

國立清華大學
分子與細胞生物研究所
碩士論文

新式保存花朵色澤、形態及 DNA 之浸液方法:以石斛蘭為例

A new method of preserving fresh flowers:

Taking *Dendrobium* as an example



姓 名:洪子洵 (Hung, Zi-Shun)

學 號:9680589

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

在清華的日子，算一算也快要六個年頭了，清大的一草一木，每個場所都有屬於我的回憶。這本論文是我兩年來的成果，在這個過程中包含了許多人的支持及鼓勵。首先，我要感謝我的指導教授李家維老師，在二年前我從化學系畢業跨領域到生科時，引導我從彷徨無助中走出來，給了我一個這樣有創意的題目，還有充足的資源與自由的發揮空間，並適時指導一個明確的方向。

感謝我最重要的實驗夥伴林其昌同學，我們各自從不同的領域來此相聚，一起面對這個挑戰，過程中感謝你在我消極的時候給予鼓勵與協助，也感謝你對我的包容以及兩年多來的陪伴。也感謝實驗室的吳欽翔學長在實驗技術以及觀念上的指導，讓我可以疑惑時能找到答案。感謝管理實驗室事務的康美華學姐，讓我們做實驗無後顧之憂。感謝張毓倫學妹以及劉士銜學弟，你們讓實驗室永遠充滿生氣，讓原本無味的實驗室生活，樂趣十足，感謝常幫忙買東西的士銜學弟，辛苦了。

最後，我要感謝我的家人，你們總是默默的在我的背後支持著我，父母的開明讓我對自己的選擇可以大步地向前邁進。感謝嫻蕙，在我最後一段準備論文以及口試的日子裡，在我的身邊陪伴我鼓勵我向前進。感謝每個幫助過我的人。

Abstract

Although traditional plant preservation methods (e.g. soaking in formalin or in high percentage alcohol) can effectively preserved the configuration of specimens, losses of hues is an unsolved problem. Anthocyanins, the main pigment of colorful flowers, are water-soluble, unstable, and susceptible to external environmental factors such as pH, temperature, light, and other substances like enzymes. So preservation and stabilization of anthocyanins is here the key step in preserving hues of flowers. In this research, *Dendrobium* orchids are used as objects of study, we successfully developed a preservation solution which is able to keep the color, morphology, and DNA of *Dendrobium* orchids. In the study, we modified the pH-differential method and used HPLC to carry out quantitative and qualitative analysis of anthocyanins. Electrophoresis and PCR were used to analyze the effect of the preservation solution on leaf DNA. The results reveal that the content of anthocyanins declined significantly at the first two weeks then became stable in the long-term tracking. The hues of *Dendrobium* orchids are basically the same. There is no significant degradation of leaf DNA, and the DNA extracted from the mersed samples could be subjected to PCR amplification. These results suggest that the preservation solution not only can keep the appearances of the flower *Dendrobium* orchids but also the leaf DNA. This research has important potentials for academic and applicative purposes.

摘要

傳統的植物浸漬標本保存方法，如：福馬林或 70% 酒精，雖可有效保存形態，但卻無法維持標本的色澤。花青素為花朵呈色的主要色素之一，此類水溶性小分子易受環境影響(如：pH 值、溫度、酵素…等)產生降解，因此保存或安定了花青素即可維持花朵的主要色澤。本研究以蘭科植物中的石斛蘭屬(*Dendrobium*)花朵為材料，成功配製可有效保存石斛蘭的色澤、形態以及 DNA 之保存液。實驗中採用高效率液相層析法(HPLC)及酸鹼值差異法(pH-differential methods)檢測花青素在保存液中降解的情形，也進一步使用 DNA 電泳以及聚合酶連鎖反應放大技術(PCR)，探討此保存液對葉片 DNA 的影響。實驗發現，此保存液雖會造成花朵之花青素部分的降解，但仍可使其穩定維持目測之色澤。此保存液對葉片 DNA 也無顯著破壞，特定之基因序列仍可由 PCR 鑑定出來。由這些結果顯示，本研究之保存液確實可有效的保存石斛蘭標本的色澤、形態以及 DNA，不僅在學術上有其重要價值，在商業上亦有其發展的潛力。



目次

目次.....	1
一. 緒論.....	4
二. 文獻探討.....	6
1. 石斛蘭簡介.....	6
1.1 石斛蘭.....	6
1.2 石斛蘭屬(<i>Dendrobium</i>)常見的花青素種類.....	8
2. 花青素(Anthocyanidins).....	9
2.1 花青素的化學結構.....	9
3. 影響花青素顏色穩定度的因素.....	13
3.1 結構.....	13
3.2 濃度.....	13
3.3 pH 值.....	14
3.4 溫度.....	15
3.5 酵素.....	16
3.6 其他的影響因素.....	16
4. 共呈色效應(Copigmentation).....	16
4.1 Copigments.....	18
4.2 分子間共呈色效應(Intermolecular copigmentation).....	18
4.3 分子內共呈色效應(Intramolecular copigmentation).....	19
4.4 自體結合(Self-association).....	20
4.5 金屬複合作用(Metal complexation).....	20
5. 植物標本保存方法探討.....	20
5.1 浸液保存法.....	21
5.2 其他保存法.....	21
6. 實驗目標.....	23

三.實驗方法與材料.....	24
實驗流程	24
實驗方法	25
1. 石斛蘭標本製作.....	25
1.1 浸漬液配製.....	25
1.2 花朵處理.....	25
2. 石斛蘭標本色素分析方法.....	25
2.1 花青素萃取.....	25
2.2 酸鹼值差異法(pH differential method)	25
2.3 高效率液相層析(HPLC).....	27
4. 石斛蘭標本 DNA 保存分析	27
3.1 石斛蘭標本葉片基因體 DNA(Genome DNA)保存分析.....	27
3.2 石斛蘭葉片基因體 DNA 萃取.....	27
3.3 石斛蘭葉片植物裸露(Extracted genome DNA)保存實驗.....	28
3.4 聚合酶鏈鎖反應(Polymerase chain reaction, PCR)	29
四. 實驗結果	30
1. 石斛蘭花朵浸漬標本保存狀況評估	30
2. 石斛蘭標本花青素定量及定性結果	35
3. 裸露基因體 DNA (extracted DNA)浸漬保存結果.....	39
4. 石斛蘭葉子標本 DNA 保存情形分析	41
5. 石斛蘭葉片標本 DNA 電泳分析.....	42
五.討論.....	45
1.保存液成分對於石斛蘭保色探討	45
2. 保存方法試驗探討	46
3. 硼酸與其他替代酸類的探討.....	46
3. 花青素含量變化探討	52
4. 石斛蘭標本 DNA 保存情形探討	52

5. 未來工作	53
六.結論	54
七.參考文獻	55

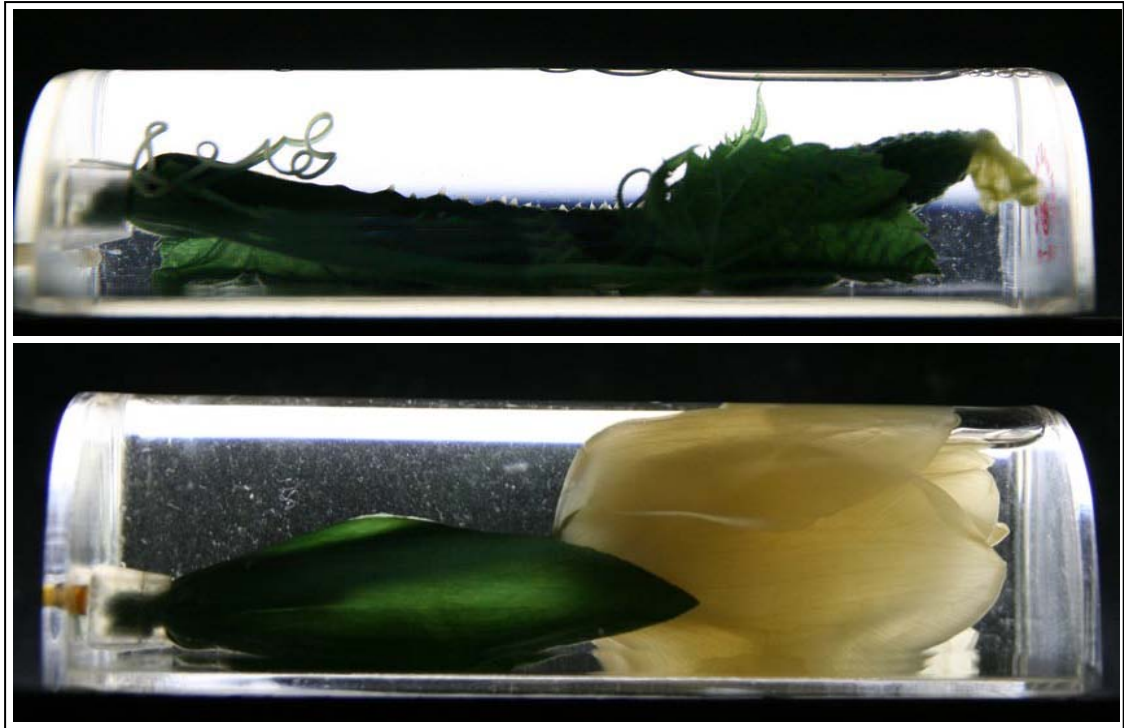


一. 緒論

標本浸液保存時的保色問題，長期以來受到相當多的關注，前人也有許多研究，希望能將標本形態與色澤同時並長久保存。有關於植物保存方面的研究，初期多是關於抗菌(antimicrobials)(Goossens et al., 1997)以及防腐(antiseptics)(Goshorn et al., 1938)的研究，並不注重植物原色的保存。最傳統的植物標本保存方法是臘葉保存法，此法是將植物組織壓平乾燥後保存，樣品在乾燥過程中便會褪色。目前世界上博物館浸液保存標本的方法多用 70% 酒精(alcohol)、4% 福馬林(formalin)保存標本，此類保存液雖能有效保存標本的形態，但標本原色會淡化或呈現黃褐色，且標本中的 DNA 也會受到嚴重的破壞。

本研究最初的動機，為我們發現中國旅順園藝試驗場製作的保鮮工藝品(圖一)，主要以壓克力材質的容器中裝入溶液以及植物構成。該容器中的植物顏色仍然鮮豔如原色，且此形態可以保持長達一年甚至數年。此類工藝品除了觀賞價值更具學術研究的重要性，但經由我們深入了解之後，發現其成功保存的植物，組織內多含大量類胡蘿蔔素(carotenoids)以及葉綠素(chlorophyll)(如:小黃瓜、鬱金香等)，而對於主要由花青素(anthocyanins)呈色的部位保存成效不彰，促使我們想深入研究花青素呈色植物的保存保色方法。

花青素為大部分植物花朵呈色的主要色素，保存花青素是花朵保色的主要關鍵，但此類水溶性分子化性不穩定且保存難度高。石斛蘭屬(*Dendrobium*)的蘭花為市面上常見且深受國人喜愛的花種，取得方便且內含豐富的花青素，故本實驗以石斛蘭為主要研究對象，研究能有效保存石斛蘭花色澤以及外形的浸漬液配方。



圖一. 旅順園藝試驗場工藝品(上圖為小黃瓜；下圖為鬱金香)。



二. 文獻探討

1. 石斛蘭簡介

1.1 石斛蘭

石斛蘭是樹蘭亞科(Epidendroideae)的成員，學名是 *Dendrobium*。 *Dendrobium* 一詞源自希臘語，*dendron* 是樹木，而 *bium* 就是生長，以其著生於樹木的情況命名。石斛蘭屬(*Dendrobium*)為複莖類著生蘭，種類超過 2,000 種，為蘭科植物中僅次於飛燕蘭屬(*Bulbophyllum*)的大屬。分佈於東南亞、印度、喜馬拉雅，一直延伸北到日本，南到澳洲、紐西蘭，東到大溪地等廣大區域(郭玉梅, 1999)。

「石斛」這個中文名稱十分特別，典故源於中藥界，最早的記載為南北朝陶弘景校訂的神農本草經，由於石斛蘭屬的莖部形狀與金釵的骨相似，因此又有金釵石斛以及金釵等別稱。石斛莖部含有石斛鹼，是項名貴藥材具清熱、潤肺、驅毒、消炎、強筋壯骨等功效(薛聰賢, 2002)。

石斛蘭花的形狀特徵為左右兩側萼片攏成類似下巴的形狀，其植株大小、形態以及花朵的顏色與形狀等，都隨著種類不同而有差異。可依開花季節分成春天開花的春石斛以及秋天開花的秋石斛(圖二)兩大類。春石斛花開在莖節兩側。秋石斛花開在莖的頂端，每一梗開花十數朵，花型包括大花蝴蝶蘭型和小花捲瓣型。石斛蘭花形小、花色豔，其切花為插花的高級花材，因其生性強健、耐旱，對環境適應力廣，又被稱為「父親之花」，在商業以及醫學方面具很重要的價值(薛聰賢, 2002)。



圖二. 常見的秋石斛

1.2 石斛蘭屬(*Dendrobium*)常見的花青素種類

對於石斛蘭屬裡花青素種類研究的資料並不多。1973 年 Lowry 和 Keong 首次發現 cyanidin-3-glucoside 存在於 *D. cornutum* 以及 *D. crocatum* 中 (Lowry and Keong, 1973)。最近的研究指出，與其他的蘭科植物相同的是，在石斛蘭中出現的主要花青素為 cyanidin-3-7-3'-triglucoside(表一)(Saito et al., 1994, Williams et al., 2002, Saito et al., 1995, Tatsuzawa et al., 1997)。

表一. 樹蘭亞科(Epidendroideae)四個屬的花青素種類及結構(adapted from Tatsuzawa et al., 2005)

Classification			Glycoside type ¹	Acyl position and type ²	
Tribe	Subtribe	Genera		Aromatic acid	Aliphatic acid
Dendrobieae	Dendrobiinae	<i>Dendrobium</i>	Cy 3,7,3'-triglucoside	7,3'-Sin	3-Mal
			Cy 3,7,3'-triglucoside	7,3'- <i>p</i> -HB	3-Mal
Epidendreae	Laeliinae	<i>Cattleya</i>	Cy 3,7,3'-triglucoside	7,3'- <i>p</i> -Cou, Caf, Fer	3-Mal
		<i>Laelia</i>	Cy 3,7,3'-triglucoside	7,3'- <i>p</i> -Cou, Caf, Fer	3-Mal
		<i>xLaeliocattleya</i>	Cy 3,7,3'-triglucoside	7,3'- <i>p</i> -Cou, Caf, Fer	3-Mal
		<i>Sophranitis</i>	Cy 3,7,3'-triglucoside	7- <i>p</i> -Cou, Caf, Fer	3-Mal
Vandaeae	Aeridiinae	<i>Vanda</i>	Del 3,7,3'-triglucoside	7,3'-Sin, Fer	3-Mal
			Cy 3,7,3'-triglucoside	7,3'-Sin, Fer	3-Mal
		<i>Phalaenopsis</i>	Cy 3,7,3'-triglucoside	7,3'-Sin, Fer	3-Mal
Arethuseae	Bletiinae	<i>Bletilla</i>	Cy 3,7,3'-triglucoside	7,3'- <i>p</i> -Cou, Caf	3-Mal

