

中華民國第 64 屆中小學科學展覽會

作品說明書

高級中等學校組 植物學科

佳作

052107

探討矮仙丹對紫外線的防護機制

學校名稱： 國立潮州高級中學

作者： 高三 林維德 高三 楊輝騰	指導老師： 楊勝惠 洪育祥
---------------------------------	-----------------------------

關鍵詞： 花青素、活性氧、油粒體

摘要

比較校園常見紅花、粉花、黃花矮仙丹抗 UV 能力之差異。萃取花瓣的花青素，研究在不同濃度及 pH 值的環境下抗 UV 的能力，結果發現紅花的花青素含量大於粉花，在偏鹼環境中，會因結構改變而有較高抗 UV 能力。另外在照射 UV 後，紅花之花青素與類胡蘿蔔素均增加，使抗氧化力上升，傷害性指標丙二醛濃度先降後升。粉花利用抗氧化酶，超氧化物歧化酶上升、過氧化物酶短期顯著上升，用以清除活性氧，但長期濃度顯著下降，顯示細胞受到傷害。黃花不論在短期及長期照射下，均以類胡蘿蔔素做為主要的抗氧化方式。此外，隨著 UV 照射時間膜脂過氧化的現象越明顯，丙二醛濃度上升，觀察發現紅花、粉花下表皮的油粒體有數量增生的現象，黃花則數量下降。

壹、前言

一、研究動機

植物每天從日出到日落，敬業地站在太陽底下，既沒有撐傘也沒擦防曬，也不能偷偷跑進屋內，為什麼都不會曬黑呢？事實上，植物即使曬傷也不會曬黑，而是曬白？這也太令人羨慕了，但曬白卻是植物的曬傷，因為接收了大量的光子，造成光合作用的電子傳遞鏈產生塞車所致(Jacob C. Dean *et al.*, 2014)。

隨著全球氣候變遷，臭氧層破洞的議題日益受到關注，是各大媒體及論壇經常討論的重要對象。臭氧層破洞會導致有更多的紫外線(UV)穿透到地表，並對生命體造成威脅。為了因應 UV 對生命體造成威脅，人們透過大量的研究，以找尋出能夠抵抗 UV 的相關物質。經過研究後發現，植物體內存在水溶性與脂溶性的天然、可抗 UV 之物質，若能將其應用在防曬上，將是對人類的一大貢獻。

矮仙丹是常見的校園植物，大街小巷與公園皆可見其蹤影。除觀賞性佳之外，矮仙丹屬於長日照代表植物，含有花青素與類胡蘿蔔素(Sweta Sharma *et al.*, 2021)。綜合以上，選擇矮仙丹作為研究抗 UV 的植株，並透過萃取花瓣內的物質，進行一系列的相關研究。

二、研究目的

- (一)研究不同濃度下，花青素的抗 UV 能力。
- (二)研究在不同 pH 值時，花青素的抗紫外線之能力，並以結構的差異解釋原因。
- (三)測量紅花、粉花、黃花的 SOD 與 POD 濃度，並探討 SOD 與 POD 活性與花青素之關係。
- (四)對花瓣表皮細胞觀察，並探討照射 UV 後細胞變化的情形。
- (五)測量經過長時間照射導致脂質過氧化現象。

三、文獻探討

(一)紫外線(ultraviolet，簡稱 UV)

UV 可依據波段大小分為 UVA(315~400nm)、UVB(280~315nm)、UVC(220~280nm)。其中，UVC 能完全被臭氧層吸收，大部分的 UVB 能被臭氧層吸收，而大部分的 UVA 能夠直射地表。UVA 的波段較長，能量較低，會使皮膚曬黑、產生皺紋；UVB 的波段較短，能量較高，對身體的傷害也較高，會使皮膚曬傷、曬紅(盛建軍等，2019)。

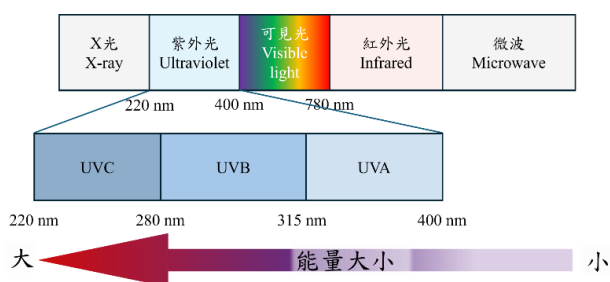


圖 1.光頻譜圖及能量之間的關係

(二)花青素

花青素廣泛存在於自然界中，屬水溶性色素，儲存於植物細胞的液胞裡。花青素作為類黃酮的一種，屬於天然的抗氧化劑，藉由氫原子轉移(HAT, hydrogen atom transfer)及單電子轉移(SET, single electron transfer)來清除自由基，達到清除自由基的效果(Bianca Enaru *et al.*, 2021)。除此之外，花青素也是一種天然的酸鹼指示劑。在不同 pH 值的環境下，花青素的結構會發生改變，並且會隨著 pH 值上升，而讓轉移電子至自由基上的速度會增加(Olivier Dangles *et al.*, 2018)。在吸收光譜方面，花青素的吸收光譜約在 530nm 下有最大吸收高峰(Supradip Saha *et al.*, 2019)。

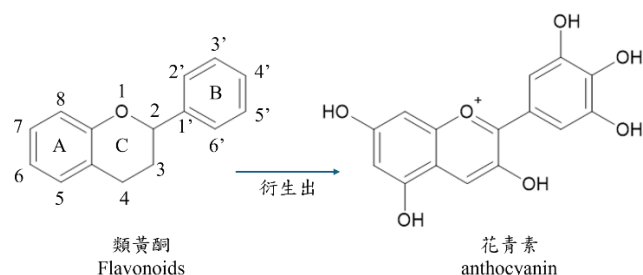


圖 2.花青素為類黃酮家族的其中一個分支

(三)抗氧化酶

植物在代謝過程中容易受到電子轉移而產生具有毒害作用的活性氧(Reactive oxygen species, ROS)，如: $\text{OH}^\bullet$ 、 $\text{O}_2^{\bullet-}$ 、 H_2O_2 等，而植物細胞的葉綠體、粒線體和細胞膜等是產生活性氧的主要場所。為了減輕活性氧對細胞的破壞及維持體內活性氧的動態平衡，於是在演化過程中產生抗氧化酶，例如超氧化物歧化酶(SOD)、過氧化物酶(POD)等，其中 SOD 催化 $\text{O}_2^{\bullet-}$ 歧化反應生成 H_2O_2 ，POD 清除 $\text{O}_2^{\bullet-}$ 、 H_2O_2 和其他過氧化物。這些抗氧化酶與植物的代謝與對抗逆境有密切關係。

1.SOD(超氧化物歧化酶)

超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)是生物體系中抗氧化酶系的重要組成成員，廣泛分佈在微生物、植物和動物體內。在高等植物中，不同形式的超氧化物歧化酶定位於不同的細胞區室中。Mn-SOD 存在於粒線體和過氧化物酶體；Fe-SOD 主要位於葉綠體，但在過氧化物酶體中也能夠被檢測到；CuZn-SOD 則定位於原生質、葉綠體、過氧化物酶體和質外體(apoplast)中。該酶與植物的代謝及對抗衰老有密切關係，是植物體內重要的保護酶之一，因此 SOD 濃度的測定在研究植物衰老及抗逆機制中有著重要意義。(Cerqueira, J.V.A. *et al.*, 2023)

2.POD(過氧化物酶)

植物在正常生長情況下所產生的活性氧(Reactive oxygen species, ROS)濃度非常低，但在逆境下(如：乾旱、照 UV、土壤鹽鹼化)，植物所產生之 ROS 濃度便會急速增加。ROS 包含了自由基類的 $\text{OH}^\bullet$ 、 $\text{O}_2^{\bullet-}$ 及非自由基類的 H_2O_2 ，在細胞內進行一系列的氧化還原反應後，使蛋白質、DNA、RNA 受損。植物為了避免 ROS 累積於體內，使其與體內生物分子發生反應，因此演化出了抗氧化酵素清除系統。抗氧化酵素清除系統包含了超氧化物歧化酶(SOD)、過氧化物酶(POD)等。隨著 ROS 的增加，抗氧化酵素的活性也會隨之增

加。抗氧化酵素之間互相分工，透過一連串的氧化還原反應將體內的活性氧清除(蔣永正，2011)，其中，POD 可使 H_2O_2 作為電子供體，過氧化物酶可將 H_2O_2 催化為 H_2O (Pontsho Patricia Twala *et al.*, 2020)。

(四)油粒體(Elaoplast)

油粒體是植物儲存、代謝脂質的場所，與澱粉體、蛋白質體均屬於白化體，常見於植物的花瓣、果實、種子(Robert R. Wise *et al.*, 2007)。油粒體與葉綠體均由原質體演化而來，屬於半自主胞器(Zhu M. *et al.*, 2018)。其儲存的脂質可進行分解，並提供植物細胞利用。三酸甘油脂可分解為甘油及脂肪酸，甘油可轉換成醣類型呼吸作用產生能量，脂肪酸則須進入乙醛酸循環後，才可以轉換為葡萄糖，並進行利用(郭華仁，2015)。

(五)DPPH(1, 1-二苯基-2-三硝苯肼自由基)

抗氧化物質可藉由提供氫(Hydrogen donor)來清除脂質過氧化所產生的自由基，進而達到抑制氧化連鎖反應的進行，故在抗氧化的研究上常使用 DPPH 來評估抗氧化的供氫能力。DPPH 在波長 517nm 下有強吸收值，當 DPPH 被具有具抗氧化能力物質還原時，使吸光度降低(溶液變無色或黃色)，就可算出 DPPH 的清除率(Molyneux, P., 2004)。

(六)MDA(Malondialdehyde, 丙二醛)

植物器官老化或在逆境環境下，容易受到傷害並發生膜脂過氧化的現象，丙二醛(MDA)是膜脂過氧化的分解產物，其含量可反應植物遭受逆境傷害的程度 (Du, H. *et al.*, 2018)。

貳、研究設備與器材

- 一、儀器：電子秤、研鉢及研杵、離心機、分光光度計、筆電、恆溫往復式震盪水槽、複式顯微鏡。
- 二、材料：紅花矮仙丹、粉花矮仙丹、黃花矮仙丹、萬用試紙(MERCK)、UV燈、TLC片(MERCK)、毛細管、沖堤瓶、鑷子、試管、保鮮膜、鑷子、手套、培養皿、燒杯及玻棒、研鉢及研杵、蓋玻片及載玻片、滴管、離心管、布氏漏斗、側枝三角錐形瓶、抽濾管、索氏萃取器、冷凝管、吸注器與吸注管。

三、藥品：正己烷、乙酸乙酯、丙酮、乙醇、甲醇、鹽酸、磷酸氫二鉀、磷酸二氫鉀、過氧化氫、Guaiacol(愈創木酚)、甲硫氨酸、Nitro Blue Tetrazolium、EDTA(乙二胺四乙酸)、核黃素、亞甲藍、蘇丹紅4號、TBA(硫代巴比妥酸)、TCA(三氯醋酸)、DPPH(1, 1-二苯基-2-三硝苯肼自由基)。

參、研究過程與方法

一、實驗流程

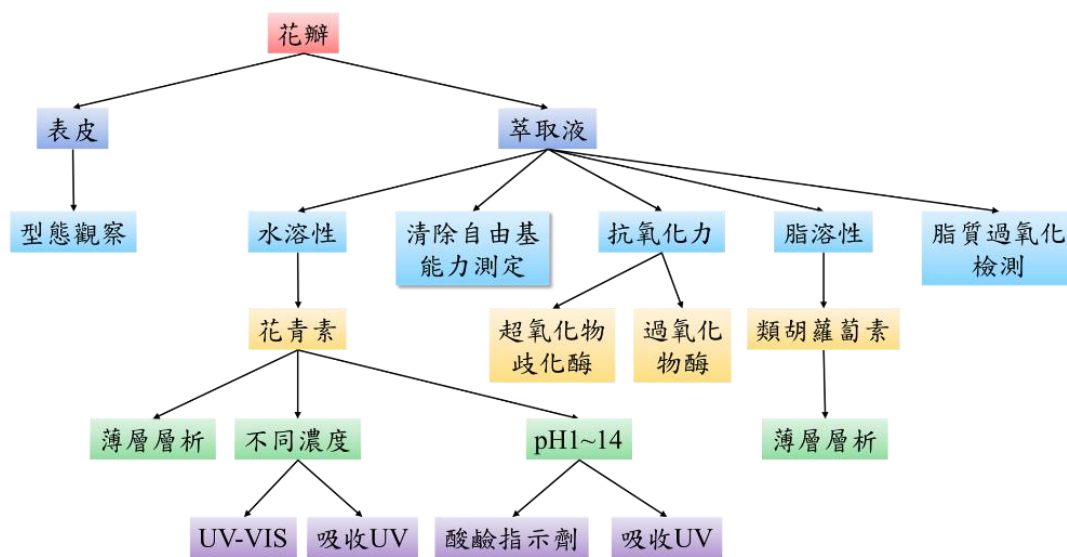


圖 3.實驗流程圖

二、研究方法

(一)檢測矮仙丹花的花青素含量(Giusti, M. M. et al., 2001)

1.藥品準備

(1)溶液 A：pH 1.0(125 ml of 0.2 M KCl and 375 ml of 0.2 M HCl)氯化鉀緩衝溶液 500mL

(2)溶液 B：pH 4.5(200 ml of 1 M Sodium Acetate $C_2H_3NaO_2 \cdot 3H_2O$, 120 ml of 1 M HCl and 180 ml of DW)醋酸鈉 sodium acetate buffer 緩衝溶液 500mL。

2.實驗步驟

(1)採集矮仙丹花朵。將花朵0.5克，加入1%鹽酸化甲醇容液研磨。

(2)將研磨液倒入小燒杯加上1%鹽酸甲醇溶液約至10mL，以錫箔紙覆蓋後，放置恆溫往復式恆溫震盪水槽，溫度設定加熱至40℃，震盪轉速設定50 rpm，加熱浸提30分鐘

(3)將適當矮仙丹花的研磨液倒入離心管，並置於離心機內，以6000轉離心20分鐘，取上清液作為「萃取液」。

(4)將「萃取液」0.5ml，溶於裝有(2.5-0.5=2) ml的pH 1.0緩衝溶液的比色管中，掃描330~800nm最大吸光值波長 $\lambda_{vis-max}=515$ 。稀釋倍數(Dilution Factor) $DF = \frac{2.5}{0.5} = 5$

(5)以pH 1.0的緩衝液配稀釋溶液，稱為A溶液。以pH 4.5的緩衝液配稀釋溶液，稱為B溶液。

(6)靜置約15分鐘，以紅花為例，測量紅花的A溶液在515nm、700nm的吸光值 A_{515} 、 A_{700} 與紅花的B溶液在515nm、700nm的吸光值 B_{515} 、 B_{700} ；粉花亦同。

代入下列公式，將紅花、粉花與黃花中花青素的總量以(mg/L) Cyanidin-3-glucoside(花青素-3-葡萄糖苷) 表示。

(7)公式：

$$C_{mg/L} = \left((A_{\lambda_{vis-max}} - A_{700})_{pH1.0} - (B_{\lambda_{vis-max}} - B_{700})_{pH4.5} \right) \times 449.2 \times \frac{1000}{26900} \times DF$$

(8)薄層層析檢測(TLC)

以毛細管吸附「萃取液」，滴於TLC片上，以正丁醇：甲酸：水=12：1.7：4作為展開液，以薄層層析法，進行定性分析。

(二)矮仙丹花的 UV-Vis 光譜圖

1.以減壓過濾方法提高研磨液的過濾效果。將布氏漏斗裝至側枝三角錐形瓶(抽濾瓶)上，側枝外接抽濾管，利用伯努力效應以高速的水流通過側管產生壓力，將研磨液快速過濾帶入錐形瓶內，而花瓣研磨殘渣會留在濾紙上方。此時再以鹽酸甲醇溶液對殘渣及濾紙進行洗滌至變白色。

2.將過濾液透過索氏萃取器結晶析出。

3.已知 $ppm = \frac{mg}{L}$ ，製作濃度 T_0 (ppm)之青花素溶液原液。取 $(W_1 - W_0)$ mg 加入 $X = \frac{W_1 - W_0}{T_0}$

(L)的水製成原液。之後取 T_{i-1} (ppm)前液 A mL 再加入 $A \times \frac{T_{i-1} - T_i}{T_i}$ mL 水稀釋成

$T_i, i = 1, 2, 3, \dots$ 濃度可得...

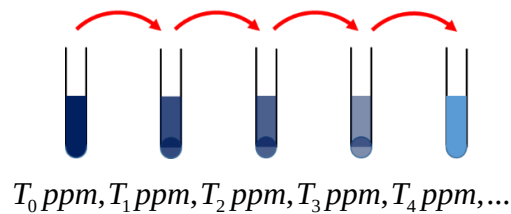


圖 4.移液示意圖

4.利用上面不同濃度的花青素，製作 UV-Vis 光譜圖。

(三)偵測不同濃度的花青素吸收 UV 的能力

- 1.將不同濃度的花青素 10mL 倒入培養皿，以 365nm 紫外光照射，偵測吸收 UV 的能力。
- 2.繪製濃度 ppm 與吸收 UV 量(mW/cm^2)的關係圖。

(四)偵測不同 pH 值的花青素吸收 UV 的能力

- 1.分別將試管倒入 pH=1~pH=14 的 7ml 緩衝液，並滴入 3ml 花青素溶液。觀察完變色反應後，將溶液加入培養皿。
- 2.以 365nm 紫外光照射，偵測吸收 UV 的能力並繪製濃度 ppm 與吸收 UV 量(mW/cm^2)的關係圖

(五) DPPH 自由基清除能力測定(Molyneux, P., 2004)

1.藥品準備

(1)DPPH 之甲醇溶液(100mL,0.1mM)。

將 0.0040gDPPH(分子量 394.32g/mol)加到甲醇溶液中，定容至體積 100mL 避光保存。

2.實驗步驟

(1)取矮仙丹花 0.3g 以 6ml 甲醇研磨，再以 6000 轉離心 20 分鐘。

(2)取 1mL 的上清液加入 2mL 0.1mM DPPH 甲醇溶液，作為操作組，吸光度 B，避光靜置 30 分鐘。取 1mL 的上清液加入 2mL 甲醇溶液，作為操作空白組，吸光度 B_0 。

(3)取 1mL 甲醇溶液加入 2mL 0.1mM DPPH 甲醇溶液，作為控制組，吸光度 A。取 1mL 的甲醇加上 2mL 甲醇溶液，作為控制空白組，吸光度 A_0 。

(4)以分光光度計在 517nm 讀取吸光值，則

$$\text{DPPH 自由基清除率}(\%) = \left(1 - \frac{\text{操作組}}{\text{控制組}}\right) \times 100\% = \left(1 - \frac{B - B_0}{A - A_0}\right) \times 100\%。$$

(六)SOD 量測(Cerqueira, J.V.A. *et al.*, 2023)

1.藥品準備

(1)磷酸鹽緩衝液 Potassium Phosphate (PP) (0.5L,50mM,pH 7.8)

量取磷酸氫二鉀 3.724g(K_2HPO_4 : 174.18g/mol)、磷酸二氫鉀 0.493g(KH_2PO_4 : 136.09g/mol)，加蒸餾水定容至 500ml

(2)甲硫氨酸 Met(0.1L,130 mM)

量取甲硫氨酸 1.9399 g (Met $C_5H_{11}NO_2S$: 149.21g/mol)，加磷酸鹽緩衝液定容至 100ml

(3)NitroBlue Tetrazolium (0.1L,750 μ M)

量取 0.06133g 的 NBT(分子量 817.64)，加磷酸鹽緩衝液定容至 100ml，避光保存

(4)EDTA (0.5L,0.1 mM)

量取 0.0146g 的 EDTA(分子量 292)，加磷酸鹽緩衝液至 500ml

(5)核黃素溶液(0.5L, 20 μ M)

量取 0.0376g 核黃素(分子量 376.36)，加水定容至 500 mL，避光保存。

2.樣品準備

酶液提取：取矮仙丹花 0.5g 於研鉢中，以 1ml 磷酸緩衝液研磨成漿，加緩衝液至 5ml 放置冰中浸提 20 分鐘。以離心機 6000rpm 離心 20min，上清液為 SOD 粗提液。

3.實驗操作

(1)取 5 支比色管，其中 3 支為測定管，2 支為對照管，每支分別先加入：

1.7 ml 磷酸緩衝液、0.3mlMET、0.3mlNBT、0.3mlEDTA、0.3ml 核黃素。

(2)A、B 二支對照管加 0.1ml 蒸餾水、C、D、E 三支為測定管加 0.1ml 酶液。每支總體積為 3ml。

(3)將 A 對照管至於暗處，其它 B、C、D、E 四管置於日光燈下反應 20 分鐘。

(七)POD 量測(Michael Mitsch *et al.*, 2020)

1.藥品準備

(1)Postassium phosphate buffer (500mL,50mM,pH=5.8)

量取 254.342 mg 磷酸氫二鉀 K_2HPO_4 (分子量 174.18)、3.204 g 磷酸二氫鉀 KH_2PO_4 (分子量 136.09)，加蒸餾水直至體積為 500m L。

(2)Guaiacol 愈創木酚(21.6mM)

量取 1mLGuayacol 溶液(分子量：124.14 密度：1.13)，加蒸餾水直至體積為 420mL。

(3)H₂O₂(39.2mM)

量取 0.5mL H₂O₂ 溶液(分子量：34；密度：1.1337)，加蒸餾水直至體積為 425mL。

(4)POD activity buffer：以 H₂O₂ :Guaiacol : Buffer = 810 μ L : 900 μ L : 900 μ L 配置。

2.樣品準備

(1)將 100mg 樣品加入 1ml Potassium phosphate buffer 以研鉢及杵研磨後倒入離心管。

(2)再以 6000rpm 離心 20 分鐘後置於冰上保存備用。

3.實驗操作

(1)將 2610 μ L 的 POD activity buffer 加入比色管，並於分光光度計中架設完成。

(2)取離心後的樣品上清液 90 μ L 加入比色管中快速混勻。

(3)以分光光度計測量吸光值，測量 8 分鐘後並記錄每分鐘 470nm 的吸光度。

(八)檢測矮仙丹花類胡蘿蔔素含量(Ramesh Kumar Saini. *et al.*, 2018)

1.藥品準備

提取液：以丙酮50mL與正己烷150mL，按1:3之體積比配置溶液200mL

2.實驗步驟

(1)採集矮仙丹花的矮仙丹花朵。將花朵 0.5 克，加入提取液研磨，並將研磨液倒入小燒杯加至約 10mL，以錫箔紙覆蓋後，放置恆溫往復式恆溫震盪水槽，溫度設定加熱至 40℃，震盪轉速設定 50 rpm，加熱浸提 60 分鐘。

(2)將適當紅花、粉花的研磨液倒入離心管，並置於離心機內，以 6000 轉離心 20 分鐘，取上清液至比色管，進行分光光度計讀取全光譜。

(3)長條濾紙

以毛細管吸附「萃取液」，滴於薄層色層層析長條濾紙上，以石油醚：正己烷=9：1 作為展開液，進行定性分析。

(九)型態觀察

1.以鑷子撕開矮仙丹花之上表皮與下表皮

2.切取 2 平方公分表皮組織，置入培養皿中浸泡 5%、10%、20%三種不同濃度的食鹽水

溶液 15 分鐘，取出表皮組織在顯微鏡中觀察

3.分成未染色、染亞甲藍藥劑與染蘇丹紅藥劑三種情形在顯微鏡中觀察

(十)MDA 量測(Du, H. *et al.*, 2018)

1.藥品準備

(1)10%三氯醋酸(TCA) 250mL

量取 25 g 三氯醋酸(TCA： $C_2HCl_3O_2$ ：163.4 g/mol)，加蒸餾水定容至 250mL

(2)0.67%硫代巴比妥酸(TBA) 100mL

量取 0.67g 硫代巴比妥酸(TBA： $C_4H_4N_2O_2S$ ：144.15 g/mol)，加 10%三氯醋酸(TCA)定容至 100mL。

2.實驗操作

(1)MDA 的提取：

秤取剪碎的樣品 0.25g，加入 2ml 10%TCA 研磨均勻，再加 8ml TCA 研磨並至於冰上浸提 10 分鐘，再以 6000 轉離心 10 分鐘，上清液為樣品提取液。

(2)顯色反應和測定：

吸取離心的上清液 2mL，加入 2mL 0.67%TBA 溶液(使用前搖勻)，混勻物於 100°C 沸水浴中反應 30 分鐘，迅速冷卻後 6000 轉離心 10 分鐘。取上清液測定 450、532 和 600nm 波長下的吸光度。(其中對照組為 2mL 蒸餾水，加入 2mL 0.67%TBA)

(3)公式：

$$C = \frac{6.45(D_{532} - D_{600}) - 0.56D_{450}}{W} \times N \text{。MDA 的濃度}(\mu M)$$

D450、D532、D600 分別代表 450、532 和 600nm 波長下的吸光度。

N：提取液總體積(mL)

W：植物組織重(g)

肆、研究結果

一、矮仙丹花的花青素含量

(一)比較水、甲醇、甲醇 1%HCl 萃取花青素的能力



圖 5.矮仙丹花瓣研磨樣品

1.研磨結果

以上樣品為矮仙丹紅花花瓣，而提取溶液由左至右依序為水、甲醇、甲醇 1%HCl(簡稱酸性甲醇)，經往復式恆溫震盪水槽震盪後，最右邊紅色更加明顯。在酸性環境中，花青素主要以紅色 *flavylium cation* 陽離子式存在(Nitalpatil *et al.*, 2015)。

2.比較水、甲醇、甲醇 1%HCl 萃取出的花青素

(1)TLC 分析

以毛細管吸附樣品溶液，滴於 TLC 片上，分別用正丁醇：甲酸：水=12：1.7：4 作為展開液(Nital patil, & Ajit datar. 2015)，以薄層層析法，進行定性分析。

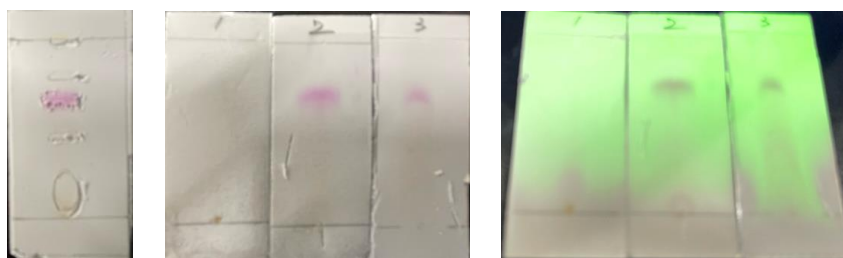
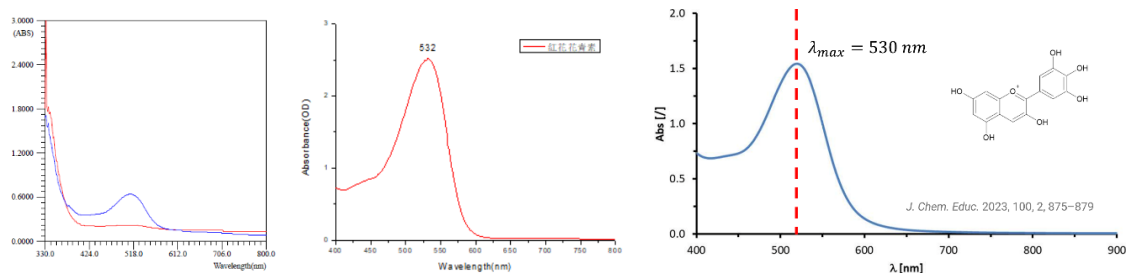


圖 6.粗萃液展開結果圖

TLC 片由左至右依序為以 1 水、2 甲醇、3 酸性甲醇為提取液的樣品點，經紫外光照射後，以水作為提取劑的提取結果在 TLC 片上並沒有明顯花青素之訊號，甲醇及酸性甲醇為提取劑的提取結果均可以顯示出紅色花青素的訊號，因此推斷甲醇以及酸性甲醇均適合作為本實驗之提取劑。由訊號分布可以得知，花青素的訊號相對於其他訊號來說更明顯，因此暫時推估花青素所佔有之比率應最多，而其餘為非花青素物質，因訊號微弱，初步判斷應不影響後續實驗，是否影響整體實驗由光譜結果再確認。

