

蜂王漿之品質管制--

毛細管電泳在蜂王漿鮮度指標測定上之應用

陳景川 溫惠美 葉美吟

國立屏東科技大學 食品科學系

摘 要

本研究採本省中南部以生產蜂王漿為主之義大利蜂種所生產之新鮮蜂王漿，經由儲存試驗進行鮮度指標之探討。新鮮蜂王漿分別儲存在室溫及 37°C 下，每週定時取樣，連續採樣三個月。以毛細管區帶電泳分析新鮮蜂王漿，發現在 pH 2.5 之磷酸鈉及 pH 6.0 之 Cit/MES 緩衝溶液下分離，有很好的分析效果。在 pH 2.5 之磷酸鈉緩衝液中可分離出四個尖峰(N1,N2,N3 及 N4)；而在 pH 6.0 之 Cit/MES 緩衝液下，則分離出二個尖峰(R1 及 R2)。將此分離條件應用於蜂王漿儲存試驗中，發現儲存一週後，各蛋白質之波峰即有明顯的變化，且 37°C 之儲存條件所引起之變化明顯的比室溫下來得顯著。將各蛋白質波峰之消長趨勢，以高度比值予以量化，分別得到 N1/N2，N3/N4 及 R2/R1 等三種比值，此三值均可作為判定蜂王漿鮮度品質之參考指標，其中尤以 R2/R1 比值最為靈敏。應用此『波峰高度比值法』調查 20 件省產新鮮蜂王漿之鮮度範圍，結果顯示各樣品之鮮度差異性相當大，其中 N1/N2 範圍在 1.23 ~ 1.46 之間，N3/N4 在 0.10 ~ 0.42 之間，R2/R1 則在 0.23 ~ 0.43 之間。

關鍵詞：蜂王漿、毛細管電泳、鮮度指標

◎ 前言

蜂王漿一直是世人心目中的瓊漿玉液，也是高經濟價值的蜂產品，但由於蜂王漿的含水量高，並且富含蛋白質及碳水化合物，是微生物生長的良好基質，再加上蜂王漿採收不易，頗費人工，受污染的機會大，而且蜂王漿對溫度敏感，因此採收後若儲藏不當，極易造成品質的劣變而影響商品價值。

目前本省對於蜂王漿鮮度品質的認定尚未有統一之標準，一般業者大都以感官檢驗，例如：外觀、顏色、氣味、黏稠度等，做為初步判定之指標，若是外銷品，則再以儀器進一步分析。測定之方法，包括氣相層析法、高效能液相層析法、紫外光度計測定法等^(1~6)。另外，亦有學者以黏度、色差值、酵素活性、脂質氧化、蛋白質含量、膠體過濾法及電泳圖譜法等做為蜂王漿品質劣變之評估指標^(7~8)。由於上述各方法或因步驟繁複耗時，浪費人力；或因指標不靈敏，在判定上易失去時效性，故仍皆非理想之鮮度指標。而觀之國內養蜂業者，大都以生產蜂王漿為主，占蜂產品總收入的百分之五十以上，所以建立一套簡便、快速又靈敏的鮮度評估方法，有其應用上之迫切性。本研究擬嘗試以毛細管電泳因具有高效率、分析時間短及樣品用量少等諸多優點，將其應用在蜂王漿之儲存試驗，並追蹤蛋白質之變化，期能從中尋找一更為靈敏及更具時效性之鮮度指標。

◎ 材料與方法

一、材料

儲存試驗所使用之蜂王漿，採自本產中南部以生產蜂王漿為主之義大利蜂種(*Apis mellifera ligustica*)所生產之新鮮蜂王漿，其養蜂花種以茶花及油菜花為主，其它雜花為輔。新鮮蜂王漿採購後隨即儲存於-18°C之冷凍庫備用。另外，鮮度調查所使用之蜂王漿，則收購自本省各處蜂農或外銷貿易商等處，共計 20 件檢體。

二、方法：

1. 儲存試驗

將新鮮蜂王漿分別貯存在室溫(25±3°C)和 37°C 恆溫室中，每週定期取取樣進行實驗分析，連續採樣三個月。取蜂王漿 0.2g，加入 10ml 的蒸餾水，振盪混合均勻後，以 12000×g 在 4°C 離心 10 分鐘，收集澄清液後以 0.45 µm 濾膜過濾去除雜質，再分別以 pH 2.5 之磷酸鈉及 pH 6.0 之 Cit/MES 緩衝液進行毛細管電泳分析。

2. 毛細管區帶電泳分析(Beckman P/ACE 5000 system)

