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　農業與食品學科

052206

一言「薄荷」就打拉曼

學校名稱： 臺北市立大直高級中學

作者：	指導老師：
高二 郭奕希 高二 呂勻庭	陳志郎

關鍵詞： 綠薄荷、腺毛、拉曼光譜

一言「薄荷」就打拉曼

摘要

綠薄荷葉面上盾狀腺毛突出於表面，進行精油分泌和儲存，呈蘑菇頭狀球體，直徑約30~70 微米。高日照量葉片的盾狀腺毛較大型於日照量低的葉片，下表皮腺毛較上表皮大型且密集，推測是為了減少日照對精油的揮發損失。實驗使用拉曼光譜技術來測量綠薄荷腺毛、葉肉及其精油主要成分－檸檬烯和香芹酮。數據顯示檸檬烯和香芹酮的特徵峰與腺毛的光譜特徵峰重疊，確定成功從葉片表面組織中測得精油訊號，證實了拉曼光譜測量精油與腺毛方法的可行性。實驗還確認了此方法也適用於檸檬馬鞭草。實驗也使用拉曼光譜測量生活中泛用性極高的百靈油和其主成份－辣薄荷精油，證實該技術對萃取精油成分的檢測也是可行的。

壹、 前言

一、研究動機

精油作為一種廣泛應用的天然產物，在醫療、食品等領域的應用不斷擴展，在農業上擁有著巨大的經濟價值。精油的收成量會因季節、環境和氣候的變化而有所不同，收成時間往往也會影響其品質，進而影響經濟價值。基於此，我們希望找到一種方法可以快速方便檢測植物中蘊含的精油，以幫助採收者確認最佳的收成時機。

精油在不同品種植物中存在的位置各不相同，有些在花朵中，有些在葉肉中，甚至整株植物都有精油的分泌。選擇綠薄荷作為研究材料，基於其精油分泌構造是存在於葉片表面的腺體類毛狀體（Glandular trichomes，以下簡稱腺毛或精油囊），可以直接觀察腺毛的結構與分布特性外，也能分析葉片與腺毛的發育關係。腺毛分布於葉表面也有助於儀器定位及直接檢測，因此本實驗嘗試以拉曼光譜技術直接進行新鮮葉片組織的精油檢測。拉曼光譜（Raman spectroscopy）檢測技術是一種精準且快速獲取數據的工具，藉由拉曼光譜圖的特徵峰，可提供判斷被測物中所含的化學物質種類。此外，拉曼光譜技術具有非侵入性，不會損壞樣品，因此只需少量樣品便能分析其中所含的物質。研究為

了驗證拉曼光譜檢測精油狀態的通用可行性，我們還選擇了精油分泌構造與綠薄荷相似的檸檬馬鞭草作為延伸實驗材料，期望這種實驗方法能夠應用於不同的精油植物。

二、文獻回顧

(一) 精油（Essential oils）

精油一般是指從植物中萃取出來的芳香物質，為香水、調味料、化妝品等工業的重要產品。芳香植物是具有香氣和可供提取芳香物質的栽培植物和野生植物的總稱，常見者包括薰衣草、綠薄荷 (留蘭香)、辣薄荷、迷迭香、檸檬馬鞭草、檸檬香茅、百里香、羅勒、洋甘菊等。精油因成分特性具備調節溫度及保護植物免受細菌或病菌的侵害，而花瓣中的精油，可能吸引對自己有益的昆蟲，同時也可能驅趕對自己有害的昆蟲。

精油是以光合作用產物來生成的有機化合物，並不是油，可分為萜類化合物（Terpenoids）及氧化複合物兩大類，熟知的精油種類大多是萜類化合物。異戊二烯（Isoprene）是組成萜類化合物的重要化合物，單萜（Monoterpenes）化合物是由兩個單元的異戊二烯組成，分子結構可以是無環鏈狀或單環狀或雙環狀。例如薄荷醇（Menthol）是辣薄荷（Peppermint）精油的主要成分，就是單環狀萜，而綠薄荷（Spearmint）精油主要成分是香芹酮（Carvone）及檸檬烯（Limonene），檸檬烯是單環狀萜，香芹酮是有修飾的單萜類（Monoterpenoids）化合物。另有倍半萜烯（Sesquiterpene）則是由三個單元的異戊二烯組成的一類萜烯。至於另一類氧化複合物精油，種類繁多包括酯類、醛類、酮類、醇類、酚類等化合物，有時也涵蓋酸類、內酯類或硫氮化合物。

(二)腺體類毛狀體（Glandular trichomes）

毛狀體（Trichomes）是大量植物物種表皮的生長物，由單細胞或多細胞結構組成。非腺體(nonglandular)類毛狀體功能因植物而異，可能與保溫、保護、減少蒸散、吸附物質等功能有關，而腺體（glandular）類毛狀體功能則是分泌能力，約見於 30% 的維管植物物種，很多植物可以兩者兼具。腺體類毛狀體（腺毛）中尤其多細胞結構腺毛，能夠分泌或儲存大量次級代謝物，有助於提高植物對環境的適應性。且長遠而