(2)光譜分析



甲醇(藍)與水(紅)萃取

酸性甲醇萃取

標準花青素光譜

由 TLC 分析結果可以得知利用甲醇、酸性甲醇溶液浸提均可以得到花青素，因此以 UV-Vis 吸收光譜進行分析，並比對文獻上酸性的花青素之 UV-Vis 吸收光譜圖。如圖所示，在光譜中的紅線與藍線分別為使用水及甲醇作為提取液的吸收光譜。其中因為甲醇本身為中性物質，因此其 UV-Vis 吸收光譜的檢測結果與文獻所示之結構不同，容易被誤解萃取出之物質為非花青素；以酸性甲醇溶液萃取出來的 UV-Vis 吸收光譜圖與文獻示完全一致，加上酸性環境下花青素可能以較為穩定的 flavion cation 結構存在，因此最後選定以酸性甲醇溶液作為主要的萃取方式。

綜合以上兩種物質的鑑定結果可以得到，雖然由薄層層析可以發現溶液並非為純的花青素，但是從 UV-Vis 吸收光譜可以得知其他非花青素物質的含量相對於花青素而言是具有可忽略性的，因此需評估溶液內花青素之相對含量。

(二)花青素相對含量分析

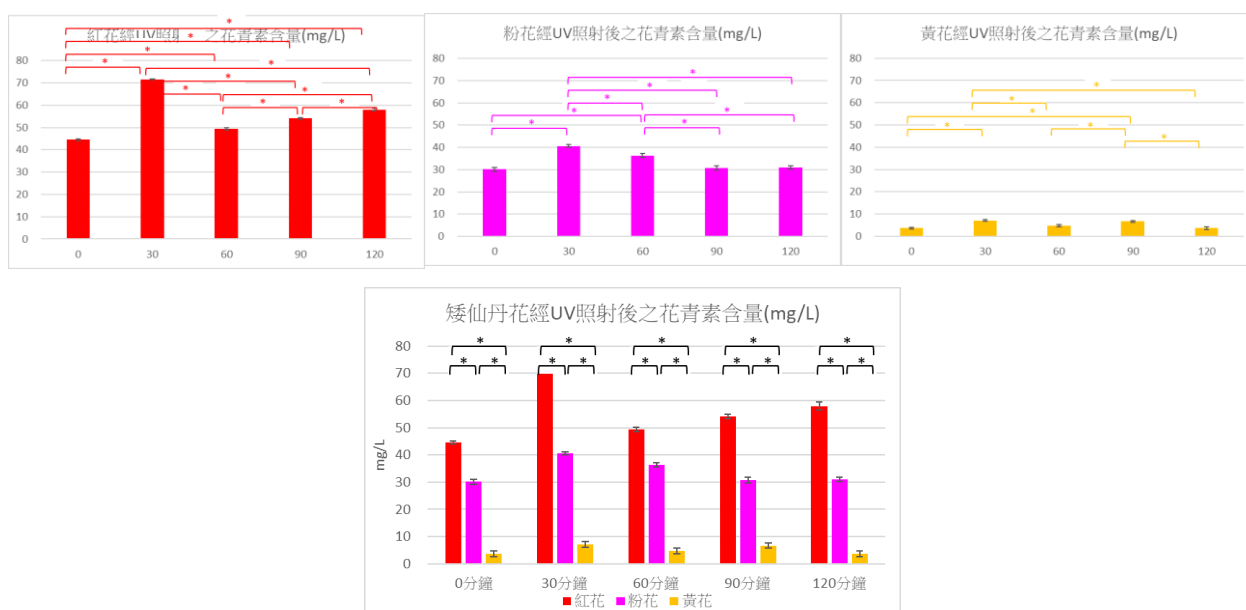
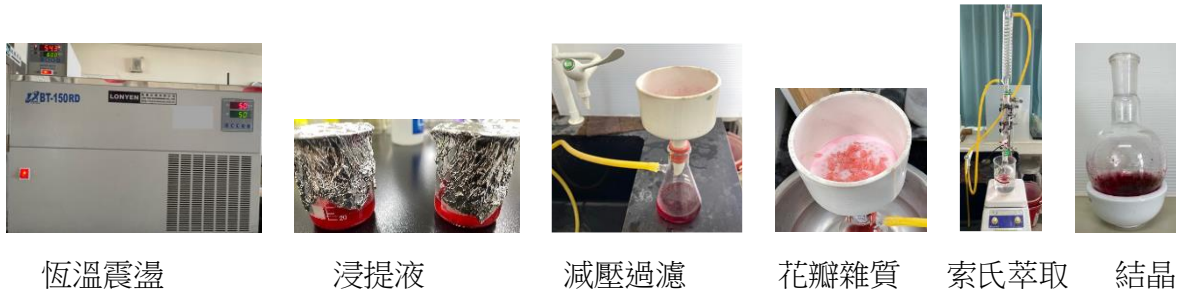


圖7.花青素含量

由數據觀察，「紅花萃取液的花青素含量皆高於粉花、黃花」。其中紅花、粉花、黃花花青素皆在照射 30 分鐘時最高，且均有顯著上升之趨勢，但照射 60 分鐘後均有下降之情形。紅花花青素在照射 60 分鐘後有再度上升之趨勢，粉花則持平。黃花花青素含量遠小於紅花、粉花，升降趨勢不一。

二、紅花與粉花的 UV—Vis 光譜圖

(1)依實驗步驟取得結晶。



(2)配置不同濃度的溶液，由分光光度計測得矮仙丹紅花與粉花的最大吸收波長(吸收光譜波峰)約在波長 530nm 處，與文獻相符(Elia Bergamin *et al.*, 2023)。由此可驗證「萃取液中物質含有花青素」。

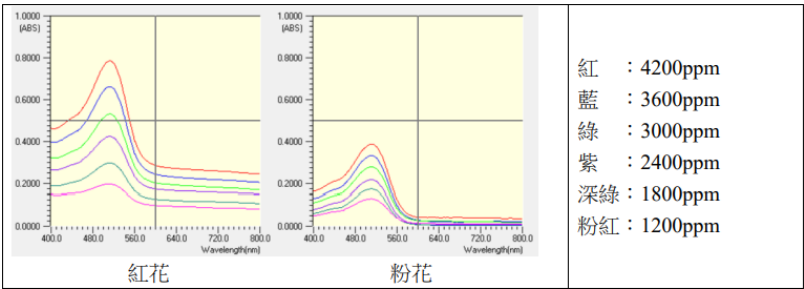


圖 8.紅花與粉花的 UV—Vis 光譜圖

三、不同濃度的花青素溶液之 UV 吸收能力

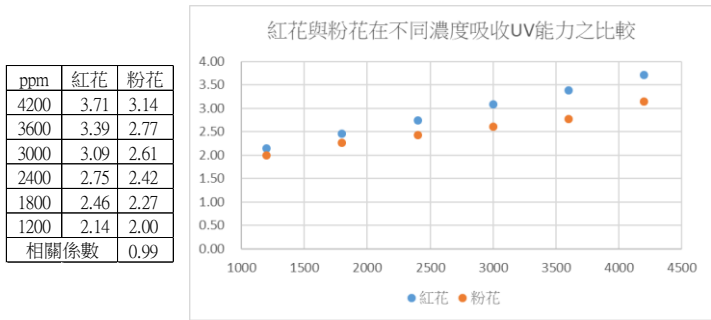


圖 9.不同濃度下，紅花、粉花花青素吸收 UV 能力之趨勢比較圖

由圖可知，花青素濃度與吸收 UV 之間的關係呈「高度正相關」，且隨著濃度增加，紅花花青素的吸收之能力也顯著較粉花為佳。

四、pH=1~14 的花青素溶液吸收 UV 之能力

同種花瓣的花青素種類大抵相同，而花青素在不同 pH 值環境下，花青素會因為結構改變使其呈現出來的顏色不同(Dangles, & Fenger, 2018)。以下我們設計了在不同 pH 值環境下的實驗，觀察經結構改變的花青素是否具有不同的抗 UV 能力。

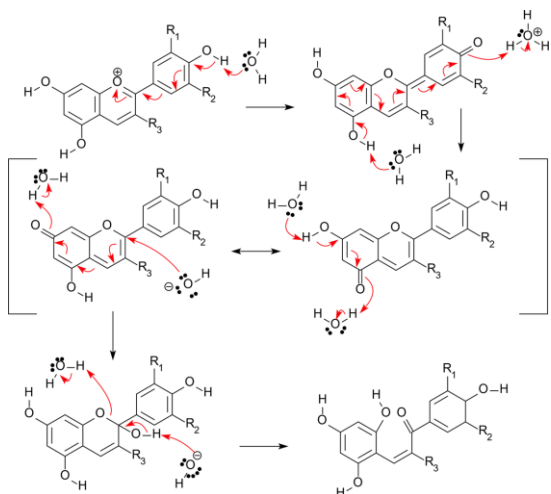


圖 10.花青素於不同酸鹼時的反應機構



圖 11.花青素在不同 pH 值下的顏色變化

(一)Arduino 測試

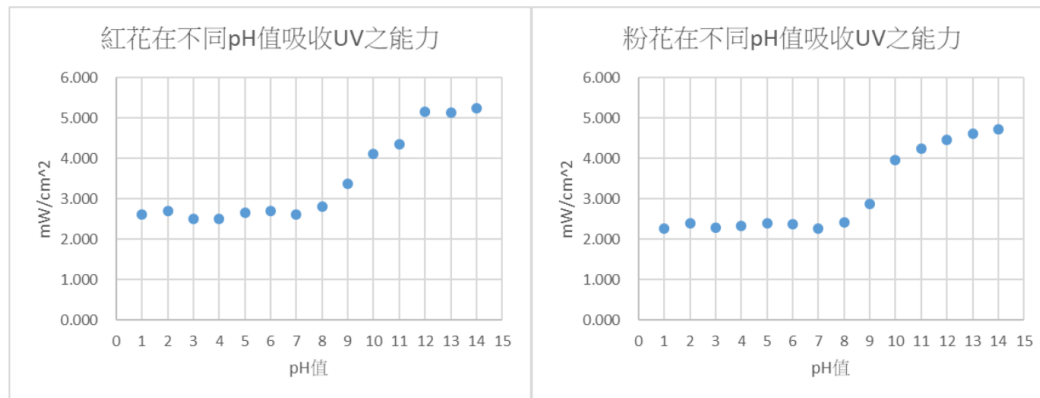


圖 12. pH1~14 的花青素溶液吸收 UV (mW/cm^2)之趨勢圖

由結果可知：在 pH1~8 之間，「花青素的吸收 UV 之能力的變化幾乎不變」，且紅花略高於粉花。在 pH8~12 之間，「隨著 pH 增加，花青素的吸收 UV 能力也增加」，且紅花增加的幅度較粉花大。在 pH12~14 之間，「花青素的吸收 UV 之能力變化趨於平緩」，且紅花的吸收量皆高於粉花。

實驗結果顯示：「花青素在鹼性緩衝液中的 UV 吸收能力較強，且隨著 pH 值上升而增加」。另外，也可以推論「紅花對 UV 吸收能力皆高於粉花，且不受 pH 值的影響。」

(二)光譜分析

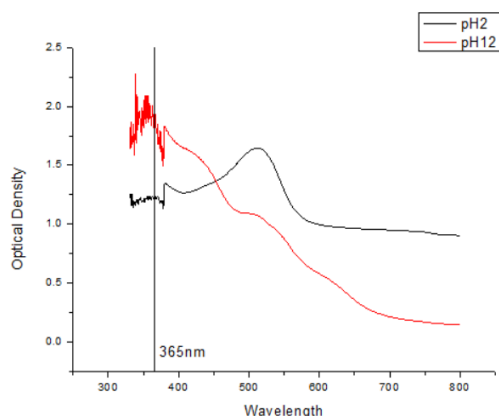


圖 13.鹼性與酸性環境下，花青素吸收 UV-Vis 吸收光譜圖

以 365nm 作為是 UVA 的參考基準，可以發現在鹼性環境下的花青素的吸光值較在酸性情況下的吸光值高，由此也可以佐證經 Arduino 測試結果所得到的結論：「花青素在鹼性環境下，吸收 UV 能力較在酸性環境佳」。

五、DPPH 自由基清除能力測定

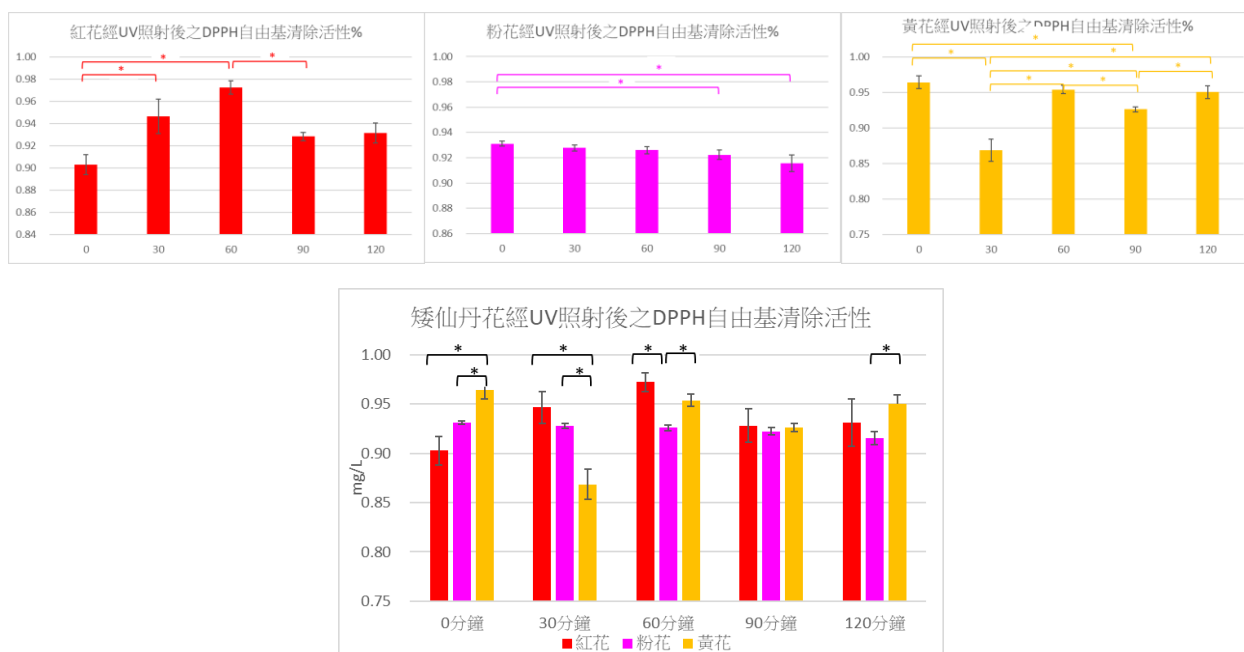


圖 14.矮仙丹花 DPPH 自由基清除活性%

不論是紅花、粉花、黃花，經照射 UV 後，紅花與黃花變化較大。紅花先增加後降低又緩增，粉花則穩定下降。黃花則有降升交替之趨勢。在短期照射下，紅花的 DPPH 清除率有顯著上升的情形，而粉花、黃花則緩降；在長期照射下，紅花的 DPPH 清除率略較 0 分鐘為高，粉花的 DPPH 清除率顯著下降，黃花的 DPPH 清除率略較 0 分鐘為低。

六、矮仙丹花的 SOD 測試

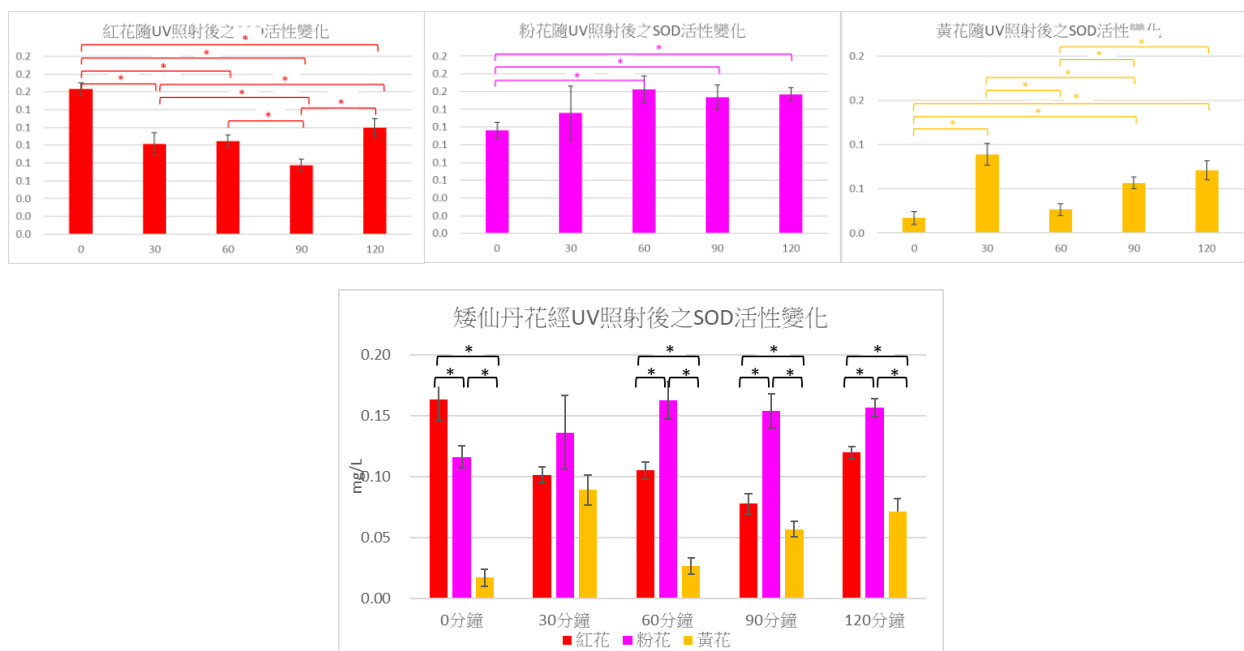


圖 15.矮仙丹花在不同照射時間下的 SOD 數值

為了探討植物體本身抗 UV 以及抗氧化相關的能力，首先將矮仙丹的花瓣照射 UV 光，以激發細胞內部產生活性氧化物種(ROS)，接著進行 POD 以及 SOD 的測試，並推敲其消長與花青素之間的關係。

(一)整體而言

以不同照射時數的紅花、粉花及黃花花瓣進行SOD的測試，如圖所示，並以60分鐘為界線，將照射時間分為前期及長期可以得以下結果：在前期，紅花的SOD活性下降，粉花上升，而黃花則先升後降；在長期的情況下，紅花的SOD有略微上升的趨勢，粉花幾乎持平，而黃花則持續上升。

(二)照射 UV 與未照射 UV 之比較

為了確定紫外光對花瓣的照射，是否引發體內 SOD 的活性的變化具有顯著的影響，因此利用 t-test 進一步分析有無照射紫外光之間的數據比對。研究結果如圖所示，紅花的 SOD 在 0 到 30、60、90、120 分鐘都有顯著下降之趨勢；粉花在 0 到 60、90、120 分鐘都有顯著上升之趨勢；黃花在 0 到 30、90、120 都有顯著上升之趨勢。

(三)不同花色在相同照射 UV 時間時，其 SOD 之比較

為了探討花青素的含量是否會對 SOD 的活性造成影響，因此對比了紅花與粉花、黃花在相同照射時間下，其 SOD 的活性大小。如圖所示，紅花在 0 分鐘時，其 SOD 活性顯著大於粉花、黃花。隨著時間變化，紅花的 SOD 下降，粉花、黃花的 SOD 則上升，因此三

者間在照射 30 分鐘時，SOD 活性沒有顯著差異。照射 60 分鐘以後，粉花的 SOD 濃度皆大於紅花大於黃花，且三者之間均有顯著差異之關係。而黃花在照射 UV 後，雖略有上升，但 SOD 含量為三種花色中最少者。

七、矮仙丹花的 POD 測試

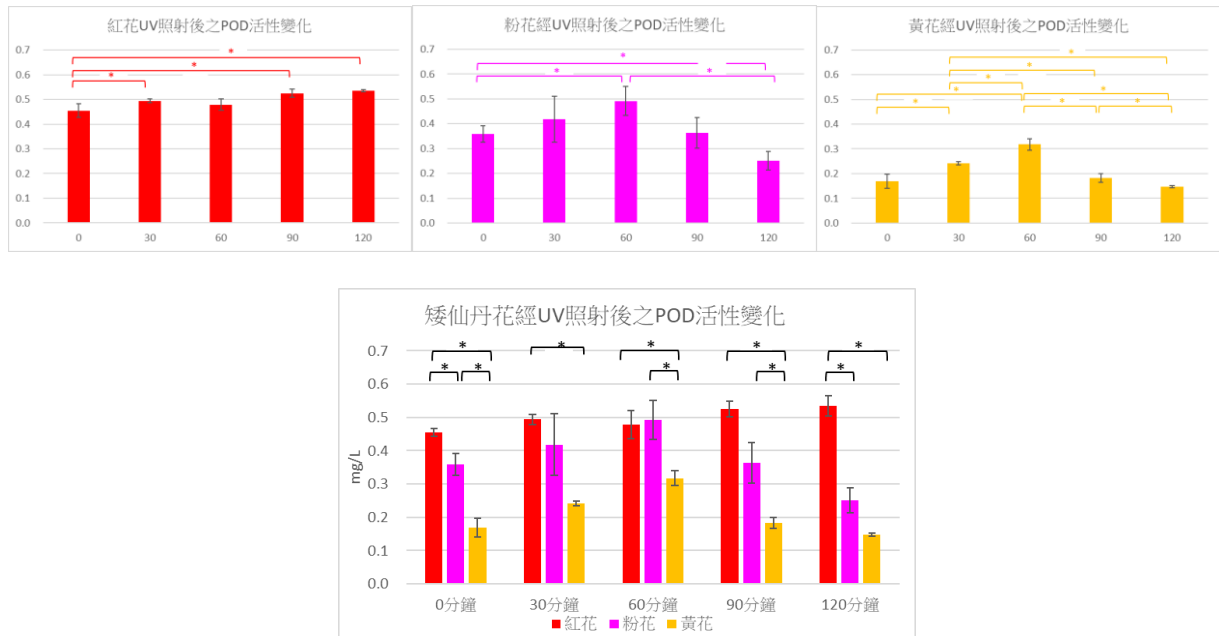


圖 16.矮仙丹花在不同照射時間下的 POD 數值

(一)整體而言

以下探究 POD 在對照射不同 UV 時數的影響。以 60 分鐘為界，將照射時間分為前期及長期可以發得知以下結果:「在前期，紅花、粉花、黃花的 POD 活性皆有上升之趨勢；在長期，紅花則持續上升，而粉花、黃花則急速下降。」

(二)照射 UV 與未照射 UV 之比較

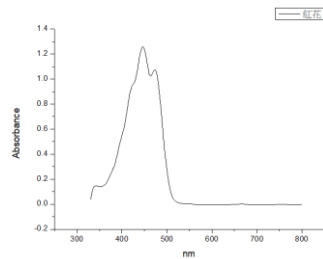
為了確定紫外光對花瓣照射引發POD的活性的變化著實具有顯著的影響，因此利用t-test 進一步分析有無照射紫外光之間的數據比對。根據圖示，紅花在0到30、90、120分鐘下皆具有顯著上升之情形，粉花在0到60、120分鐘皆具有顯著變化之情形，而黃花則在0到30、60 具有顯著變化。顯然，POD的活性也會隨著時間而會有所變化。

(三)不同花種在相同照射UV時間時，其POD之比較

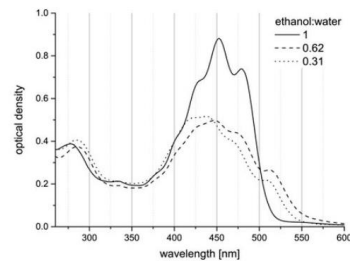
隨後緊接著探討花青素的含量是否會對 POD 的活性造成影響，因此對比了紅花與粉花、黃花在相同照射時間下，其 POD 的活性大小。由圖可知，在未照射 UV、照射 120 分鐘後的情況下，紅花的 POD 活性顯著大於粉花、黃花。照射 30、60、90 分鐘後，紅花、黃花之間出現顯著差異，照射 60、90 分鐘後，粉花、黃花也出現顯著差異。由此可知，隨著

時間改變，紅花、粉花、黃花的 POD 活性產生變化，差異也會有所改變。紅花 POD 濃度較粉花高且有顯著差異。由此可知，隨著時間改變，紅花、粉花、黃花的 POD 活性產生變化，差異也會有所改變。紅花 POD 濃度較粉花高且有顯著差異。而黃花在照射 UV 後，雖略有上升，但 POD 含量為三種花色中最少者。

八、類胡蘿蔔素



萃取液之胡蘿蔔素的 UV-Vis 吸收光譜



標準類胡蘿蔔素 UV-Vis 吸收光譜

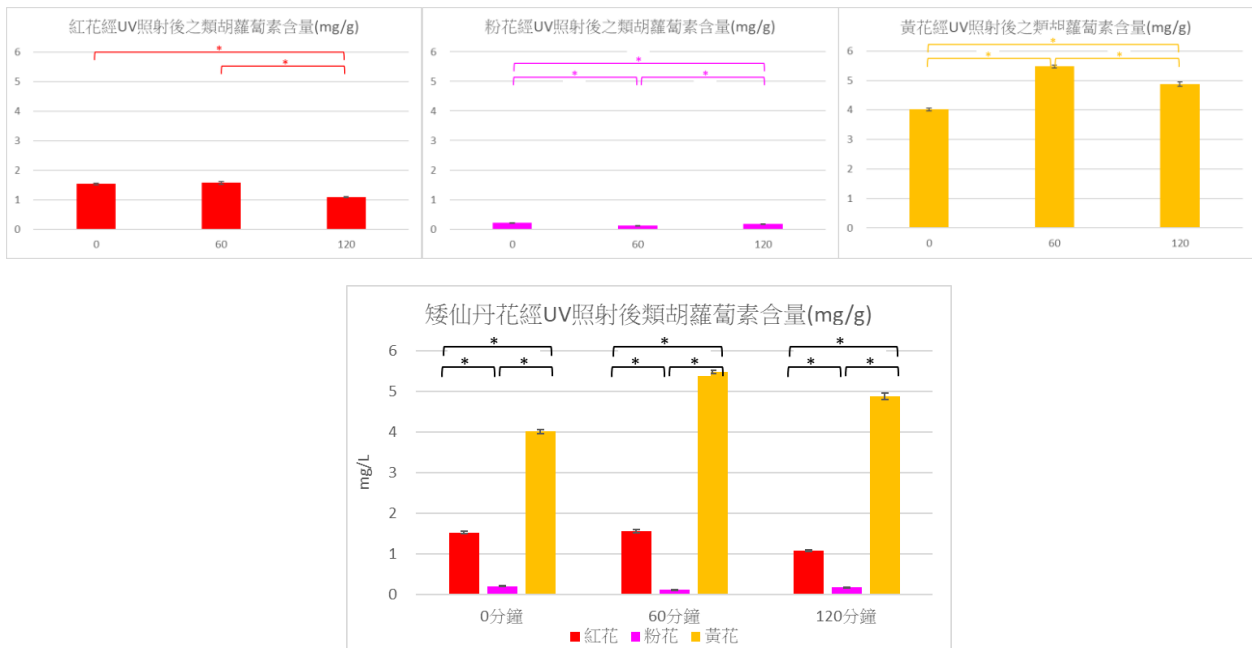


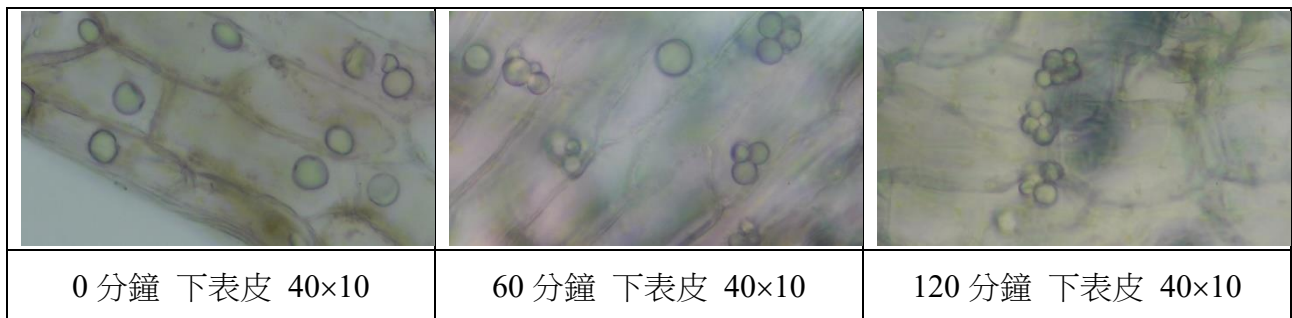
圖 17.矮仙丹花類胡蘿蔔素萃取結果之比較(箭頭處為粉花放大觀察)