1. Del, delphinidin ; Cy, cyanidin
2. Sin, sinapic acid ; Fer, ferulic acid ; *p*-HB, *p*-hydroxybenzoic acid ; *p*-Cou, *p*-coumaric acid ; Caf, caffeic acid ; Mal, malonic acid

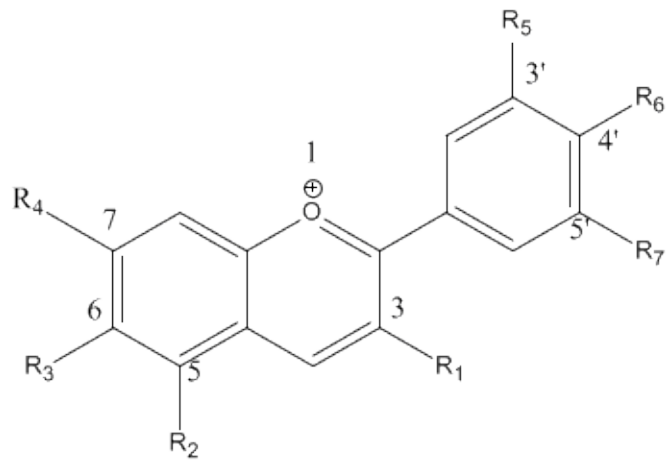
2.花青素(Anthocyanidins)

植物的色澤是由多種不同的植物色素組成的結果，其中花的呈色主要是由花青素類分子所決定，因此花青素在植物的色澤扮演相當重要的角色。

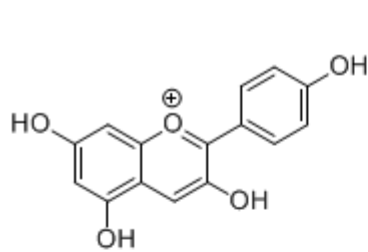
2.1 花青素的化學結構

花青素或譯為花色素、花青苷，屬於多酚類(polyphenols)中的類黃酮(flavonoid)一類，這個類別中的化合物典型結構為 $C_6C_3C_6$ -骨架。花青素為多羥基(polyhydroxyl)取代及多甲氧基(polymethoxyl)取代的 2-phenylbenzopyrylium cation 衍生物 (圖三) (Rein, 2005)。若花青素具醣基取代時，其分子稱之為花青素苷(anthocyanins)，花青素苷的主要結構可分為非配糖體(aglycone)以及其取代糖基兩個部分，非配糖體於酸性環境為 flavylium cation，其結構具有許多共軛雙鍵(conjugated double bonds)，在吸收光譜中可吸收 500 nm 附近的光而呈現紅色。

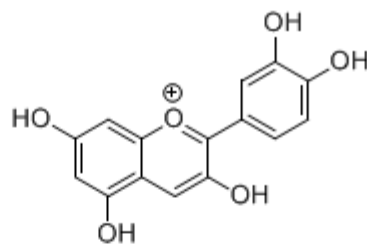
花青素苷結構中的非配醣體，多為五取代基(3,5,7,3',4')或六取代基(3,5,7,3',4',5')的化合物，目前已知的花青素有 21 種(表二) (Fancis, 1989; Andersen, 2002; Devia et al., 2002)。其中重要而且較常見的六種分別是:紅紫色的矢車菊色素(cyanidin)、紅色的甲基花色素(peonidin)、橘紅色的天竺葵色素(pelargonidin)、藍紫色的花翠素(delphinidin)、深紫色的錦葵色素(malvidin)和紫色的甲花翠素(petunidin) (圖四)，這些花青素的主要差別為環上取代基數目及種類的不同。花青素在自然界多以花青素苷的形式存在(Harbone, 1967)。



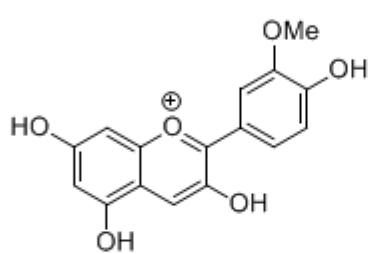
圖三. 花青素的基本結構。



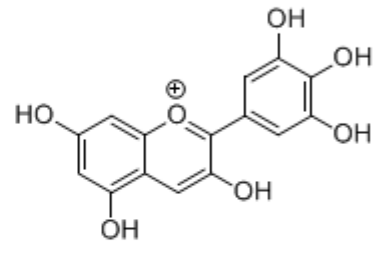
Pelargonidin



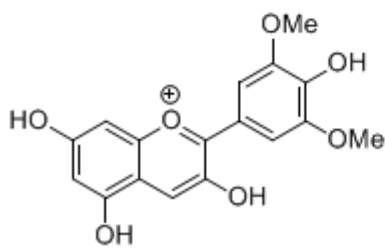
Cyanidin



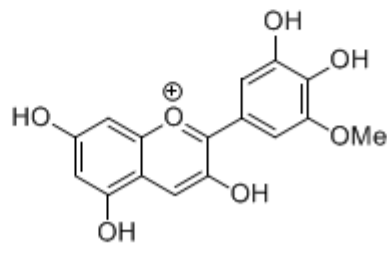
Peonidin



Delphinidin



Malvidin



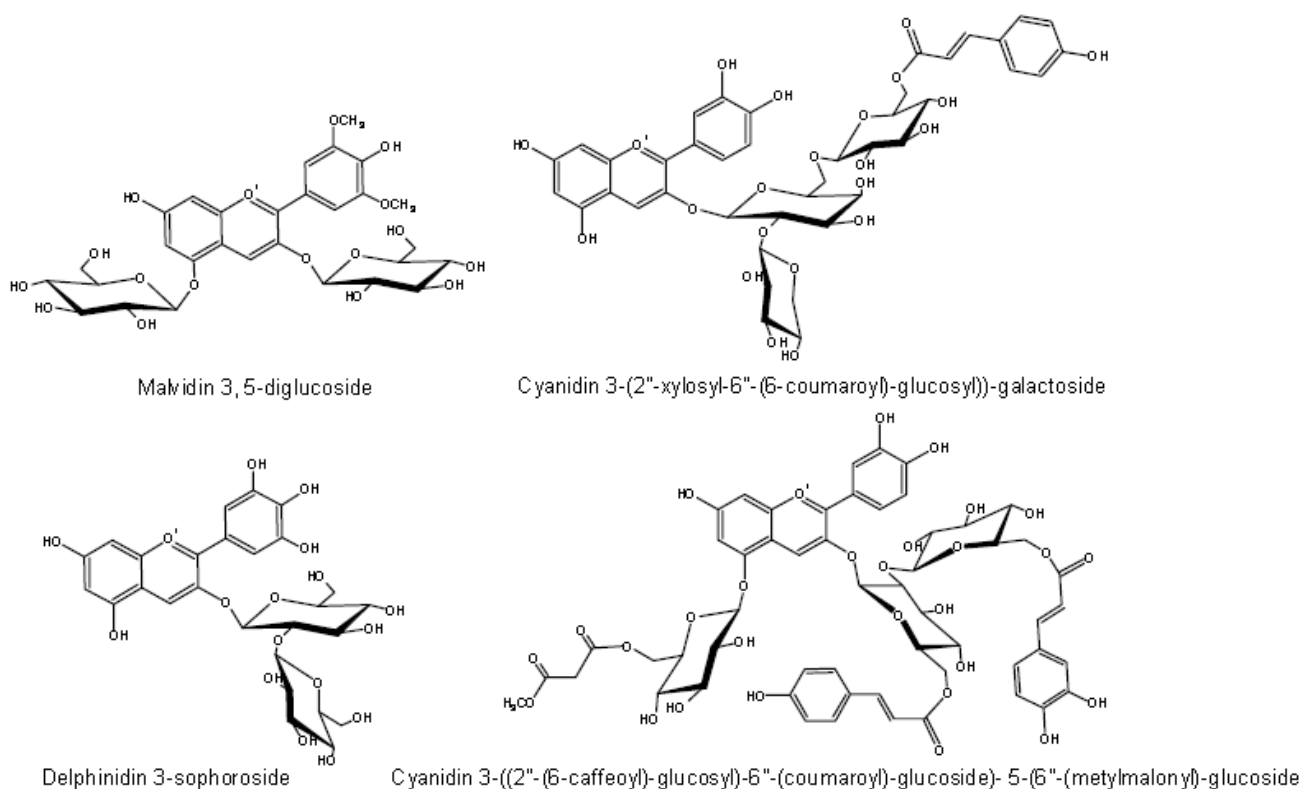
Petunidin

圖四. 六種主要的天然花青素。

表二. 常見的 21 種花青素及其顏色(粗體為常見的六種花青素)。

Anthocyanins	Substitution pattern							color
	3	5	6	7	3'	4'	5'	
Apigenin	H	OH	H	OH	H	OH	H	Orange
Arrabidin	H	H	OH	OH	H	OH	OCH ₃	None
Aurantidin	OH	OH	OH	OH	H	OH	H	Orange
Capensinidin	OH	OCH ₃	H	OH	OCH ₃	OH	OCH ₃	Bluish red
Carajurin	H	H	OH	OH	H	OCH ₃	OCH ₃	None
Cyanidin	OH	OH	H	OH	OH	OH	H	Orange
Delphinidin	OH	OH	H	OH	OH	OH	OH	Bluish red
Eupinidin	OH	OCH ₃	H	OH	OCH ₃	OH	OH	Bluish red
Hirsutidin	OH	OH	H	OCH ₃	OCH ₃	OH	OCH ₃	Bluish red
3'-Hydroxyarrabidin	H	H	OH	OH	OH	OH	OCH ₃	None
6-Hydroxycyanidin	OH	OH	OH	OH	OH	OH	H	Red
6-Hydroxydelphinidin	OH	OH	OH	OH	OH	OH	OH	Bluish red
Luteolin	H	OH	H	OH	OH	OH	H	Orange
Malvidin	OH	OH	H	OH	OCH₃	OH	OCH₃	Bluish red
5-Methylcyanidin	OH	OCH ₃	H	OH	OH	OH	H	Orange red
Pelargonidin	OH	OH	H	OH	H	OH	H	Orange
Peonidin	OH	OH	H	OH	OCH₃	OH	H	Red
Petunidin	OH	OH	H	OH	OCH₃	OH	OH	Bluish red
Pulchellidin	OH	OCH ₃	H	OH	OH	OH	OH	Bluish red
Rosinidin	OH	OH	H	OCH ₃	OCH ₃	OH	H	Red
Tricetinidin	H	OH	H	OH	OH	OH	OH	Red

花青素苷因具有醣類取代基的結構，故在水中穩定且溶解度佳(Timberlake and Bridle, 1966)，醣類取代基若為單取代(monoglycoside)大部分在 3-hydroxyl 位置，雙取代(diglycosides)則多在 3-hydroxyl 和 5- hydroxyl 的位置。但在蘭花中較為特別，主要取代在 3-hydroxyl 和 7- hydroxyl 的位置，三取代(triglycosides)則多為兩個取代基在 C-3，另外一個出現在 C-5 或 C-7 位置上(圖五)。



圖五. 含有取代基的花青素(Rein, 2005)。

除了醣類取代基外，花青素也會與有機酸進行醯基化反應(acylation)，多在花青素的醣基位置反應而與醣基形成酯鍵(ester bond)，常見反應的有機酸包括：malonic、acetic、malic、succinic 和 oxalic acids(Rein, 2005)。

3. 影響花青素顏色穩定度的因素

花青素在自然界中為不穩定的化合物，很多因素會影響花青素的顏色穩定度，例如：pH 值、花青素濃度、溶劑、溫度、花青素結構、氧氣、酵素等。

3.1 結構

花青素的醣類取代基及有機酸取代基不同造成其分子結構的差異，對花青素的反應活性及穩定性會產生不同的影響。

非配醣體上羥基的增加可以穩定花青素，如：花翠素(delphinidin)在酸性甲醇中較矢車菊色素(cyanidin)穩定(Dao et al., 1998)。若增加非配醣體上之甲氧基取代會減低花青素的穩定性，甲氧基取代在色素 C-4' 以及 C-7 的穩定度會比同樣位置為羥基的色素低(Mazza and Brouillard, 1987)。結構的不同除了影響花青素反應活性之外，對於花朵的呈色亦造成不同改變，隨著羥基的增加花青素的顏色會由粉紅漸漸地改變為藍色，而甲氧基的增加則會使趨勢相反(Mazza and Brouillard, 1987)。

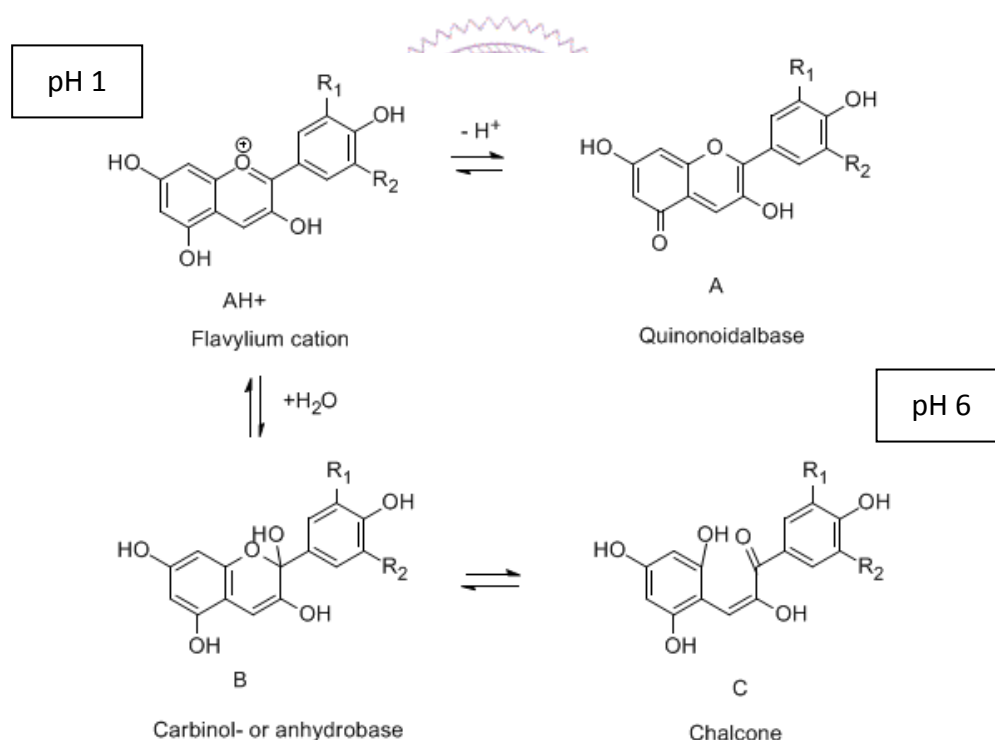
花青素上醣類取代基的增加已證實具穩定花青素的作用，研究指出 cyanidin 較 malvidin 穩定但卻比 malvidin- 3-glucoside 不穩定(Mazza and Brouillard, 1987)。