言，調節此類分泌結構的密度和生產力的能力將具有巨大的生物技術意義（Huchelmann, A., Boutry, M., Hachez, C.,2017；Jin, J. *et al.*, 2014）。根據頂端頭部大小和柄長度主要區分為盾狀腺毛（Peltate glandular trichomes, PGT）或頭狀腺毛（Capitate glandular trichomes）兩類，頭狀腺毛通常具有長度超過頭部高度一半的柄但較小，而盾狀腺毛為短柄毛狀體但具有由 4 至 18 個細胞組成的大分泌頭（Glas, J.J. *et al.*, 2012)。

薄荷植物同時具有盾狀腺毛及頭狀腺毛，頭狀腺毛的分泌物主要是醣類、脂質及蛋白質混合物，而單萜類精油成分則主要由盾狀腺毛分泌及儲存在角質鞘覆蓋下的空間內。幼葉腺毛數量比成熟葉少，新腺毛在葉片生長過程中持續產生，使得同一區域同時具有不同年齡階段的腺毛（Maffei, M., Bertea, C. M.,and Mucciarelli, M.,2007）。

(三)拉曼光譜檢測植物代謝物

胺基酸、脂質、類黃酮、多酚、生物鹼和葉綠素等初級和次級植物代謝物，通常無法以視覺直接判斷目標植物的收穫時機。典型研究植物代謝物濃度的方法，常需要漫長時間密集的從組織中提取製備，才能獲得用於分析所需的公克級份量，以便進行高效液相色譜 (HPLC) 定量。而代謝物的表現和積累取決於溫度、濕度、土壤類型和日照量等許多生物和非生物因素，上述分析方式無法快速進行，將使最佳收穫時間不容易預測。例如迷迭香酸（Rosmarinic acid）是可從綠薄荷中提取的水溶性代謝物，研究嘗試利用拉曼光譜作為一種快速即時測量的方法，來確定植物的最佳收穫時間以提取最豐富的迷迭香酸。且拉曼光譜作為非破壞性分析技術，可根據光譜特徵峰提供植物代謝物之分子官能團信息（Li, J. *et al.*,2021)。

三、研究目的

綠薄荷等芳香植物，其精油分泌構造是存在於葉片表面的腺毛，觀察腺毛的分布特性外，也希望能進一步分析葉片與分泌腺毛的發育關係。且本實驗嘗試確立拉曼光譜技術可直接用於新鮮葉片組織的精油檢測，就能以精準且快速方便的方式掌握植物精油分泌狀態。也藉由拉曼光譜圖的特徵峰辨識，提供精油純度及成分種類的判斷。

(一) 綠薄荷精油分泌腺毛的型態與構造之觀察

1. 腺毛構造觀察與大小量測

2. 腺毛分布狀態與葉發育狀態之關係

(二) 拉曼光譜技術即時檢測綠薄荷精油分泌狀況之探討

1. 綠薄荷精油主要成分之拉曼光譜檢測

2. 綠薄荷腺毛之拉曼光譜檢測

3. 綠薄荷葉肉拉曼光譜檢測

(三) 拉曼光譜技術即時檢測精油植物分泌之適用性探討-檸檬馬鞭草為例

1. 檸檬馬鞭草植物精油囊之拉曼光譜檢測

2. 檸檬馬鞭草精油之拉曼光譜檢測

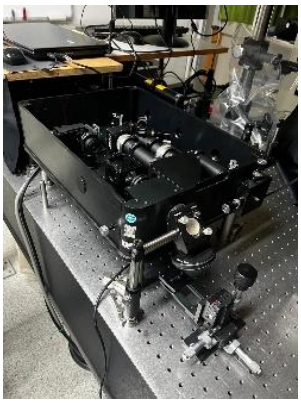
(四) 拉曼光譜檢測比較相關精油產品成分之探討

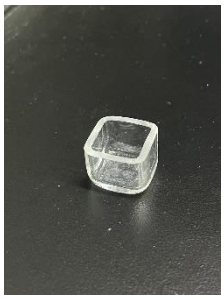
1. 百靈油之拉曼光譜檢測

2. 辣薄荷精油之拉曼光譜檢測

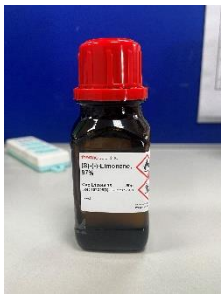
貳、 研究設備及器材

一、 研究設備及器材（圖片來源：指導教師與作者共同拍攝）

穿透與反射式顯微鏡	拉曼光譜儀	光譜量測系統
		
數位解剖顯微鏡	複式顯微鏡	目鏡輔助拍攝裝置

		
微量吸管	玻璃槽	
		

二、 **研究藥品** （圖片來源：指導教師與作者共同拍攝）

香芹酮 (Carvone)	檸檬烯 (Limonene)	辣薄荷精油 (Peppermint Oil)
		