依實驗步驟所取得的萃取液，在全光譜分析中可判別為類胡蘿蔔素。紅花類胡蘿蔔素在長期照射(120 分鐘後)下有顯著下降的趨勢。粉花類胡蘿蔔素極少，但在短期(60 分鐘)照射下具有顯著下降的趨勢，在長期照射下具有顯著上升的情形。黃花類胡蘿蔔素為三者中最高，在短期、長期照射下均顯著上升。比較三者相同時間下，類胡蘿蔔素的含量可以發現，三者不論是在照射 0、60、120 分鐘時，三者間均有顯著差異。

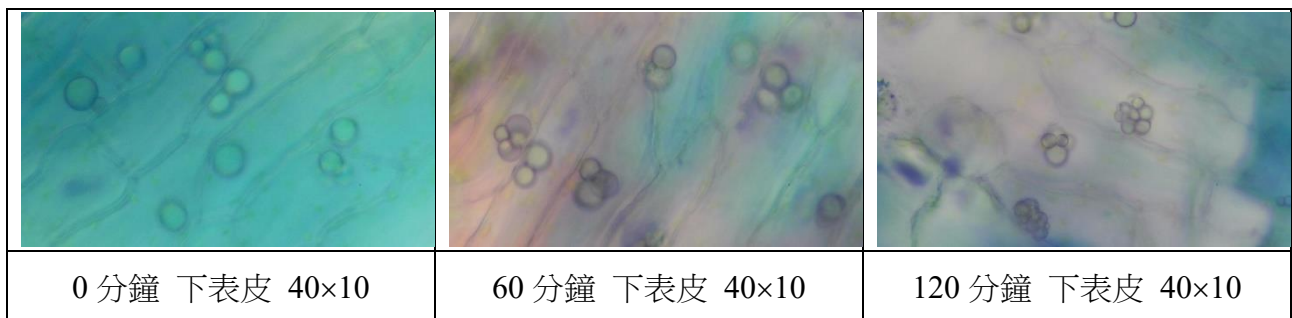
九、型態觀察

(一)紅花下表皮

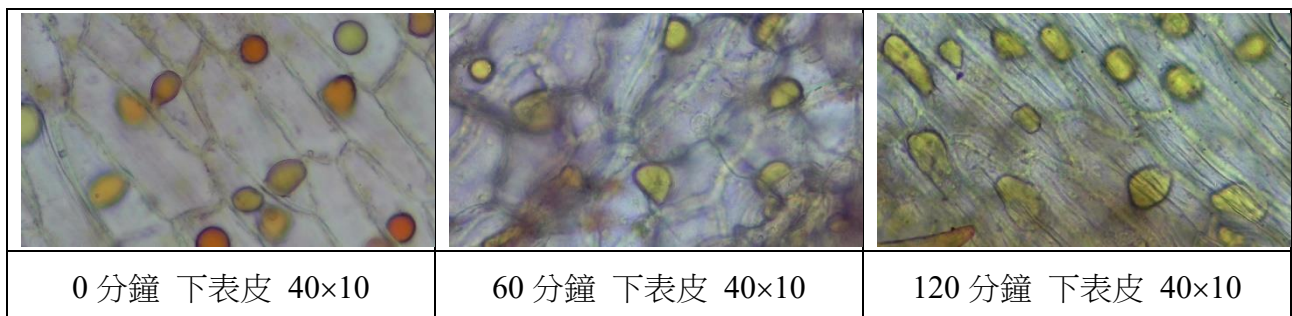
1.未染色



2.亞甲藍

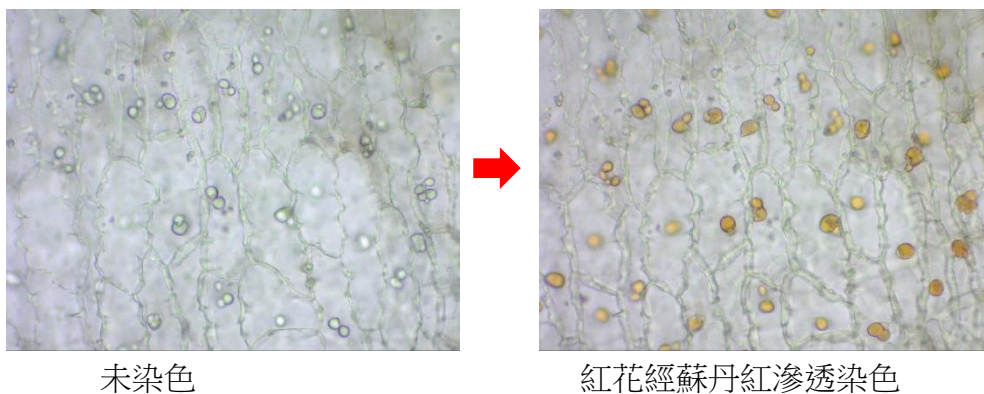


3.蘇丹紅



4.觀察結果

(1)將未染色之玻片先行在顯微鏡下觀察，接著在蓋玻片旁滴上幾滴蘇丹紅，並以縮時攝影進行拍照，經過一段時間觀察，可得如圖結果，推論未染色所觀察到的圓圈顆粒幾乎是油粒體。



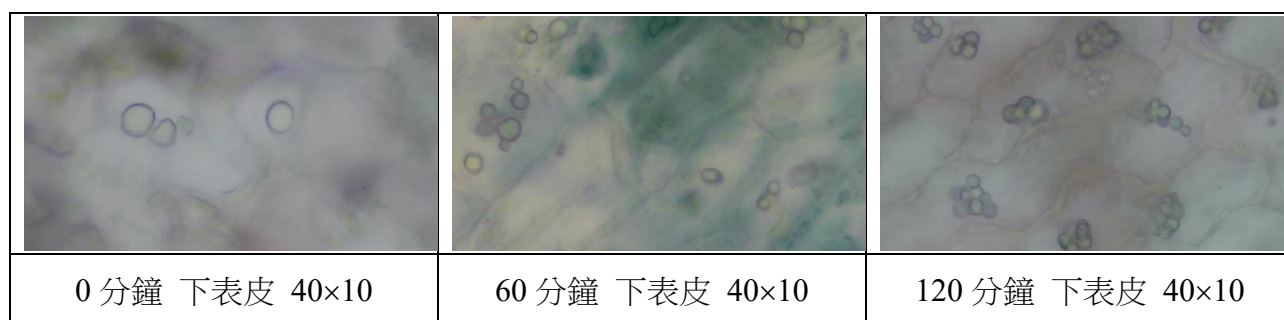
(2)未染色時與染亞甲藍的情況略同。照射0分鐘時顆粒大小相似，且較照射UV後的顆粒大；照射60分鐘後，部分顆粒開始有分裂的情形發生，而出現大小不一的顆粒聚集(葡萄串狀)之現象。

(3)照射120分鐘後，大顆粒幾乎分裂為小顆粒狀，而有小顆粒聚集的情形出現。

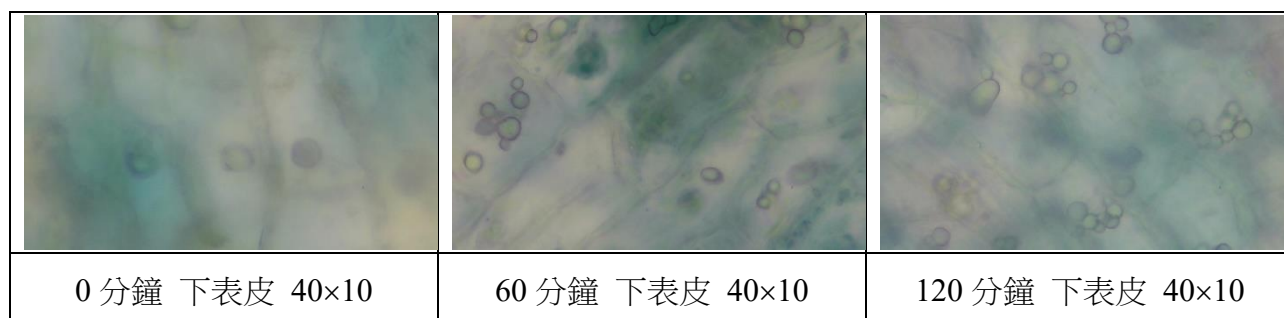
(4)染蘇丹紅在未照射UV時，顆粒呈圓形狀；照射60分鐘後，顆粒變形，且有擴散的情形；照射120分鐘後，顆粒變形及擴散情況更加明顯，顆粒大小也較照射0分鐘及60分鐘大。

(二)粉花下表皮

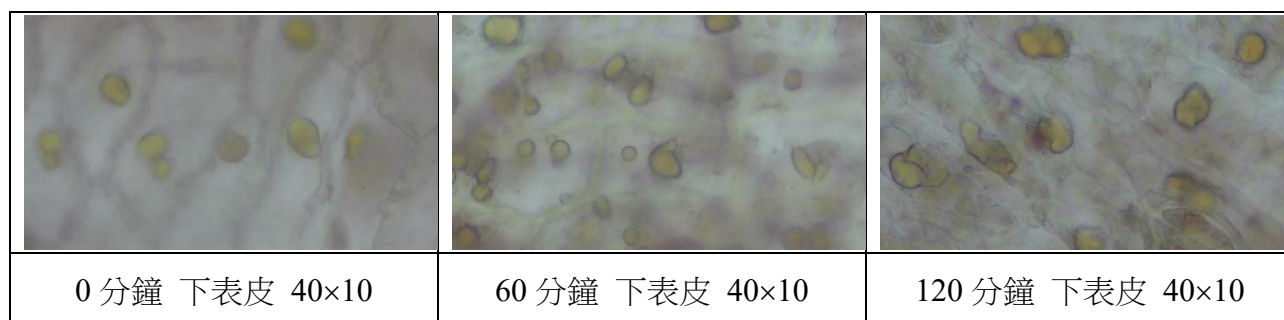
1.未染色



2.亞甲藍

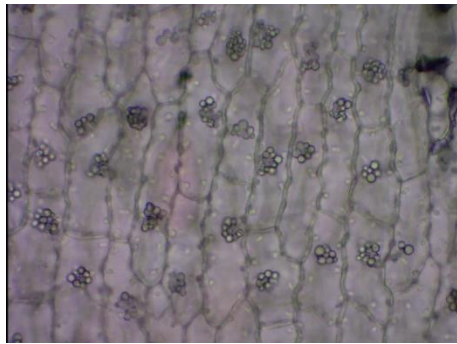


3.蘇丹紅

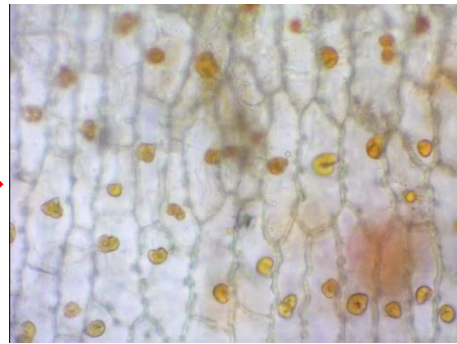


4.觀察結果

(1)同紅花的縮時攝影進行拍照，經過一段時間觀察，可驗證相同結果。



未染色



粉花經蘇丹紅滲透染色

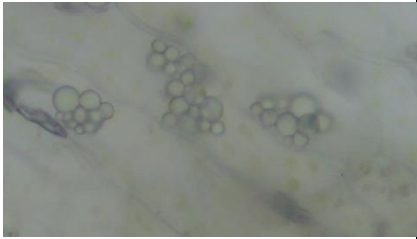
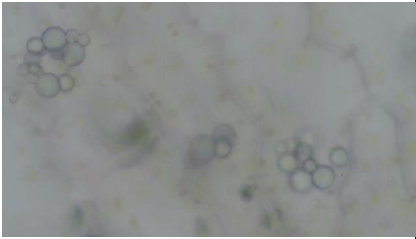
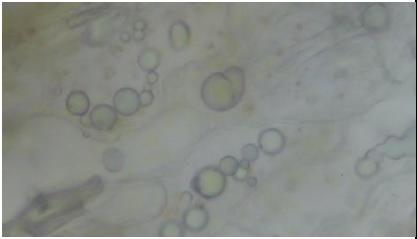
(2)未染色時與染亞甲藍的情況略同。在照射0分鐘時顆粒大小相似，且較照射UV後的顆粒大小來得大；照射60分鐘後，逐漸形成大小不一的顆粒(葡萄串狀)；120分鐘，大顆粒幾乎已分列為小顆粒而形成小顆粒聚集之現象。

(3)與紅花相比之下，粉花與紅花下表皮細胞的顆粒隨者照射時間越長，其顆粒皆有數量增生之情形，但不論是否照射UV，粉花顆粒的粒徑大小皆較紅花來得小。

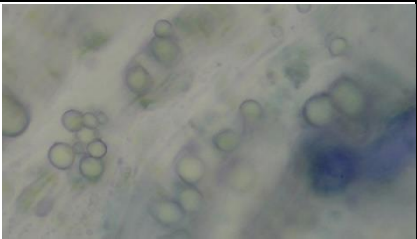
(4)染蘇丹紅與紅花情況相似，在未照射UV時，顆粒呈圓形狀；照射60分鐘後，顆粒變形，且有擴散的情形；照射120分鐘後，顆粒變形及擴散情況更加明顯，顆粒大小也較照射0分鐘及60分鐘大。

(三)黃花下表皮

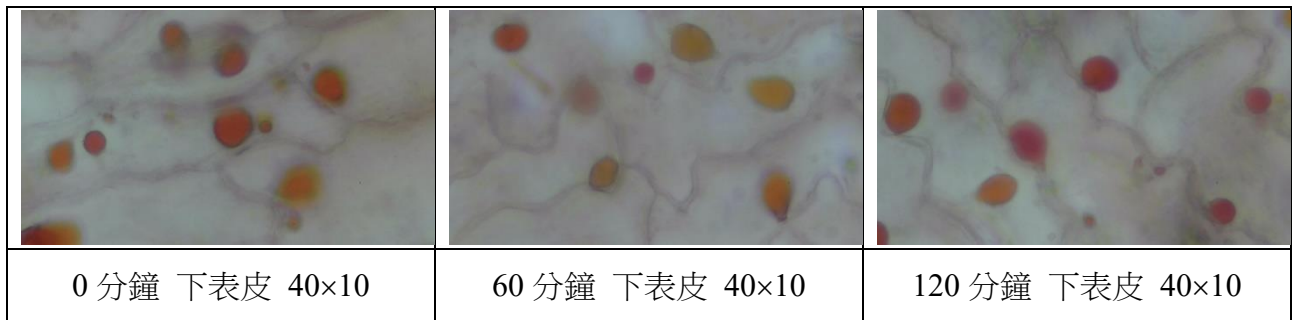
1.未染色

		
0 分鐘 下表皮 40×10	60 分鐘 下表皮 40×10	120 分鐘 下表皮 40×10

2.亞甲藍

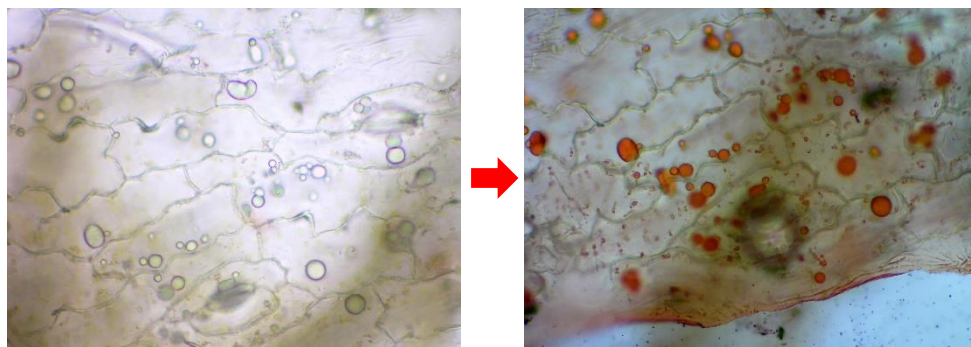
		
0 分鐘 下表皮 40×10	60 分鐘 下表皮 40×10	120 分鐘 下表皮 40×10

3.蘇丹紅



4.觀察結果

(1)同黃花的縮時攝影進行拍照，經過一段時間觀察，驗證相同結果。



未染色

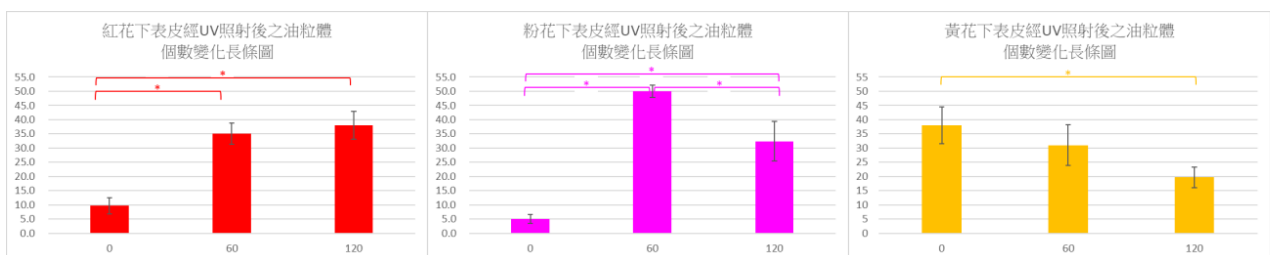
黃花經蘇丹紅滲透染色

(2)未染色時與染亞甲藍的情況略同。在未照射UV時有明顯大小不一的顆粒(葡萄串狀)；隨著照射時間增加，小顆粒數目稍微減少，但大顆粒數目增加。

(3)與前面花色相比，黃花下表皮油粒體的數目比較多，特別是小顆粒的數目；隨著照射UV時間增加，黃花顆粒的粒徑由小變大，與紅花由大變小恰相反。

(4)染蘇丹紅在未照射UV時，顆粒呈圓形狀；照射60分鐘後，顆粒大小及數目變化不大；照射120分鐘後，顆粒略變橢圓形，但顏色變淡。除此之外，我們發現黃花的顏色均較紅花、粉花深。

(四)矮仙丹花下表皮油粒體數目變化



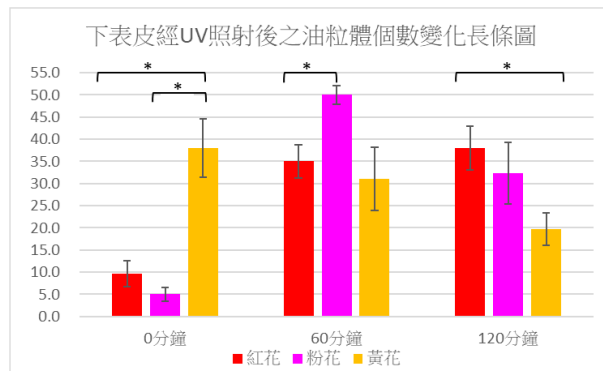


圖18.矮仙丹花下表皮油粒體數變化

根據圖18.紅花、粉花的油粒體在短期及長期照射下，其數量均有顯著上升之情形。三者成長趨勢不一。紅花油粒體數量不斷上升；粉花油粒體數量在照射60分鐘時顯著、快速上升，照射60分鐘後，有顯著下降的趨勢；黃花油粒體數量隨照射時間越長而下降。

(五)矮仙丹花下表皮染蘇丹紅隨UV照射時間油粒體面積百分比變化

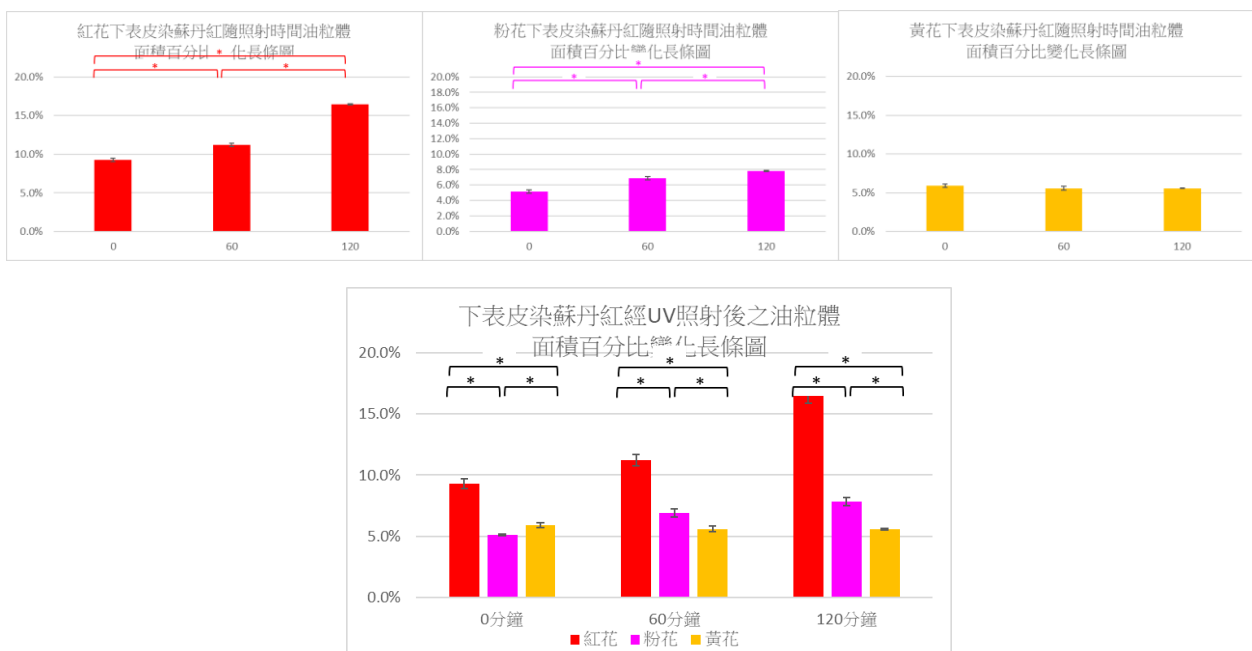
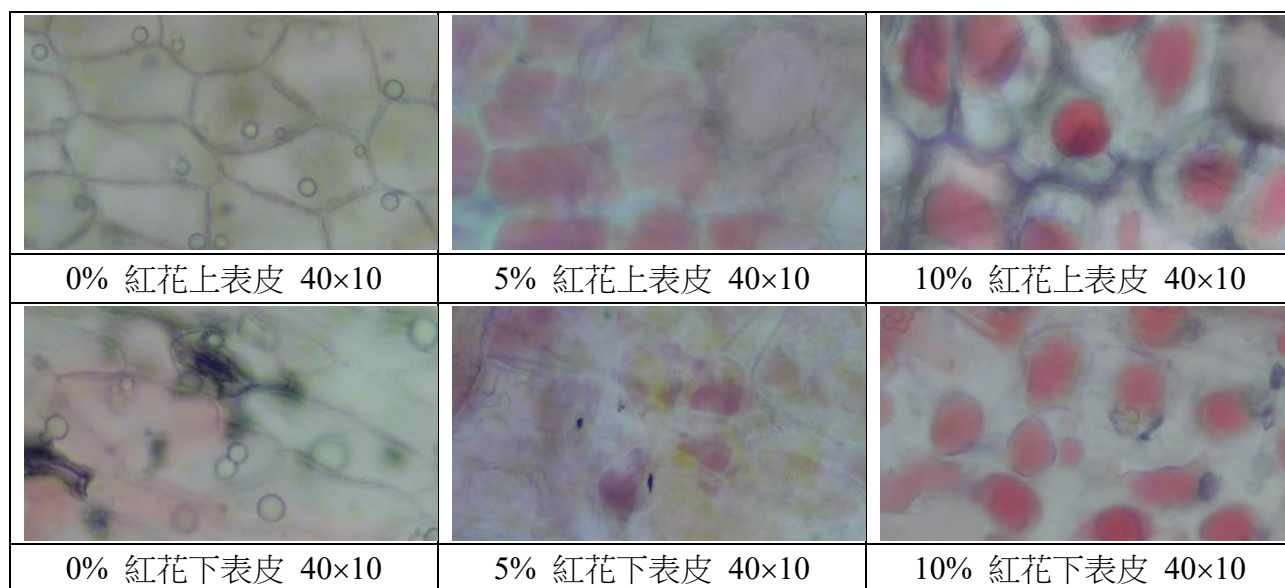


圖19.矮仙丹花下表皮油粒體面積變化

紅花、粉花下表皮油粒體經蘇丹紅染色後所占面積百分比隨照射時間增加而有顯著增加的趨勢。黃花油粒體面積則無顯著變化。

(六)質壁分離



觀察紅花是因為紅花的花青素比粉花多。隨著食鹽水的濃度增加，可觀察到液胞裡花青素逐漸聚集一起，且上表皮花青素顏色比下表皮略深。

十、矮仙丹花的MDA測試

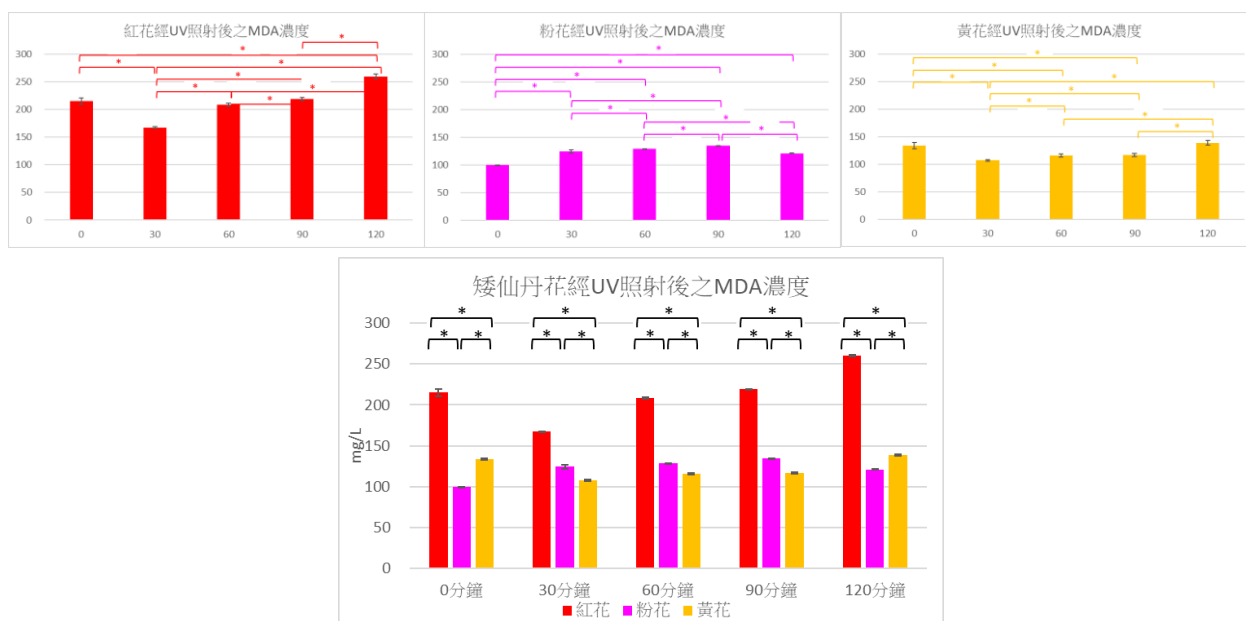


圖20.矮仙丹花隨UV照射時間MDA濃度變化

- 1.在0分鐘時，紅花的MDA最高，經UV照射後，紅花與黃花的丙二醛隨照射時間，先下降而後上升。粉花的丙二醛經照射UV後，雖有上升趨勢，但變化趨勢較緩。
- 2.丙二醛是脂質過氧化的重要指標，細胞膜受損越嚴重，其產生的丙二醛含量也會較多。由型態觀察可以得知，照射UV會使油粒體的顆粒及面積發生變化，因此推斷在UV照射下使脂質分解，形成丙二醛。此外，紅花的油粒體較大，因此在照射UV後所產生的丙二

醛會較多。綜合上述，紅花雖花青素較多，吸收UV及抗氧化能力也較粉花高，但因為油粒體的含量較粉花多，所以丙二醛產生量較多。粉花與黃花相比之下，黃花體內的類胡蘿蔔素雖為三者中最高，但缺乏花青素吸收UV，故產生的ROS較高，脂質過氧化的情形也較為嚴重，所以即使油粒體面積較紅花、粉花低，但丙二醛的含量卻與粉花相近。