3.2 濃度

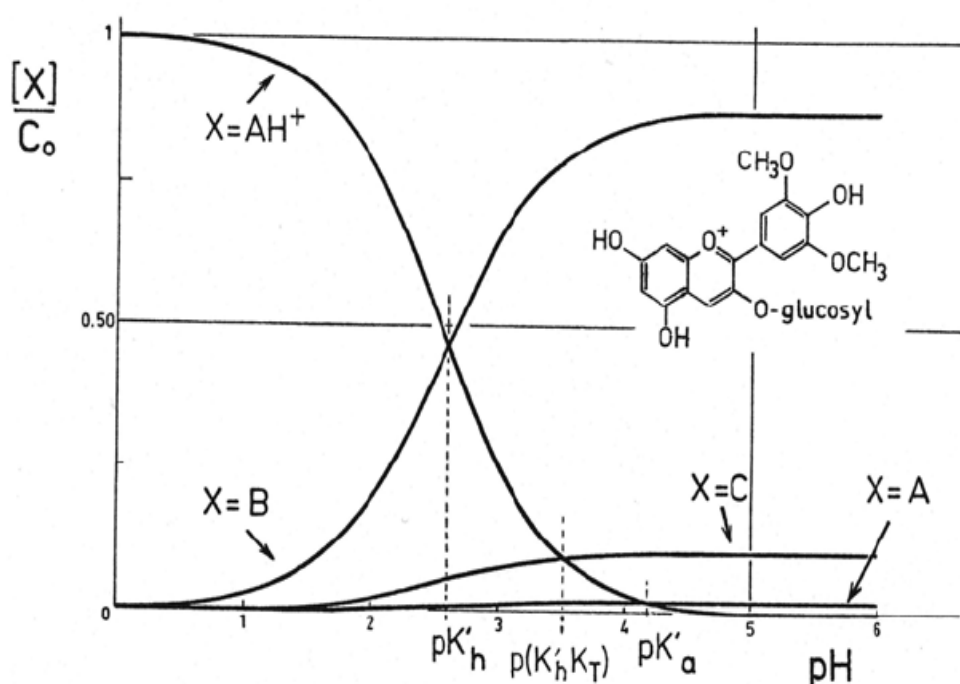
花青素濃度的增加能提升自身的呈色穩定度(Giusti and Wrolstad, 2003)，將矢車菊色素苷(cyanin)的濃度從 10^{-4} 提升到 10^{-2} 會使得顏色的強度增加 300 倍(Asen et al., 1972)，主要是透過花青素的 self-association 作用，造成自身穩定度增加而致(Brouillard, 1982)。Self-association 作用會在稍後的章節做詳細說明。

3.3 pH 值

花青素表現的顏色會因溶液 pH 值變化而改變。花青素於酸性環境主要存在的結構會有 flavylium cation、quinonoidalbase、carbinol pseudobase 以及 chalcone 四種(圖六) (Maarit Rein, 2005)。在 pH 1 時，紅色的 flavylium cation 為主要組成成分；在 pH 2 到 4 的範圍裡，quinonoidalbase 為主要組成；而當 pH 值提高到 5 到 6 之間時，無色的 carbinol pseudobase 和淺黃色的 chalcone 為主要組成(圖七)。在更廣泛的 pH 值範圍，有些花青素被證實在 pH 8 到 9 的範圍會增加色素的穩定度，但色彩強度並未增加(Fossen et al., 1998)。花青素的呈色的不同，主要是受到上段提到的在不同 pH 值下，四種主要成分會同時存在但組成比例不同所造成的結果。



圖六. 不同 pH 值時，花青素的四種不同結構。



圖七. Malvidin-3-glucoside 四種結構(A)Flavylium cation (B)Quinonoidalbase (C) Carbinol or anhydrobase (D)Chalcone 在不同 pH 值時平衡的比例(Brouillard, 1982)。

在 pH 1 時，紅色的 flavylium cation(AH^+)為主要成分，但當 pH 值升高，flavylium cation 會漸漸轉變為其他兩類結構而造成顏色流失(Brouillard, 1982)。若 pH 值高於 7 時，花青素會處於十分不穩定且易分解的狀態。因此，pH 值對花青素顏色的呈現影響甚鉅。

3.4 溫度

當保存花青素的溶液或環境溫度增加時，花青素的降解速率會隨之上升(Palamidis and Markakis, 1978)。在 pH 2 到 4 之間，溫度上升會使得花青素苷的醣類取代基斷裂，形成較不穩定的花青素結構，造成花青素降解成褐色產物，此情形在氧氣的存在的條件會更為明顯(Markakis et al., 1957)。減低 pH 值以及移除

氧氣後，溫度上升對花青素降解速率增加的影響會減小。

3.5 酵素

研究指出在植物中的數種酵素如:glycosidases、peroxidases 以及 phenol-ases 等，都是會使花青素降解的常見酵素(Huang, 1955；Pifferi and Cultrera, 1974)。Glycosidases 會使得醣基與配醣體之間的共價鍵斷裂，產生不穩定的花青素，造成花青素降解(Huang, 1955)。

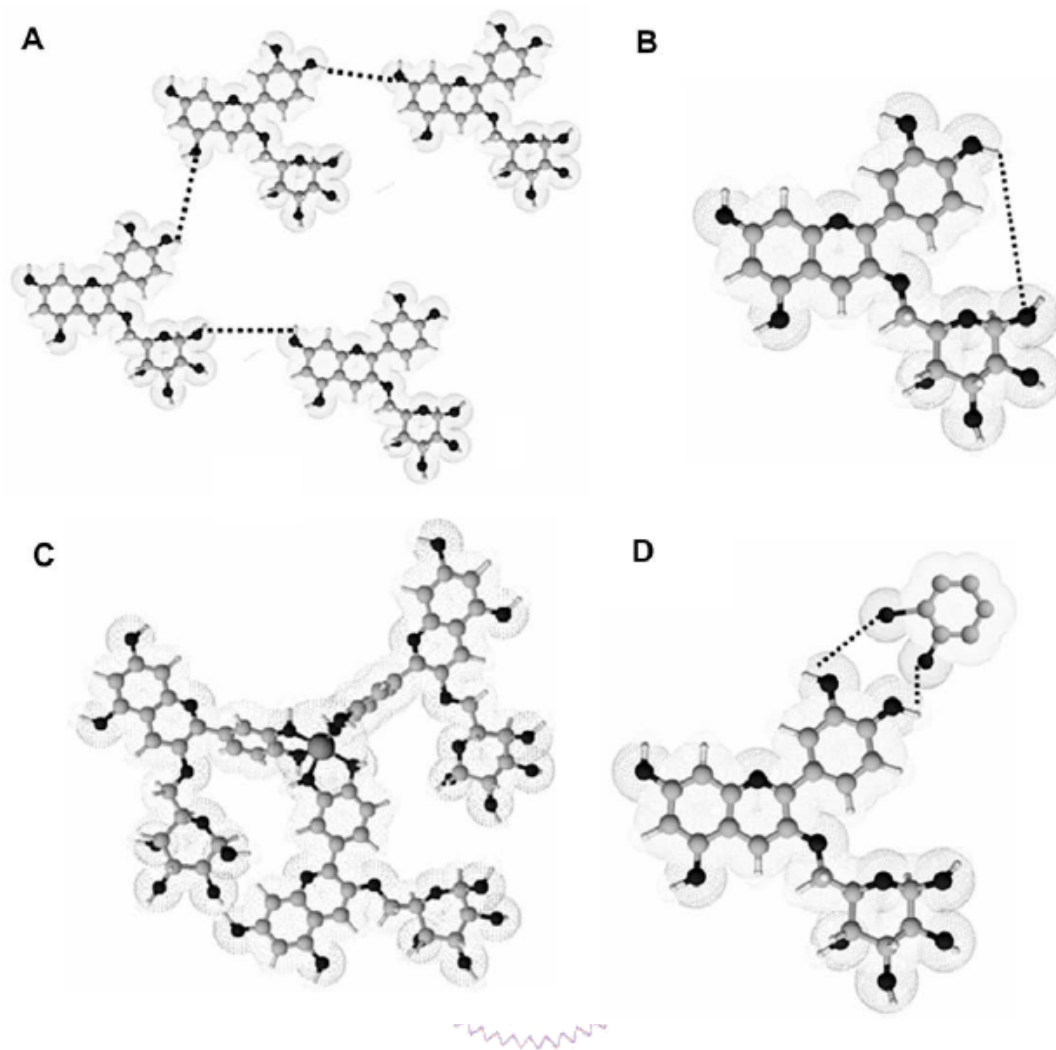
3.6 其他的影響因素

光照也會影響花青素的降解速率，影響的方式可大略分成兩種，一是光本身為花青素生合成步驟中不可或缺的因素，但也會造成花青素降解的速率增加(Markakis, 1982)。另一種方式則是因為光所帶來的熱，造成花青素因溫度的上升而降解。

除了上述的幾個原因之外，氧氣的存在已證實會擴大其它因素對增加花青素降解的速率(Nebesky et al., 1949)。

4. 共呈色效應(Copigmentation)

共呈色效應指色素與有機分子或金屬離子互相結合或互相作用形成複合分子，而共同呈色的現象(Boulton, 2001)。與色素進行共呈色效應的物質稱為 Copigments。研究指出共呈色效應為穩定花青素的主要機制，並對穩定植物顏色有明顯的作用(Mazza & Brouillard, 1990，Davies & Mazza, 1993)。共呈色效應主要的作用可分為四類，分別是：自體結合(self-association)、分子間共呈色效應(intermolecular copigmentation)、分子內共呈色效應(intramolecular copigmentation)以及金屬複合作用(metal complexation)(圖八)。



圖八. 共呈色效應 (A)自體結合 (B)分子內共呈色效應 (C)金屬複合作用 (D)分子間共呈色效應(Castaneda-Ovando et al., 2009)。

共呈色效應會造成花青素溶液發生 bathochromic shift，此現象指在可見光光譜範圍，最大吸收值的波長產生往更大波長的位移，此共呈色效應可使一種花青素的呈色由紅色轉變為偏藍色(Asen et al., 1972)；除此之外，hyperchromic effect 也在花青素的共呈色效應中發現，使光譜中吸收最大值會有上升的情形，即共呈色效應可增加花青素的色彩強度(Dangles and Brouillard, 1993)。也有研究指出紅酒主要的呈色，來自於花青素形成的美麗紅色。葡萄的花青素是不穩定且易分解的，但葡萄酒中的花青素卻能長久保存，其最主要的因素為共呈色作用 (Boulton,

2001 ; Darias-Martin et al., 2002 ; Gutierrez, 2003 ; Boselli et al., 2004)。

4.1 Copigments

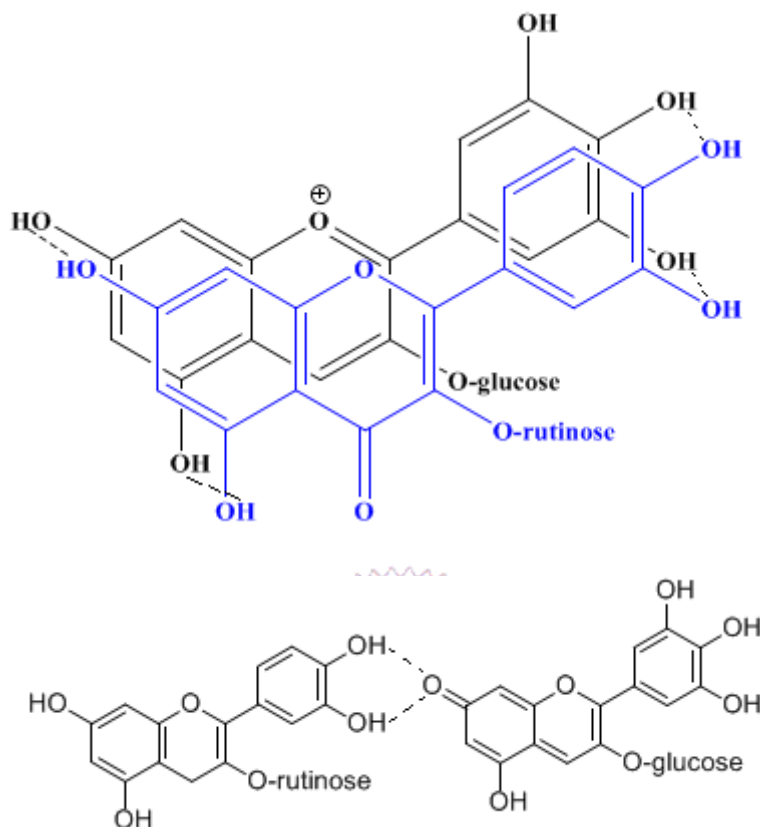
Copigments 通常是無色或者是帶一點淡黃色的化合物，在植物體內常在花青素周遭出現，比較常見的是類黃酮(flavonoids)、生物鹼(alkaloids)、胺基酸(amino acids)、有機酸(organic acids)、核酸(nucleotides)、聚醣體(polysaccharides)、金屬離子(metal ions)或者是其他的花青素(Brouillard et al., 1989)，其中以類黃酮的研究最為廣泛。Copigments 的結構具有豐富的 π 電子系統(π -electrons system)，容易與缺電子的 flavylium cation 連結在一起，此連結可保護 flavylium cation 的 2-position 不被水進行親核性攻擊(nucleophilic attack)或令 4-position 不被過氧化物(peroxides)以及二氧化硫(sulfur dioxide)攻擊而進行反應，可有效穩定花青素本身的結構，減低花青素降解的速率(Maarit, 2005)。

4.2 分子間共呈色效應(Intermolecular copigmentation)

分子間共呈色效應為花青素與無顏色的 copigments 之間非共價鍵的作用，主要的作用力為氫鍵的形成(hydrogen bonding)以及疏水性交互作用(hydrophobic interaction)(Asen et al., 1972 ; Brouillard et al., 1989)，主要種類的花青素都會發生此作用。分子間共呈色效應主要發生在花青素的 flavylium cation 以及 quinonoidal base 這兩種結構型態。其主要因素為此二結構為平面且具有非域化(delocalized)的 π 電子，由於具有相似的結構，所以 copigment 與 flavylium cation 以及 quinonoidal base 容易進行疏水性交互作用形成兩個互相重疊的分子。此種分子間共呈色效應使得水不易親核性攻擊(nucleophilic attack)花青素，避免其對花青素的破壞。

除了疏水性交互作用之外，另一主要的作用力為氫鍵(hydrogen bonding)。舉例而言，在此類作用中，位於花青素 7-和 4'-position 的酮類取代基(keto group)

會與黃酮醇(flavonols)的 7-、3'-或 4'- position 的羥基形成氫鍵(圖九)(Willams and Hrazdina, 1979)，亦有助於避免花青素的降解。



圖九. 分子間共呈色效應(delphinidin-3-glucoside & rutin)。

4.3 分子內共呈色效應(Intramolecular copigmentation)

因為與花青素的共價鍵結，讓 copigment 一度被視為花青素本身的架構，使得分子內共呈色效應初期不被重視。後來的研究將其定義為對花青素具穩定作用的 copigment 與花青素醯基化作用，此醯基化作用多發生在花青素的醯基部分。

Copigment 帶陰電性的芳香基部分，與帶正電性的 flavylum cation 互相作用，形成具有保護作用的堆積(stacking)，有效阻礙 C-2 以及 C-4 受到親核性反應物(如： H_2O)攻擊(Brouillard, 1981；Brouillard, 1983)。Brouillard 首先提出此防止親核性

攻擊的堆積為三明治堆積(sandwich type of stacking)機制的研究者, 醃基取代的多寡、取代基的結構以及位置都已證實會影響分子內共呈色效應, 且多取代基花青素的共呈色效應作用較單取代基花青素影響大。

4.4 自體結合(Self-association)

