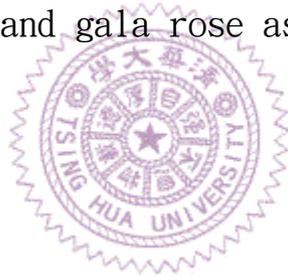


國立清華大學  
分子與細胞生物研究所  
碩士論文

保存花朵色澤、形態及 DNA 之新式浸液方法:以佳娜紅玫瑰為例

A new method for the preservation of fresh flowers:

Take the Grand gala rose as an example



姓名:林其昌(Lin, Chi-Chang)

學號:9680557

指導教授:李家維博士(Li, Chia-Wei, Ph.D.)

中華民國九十八年七月

## 誌謝

兩年的時間一眨眼便過去了，從當初剛進實驗室什麼都不懂，事事都要尋求他人的協助，到今天得以完成畢業論文，為研究生生活畫下完美的句點，一路走來要感謝的人太多了。首先要感謝家人尤其是父母給我生活上的支持與關心，使我得以無後顧之憂地進行研究，接著更要感謝李家維老師的指導並給予充分的資源與支持，我永遠不會忘記每當實驗不順時，老師從沒有一句責備，總是持續的相信我們鼓勵我們，帶給了我們繼續研究的動力與希望。

我也要感謝我的實驗夥伴洪子洵同學，因為和你一同合作，努力進行研究，才能有如今的成果，我永遠不會忘記過去兩人彼此互助合作進行研究，遇到難題時一同克服的情景。感謝吳欽翔學長，教我們許多實驗的方法並給予諸多建議及實際的幫助，要是沒有學長的協助，我們的畢業時間將遙遙無期。感謝康美華學姊，由於學姊負責管理實驗室的相關事務，我們才能輕鬆順利的進行研究。感謝劉士銜學弟，時常搭你的便車也常受你熱心的幫助，因為有你才免除了我們一些交通上的不便。感謝張毓倫學妹，因為有你實驗室的氣氛不再沉悶。感謝我未來的老婆樊瑜，幫忙我製作口試的投影片及聽我一次次的預口試，也感謝妳以非本科系不具相關背景的身分為我檢查論文寫作上的缺失。還有許多未一一列出，給我許多幫助的貴人，在此致上由衷的感謝之意。

最後祝福我身邊所有的家人、師長、學長姐及朋友們，都能心想事成、身體健康，生活上幸福快樂。

## Abstract

Anthocyanins, the main composition of colorful plants, are very unstable and susceptible to external environmental factors such as temperature, light, pH and other substances such as oxides. Consequently, there is no effective method for the long-term preservation of fresh flowers. In this study, Jia Na red rose (Grand Gala) with bright red color was used as an object of study. We make up the preservative solution for rose that can keep color fidelity for a long time. The color and shape of roses could be effectively maintained for at least six months. The change of anthocyanins amount in the flowers during the preservation was analyzed by the pH differential method. Electrophoresis and PCR were used to study the effect of preservation solution on the leaf DNA. The results revealed that the content of anthocyanins of flower petals immersed in the preservation solution declined with the increased preservation time, but the color looks unchanged with the naked eyes. There was no significant damage for DNA and gene in plant tissue. These results suggest that the preservation solution is effective for the long-term preservation of rose specimens and also has the potential in color preservation for other flower specimens.

## 摘要

花青素是造成植物的花多彩的主要原因，但花青素十分不穩定，且易受外在環境因素如溫度、光線、酸鹼度及氧化物等的影響而分解，因此關於花標本的保色，至今尚未有合宜的方法。本實驗以佳娜紅玫瑰(Grand gala)作為保色的研究對象。實驗中經過多方嘗試後，成功配製成可長久保真、保色的玫瑰花保存液，此保存液可有效將其顏色與外型至少保存半年以上。本實驗也進一步探討在保存液中葉片 DNA 的保存狀況及花瓣中花青素的含量是否隨保存時間延長而有所變化。利用改良式的酸鹼值差異法(pH differential method)定量花青素，並透過電泳和 PCR 分析選定的特定基因之保存情形。結果顯示保存液中浸泡的花瓣樣本，其花青素含量隨時間有些許下降，但其基本色澤維持不變，對植物葉片的 DNA 也無顯著破壞。結果驗證此保存液可作為玫瑰花標本有效長期保存的方式，也有進一步發展為保存其他花朵標本的潛力。

# 目次

目次.....	1
一、前言與研究動機.....	4
二、文獻探討.....	5
1. 玫瑰花簡介.....	5
(1) 佳娜紅玫瑰(Grand gala)簡介.....	5
(2) 玫瑰花之花青素.....	7
(3) 玫瑰相關研究.....	10
2. 花青素.....	12
(1) 花青素的化學研究與歷程.....	12
(2) 影響花青素穩定之因素.....	14
I. pH 值的影響.....	14
II. 共呈色效應(Copigmentation).....	14
III. 金屬離子的影響.....	16
IV. 光線的影響.....	18
V. 溶劑以及花青素濃度的影響.....	18
VI. 氧氣、溫度與抗壞血酸.....	18
VII. Pyranoanthocyanins.....	19
3. 植物標本保存的方法.....	21
(1) 保存葉子.....	22
(2) 保存花朵.....	22
4. 實驗目標.....	29
三、實驗方法.....	29
1. 實驗流程.....	29
2. 佳娜紅玫瑰浸液標本製作.....	30

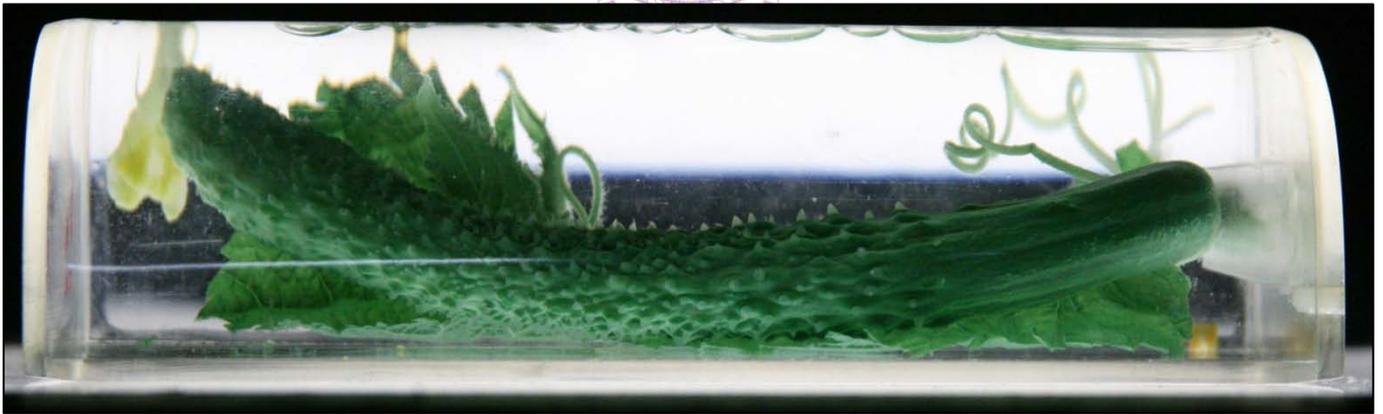
2.1 實驗材料.....	30
2.2 玫瑰保存液之配製.....	30
2.3 花朵樣本的製作方法.....	30
3. 花青素之萃取及鑑定.....	32
3.1 實驗材料.....	32
3.2 實驗方法.....	32
I. 花青素萃取.....	32
II. 花青素的定量.....	32
III. 花青素的鑑定.....	32
4. 佳娜紅玫瑰基因體(Genomic) DNA 萃取及保存.....	33
4.1 實驗材料.....	33
4.2 實驗方法.....	33
I. 玫瑰葉片 genomic DNA 萃取.....	33
II. 玫瑰葉片 genomic DNA 保存實驗.....	34
四、分析方法.....	36
1. 酸鹼值.....	36
2. 花青素含量.....	36
(1) 緩衝溶液.....	36
(2) 操作方法.....	36
3. DNA 保存情形.....	37
五、實驗結果.....	38
1. 佳娜紅玫瑰浸液標本外觀評比.....	38
2. 佳娜紅玫瑰花青素之分離純化及鑑定.....	41
3. 佳娜紅玫瑰浸於玫瑰保存液後花青素含量變化.....	45
4. 玫瑰保存液對佳娜紅玫瑰之 DNA 保存.....	47
I. 葉片內的 DNA.....	47

II. 葉片分離之 DNA(Isolated DNA).....	47
六、討論.....	54
1. 玫瑰保存液保色之可能原因.....	54
2. 酒石酸與硼酸.....	55
3. 色素含量的變化.....	57
4. 未來工作.....	57
七、結論.....	58
八、參考文獻.....	58



## 一、前言與研究動機：

自然界中的植物最吸引人的部分莫過於五顏六色的花朵，從古至今人們總希望能將花的形態與色彩永久保存。諸多植物保存的方式中，最常見的是將植物製作成蠟葉標本，但此保存方式會令花朵的外形改變，並且標本完成後也會使花朵變色，無法將外形與色澤長久保存。此為保存花朵及製作標本時常遇到的難題。在一次偶然的情況下，本篇研究者有幸見到大陸旅順園藝試驗場製作的保鮮工藝品(圖一)，是由一個壓克力材質的小容器內部裝著一條小黃瓜，瓜的尖端開著一朵黃花，並浸泡於特殊的保存液，神奇的是，小黃瓜在保存液中維持了一年以上未變色及腐敗，就引起本篇研究者研究這類植物工藝品的興致。後面章節並比較此保存方法與本實驗方法之優缺。由於大陸的保鮮工藝品，無法將含有花青素的花朵長期保色，因此本實驗選定佳娜紅玫瑰為實驗對象，原因是這種玫瑰花色為紅色，富含花青素，希望能將這樣富含花青素的花朵之顏色長期保存。



圖一、旅順園藝試驗場之保鮮工藝品

## 二、文獻探討

### 1. 玫瑰花簡介:

玫瑰在分類上屬於薔薇科(*Rosaceae*)、薔薇屬(*Rosa*)，學名為 *Rosa rugosa*。葉片為橢圓形成羽狀排列，綠色，枝條有刺。玫瑰(Rose)這個名詞有許多意義，它的名字好聽、花朵芬芳、是好禮物及節慶裝飾(Heinz-Mohr et al., 1988)。玫瑰在歷史、建築、紋章、繪畫及文學都是重要的元素(Wheldon et al., 1984)。

目前各式的玫瑰都是從野生種演進改良而來，透過選擇性突變以及雜交，慢慢產生出大量不同的玫瑰品種，A. Jaeger 最早在其著作裡描述了 15000 種不同的品種(Jaeger, 1936)，之後不斷有學者提出新的品種(McFarland, 1980)，專家估計，至今的品種已高達五萬多種，且仍不斷交配孕育新品種中。

#### (1) 佳娜紅玫瑰(Grand gala)簡介:

本實驗所用的玫瑰為佳娜紅(Grand gala)玫瑰(圖二)，是一種市面上常見的紅玫瑰，分類上屬於矮灌木叢(Bush)玫瑰，由法國人於 1954 年培育出，花色為紅色，花形則是劍瓣高心，帶有中等的香味，主要於切花使用。

(<http://163.23.24.240/Rose/>)



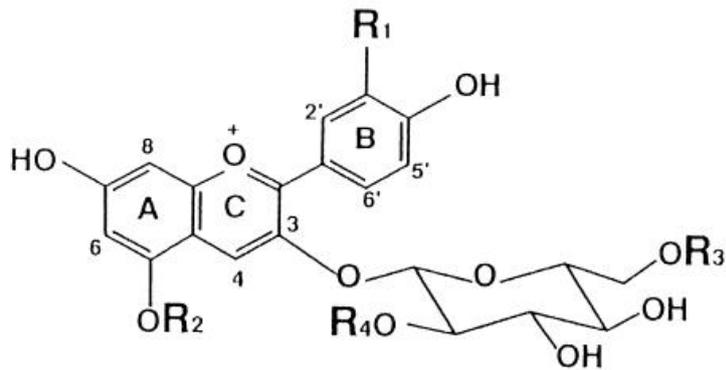
圖二、佳娜紅玫瑰



## (2) 玫瑰花之花青素:

花青素(Anthocyanins)是玫瑰呈色的主要原因，雖然玫瑰中其它的成份如胡蘿蔔素(carotenoid)也影響黃色澤的變化，但花青素仍是造成顏色多變最重要的成份(圖三)。主要原因是相對於胡蘿蔔素等，花青素在可見光譜中的光的吸收占大部份的比例(Conrad et al.,1991)。玫瑰花的花青素研究始於1915年，學者從乾燥的玫瑰花中分離出花青素(cyanin)(Willstatter et al., 1915)。之後天竺葵色素苷(pelargonin)也從一種深橘紅色品種的玫瑰中首度分離出來(Scott-Moncrieff,1936)。

有關玫瑰花青素的結構方面，Mikangi 對常見的現代庭園玫瑰詳細的介紹，文中針對五十二種玫瑰進行花青素的組成分析，利用高效液相層析技術(HPLC)的分析方式，發現十一種成分，以Cyanidin-3, 5-diglucoside 占最大宗。表一顯示，在五十二個品種的玫瑰中，Cyanidin-3, 5-diglucoside 是含量最多的玫瑰花青素，其次則為Peonidin-3, 5-diglucoside，雖然相關研究指出Cy-3-glucoside 是自然界中最豐富的花青素(Lee et al.,2005)，但在Mikangi 的著作中，Cyanidin-3-glucoside 在玫瑰花青素裡只占第三位。此外Mikangi 也首度在其他種類的玫瑰中發現四種不同的花青素，分別為Cyanidin-3-rutinoside、Peonidin-3-rutinoside、Peonidin-3- $\rho$ -coumaroylglucoside -5-glucoside 以及Cyanidin-3-sophoroside，這四種花青素主要的差異為連接的醣基，以往玫瑰花青素鍵結的醣基主要是3, 5-diglucoside 以及3-glucoside，但這四種花青素的醣基卻不是3, 5-diglucoside 以及3-glucoside。



*Rosa* anthocyanins

- 1 pelargonidin 3-glucoside,  $R_{1,2,3,4} = H$   
 2 cyanidin 3-glucoside,  $R_{2,3,4} = H$ ,  $R_1 = OH$   
 3 peonidin 3-glucoside,  $R_{2,3,4} = H$ ,  $R_1 = OCH_3$   
 4 pelargonidin 3,5-diglucoside,  $R_{1,3,4} = H$ ,  $R_2 = \text{glucosyl}$   
 5 cyanidin 3,5-diglucoside,  $R_{3,4} = H$ ,  $R_1 = OH$ ,  $R_2 = \text{glucosyl}$   
 6 peonidin 3,5-diglucoside,  $R_{3,4} = H$ ,  $R_1 = OCH_3$ ,  $R_2 = \text{glucosyl}$   
 (Additional *Rosa* anthocyanins)  
 7 cyanidin 3-rutinoside,  $R_{2,4} = H$ ,  $R_1 = OH$ ,  $R_3 = \text{rhamnosyl}$   
 8 peonidin 3-rutinoside,  $R_{2,4} = H$ ,  $R_1 = OCH_3$ ,  $R_3 = \text{rhamnosyl}$   
 9 cyanidin 3-sophoroside,  $R_{2,3} = H$ ,  $R_1 = OH$ ,  $R_4 = \text{glucosyl}$   
 10 cyanidin 3- $\rho$ -coumarylglucoside-5-glucoside,  $R_4 = H$ ,  $R_1 = OH$ ,  $R_2 = \text{glucosyl}$ ,  $R_3 = \rho\text{-coumaryl}$   
 11 peonidin 3- $\rho$ -coumarylglucoside-5-glucoside,  $R_4 = H$ ,  $R_1 = OCH_3$ ,  $R_2 = \text{glucosyl}$ ,  $R_3 = \rho\text{-coumaryl}$

圖三、玫瑰花花青素結構(Mikanagi, 2000)

表一、不同品種玫瑰之花青素組成 (Mikanagi, 2000)