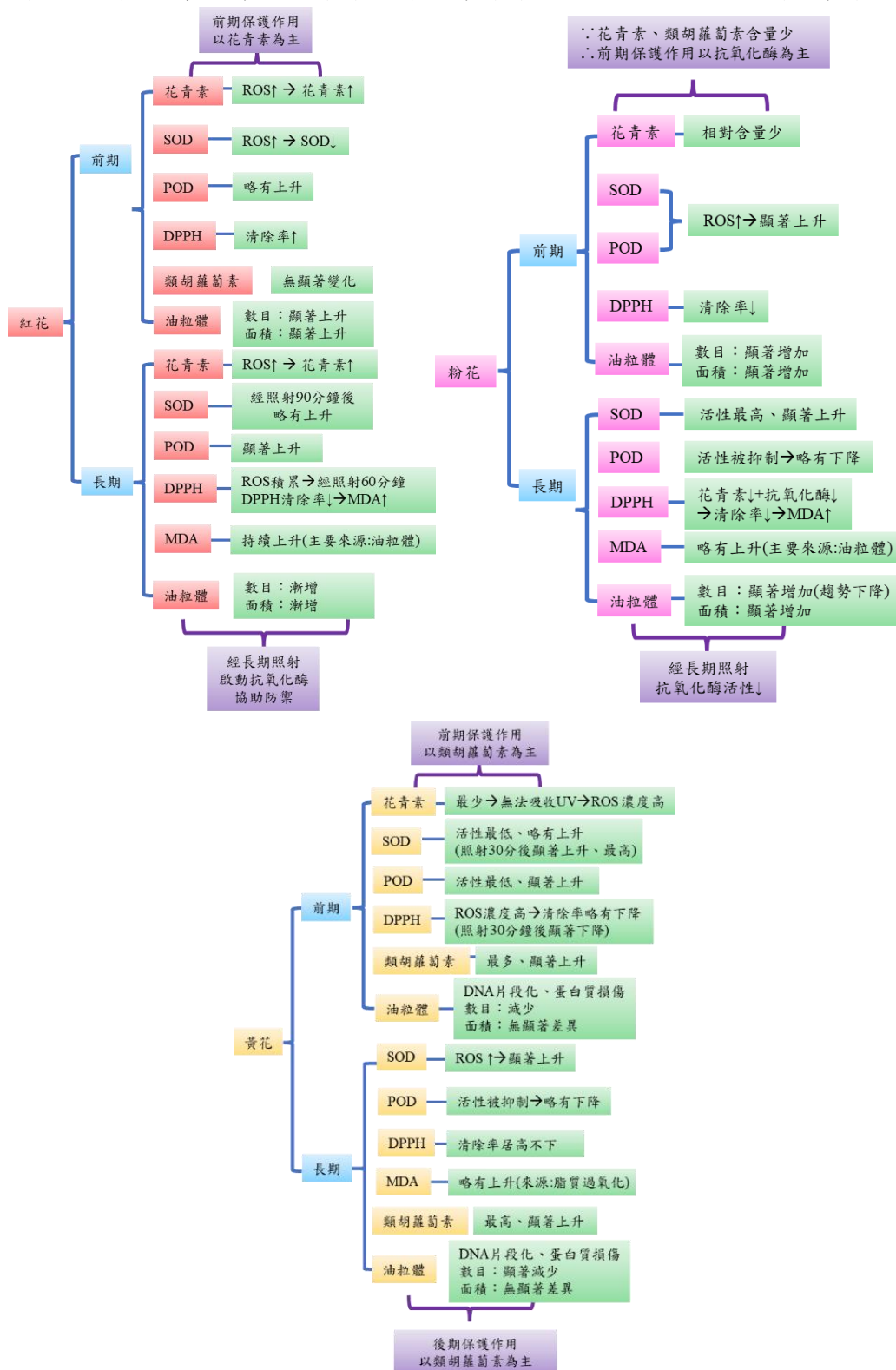


圖 21.矮仙丹實驗總整理

伍、討論

一、在 UV-Vis 吸收光譜中，越接近 UV 波段處，發現會有不規則之起伏之現象。

最常見的花青素結構中， R_1 、 R_2 為 OH 基團，而 R_3 為糖苷鏈，稱為 cyanidin-3-glucoside(花青素-3-葡萄糖苷) (Supradip Saha *et al.*, 2019)。因糖苷鏈亦具有吸收 UV 之能力，而苯環也具有吸收 UV 之能力，故兩物質吸收 UV 的訊號會在 UV 波段處重疊。加上儀器的偵測極限限制下，越接近 UV 波段處，其吸收光譜會有不規則起伏之現象。

二、不同酸鹼值下，花青素具有不同的顏色及吸收 UV 能力。

以酸性甲醇溶液進行花青素的萃取可以得到以陽離子形式出現的(A)結構，其顏色為紅色；隨著 pH 值的上升，花青素的結構亦隨之改變，導致一系列顏色的改變，所以花青素可以當酸鹼指示劑。除此之外，苯環可以吸收 UV，由圖可得，結構(A)至(F)至少有一個(含)以上的獨立苯環構造，其中結構(E)和(F)均具有兩個苯環。結構中獨立苯環的數量隨 pH 增加而變多，可得鹼性環境下的花青素具有高 UV 吸收量值。

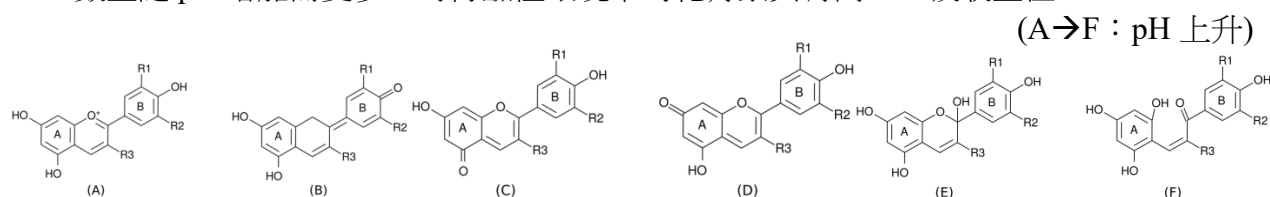


圖 22.不同 pH 值下的花青素結構(Changho Jhin *et al.*, 2014)

三、探討花青素、SOD、POD 之間清除自由基之關係。

(一)本實驗以不同花色的矮仙丹來探討其抵抗非生物性壓力因子(紫外光)，作為指標性實驗物種。發現短期照射 UV 後，可能累積較高濃度的 ROS，誘發花青素的合成，生化合成花青素的機制複雜，包含轉錄因子(例如:R2R3-MYB)的參與，在細胞質合成，再送至液胞儲存，此種藉由 ROS 為訊號調控花青素合成，以清除自由基的過程尚未清楚 (Cerqueira, *et al.* 2023)。

(二)花青素與 SOD、POD 之間的交互作用

UV 照射矮仙丹後，因花青素本身的結構具有共振鏈，這樣的共振鏈在光譜學中被稱作是有助色基團(發色基團)。助色基團是主要可以吸收 UV 的重要因子，又因為紫外光容易造成生物體中或是環境中產生游離化的電子，因此若有花青素的存在下，花青素可以因吸收紫外光而有效阻擋游離化電子的生成，接著所剩的電子跟氧氣和產生超氧陰離

子。超氧陰離子藉由 SOD 與花青素的作用下會形成過氧化氫，而過氧化氫會藉由 POD 的催化而形成水跟氧氣。但是過氧化氫也可能會反應成氫氧自由基，氫氧自由基再接收電子後，又會造成脂質過氧化、DNA 片段化、蛋白質損傷.....等，而使抗氧化酶的轉譯遭到抑制(Cerqueira, J.V.A. *et al.*, 2023)(圖 23)。

(三)不同照射時間對三種矮仙丹花的影響

1.紅花情形，在短期照射下，紅花的花青素顯著上升、

SOD 有顯著下降的情形。除此之外，也發現了 POD 有顯著上升的趨勢，其抗氧化力有上升的情形。另外，

我們也發現了類胡蘿蔔素在短期照射下沒有顯著變化，因此我們推斷紅花在短期照射下，主要以花青素的

保護為主。從長期來看，除了花青素持續顯著上升

之外，也發現了 SOD 在照射 90 分鐘後有略微上升的趨勢，POD 以長期來看有顯著

上升的情形，固可得以下結論：「在長期照射下，植物體內啟動了抗氧化酶的防禦機

制。」但是因為 ROS 的積累，故在照射 60 分鐘後，整體抗氧化能力下降、類胡蘿

蔔素亦顯著下降，導致 MDA 有上升的趨勢。

2.粉花情形，在短期照射下，因為體內的花青素、類胡蘿蔔素較少，所以在短期照射

下就啟動了抗氧化酶的防禦機制，所以 SOD、POD 均有顯著上升的情形。從長期來

看，SOD 顯著上升，但 POD 卻顯著下降，所以我們認為經長期照射下，抗氧化酶的

活性下降，加上 ROS 的累積，故整體抗氧化力下降，MDA 有上升的情形。

3.黃花情形，在短期照射下，因為缺乏花青素吸收 UV，故 ROS 的濃度高，使 SOD 在

照射 30 分鐘後就有顯著、迅速上升的情形，而 POD 在短期照射下，亦具有顯著上

升的情形，但是因為 ROS 濃度高，所以其抗氧化能力下降。另外，因為黃花的抗氧

化酶的活性及花青素的濃度較粉花及紅花低，故需大量依賴類胡蘿蔔素清除 ROS，

其類胡蘿蔔素在短期照射下有顯著上升的情形。在長期照射下，SOD 有顯著上升之

趨勢，POD 隨著照射時間越長有下降的趨勢，顯示在高濃度 ROS 的環境下，抗氧化

酶的活性遭到抑制。類胡蘿蔔素因是黃花體內主要的抗氧化物質，抗氧化酶的活性

下降，其為清除 ROS，故顯著上升，並在長期照射下類胡蘿蔔素均維持在高濃度。

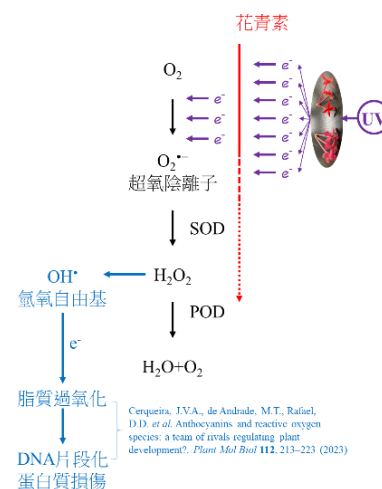


圖 23.花青素與抗氧化酶的關係

四、在型態觀察中，照射 UV 的時間越長，油粒體會有破碎之情形發生。

(一)經由蘇丹紅染色後，顆粒有被染色的情形，且有聚集的現象。因此，我們推測顆粒可能是負責儲存脂質(如：類胡蘿蔔素)的油粒體。

(二)紅花隨著 UV 照射時間越長，ROS 也隨之上升，導致植物體內的代謝速率必須增加，才會使氧化壓力不會過高，所以油粒體面積上升，顆粒數亦有數量增生的現象；而粉花，則因 ROS 產生過多，所以抗氧化能力顯著下降，且體內為增加代謝率，故油粒體面積及顆數均有顯著上升之情形；黃花體內缺乏花青素吸收 UV，使得 ROS 的濃度較高，可能使其 DNA 片段化及蛋白質損傷，所以油粒體的增生受到了影響，其顆數有顯著下降的情形，但因為類胡蘿蔔素上升，所以油粒體面積變化不明顯，其顆粒數有顯著下降的情形，但油粒體面積變化則不顯著。

(三)氫氧自由基會與膜的脂肪酸鏈產生反應。經由一系列化學反應後，最後會形成脂質過氧化物。最後因為脂質過氧化物會發生會發生聚合作用，使膜的流動性下降(Young IS & McEneny J.,2001)(圖 24)，故油粒體必須進行數量增生，才能維持膜的穩定性。另外，因為紅花的油粒體較粉花、黃花大，故照射 UV 後，脂質變成 MDA，所以紅花體內所偵測到的 MDA 濃度會較高，而黃花的油粒體面積及顆粒數雖較粉花少，但是產生的 ROS 較多加上較高的類胡蘿蔔素，所以 MDA 的濃度與粉花相近，凸顯其適應性較弱的性質。(Emanuel Schmid-Siebert, 2016)。

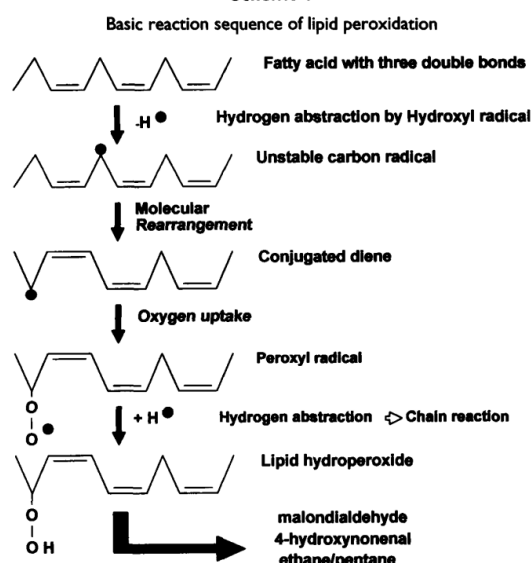


圖 24.脂質過氧化造成細胞膜的流動性下降(Young IS & McEneny J.,2001)

陸、結論與應用

一、隨著花青素濃度不斷提升，抗 UV 的效果越佳。花青素在不同 pH 值環境下，會因為結構改變而呈現不同的顏色，且鹼性環境下花青素呈現較佳的抗 UV 效果，可應用花青素作為天然的防曬物質。另外，比較紅花、粉花、黃花中存在不同濃度的花青素及類胡蘿蔔素也會影響花瓣組織的抗氧化力，在短期(0~60 分鐘)與長期(60~120 分鐘)照射 UV 的比較，發現紅花之花青素增加，使抗氧化力上升，傷害性指標丙二醛

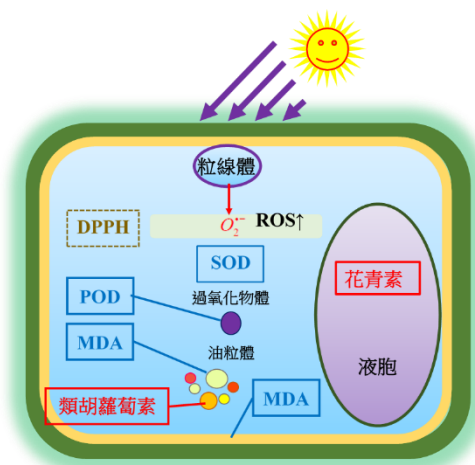


圖 25.矮仙丹花瓣抗 UV 模式圖

(MDA)濃度則先降後升。粉花則利用抗氧化酶，超氧化物歧化酶(SOD)持續上升、過氧化物酶(POD)短期(1 小時)顯著上升，用以清除活性氧(ROS)，但長期(2 小時) POD 之濃度顯著下降，顯示細胞產生傷害。位於油粒體的脂溶性物質如類胡蘿蔔素，在下表皮可明顯觀察隨 UV 照射時間變長逐漸增加數量，而 MDA 之濃度上升顯示膜脂過氧化的傷害較大。黃花因為缺乏花青素，所以在短期照射下，類胡蘿蔔素、抗氧化酶的活性上升作為保護措施。在長期照射下，仍是以類胡蘿蔔素作為主要的抗氧化物質，其 MDA 濃度亦有增加之情形。總而言之，紅花色素含量較高，能協助抗 UV 功能；粉花色素含量較低，需較多抗氧化酶的表現，才能降低紫外線的傷害；黃花不論在短期及長期皆以類胡蘿蔔素來抗氧化。紅花、粉花、黃花利用不同策略，以降低紫外線傷害的影響。

二、未來展望

現代生活中，花青素多用於保健食品，具有護膚、防皺、促進新陳代謝、保護眼睛等功能，是長期於烈日下工作及經常使用 3C 產品的人們不可或缺的保健食品。未來可比較不同種類的花青素及類胡蘿蔔素之抗氧化能力或利用它們的特性開發出相關抗 UV 產品，例如塗抹的脂溶性防曬油膏、抗紫外線塗料、纖維、窗貼、眼下防曬貼，以及可供食用的抗氧化藥品等。隨著臭氧層破洞的情況加劇，可能會使波長更短的 UV 光進入地球。更高能量的電磁波可能會使植物傷害增加，甚至造成死亡，並帶來大量的經濟損失或糧食危機。若我們能將經濟作物進行品種改良，例如：研究如何影響色素合成的途徑，使植物的花青素含量增加，或是使植物的花青素穩定的呈現在鹼性之環境下，並增加其抗氧化酶基因的表現，使其抵抗 UV 的能力增加。未來若能應用成功，將會是人類的一大福祉。

柒、參考文獻

1. 蔣永正(2011 年)。植物對環境逆境之調控與應用。 <https://reurl.cc/m0yDeW>
2. 盛建軍、李想、何永美、祖艷群、湛方棟、李元 (2019)。UV-B 輻射對花青素合成代謝的影響及分子機理。植物生理學 *Plant Physiology Journal*, 55, 949-958。
3. 崔麗霞、張志軍、李曉君、李會真(2017 年 2 月 28 日)。花青素提取、分離純化技術研究進展。
4. Bouvier F, Backhaus RA, Camara B. Induction and control of chromoplast-specific carotenoid genes by oxidative stress. *J Biol Chem*. 1998 Nov 13;273(46).
5. Changho Jhin, & Keum Taek Hwang. (2014). Prediction of Radical Scavenging Activities of Anthocyanins Applying Adaptive Neuro-Fuzzy Inference System (ANFIS) with Quantum Chemical Descriptors. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(8), 1-13.
6. Cerqueira, J.V.A., de Andrade, M.T., Rafael, D.D. *et al.* (2023). Anthocyanins and reactive oxygen species: a team of rivals regulating plant development?. *Plant Mol Biol* 2023, **112**, 213–223
7. Elia Bergamin, Giacomo Fabris, Matteo Neffat, Paola Baron Toaldo, Daniela De Luchi, and Renato Bonomi(2023). Multiple Solid–Liquid Extraction: Determination of Extraction Yield through UV-Vis Spectroscopy, *Journal of Chemical Education* 2023 100 (2), 875-879
8. Emanuel Schmid-Siegert, Olga Stepushenko, Gaetan Glauser, Edward E. Farmer, (2016). Membranes as Structural Antioxidants: RECYCLING OF MALONDIALDEHYDE TO ITS SOURCE IN OXIDATION-SENSITIVE CHLOROPLAST FATTY ACIDS, *Journal of Biological Chemistry*, Volume 291, Issue 25, 2016, Pages 13005-13013
9. Giusti, M. M., & Wrolstad, R. E. (2001). Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, 00(1), F1.2.1–F1.2.13.
10. Jacob C. Dean, Ryoji Kusaka, Patrick S. Walsh, Florent Allais, and Timothy S. Zwier. (2014) Plant Sunscreens in the UV-B: Ultraviolet Spectroscopy of Jet-Cooled Sinapoyl Malate, Sinapic Acid, and Sinapate Ester Derivatives. *J. Am. Chem. Soc.* 136 (42), 14780–14795.
11. Jomova K, Raptova R, Alomar SY, Alwasel SH, Nepovimova E, Kuca K, Valko M. Reactive oxygen species, toxicity, oxidative stress, and antioxidants: chronic diseases and aging. *Arch Toxicol*. 2023 Oct;97(10)
12. Michael Mitsch, & Bryan White. (2020). A Simple, Quantitative Peroxidase Assay Demonstrating Enzyme Inhibition with L-cysteine. *Biology Laboratory Education*, 41, 1-10.
13. Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J Sci Technol*, 26(2), 211-219.
14. Nital Patil, Ajit Ganesh Datar. (2015). Extraction, stability and separation of anthocyanins of ixora coccinea linn. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* March 2015 7(3):198-202
15. Olivier Dangles, & Julie-Anne Fenger. (2018). The Chemical Reactivity of Anthocyanins and Its Consequences in Food Science and Nutrition. *Advances in Anthocyanin Research* 2018, 23(8), 1-23.
16. Pontsho Patricia Twala, Alfred Mitema, Cindy Baburam, & Naser Aliye Feto. (2020). Breakthroughs in the discovery and use of different peroxidase isoforms of microbial origin. *AIMS Microbiology*, 6(3), 1-20.
17. Ramesh Kumar Saini, Young-Soo Keum. (2018). Carotenoid extraction methods: A review of recent developments, *Food Chemistry*, Volume 240, Pages 90-103
18. S. Saha, J. Singh, A. Paul, and R. Sarkar. (2019). Anthocyanin Profiling Using UV-Vis Spectroscopy and Liquid Chromatography Mass Spectrometry. *Journal of AOAC International*, 103(1), 1-17.
19. Scandalios, J. G. (1993) Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiol*. 101: 7-12.
20. Sweta Sharma, Chhavi Baran, Aradhana Tripathi, Aishwary Awasthi, Aarti Jaiswal, Rahul Uttam, Abhi Sarika Bharti, Renu Singh & K. N. Uttam (2021) Phytochemical Screening of the Different Cultivars of Ixora Flowers by Non-Destructive, Label-Free, and Rapid Spectroscopic Techniques, *Analytical Letters*, 54:14, 2276-2292
21. Wise, R.R., & Hooper, K. (2006). The structure and function of plastids. P.9
22. Xiao Q, Zhu Y, Cui G, Zhang X, Hu R, Deng Z, Lei L, Wu L, Mei L. A Comparative Study of Flavonoids and Carotenoids Revealed Metabolite Responses for Various Flower Colorations Between *Nicotiana tabacum* L. and *Nicotiana rustica* L. *Front Plant Sci*. 2022 Apr 25;13
23. Young IS, McEneny J.(2001). Lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *Biochem Soc Trans*. 2001 May;29(Pt 2):358-62.

捌、附錄

一、矮仙丹花的花青素含量

紅花									
	N1	N2	N3	平均	標準差	T-test	T-test	T-test	T-test
0	45.318	44.026	44.224	44.522	0.568	對照組			
30	71.355	72.448	70.461	71.421	0.813	0.000	對照組		
60	49.988	49.889	48.100	49.326	0.868	0.003	0.000	對照組	
90	54.659	54.560	52.970	54.063	0.774	0.000	0.000	0.005	對照組
120	56.051	58.436	59.330	57.939	1.384	0.000	0.000	0.002	0.026
粉花									
	N1	N2	N3	平均	標準差	T-test	T-test	T-test	T-test
0	28.920	31.205	30.112	30.079	0.933	對照組			
30	39.852	41.144	40.845	40.614	0.552	0.000	對照組		
60	35.280	37.168	36.572	36.340	0.788	0.002	0.003	對照組	
90	32.199	30.410	29.615	30.742	1.081	0.548	0.000	0.004	對照組
120	32.100	30.709	30.013	30.940	0.868	0.393	0.000	0.003	0.849
黃花									
	N1	N2	N3	平均	標準差	T-test	T-test	T-test	T-test
0	3.975	3.180	3.776	3.644	0.338	對照組			
30	6.559	7.255	7.454	7.089	0.384	0.001	對照組		
60	5.168	4.969	4.075	4.737	0.475	0.057	0.006	對照組	
90	6.857	7.056	6.062	6.658	0.429	0.001	0.350	0.013	對照組
120	3.379	3.081	4.572	3.677	0.644	0.952	0.003	0.134	0.006

	時間	N1	N2	N3	平均	標準差	T-test	T-test
紅	0	45.318	44.026	44.224	44.522	0.568	對照組	
粉	0	28.920	31.205	30.112	30.079	0.933	0.000	對照組
黃	0	3.975	3.180	3.776	3.644	0.338	0.000	0.000
紅	30	71.355	72.448	70.461	71.421	0.813	對照組	
粉	30	39.852	41.144	40.845	40.614	0.552	0.000	對照組
黃	30	6.559	7.255	7.454	7.089	0.384	0.000	0.000
紅	60	49.988	49.889	48.100	49.326	0.868	對照組	
粉	60	35.280	37.168	36.572	36.340	0.788	0.000	對照組
黃	60	5.168	4.969	4.075	4.737	0.475	0.000	0.000
紅	90	54.659	54.560	52.970	54.063	0.774	對照組	
粉	90	32.199	30.410	29.615	30.742	1.081	0.000	對照組
黃	90	6.857	7.056	6.062	6.658	0.429	0.000	0.000
紅	120	56.051	58.436	59.330	57.939	1.384	對照組	
粉	120	32.100	30.709	30.013	30.940	0.868	0.000	對照組
黃	120	3.379	3.081	4.572	3.677	0.644	0.000	0.000

	0分鐘	30分鐘	60分鐘	90分鐘	120分鐘
紅花	44.522	71.421	49.326	54.063	57.939
粉花	30.079	40.614	36.340	30.742	30.940
黃花	3.644	7.089	4.737	6.658	3.677
紅標準差	0.568	0.868	0.868	0.774	1.384
粉標準差	0.933	0.552	0.788	1.081	0.868
黃標準差	0.338	0.384	0.475	0.429	0.644

二、pH=1~14 的花青素溶液吸收 UV 之能力

紅花						粉花					
pH	N=1	N=2	N=3	平均	標準差	pH	N=1	N=2	N=3	平均	標準差
1	2.45	2.68	2.69	2.607	0.111	1	2.16	2.30	2.32	2.260	0.071
2	2.53	2.85	2.69	2.690	0.131	2	2.24	2.55	2.40	2.397	0.127
3	2.28	2.64	2.60	2.507	0.161	3	2.26	2.39	2.19	2.280	0.083
4	2.28	2.60	2.60	2.493	0.151	4	2.12	2.57	2.32	2.337	0.184
5	2.28	3.01	2.65	2.647	0.298	5	2.14	2.61	2.44	2.397	0.194
6	2.32	3.01	2.77	2.700	0.286	6	2.20	2.69	2.23	2.373	0.224
7	2.28	3.05	2.52	2.617	0.322	7	1.97	2.57	2.23	2.257	0.246
8	2.53	3.17	2.73	2.810	0.267	8	2.77	2.52	1.95	2.413	0.343
9	2.61	3.82	3.66	3.363	0.537	9	3.29	2.55	2.77	2.870	0.310
10	4.48	3.86	3.99	4.110	0.267	10	5.12	3.40	3.34	3.953	0.825
11	4.52	4.23	4.31	4.353	0.122	11	5.08	3.78	3.84	4.233	0.599
12	4.97	5.28	5.21	5.153	0.133	12	5.05	4.02	4.32	4.463	0.433
13	5.13	5.36	4.92	5.137	0.180	13	5.01	4.27	4.55	4.610	0.305
14	5.30	5.53	4.92	5.250	0.252	14	4.89	4.31	4.96	4.720	0.291
相關	0.962	0.938	0.975			相關	0.901	0.916	0.976		
係數	N=3,1	N=1,2	N=2,3			係數	N=3,1	N=1,2	N=2,3		

三、矮仙丹花 DPPH 自由基清除能力測定

紅花									
	N1	N2	N3	平均	標準差	T-test	T-test	T-test	T-test
0	88.84%	89.75%	92.25%	0.903	0.014	對照組			
30	94.99%	96.45%	92.51%	0.947	0.016	0.047	對照組		
60	96.88%	98.51%	96.29%	0.972	0.009	0.005	0.124	對照組	
90	94.98%	92.64%	90.85%	0.928	0.017	0.181	0.333	0.032	對照組
120	93.36%	95.92%	90.09%	0.931	0.024	0.223	0.496	0.086	0.892

粉花									
	N1	N2	N3	平均	標準差	T-test	T-test	T-test	T-test
0	93.33%	93.11%	92.89%	0.931	0.002	對照組			
30	92.99%	92.89%	92.44%	0.928	0.002	0.184	對照組		
60	92.89%	92.67%	92.22%	0.926	0.003	0.091	0.521	對照組	
90	92.68%	92.22%	91.78%	0.922	0.004	0.039	0.153	0.326	對照組
120	92.44%	90.89%	91.33%	0.916	0.007	0.032	0.068	0.108	0.275

黃花									
	N1	N2	N3	平均	標準差	T-test	T-test	T-test	T-test
0	97.50%	95.28%	96.53%	0.964	0.009	對照組			
30	85.37%	86.18%	89.01%	0.869	0.016	0.002	對照組		
60	95.66%	95.94%	94.57%	0.954	0.006	0.244	0.002	對照組	
90	92.08%	92.95%	92.81%	0.926	0.004	0.005	0.007	0.005	對照組
120	96.32%	94.28%	94.52%	0.950	0.009	0.199	0.003	0.669	0.026