所使用之方法係依李氏等之法行之⁽⁹⁾。藥品及毛細管皆採用 Beckman 公司之產品。由初步實驗結果發現以 pH 2.5 之磷酸鈉及 pH 6.0 之 Cit/MES 緩衝液的分析效果最好，故本文之所有分析工作，皆分別在此二種緩衝液下進行。

◎ 結果與討論

一、毛細管電泳之層析分離

從文獻顯示，蜂王漿之鮮度指標大多局限在物理性質或感官目測等方向，缺乏較靈敏或較具時效性之測試方法，不易及時察覺初期之鮮度變化。雖然在相關文獻中，亦曾提及應用 SDS-PAGE 之電泳分離，可做為蜂王漿之判斷指標，然而 SDS-PAGE 之樣品製備耗時，且蛋白質染色帶之變化，在貯藏期間往往需長達數週以上，方出現較明顯的改變，偵測結果不具時效性。相較之下，毛細管電泳則具有樣品可直接上機，不需繁複的前處理；且分析所需時間短，只需數分鐘即可完成；加上，再現性佳等優點，故將其應用在蜂王漿的貯存試驗上，尋找一更具時效性的鮮度指標，似為可行之道。

圖一和圖二分別是新鮮蜂王漿於毛細管電泳中，在 pH 2.5 之磷酸鈉緩衝液及 pH 6.0 之 Cit/MES 緩衝液的層析圖。由二圖可清楚顯示相同的樣品在不同的分離條件下，出現完全不同之層析結果。在 pH 2.5 之磷酸鈉緩衝液下，採用正相的電極方向，即被偵測之物質為帶正電荷者方可偵測得，而大部分蛋白質在 pH 2.5 之緩衝液中，即以帶正電荷形式存在，故蜂王漿於此條件下可被分離出較多的波峰。但在 pH 6.0 之緩衝液，採用逆相之電極方向，被偵測之物質須為帶負電荷者。而在此 pH 條件下，樣品中只有部分蛋白質帶負電荷，故圖二顯示，僅分離出二個波峰。

圖三 圖六分別為蜂王漿在 25°C 及 37°C 下儲存不同時間之毛細管電泳層析圖。其中圖三及圖四分別為在 pH 2.5 之磷酸鈉緩衝液中分離之層析圖，在 25°C 貯存一週後，N3 波峰高度有明顯增高之現象，且其隨著貯存時間之增長而繼續增加；貯存二個月後，N1 和 N2 兩個波峰形狀亦產生變化。上述變化情形，於 37°C 貯存時更為明顯，其中 N1 和 N2 在貯存一個月後即消失產生另一個波峰。圖五及圖六係在 pH 6.0 之 Cit/MES 緩衝液中分離之層析圖，其中 R1 於貯存期間幾乎完全沒有變化，而 R2 則明顯隨著貯存時間之增長而有消失之趨勢，同樣地，在 37°C 貯存時，R2 之變化更為顯著。為了讓各蛋白質之變化情形更易於觀察，本實驗將上述波峰之消長趨勢予以量化，把不同蛋白質之波峰高度比值(peak height ratio)相對於貯存時間做一曲線圖，則可明顯表現出各蛋白質間之變化趨勢。此結果分別在圖七 九中示出。圖七為 pH 2.5 之磷酸鈉緩衝液下 N1/N2 之變化情形，在一週內 N1/N2 值即有明顯下降之現象，然隨著貯存時間之增長，此值之變化趨於平緩，顯示 N1/N2 值在貯存初期，可為一相當靈敏之指標。於