Anthocyanin distribution in flowers of genus *Rosa*

Pigment No. 5	Anthocyanins (as %) <sup>a</sup>															
	5	9	7	2	10	6	x	8	3	11	4	1	UK1	UK2		
	Rt. (min)	33.1	35.0	39.6	37.4	49.2	56.0	37.8	41.2	44.6	43.5	54.0	60.9	35.4	41.8	55.0
Species, varieties and cultivars	Cy					Pn						Pg				
	3,5-diglu	3-sop	3-rut	3-glu	3,5-diglu-ρC	3,5-diglu	3-sop?	3-rut	3-glu	3,5-diglu-ρC	3,5-diglu	3-glu	?	?		
					cis	trans				cis	trans					
Section <i>Cinnamomeae</i> (= section <i>Rosa</i> )																
<i>Rosa acicularis</i> (R01)	26	0	1	0	+	1	44	+	9	0	1	5	0	0	2	8
<i>Rosa arkansana</i> (R02)	61	+	0	0	+	1	32	+	0	0	1	3	0	0	0	0
<i>Rosa bella</i> (R03)	80	+	3	1	+	1	8	0	+	0	+	+	0	0	3	1
<i>Rosa cinnamomea</i> (R04)	33	+	0	0	+	+	62	+	0	0	1	2	0	0	0	0
<i>Rosa forrestiana</i> (R05)	97	+	+	+	+	1	0	+	+	+	0	0	0	0	0	0
<i>Rosa marretii</i> (R06)	98	+	0	+	0	0	0	0	0	0	+	1	0	0	0	0
<i>Rosa moyesii</i> (R07)	50	17	+	28	+	2	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Rosa moyesii</i> cv. Arthur Hillier (R08)	38	4	1	7	+	2	23	+	2	4	+	2	0	0	3	8
<i>Rosa moyesii</i> cv. Eddie's Crimson (R09)	57	+	0	+	+	2	34	0	+	+	1	4	0	0	0	0
<i>Rosa moyesii</i> cv. Fargesii (R10)	23	16	+	13	+	+	34	1	+	4	+	2	0	0	0	0
<i>Rosa moyesii</i> cv. Geranium (R11)	45	6	+	35	+	+	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Rosa moyesii</i> cv. Highdownensis (R12)	41	2	0	1	+	1	49	0	+	1	1	4	0	0	0	0
<i>Rosa moyesii</i> cv. Hillieri (R13)	74	6	+	9	1	4	0	+	+	+	0	0	0	0	0	0
<i>Rosa nipponensis</i> (R14)	94	+	+	1	+	+	1	1	+	0	0	0	0	0	0	0
<i>Rosa nutkana</i> (R15)	30	+	1	0	+	+	24	0	6	+	+	1	0	0	4	30
<i>Rosa pendulina</i> var. oxyodon (R16)	95	+	+	+	+	2	+	0	+	+	0	0	0	0	0	0
<i>Rosa rugosa</i> (R17)	32	1	+	1	+	+	63	+	+	+	+	+	0	0	0	0
<i>Rosa rugosa</i> var. plena (R18)	35	2	0	1	+	+	60	+	+	1	+	1	0	0	0	0
<i>Rosa rugosa</i> cv. Maikwai (R19)	39	+	0	1	+	+	53	0	+	+	+	3	0	0	0	0
<i>Rosa rugosa</i> cv. Roseraie del'Hay (R20)	16	0	+	0	+	+	76	+	+	1	+	2	0	0	0	0
<i>Rosa rugosa</i> cv. Salmon Pink (R21)	+	8	2	24	0	0	0	+	1	61	0	0	0	0	0	0
<i>Rosa rugosa</i> cv. Scabrosa (R22)	26	+	0	0	+	+	70	0	+	+	+	0	0	0	0	0
<i>Rosa rugosa</i> cv. Scarlet (R23)	79	+	0	0	+	1	17	0	+	+	+	+	0	0	0	0
<i>Rosa sweginzowii</i> (R24)	74	+	0	0	1	6	14	0	0	0	+	2	0	0	0	0
<i>Rosa willmottiae</i> (R25)	47	+	0	0	+	2	39	0	+	1	1	6	0	0	0	0
<i>Rosa</i> × <i>iwara</i> (R26)	52	+	0	+	+	+	46	0	0	+	+	1	0	0	0	0
Section <i>Chinenses</i>																
<i>Rosa chinensis</i> Jacq.	85	0	+	13	+	1	0	0	+	+	0	0	0	0	0	0
<i>Rosa chinensis</i> var. minima	87	0	+	11	+	+	0	0	+	+	0	0	0	0	0	0
<i>Rosa chinensis</i> var. spontanea	28	0	2	56	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>Rosa chinensis</i> cv. Fabvier	82	0	+	10	+	5	2	0	+	+	0	0	0	0	0	0
<i>Rosa chinensis</i> cv. Miss Lowe	43	+	1	53	+	+	0	0	+	+	0	0	0	0	0	0
<i>Rosa chinensis</i> cv. Mutabilis	23	0	+	73	0	0	0	0	+	2	0	+	0	0	0	0
<i>Rosa chinensis</i> cv. Pomponde de Paris	71	0	0	27	+	+	+	0	+	+	0	0	0	0	0	0
<i>Rosa chinensis</i> cv. Slater's Crim China	58	0	+	33	+	4	0	+	+	1	+	+	0	0	0	0
Section <i>Gallicanae</i>																
<i>Rosa gallica</i>	92	0	0	6	+	1	0	0	+	+	0	0	0	0	0	0
<i>Rosa gallica</i> cv. Cardinal de Richelieu	97	+	0	1	+	1	+	0	0	+	0	0	0	0	0	0
<i>Rosa gallica</i> cv. Rosa Mundi	98	+	0	+	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Rosa gallica</i> cv. Shigyoku	98	+	0	+	+	1	+	0	+	+	0	0	0	0	0	0
<i>Rosa gallica</i> cv. Violacea	96	+	0	+	+	2	+	0	+	+	0	0	0	0	0	0
<i>Rosa</i> × <i>centifolia</i> cv. Bullata	98	1	0	+	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0
<i>Rosa</i> × <i>centifolia</i> cv. Muscosa	96	1	0	1	+	2	+	0	+	+	0	0	0	0	0	0
<i>Rosa</i> × <i>damascena</i>	97	1	0	1	+	1	0	0	+	+	0	0	0	0	0	0
<i>Rosa</i> × <i>damascena</i> cv. Bifera	97	+	0	1	+	+	0	0	+	+	0	0	0	0	0	0
<i>Rosa</i> × <i>damascena</i> cv. Gloire de Guilan	97	1	0	1	+	1	0	0	+	+	0	0	0	0	0	0
Modern garden roses																
<i>Rosa</i> cv. La France	98	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
<i>Rosa</i> cv. Ole	69	0	+	3	+	+	+	0	+	+	0	0	22	2	0	0
<i>Rosa</i> cv. Papa Meilland	94	0	0	1	+	+	1	0	+	+	0	0	1	0	0	0
<i>Rosa</i> cv. Seika	96	0	0	3	0	+	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0
<i>Rosa</i> cv. Frensham	85	0	+	+	+	8	3	0	+	+	0	+	0	+	+	+
<i>Rosa</i> cv. Orange Bunny	37	0	0	+	0	+	0	0	+	0	0	0	58	3	0	0
<i>Rosa</i> cv. Red Meillandina	73	0	+	1	1	5	13	0	+	+	+	2	2	+	+	+
<i>Rosa</i> cv. The Fairy	95	0	0	+	+	3	0	0	+	0	0	0	1	0	0	0

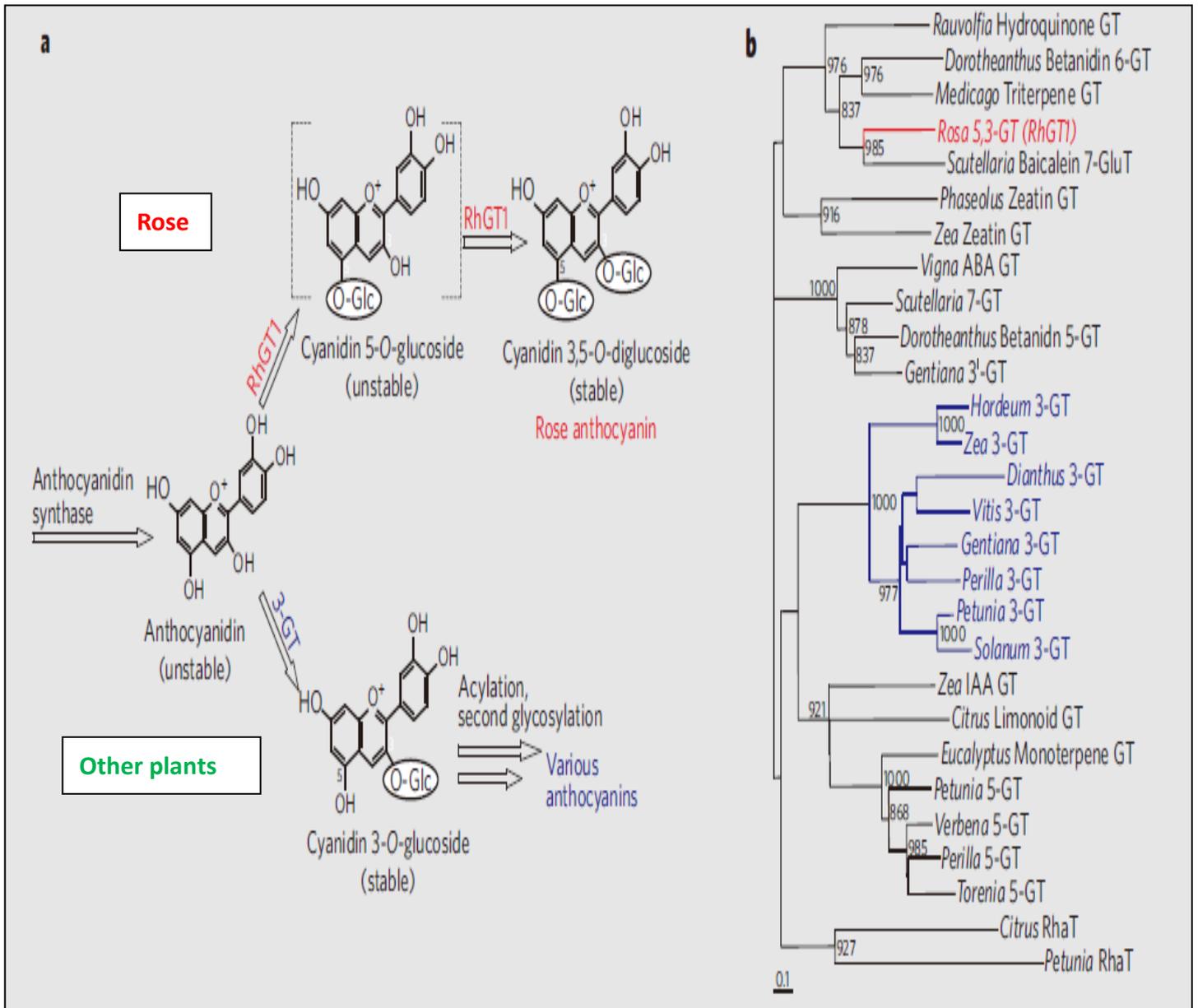
<sup>a</sup>Percent of total absorbance of all detected anthocyanins at 530 nm by HPLC analysis. value < 0.1 = 0, 0.1 < value < 0.5 = +, 0.5 < value < 1.5 = 1. Rts of '+' pigments are identical to each pigments, but chemical structures are not yet confirmed.

### (3)玫瑰相關研究:

玫瑰花含有多種類黃酮(flavonoid)成份，和類胡蘿蔔素(carotenoid)一同大量存在時才會光吸收，而產生青銅般的顏色(Wiermann et al.,1981)。最近的研究指出玫瑰的花青素合成路徑和一般的植物不同，在 cyanidin 三號碳及五號碳位置添加醣基以合成 Cyanidin-3, 5-diglucoside 的過程中，玫瑰僅需單一種酵素就可完成，與其他植物使用不同的酵素兩階段達成的方式不同(圖四)，後續的研究也分離出這種醣化酵素進行研究(Ogata et al.,2005)。

玫瑰除了具有觀賞價值，其萃取物也有許多用途，如可製成香水及精油等，Plamen 等人也發現玫瑰花瓣萃取出的多酚類(polyphenolics)可穩定草莓飲料的顏色，增加飲料中花青素對熱的耐受性，此現象或許也可增加玫瑰萃取物在食品工業方面的應用(Plamen,2007)。

本實驗選用的玫瑰品種，佳娜紅玫瑰(Grand gala)十分常見，有學者便以佳娜紅為實驗材料研究玫瑰類植物經人為修剪枝葉後的生理反應。他們發現修剪枝葉後會使光合作用更加旺盛，或許可應用於控制花朵栽培的產量(Calatayud,2008)。其它研究方面，學者也為玫瑰花苞的開放以及衰老時期中的生理現象，進行一系列的整理，並列出許多因素，包含激素的調控、水的關係、碳水化合物的代謝、細胞壁的代謝及抗氧化防衛機制等等，討論這兩種極端的生理現象(Kumar,2008)。



圖四、玫瑰花青素糖基化過程(Ogata et al., 2005)

## 2. 花青素:

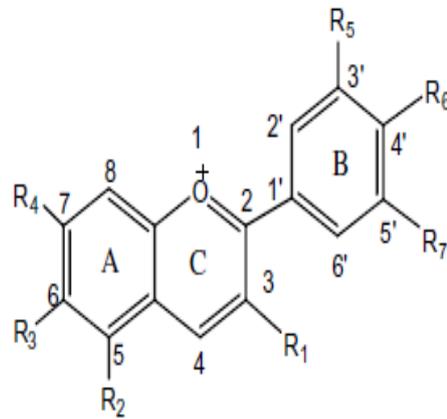
花青素是維管束植物中最重要色素之一，可令花朵及水果呈現紅色、粉紅色、紫色、藍色、橘色等顏色，對動物的健康無害且易溶於水溶液中，使其可廣泛應用於水溶性的食品色素添加劑(Pazmino-Duran,2001)。近來花青素最引人關注的是它抗氧化的能力，這項功能可能在神經、心血管疾病及糖尿病的預防方面扮演重要的角色(Konczak et al.,2004)。也有許多研究針對花青素在腫瘤治療(Lule et al.,2005; Nichenametla et al.,2006)、營養添加(Stintzing et al.,2004)及其生物活性(Kong et al.,2003)等。

### (1)花青素的化學研究與歷程:

花青素是構成花青素苷(anthocyanin)的基本結構，花青素苷由一個苯環{A}和另一個包含氧原子的異質環{C}鍵結，最後再經由兩個碳原子鍵結第三個苯環{B}而構成的基本構型(表二)(Konczak et al.,2004)，當花青素呈現加有醣基的型式時，即稱之花青素苷。花青素屬於類黃酮類(flavonoids)化合物，另一類類黃酮如苯基苯乙烯酮(chalcones)和橙酮(aurones)常促成某些花呈黃色，而其他黃酮(flavones)則使花瓣呈現白色，若缺乏此類色素則呈透明狀。

不同種花青素主要的區別為B環上羥基化(hydroxylation)或甲氧基化(methylation)之形式，通常決定花青素的顏色，羥基化會增加色素的藍色傾向，甲氧基化則會造成紅色。這些色素成色的原因於1939年首度由Pauling提出可能的解釋，他提出共振的結構或許是造成顏色的原因(Wrolstad et al.,2005)，2006年時已經發現超過五百種的花青素(Andersen et al., 2006)且持續更新中。表二所列的二十三種花青素中以其中的六種cyanidin、delphinidin、malvidin、pelargonidin、peonidin、petunidin為最常見(Clifford, 2000)，這六種中的其中三種未甲基化的色素cyanidin、delphinidin、Pelargonidin是自然界中最常見的，存在80%的葉子色素中、69%水果色素中及50%花朵色素中(Harborne et al., 1993)。

表二、花青素的基本構型及常見的花青素(Castaneda-Ovando et al., 2009)



General anthocyanins structure

Name	Abbreviations	Substitution pattern							Colour
		R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>	R <sub>7</sub>	
Apigeninidin	Ap	H	OH	H	OH	H	OH	H	
Arrabidin	Ab	H	H	OH	OH	H	OH	OMe	N.R. <sup>a</sup>
Aurantidin	Au	OH	OH	OH	OH	H	OH	H	
Capensinidin	Cp	OH	OMe	H	OH	OMe	OH	OMe	Blue-red
Carajurin	Cj	H	H	OH	OH	H	Ome	OMe	N.R. <sup>a</sup>
Cyanidin	Cy	OH	OH	H	OH	OH	OH	H	Orange-red
Delphinidin	Dp	OH	OH	H	OH	OH	OH	OH	Blue-red
Europinidin	Eu	OH	OMe	H	OH	OMe	OH	OH	Blue-red
Hirsutidin	Hs	OH	OH	H	OMe	OMe	OH	OMe	Blue-red
3'-HydroxyAb	3'OHAb	H	H	OH	OH	OH	OH	OMe	N.R. <sup>a</sup>
6-HydroxyCy	6OHCy	OH	OH	OH	OH	OH	OH	OH	Red
6-HydroxyDp	6OHDp	OH	OH	OH	OH	OH	OH	OH	Blue-red
6-HydroxyPg	6OHpg	OH	OH	OH	OH	H	OH	H	N.R. <sup>a</sup>
Luteolin	Lt	H	OH	H	OH	OH	OH	H	
Malvidin	Mv	OH	OH	H	OH	OMe	OH	OMe	Blue-red
5-MethylCy	5-MCy	OH	OMe	H	OH	OH	OH	H	Orange-red
Pelargonidin	Pg	OH	OH	H	OH	H	OH	H	
Peonidin	Pn	OH	OH	H	OH	OMe	OH	H	Orange-red
Petunidin	Pt	OH	OH	H	OH	OMe	OH	OH	Blue-red
Pulchellidin	Pl	OH	OMe	H	OH	OH	OH	OH	Blue-red
Riccionidin A	RiA	OH	H	OH	OH	H	OH	H	N.R. <sup>a</sup>
Rosinidin	Rs	OH	OH	H	OMe	OMe	OH	H	Red
Tricetinidin	Tr	H	OH	H	OH	OH	OH	OH	Red

<sup>a</sup> N.R: not reported.