	時間	N1	N2	N3	平均	標準差	T-test	T-test
紅	0	88.84%	89.75%	92.25%	0.903	0.014	對照組	
粉	0	93.33%	93.11%	92.89%	0.931	0.002	0.107	對照組
黃	0	97.50%	95.28%	96.53%	0.964	0.009	0.011	0.031
紅	30	94.99%	96.45%	92.51%	0.947	0.016	對照組	
粉	30	92.99%	92.89%	92.44%	0.928	0.002	0.243	對照組
黃	30	85.37%	86.18%	89.01%	0.869	0.016	0.008	0.031
紅	60	96.88%	98.51%	96.29%	0.972	0.009	對照組	
粉	60	92.89%	92.67%	92.22%	0.926	0.003	0.014	對照組
黃	60	95.66%	95.94%	94.57%	0.954	0.006	0.092	0.010
紅	90	94.98%	92.64%	90.85%	0.928	0.017	對照組	
粉	90	92.68%	92.22%	91.78%	0.922	0.004	0.671	對照組
黃	90	92.08%	92.95%	92.81%	0.926	0.004	0.878	0.363
紅	120	93.36%	95.92%	90.09%	0.931	0.024	對照組	
粉	120	92.44%	90.89%	91.33%	0.916	0.007	0.454	對照組
黃	120	96.32%	94.28%	94.52%	0.950	0.009	0.379	0.015

	0分鐘	30分鐘	60分鐘	90分鐘	120分鐘
紅花	0.903	0.947	0.972	0.928	0.931
粉花	0.931	0.928	0.926	0.922	0.916
黃花	0.964	0.869	0.954	0.926	0.950
紅標準差	0.014	0.016	0.009	0.017	0.024
粉標準差	0.002	0.002	0.003	0.004	0.007
黃標準差	0.009	0.016	0.006	0.004	0.009

四、矮仙丹花 SOD 測試

紅花									
	N1	N2	N3	平均	標準差	T-test	T-test	T-test	T-test
0	0.159	0.186	0.144	0.163	0.017	對照組			
30	0.093	0.109	0.101	0.101	0.006	0.009	對照組		
60	0.112	0.107	0.095	0.105	0.007	0.012	0.639	對照組	
90	0.083	0.084	0.066	0.078	0.008	0.003	0.034	0.026	對照組
120	0.117	0.115	0.127	0.119	0.005	0.027	0.037	0.081	0.004

粉花									
	N1	N2	N3	平均	標準差	T-test	T-test	T-test	T-test
0	0.125	0.120	0.103	0.116	0.009	對照組			
30	0.151	0.163	0.094	0.136	0.030	0.422	對照組		
60	0.184	0.152	0.151	0.162	0.015	0.021	0.332	對照組	
90	0.148	0.173	0.140	0.154	0.014	0.033	0.491	0.588	對照組
120	0.146	0.164	0.160	0.156	0.008	0.009	0.405	0.648	0.823

黃花									
	N1	N2	N3	平均	標準差	T-test	T-test	T-test	T-test
0	0.011	0.027	0.013	0.017	0.007	對照組			
30	0.100	0.071	0.095	0.089	0.013	0.002	對照組		
60	0.036	0.022	0.021	0.027	0.007	0.245	0.003	對照組	
90	0.051	0.066	0.053	0.057	0.006	0.004	0.032	0.011	對照組
120	0.086	0.067	0.060	0.071	0.011	0.004	0.201	0.008	0.176

	時間	N1	N2	N3	平均	標準差	T-test	T-test
紅	0	0.159	0.186	0.144	0.163	0.017	對照組	
粉	0	0.125	0.120	0.103	0.116	0.009	0.042	對照組
黃	0	0.011	0.027	0.013	0.017	0.007	0.003	0.000
紅	30	0.093	0.109	0.101	0.101	0.006	對照組	
粉	30	0.151	0.163	0.094	0.136	0.030	0.244	對照組
黃	30	0.100	0.071	0.095	0.089	0.013	0.299	0.146
紅	60	0.112	0.107	0.095	0.105	0.007	對照組	
粉	60	0.184	0.152	0.151	0.162	0.015	0.019	對照組
黃	60	0.036	0.022	0.021	0.027	0.007	0.000	0.002
紅	90	0.083	0.084	0.066	0.078	0.008	對照組	
粉	90	0.148	0.173	0.140	0.154	0.014	0.005	對照組
黃	90	0.051	0.066	0.053	0.057	0.006	0.050	0.004
紅	120	0.117	0.115	0.127	0.119	0.005	對照組	
粉	120	0.146	0.164	0.160	0.156	0.008	0.007	對照組
黃	120	0.086	0.067	0.060	0.071	0.011	0.011	0.001

	0分鐘	30分鐘	60分鐘	90分鐘	120分鐘
紅花	0.163	0.101	0.105	0.078	0.119
粉花	0.116	0.136	0.162	0.154	0.156
黃花	0.017	0.089	0.027	0.057	0.071
紅標準差	0.017	0.006	0.007	0.008	0.005
粉標準差	0.009	0.030	0.015	0.014	0.008
黃標準差	0.007	0.013	0.007	0.006	0.011

五、矮仙丹花 POD 測試

紅花									
	N1	N2	N3	平均	標準差	T-test	T-test	T-test	T-test
0	0.445	0.448	0.471	0.455	0.011	對照組			
30	0.482	0.485	0.516	0.494	0.015	0.043	對照組		
60	0.417	0.508	0.510	0.478	0.043	0.498	0.648	對照組	
90	0.505	0.513	0.558	0.525	0.024	0.019	0.193	0.248	對照組
120	0.493	0.547	0.564	0.535	0.030	0.025	0.166	0.204	0.745

粉花									
	N1	N2	N3	平均	標準差	T-test	T-test	T-test	T-test
0	0.352	0.403	0.321	0.359	0.034	對照組			
30	0.496	0.471	0.288	0.418	0.093	0.445	對照組		
60	0.533	0.533	0.409	0.492	0.058	0.050	0.399	對照組	
90	0.279	0.389	0.423	0.364	0.061	0.929	0.527	0.100	對照組
120	0.242	0.302	0.211	0.252	0.037	0.040	0.079	0.008	0.093

黃花									
	N1	N2	N3	平均	標準差	T-test	T-test	T-test	T-test
0	0.206	0.138	0.164	0.169	0.028	對照組			
30	0.251	0.240	0.234	0.242	0.007	0.024	對照組		
60	0.321	0.288	0.344	0.318	0.023	0.004	0.011	對照組	
90	0.172	0.169	0.206	0.182	0.017	0.598	0.010	0.003	對照組
120	0.149	0.152	0.141	0.148	0.005	0.341	0.000	0.001	0.047

	時間	N1	N2	N3	平均	標準差	T-test	T-test
紅	0	0.445	0.448	0.471	0.455	0.011	對照組	
粉	0	0.352	0.403	0.321	0.359	0.034	0.045	對照組
黃	0	0.206	0.138	0.164	0.169	0.028	0.002	0.004
紅	30	0.482	0.485	0.516	0.494	0.015	對照組	
粉	30	0.496	0.471	0.288	0.418	0.093	0.366	對照組
黃	30	0.251	0.240	0.234	0.242	0.007	0.000	0.114
紅	60	0.417	0.508	0.510	0.478	0.043	對照組	
粉	60	0.533	0.533	0.409	0.492	0.058	0.812	對照組
黃	60	0.321	0.288	0.344	0.318	0.023	0.018	0.038
紅	90	0.505	0.513	0.558	0.525	0.024	對照組	
粉	90	0.279	0.389	0.423	0.364	0.061	0.051	對照組
黃	90	0.172	0.169	0.206	0.182	0.017	0.000	0.045
紅	120	0.493	0.547	0.564	0.535	0.030	對照組	
粉	120	0.242	0.302	0.211	0.252	0.037	0.001	對照組
黃	120	0.149	0.152	0.141	0.148	0.005	0.002	0.057

	0分鐘	30分鐘	60分鐘	90分鐘	120分鐘
紅花	0.455	0.494	0.478	0.525	0.535
粉花	0.359	0.418	0.492	0.364	0.252
黃花	0.169	0.242	0.318	0.182	0.148
紅標準差	0.011	0.015	0.043	0.024	0.030
粉標準差	0.034	0.093	0.058	0.061	0.037
黃標準差	0.028	0.007	0.023	0.017	0.005

六、矮仙丹花油粒體個數

紅花							
	N1	N2	N3	平均	標準差	T-test	T-test
0	10	6	13	9.7	2.9	對照組	
60	36	39	30	35.0	3.7	0.002	對照組
120	31	42	41	38.0	5.0	0.002	0.533

粉花							
	N1	N2	N3	平均	標準差	T-test	T-test
0	7	3	5	5.0	1.6	對照組	
60	48	53	49	50.0	2.2	0.000	對照組
120	42	26	29	32.3	6.9	0.006	0.026

黃花							
	N1	N2	N3	平均	標準差	T-test	T-test
0	46	30	38	38.0	6.5	對照組	
60	41	27	25	31.0	7.1	0.363	對照組
120	15	20	24	19.7	3.7	0.026	0.116

	時間	N1	N2	N3	平均	標準差	T-test	T-test
紅	0	10	6	13	9.7	2.9	對照組	
粉	0	7	3	5	5.0	1.6	0.134	對照組
黃	0	46	30	38	38.0	6.5	0.014	0.015
紅	60	36	39	30	35.0	3.7	對照組	
粉	60	48	53	49	50.0	2.2	0.014	對照組
黃	60	41	27	25	31.0	7.1	0.532	0.053
紅	120	31	42	41	38.0	5.0	對照組	
粉	120	42	26	29	32.3	6.9	0.406	對照組
黃	120	15	20	24	19.7	3.7	0.016	0.106

	0分鐘	60分鐘	120分鐘
紅花	9.7	35.0	38.0
粉花	5.0	50.0	32.3
黃花	38.0	31.0	19.7
紅標準差	2.9	3.7	5.0
粉標準差	1.6	2.2	6.9
黃標準差	6.5	7.1	3.7

七、矮仙丹花油粒體面積

紅花							
	N1	N2	N3	平均	標準差	T-test	T-test
0	0.098	0.088	0.093	9.29%	0.004	對照組	
60	0.114	0.117	0.106	11.22%	0.005	0.012	對照組
120	0.157	0.166	0.171	16.47%	0.006	0.000	0.001

粉花							
	N1	N2	N3	平均	標準差	T-test	T-test
0	0.052	0.051	0.050	5.13%	0.001	對照組	
60	0.069	0.065	0.073	6.90%	0.003	0.002	對照組
120	0.082	0.074	0.079	7.84%	0.004	0.000	0.050

黃花							
	N1	N2	N3	平均	標準差	T-test	T-test
0	0.057	0.062	0.058	5.91%	0.002	對照組	
60	0.053	0.058	0.056	5.58%	0.002	0.212	對照組
120	0.056	0.057	0.055	5.58%	0.001	0.105	0.972

	時間	N1	N2	N3	平均	標準差	T-test	T-test
紅	0	0.098	0.088	0.093	9.29%	0.004	對照組	
粉	0	0.052	0.051	0.050	5.13%	0.001	0.004	對照組
黃	0	0.057	0.062	0.058	5.91%	0.002	0.002	0.028
紅	60	0.114	0.117	0.106	11.22%	0.005	對照組	
粉	60	0.069	0.065	0.073	6.90%	0.003	0.001	對照組
黃	60	0.053	0.058	0.056	5.58%	0.002	0.001	0.012
紅	120	0.157	0.166	0.171	16.47%	0.006	對照組	
粉	120	0.082	0.074	0.079	7.84%	0.004	0.000	對照組
黃	120	0.056	0.057	0.055	5.58%	0.001	0.001	0.010

	0分鐘	60分鐘	120分鐘
紅花	9.29%	11.22%	16.47%
粉花	5.13%	6.90%	7.84%
黃花	5.91%	5.58%	5.58%
紅標準差	0.004	0.005	0.006
粉標準差	0.001	0.003	0.004
黃標準差	0.002	0.002	0.001

八、矮仙丹花MDA測試

紅花									
	N1	N2	N3	平均	標準差	T-test	T-test	T-test	T-test
0	210.604	213.006	221.521	215.044	4.684	對照組			
30	168.022	167.484	166.968	167.491	0.430	0.000	對照組		
60	207.375	207.330	210.493	208.399	1.481	0.128	0.000	對照組	
90	218.874	219.648	219.368	219.297	0.320	0.269	0.000	0.001	對照組
120	261.244	259.158	259.136	259.846	0.989	0.000	0.000	0.000	0.000

粉花									
	N1	N2	N3	平均	標準差	T-test	T-test	T-test	T-test
0	100.172	99.869	100.150	100.064	0.138	對照組			
30	125.466	120.889	126.992	124.449	2.593	0.000	對照組		
60	128.796	129.076	128.796	128.889	0.132	0.000	0.073	對照組	
90	135.024	134.698	134.979	134.900	0.144	0.000	0.005	0.000	對照組
120	120.517	121.750	120.550	120.939	0.574	0.000	0.135	0.000	0.000

黃花									
	N1	N2	N3	平均	標準差	T-test	T-test	T-test	T-test
0	125.879	136.763	139.287	133.976	5.818	對照組			
30	105.113	108.290	108.278	107.227	1.495	0.003	對照組		
60	112.530	116.175	119.530	116.078	2.859	0.017	0.018	對照組	
90	113.662	120.437	115.435	116.511	2.869	0.019	0.015	0.887	對照組
120	140.878	142.394	132.960	138.744	4.136	0.398	0.001	0.003	0.003

	時間	N1	N2	N3	平均	標準差	T-test	T-test
紅	0	210.604	213.006	221.521	215.044	4.684	對照組	
粉	0	100.172	99.869	100.150	100.064	0.138	0.001	對照組
黃	0	125.879	136.763	139.287	133.976	5.818	0.000	0.014
紅	30	168.022	167.484	166.968	167.491	0.430	對照組	
粉	30	125.466	120.889	126.992	124.449	2.593	0.001	對照組
黃	30	105.113	108.290	108.278	107.227	1.495	0.000	0.003
紅	60	207.375	207.330	210.493	208.399	1.481	對照組	
粉	60	128.796	129.076	128.796	128.889	0.132	0.000	對照組
黃	60	112.530	116.175	119.530	116.078	2.859	0.000	0.024
紅	90	218.874	219.648	219.368	219.297	0.320	對照組	
粉	90	135.024	134.698	134.979	134.900	0.144	0.000	對照組
黃	90	113.662	120.437	115.435	116.511	2.869	0.000	0.012
紅	120	261.244	259.158	259.136	259.846	0.989	對照組	
粉	120	120.517	121.750	120.550	120.939	0.574	0.000	對照組
黃	120	140.878	142.394	132.960	138.744	4.136	0.000	0.024

	0分鐘	30分鐘	60分鐘	90分鐘	120分鐘
紅花	215.044	167.491	208.399	219.297	259.846
粉花	100.064	124.449	128.889	134.900	120.939
黃花	133.976	107.227	116.078	116.511	138.744
紅標準差	4.684	0.430	1.481	0.320	0.989
粉標準差	0.138	2.593	0.132	0.144	0.574
黃標準差	5.818	1.495	2.859	2.869	4.136

【評語】 052107

1. 本研究以紅花、粉花及黃花矮仙丹為材料，進行其抗 UV 能力之差異分析。
2. 結果發現紅花之花青素與類胡蘿蔔素在照射 UV 後均增加，使抗氧化力上升，黃花則以類胡蘿蔔素做為主要的抗氧化方式。
3. 本研究實驗結果多以敘述性呈現，應進一步強化探究結果的意義。
4. 建議說明選擇使用矮仙丹植物為材料的理由，與其抗 UV 能力之生物問題的相關性/重要性。

作品簡報



探討矮仙丹對紫外線的 防護機制

摘要

比較校園常見紅花、粉花、黃花矮仙丹抗UV能力之差異。萃取花瓣的花青素，研究在不同濃度及pH值的環境下抗UV的能力，結果發現紅花的花青素含量大於粉花，在偏鹼環境中，會因結構改變而有較高抗UV能力。另外在照射UV後，紅花之花青素與類胡蘿蔔素均增加，使抗氧化力上升，傷害性指標丙二醛濃度先降後升。粉花利用抗氧化酶，超氧化物歧化酶上升、過氧化物酶短期顯著上升，用以清除活性氧，但長期濃度顯著下降，顯示細胞受到傷害。黃花不論在短期及長期照射下，均以類胡蘿蔔素做為主要的抗氧化方式。此外，隨著UV照射時間膜脂過氧化的現象越明顯，丙二醛濃度上升，觀察發現紅花、粉花下表皮的油粒體有數量增生的現象，黃花則數量下降。

壹、前言

一、研究動機

隨著全球氣候變遷，臭氧層破洞的議題日益受到關注，是各大媒體及論壇經常討論的重要對象。臭氧層破洞會導致有更多的紫外線(UV)穿透到地表，並對生命體造成威脅。為了因應UV對生命體造成威脅，人們透過大量的研究，以找尋出能夠抵抗UV的相關物質。經過研究後發現，植物體內存在水溶性與脂溶性的天然、可抗UV之物質，若能將其應用在防曬上，將是對人類的一大貢獻。

矮仙丹是常見的校園植物，大街小巷與公園皆可見其蹤影。除觀賞性佳之外，矮仙丹屬於長日照代表植物，含有花青素與類胡蘿蔔素(Sweta Sharma *et al.*, 2021)。綜合以上，選擇矮仙丹作為研究抗UV的植株，並透過萃取花瓣內的物質，進行一系列的相關研究。

二、研究目的

- (一)研究不同濃度下，花青素的抗UV能力。
- (二)研究在不同pH值時，花青素的抗紫外線之能力，並以結構的差異解釋原因。
- (三)測量紅花、粉花、黃花的SOD與POD濃度，並探討SOD與POD活性與花青素之關係。
- (四)對花瓣表皮細胞觀察，並探討照射UV後細胞變化的情形。
- (五)測量經過長時間照射導致脂質過氧化現象。

三、文獻探討

(一)紫外線(ultraviolet，簡稱UV)

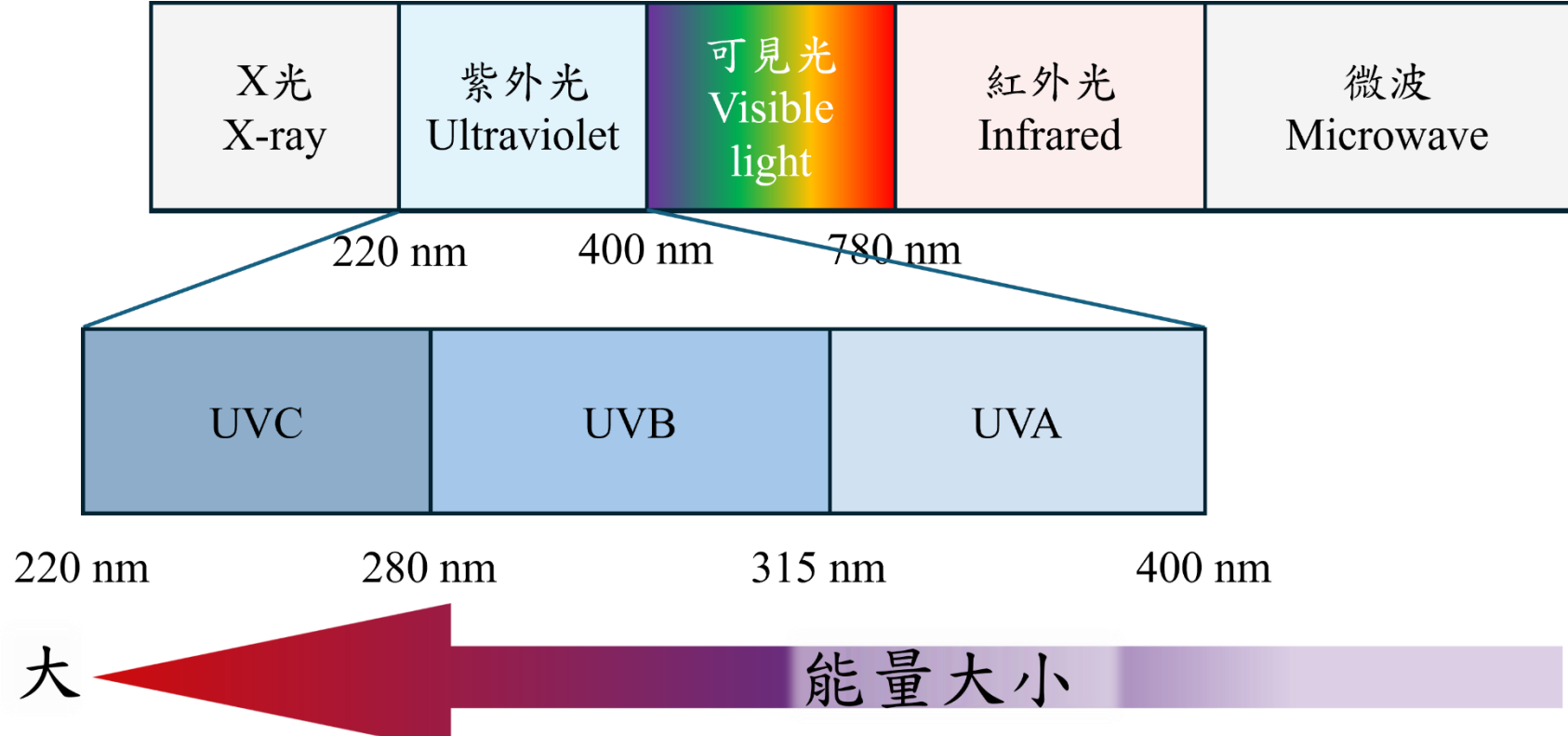


圖1.光頻譜圖及能量之間的關係

(二)類黃酮與花青素

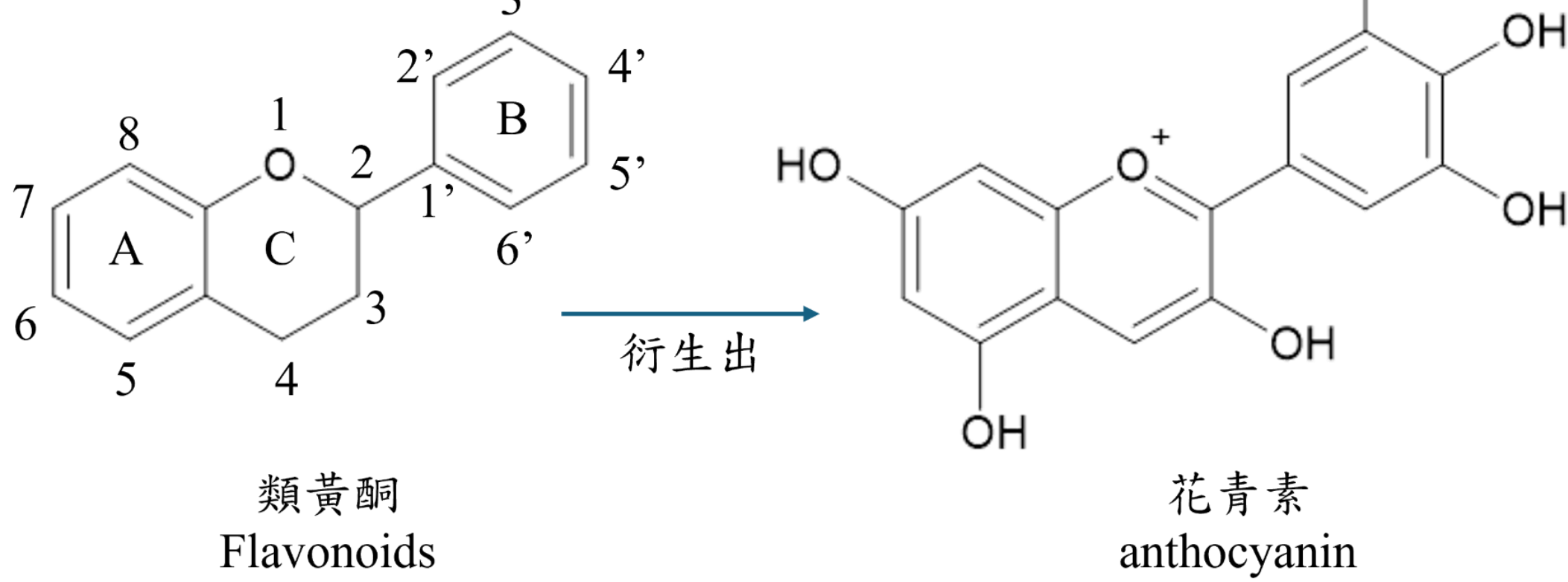


圖2.花青素為類黃酮家族的其中一個分支

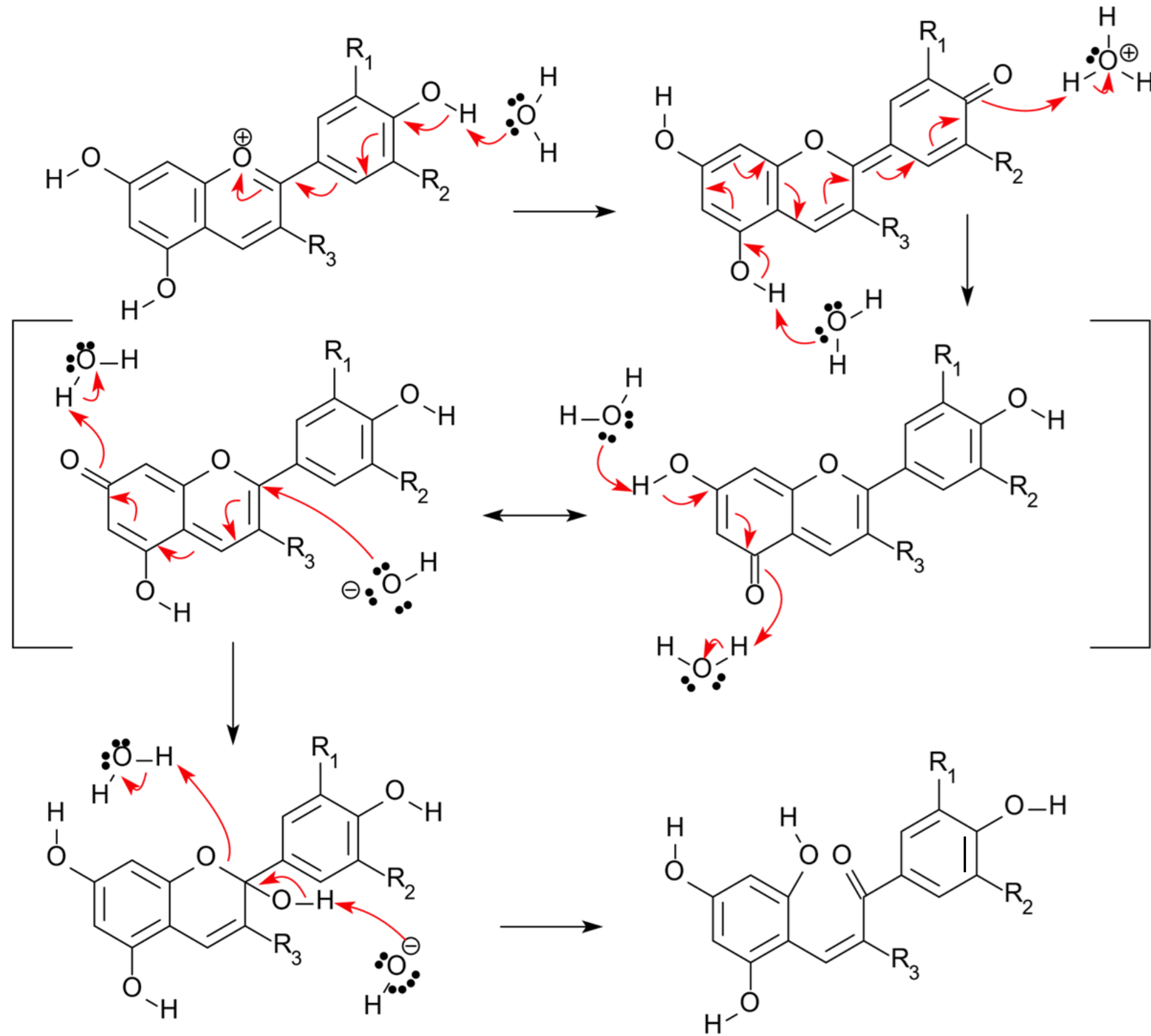


圖3.花青素在酸性環境下的UV-Vis吸收光譜↑
圖4.花青素於不同酸鹼環境下之反應機構→

(三)抗氧化酶

- 1.SOD(Superoxide dismutase)
超氧化物歧化酶
- 2.POD(Peroxidase)
過氧化物酶

(四)DPPH(1, 1-二苯基-2-三硝基肼自由基)

DPPH可用於抗氧化力的評估。

(五)類胡蘿蔔素

脂溶性抗氧化劑，存於色素體內。

(六)MDA(Malondialdehyde, 丙二醛)