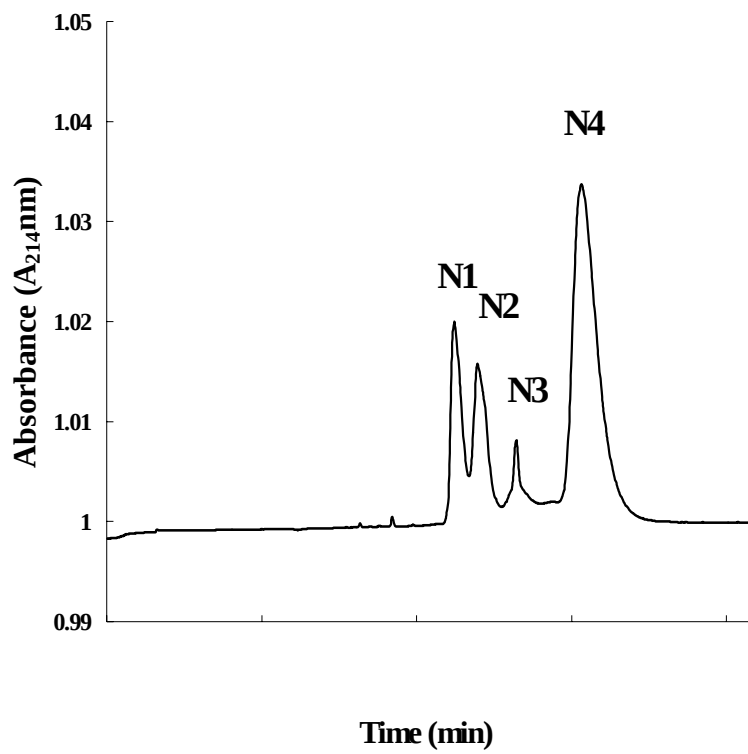
37°C之曲線圖則顯示在整個貯存期間，N1/N2 值之變化皆相當顯著，顯示貯存溫度的確對蜂王漿品質有明顯之影響。將 N3/N4 之比值對貯存時間作圖(圖八)，同樣地，在一週內即可觀察出比值之明顯變化，顯示以毛細管電泳分析的確可發揮更佳之時效性與敏感性。圖九為 pH 6.0 Cit/MES 緩衝液下，R2/R1 比值之變化情形，其比值隨著儲存時間之增長而急遽下降，圖中零值表示 R2 完全消失，於室溫儲存時，在第五週後，R2 完全消失，而於 37°C 儲存時，變化更為明顯，在第三週即出現零值，但不論是在室溫或 37°C 下，其 R2/R1 比值在一週內即有明顯變化，顯示其可做為判定鮮度之良好指標。

本實驗嘗試以毛細管電泳分離蜂王漿之蛋白質成分，雖受限於現有緩衝液（商品化產品）之選擇性不多，但由貯藏試驗之測試結果觀之，以各蛋白質間之消長比值來反映蜂王漿之鮮度，似為一良好可行之指標，尤其對初期（一週內）之變化，更為靈敏，其中以在 pH 6.0 之 Cit/MES 緩衝液下測試 R2/R1 之效果最好，此值應可作為今後欲判定蜂王漿的品質好壞之參考指標。

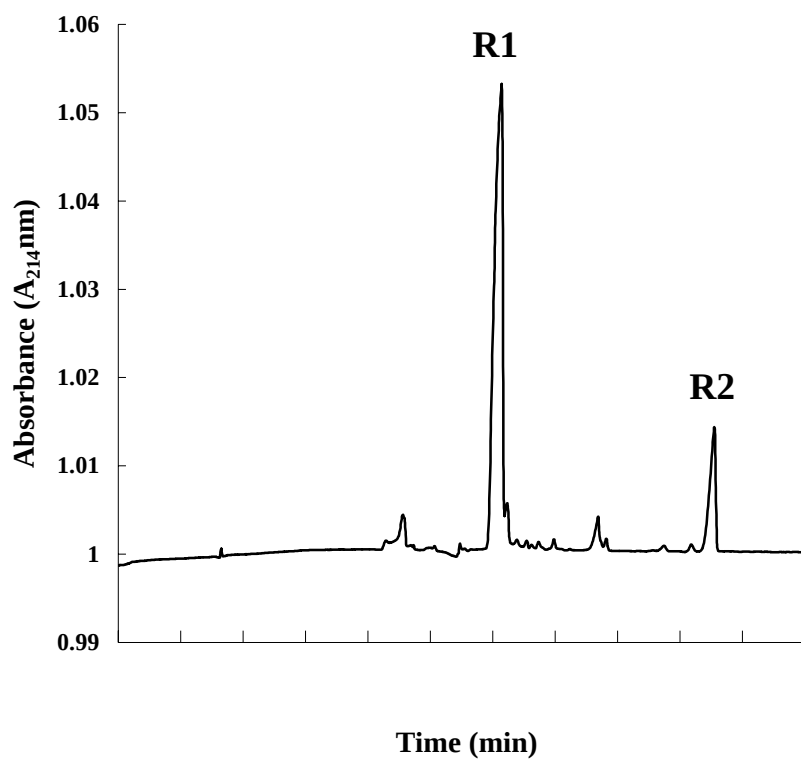
二、省產蜂王漿之鮮度調查

為了解省產蜂王漿之鮮度品質，本實驗採集中南部各處蜂農所生產之新鮮蜂王漿，共計 20 件檢體，以毛細管電泳測定之波峰高度比值法，來調查其一般鮮度範圍，做為品質管制之參考。如表一及表二所示，新鮮蜂王漿的 N1/N2 之比值範圍在 1.23 ~ 1.46 之間，N3/N4 之比值範圍在 0.10 ~ 0.42 之間；R2/R1 之比值則在 0.23 ~ 0.43 之間（見表三）。相較於以感官目測其中之變化，本實驗將蜂王漿置於 25°C 環境下，其外觀顏色在二個月內幾無變化，至第九週顏色才逐漸變深，而黏稠度也在第六週時稍微開始變稠；在 37°C 時，外觀顏色在第五週開始變深，而黏稠度亦在第四週始有變化。