## (2)影響花青素穩定之因素:

從植物組織分離出的花青素非常不穩定且容易分解(Giusti et al., 2003)，它們的穩定性受許多因子影響，包含 pH、儲存溫度、化學結構、濃度、光線、氧氣、溶劑、酵素的存在及金屬離子等等。由於花青素一些可能對健康的促進或取代人工合成的色素等優點，其化學結構方面的研究，是近來相關研究的重點(Rein,2005)。

### I. pH 值的影響:

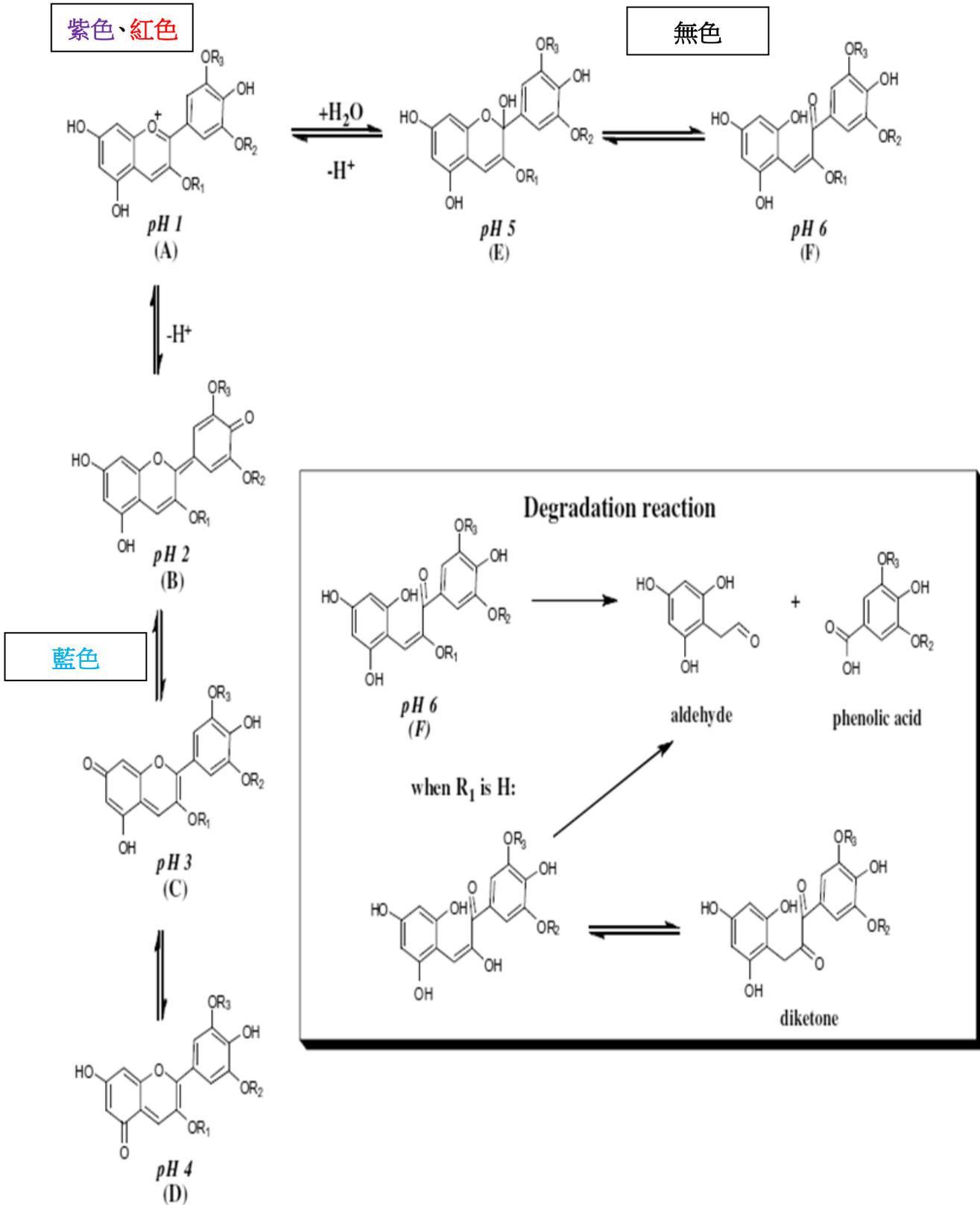
花青素在不同的酸鹼環境下，會產生不同的化學結構(圖五) (Horton et al., 1998; Fleschhut et al.,2006; Heredia, Francia-Aricha et al.,1998; Kennedy et al.,2000)，在 pH1 的酸性環境時，呈現紅色的 flavylum cation 狀態，導致花朵呈紫色或紅色的顏色，而在 pH2 跟 pH4 之間時，呈藍色的 quinoidal 狀態，pH5 跟 pH6 之間時，只能看到兩種無色的物質，carbinol pseudobase 以及 chalcone，pH 高於 7 時，花青素會開始進行分解的作用。因此研究花青素顏色的變化與 pH 值的關係時，可發現花青素在鹼性環境下顏色的變化十分明顯，因為此時花青素是處於十分不穩定且易分解的狀態(Cabrita et al.,2000)。

### II. 共呈色效應(Copigmentation):

共呈色效應是指花青素和其他無色的有機物質或金屬離子結合，形成複合的分子之現象(Boulton,2001)

$\text{Anthocyanins} + \text{Co-pigments} = \text{Copolymerized anthocyanins}$

，這類分子在植物體中呈現不同的顏色，學者指出，色素和其他物質產生共呈色作用是植物顏色得以穩定的主要機制(Davies et al., 1993; Mazza et al.,1990)。和花青素形成共呈色作用的物質通稱為 Co-pigments，一般都是無色的，可以是類黃酮(flavonoids)、生物鹼(alkaloids)、胺基酸、有機酸、核酸、多醣類、金屬甚至其他花青素。當它們和花青素產生共呈色作用，可使花青素產生增色作用、



圖五、花青素在不同 pH 值產生的化學結構變化(Castaneda-Ovando et al.,2009)

R1=H or saccharide

R2 and R3=H or Methyl

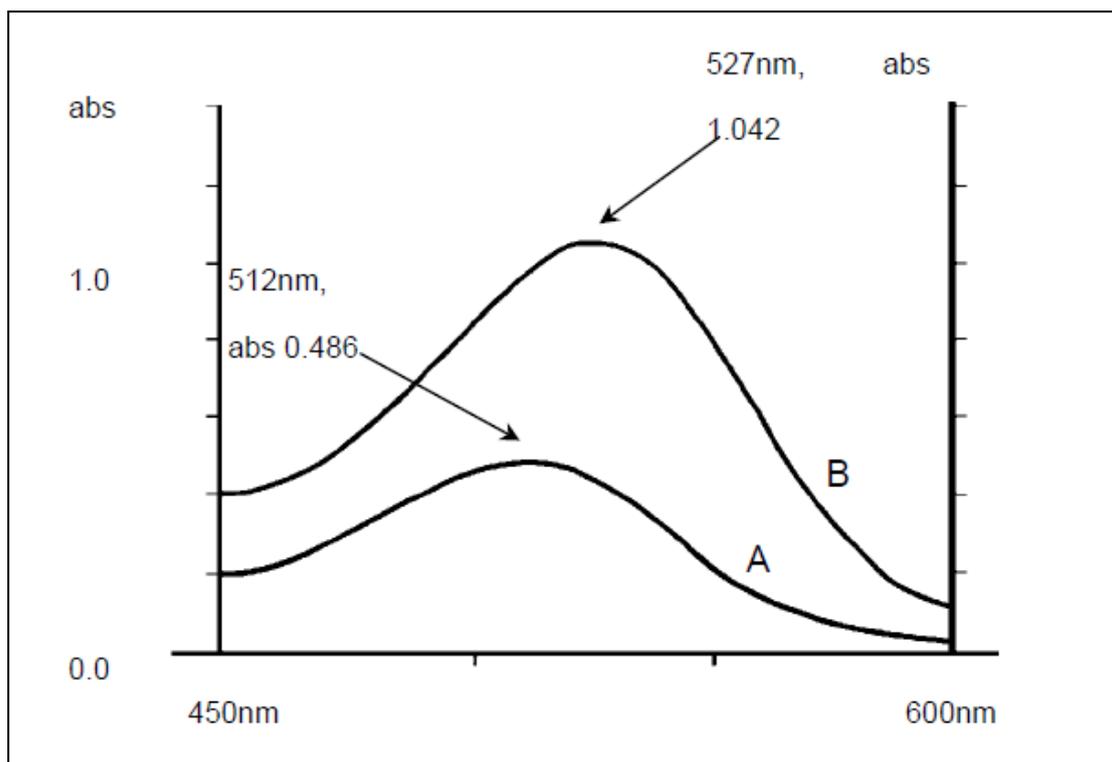
顏色加深，及增加花青素在可見光區的最大吸光值(圖六)。

共呈色效應有不同的產生方式，最重要的幾種為分子間(intermolecular)以及分子內(intramolecular)複合形成、同分子自我結合(self-association)以及金屬複合(metal complexation)形成，圖七為簡單的示意圖(Rein, 2005)。共呈色效應也受幾個因素影響，包含 pH、溫度、濃度、溶劑及分子結構，根據 Asen(1976)的研究指出，花青素的濃度需要高於  $3.5 \times 10^{-5} \text{ M}$  才可能產生共呈色效應，Co-pigments 的濃度也是重要的。舉一個生活中共呈色效應的例子，在葡萄酒尤其是紅酒中，可以看到由花青素造成鮮豔的紅色，這些花青素理應是不穩定且易分解的，研究顯示造成葡萄酒中的花青素能長久保存最主要的因素，是來自於花青素與 Co-pigments 產生共呈色作用所致(Boulton,2001; Darias-Martin et al.,2002; Gutierrez,2003; Boselli et al.,2004)。

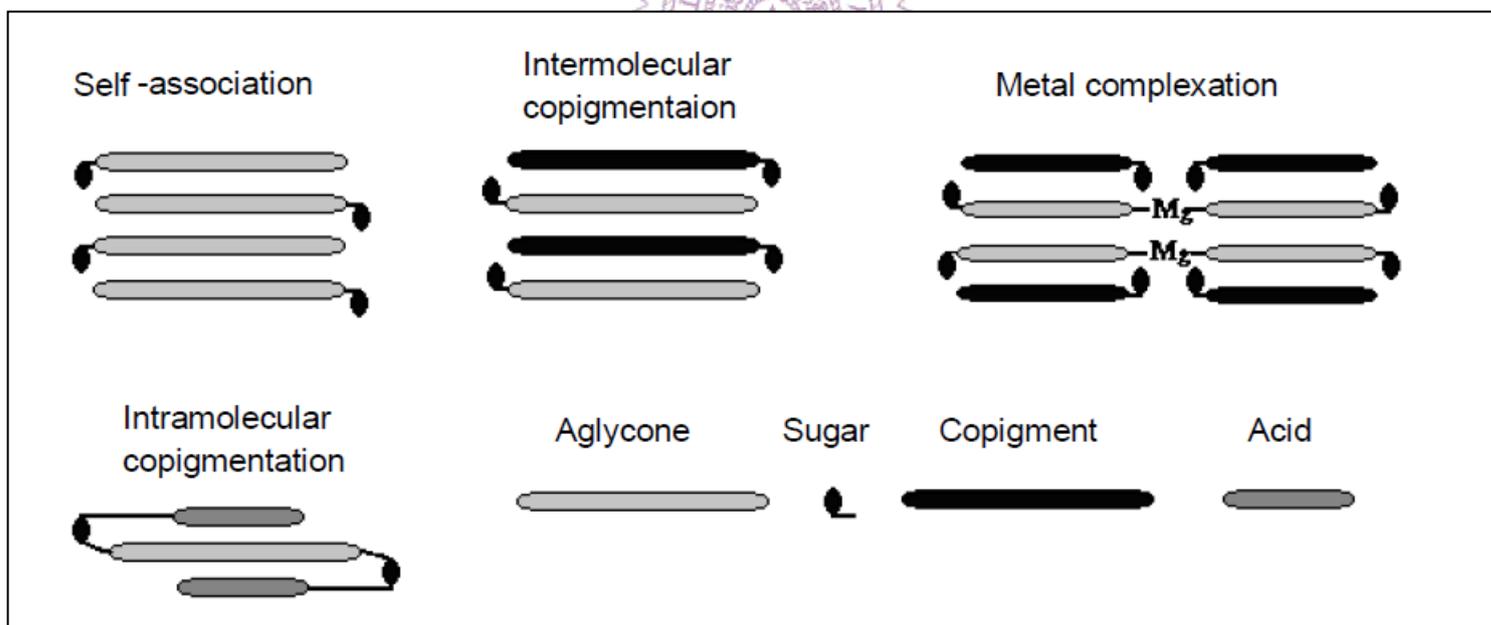


### III. 金屬離子的影響：

對於造成花顏色多變的原因，最初是認為是因flavylium salts(花青素的一種型式)與金屬離子螯合造成(Clifford,2000)，雖然後來發現主要的原因並非如此，但金屬離子的確顯著影響顏色的呈現。研究指出，某些植物顏色的穩定性，如藍色，是由於花青素和一些金屬離子如  $\text{Al}^{3+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Sn}^{2+}$  (Starr & Francis,1973) 或者  $\text{Mg}^{2+}$  以及  $\text{Mo}^{2+}$  結合造成的(Hale et al.,2001)。最近的研究並指出在 pH5 的環境下，O-di-hydroxyl anthocyanins 與  $\text{Fe}^{3+}$  或  $\text{Mg}^{2+}$  結合是造成植物產生藍色所需(Yoshida et al., 2006)。其它如上所述，金屬離子也常扮演 Co-pigments 的功能，可與花青素產生共呈色作用，進而穩定花青素的結構。



圖六、共呈色效應產生的增色作用。(A)Cyanidin 3-glucoside, (B)Cyanidin 3-glucoside + co-pigments (Rein, 2005)



圖七、共呈色效應示意圖(Rein, 2005)

#### IV. 光線的影響:

光線是合成花青素不可或缺的要素，但花青素自植物組織內萃取出來後，光線反而會對花青素造成破壞(Markakis, 1982)。有學者發現花青素在 pH2.3 且室溫的環境下，分別放置於黑暗與室內不避光的環境下，二十四小時後發現黑暗的環境對花青素的保存較佳(Kearsley et al.,1981)。Delgado-Vargas 等人也指出，當花青素置於光照下會使其十分不穩定，主要是因為其 C-5 位置對光線敏感，容易受光照影響而破壞。

#### V. 溶劑以及花青素濃度的影響:

關於溶劑及花青素的含量所造成顏色變化的現象，最早有學者以人工合成的花青素實驗，發現在充滿質子的溶劑中花青素呈現紅色，而在無質子的溶劑中花青素呈現黃色。當增加花青素的濃度時，較偏好呈現紅色的情形(Fujii et al.,2002)，後來被發現主要是由於水和這些花青素分子中的電子共斥與傳遞，造成花青素構型的改變，進而產生顏色的變化，所以水也與花青素的穩定與否有關。

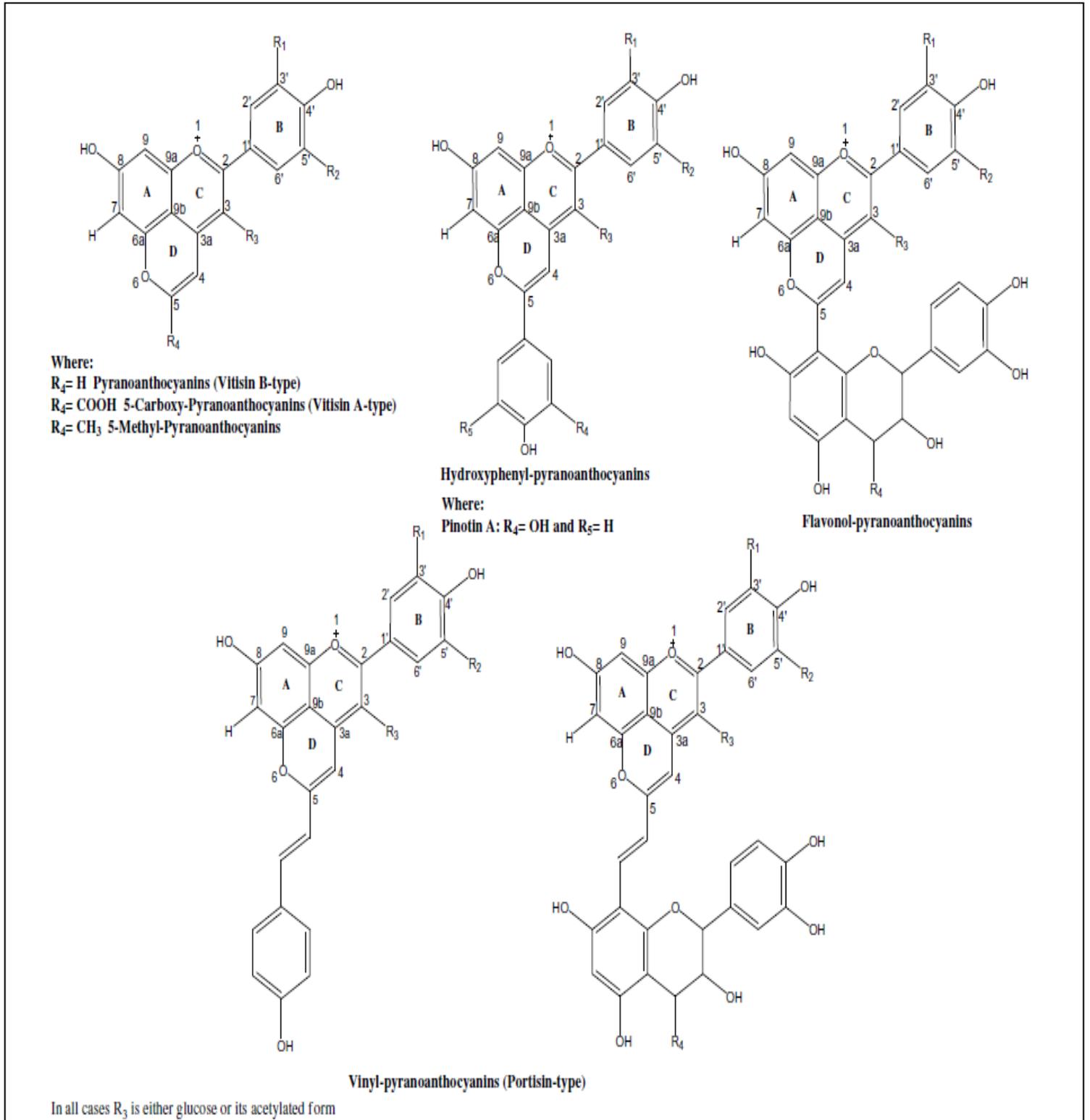
#### VI 氧氣、溫度與抗壞血酸:

氧氣也會造成花青素的破壞，學者發現當氧氣存在並提高溫度時，會使得果汁分離出的花青素加速分解(Nebesky et al., 1949)，當氧氣加上抗壞血酸，同樣會加劇花青素的分解。也有學者提出氧氣造成花青素的分解受 pH 影響，較高的 pH 會使更多的花青素在氧氣存在下被分解(Markakis, 1982)。花青素也會與含氧自由基作用，當花青素和這些物質作用時，扮演抗氧化劑的角色，這項特色也使得花青素被認為有益健康(Matsufuji et al.,2003; Garcia-Alonso et al.,2004; Rossetto et al.,2004)。

## VII. Pyranoanthocyanins:

Pyranoanthocyanins於1996年首度於紅酒過濾液中發現(Santos et al., 1996), 這些分子由於比一般的花青素在不同pH環境更穩定, 近十年左右也引起學者的注意。它們的形成是由花青素與低分子量的分子如4-vinylphenol、pyruvic acid、以及flavonols反應產生。由於這些Pyranoanthocyanins時常在酒中發現, 所以也有人提出它們的存在, 可能也是紅酒能長期保存鮮豔顏色的原因。圖八列出幾種常見的Pyranoanthocyanins。相關的研究由Schwarz等人提出, Pyranoanthocyanins存在的濃度與幾個因子有關, pyruvic acid、acetaldehyde、花青素濃度、pH及溫度(Schwarz et al.,2003)。有些Pyranoanthocyanins也在其它果汁中發現, 尤其是深橘紅色的果汁中, 如紅蘿蔔汁(Schwarz et al.,2004)、深紅顏色的橘子汁及紅酒, 雖然它們產生的結構有些不同, 但也可發現到 Pyranoanthocyanins的存在(Hillebrand et al.,2004)。