丙二醛(MDA)是膜脂過氧化的分解產物，其含量可反應植物遭受逆境傷害的程度。

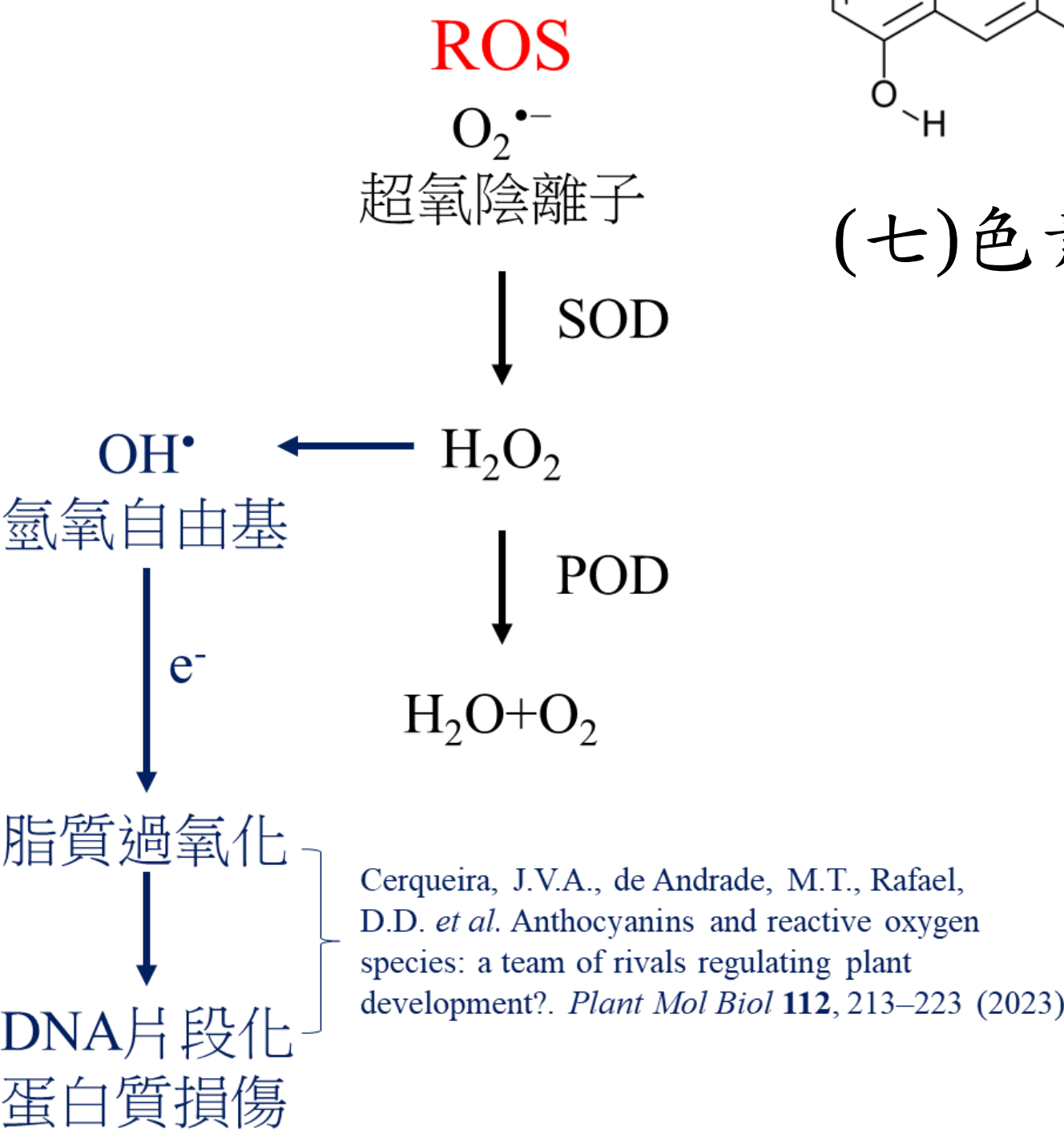


圖5.抗氧化酶清除自由基關係圖

(七)色素體(Plastid)

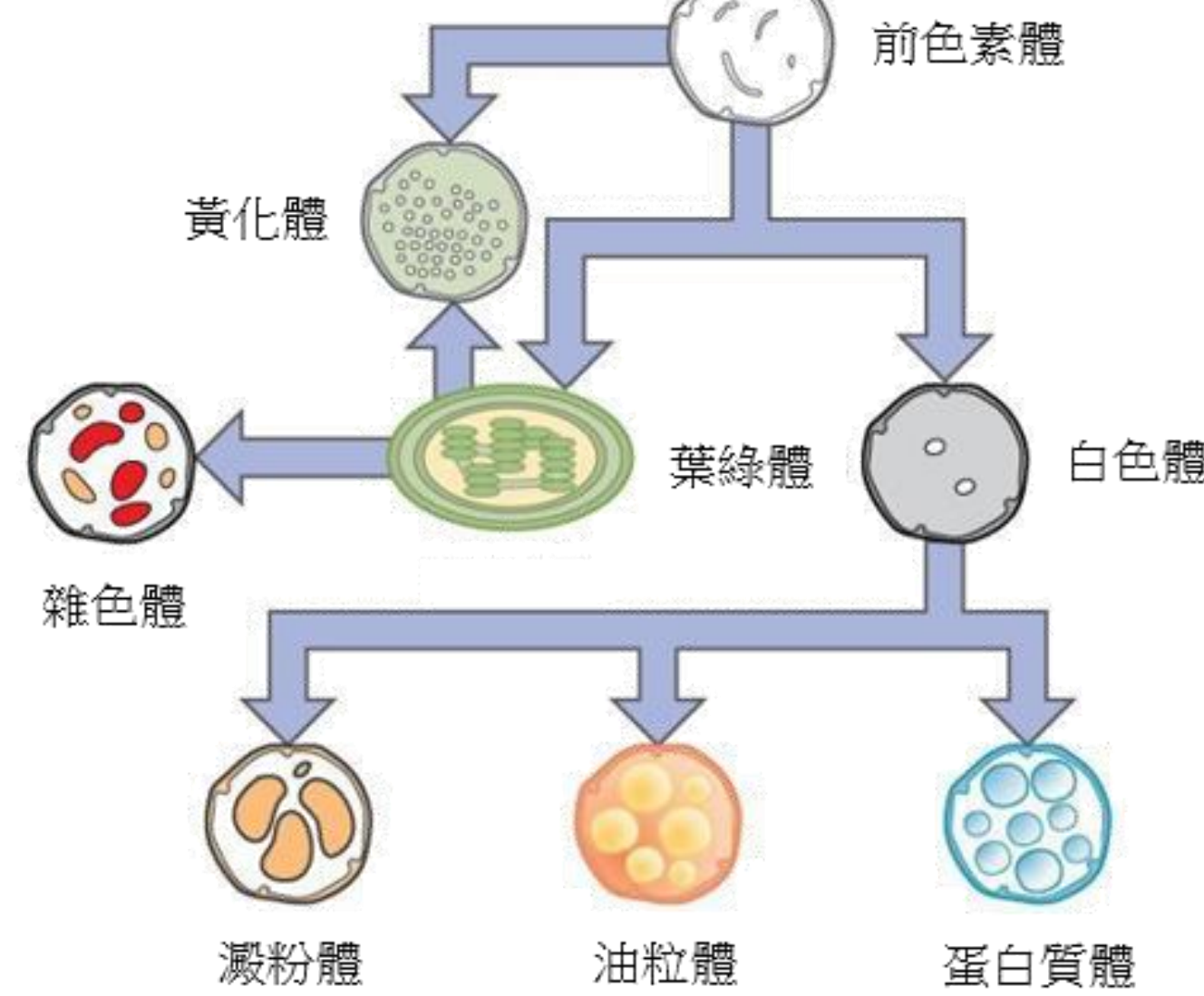
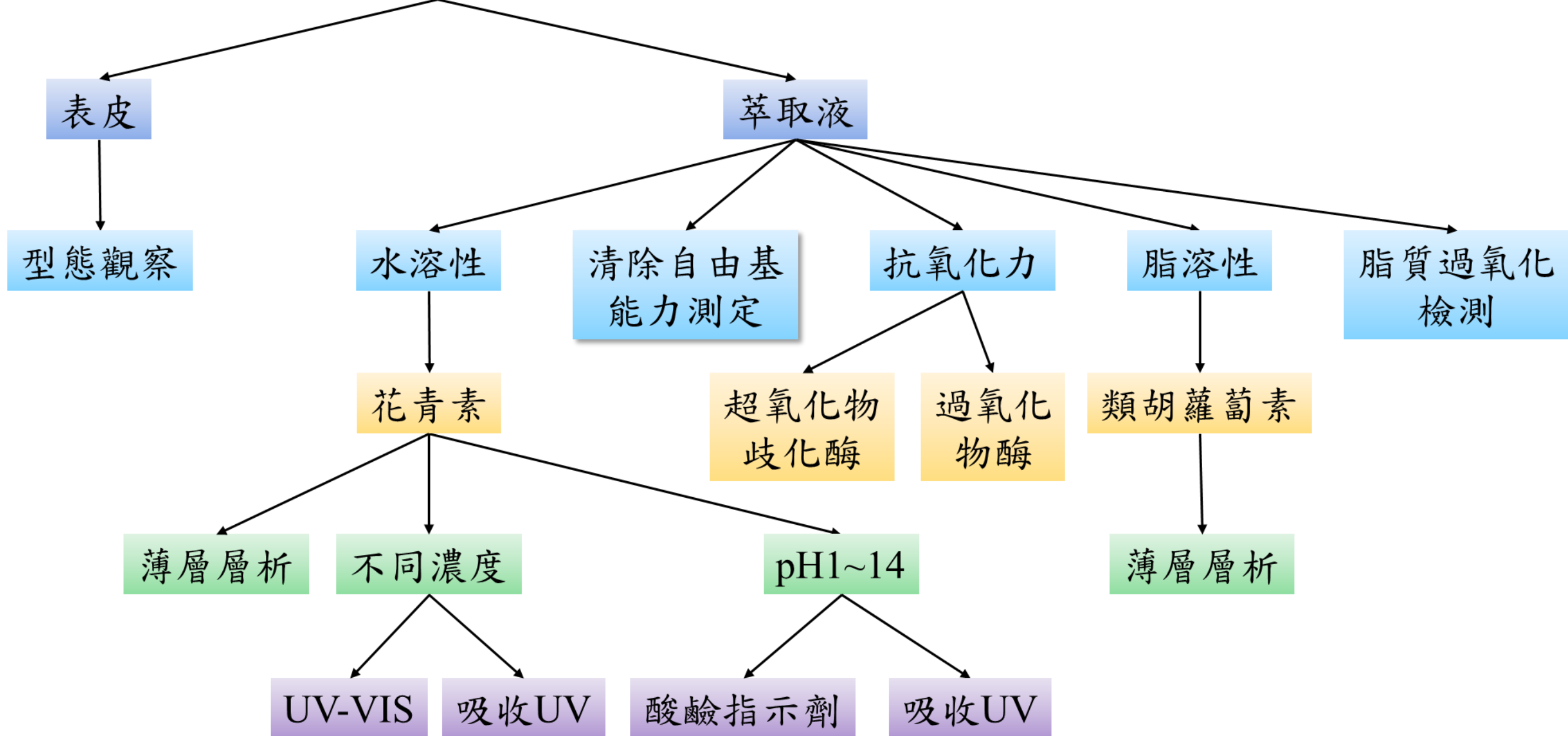


圖6.各種色素體的關係圖

貳、研究過程與方法

一、實驗流程



二、研究方法

- (一)UV-Vis光譜圖
- (二)檢測花青素含量
- (三)偵測不同濃度的花青素吸收UV的能力
- (四)偵測不同pH值的花青素吸收UV的能力
- (五)DPPH自由基清除能力測定
- (六)超氧化物歧化酶(SOD)量測
- (七)過氧化物酶(POD)量測
- (八)類胡蘿蔔素含量
- (九)型態觀察
- (十)MDA量測

參、研究結果

一、萃取花青素、類胡蘿蔔素

(一)研磨結果(以花青素為例)