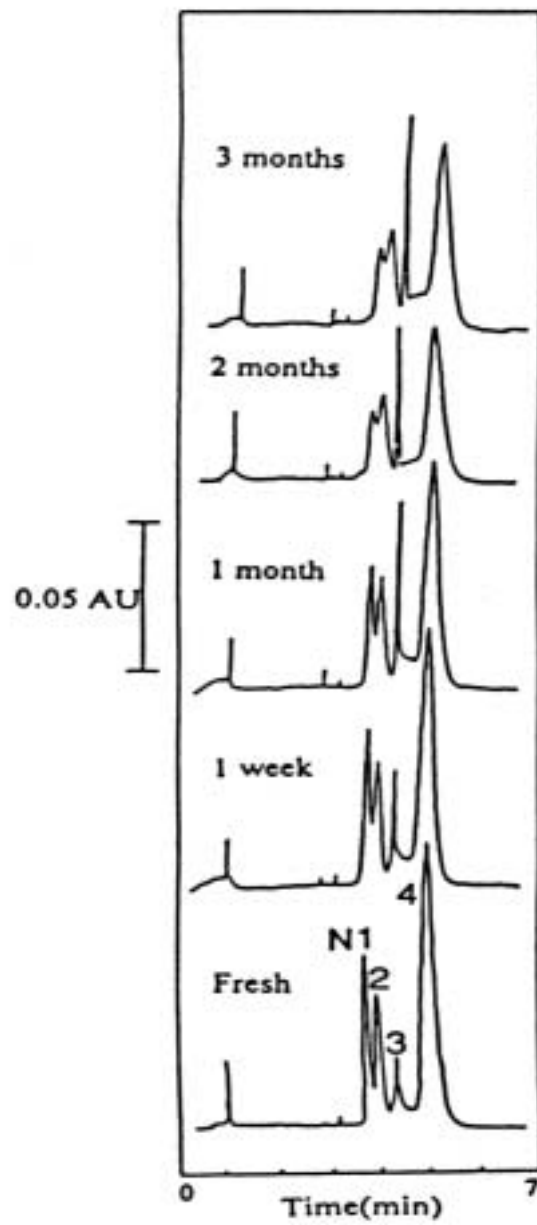
目前省產之蜂王漿大多仍以人工採收，採收期間如不注意溫度之控制，很容易造成鮮度之敗壞。從上述各表之數據，即可發現各產品之鮮度差異性相當大。因此，以毛細管電泳分析，的確可發揮蜂王漿在早期之品管監控的功能。