圖八、常見的主要 Pyranoanthocyanins 之化學結構(Rein, 2005)

### 3. 植物標本保存的方法：

為了將植物的顏色與形態長久保存，目前有許多種植物標本的製作方法，如利用溫度上升將植物乾燥的乾製法(藍,2007;Massey,1974)、將植物浸泡於保存液的浸液法(王, 1998;劉,1994;Romero-sierra et al.,2004)、及冷凍乾燥法(王,1995;Strausser, 1982;Chen,2000)。表三所列的幾種常見的方法都各有優缺，要完美的將植物的外形與顏色同時保存似乎為不可能的任務，以下介紹幾種花朵及葉子保存的方法。

表三、常見的植物標本製作方法與比較

保存方法	原理	優點	缺點
蠟葉法	將葉片夾於報紙中，以重物壓平	製作方便	變形、變色
浸液法	將植物浸泡於保存液中	保持外形	變色
冷凍乾燥	以冷凍乾燥的方法將植物組織的水分去除	維持某些植物組織的顏色(綠色)	變形、變色及成本過高
銅離子取代	以銅離子取代葉綠素中的鎂離子	使葉片保持綠色	只能保存葉子，綠色較明亮 與原本有些許差異
插枝吸收營養	提供植物所需的養分及金屬離子	延長保存時間	最終仍會變色及枯萎

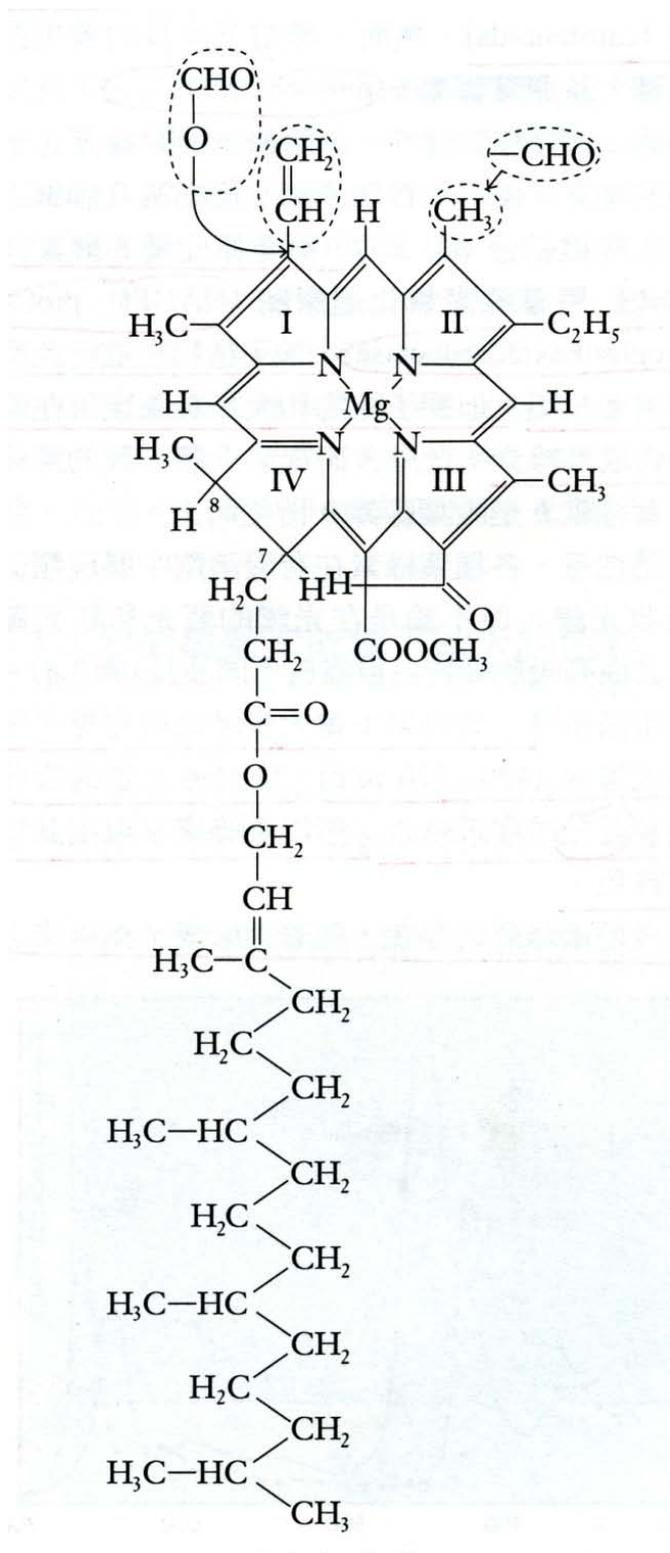
### (1)保存葉子:

葉子之綠色最主要的來源為葉綠素，為一種有機分子由兩部分組成；吡咯紫質(porphyrin)組成頭部，以長煙或稱為葉綠醇(phytol)構成尾部(圖九)。吡咯紫質中心含鎂離子，在酸性環境時，鎂容易自吡咯紫質中心釋放，造成綠色褪色成褐色。失去鎂的葉綠素稱為植物黑素(黃,2006)，植物生理學的實驗提到，將葉綠素萃取出來之後，在酸性的情況下，加入醋酸銅結晶，再用水浴微微加熱，可觀察到溶液的顏色由褐色轉變成鮮亮的綠色。表示銅離子取代鎂在葉綠素中的位置，使葉綠素恢復綠色，且這種含銅葉綠素也變得更加穩定不易被破壞(植物生理學實驗 1994)。經由銅離子取代的原理，許多研究者提出類似的保存葉子方法(郭,2005;黃,2006;湯,2007)，但這類保存方法雖然可使綠色長久維持，但其綠色卻和原本的綠色不同，新形成的綠色較明亮，且這項技術並不穩定，我們曾依上述方法測試幾種常見的葉子，發現並非任何葉子都可以自酸性加熱的環境中恢復成綠色。(圖十、圖十一)

### (2)保存花朵:

花朵的保存時間往往不長，於是許多研究者便希望能延長保存的時間甚至將花朵的外形與顏色永久保存。

花朵的顏色主要是由花青素造成，但花青素受許多因素影響十分不容易保存，截至目前為止相當多的專利與花朵的保存有關，包括:利用冷凍乾燥技術(Wenxue,2002)、浸漬法(WO 99/55152)、插枝吸收營養(US Patent 5627132)及染色的方式，但並無保存方法可將植物之外形與顏色長久保存且維持原先的自然狀態。以插枝吸收營養法處理之植物最終仍會枯萎(圖十二、圖十三)，浸液法處理的植物多會褪色或變色(圖十四)，如將鮮花浸泡在配方為醇類加入有機酸及幾種金屬離子之保存液，溶解完畢後為使保存液的反應加速給予加熱，花朵在加熱的醇類裡會不斷的流失色素，幾分鐘後取出，花朵會保持鮮紅色，但顏色卻和原先的不同。以紅玫瑰為例，浸泡後的顏色是桃紅色，和原先的深紅色不同，質地也變得柔軟，與原本不同(圖十五)(WO 99/55152)。



圖九、葉綠素 a 的化學結構(圖片來源:植物生理學)



圖十、銅離子取代(96.10.19)(攝於 98.7.29)



圖十一、銅離子取代失敗情形(96.10.19)



圖十二、插枝吸收營養法(前)(96.12.27)



圖十三、插枝吸收營養法(後)(96.12.31)



圖十四、浸液法處理前(上)(96.11.1)、  
後(下)(96.11.13)

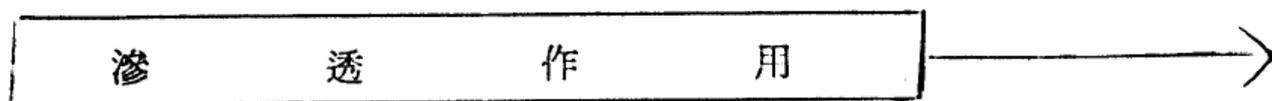
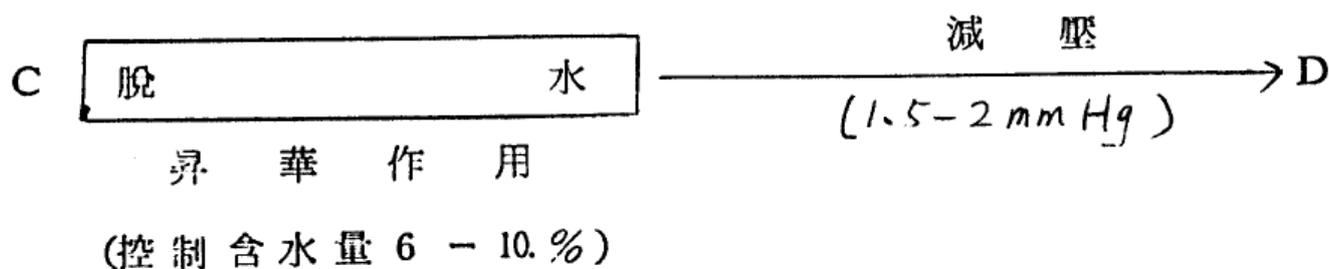
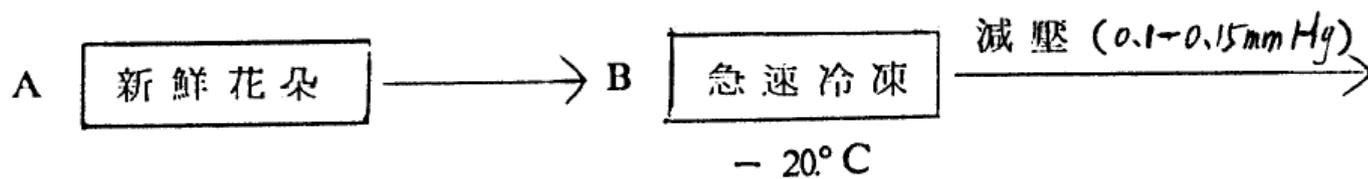


圖十五、浸液法處理之紅玫瑰花瓣(97.3.14)

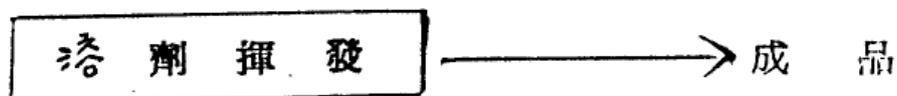
國內保存花朵相關研究目前做得最好的，是 2007 台北國際花展活動展出的不老花，發明人為林國筆先生，製作方法為將鮮花急速冷凍，再經專利的灌油處理(圖十六)，如此可使鮮花依其自然生態、光澤及彈性完整保存下來而不凋謝(圖十七、圖十八)。實際參觀後發現，不老花分兩部分製作，即將花朵的部分與綠色的枝條及葉子分開處理，枝條與葉子需用其他方法並使用綠色的染劑，但花的質地的確如真花般栩栩如生，顏色也相當自然(林, 1990 中華民國專利 159041)。

大陸也有類似的保存花，在大連市旅順園藝試驗場有將花朵保存成功的例子。在實際參訪之後得知將花果經過前處理後，浸泡到特別調配的保存液保存，可將花朵及蔬果保存兩年以上不變色。但我們發現這項技術也存在缺點，他們保存的花及枝葉大多是黃色、綠色的顏色，較少針對花青素呈現的顏色(紅色、紫色、藍色)保存，若是含花青素的花，在保存液中也會褪色(圖十九右邊花朵、圖二十左邊花朵)，但不可否認他們的保鮮工藝品有一些已十分接近真實植物的樣貌，且花與枝葉並未分開，而呈自然連接原貌(圖十九、圖二十)  
(保鮮花網:<http://www.dlhuahui.com/index.htm>)。

過程：



以乙醇、異丙醇為溶劑，聚二乙醇、甘油、乙二醇為溶質並調整PH值及添加着色劑



溶質滲透到細胞內水的位置並恢復原狀。

圖十六、不老花簡略製作過程(林, 1990, 國內專利 159041)



圖十七、不老花(1)  
(攝於 2007 台北國際花展)



圖十八、不老花(2)  
(攝於 2007 台北國際花展)



圖十九(攝於生科一館李家維實驗室 98.6.1)



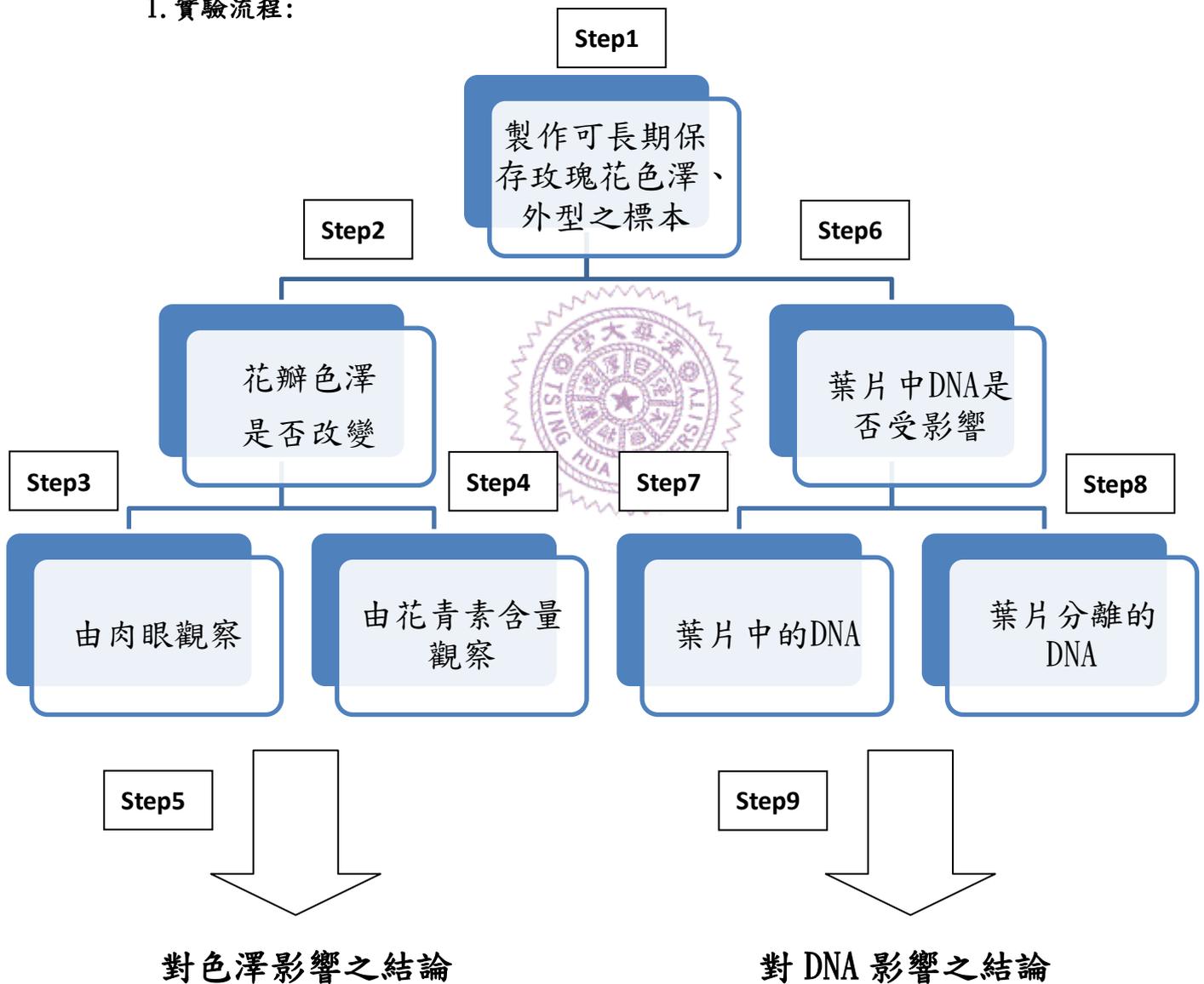
圖二十、(攝於生科一館李家維實驗室 98.6.1)

#### 4. 實驗目標：

- (1) 配製出可將佳娜紅玫瑰花色澤及外型保存之保存液。
- (2) 觀察浸泡於保存液中的玫瑰葉片中的 DNA 是否受影響而破壞。
- (3) 觀察浸泡於保存液中的玫瑰花瓣色素含量是否隨時間而變化。

#### 三、實驗方法：

##### 1. 實驗流程：



## 2. 佳娜紅玫瑰浸液標本製作：

### 2.1 實驗材料：

佳娜紅玫瑰(Grand gala)購自一般花店，來源為台灣中南部花場

### 2.2 玫瑰保存液之配製：

保存液成份為 90%正戊醇(pentanol)，加入 10%異丙醇(isopropanol)、1%硫脲(thiourea)及 0.5%酒石酸(tartaric acid)，於室溫混合均勻，攪拌至酒石酸及硫脲完全溶解。

### 2.3 花朵樣本的製作方法：

- (a)將新鮮的佳娜紅玫瑰之莖部浸於配製的玫瑰保存液。(圖二十一)
- (b)在液面下將莖部斜切，使其於室溫下吸收保存液 12 小時。
- (c)將吸收過保存液的玫瑰其綠色的枝葉皆去除，之後將整朵花剩餘花冠及花萼的部分浸於充滿保存液的玻璃標本瓶中。
- (d)間隔 12、24、72 小時將浸泡過花朵的保存液替換成同配方未浸泡花朵保存液。
- (e)最後一次替換保存液後即完成玫瑰浸液標本。(圖二十二)



圖二十一(攝於生科一館李家維實驗室 98.6.1)



圖二十二(攝於生科一館李家維實驗室 98.6.1)

### 3. 花青素之萃取及鑑定:

#### 3.1 實驗材料:

- (a) 浸泡於玫瑰保存液的佳娜紅玫瑰花瓣，製作方法同 1.2、1.3，只取花瓣的部分，各取 2g 花瓣，分裝浸泡於不同瓶玻璃標本瓶中。(圖二十三)
- (b) 檸檬酸溶液(citric acid) 5%，pH=1.79