將花青素的濃度由 10^{-4} 提升到 10^{-2} M 時, 會使光譜在 507 nm 到 502 nm 的吸收最大值增加 300 倍, 此一現象源於花青素的 self-association。花青素的 self-association 機制與上述提到的堆積作用相似(Asen et al., 1972), 主要來自於花青素本身結構上的非極性作用力。

4.5 金屬複合作用(Metal complexation)

很多花朵顏色形成的原因係與紅色 flavylum cation 與藍色金屬的螯合(chelate)有關(Clifford, 2000)。最常與花青素進行螯合作用的金屬為: 錫(Sn)、鐵(Fe)、鋁(Al)、銅(Cu)、鎂(Mg)以及鉀(K)(Starr and Francis, 1974; Markakis, 1982)。

並非所有種類的花青素都會與金屬螯合。只有在B環上擁有一個以上可自由取代的羥基的矢車菊色素、花翠素以及甲花翠素具備與金屬螯合的能力。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Al、Fe、Cu、Sn(Starr & Francis, 1973)或Mg以及Mo結合造成的(Hale et al., 2001)。更多最近的研究指出於pH 5的環境, O-di-hydroxyl anthocyanins與Fe(III)或Mg(II)結合是造成植物產生藍色必需的反應(Yoshida et al., 2006)。

5. 植物標本保存方法探討

傳統的植物保存方法很多, 例如: 浸液保存法、低溫真空乾燥、插枝吸收法等, 本篇選擇其中主要的浸液保存法來做介紹。

5.1 浸液保存法

傳統的浸液保存法多半利用 5% 的福馬林或 70% 的酒精作為標本浸漬液，以保存標本的形態。這個方法雖然簡便，但其最大的缺點在於植物原色無法保存，故本篇研究重點即為改進傳統保存法的保色部分。對於前人致力於植物保色的研究，也分為下列幾個部份介紹：

(1) 綠色標本保存法：

將綠色植物的葉片或果實洗淨消毒後，於高溫浸泡富含銅離子的酸性溶液（如：醋酸），主要的保色原理為葉綠素(chlorophyll)裡 porphyrin 中的鎂離子可被 H^+ 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 置換(王榮祥等人, 2007)。用酸處理樣品時， H^+ 易進入葉綠素，置換鎂離子形成去鎂葉綠素(pheophytin)，又稱為植物黑素，會使葉片呈褐色。去鎂葉綠素再與溶液中銅離子結合，形成銅代葉綠素，顏色會比原來穩定，達成保色的效果。以銅離子取代之後，再將樣品取出浸漬在酸性的甘油溶液(如：亞硫酸甘油溶液)中保存(黃肇宇, 2006；郭建華, 2005)。

(2) 黃色花果保色方法：

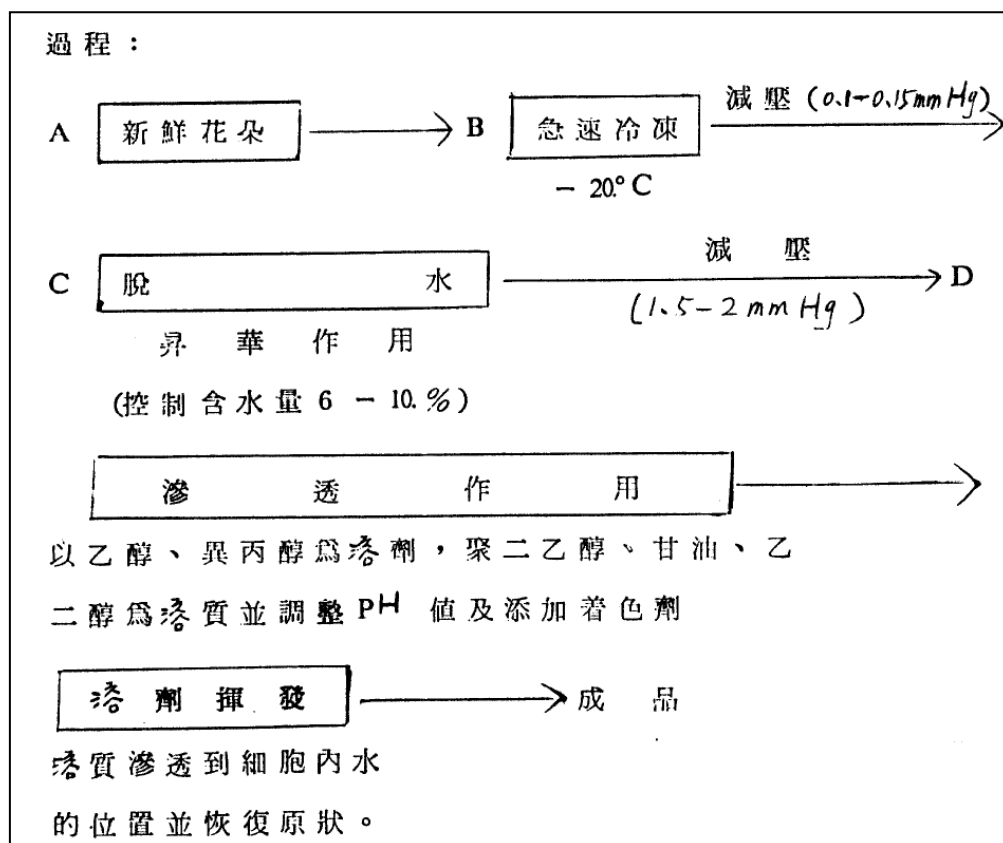
此類方法多半針對胡蘿蔔素以及葉黃素的保存研究，可分為前置步驟以及保存液兩個部份。前置步驟為將花果樣本以 5% 硫酸銅溶液浸泡數小時，浸泡完成的樣品再置入 1 % 亞硫酸水溶液中保存(段顯德, 1994)。

綠色以及部分黃色植物的保存方法是目前較成功的，其原因在於此類植物的主要呈色色素為較穩定的胡蘿蔔素或葉黃素。但主要呈色色素為花青素的花朵浸液保存方法，目前尚待更進一步的研究。

5.2 其他保存法

其他種類的植物保存方法在多篇專利中都提到相關研究，如利用冷凍乾燥技

術(Zhu, 2002)、插枝吸收法(US Patent 5627132)等。國內也有相關的發明，在 2007 年國際花展中展出的「不老花」即為其中一項，方法主要是將鮮花急速冷凍，利用其專利的灌油技術，再將花朵做灌油處理以達到保存效果(圖十一)。花朵經由此處理後可常保其光澤及彈性而不凋謝(圖十二)(林國筆,1990)，但此方法須將花朵與枝葉分開處理後接上，仍然有其不足之處。



圖十一. 「不老花」的保存方法(林國筆, 1990)。



圖十二. 「不老花」成品圖。

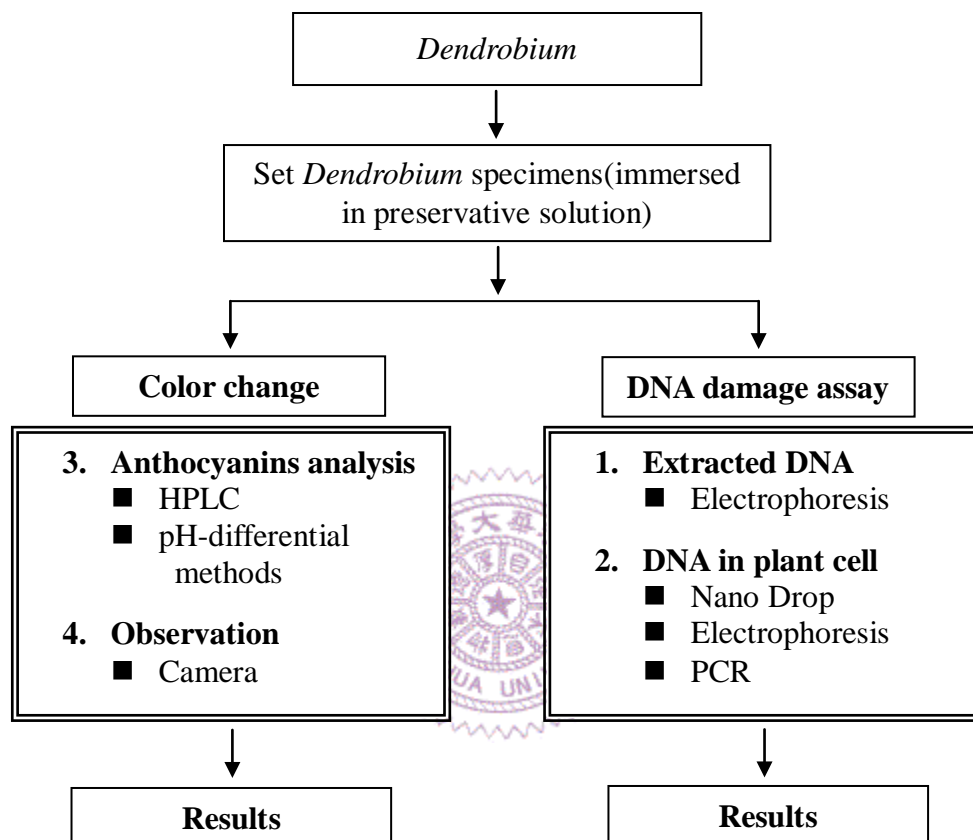


6. 實驗目標

1. 研究配製可將石斛蘭花形態以及色澤保存之保存液。
2. 觀察浸泡於保存液的石斛蘭花花青素含量變化。
3. 觀察浸泡於保存液的石斛蘭葉子組織之 DNA 是否受到保存液影響而破壞。

三.實驗方法與材料

實驗流程



實驗方法

1. 石斛蘭標本製作

本實驗的材料為 *Dendrobium sonia*，為台灣一般花市中常見的粉紫色石斛蘭。

1.1 浸漬液配製

溶劑：正戊醇(1-pentanol) 90%(v/v)，異丙醇(isopropanol)10%(v/v)。

溶質：硫脲(thiourea)1%(w/v)，硼酸(boric acid) 0.25%(w/v)。

1.2 花朵處理

以 ddH₂O 清洗新鮮的石斛蘭的花朵表面，再利用乾紙巾將表面水滴擦拭乾淨，去除花梗以下的部分，大約只留下 3 cm 花梗，處理完後將花朵置入 200 ml 乾淨標本瓶中，將上段配製的浸漬液倒滿標本瓶，並將標本瓶密封。

2. 石斛蘭標本色素分析方法

2.1 花青素萃取

將上述 *Dendrobium sonia* 植物標本取出，以真空幫浦真空乾燥 3 個小時；乾燥完成後，放入研鉢中研磨花瓣組織成粉末狀。配置 methanol:水:acetic acid=4:5:1 的萃取液，將粉末以 1 g/50 ml 萃取液的比例混合於燒杯中，再以儀器(LAB. Rotator)水平震盪 3 小時將花朵中的 anthocyanins 成分萃取出。

2.2 酸鹼值差異法(pH differential method)

關於花青素的定量，酸鹼值差異法是實行多年的實驗方法。利用在不同酸鹼值中，花青素特定波長的吸收值進行計算，可有效去除溶液中因其他成分造成的

誤差，得到可參考的數值(Lee et al., 2005)。

I. Reagents:

(a) pH 1.0 buffer (氯化鉀 potassium chloride, 0.025 M):

稱 1.86 g KCl 放置入 1 L 的燒杯，並加入 ddH₂O 980 mL 溶解之，再以濃鹽酸(ca 6.3 mL)調整 pH 值至溶液 pH=1.0 (±0.05)，將調整好 pH 值的溶液移至 1 L 的血清瓶，並加 ddH₂O 稀釋到體積等於 1 公升。

(b) pH 4.5 buffer (醋酸鈉 sodium acetate, 0.4 M):

稱 54.43 g CH₃CO₂Na·3H₂O 放置入燒杯中，並加入 ddH₂O 960 mL 溶解之，在以濃鹽酸(ca 20 mL)調整 pH 值至溶液 pH=4.5 (±0.05)，再將調整好 pH 值的溶液移至 1 L 的血清瓶，並加 ddH₂O 稀釋到體積至 1 L。

II. 測試溶液製備:

(a)將 5 ml 花青素萃取液以 pH 1.0 buffer 稀釋成 10 倍[DF(dilution factor)=10]到總體積為 50 ml。

(b)將 5 ml 花青素萃取液以 pH 4.5 buffer 稀釋成 10 倍[DF(dilution factor)=10]到總體積為 50 ml。

III. UV-Vis spectrometry:

以 Hitachi U-2800 spectrophotometer 對測試液(a)及(b)全波長掃描，並記錄其於 520 nm 以及 700 nm 的吸收值。

IV. 計算方法:

Anthocyanin pigment (cyanidin-3-7-3'-triglucoside equivalents, mg/L)

$$= \frac{A \times MW \times DF \times 10^3}{\epsilon \times l}$$

$A = (A_{520 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}})_{\text{pH 1.0}} - (A_{520 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}})_{\text{pH 4.5}}$

MW (molecular weight) = 773.55 for cyanidin-3-7-3'-triglucoside

DF (dilution factor)=10

E (extinction coefficient) = $12,300 \text{ L} \times \text{cm}^{-1} \times \text{mol}^{-1}$ for cyanidin-3-7-3'-triglucoside

l = pathlength in cm

2.3 高效率液相層析(HPLC)

對於石斛蘭花青素的 HPLC 定性實驗主要參考 F. Tatsuzawa 等人在 2005 所發表的文獻略微調整(Tatsuzawa et al., 2005):

分析條件如下:

實驗中使用的C-18分離管柱為VERCOPAK (14795 N5 ODS(C18) , 4.6×250 mm) , 並於室溫中進行分析鑑定。實驗中以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 ml/min的流速, 將溶劑B以梯度的方式於40分鐘內由20%拉升至85%。每樣品注射量為10 μl , 檢測器(Water 2796 Bioseparations Module)的偵測波長為530 nm。

3. 石斛蘭標本 DNA 保存分析

DNA 萃取方面的實驗因為花朵 DNA 萃取困難, 因此 DNA 萃取以及聚合酶連鎖反應(PCR)實驗採用 *Dendrobium yundi kelso x kingianum* 此種石斛蘭的葉片作為材料。

3.1 石斛蘭標本葉片基因體 DNA(Genome DNA)保存分析

分別將浸漬 1 day、1 week、1 month、2 month 以及 3 month 的石斛蘭葉片從標本瓶取出, 以真空幫浦快速將葉片表面的保存液抽乾, 進行 genome DNA 萃取實驗, 再進行電泳觀察其 DNA 保存情形。

3.2 石斛蘭葉片基因體 DNA 萃取

首先, 取 1g 新鮮石斛蘭的葉子, 以 10% (v/v) sodium hypochloride 消毒葉子

表面 10 分鐘，再用 ddH₂O 潤洗 5 次之後，將葉子置於研鉢加入液態氮磨碎成粉末。接著加入 0.6 cm³ 的 polyvinylpolypyrrolidone (100 mg cm⁻³)，然後將 6 cm³ extraction buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM EDTA, pH 8.0, 500 mM NaCl and 100 mM mercaptoethanol) 加入研鉢中與粉末一起研磨，接著再加入 0.4 cm³ 的 20% sodium dodecyl sulphate 混合後，改置入離心管。