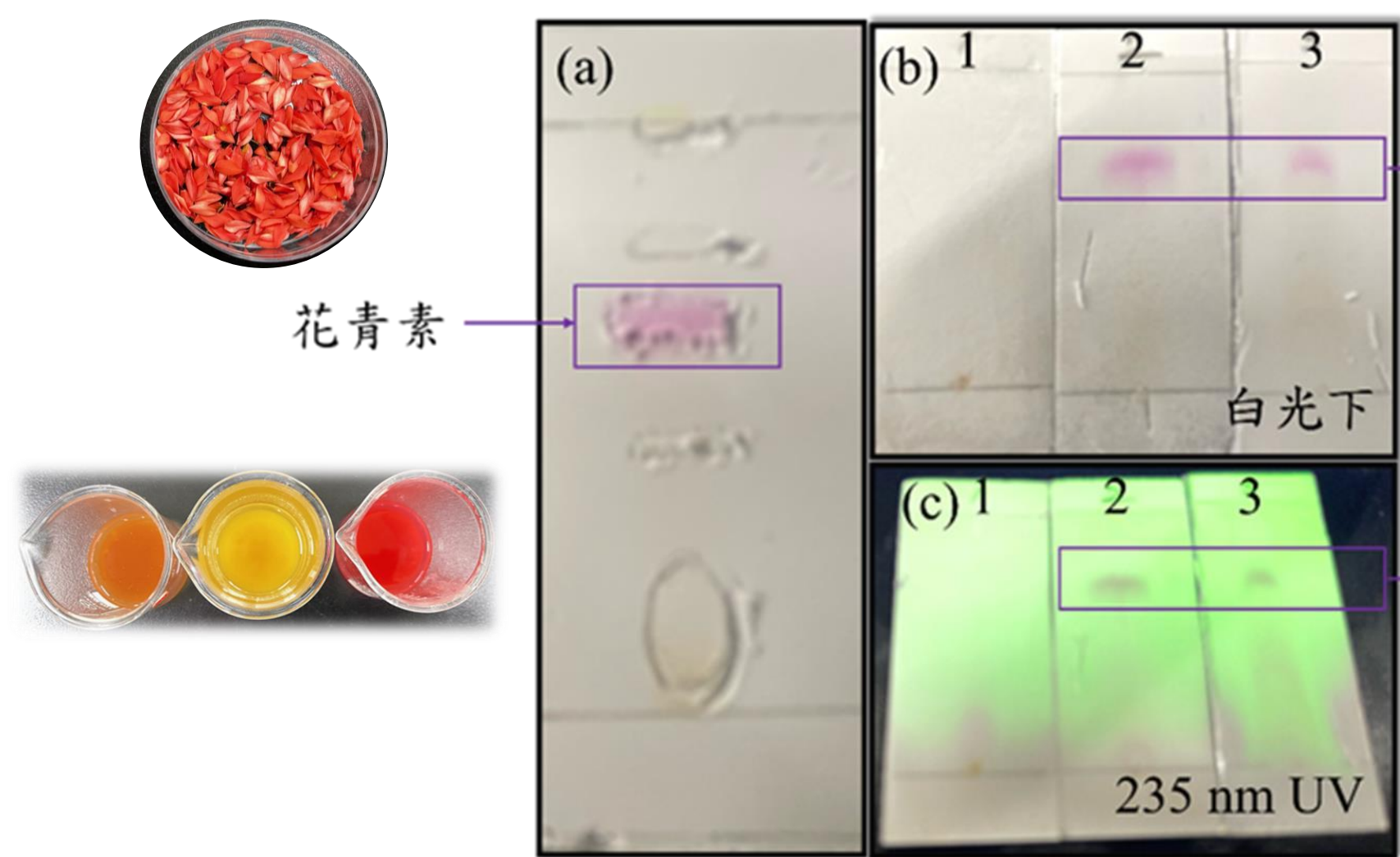


圖7.矮仙丹花瓣及粗萃取液展開結果圖

(二)花青素UV-Vis吸收光譜分析

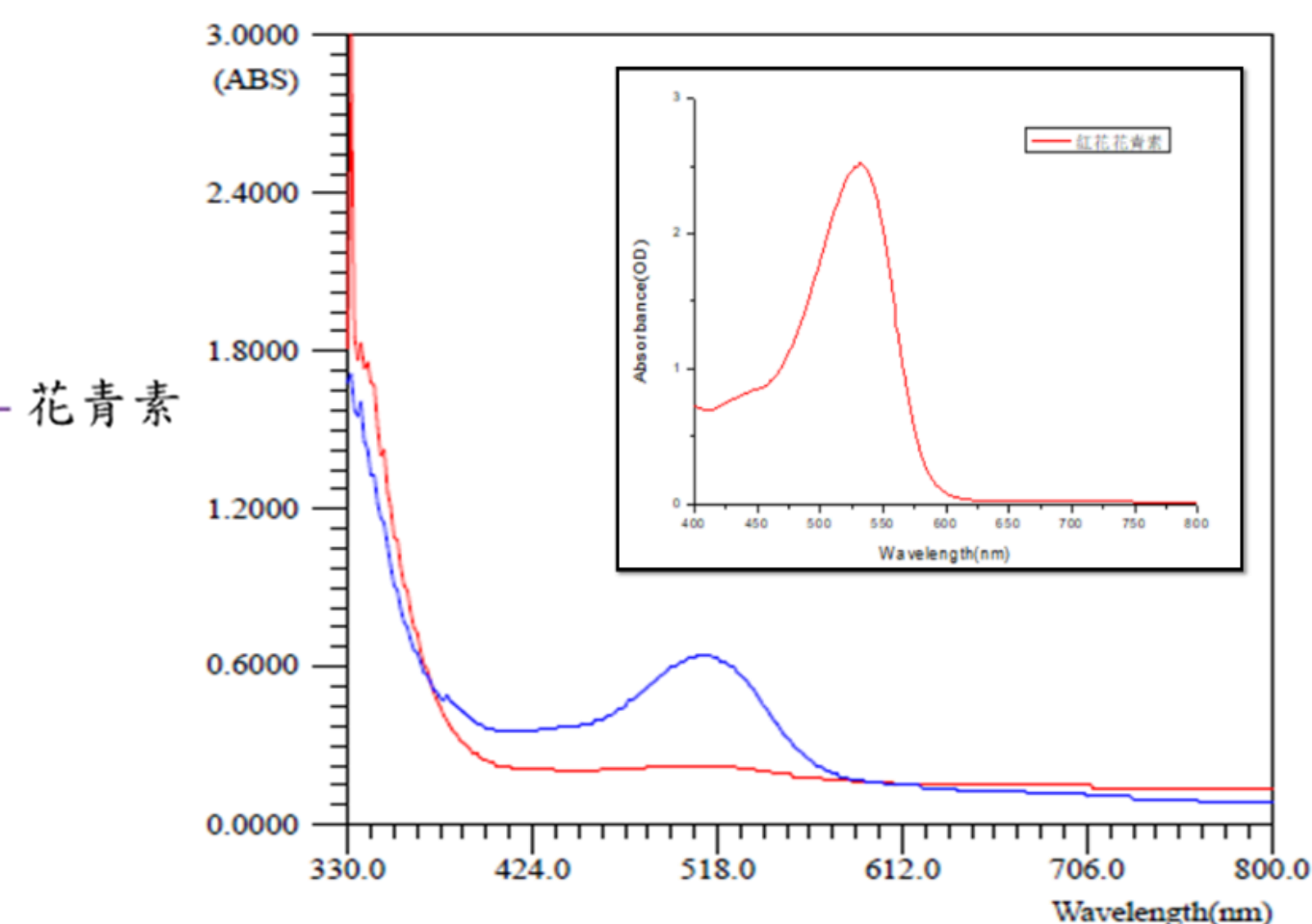


圖8.以水(紅線)、甲醇溶液(藍線)，酸性甲醇(小圖紅線)所萃取之花青素光譜

(三)類胡蘿蔔素UV-Vis吸收光譜分析

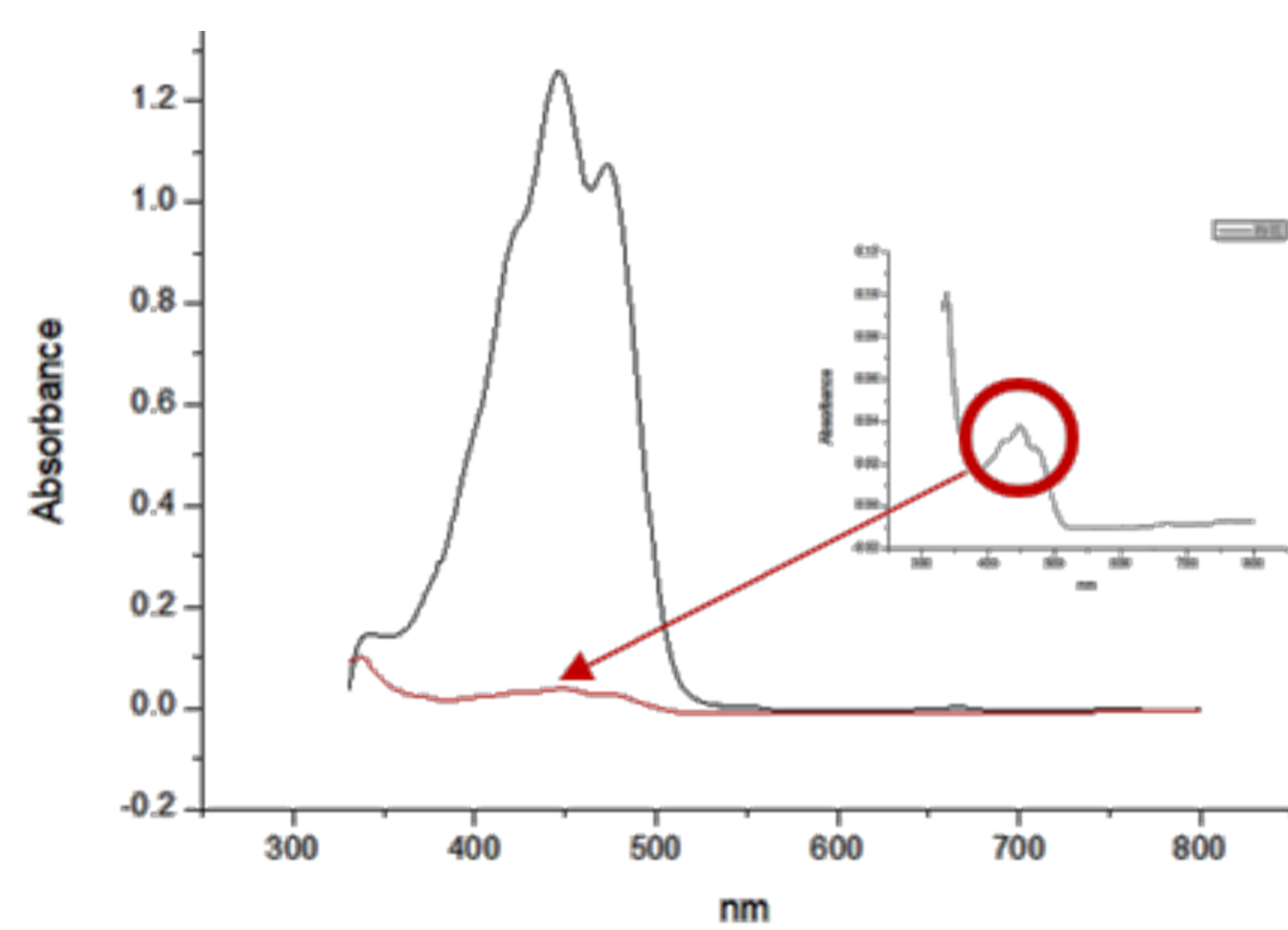


圖9.類胡蘿蔔素的吸收光譜

二、花青素於pH值下的顯色結果及其抗紫外線能力鑑定



圖10.花青素於pH 1-14顯色結果

(一) Arduino分析

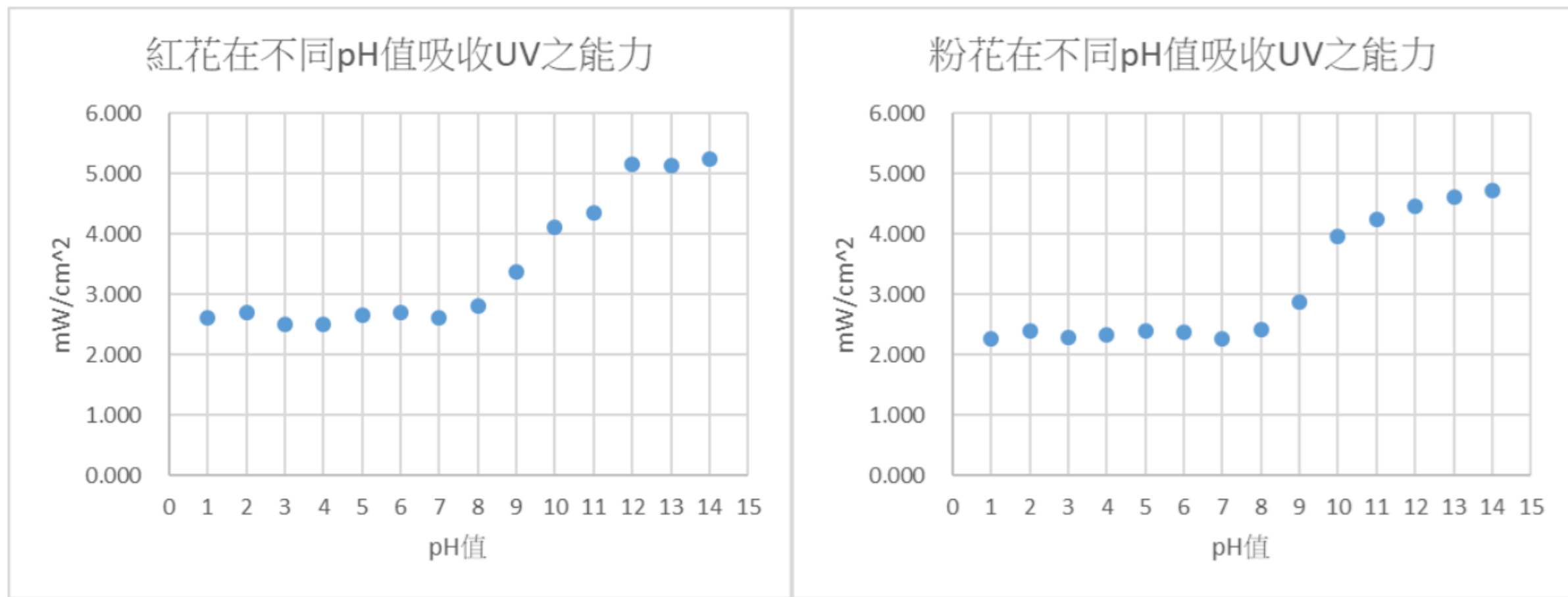


圖11.不同酸鹼值下的花青素之紫外光吸收度比較

(二)光譜分析圖

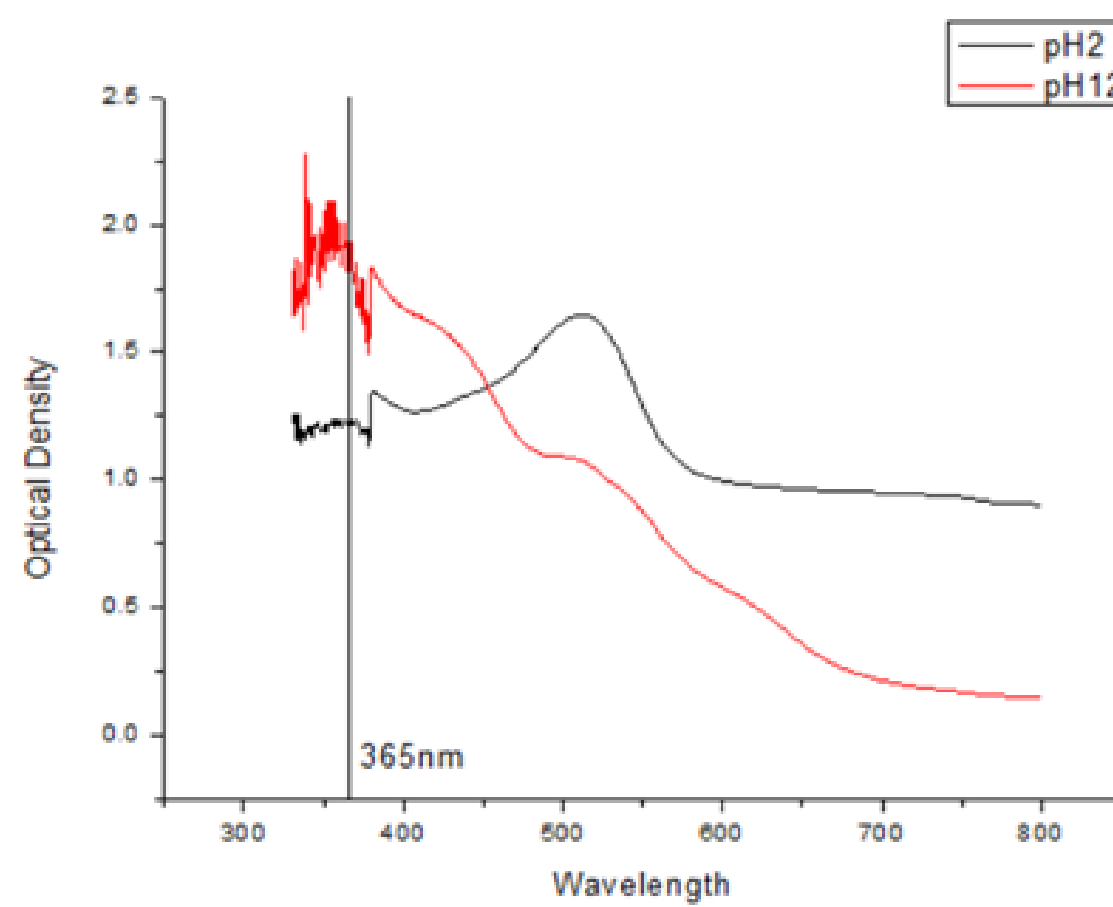


圖12.酸、鹼之花青素光譜分析

三、花青素的相對含量

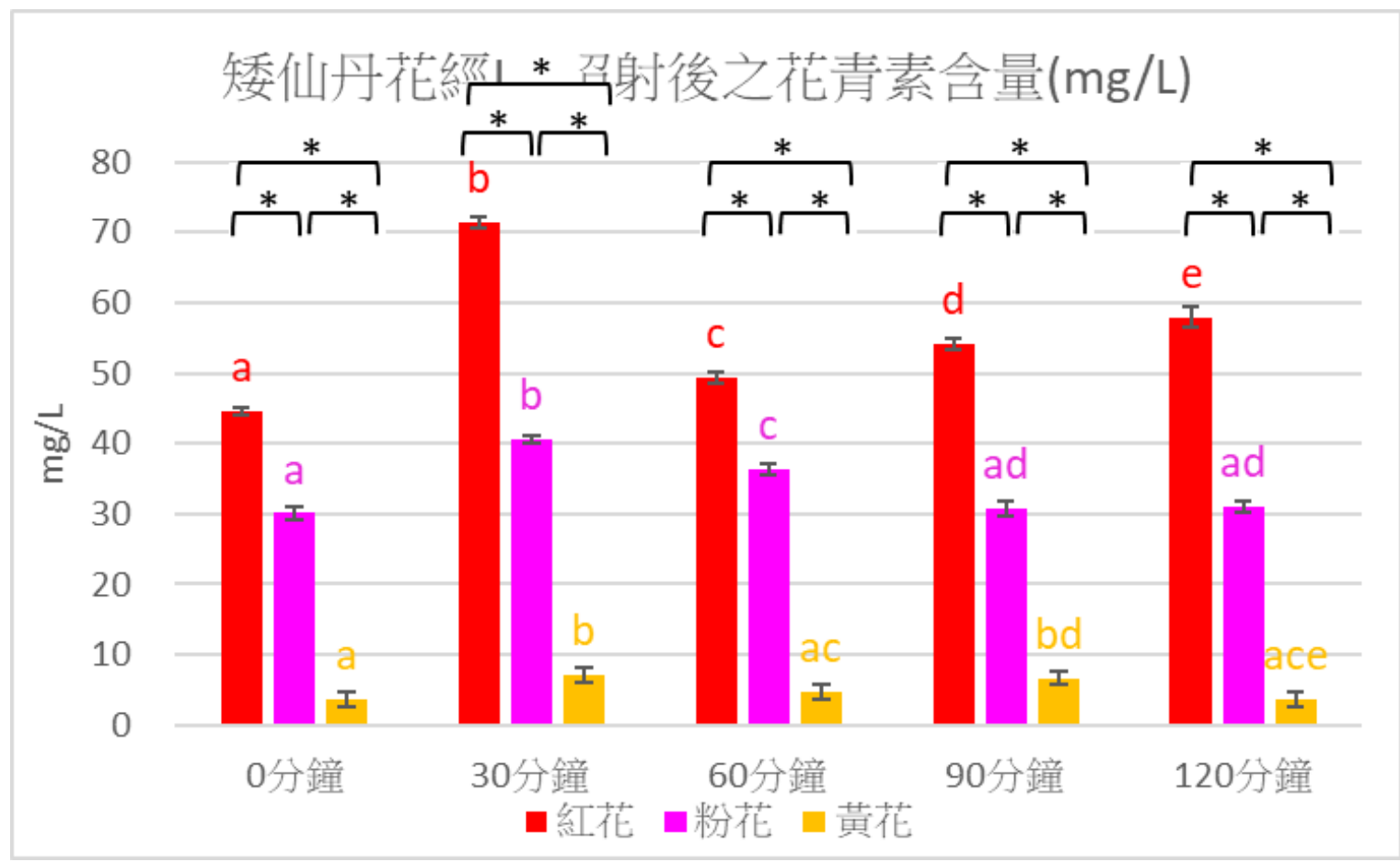


圖13.隨UV照射時間花青素之比較

四、紅花、粉花的SOD測試

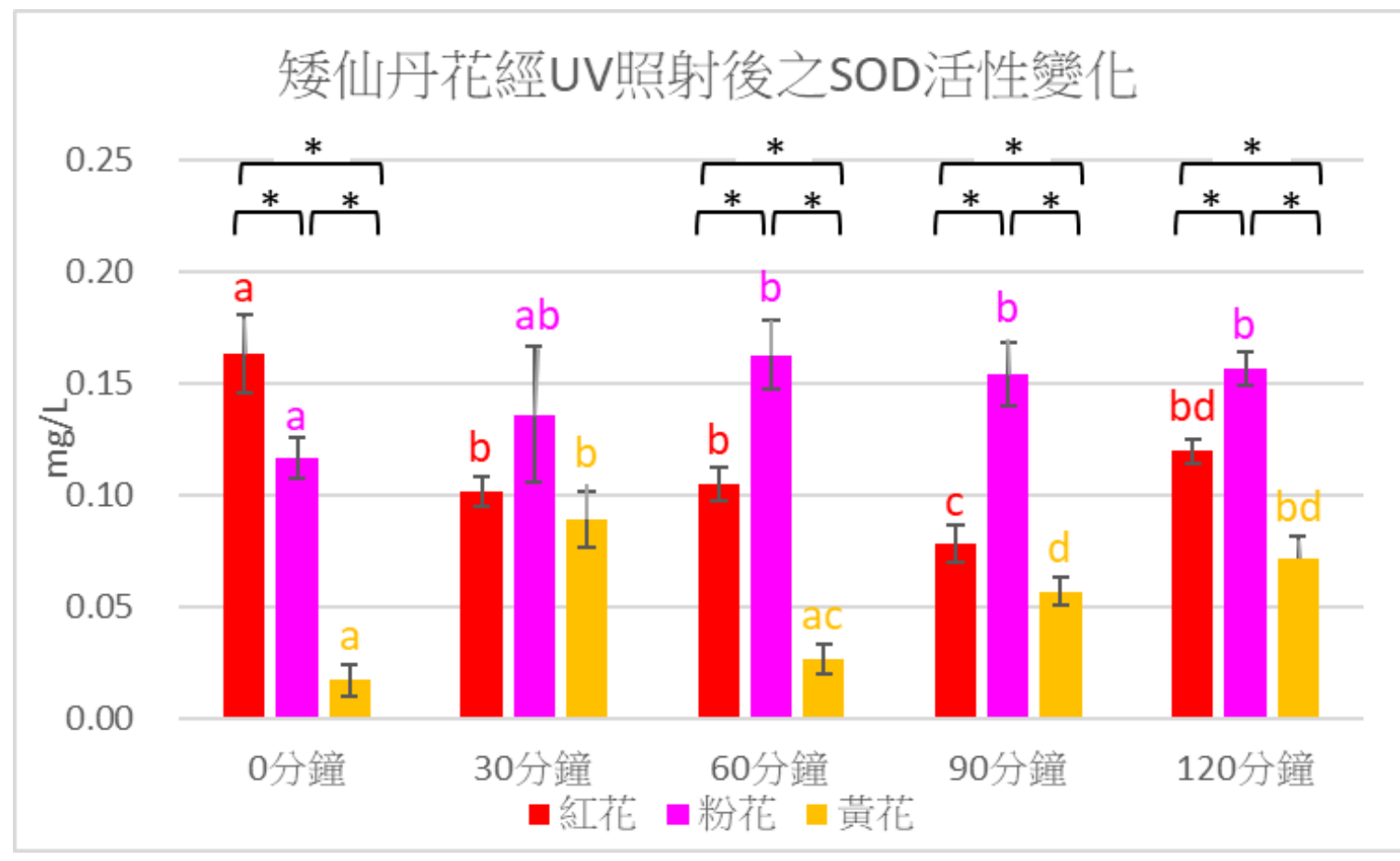


圖14.隨UV照射時間SOD之比較

五、紅花、粉花的POD測試

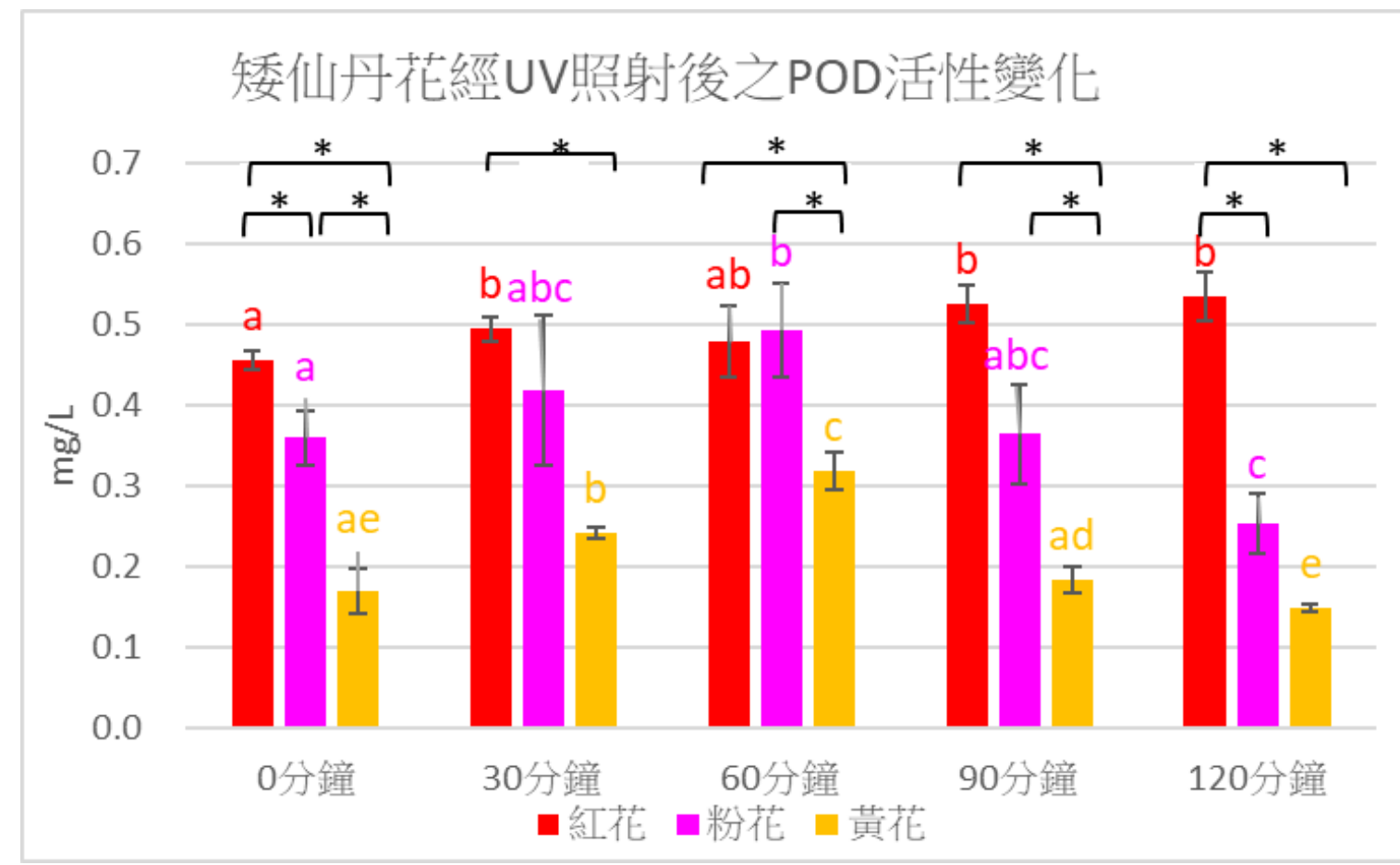


圖15.隨UV照射時間POD之比較

六、DPPH自由基清除能測定

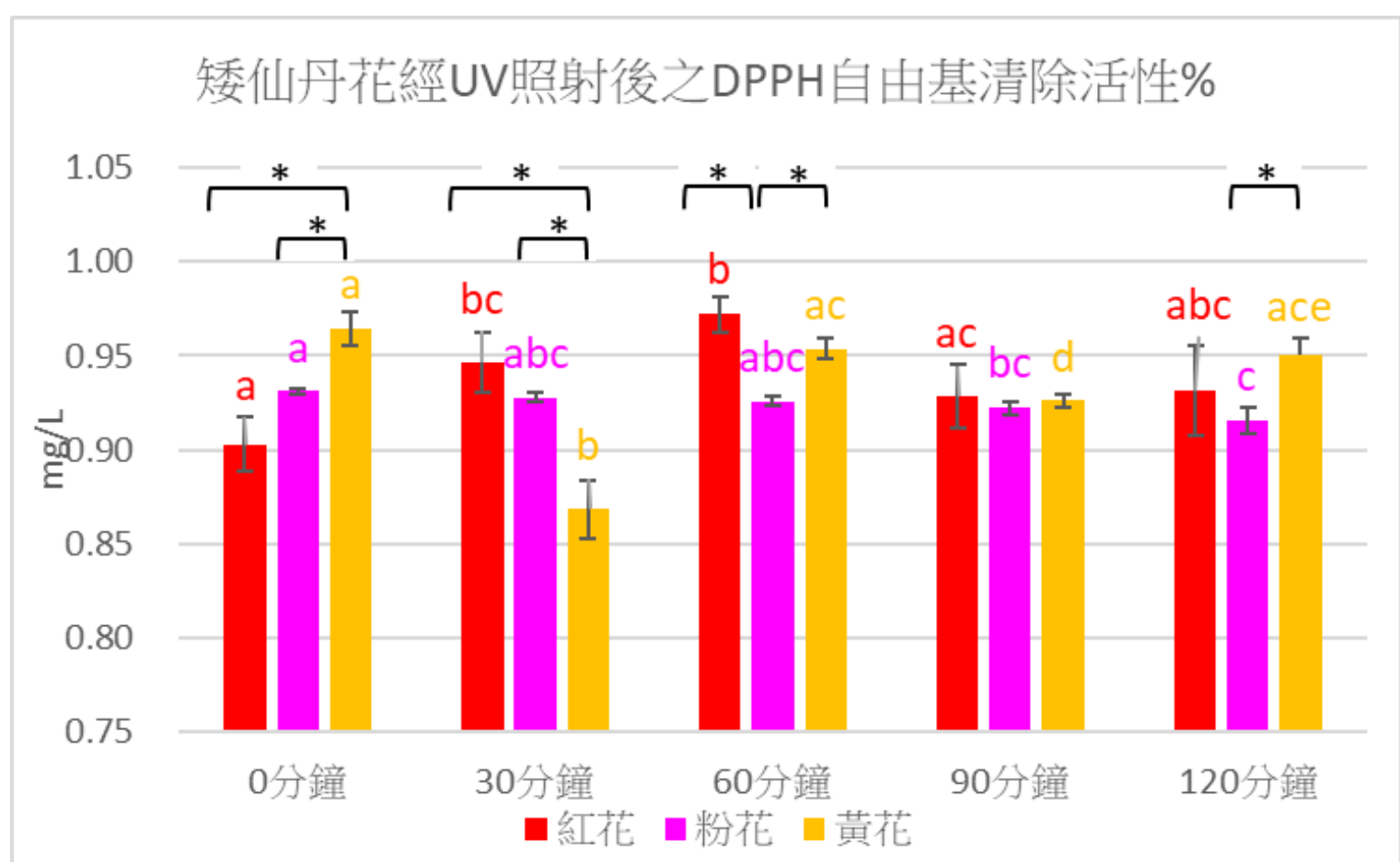


圖16.隨UV照射時間DPPH自由基清除活性%

七、類胡蘿蔔素之比較

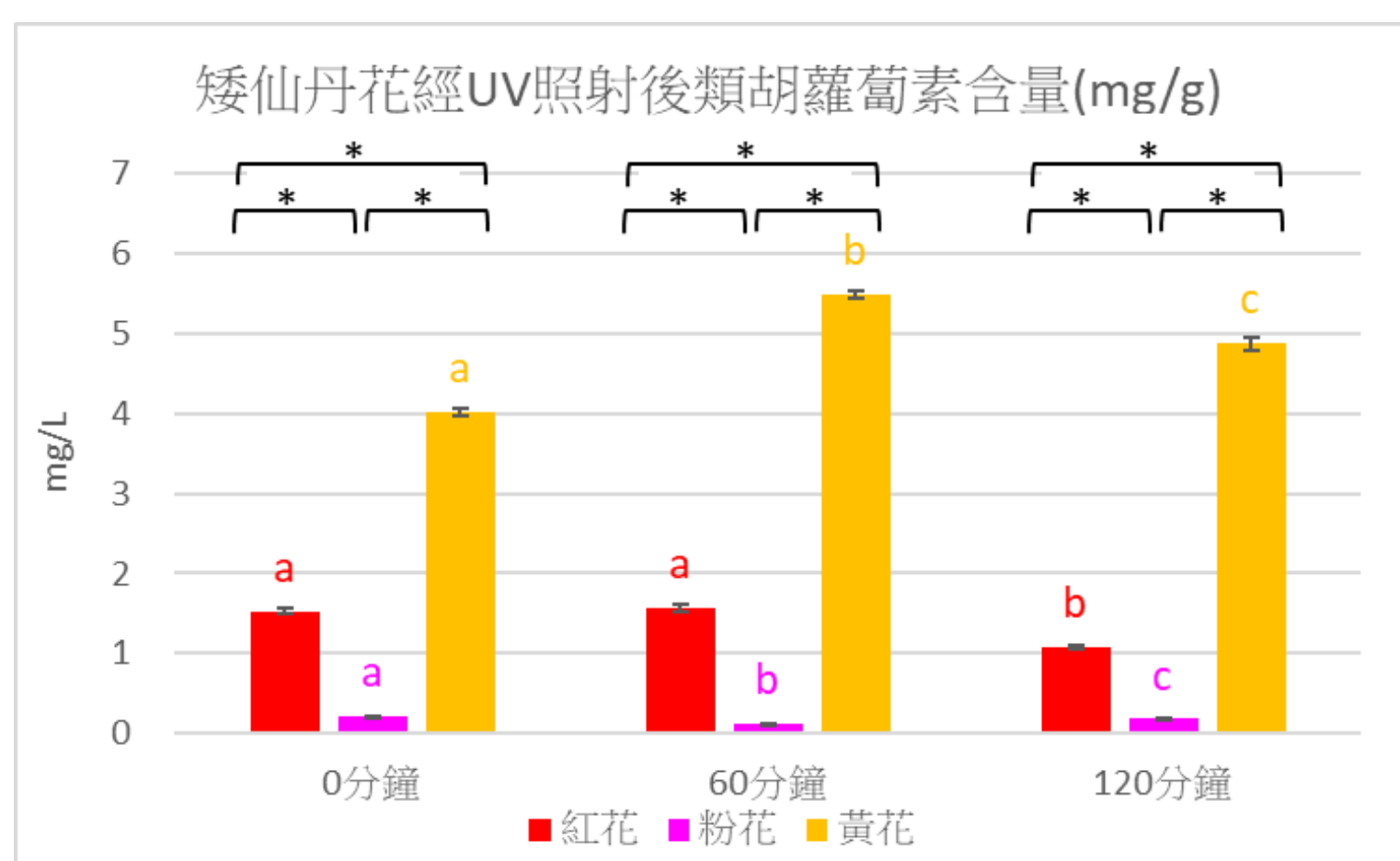


圖17.類胡蘿蔔素之萃取比較

八、紅花、粉花的MDA測試

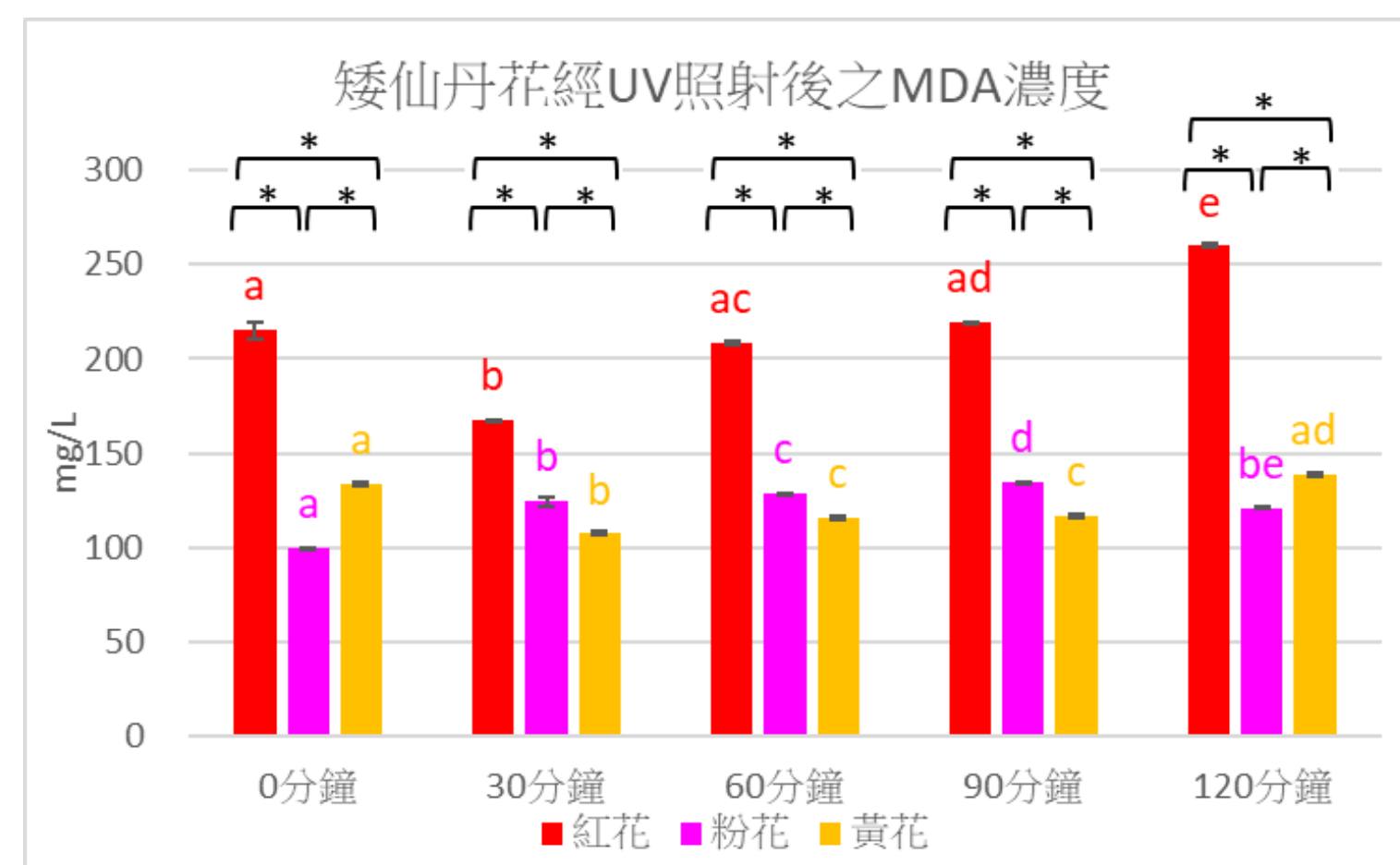


圖18.隨UV照射時間MDA之比較

九、型態觀察

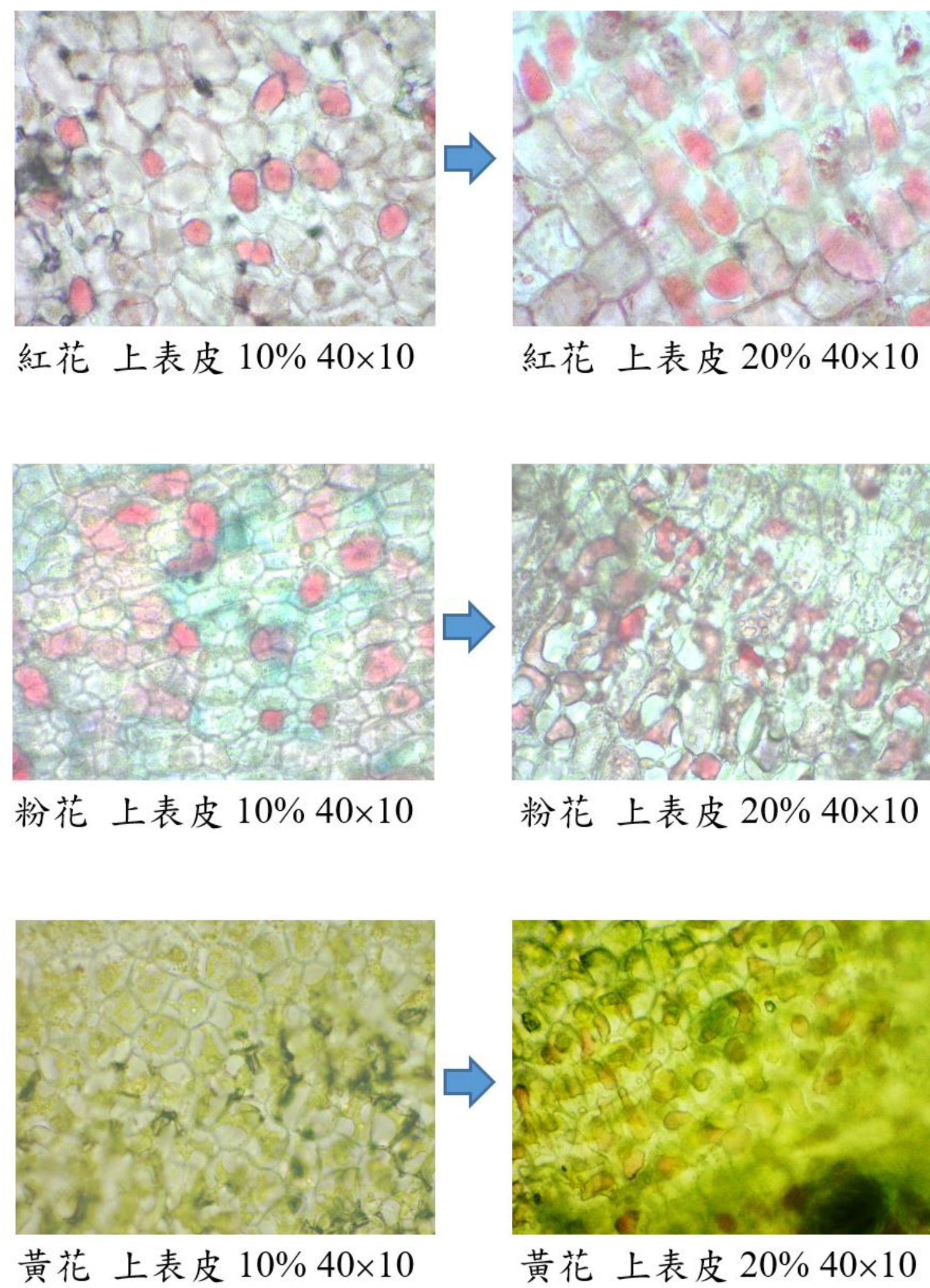


圖19.紅花(上)、粉花(中)、黃花(下)質壁分離

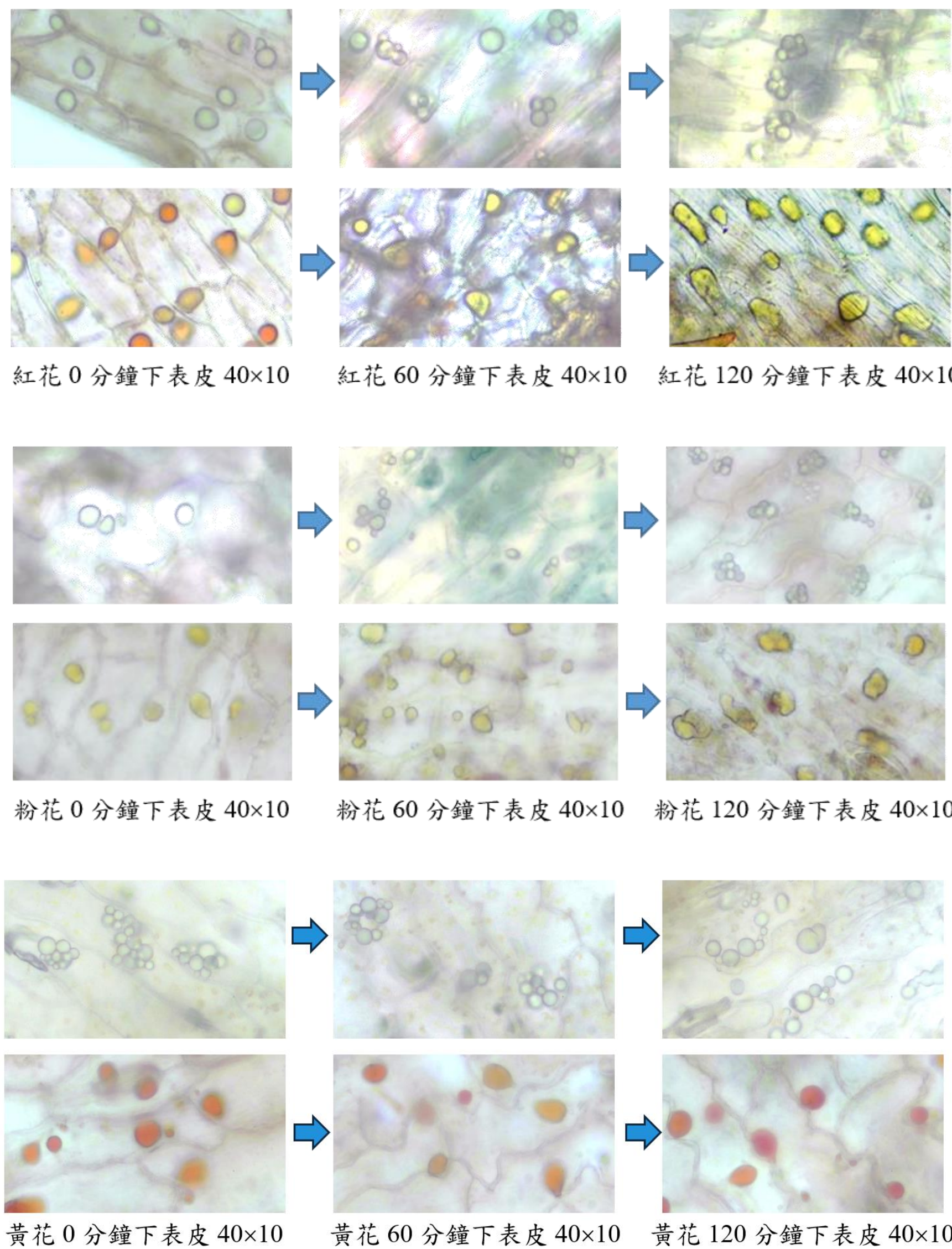


圖20.紅花(上)、粉花(中)、黃花(下)隨UV照射時間油粒體比較

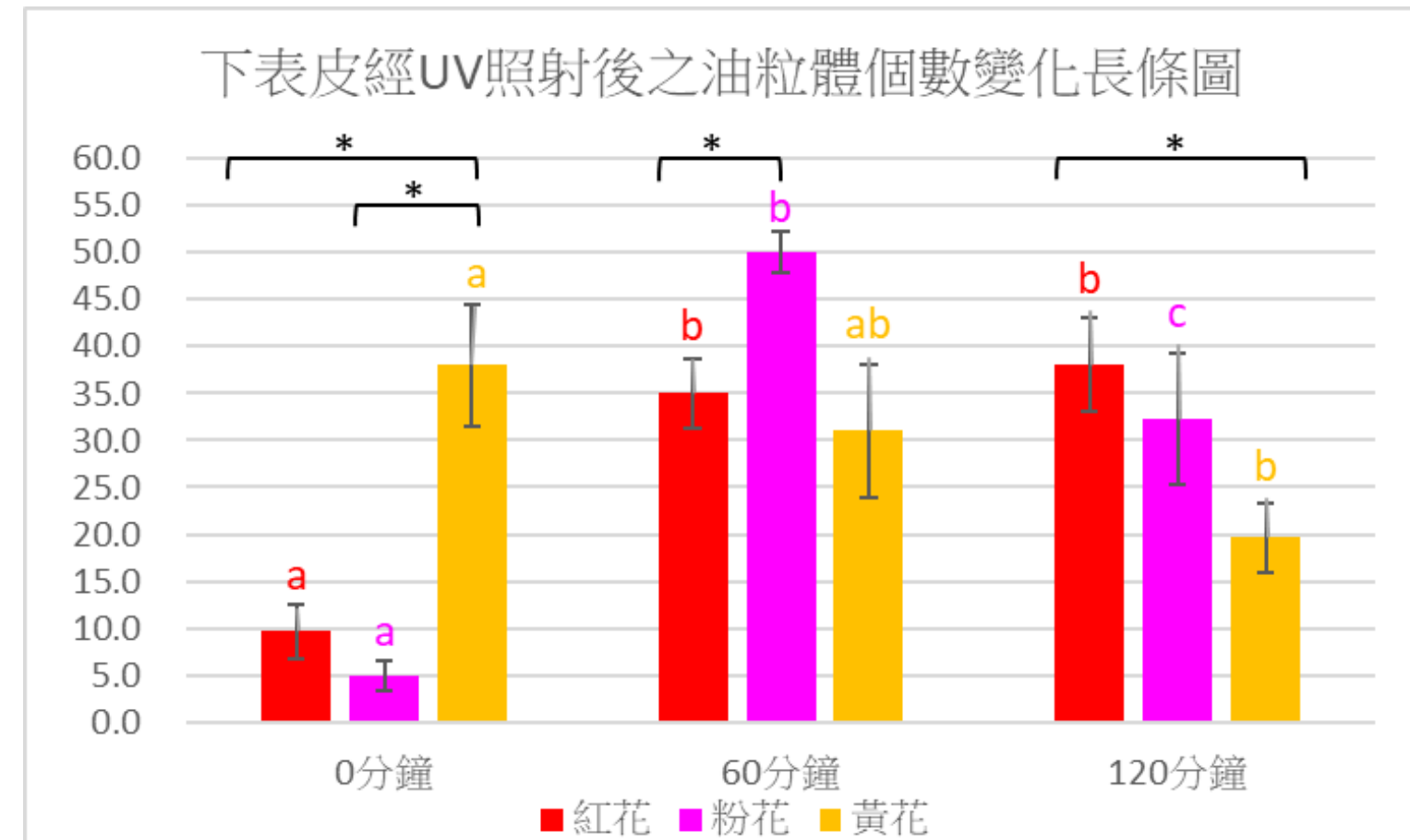


圖21.矮仙丹花下表皮油粒體數變化

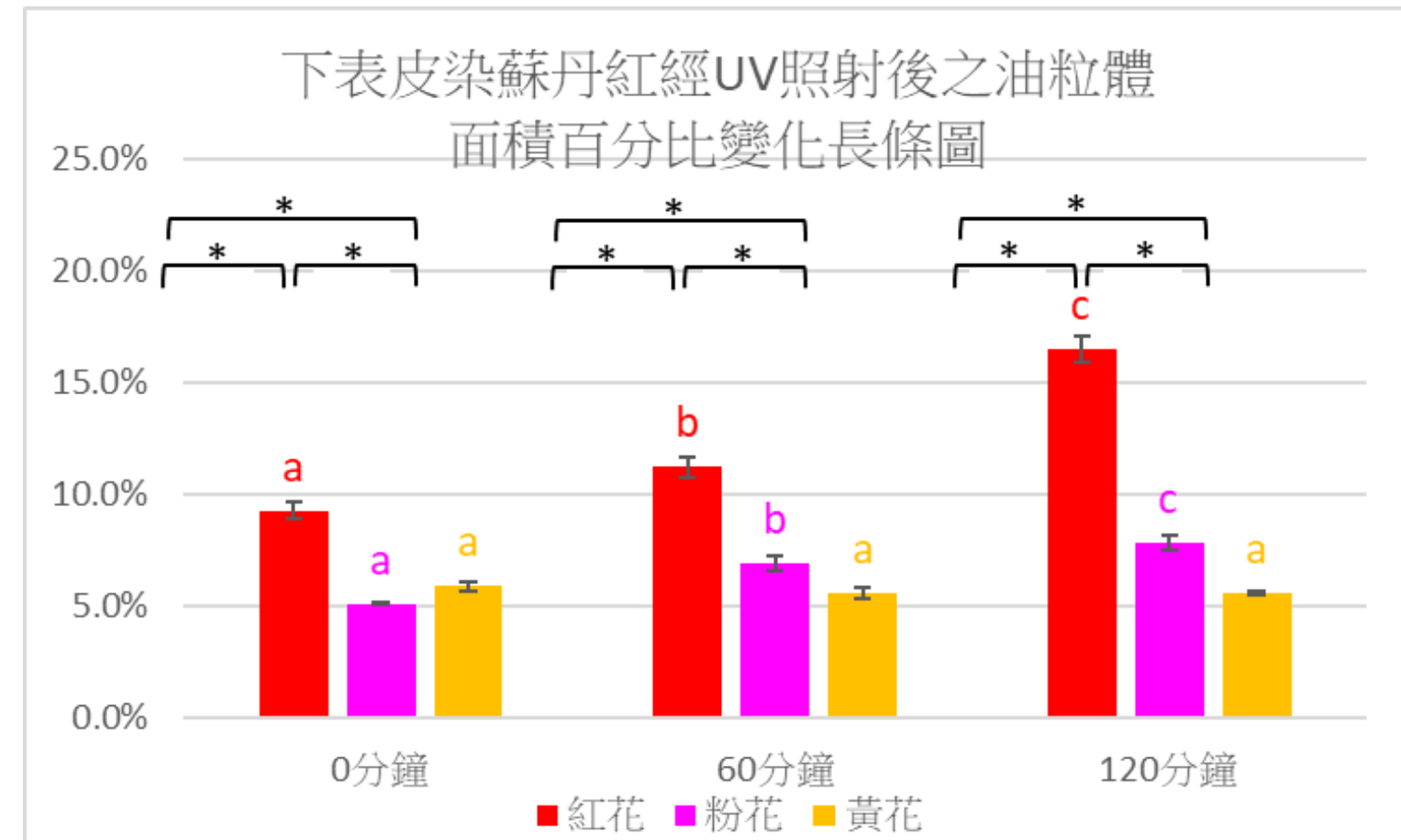


圖22.矮仙丹花下表皮油粒體面積變化

肆、討論

一、在UV-Vis吸收光譜中，越接近UV波段處，會有不規則之起伏之現象。

最常見的花青素之結構，其R₁、R₂為OH，而R₃為糖苷鏈，稱為cyanidin-3-glucoside(花青素-3-葡萄糖苷)(Supradip Saha et al., 2019)。因糖苷鏈與苯環具有吸收UV之能力，故兩物質吸收UV的訊號會在UV波段處重疊。加上儀器的偵測極限限制下，越接近UV波段處，其吸收光譜會有不規則起伏之現象。

二、不同酸鹼值下，花青素具有不同的顏色及吸收UV能力。

以酸性甲醇溶液進行花青素的萃取可以得到以陽離子形式出現的(A)結構，其顏色為紅色；隨著pH值的上升，花青素的結構亦隨之改變，導致一系列顏色的改變，所以花青素可以當酸鹼指示劑。除此之外，苯環可以吸收UV，由圖可得，結構(A)至(F)至少有一個(含)以上的獨立苯環構造，其中結構(E)和(F)均具有兩個苯環。結構中獨立苯環的數量隨pH增加而變多，可得鹼性環境下的花青素具有高UV吸收量值。(A→F：pH上升)

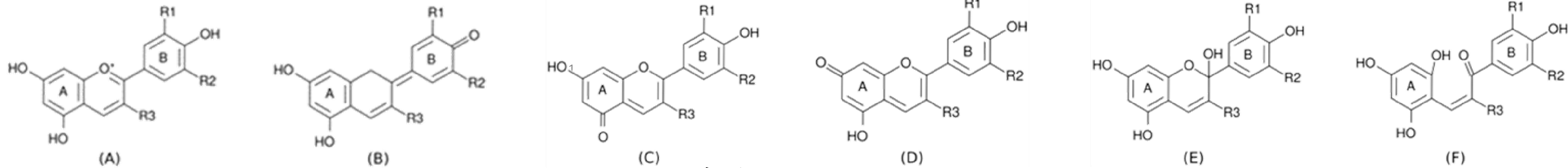


圖23.不同pH值下的花青素結構(Changho Jhin et al., 2014)

三、三種花色的矮仙丹之比較

(一)

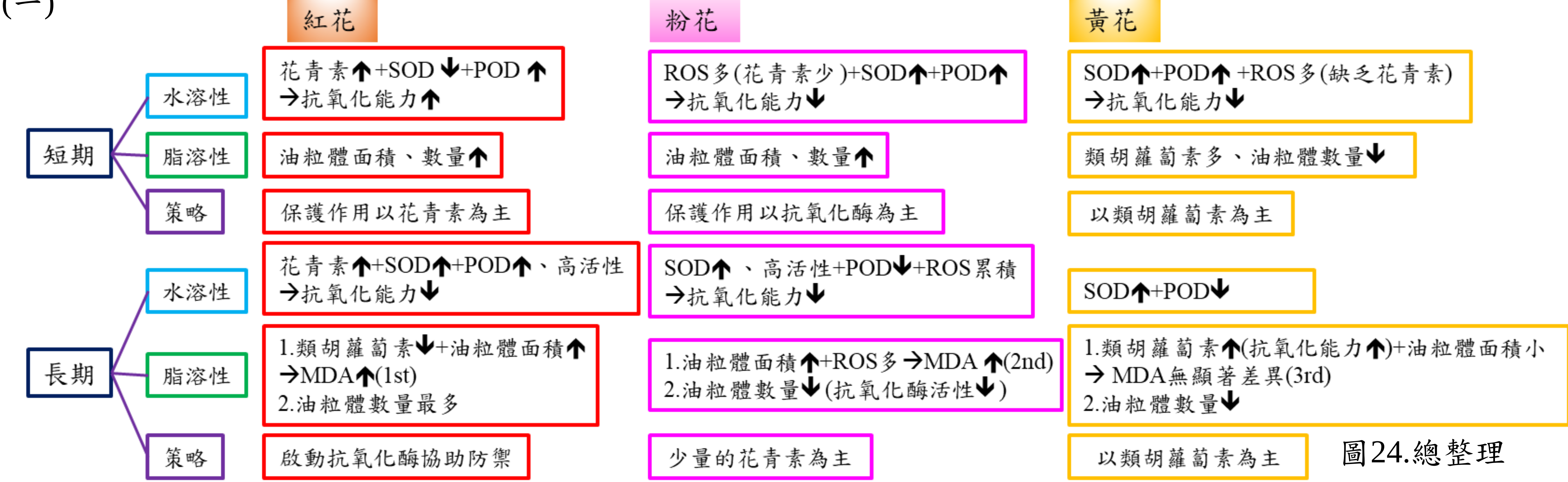


圖24.總整理

(二)本實驗以不同花色的矮仙丹來探討其抵抗非生物性壓力因子(紫外光)，作為指標性實驗物種。發現短期照射UV後，可能累積較高濃度的ROS，誘發花青素的合成，生化合成花青素的機制複雜，包含轉錄因子(例如R2R3-MYB)的參與，在細胞質合成，再送至液胞儲存，此種藉由ROS為訊號調控花青素合成，以清除自由基的過程尚未清楚(Cerqueira, et al. 2023)。

(三)部分植物體在照射UV後，ROS本身也可以做為訊息傳遞因子，可在不同濃度下，使不同抗氧化酶的活性上升，過程與轉錄因子(例如：WRKY)有關(Wang G, et al. 2022)。

四、在型態觀察中，照射UV的時間越長，油粒體會有破碎之情形發生

(一)經由蘇丹紅染色後，顆粒有被染色的情形，且有聚集的現象。因此，我們推測顆粒可能是負責儲存脂質的油粒體。

(二)隨著UV照射時間越長，ROS也隨之上升，導致植物體內的代謝速率必須增加，才會使氧化壓力不會過高，所以紅花、粉花油粒體面積上升，顆粒數亦有數量增生的現象；黃花體內缺乏花青素吸收UV，使得ROS的濃度較高，可能使其DNA片段化及蛋白質損傷，所以油粒體的增生受到了影響，其顆數有顯著下降的情形，但因為類胡蘿蔔素多且有上升的趨勢，所以油粒體面積變化不明顯，其顆粒數有顯著下降的情形。

(三)紅花的油粒體面積較粉花、黃花大，故照射UV後，脂質變成MDA，所以紅花體內所偵測到的MDA濃度會較高，而黃花的油粒體面積及顆粒數雖較粉花少，但是產生的ROS較多加上較高的類胡蘿蔔素，所以MDA的濃度與粉花相近，凸顯其適應性較弱的性質。(Emanuel Schmid-Siebert, 2016)。