#### 3.2 實驗方法:

##### I. 花青素萃取:

- (a) 將浸泡於玫瑰保存液的佳娜紅玫瑰花瓣，於不同時間點(1 周、2 周、3 周、6 周、12 周)自標本瓶中取出。
- (b) 秤取出的花瓣置於抽氣瓶中，用抽氣幫浦將表面剩餘保存液抽乾，使花瓣乾燥。
- (c) 取乾燥後的花瓣 0.5 克，置於 15 毫升離心管中。
- (d) 用玻璃棒將管中的花瓣搗碎成粉末後加入 15 毫升檸檬酸溶液。
- (e) 使花瓣與檸檬酸溶液混合均勻後置於 47°C 的水浴槽加熱 4 小時。
- (f) 加熱後取出用濾紙(90 mm)過濾得玫瑰花青素萃取液約十二毫升。

##### II. 花青素的鑑定:

將上述的花青素萃取液以 0.22  $\mu$ m 的濾膜過濾後，以高效能液相層析儀(Water 2796 Bioseparations Module)進行分析，與花青素標準品(cyanidine 3,5-diglucoside 溶於 methanol:water=1:3 之溶液)比較，以鑑定花青素之種類。分析條件如下:

使用 C18 分離管柱為 VERCOPAK( 14795 N5 ODS(C18) , 4.6  $\times$  250 mm)，並於室溫中進行分析鑑定。

以 1.5%  $H_3PO_4$  in  $H_2O$  為溶劑 A，1.5%  $H_3PO_4$ ，20% HOAc，25% MeCN in  $H_2O$  為溶劑 B。分離過程中以 0.7 毫升/分鐘的流速，將溶劑 B 順梯度的方式於 40 分鐘內由 20% 提升至 85%，每次樣品的注射量為 10  $\mu$ L，檢測器的量測波長設定為 530 nm。做法參照(Tatsuzawa et al., 2005)

#### 4. 佳娜紅玫瑰基因體(Genomic) DNA 萃取及保存:

##### 4.1 實驗材料:

使用新鮮玫瑰葉片或浸泡於玫瑰保存液的佳娜紅玫瑰新鮮葉片，其製作方法同 2.2、2.3，但只取約 2g 綠色葉片的部分，分裝浸泡於不同瓶玻璃標本瓶中。(圖二十四)

##### 4.2 實驗方法:

###### I 玫瑰葉片基因體(Genomic) DNA 之萃取: (Lim, 1997)

(a.1) 將浸泡於玫瑰保存液的佳娜紅玫瑰葉片，於不同時間點(1 周、2 周、3 周、6 周、9 周及 13 周)自標本瓶中取出，並以抽氣幫浦乾燥。

(a.2) 秤取約 0.1 克的乾燥玫瑰葉片或新鮮葉片，收集後以 10% (v/v) sodium hypochlorite 將表面消毒 10 分鐘，之後用蒸餾水將組織潤洗 5 次。

(b) 將葉片置於研鉢中，加入液態氮後磨碎成粉末狀。

(c) 加入 60  $\mu$ l 的 polyvinylpolypyrrolidone (100 mg  $\text{cm}^3$ ) 於研鉢中。

(d) 加入 600  $\mu$ l 的萃取液(100mM Tris-HCl, pH 8.0, 50mM EDTA, pH 8.0, 500mM NaCl and 100mM mercaptoethanol)

(e) 將研鉢中的萃取物改置於離心管後，加入 40  $\mu$ l 的 20% sodium dodecyl sulphate，並將管子上下翻轉混合均勻，之後置於 65 °C 水浴 10 分鐘。

(f) 加入佔總體積約 1/10 的 5 M potassium acetate (pH 5.2)，並將離心管埋於冰裡 20 分鐘。

(g) 將離心管離心(10,000  $g$  20 分鐘 4 °C)。

(h) 離心後蒐集上清液，並加入 400  $\mu$ l 的異丙醇(isopropanol)，以沉澱 DNA。

(i) 放置於 -20 °C 1 小時或 -80 °C 15 分鐘後，離心(10,000  $g$  15 分鐘 4 °C) 以收集 DNA。

- (j) 緩慢倒去離心管中溶液後(不可大力搖晃)加入 200  $\mu$ l Tris EDTA buffer (10mM Tris-HCl and 1mM EDTA, pH8.0) 回溶 DNA，並加入 1  $\mu$ l 的 RNase A。
- (k) 放置於 37  $^{\circ}$ C 水浴 30 分鐘後，接著加入 200  $\mu$ l 的 phenol:chloroform (1:1)，並將此混合物離心(10,000  $g$  5 分鐘 4 $^{\circ}$ C)。
- (l) 離心後蒐集上層的水層，再加入 200  $\mu$ l 的 phenol:chloroform (1:1) 重複步驟(k)、(l)。
- (m) 將蒐集的上層液加入佔總體積 0.1 倍份量的 3 M sodium acetate (pH 5.2) 以及佔總體積 2.5 倍的 100% ethanol，將混合物置於-80  $^{\circ}$ C 30 分鐘。
- (n) 離心(10,000  $g$  10 分鐘 4 $^{\circ}$ C)後，緩慢倒去離心管中溶液(不可大力搖晃)，加入 70% ethanol 洗去雜質，並用烘箱烘乾。
- (o) 加入 25  $\mu$ l Tris EDTA buffer(pH 8.0) 回溶 DNA，取得植物 genomic DNA。

## II 玫瑰葉片 genomic DNA 保存實驗:

- (1) 取新鮮未浸泡保存液的玫瑰葉片，依照玫瑰葉片基因體(genomic) DNA 之萃取方法，將萃取所得的玫瑰葉片 genomic DNA 取 40  $\mu$ l 加入 600  $\mu$ l 的 100% methanol，並置於-20  $^{\circ}$ C 2 小時以沉澱 DNA。
- (2) 離心(10,000  $g$  20 分鐘 4 $^{\circ}$ C)後去除上清液。
- (3) 分別加入 40  $\mu$ l 的玫瑰保存液(90% pentenol、10% isopropano、1% thiourea、0.5% tartaric acid)及另一種未加酒石酸(tartaric acid)的保存液，成分為(90% pentenol、10% isopropano、1% thiourea)。
- (4) 放置於室溫分別保存，並於不同的時間點取出。
- (5) 加入 600  $\mu$ l 的 100% methanol，置於-20  $^{\circ}$ C 2 小時以沉澱 DNA。
- (6) 離心(10,000  $g$  20 分鐘 4 $^{\circ}$ C)，去除上清液。
- (7) 加入 500  $\mu$ l TE buffer(pH 8.0) 回溶 DNA，進行 DNA 電泳分離。



圖二十三、浸泡於玫瑰保存液之花瓣(攝於生科一館李家維實驗室 98.6.1)



圖二十四、浸泡於玫瑰保存液之葉片(攝於生科一館李家維實驗室 98.6.1)

#### 四、分析方法：

##### 1. 酸鹼值：

以 pH meter (CORNING pH meter 440)測定花青素萃取液及檸檬酸溶液之酸鹼值。

##### 2. 花青素含量：

依照 Lee(2005)所介紹的酸鹼值差異法(pH differential method)加以修改進行定量。

##### (1)緩衝溶液：

pH 1.0 buffer (potassium chloride, 0.025 M)

pH 4.5 buffer (sodium acetate, 0.4 M )

##### (2)操作方法：

各取兩份 1 毫升玫瑰花青素萃取液分別加入 9 毫升的 pH1.0 及 pH4.5 buffer 配成兩杯各 10 毫升的稀釋液，混合均勻後分別以分光光度計(HITACHI U-2800 Double beam spectrophotometer)測其在 520 nm 的吸光值得 A1 (pH1.0)及 A2 (pH4.5)，以及在 700 nm 的吸光值得 B1(pH1.0)與 B2(pH4.5)，再以下列公式計算玫瑰花青素萃取液所含花青素含量(毫克/公升)：

$$\frac{\{(A1 - B1) - (A2 - B2)\} \times MW \times F \times 10^3}{\epsilon}$$

MW: 花青素 cyanidin 3,5-diglucoside(C<sub>27</sub>H<sub>31</sub>O<sub>16</sub>)之分子量=611.55 g/mol

F: 稀釋因子(dilution factor)=10

$\epsilon$  : cyanidin 3,5-diglucoside 之莫耳吸光係數(26300 L × cm<sup>-1</sup> × mol<sup>-1</sup>)

### 3. DNA 保存情形:

操作方法:

將 genomic DNA 直接進行 DNA 電泳觀察，並設計 DNA 引子(primer)進行聚合酶鏈鎖反應(PCR)，之後將 PCR 產物進行 DNA 電泳觀察。

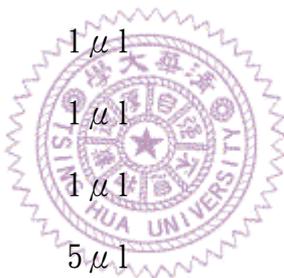
聚合酶連鎖反應(PCR):

本實驗之聚合酶連鎖反應使用以程式控制熱循環溫度的 Master cycler 5333 系統，以 0.4 unit 的 *Taq* DNA polymerase(BioLabs M0273S)聚合酶，DNA 引子(primer)如下。

PCR:

#### A. material

(1)cDNA	1 $\mu$ l
(2)10 $\mu$ M primer-F	1 $\mu$ l
(3)10 $\mu$ M primer-R	1 $\mu$ l
(4)dNTP 10 $\mu$ M	1 $\mu$ l
(5)10X PCR buffer	5 $\mu$ l
(6)ddH <sub>2</sub> O	38.5 $\mu$ l
(7)Tag-polymerase	1 $\mu$ l



#### B. PCR condition:

(1)95 °C	1 分鐘
(2)95 °C	30 秒
(3)50 °C	30 秒
(4)72 °C	1 分鐘
(5)回到步驟(2)並重複三十次	
(6)72 °C	1 分鐘

PCR primer: (明欣生物科技有限公司合成)

Primer 來源: Rosa hybrid cultivar Yun Zheng Xia Wei 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence.

F 5' A A G G A T C A T T G T C G A A A C C T 3'

R 5' T C G A C A C G C A T T G T T T A A G A 3'

## 五、實驗結果:

### 1. 佳娜紅玫瑰浸液標本外觀評比:

浸泡於玫瑰保存液六個月的佳娜紅玫瑰，其花瓣的顏色大致與原先新鮮的玫瑰顏色相同，除了顏色稍深，皆呈現鮮紅色，可與新鮮玫瑰以及長期浸泡於清水中的玫瑰作比較看出(圖二十五、圖二十六)。外部型態方面，由於玫瑰保存液主要由醇類構成，會造成花朵的脫水，雖然其型態大致不變，但花瓣部份出現萎縮及硬化現象。此保存液雖可保存花瓣顏色，但原先呈綠色的花萼部分，因長時間浸泡於保存液後產生褪色，無法和鮮紅色一同保存。實驗中也比較放置於光照以及黑暗條件時，玫瑰保存液對玫瑰的保存情形(圖二十七)，做法為將浸泡於玫瑰保存液的玫瑰，一組放置於兩管 20 W 的日光燈管下約 15 公分處(照度為  $70.5\sim 71.0 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ )，照明六個月以上不間斷(圖二十八);另一組放置於黑暗的櫃子中，六個月之後取出比較。實驗結果顯示放置於黑暗的保存情形稍佳，雖然兩組花瓣顏色十分接近，顯示花瓣顏色不受光照影響，但黑暗組的花萼部分綠色流失較少。



圖二十五、浸泡保存液之玫瑰(97.10.20)(左)與新鮮玫瑰(右)之比較(攝於 98.6.1)



圖二十六、浸泡保存液的玫瑰(97.10.20)(右)與浸泡清水兩星期以上的玫瑰 (98.5.11)(左)之比較(攝於 98.6.1)



圖二十七、浸泡保存液之玫瑰置於黑暗(左)與光照下(右)保存情形(97.10.20)(攝於 98.6.1)

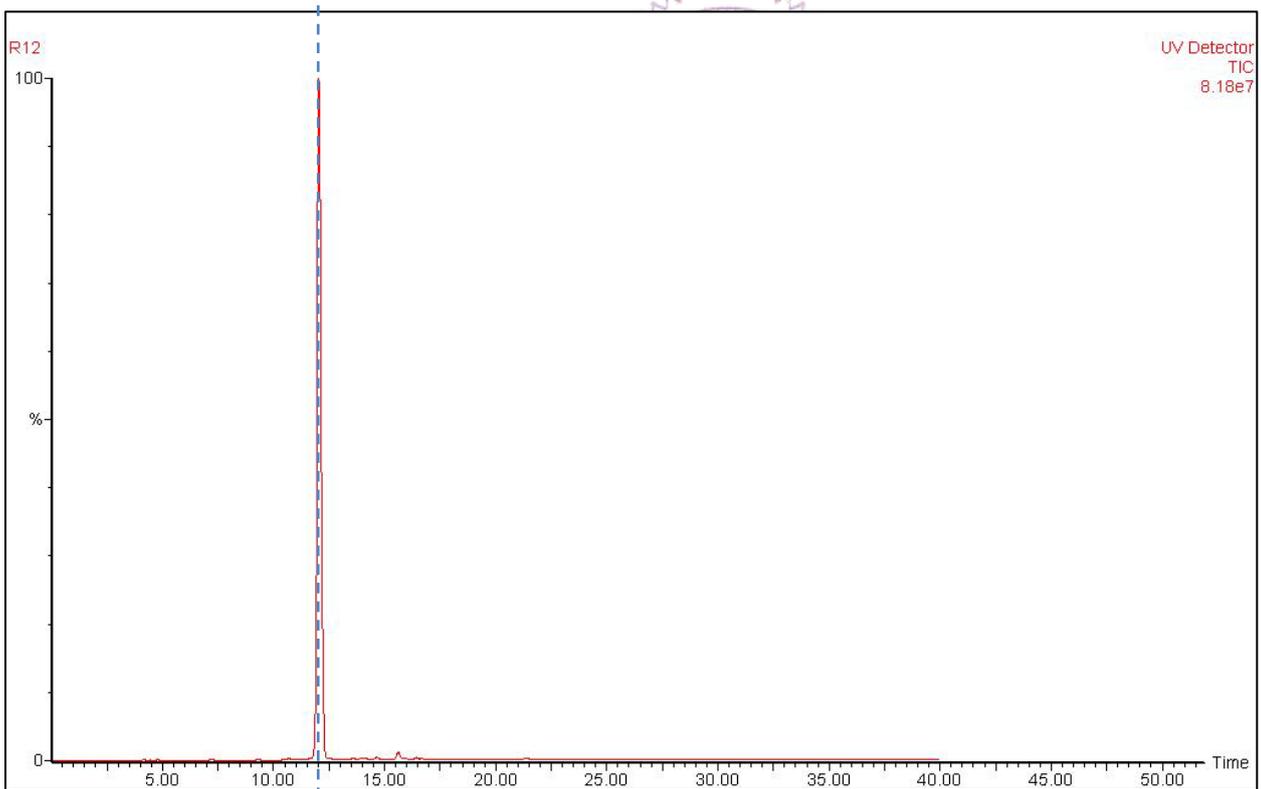
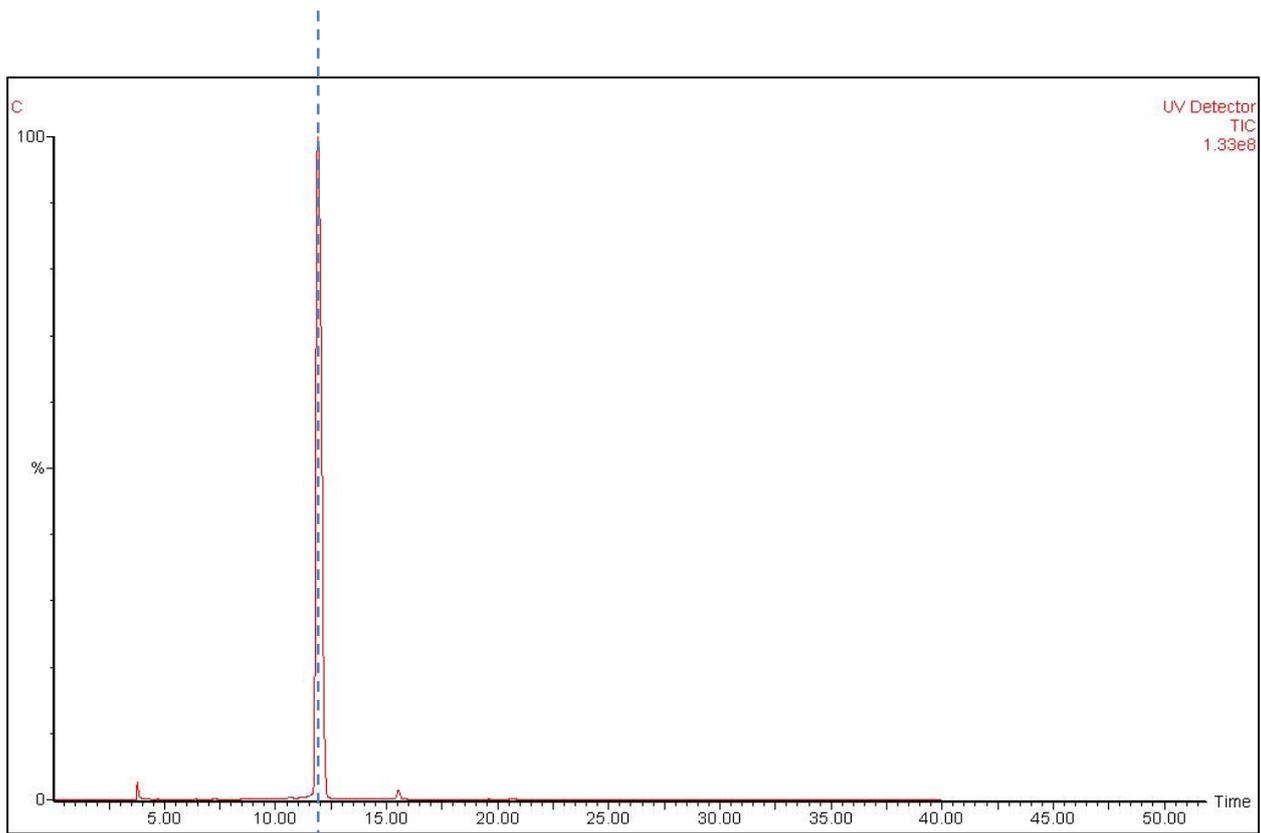