將裝有萃取物的離心管在 65 °C 水浴 10 分鐘，加入萃取物 1/10 體積的 5 M potassium acetate (pH 5.2)，再冰浴 20 分鐘。接著用高速離心機(Hitachi High-speed Refrigerated Centrifuge himac CR22G2) 以 4 °C 、10,000 g 離心 20 分鐘，將上澄清液取出並加入 4 cm³ isopropanol 以沉澱 DNA。置入 -80 °C 冰箱 20 分鐘加速 DNA 沉澱速率。取出後低溫高速離心(4 °C , 10,000 g) 15 分鐘以取得沉澱物，在此之後，以 2 cm³ Tris EDTA 緩衝液(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH=8.0)(TE buffer)回溶，再加入 1 mm³ 的 RNase A(10 mg cm⁻³)之後，置入 37°C 水浴 30 分鐘。

將水浴過後的樣品加入 2 cm³ phenol:chloroform=1:1 的混合液萃取，並低溫高速離心(4 °C , 10,000 g)5 分鐘，再將水層移出，重覆上述過程兩次。接著，加入 1/10 混合液體積的 3 M sodium acetate (pH 5.2)以及 2.5 倍混合液體積的 100% ethanol，將樣品置入 -80 °C 冰箱 30 分鐘之後，做低溫高速離心 10 分鐘已取得 DNA 沉澱物，再以 70 % ethanol 清洗沉澱物後快速乾燥，再以 0.5 cm³ TE buffer 回溶後，即可保存在 4 °C 冰箱中 (Lim et al., 1997)。

3.3 石斛蘭葉片植物裸露(Extracted genome DNA)保存實驗

將上述方法萃取之 genomic DNA 取 50 µl 加入 500 µl 的 100% ethanol，之後置於 -20 °C 冰箱兩小時，沉澱 DNA。再使用高速離心機離心(14000 rpm, 20 min)，倒去上層液體留下已沉澱之 DNA。

再加入 50 µl 的保存液(pentenol 90%, isopropano 10%, thiourea 1%, boric acid 0.25%)。放置室溫陰暗處分別保存 1 week、2 week、1 month 以及 2 month 後取

出，加入 500 µl 的 100% ethanol 之後，置於-20 °C 冰箱兩小時以沉澱 DNA。

利用高速離心機離心(14000 rpm, 20 min)，倒去上層液體後加入 TrisEDTA buffer 回溶 DNA，最後進行 DNA 電泳觀察。

3.4 聚合酶鏈鎖反應(Polymerase chain reaction, PCR)

將浸漬時間不同的石斛蘭葉子標本取出，並進行 DNA 萃取，再將此 DNA 樣本進行聚合酶鍊反應的實驗。

本研究進行的聚合酶鍊反應是以可以程式控制的熱循環溫度的 Master cycler 系統 5333 (Eppendorf)，聚合酶是 0.4 units 的 *Taq* DNA polymerase(M0273S, BioLabs inc.)，所採用的引子(primer)序列與其相關條件如下：

PCR primer:

基因定義：

Dendrobium kingianum subsp. *camarvonense* 18S ribosomal RNA gene

反應條件：

1. 95 °C 1 min
2. 95 °C 30 sec
3. 50 °C 30 sec
4. 72 °C 1 min
5. 2~4 repeat 30 times
6. 72 °C 3 min

引子序列：

5'-TCTGCGAGAAGTCCATTGA-3'

5'-TACTAGGGGAATCCTCGTA-5'

反應產物: 852 bp



四. 實驗結果

1. 石斛蘭花朵浸漬標本保存狀況評估

粉紫色的石斛蘭花朵在浸漬液倒入之後，於室溫浸漬在保存液一個小時內，輕搖之，可以發現有水份混合在保存液中，這是來自於石斛蘭花朵的水份，因水份會造成花青素的降解，因此分別於 1, 3, 12, 及 24 小時後置換保存液，以達脫水目的。

原本顏色為粉紫色的石斛蘭花，在經過保存液的浸漬以及置換過程之後，顏色會變得較深，但與原色差異不大，唯有因為脫水的關係質地會變得硬脆。此過程中花朵的型態並未改變，與新鮮的(圖十三)以及剛浸泡在清水中的石斛蘭比較並無顯著差異(圖十四)，且在保存液中並未看見有色素析出的現象。

保存液置換完成後，經 1, 7, 28 及 50 天的觀察 (圖十五、圖十六)。發現在置換過程完成之後，花朵的顏色以及形態不再變化。與分別置於室溫下以及泡在清水中七天的花朵相比較(圖十七)，肉眼即明顯發現，其褪色以及型態改變的情形，大不相同。證實保存液能成功保存石斛蘭。

為了解光照對於標本保色的影響。我們將一組石斛蘭花標本置於兩管 20W 的日光燈管下 15 公分處長期照明。實驗發現，在 3 個月時，石斛蘭標本顏色開始變化，在 6 個月照明(光照度:70.5~71.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)下的石斛蘭標本，花朵原為紫色的部份減少，中間原為深紫色的舌瓣顏色也變得較淺(圖十八)，至於此實驗花青素的含量變化仍有待進一步的實驗證明。



圖十三. 新鮮石斛蘭花朵(2009.6.18)。



圖十四. 浸漬在清水中(2009.6.18) (左圖)以及保存液 1 天石斛蘭花(右圖)的比較(2009.6.20)。



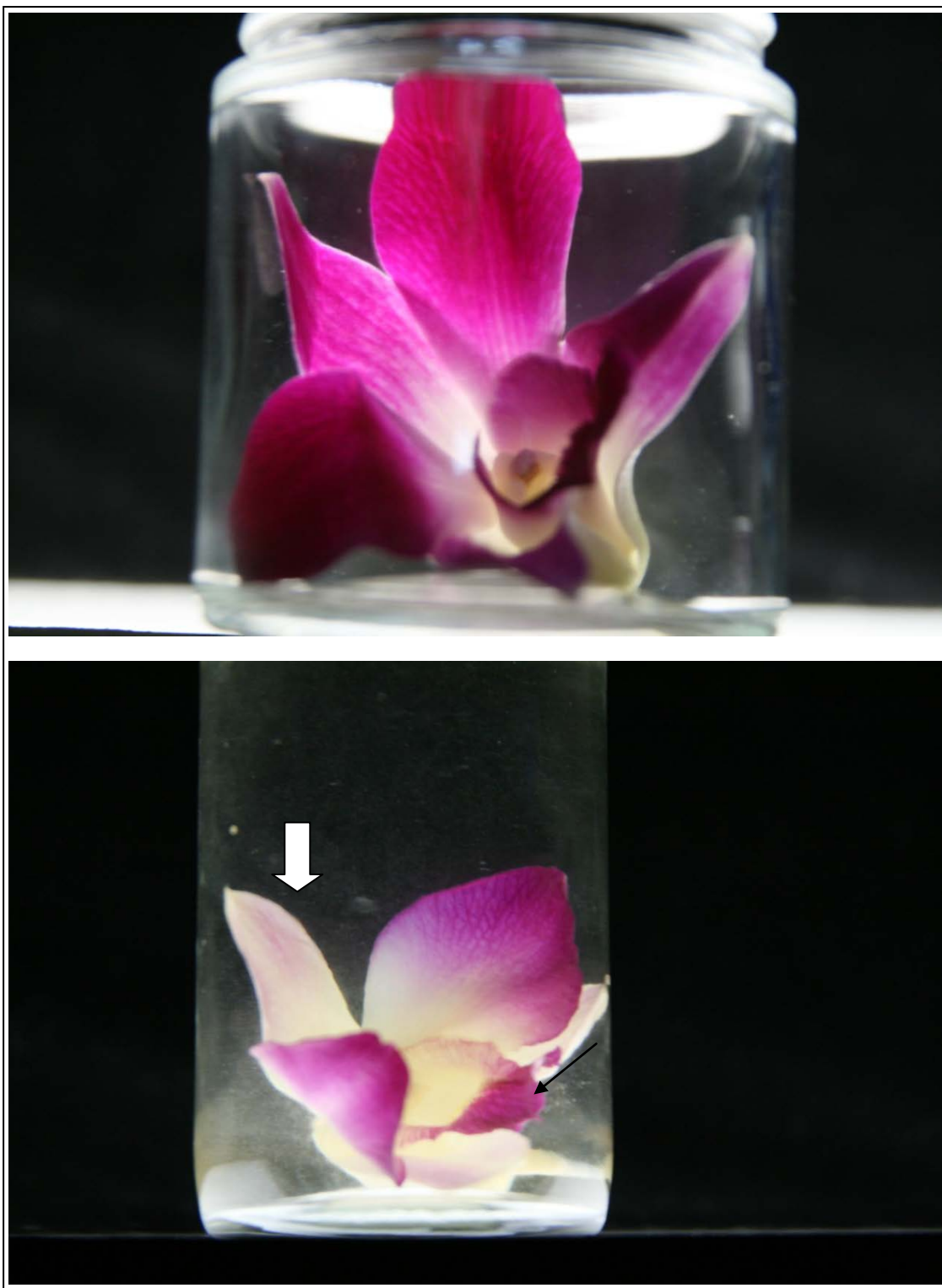
圖十五. 浸漬在保存液 7 天(圖左)以及 28 天(圖右)的石斛蘭花朵(2009.6.20)。



圖十六. 浸漬在保存液 50 天的石斛蘭花朵(2009.7.2)。



圖十七. 放置於室溫下 7 天(上圖)及浸泡在清水中 7 天的花朵(下圖)(2009.7.2)。

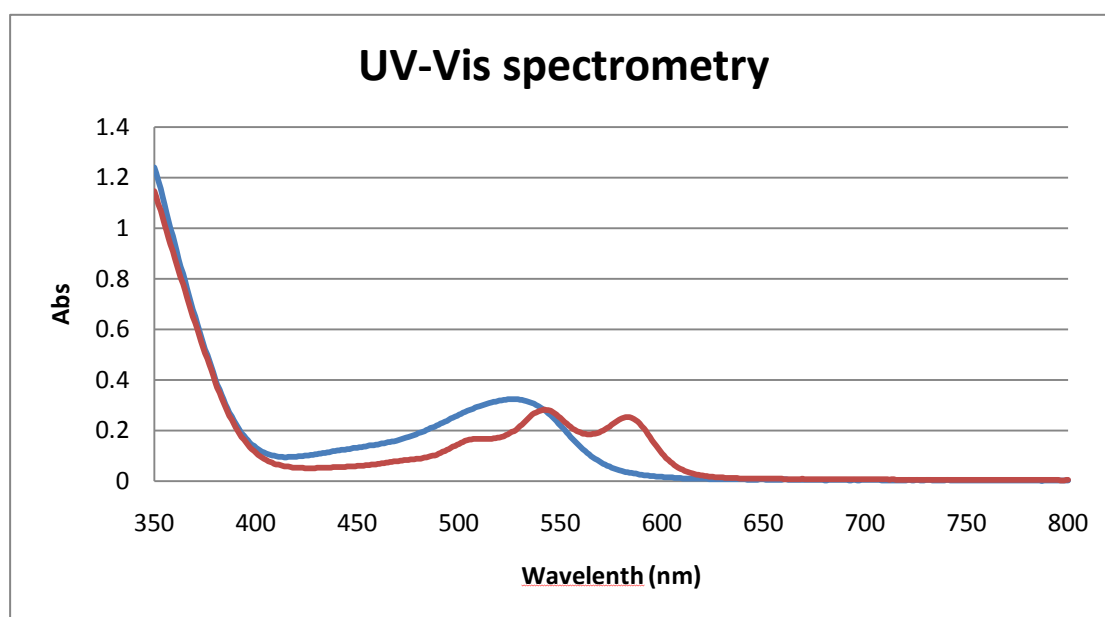


圖十八. 新鮮石斛蘭(上圖)與 6 個月強烈光照的石斛蘭花朵(下圖)比較圖(白色箭頭所指為原本紫色部分，黑色箭頭所指為原本深紫色部分)(2009.6.18)。

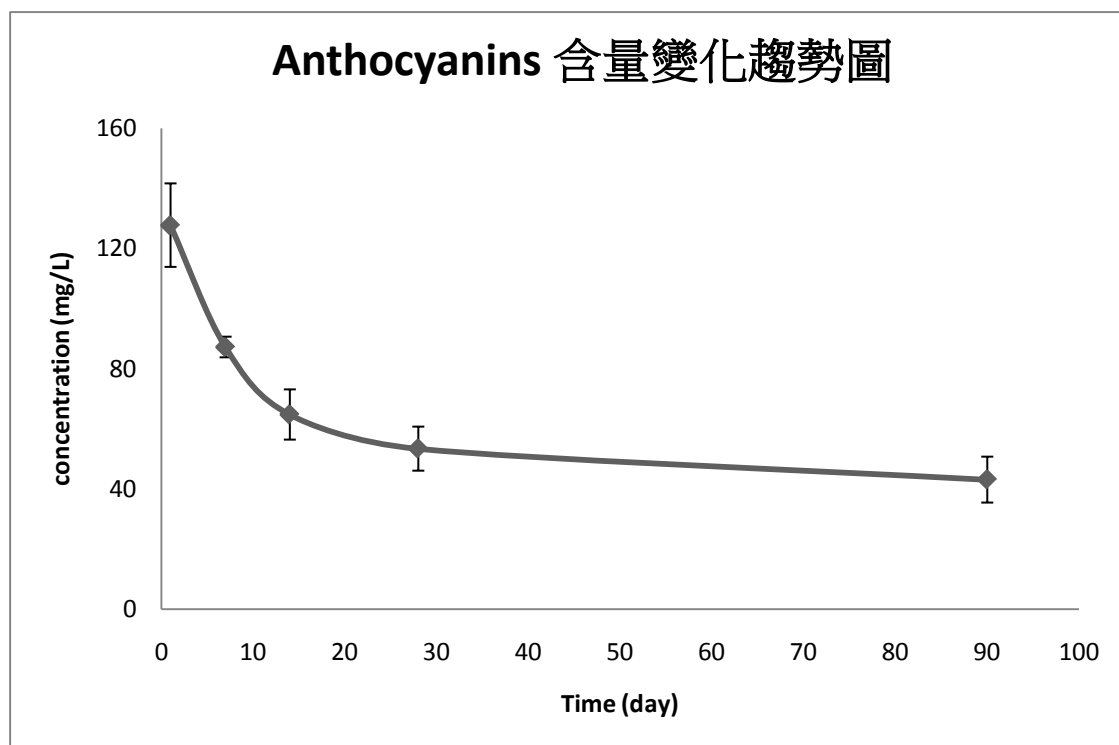
2. 石斛蘭標本花青素定量及定性結果

將放置室溫陰暗處 1 天、7 天、14 天、28 天以及 90 天的石斛蘭標本取出，進行花青素萃取實驗。以 UV-Vis spectrometry 測試，在 pH=1 的環境主要波峰出現在 530 nm，當 pH=4.5 時則有 3 個出現在 500 nm 到 600 nm 的範圍內(圖十九)。1 天以及 7 天的石斛蘭標本經由 pH differential methods 計算之後，每公克花青素含量由平均值由 127.75 mg 降低至 88.21 mg，放置 14 天的樣本又降低至 59.57 mg，但降低的量明顯變少。