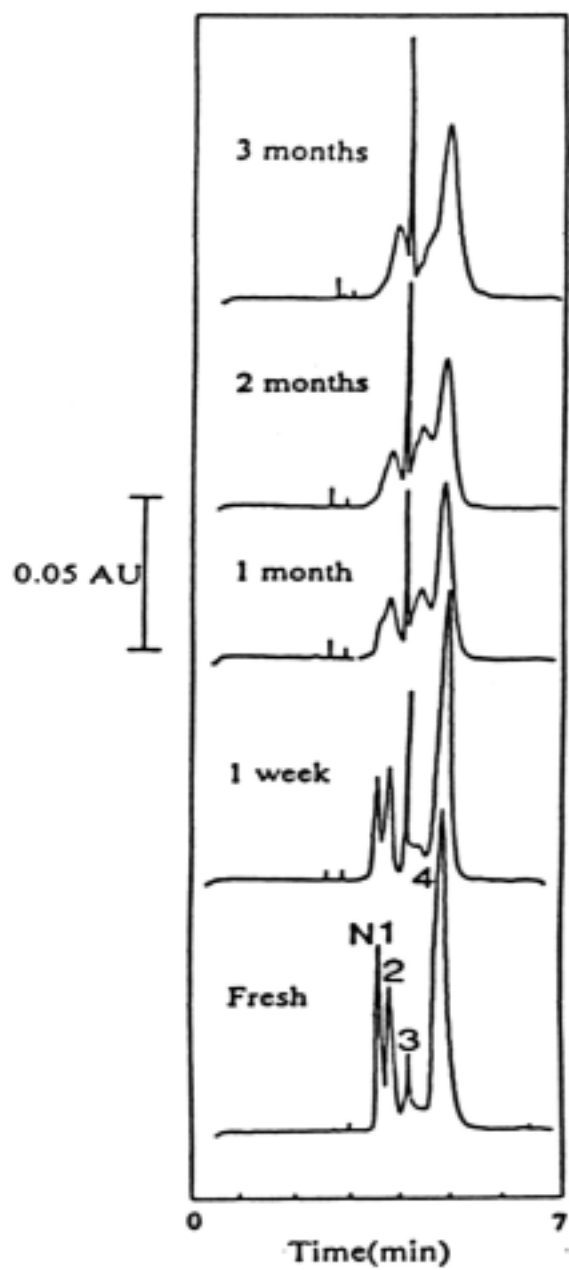
圖一、新鮮蜂王漿於磷酸鈉緩衝溶液（pH 2.5）之毛細管區帶電泳層析圖。



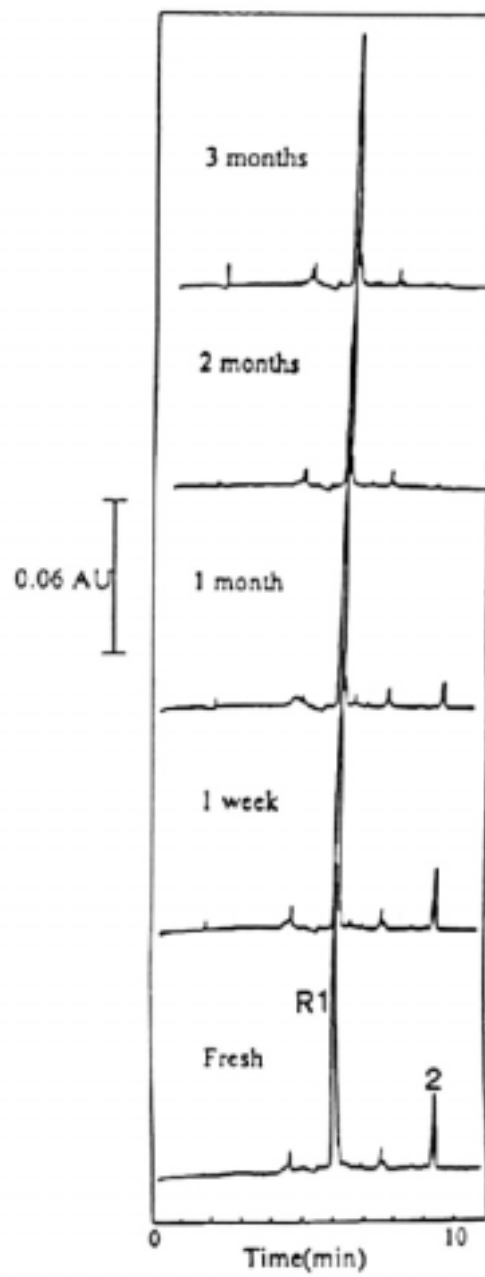
圖二、新鮮蜂王漿於 Cit/MES 緩衝溶液 (pH 6.0) 之毛細管區帶電泳層析圖。



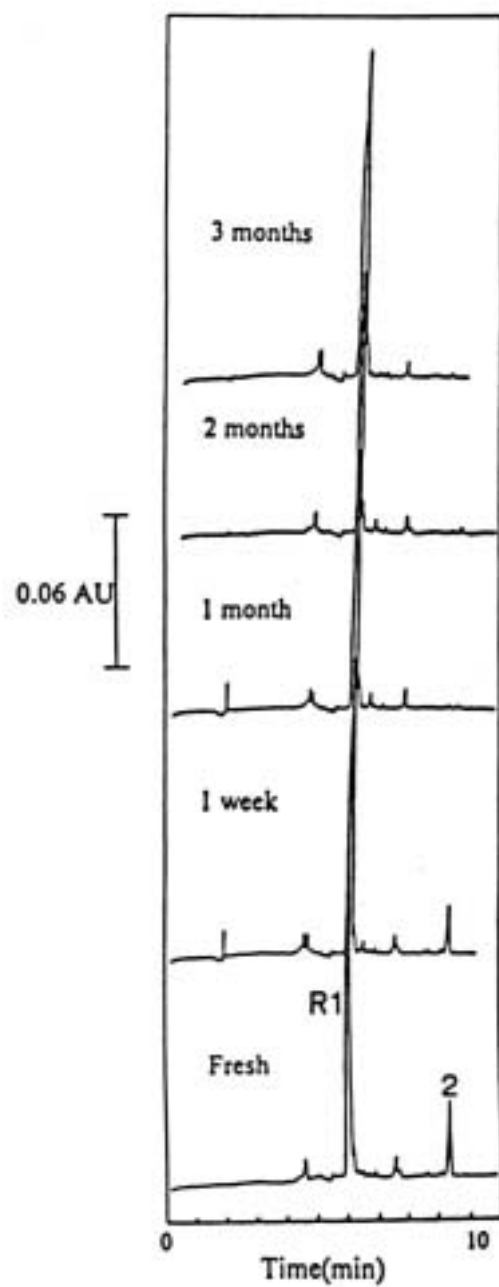
圖三、蜂王漿在 25°C下儲存不同時間後於磷酸鈉緩衝溶液（pH 2.5）之毛細管電泳層析圖。