圖二十八、玫瑰浸液標本置於光照實驗(照度  $70.5 \sim 71.0 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ )情形示意(攝於 98.6.1)

## 2. 佳娜紅玫瑰花青素之分離純化及鑑定:

利用 C18 高效液相層析鑑定實驗中玫瑰花花青素之種類的結果顯示，實驗使用的佳娜紅玫瑰主要花青素組成種類只有一種(圖二十九)。利用已知的玫瑰花青素標準品(cyanidine 3,5-diglucoside)與其比較，顯示本實驗萃取之花青素可能為 cyanidine 3,5-diglucoside，二者波峰出現位置及時間均相同。此結果與 Mikanagi 提出，紅色的玫瑰主要花青素為 cyanidine 3,5-diglucoside 結果相符。圖中右上角顯示數值為測量波長 530 時的吸收值，可藉此比較推得花青素的含量。發現浸泡時間越長的玫瑰標本(12 周)之含量比浸泡時間較短的玫瑰標本(1 周)低(表四、圖三十)，顯示花青素含量隨浸泡保存的時間增長而減少，後續使用酸鹼差異法算得的色素含量也符合此情形(表四)。

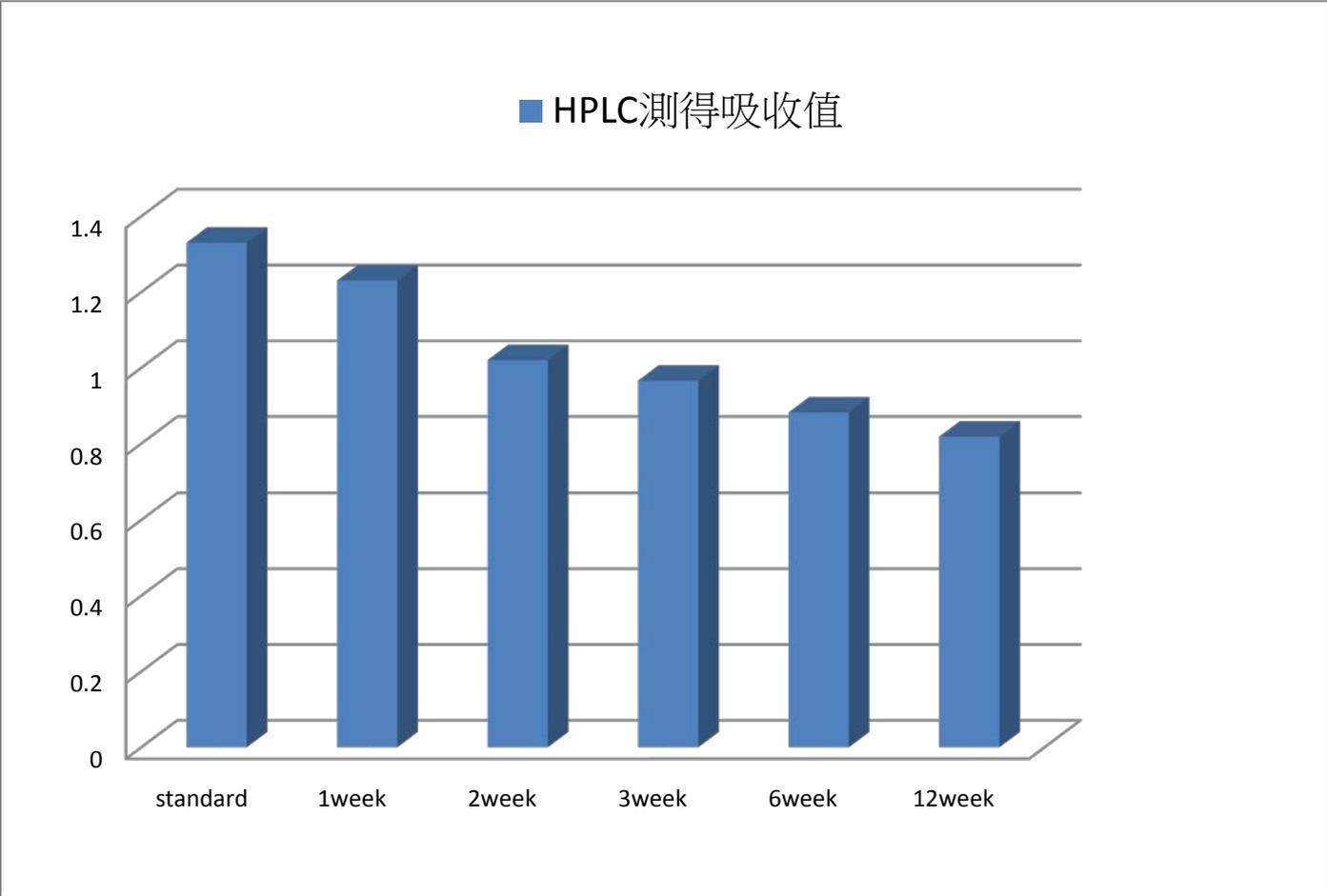




圖二十九、10 微升標準樣品(0.001 毫克/微升)(上圖)與 10 微升浸泡保存液 12 星期時萃取之花青素(下圖)之 HPLC 圖譜分析

表四、標準樣品與不同時間點萃取花青素於 HPLC 測量之 530 nm 吸收值及濃度估算

	HPLC 吸收值	實際含量估算 (mg/L)	酸鹼差異法估算 (mg/L)
標準樣品 (Cy -3,5-diglucoside)	$1.33 \times 10^8$	1000	
浸泡 1 星期樣品	$1.23 \times 10^8$	924.81	484.236
浸泡 2 星期樣品	$1.02 \times 10^8$	766.92	325.496
浸泡 3 星期樣品	$9.66 \times 10^7$	726.32	306.787
浸泡 6 星期樣品	$8.82 \times 10^7$	663.16	269.756
浸泡 12 星期樣品	$8.18 \times 10^7$	615.04	208.69

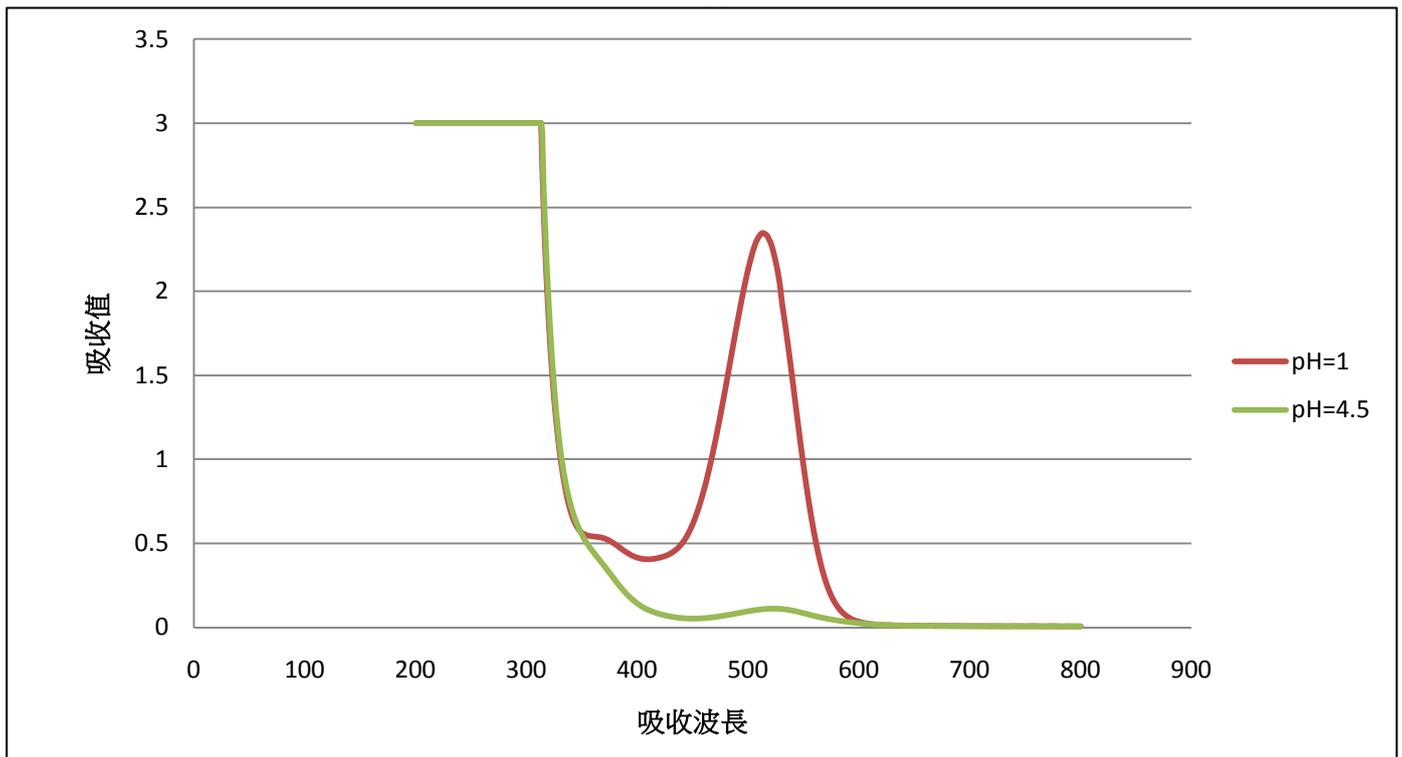


圖三十、HPLC 於 530 nm 測得吸收值趨勢圖

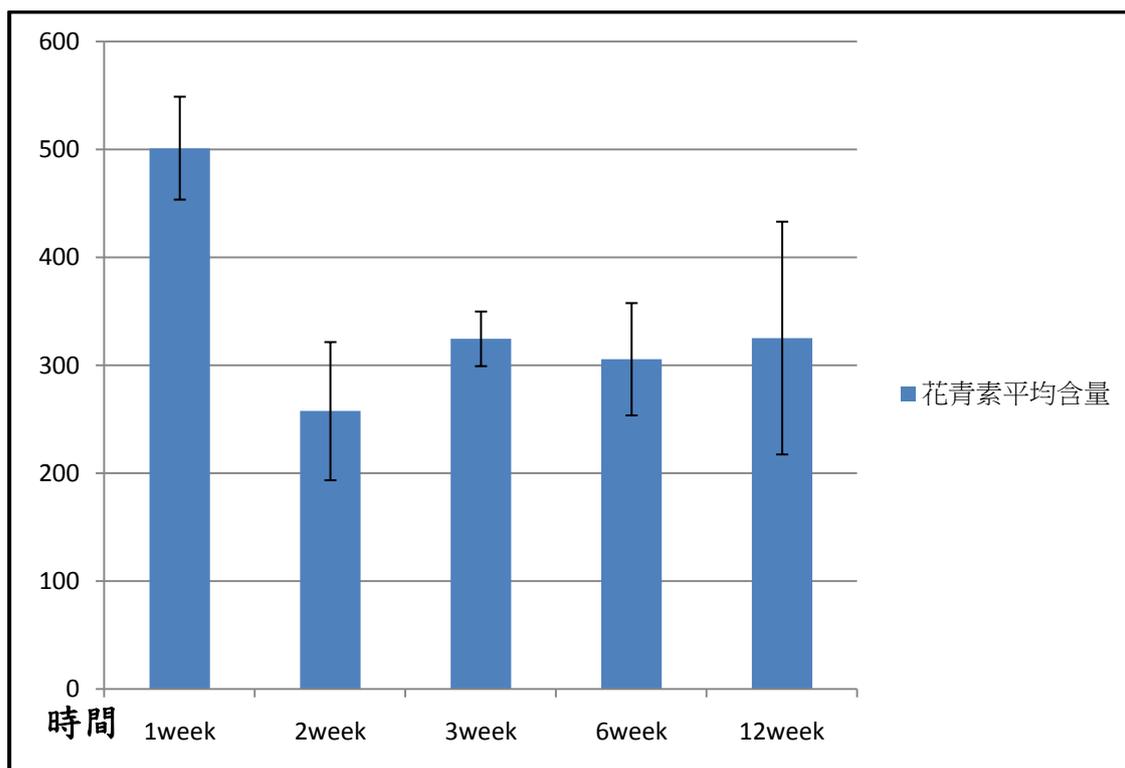
### 3. 佳娜紅玫瑰浸於玫瑰保存液後花青素含量變化:

重複相同實驗方法(2.2 實驗方法 I)製作三組玫瑰樣品，萃取得到各組花青素萃取液後，再利用 Lee(2005)介紹的酸鹼值差異法(pH differential method)加以修改進行定量。圖三十一為其中一組樣品進行酸鹼差異法，定量玫瑰花青素含量時，於兩種酸鹼值環境以分光光度計(HITACHI U-2800 Double beam spectrophotometer)測得吸收值之圖譜。之後比較在不同時間點萃取所得花青素含量平均之變化:(圖三十二、圖三十三)

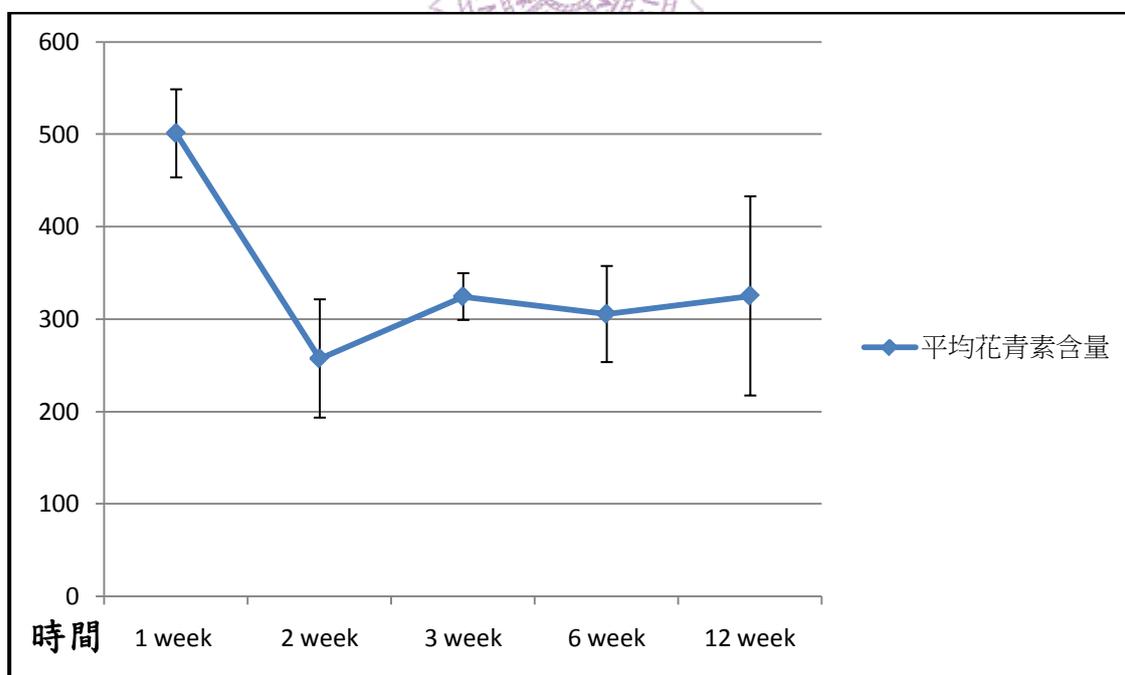
結果顯示，隨著時間越久，三組玫瑰的花青素含量與最初相比皆明顯降低，但下降的程度也漸漸趨緩。



圖三十一、兩種酸鹼值下玫瑰色素於分光光度計測得之圖譜



圖三十二、三組玫瑰樣品花青素平均含量(mg/L)



圖三十三、三組玫瑰樣品平均花青素含量隨時間變化趨勢(mg/L)

#### 4. 玫瑰保存液對佳娜紅玫瑰之 DNA 保存:

##### I. 葉片內的 DNA:

重複相同實驗方法(3.2 實驗方法 I)萃取浸泡於保存液的玫瑰葉片之 DNA 得三組 DNA 樣品(以代號 R1、R2、R3 表示)，以 DNA 電泳及 PCR 觀察玫瑰保存液對葉片組織內之 DNA 保存情形，觀察保存液是否會隨時間的增長破壞葉片組織內之 DNA。(圖三十四、圖三十五)

結果顯示萃取不同時間點之葉片 genomic DNA 在 DNA 電泳圖中可看到 10Kbp 以上的條帶(圖三十四)，在後續 PCR 的實驗(取任意一組樣品進行 PCR)可觀察到不同時間點(1~13week)皆得到欲放大約 700bp 之基因片段，間接證明植物葉片的 DNA 在組織內時未受玫瑰保存液影響而顯著破壞。由於植物組織中 DNA 萃取不易，且因實驗之疏忽未將 DNA 樣品定量，因此 DNA 電泳結果並不明顯，未來實驗時可降低 DNA 電泳製膠濃度，以期有顯著的 DNA 條帶，本實驗主要著重於 PCR 實驗之結果。