其後 28 天以及 90 天的樣本的花青素含量與 14 天的樣本比較，發現花青素含量幾無變化，由此推論，花青素含量在浸漬 14 天之後，即呈現穩定狀態。



圖十九. 兩種酸鹼值(藍:pH=1，紅:pH=4.5)於分光光度計測得之花青素光譜。

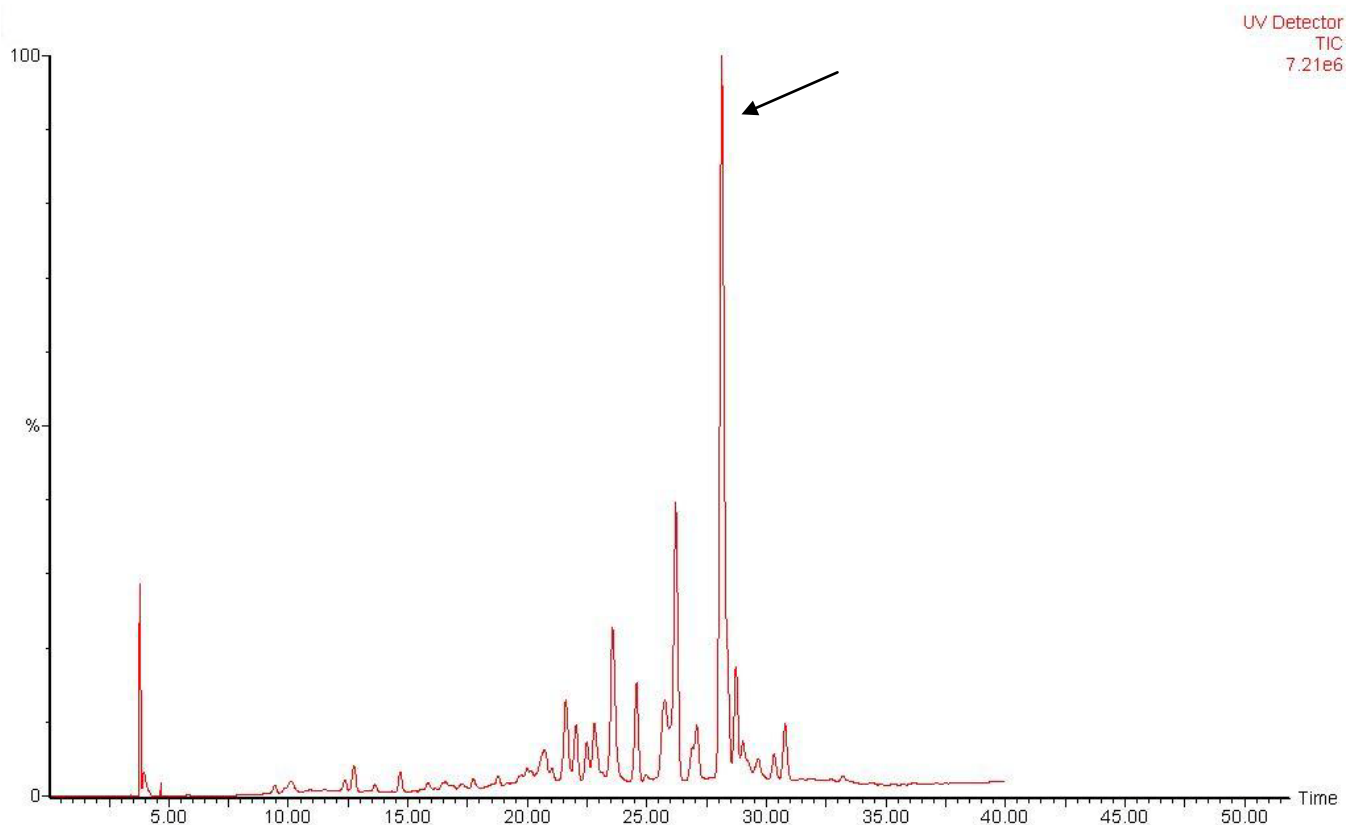


圖二十. 石斛蘭標本花青素含量趨勢圖。



將花青素萃取實驗中的樣本，進行 HPLC 定性實驗(Tatsuzawa et al., 2005)，顯示石斛蘭中的色素組成可能相當複雜。目前尚未確定何者為 cyanidin-3-7-3'-triglucoside，推測於 28 分鐘出現的波峰可能性最大，但仍須進一步的研究證明(圖二十一)。

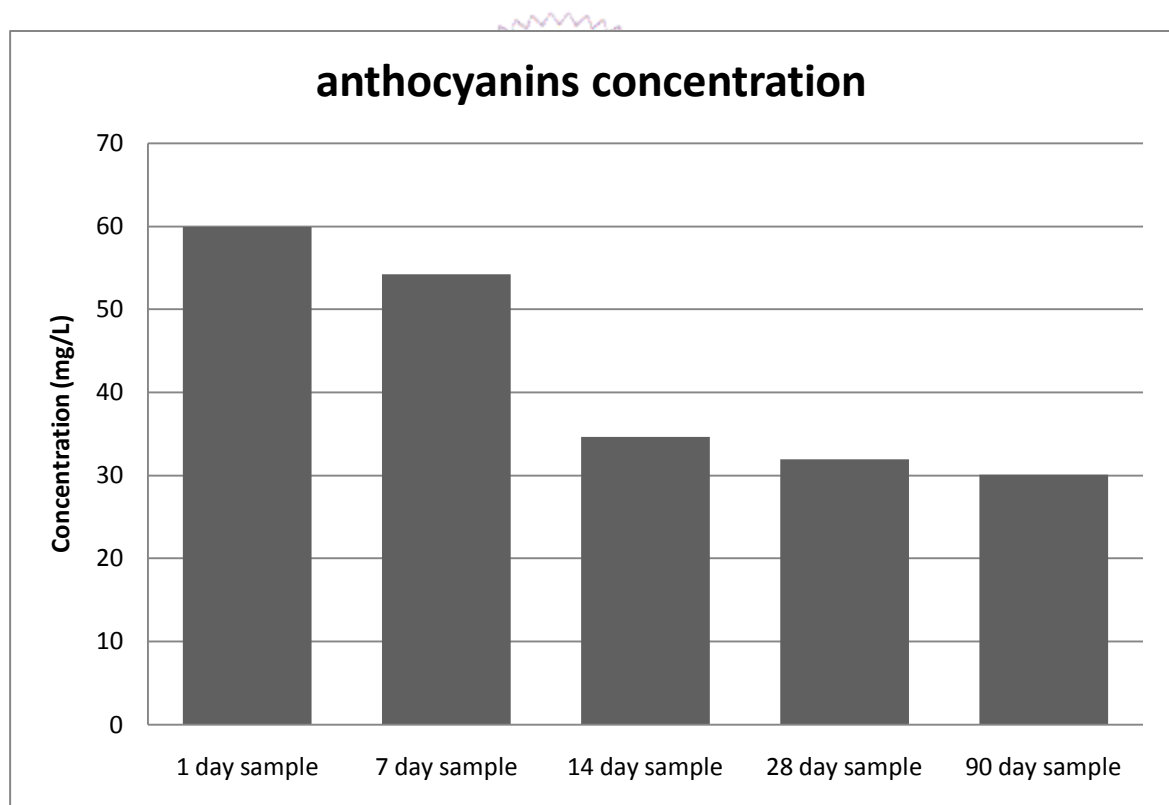
對 HPLC 的結果作主要花青素簡單定量，發現其花青素含量的變化亦隨著時間而改變，在實驗的前兩周即明顯下降，而後漸趨穩定無變化，與 pH differential methods 結果相符(表三、圖二十二)。



圖二十一. 石斛蘭標本花青素 HPLC 圖譜分析(530 nm)。

表三. 石斛蘭標本花青素 HPLC 簡單定量結果。

	Absorbance (530 nm)	Concentration (mg/L)
Standard	133×10^8	1000
1 day sample	7.97×10^6	59.924
7 day sample	7.21×10^6	54.210
14 day sample	4.61×10^6	34.662
28 day sample	4.25×10^6	31.955
90 day sample	4.07×10^6	30.602



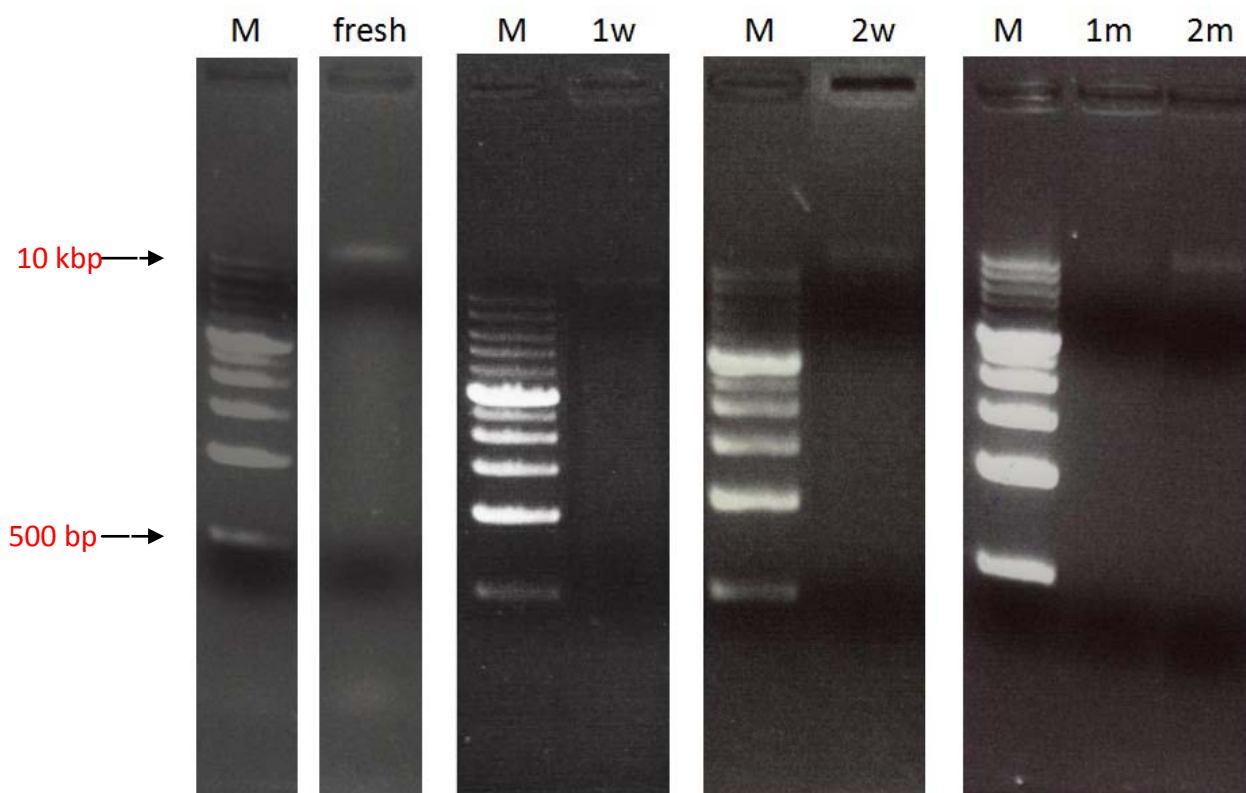
圖二十二. 石斛蘭標本花青素 HPLC 定量趨勢。

3. 裸露基因體 DNA (extracted DNA)浸漬保存結果

在進行花朵 DNA 萃取時會受到雜質干擾嚴重，影響後續實驗結果，因此，DNA 萃取實驗選擇新鮮石斛蘭的葉片作為材料。

將葉片 DNA 萃取出來後，與保存液震盪混合後，置於室溫陰暗處保存。分別於 1 星期、2 星期、1 個月以及 2 個月後取出，以 DNA 電泳觀察 DNA 是否降解。實驗結果發現，電泳膠上分別可以在 well 中以及 10 kbp 以上的位置發現兩個條帶，與新鮮石斛蘭 genome DNA 膠片的結果相符，表示裸露的石斛蘭 genome DNA 並不會因為直接接觸保存液，而受到影響產生降解(圖二十三)。

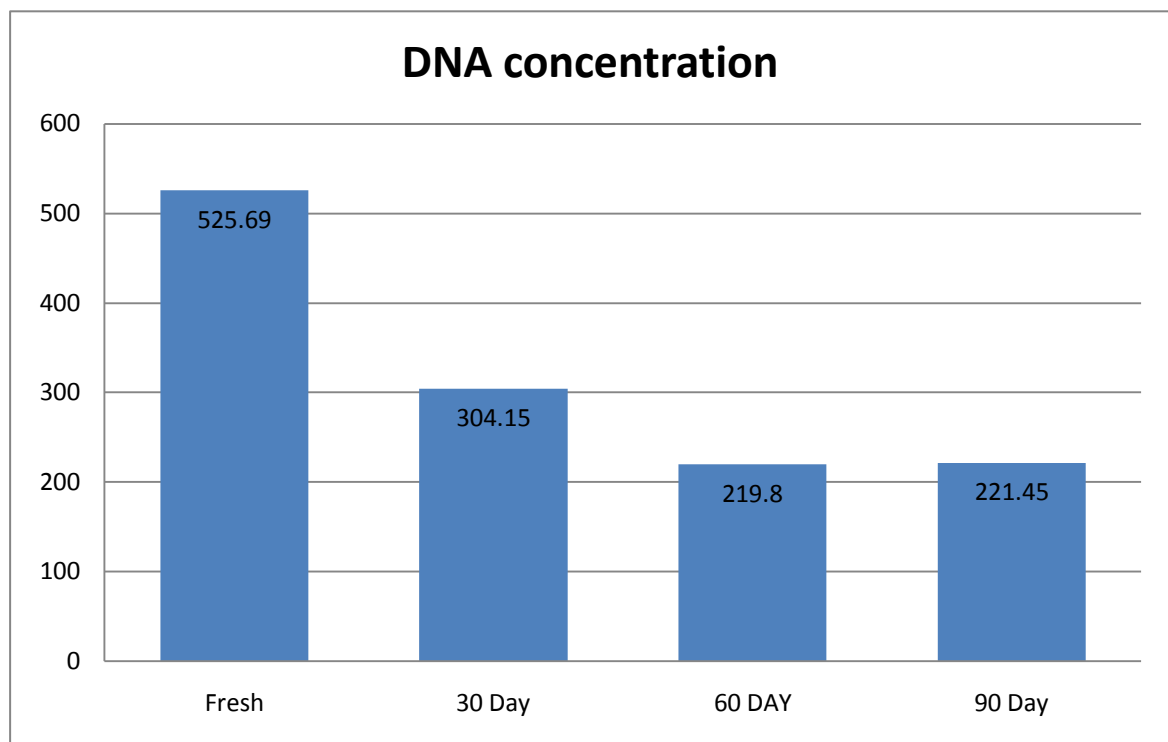




圖二十三. 石斛蘭體外 DNA 浸泡保存液電泳結果(M: Maker, fresh:新鮮石斛蘭 DNA 萃取, 1 w:浸漬一個星期的樣本, 2 w:浸漬兩個星期的樣本, 1 m:浸漬一個月的樣本, 2 m:浸漬二個月的樣本)。

4. 石斛蘭葉子標本 DNA 保存情形分析

將石斛蘭葉子浸漬在保存液中，分別於 30 天、60 天以及 90 天後取出萃取 DNA。萃取出樣本利用微量核酸及蛋白偵測儀(Nano Drop)進行 DNA 定量，並與新鮮石斛蘭葉子萃取結果相比較。實驗結果顯示浸漬在保存液 30 天後，石斛蘭 DNA 含量下降到新鮮樣本含量的 60%，但隨著時間的拉長 DNA 含量並未呈現直線下降的結果，60 天以及 90 天樣本的萃取結果顯示其 DNA 含量並未有顯著差異(圖二十四)。