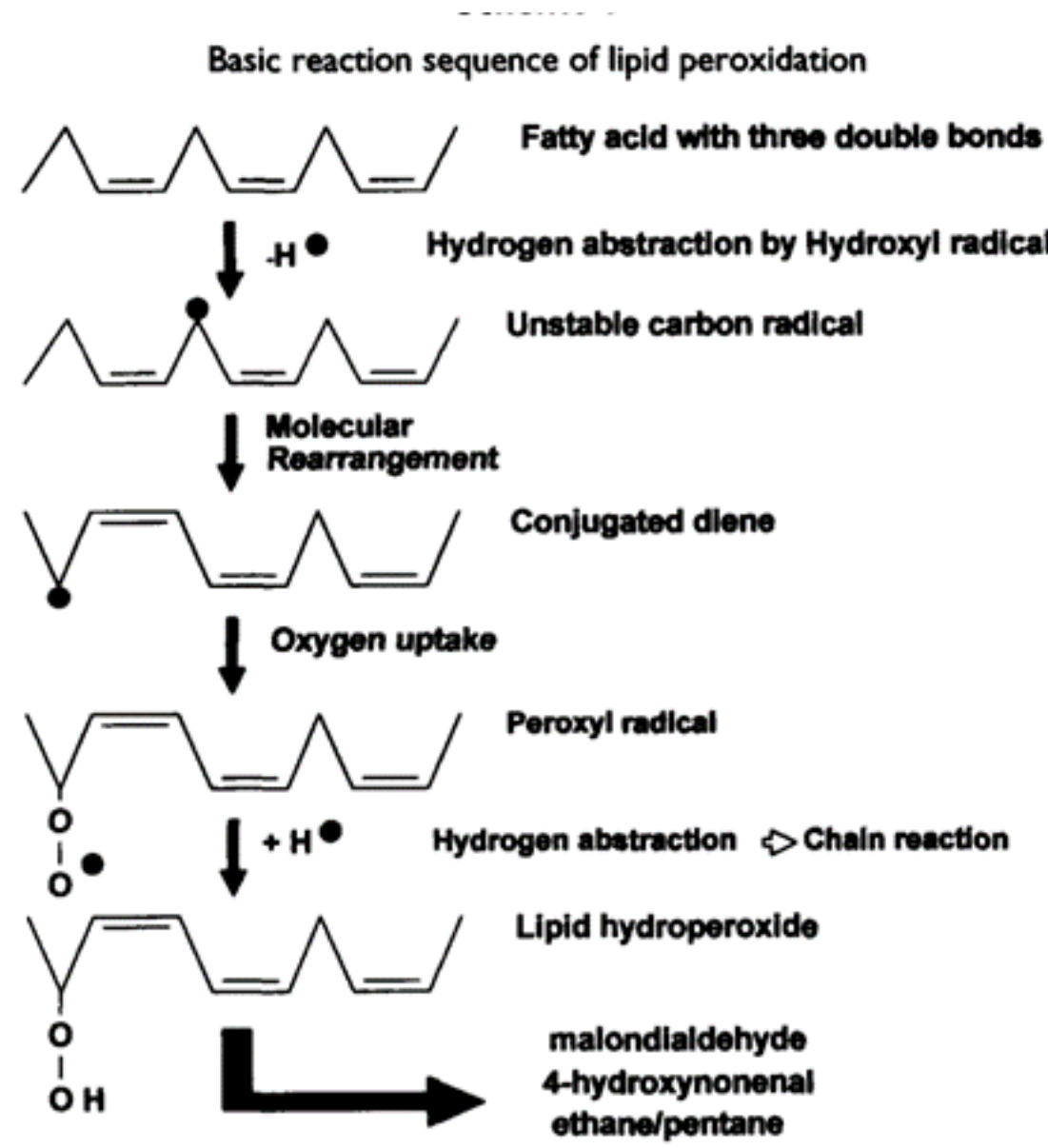


圖25.脂質過氧化造成細胞膜的流動性下降

伍、結論與應用

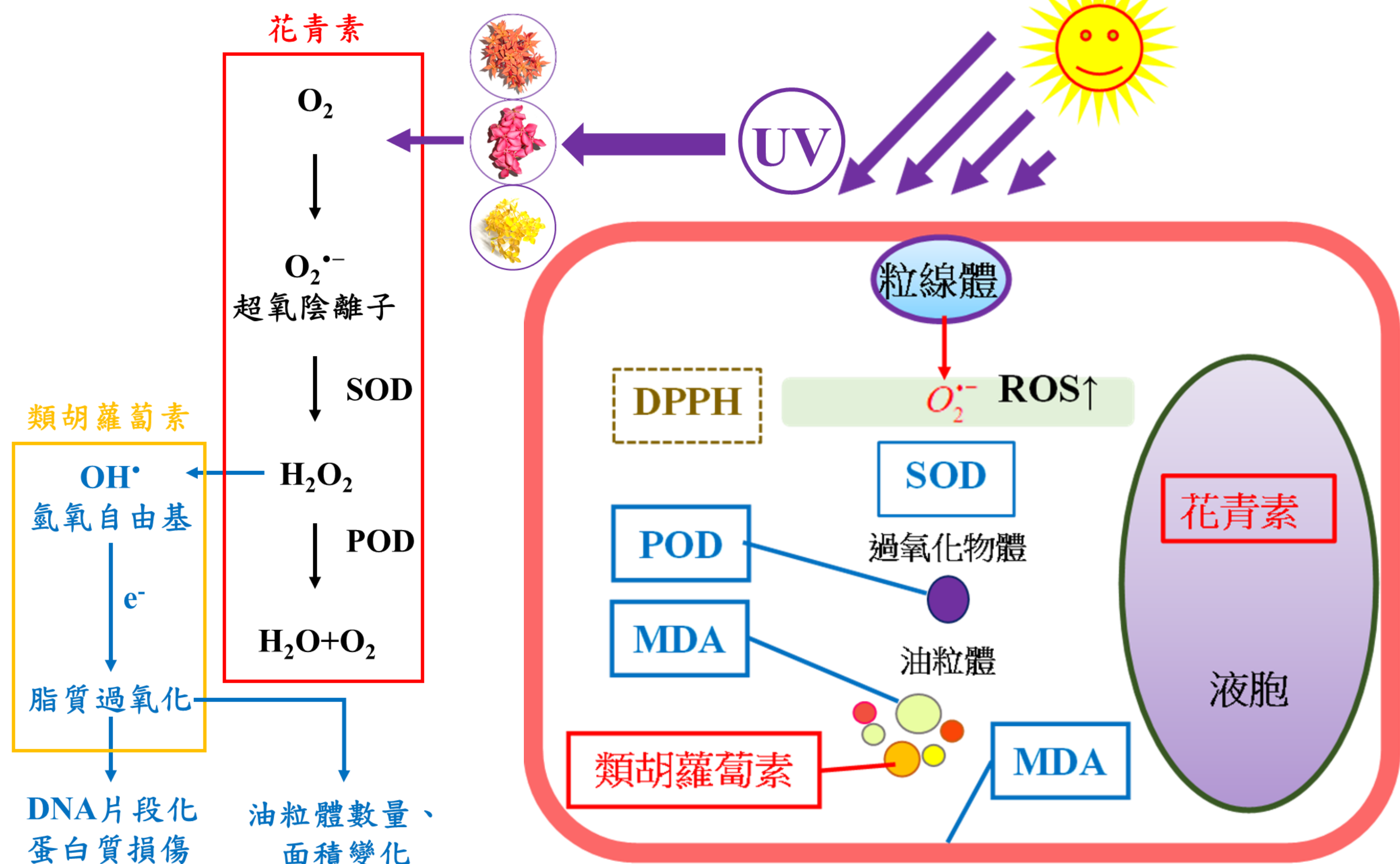


圖26.矮仙丹花瓣抗氧化作用模式圖

在本次實驗中我們發現：「**隨著濃度及pH值的提升，花青素呈現較佳的吸收UV效果**」、「**紅花的花青素最高而類胡蘿蔔素含量其次，能短時間協助抗UV**；粉花的花青素其次而類胡蘿蔔素含量最低，需較多抗氧化酶的表現，才能降低紫外線的傷害；黃花的花青素最低但類胡蘿蔔素含量最高，不論在短期及長期皆以類胡蘿蔔素來抗氧化。矮仙丹花利用不同策略，以降低紫外線傷害的影響」。若我們能將經濟作物進行品種改良，例如：研究如何影響色素合成的途徑、使植物的花青素穩定的呈現在鹼性之環境下、增加其抗氧化酶基因的表現。未來若能應用成功，將會是人類的一大福祉。

陸、參考文獻

- 1.蔣永正(2011年)。植物對環境逆境之調控與應用。
- 2.盛建軍、李想、何永美、祖艷群、湛方棟、李元(2019)。UV-B輻射對花青素合成代謝的影響及分子機理。植物生理學Plant Physiology Journal，55，949-958。
- 3.Changho Jhin, & Keum Taek Hwang. (2014). Prediction of Radical Scavenging Activities of Anthocyanins Applying Adaptive Neuro-Fuzzy Inference System (ANFIS) with Quantum Chemical Descriptors. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(8), 1-13.
- 4.Cerqueira, J.V.A., de Andrade, M.T., Rafael, D.D. *et al.* (2023). Anthocyanins and reactive oxygen species: a team of rivals regulating plant development?. *Plant Mol Biol* 2023, **112**, 213–223
- 5.Elia Bergamin, Giacomo Fabris, Matteo Neffat, Paola Baron Toaldo, Daniela De Luchi, and Renato Bonomi(2023). Multiple Solid–Liquid Extraction: Determination of Extraction Yield through UV-Vis Spectroscopy, *Journal of Chemical Education* 2023 100 (2), 875–879
- 6.Emanuel Schmid-Siebert, Olga Stepushenko, Gaetan Glauser, Edward E. Farmer, (2016). Membranes as Structural Antioxidants: RECYCLING OF MALONDIALDEHYDE TO ITS SOURCE IN OXIDATION-SENSITIVE CHLOROPLAST FATTY ACIDS, *Journal of Biological Chemistry*, Volume 291, Issue 25, 2016, Pages 13005-13013
- 7.S. Saha, J. Singh, A. Paul, and R. Sarkar. (2019). Anthocyanin Profiling Using UV-Vis Spectroscopy and Liquid Chromatography Mass Spectrometry. *Journal of AOAC International*, 103(1), 1-17.
- 8.Sweta Sharma, Chhavi Baran, Aradhana Tripathi, Aishwary Awasthi, Aarti Jaiswal, Rahul Uttam, Abhi Sarika Bharti, Renu Singh & K. N. Uttam (2021) Phytochemical Screening of the Different Cultivars of Ixora Flowers by Non-Destructive, Label-Free, and Rapid Spectroscopic Techniques, *Analytical Letters*, 54:14, 2276-2292
- 9.Wang G, Wang X, Ma H, Fan H, Lin F, Chen J, Chai T, Wang H. PcWRKY11, an II-d WRKY Transcription Factor from *Polygonum cuspidatum*, Enhances Salt Tolerance in Transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Int J Mol Sci.* 2022 Apr 14;23(8):4357. doi: 10.3390/ijms23084357. PMID: 35457178; PMCID: PMC9025145.