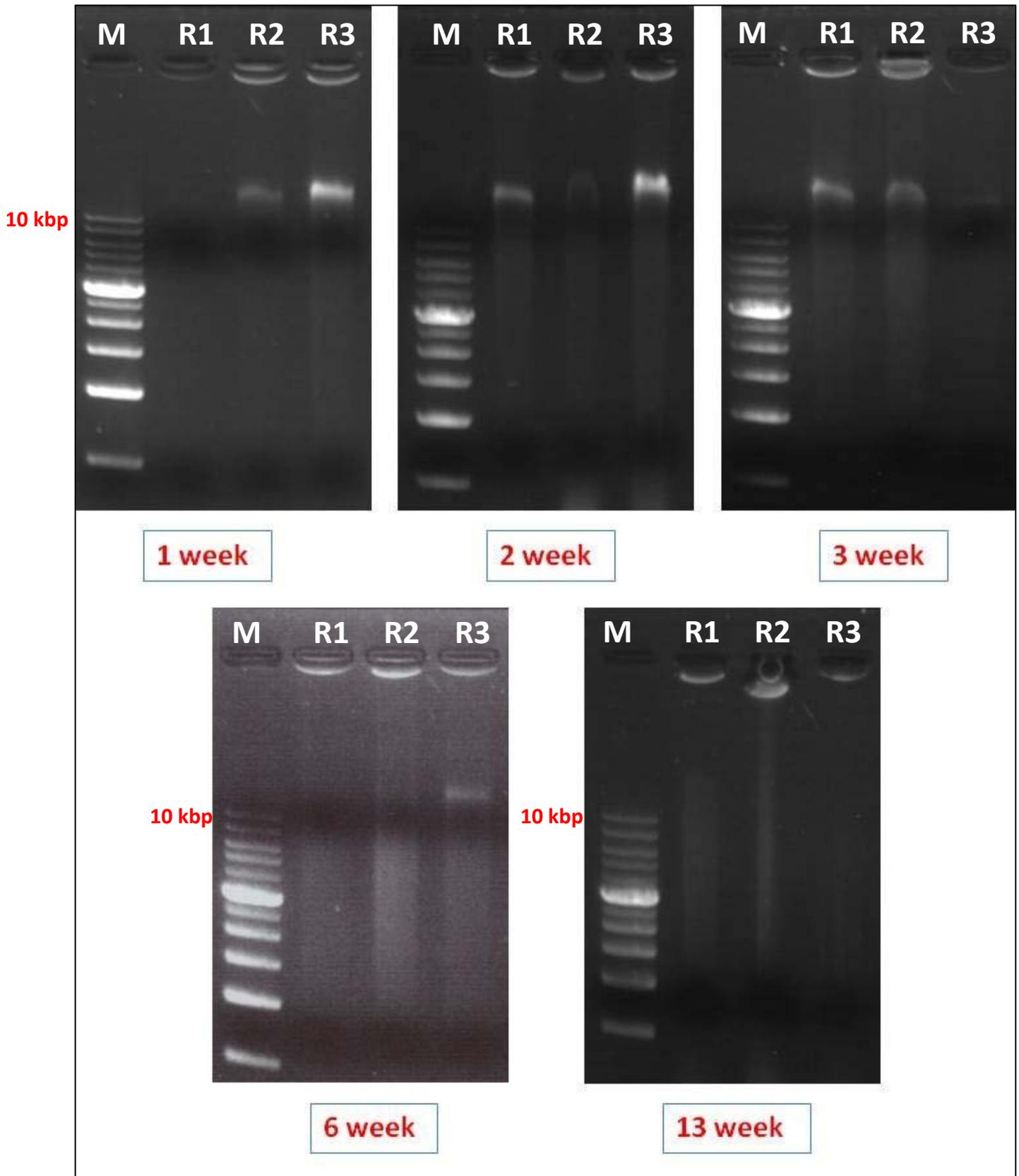
##### II. 葉片分離之 DNA(Isolated DNA):

(1)取新鮮佳娜紅玫瑰之葉片(經由實驗方法 4.2. I)萃取得到 genomic DNA 後，再以 實驗方法 4.2. II 的方式處理。為觀察不同保存液對葉片 DNA 保存的效果，將萃取得到的玫瑰 genomic DNA 浸泡於四種不同的保存液(表五)五天，發現只有浸泡於保存液二時，電泳下無法看到 DNA 的條帶，顯示 isolated DNA 直接浸泡於加有酒石酸的保存液可能會對 DNA 造成破壞(圖三十六)。

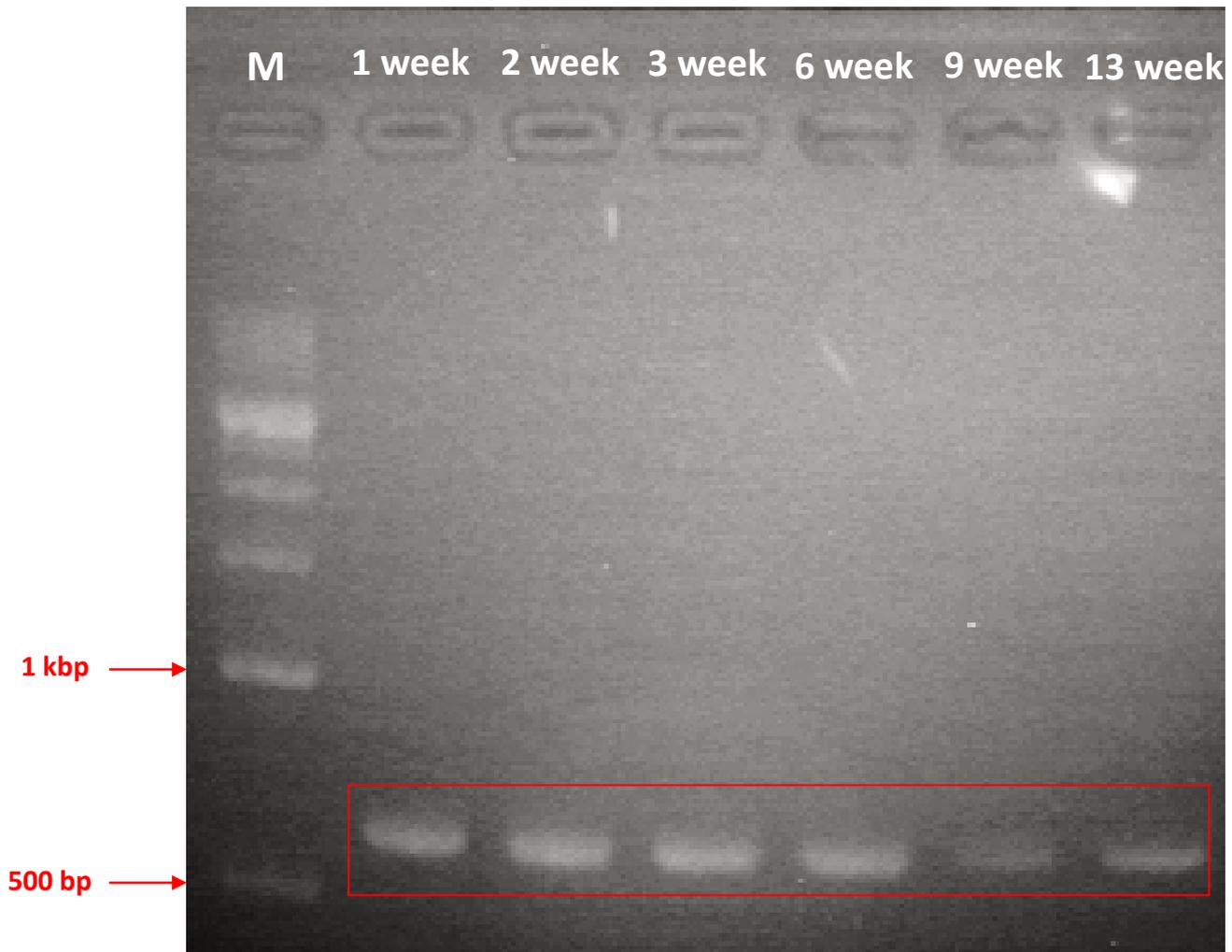
(2)後續進行將三組不同玫瑰葉片萃取得到的 genomic DNA(以代號 R1、R2、R3 表示)浸泡於去除酒石酸成分的玫瑰保存液，並放置室溫下分別保存 1week、2week、3week、6week、9week。之後取出利用 DNA 電泳的方式觀察 isolated DNA 於此保存液中隨時間的增加是否會對 DNA 的保存造成影響(圖三十七)。可以看到，玫瑰 DNA 浸泡於不含酒石酸的保存液並不會受影響而破壞掉。

(3) 將 isolated DNA 浸泡於玫瑰保存液(保存液二)以及去除酒石酸成分的玫瑰保存液(保存液三)中一天,之後進行PCR分析是否仍可將特定基因放大(圖三十八)。由圖中顯示進行PCR後,兩組皆可清楚看到基因被放大的情形,顯示雖然加有酒石酸的保存液可能對DNA造成些許破壞,但情形並不嚴重,仍可將欲放大的基因放大。





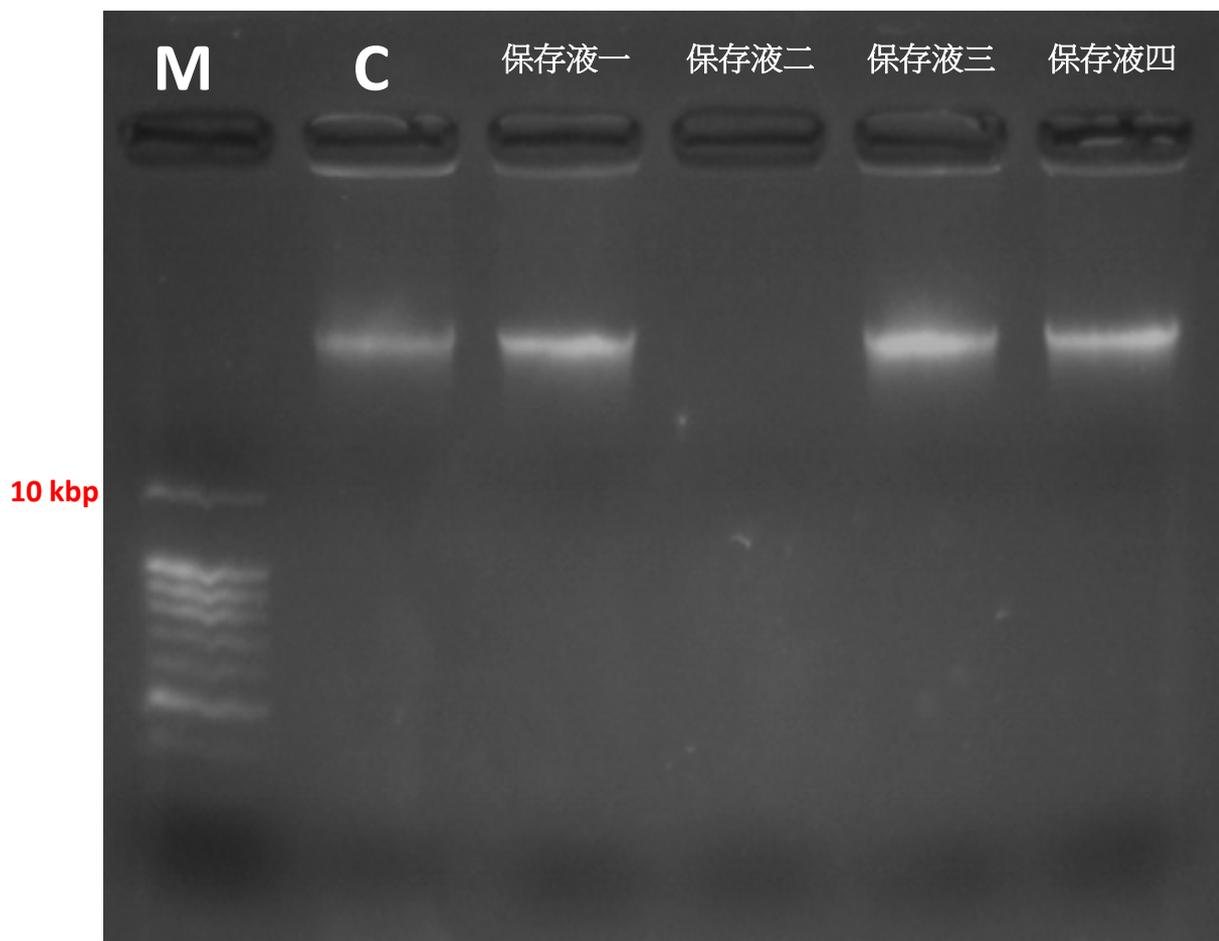
圖三十四、浸泡保存液之葉片 genomic DNA 萃取(M:10Kbp marker)



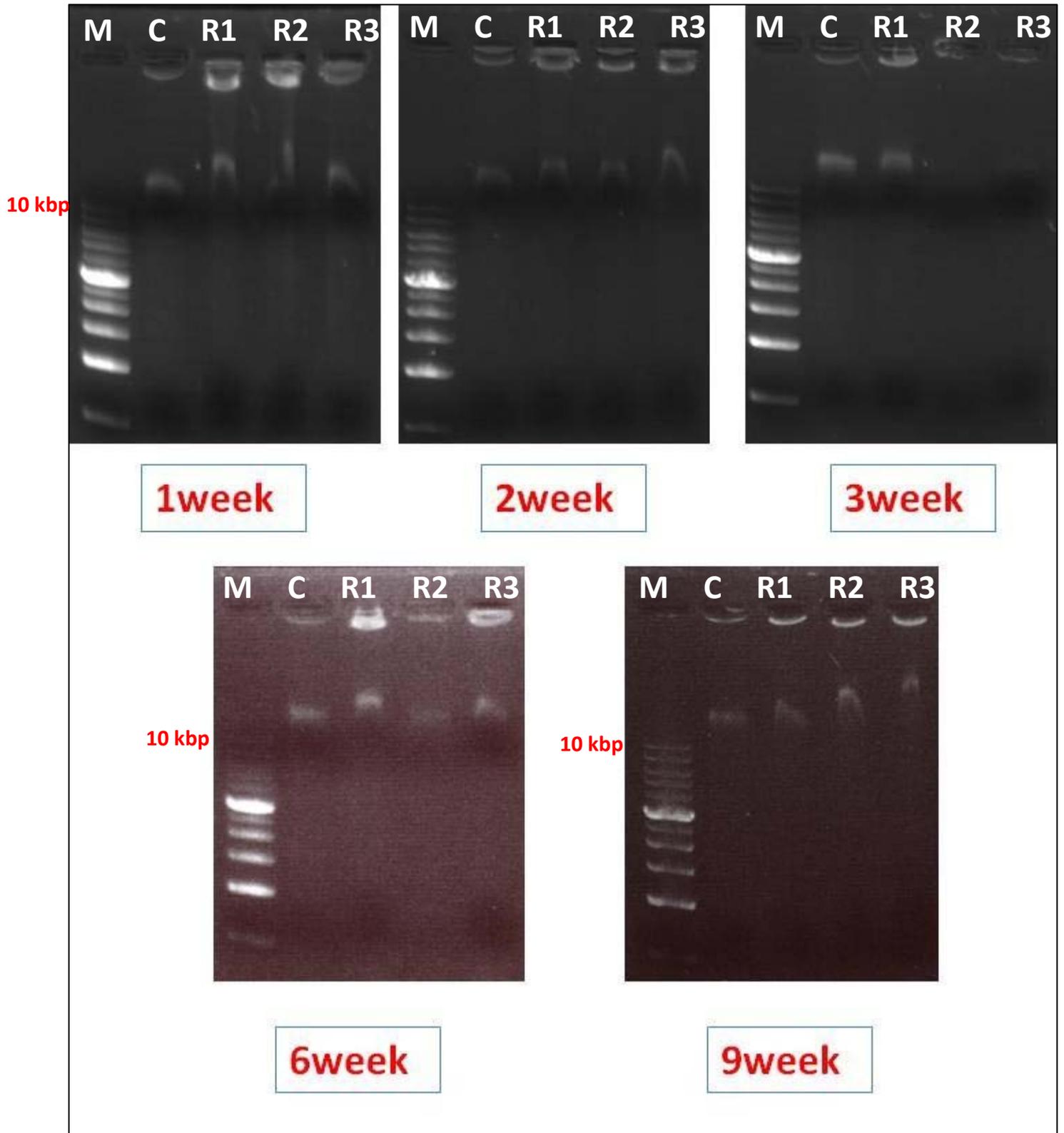
圖三十五、在不同保存時間萃取之葉片 genomic DNA 進行 PCR 擴增  
(M:1 Kb marker)

表五、Isolated DNA 所浸泡之四種不同保存液

保存液一	正戊醇(pentanol) 90%、異丙醇(isopropanol) 10%、硫脲(thiourea) 1%、 <b>硼酸(boric acid) 1%</b>
保存液二	正戊醇(pentanol) 90%、異丙醇(isopropanol) 10%、硫脲(thiourea) 1%、 <b>酒石酸(tartaric acid) 0.5%</b>
保存液三	正戊醇(pentanol) 90%、異丙醇(isopropanol) 10%、硫脲(thiourea) 1%
保存液四	正戊醇(pentanol) 90%、異丙醇(isopropanol) 10%



圖三十六、玫瑰葉片 DNA 浸泡於不同保存液之保存情形。(M:1kb marker, C:萃取得的 genomic DNA 直接進行電泳)



圖三十七、Isolated DNA 浸泡於不含酒石酸保存液保存情形(M:1Kb marker, C: 溶於 TE buffer 之 DNA)



圖三十八、浸泡於兩種保存液之葉片 genomic DNA 進行 PCR 結果  
(M:1 Kb marker，保存液三:未加酒石酸的保存液，保存液二:含酒石酸)

## 六、討論：

### 1. 玫瑰保存液保色之可能原因：

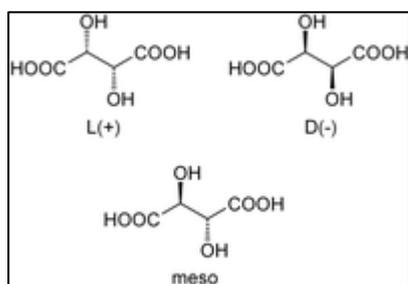
本實驗開發出的玫瑰保存液，成份為正戊醇、異丙醇、酒石酸及硫脲，是參考 United states patent 5227205、4272571 兩篇專利，並加以嘗試修改而配成，使用不同種類的醇類及酸性成份，如將異丙醇用其他醇類如 tertiary butyl-alcohol 來取代，這是在 4272571 這篇專利所使用的醇類，但實驗結果顯示這樣的配方會使玫瑰變色，偏向紫色色澤無法呈現原先的鮮紅色。之後將各種成份加以組合，並一一測試去除不必要的成份後配製而成。4272571 這篇專利中提到這些成份在保存液中的功能。正戊醇主要功能為脫水；酒石酸提供酸性的環境，此點與玫瑰色素呈色環境相吻合(玫瑰的花青素在酸性環境下呈現紅色)；而硫脲可使色素不易從組織中釋出，但詳細機制未明，推測是因為造成植物組織中的蛋白質變性導致；異丙醇的功能也是脫水，可加強正戊醇的效果，並且可使植物的過氧化酶失活。保存液中這幾種配方的濃度是經過不斷測試所得，如以不同濃度的酸性成份、醇類及硫脲實驗，最後得到保色效果最佳的組合。

