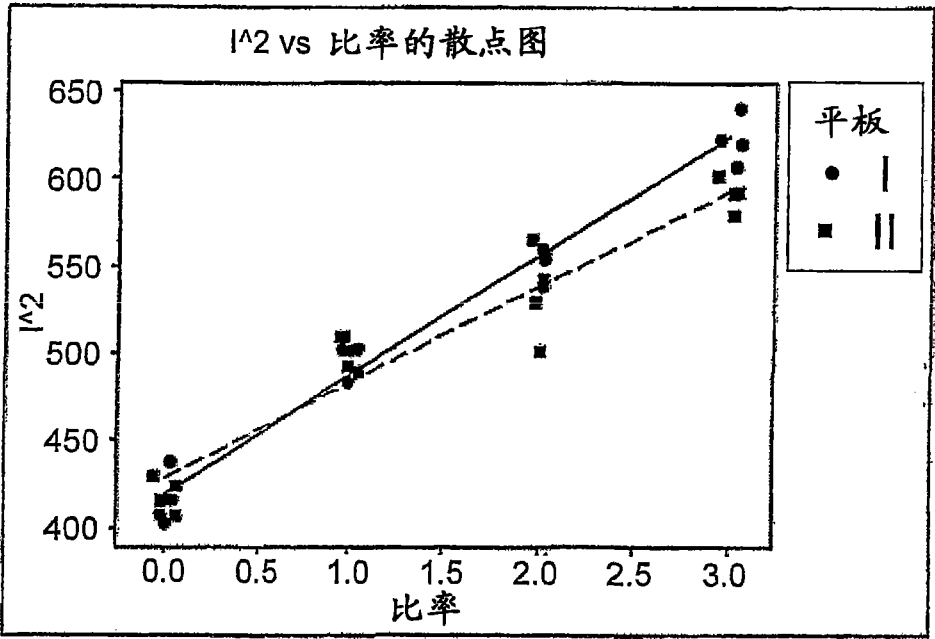


图 13