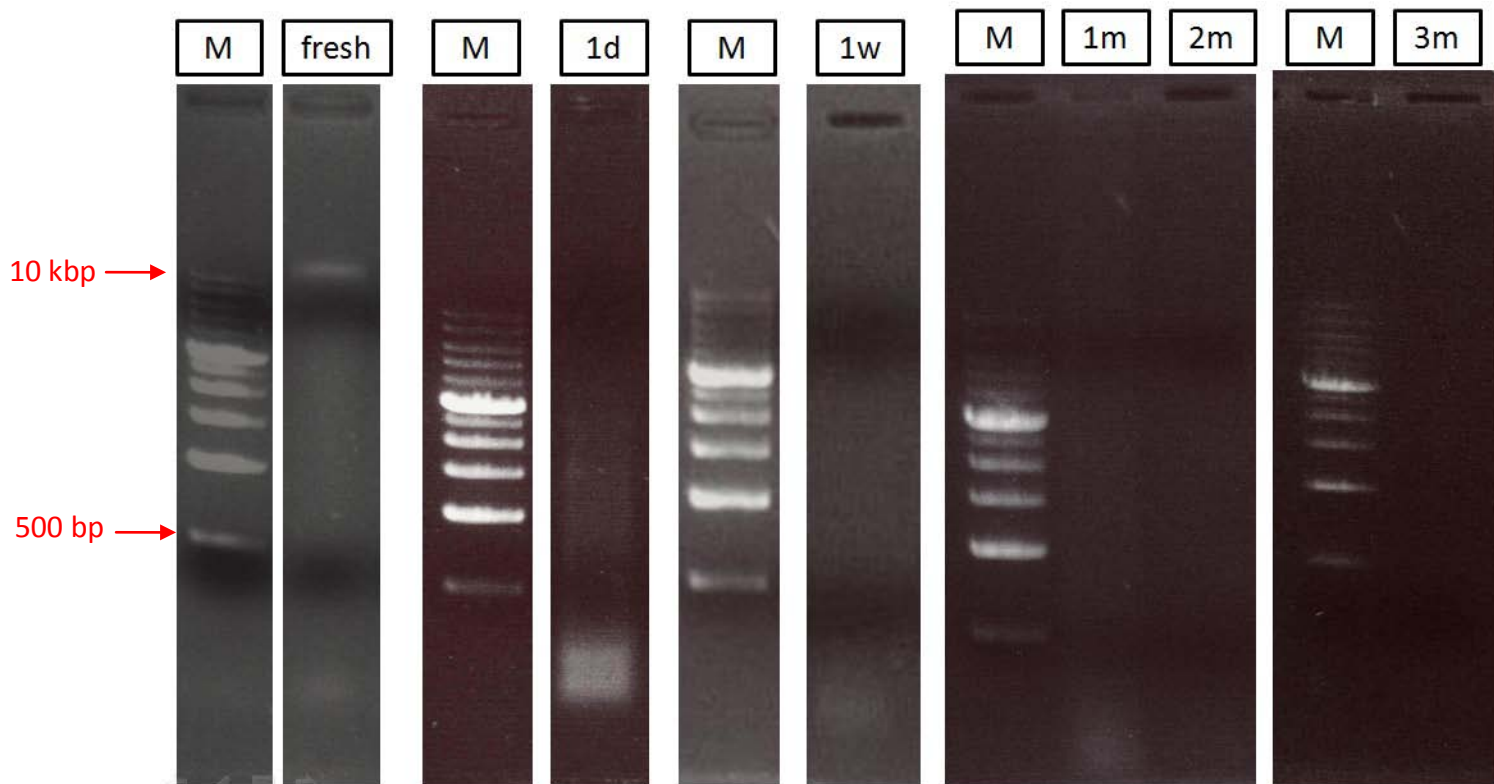
圖二十四. 石斛蘭標本 DNA 濃度變化(ng/ul)。

5. 石斛蘭葉片標本 DNA 電泳分析

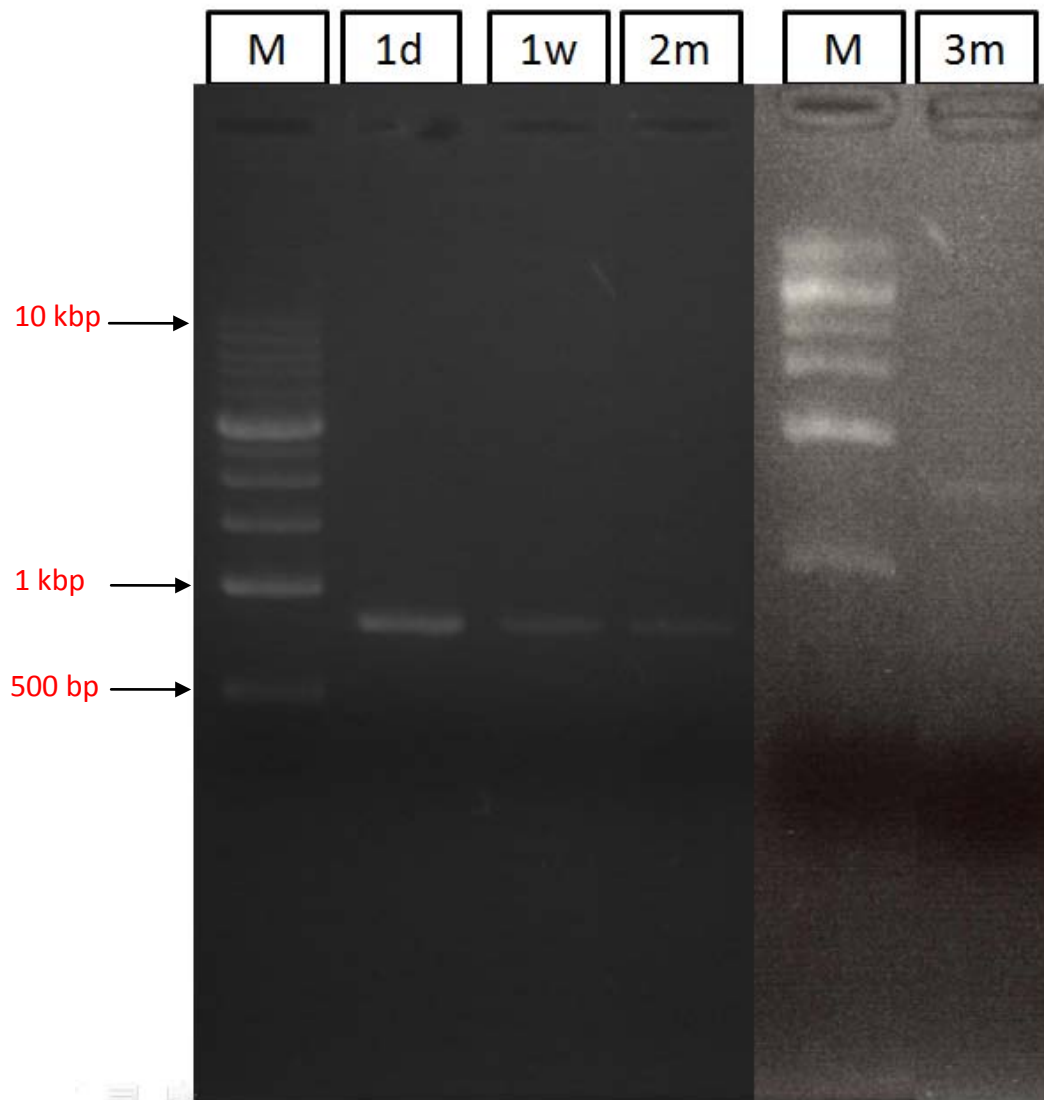
將石斛蘭標本的 DNA 萃取出來後跑 DNA 電泳，評估標本中 genome DNA 的保存情形。實驗結果發現，在浸漬 1 天之後的樣本之 DNA 已經出現 DNA 的斷裂現象(DNA smear)。對照 Marker 發現，斷裂的 DNA 大部分分子量低於 500 bp，其餘時間點之電泳結果相同(圖二十五)。

將各個時間的萃取出來的 DNA 樣品進行 PCR 擴增，選用數組資料庫中的基因去設計引子。其中，本實驗列之基因(*Dendrobium kingianum subsp. carnarvonense* 18S ribosomal RNA gene)(852 bp)可有效達到放大效果，各個時間點的樣品 PCR 放大後，電泳圖條帶單一且明顯(圖二十六)。





圖二十五. 不同時間點 genome DNA 保存情形(M:Maker, fresh:新鮮石斛蘭 DNA 萃取物, 1d:浸漬一天標本, 1w:浸漬一星期標本, 1m:浸漬一個月標本, 2m:浸漬兩個月標本, 3m:浸漬三個月標本)。



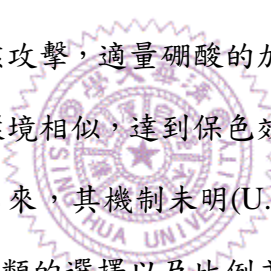
圖二十六. PCR 電泳結果(M:maker，1d:浸漬一天標本，1w:浸漬兩天標本，2m:浸漬兩個月標本，3m:浸漬三個月標本)。

五.討論

1.保存液成分對於石斛蘭保色探討

本實驗所用之保存液主要成分為：正戊醇(1-pentanol)、異丙醇(isopropanol)、硫脲(thiourea)以及硼酸(boric acid)此四種成分。此一配方主要參考自美國專利(U.S.patent 4272571 及 5227205)並加以改進而得。本實驗的配方與專利之主要不同為專利中採用 tert-butanol 以及 isopropanol 為溶劑，且酸類成分為檸檬酸(citric acid)，除了浸液配方不同之外，專利中的作法是將花朵浸漬 2 小時後取出烘乾，再置入高度真空的容器中保存，本實驗之保存方法十分簡易，將新鮮花朵置入保存液中保存即可，改進專利中方法過於複雜的缺點。

保存液中高比例的醇類可以快速將植物脫水，使植物體內的酵素活動中止，並可避免水分對花青素的親核攻擊，適量硼酸的加入可營造酸性環境，使保存液與石斛蘭細胞中花青素呈色環境相似，達到保色效果。硫脲這種成分主要的功能

是使色素不易從組織中流失出來，其機制未明(U.S. patent 4272571)。

本實驗保存液配方中，醇類的選擇以及比例主要來自於不斷的嘗試。在前述的專利中使用的主要溶劑為 tert-butanol，在嘗試加入配方後，並未能夠達到好的保存效果，花朵的色澤較原本深且失真，因此分別試驗了數種醇類，有甲醇、乙醇、正丙醇、正丁醇、正戊醇和正己醇。發現正戊醇的保存效果最佳，其餘醇類保存液僅能保色約 7 到 14 天，且其中以 90% 以上的正戊醇搭配少量異丙醇效果最佳。

探討上段之實驗結果，推測醇類除了脫水之外，長鏈狀醇類的非極性結構，可與花青素的非極性結構產生疏水性交互作用(hydrophobic interaction)，屬於共呈色效應中的分子間共呈色效應，致使花青素含量雖然有減少的趨勢，外觀的呈色仍然與原色差異不大。由於正己醇在室溫下為固態，已然不符合本實驗於常溫保存植物標本的本意，且加熱過後保存效果不彰，故不考慮使用碳數大於 6 的長

鏈狀醇類。

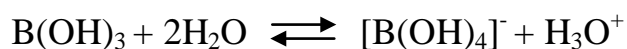
2. 保存方法試驗探討

除了本實驗所研究出之浸液保存法，我們在此之前也試驗了多種其他種類的方法。最初試驗的是：綠色保存法中的酮離子取代法，在綠色葉片的試驗上有成功的例子(圖二十七)，但過程中溫度的控制必須非常準確，否則失敗機率很高(圖二十八)。也試驗過插枝吸收法，此方法為將植物插枝在水中吸收保存液已達保存效果，此方法每次試驗過程少則三天多則一個星期，耗時長且結果全數失敗(圖二十九、圖三十)。除此之外，我們也試驗了其他的浸液方法，一開始為修改傳統的浸液保存法，利用戊醛浸漬固定植物組織 2 小時後，置入 1 % 的亞硫酸中保存，此方法所浸漬之花葉在亞硫酸中 7~14 天，便會變色(圖三十一)。若是利用 0.5 %~2 % 亞硫酸浸漬玫瑰花朵，會使玫瑰花組織變薄且顏色變呈鮮紅色，與原本花瓣差異甚大(圖三十二)。



3. 硼酸與其他替代酸類的探討

本實驗保存液中的硼酸成分，為作用機制十分特別的酸類，在水溶液中的作用機制如下：



大部分酸類多為質子提供者，而硼酸則是與水作用產生 $[\text{B(OH)}_4]^-$ ，為一種弱酸，在水溶液中並不會形成強烈的親核離子，可避免對花青素的親核攻擊，但此點在保存液的替換過程中亦可避免。硼酸可迅速與多元醇類形成螯合物，使其酸性增強，可有效且快速地營造保存液中的酸性環境。

硼酸在保存液中濃度的變化也會影響保存效果，在石斛蘭標本的保存實驗中發現以 0.25% 硼酸保存效果最佳，但對於其餘種類的蘭花，試驗結果發現將硼



圖二十七. 銅離子取代(96.10.19)(攝於
98.7.29)



圖二十八. 銅離子取代失敗情形
(96.10.19)



圖二十九. 插枝吸收營養法(前)(96.12.27)



圖三十. 插枝吸收營養法(後)(96.12.31)



圖三十一. 傳統浸液法處理前
(上)(96.11.1)、後(下) (96.11.13)



圖三十二. 亞硫酸浸液法處理之紅玫瑰花瓣
(97.3.14)

酸濃度提高至 0.75% 保存效果最好(圖三十三), 但過度提高硼酸濃度會適得其反。除了硼酸之外, 前人研究發現紅酒之所以能常保顏色鮮紅, 其原因來自於其中所含之酒石酸(Tartaric acid)成分(G.A. Garzon et al., 2001)。酒石酸為一種有機酸, 可能與花青素產生很好的共呈色效應, 且研究發現將保存液中的硼酸成份替換為 0.5% 酒石酸對於玫瑰有很好的保色效果。

將硼酸與酒石酸適量混合的保存液, 可以發現原本應是粉紫色的石斛蘭標本, 隨著酒石酸成份比例增加會使得花朵顏色變得較紅(圖三十四), 而完全不加酸的保存液則使花朵呈現深紫色。實驗中也發現硼酸與酒石酸混合的保存液, 對幾種菊科植物有很好的保色效果(圖三十五)。前述兩種酸混合實驗都還在試驗階段, 有待繼續研究探討其原因。