至於本配方為何可保色的原因，我們認為共呈色效應可能是主要的原因。先前提及共呈色效應時曾介紹有機酸也是一種 copigment，本配方裡的酒石酸便是一種有機酸，推測可能因此和花青素產生了共呈色效應。葡萄酒中常可發現酒石酸的存在，同理也可說明紅酒為何可長期保存且顏色仍維持血紅。此外配方中醇類的脫水功能也佔重要的因素，因為花青素是水溶性的有機分子，醇類將水去除後，花青素便不容易受水的影響而脫離出組織中，此現象可由實驗過程中發現的現象證實。即新鮮玫瑰浸於保存液後，需要及早且多次更換新的保存液，若不更換保存液，保色效果便十分不穩定甚至無法保色。此現象可能是少量存在保存液或花朵中的水份影響了保存液效果。另外實驗方法裡提到，將玫瑰浸泡於保存液前，先以莖部插入保存液吸收十二小時，發現此舉也有助保存的效果，推論也是因為此過程將組織多餘的水份先行脫出，使保存液不會因為水份的存在影響保存效果。

## 2. 酒石酸與硼酸：

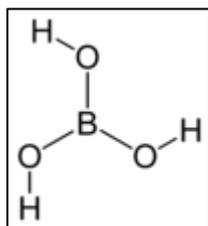
本實驗中玫瑰的保存液主要提供酸性環境的成份是酒石酸，酒石酸現已知用以保存紅玫瑰具有不錯的效果，而硼酸則對蘭科及菊科的花朵有不錯效果(圖三十九、四十)。當混合兩種酸並依照不同比例配置保存液，對於其他尤其是菊科的花朵也具有相當不錯的效果(圖四十一、圖四十二)。

這兩種酸雖然同樣是酸，但兩者性質卻有些許不同，酒石酸像是一般的酸，為一種 $\alpha$ -羧酸，在溶液中作為氫質子的提供者，常在水果尤其是葡萄中發現，也是葡萄酒中主要的有機酸，



圖三十九、酒石酸分子式 (圖片來源:維基百科)

而硼酸則和一般的酸性質不同，在水溶液中，硼酸主要以未電離的  $B(OH)_3$  形式存在，只有少數與水中的  $OH^-$  結合形成  $[B(OH)_4]^-$ ，使硼酸具有一元弱酸的性質：



圖四十、硼酸分子式(圖片來源:維基百科)

這兩種酸的性質也解釋了為何酒石酸會像一般酸一樣破壞 Naked DNA 而硼酸卻不會。

在製作花朵浸液標本的過程中我們發現，雖然保存液成分大致相同，但往往需要根據不同的花朵而使用不同的酸，例如玫瑰使用酒石酸，蘭科花朵使用硼酸，雖然詳細機制及原因未明，但或許與上述兩種酸的性質差異有關。



圖四十一、菊花以及蘭花的保存標本(攝於 98.6.1)



圖四十二、蘭花的保存標本(攝於 98.6.1)

### 3. 色素含量的變化:

在上述實驗將浸泡保存液的玫瑰，於不同的時間點萃取花青素，觀察花青素含量的變化(圖三十二、圖三十三)。實驗結果顯示花青素有隨著時間增長而產生下降的趨勢，可能在保存的期間中被分解破壞掉。前言中曾提到花青素含量下降分解的原因之一是光線，除了 Kearsley 及 Rodriguez 最早發現光線對色素的影響以外，近來也有幾篇研究提到，光線確實會對不同植物萃取出來的色素造成的影響(王, 2007、寧, 2000)。雖然實驗中萃取的花青素有顯著下降的趨勢，但最後降低的變化皆有趨於緩和的情形。此花青素含量下降但肉眼觀察花朵顏色無明顯差異的現象，可能是由共呈色效應造成的增色作用所導致(前言中所述)，使色素更加穩定不易受外在環境影響而破壞。

### 4. 未來工作:

以往的動植物標本只能將外形保存下來，顏色往往無法一同保存。為解決如此窘境，有時甚至會利用染色的方式處理。本實驗提供了一種新式的花標本製作方式，不僅可將外形保存，顏色也可長期維持，實可說是一大突破，且此種標本製作方式是將花朵各部分一次保存，並未分開處理，完整呈現原始的形態。唯一遺憾的是目前仍無法將枝葉的綠色與花朵的顏色一同保存，未來這將是進一步研究的重點。此外目前的保存液需針對不同種類的花而使用不同種類及濃度的酸性成份，未來希望製訂出各種花所使用保存液種類之規則，並進一步了解保存液之保色機制。除此之外，目前的保存技術未來不管是在商業利用如做為禮品，或是學術的標本保存，保存珍稀的植物，都提供了一種新穎且富有價值的方向。

## 七、結論：

1. 實驗中所配製的保存液，可有效保存紅玫瑰花之花朵形態與色澤。
2. 花青素的含量雖會隨時間增長而下降，但下降情形最後會趨向緩和，且在肉眼觀察上無法發覺花朵色彩的變化。
3. 此保存液對紅玫瑰花之 genomic DNA 並無顯著傷害，可長時間有效保存玫瑰花的 DNA，特定的基因片段仍可由 PCR 放大取得。



## 八、參考文獻

- A. Jaeger: Rosenlexikon (1936), Zentralantiquariat der DDR, Leipzig 1970, and G. Weiland, Lubeck 1970
- Andersen, O. M., & Jordheim, M. (2006). The anthocyanins. In O. M. Andersen & K. R. Markham (Eds.), *Flavonoids* (2nd ed., Chemistry, biochemistry and applications, pp. 452-471). Boca Raton, FL: CRC Press.
- Angeles Calatayud, Dolors Roca, Elisa Gorbe, Pedro F. Martinez.(2008).Physiological effects of pruning in rose plants cv. Grand Gala. *Scientia Horticulturae* 116, 73-79
- Asen S, Stewart RN, Norris KH. (1975). Anthocyanin, flavonol copigments, and pH responsible for larkspur flower color. *Phytochemistry* 14: 2677-2682.

- Boselli E, Boulton RB, Thorngate JH, Frega NG. (2004). Chemical and sensory characterization of DOC red wines from Marche (Italy) related to vintage and grape cultivars. *J Agric Food Chem* 52: 3843-3854.
- Boulton, R. (2001). The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: A critical review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52, 67-87.
- Cabrita, L., Fossen, T., & Andersen, O. M. (2000). Colour and stability of the six common anthocyanidin 3-glucosides in aqueous solutions. *Food Chemistry* 68(1), 101-107.
- Cameira-dos Santos, P. J., Brillouet, J. M., Cheynier, V., & Moutounet, M. (1996). Detection and partial characterisation of new anthocyanin-derived pigments in wine. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 70(2), 204-208.
- Cesar Romero-Sierra, Bath; John C. Webb, Kingston, both of Canada. Flower preservation. United states patent 4272571
- Clifford, M. N. (2000). Anthocyanins – nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(7), 1063-1072.
- Conrad Hans Eugster and Edith Marki-Fischer:(1991). The chemistry of rose pigments. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 30, 654-672
- Da Costa, C. T., Nelson, B. C., Margolis, S. A., & Horton, D. (1998). Separation of blackcurrant anthocyanins by capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 799(1 – 2), 321-327.
- Darias-Martin J, Martin-Luis B, Carrillo-Lopez M, Lamuela-Raventos R, Diaz-Romero C, Boulton R. (2002). Effect of caffeic acid on the color of red wine. *J Agric Food Chem* 50: 2062-2067.
- Davies, A. J., & Mazza, G. (1993). Copigmentation of simple and acylated anthocyanins with colorless phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41(5), 716-720.
- Delgado-Vargas F, Jimenez AR, Paredes-Lopez O. (2000). Natural pigment: carotenoids,

anthocyanins, and betalains-characteristics, biosynthesis, processing and stability.

*Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 40:173-289

Dey, P. M., & Harborne, J. B. (1993). 1. Plant phenolics methods in plant biochemistry (2nd printing). *London: Academic Press Limited. pp.* 326-341.

Fleschhut, J., Kratzer, F., Rechkemmer, G., & Kulling, S. E. (2006). Stability and biotransformation of various dietary anthocyanins in vitro. *European Journal of Nutrition*, 45(1), 7-18.

Fumi Tatsuzawa, Tomohisa Yukawa, Koichi Shinoda, Norio Saito. (2005). Acylated anthocyanins in the flowers of genus *Dendrobium* section *Phalaenantha* (Orchidaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 33, 625-629

G. Heinz-Mohr , V. Sommer. (1988). *Die Rose: Enifaltung eines Symbols*, Diederich, Munchen .

Garcia-Alonso M, Rimbach G, Rivas-Gonzalo JC, De Pascual-Teresa S. 2004. Antioxidant and cellular activities of anthocyanins and their corresponding vitisins A. Studies in platelets, monocytes, and human endothelial cells. *J Agric Food Chem* 52: 3378-3384.

Giusti, M. M., & Wrolstad, R. E. (2003). Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems. *Biochemical Engineering Journal*, 14(3), 217-225.

Gutierrez IH. (2003). Influence of ethanol content on the extent of copigmentation in a Cencibel young red wine. *J Agric Food Chem* 51: 4079-4083.

Hale, K. L., McGrath, S. P., Lombi, E., Stack, S. M., Terry, N., Pickering, I. J., et al. (2001). Molybdenum sequestration in Brassica species. A role for anthocyanins. *Plant Physiology*, 126, 1391-1402.

Heredia, F. J., Francia-Aricha, E. M., Rivas-Gonzalo, J. C., Vicario, I. M., & Santos- Buelga, C. (1998). Chromatic characterization of anthocyanins from red grapes – I. pH

- effect. *Food Chemistry*, 63(4), 491-498.
- Hillebrand, S., Schwarz, M., & Winterhalter, P. (2004). Characterization of anthocyanins and pyranoanthocyanins from blood orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(24), 7331-7338.
- Honteyman. Plant tissue preservation method and solutions. United states patent 6764711 B1
- Ito, F., Tanaka, N., Katsuki, A., & Fujii, T. (2002). Why do flavylum salts show so various colors in solution?: Effect of concentration and water on the flavylum' s color changes. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 150(1-3), 153-157.
- J. R. Massey et al.. Collection and field preparation of specimens. From Chapter 18 in *Vascular Plant Systematics* by A. E. Radford, W.C. Dickison, J. R. Massey and C. R. Bell, Harper and Row Publisher, 1974.
- Jun Ogata, Yoshiahi Kanno, Yoshio Itoh, Hidehito Tsugawa, Masahiko Suzuki.(2005) Anthocyanin biosynthesis in roses. *Nature* Vol/435 /9 June
- Jungmin Lee, Robert W. Durst and Ronald E. Wrolstad.(2005): Determination of Total Monomeric Anthocyanin Pigment Content of Fruit Juices, Beverages, Natural Colorants, and Wines by the pH Differential Method Collaborative Study. *Journal of AOAC international* VOL. 88, NO. 5.
- Kearsley MW, Rodriguez N. 1981. The stability and use of natural colors in foods: anthocyanin,  $\beta$ -carotene and riboflavin. *J Food Technol* 16: 421-431.
- Kennedy, J. A., & Waterhouse, A. L. (2000). Analysis of pigmented high-molecular mass grape phenolics using ion-pair, normal-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 866(1), 25-34.
- Konczak, I., & Zhang, W. (2004). Anthocyanins-more than nature's colours (2004). *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2004(5), 239-240.

- Kong, J. M., Chia, L. S., Goh, N. K., Chia, T. F., & Brouillard, R. (2003). Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*, 64(5), 923-933.
- Lule, S. U., & Xia, W. (2005). Food phenolics, pros and cons: A review. *Food Reviews International*, 21(4), 367-388.
- Markakis P. (1982). Stability of anthocyanins in foods. In: *Anthocyanins as Food Colors*. Markakis P (ed.), Academic Press Inc., New York, 163-178.
- Matsufuji H, Otsuki T, Takeda T, Chino M, Takeda M. (2003). Identification of reaction products of acylated anthocyanins from red radish with peroxy radicals. *J Agric Food Chem* 51: 3157-3161.
- Mazza, G., & Brouillard, R. (1990). The mechanism of co-pigmentation of anthocyanins in aqueous solutions. *Phytochemistry*, 29(4), 1097-1102
- McFarland in C. E, Meikle(Ed.): *Modern Roses 8*, Harrisburg, PA, USA 1980
- Method and composition for plant preservation without leaf curling. US Patent 5627132
- Mikanagi Y, Saito N, Yokoi M, Tatsuzawa F. (2000). Anthocyanins in flowers of genus *Rosa*, sections *Cinnamomeae* (=Rosa), *Chinenses*, *Gallicanae* and some modern garden roses. *Biochem Syst Ecol* 28: 887-902
- Naveen Kumar, Girish Chand Srivastava, Kiran Dixit.(2008). Flower bud opening and senescence in roses ( *Rosa hybrida* L.). *Plant Growth Regul* 55, 81-99
- Nebesky EA, Esselen WB, Jr., McConnell JEW, Fellers CR. (1949). Stability of color in fruit juices. *Food Research* 14: 261-274.
- Nichenametla, S. N., Taruscio, T. G., Barney, D. L., & Exon, J. H. (2006). A review of the effects and mechanisms of polyphenolics in cancer. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46(2), 161-183.
- Pazmino-Duran, A. E., Giusti, M. M., Wrolstad, R. E., & Gloria, B. A. (2001). Anthocyanins from *oxalis triangularis* as potential food colorants. *Food Chemistry*, 75(2), 211-216.

- Plamen Mollov , Kiril Mihalev , Vasil Shikov , Nikolina Yoncheva , Vasil Karagyozev.  
(2007). Colour stability improvement of strawberry beverage by fortification with polyphenolic copigments naturally occurring in rose petals. P. Mollov et al. / *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 8, 318-321
- Preservation of plant material. WO 99/55152
- R. Scott-Moncrieff, *J.Genet.*32 (1936) 117.
- Rein, M. (2005). Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins. Helsinki: University of Helsinki. pp. 10-14.
- Robert S. Dubrow, San Carlos, Calif. ; Geoffrey Samuels, New York, N.Y.; Robert J. Molinari, Wayne, Pa. Specimen display article. United states patent 5227205
- Robert W. Strausser. Method of freeze-drying flower arrangements. United states patent 4312134.
- Romero-sierra et al., Flower preservation. United States Patent 4272571
- Rossetto M, Vanzani P, Zennaro L, Mattivi F, Vrhovsek U, Scarpa M, Rigo A. (2004). Stable free radicals and peroxy radical trapping capacity in red wines. *J Agric Food Chem* 52: 6151-6155.
- S.H. Lim, C.F. Liew, C.N.Lim, Y.H. Lee and C.J. Goh.(1997). A simple and efficient method of DNA isolation from orchid species and hybrids. *Biologia plantarum* 4,(2):313-316,
- Schwarz, M., Wabnitz, T. C., & Winterhalter, P. (2003). Pathway leading to the formation of anthocyanin – vinylphenol adducts and related pigments in red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(12), 3682-3687.
- Schwarz, M., Wray, V., & Winterhalter, P. (2004). Isolation and identification of novel pyranoanthocyanins from black carrot (*Daucus carota* L.) juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 5095-5101.
- Starr, M. S., & Francis, F. J. (1973). Effect of metallic ions on color and pigment content of

- cranberry juice cocktail. *Journal of Food Science*, 38(6), 1043-1046.
- Stintzing, F. C., & Carle, R. (2004). Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition. *Trends in Food Science and Technology*, 15(1), 19-38.
- Wei Chen, Karen L.B. Gast, Sheri Smithey.(2000). The effects of different freeze-drying processes on the moisture content, color, and physical strength of roses and carnations. *Scientia Horticulturae* 84 321-332
- Wheldom and Wesley, Codicote, Hitchin.(1984). The bibliography of K. L. Stock: *Rose books*, Great Britain, characterizes 3279 works.
- Wiermann, E. Wollenweber, C. Rehse, Z. Naturf.(1981).Only highly oxygenated and methylated flavonols give rise to yellow colors in flowers and pollen; cf. R. C 36(1981) 204; J. B. Harborne, *Phytochemistry* 20 1117
- Wrolstad, R. E., Durst, R. W., & Lee, J. (2005). Tracking color and pigment changes in anthocyanin products. *Trends in Food Science and Technology*, 16(9), 423-428
- Yoshida, K., Kitahara, S., Ito, D., & Kondo, T. (2006). Ferric ions involved in the flower color development of the Himalayan blue poppy, *Meconopsis grandis* *Phytochemistry*, 67(10), 992-998.
- Zhu Wenxue, Dong Tieyou, Zhang Zhengyong. Experimental study on treatment of immortal peony flower. *Luoyang Institute of Technology*, Luoyang, 471039
- 王向前, 生物標本保色防腐劑配置方法, 中華人民共和國專利 CN 88105221 A
- 王忠民, 石秀花, 李瑾瑜, 2007, 野玫瑰色素理化性質的研究, *食品科學* Vol.28, No.06
- 王星臣, 一種冷凍保鮮蔬菜及保鮮方法, 中華人民共和國專利 CN 1105814A
- 朱廣廉, 鐘誨文, 張愛琴, 1994, *植物生理學實驗*, 淑馨出版社
- 沈仲剛, 1998, *玫瑰花栽培*, 園藝世界雜誌社, 97-101
- 林國筆, 1990 國內專利 159041
- 原著者:William G. Hopkins、Norman P. A. Huner, 編譯者:徐善德,廖玉琬,2006, *植物*

生理學, 第三版, 偉明圖書有限公司, 55-63

郭建華, 2005, 植物綠色固定保色 AB 液的實驗研究, 廣西中醫學院

湯法銀, 2006, 綠色藥用植物水浸標本的製作探討, 鄭州牧業工程高等專科學校

黃肇宇, 2006, 植物標本原色澤的保色技術研究, 玉林師範學院學報

寧淑香, 鄒俠, 陳靜, 劉焰, 2000, 朝鮮野菊花色素的提取及其穩定性研究, *Journal of Liaoning Teachers University*. Vol.23 No.1, 77-80

劉坤, 1994, 水果浸漬標本的製作與保存, *Beifang Guoshu*

藍偉, 蔡健, 胡慶菊, 2007, 玫瑰花瓣乾燥保色技術與機理研究, *Anhui Agri. Sci. Bull*, 13(4):67-68