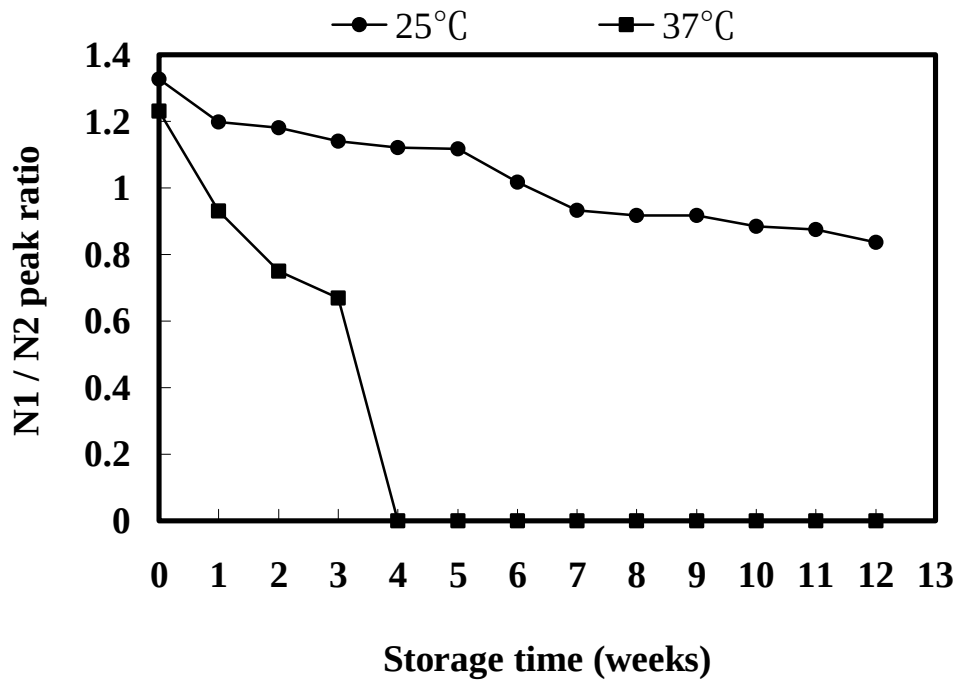
圖四、蜂王漿在 37°C下儲存不同時間後於磷酸鈉緩衝溶液 (pH 2.5) 之毛細管電泳層析圖。



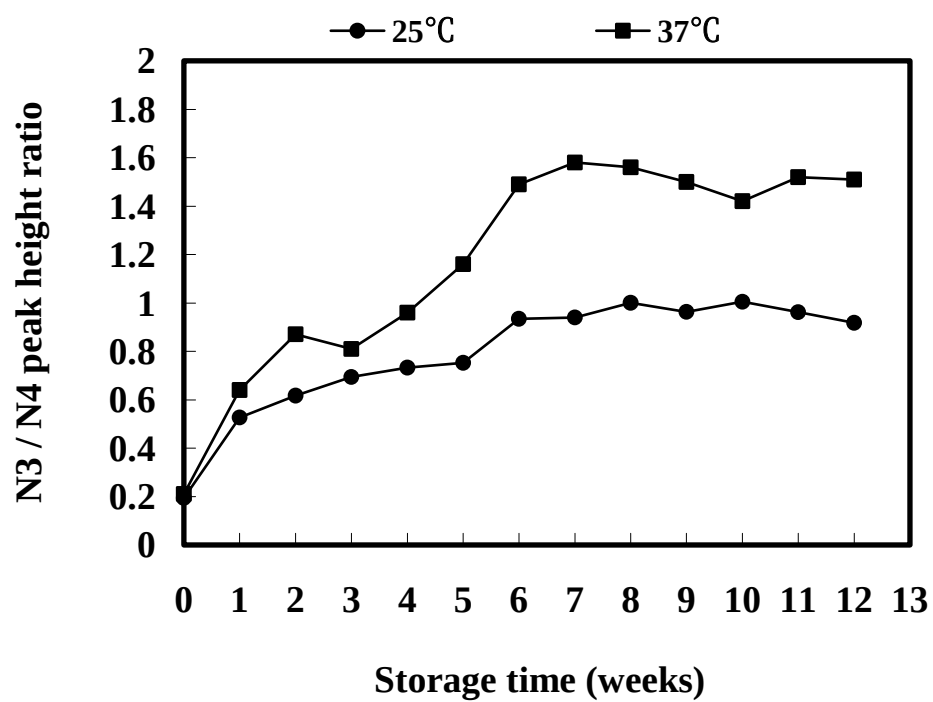
圖五、蜂王漿在 25°C下儲存不同時間後於 Cit/MES 緩衝溶液 (pH 6.0) 之毛細管電泳層析圖。