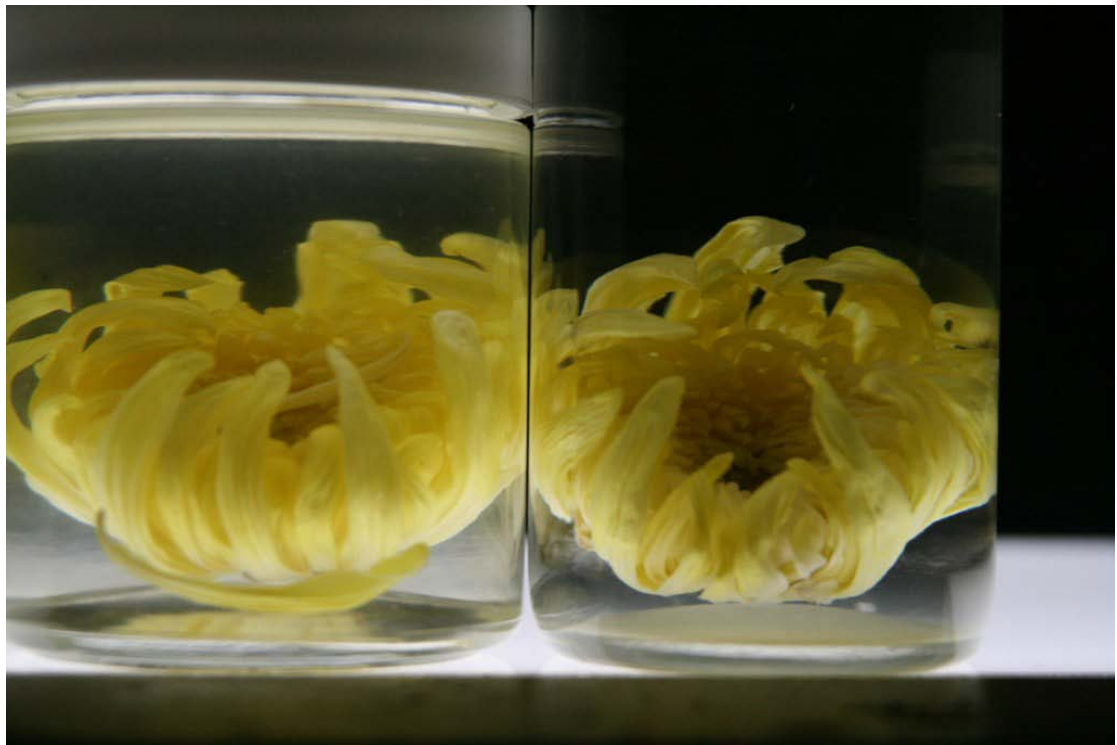




圖三十三. 以 0.75% 硼酸保存液浸漬之其他種類花朵(98.7.2.)(上圖為保存 10 個月之萬代蘭，下圖為保存 6 個月之各色花朵。)



圖三十四. 硼酸與酒石酸混合保存液浸漬結果(98.7.2.)。(左一至左三分別為硼酸 0.5%+酒石酸 0.05%、硼酸 0.25%+酒石酸 0.01% 以及不加酸的標本；右一為原保存液浸漬標本)。



圖三十五. 浸漬於混合保存液 6 個月的菊科花朵(98.7.2.)。

4. 花青素含量變化探討

在實驗結果 2. 中發現石斛蘭標本中花青素含量在浸漬前期變化較大，在兩周後呈現較穩定的狀態，此現象在 pH differential methods 以及 HPLC 的分析下，結果相同。

浸漬初期花青素快速下降的原因，推論可能有幾項原因。首先，可能來自於光照，光照花青素生合成主要的因素之一，但也會造成花青素的降解。在前人對於花青素的研究中，將提取出的花青素溶液在強光照射下，花青素會由紅變黃，在室內散光下，花青素溶液顏色會轉淡，且在光譜實驗下的吸光值也會因此下降(王忠民等人, 2007)。

本實驗的石斛蘭保存標本，雖然沒有強光照射但未刻意置於黑暗處，可能因此造成花青素的降解。但是花青素的降解並未造成植物本身在肉眼觀察下的呈色變化，推測應是與保存液的共呈色效應造成，詳細機制仍有待更進一步的研究；花青素降解的原因也可能與其他細胞內的生化變化，如: pH、O₂ 或者是過氧化物的生成有關。另外，在浸漬初期，植物體中的酵素可能尚未降解仍能進行作用，在前言中提到，酵素會對花青素進行醣基裂解，或者是其他加速花青素降解的作用，這部分實驗尚待進一步的研究去探討。

5. 石斛蘭標本 DNA 保存情形探討

在萃取石斛蘭花朵的基因體 DNA 時發現，因其次級代謝物過多，必須在萃取過程中增加分液萃取的次數，以去除代謝物的干擾，過程中會有相當大量的基因體 DNA 因此遺失，造成在電泳分析上的困難。前人並未有研究特別針對石斛蘭的基因體 DNA 萃取方法，如何有效萃取花朵 DNA 的技術仍然有很大的改善空間。

在此的 DNA 實驗主要為定性，並未詳細思考到定量的部分，所以條帶才會呈現明暗不一的現象，但主要目的在於條帶的有無，所以 loading 的量並未統一，

這是未來後人需要改進的部分。雖然在石斛蘭標本 genome DNA 的電泳圖中，發現基因體 DNA 被分解的現象。但是在 PCR 放大之後，仍然可以成功放大所要之基因，因此保存液對於基因還是有一定的保存效果。

6. 未來工作

本實驗目前研究之保存液雖然可有效石斛蘭花朵的色澤以及型態，但對於其他種類的植物保存的成效並不穩定，需要適度地調整保存液的成分，這需要更多更廣的實驗來建立規則。且除了花朵之外，此保存液對葉片以及莖部的保色，因其主要呈色色素的不同，效果並不如花朵好，有待進一步的研究出同時保存花朵與其於植物器官的方法以及保存液。本實驗之浸液保存法，可以進一步推廣至商業應用以及改進博物館保存標本的方法。



六.結論

1. 本實驗所研究之浸漬保存法，對於石斛蘭花朵色澤以及型態的維持有很成功的效果。
2. 石斛蘭標本花青素含量雖然會隨時間增長而下降，但下降量會趨向緩和，且標本的色澤並未有顯著變化。
3. 本保存液對植物的 DNA 得保存也有其貢獻，雖然基因體 DNA 出現斷裂現象，但透過 PCR 的實驗，仍可將欲提取之基因片段放大取得。



七.參考文獻

1. Andersen, O.M. (2002). Anthocyanins. In: *Encyclopedia of life sciences*. MacMillan Publishers Ltd., London, p.597-605.
2. Araceli Castaneda-Ovando, Ma. de Lourdes Pacheco-Hernandez, Ma. Elena Paez-Hernandez, Jose A. Rodriguez, & Carlos Andres Galan-Vidal. (2009). Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry* **113**: 859–871.
3. Asen, S., Stewart, R.N., & Norris, K.H. (1972). Copigmentation of anthocyanins in plant tissues and its effect on color. *Phytochemistry* **11**: 1139-1144.
4. Boselli, E., Boulton, R.B., Thorngate, J.H., & Frega, N.G. (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.
5. Boulton, R. (2001). The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: A critical review. *Am J Enol Vitic* **52**: 67-87.
6. Brouillard, R. (1982). Chemical structure of anthocyanins. In: *Anthocyanins as Food Colors*. Pericles Markakis (ed.), Academic Press Inc., New York, p.1-38.
7. Brouillard, R. (1983). The in vivo expression of anthocyanin color in plants. *Phytochemistry* **22**: 1311-1323.
8. Brouillard, R., Mazza, G., Saad, Z., Albrecht-Gary, A.M., & Cheminat, A. (1989). The co-pigmentation reaction of anthocyanins: a microprobe for the structural study of aqueous solutions. *J Am Chem Soc* **111**: 2604-2610.
9. 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.
10. Cesar Romero-Sierra, Bath; John C. Webb, Kingston, both of Canada. Flower preservation. United states patent 4272571

11. Clifford, M. N. (2000). Anthocyanins – nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **80**(7): 1063–1072.
12. Dltter von Wettstein, Gough, S., & Kannangara, G. (1995) Chlorophyll biosynthesis. *The Plant Cell* **7**:1039-1057.
13. Dangles, O., Saito, N., & Brouillard, R. (1993). Kinetic and thermodynamic control of flavylum hydration in the pelargonidin- cinnamic acid complexation. Origin of the extraordinary flower color diversity of *Pharbitis nil*. *J Am Chem Soc* **115**: 3125-3132.
14. Dao, L.T., Takeoka, G.R., Edwards, R.H., & Berrios, J.D.J. (1998). Improved method for the stabilization of anthocyanidins. *J Agric Food Chem* **46**: 3564-3569.
15. 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.
16. Davies, A.J., & Mazza, G. (1993). Copigmentation of simple and acylated anthocyanins with colorless phenolic compounds. *J Agric Food Chem* **41**: 716-720.
17. Fossen, T., Cabrita, L., & Andersen, O.M. (1998). Color and stability of pure anthocyanins influenced by pH including the alkaline region. *Food Chem* **63**: 435-440.
18. Francis, F.J. (1989). Food colorants: anthocyanins. *Crit Rev Food Sci Nutr* **28**: 273-314
19. Garzon, G.A., & Wrolstad, R.E. (2001). The stability of pelargonidin-based anthocyanins at varying water activity. *Food Chemistry* **75**(2): 185-196.
20. Giusti, M.M., & Wrolstad, R.E. (2003). Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems. *Biochem Eng J* **14**: 217-225.

21. Goossens, A., Claes, L., Drieghe, J., & Put, E. (1997) Antimicrobials: preservatives, antiseptics and disinfectants. *Contact Dermatitis*. **39**: 133-134.
22. Goshorn, R.H., Degering, E.D.F., & Tetrault, P.A. (1938) Antiseptic and bactericidal action of benzoic acid and inorganic salts-effect of pH. *Industrial and Engineering Chemistry* **30(6)**: 646-648.
23. Gutierrez, I.H. (2003). Influence of ethanol content on the extent of copigmentation in a Cencibel young red wine. *J Agric Food Chem* **51**: 4079-4083.
24. 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.
25. Harborne, J.B. (1964). Plant polyphenols. XI. Structure of acylated anthocyanins. *Phytochemistry* **3**: 151-160.
26. Harborne, J.B. (1967). Comparative Biochemistry of the Flavonoids. Academic, New York
27. Huang, H.T. (1955). Decolorization of anthocyanins by fungal enzymes. *J Agric Food Chem* **3**: 141-146.
28. Lim, S.H., Liew, C.F., Lim, C.N., Lee, Y.H. & Goh, C.J. (1997) A simple and efficient method of DNA isolation from orchid species and hybrids. *Biologia Plantarum* **41(2)**: 313-316.
29. Lowry, J.B., & Keong, S.C. (1973). A preliminary study of Malaysian orchid pigments. *Malays. J. Sci.* **2 (B)**: 115
30. Markakis, P. (1982). Stability of anthocyanins in foods. In: *Anthocyanins as Food Colors*. Markakis P (ed.), Academic Press Inc., New York, p.163-178.
31. Markakis, P., Livingston, G.E., & Fellers, C.R. (1957). Quantitative aspects of strawberry-pigment degradation. *Food Research* **22**: 117-130.

32. Mazza, G., & Brouillard, R. (1987). Recent developments in the stabilization of anthocyanins in food products. *Food Chem* **25**: 207-225.
33. Mazza, G., & Brouillard, R. (1987). Color stability and structural transformations of cyanidin 3,5-diglucoside and four 3-deoxyanthocyanins in aqueous solutions. *J Agric Food Chem* **35**: 422-426.
34. Mazza, G., & Brouillard, R. (1990). The mechanism of copigmentation of anthocyanins in aqueous solutions. *Phytochemistry* **29**: 1097-1102.
35. Method and composition for plant preservation without leaf curling. US Patent 5627132
36. Nebesky, E.A., Esselen, W.B. Jr., McConnell, J.E.W., & Fellers, C.R. (1949). Stability of color in fruit juices. *Food Research* **14**: 261-274.
37. Osawa, Y. (1982). Copigmentation of anthocyanins. In: *Anthocyanins as Food Colors*. Markakis P (ed.), Academic Press Inc., New York, p.41-65.
38. Palamidis, N., & Markakis, P. (1978). Stability of grape anthocyanin in carbonated beverages. *Semana Vitivinicola* **33**: 2633, 2635, 2637-2639.
39. Pifferi, P.G., & Cultrera, R. (1974). Enzymic degradation of anthocyanins. Role of sweet cherry polyphenol oxidase. *J Food Sci* **39**: 786-791.
40. Preservation of plant material. WO 99/55152
41. Rein, M. (2005) Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins. Helsinki: University of Helsinki.
42. Robert, S. Dubrow, San Carlos, Calif. ; Geoffrey Samuels, New York, Robert J. Molinari, Wayne, Pa. Specimen display article. United states patent 5227205
43. Saito, N., Toki, K., Uesato, K., Atsushi, S., & Honda, T. (1994). An acylated cyanidin glycoside from the red-purple flowers of *Dendrobium*. *Phytochemistry* **37**, 245–248.

44. Saito, N., Ku, M., Tatsuzawa, F., Lu, T.S., Yokoi, M., Shigihara, A., & Honda, T. (1995). Acylated cyanidin glycosides in the purple-red flowers of *Bletilla striata*. *Phytochemistry* **40**, 1523–1529.
45. 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.
46. Tatsuzawa, F., Saito, N., Yokoi, M., Shigihara, A., & Honda, T. (1995). Acylated cyanidin 3,7,30-triglucosides in flowers of *Laeliocattleya* cv Mini Purple and its relatives. *Phytochemistry* **41**, 635–642.
47. Tatsuzawa, F., Saito, N., Seki, H., Hara, R., Yokoi, M., & Honda, T. (1997). Acylated cyanidin glycosides in the red-purple flowers of *Phalaenopsis*. *Phytochemistry* **45**, 173–177.
48. Tatsuzawa, F., Yukawa, T., Shinoda, K., & Saito, N. (2005) Acylated anthocyanins in the flowers of genus *Dendrobium* section *Phalaenantha* (Orchidaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* **33** : 625–629.
49. Timberlake, C.F., Bridle, P. (1966) Spectral studies of anthocyanin and anthocyanidin equilibria in aqueous solution. *Nature* **212**: 158-159.
50. Williams, C.A., Greenham, J., Harborne, J.B., Kong, J.M., Chia, L.S., Goh, N.K., Saito, N., Toki, K., & Tatsuzawa, F. (2002). Acylated anthocyanins and flavonols from purple flowers of *Dendrobium* cv."Pompadour". *Biochemical Systematics and Ecology* **30(7)**: 667-675.
51. Williams, M., & Hrazdina, G. (1979). Anthocyanins as food colorants: effect of pH on the formation of anthocyanin-rutin complexes. *J Food Sci* **44**: 66-68.
52. 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.
53. Zhu Wenxue, Dong Tieyou, Zhang Zhengyong. Experimental study on treatment

of immortal peony flower. Luoyang Institute of Technology, Luoyang, 471039

54. 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-基礎研究* **28(6)**: 93-97.
55. 王榮祥, 許亮, 宋吉猛, 白雄明 (2007) 原色植物浸漬標本製作方法的研究 *遼寧中醫藥大學學報* **9(4)**: 163-164.
56. 林國筆 (1990) 花朵的自然生態保存及其著色之方法 *國內專利* 159041
57. 郭玉梅 (1999) · 新養蘭學II 洋蘭 · 台北 : 亞泰
58. 郭建華 (2005) 植物綠色固定保色AB液的實驗研究 *廣西中醫學院學報* **5(1)**: 3-5.
59. 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* **27(3)**:126-128
60. 薛聰賢 (2002) · 家庭園藝(第九輯) 蘭花專輯-養蘭不難 · 新店 : 台灣普綠。