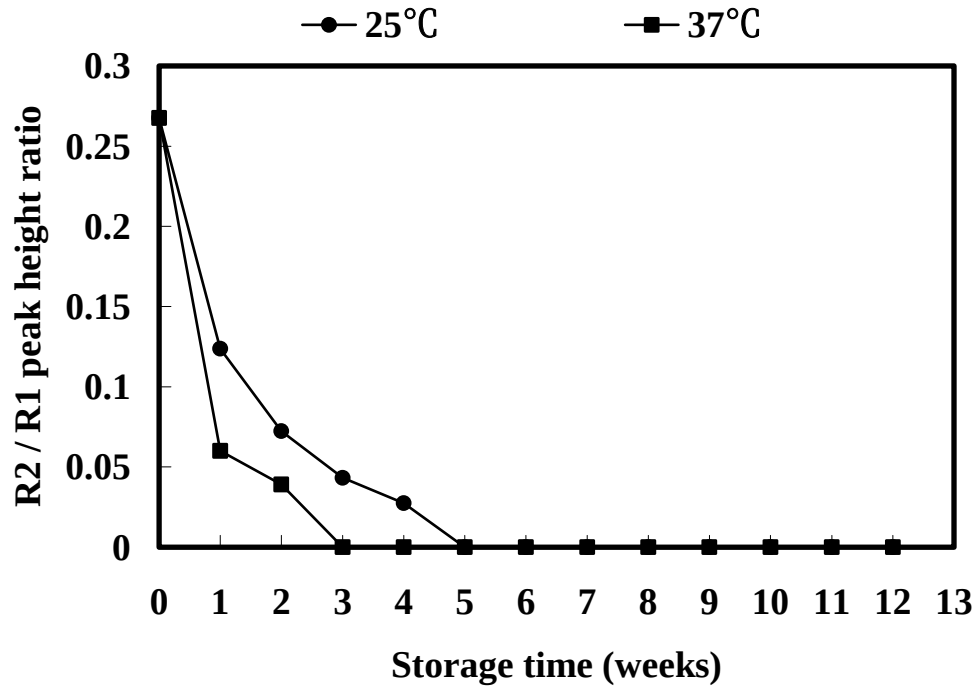
圖六、蜂王漿在 37°C下儲存不同時間後於 Cit/MES 緩衝溶液 (pH 6.0) 之毛細管電泳層析圖。



圖七、蜂王漿於不同溫度及不同儲存期間蛋白質經磷酸鈉緩衝液（pH 2.5）下毛細管電泳分離之波峰高度比值（N1/N2）之變化。



圖八、蜂王漿於不同溫度及不同儲存期間蛋白質經磷酸鈉緩衝液（pH 2.5）下毛細管電泳分離之波峰高度比值（N3/N4）之變化。



圖九、蜂王漿於不同溫度及不同儲存期間蛋白質經 Cit/MES 緩衝液 (pH 6.0) 下毛細管電泳分離之波峰高度比值 (R2/R1) 之變化。

表一、使用磷酸鈉緩衝液 (pH 2.5) 之毛細管電泳分析省產 20 種新鮮蜂王漿之波峰高度比值 (N1/N2)

Sample No.	Peak height ratio (N1/N2)
1	1.29 ^{bcd}
2	1.44 ^a
3	1.29 ^{bcd}
4	1.23 ^d
5	1.30 ^{bcd}
6	1.26 ^{cd}
7	1.25 ^{cd}
8	1.28 ^{bcd}
9	1.36 ^{abc}
10	1.39 ^{ab}
11	1.35 ^{abcd}
12	1.25 ^{cd}
13	1.30 ^{bcd}
14	1.24 ^{cd}
15	1.32 ^{bcd}
16	1.27 ^{cd}
17	1.25 ^{cd}
18	1.30 ^{bcd}
19	1.29 ^{bcd}
20	1.46 ^a
MSE	0.002

註：數值均以平均值表示，其所附註不同字母 a-l，均有顯著性差異 ($p < 0.005$)。df=20, MSE= 錯誤均方。

表二、使用磷酸鈉緩衝液 (pH 2.5) 之毛細管電泳分析省產 20 種新鮮蜂王漿之波峰高度比值 (N3/N4)

Sample No.	Peak height ratio (N3/N4)
1	0.42 ^a
2	0.15 ^{ijkl}
3	0.25 ^{cdef}
4	0.15 ^{jkl}
5	0.15 ^{jkl}
6	0.22 ^{efgh}
7	0.20 ^{ghij}
8	0.21 ^{fghi}
9	0.26 ^{bcde}
10	0.22 ^{cdef}
11	0.27 ^{bcd}
12	0.27 ^{bcd}
13	0.17 ^{hijk}
14	0.19 ^{ghij}
15	0.21 ^{fghi}
16	0.19 ^{ghij}
17	0.28 ^{bc}
18	0.13 ^{kl}
19	0.31 ^b
20	0.10 ^l
MSE	0.001

註：數值均以平均值表示，其所附註不同字母 a-l，均有顯著性差異 ($p < 0.005$)。df=20，MSE=錯誤均方。

表三、使用 Cit/MES 緩衝液 (pH 6.0) 之毛細管電泳分析省產
20 種新鮮蜂王漿之波峰高度比值 (R2/R1)

Sample No.	Peak height ratio (R2/R1)
1	0.25 ^{de}
2	0.30 ^d
3	0.29 ^{de}
4	0.36 ^{bc}
5	0.37 ^b
6	0.43 ^a
7	0.30 ^{cd}
8	0.31 ^{cd}
9	0.30 ^{cd}
10	0.27 ^{de}
11	0.29 ^d
12	0.27 ^{de}
13	0.31 ^{cd}
14	0.41 ^{ab}
15	0.27 ^{de}
16	0.28 ^{de}
17	0.39 ^{ab}
18	0.27 ^{de}
19	0.23 ^e
20	0.28 ^{de}
MSE	0.001

註：數值均以平均值表示，其所附註不同字母 a-d，均有顯著性差異 ($p < 0.005$)。df=20，MSE=錯誤均方。

◎ 參考文獻

1. 李貽琳、朱亮光、李錦楓及徐爾烈，1988，蜂王乳在貯存過程中成份的變化，食品科學，15(1)：81-90。
2. 徐浩泰、曾耀銘及張慈蘭，1992，蜂王漿中癸烯酸成份高效液相層析分析標準化，大葉學報，1(1)：81-91。
3. 蘇新元及林惠虹，1996，蜂王漿 10-羥基-2-癸烯酸紫外光簡易測定法，食品科學，23(3)：463-467。
4. 竹中哲夫、八並一壽、越後多嘉志，1986，蜂王漿儲藏中品質變化，日本食品工業學會誌，33(1)：1-7。
5. Camilleri, P. , 1993, Capillary electrophoresis: Theory and Practice, CRC Press, Inc.
6. Shinoda, M. , 1982, Gas chromatographic determination of royal jelly content in various pharmaceutical preparation, Shoyakugaka zasshi, 36(4): 315-318
7. 邱紹盟，1992，溫度與光照對蜂王漿儲存安定性的影響，國立中興大學食品科學研究所碩士論文。
8. 陳秀瑩，1994，市售蜂王漿儲存安定及品質指標建立之研究，國立中興大學食品科學研究所碩士論文。
9. 李安玲、葉美吟、溫惠美、陳景川、林貞信及黃文瑛，1999，毛細管電泳在蜂王漿蛋白質分析上之應用，藥物食品分析，7(1)：73-82。

【作者簡歷】

陳景川：台灣省屏東縣．民國三十九年生

國立台灣大學農業化學系學士

美國南達克達州立大學化學碩士

美國康乃爾大學食品科技博士

●經歷／美國南達克達州立大學助教

康乃爾大學助教、私立東海大學食科系副教授

南區水產養殖檢驗中心創辦人

●現職／國立屏東科技大學食品科學系教授兼教務長

●專長／新產品研究開發

飼料配方設計

食品、飼料檢驗分析

微量元素分析、健康食品配製