檸檬馬鞭草精油 (Lemon Verbana Oil)	百靈油 (China Oil)	
		

三、 **生物材料**（圖片來源：指導教師與作者共同拍攝）

綠薄荷 *Mentha spicata*	檸檬馬鞭草 *Aloysia citrodora*
	

參、研究過程或方法

一、綠薄荷葉面腺毛的觀察

(一)腺毛構造觀察

1. 將薄荷葉片部分剪下，放置載玻片上。
2. 滴上蒸餾水，以蓋玻片覆蓋。
3. 用膠帶黏貼蓋玻片兩側，以防葉片過厚不利於觀察。
4. 放置於複式顯微鏡載物台上，調整焦距以放大倍率 100 倍及 400 倍進行觀測。
5. 搭配目鏡輔助拍攝裝置進行拍攝紀錄。

(二)不同狀態葉面上下表皮腺毛狀態與密度之比較

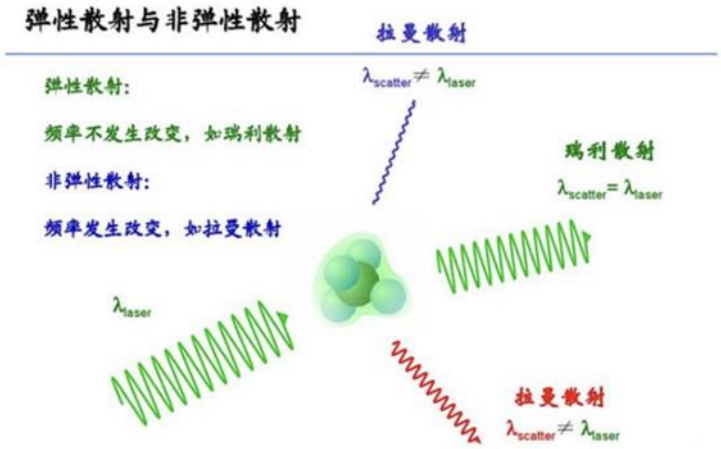
1. 摘取受日照量高低差異的薄荷葉片進行型態觀察比較。
2. 備妥數位解剖顯微鏡載物台為透光玻璃，並將葉片放置於載物台上
3. 關閉顯微鏡上方光源，僅開啟底部光源，調整對焦於葉片明顯透光的葉脈部位。
4. 以放大率 50 倍進行腺毛觀察及測量。
5. 依序測量比較不同日照量葉片上下表皮腺毛之大小及密佈分布狀態。

二、葉片組織及精油的拉曼光譜測量

(一)拉曼光譜技術原理

當一雷射光源照射在樣品上，絕大多數光子會以彈性反射的方式反射；極少部分光子會與樣品分子產生交互作用，造成反射出的光子能量改變。此能量改變的非彈性散射現象，即稱為拉曼散射。藉由蒐集拉曼散射的光子能譜，即為拉曼光譜(圖

一)。



圖一 拉曼光譜原理示意圖

(圖片來源：引用自「光電學堂-實作課程介紹-拉曼光譜量測技術」)

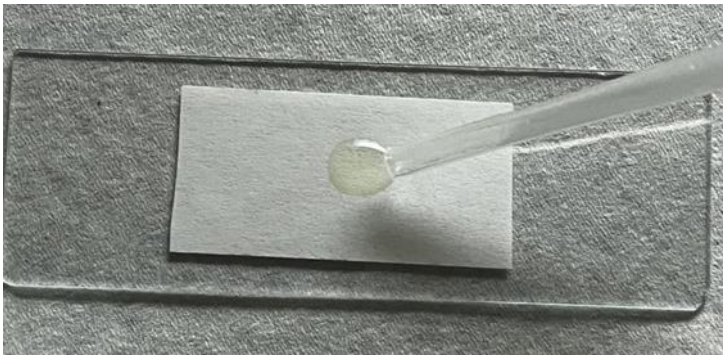
(二)拉曼光譜檢測

1. 不同類型檢測樣品製備

(1)以玻璃槽個別盛裝香芹酮及檸檬烯兩項綠薄荷精油之純物質成分

(2)用雙面膠將綠薄荷葉片、馬鞭草葉片黏貼在載玻片上方

(3)將雙面膠黏貼在載玻片上，不撕下另一面而直接在上方以微量吸管或滴管滴上精油 (圖二)



圖二 精油檢測樣品製備示意圖 (圖片來源：作者共同拍攝)

2. 把待檢測樣品放到載物臺上

3. 設定雷射波長 785nm

4. 調整聚焦使樣品處於合適位置

5. 調整雷射強度確保樣品不會被燒毀，並且足以產生拉曼訊號

6. 依標的物差異調整雷射照射的積分時間(exposure)、平均次數(average)等參數，以

取得有較好訊雜比的數據 (表一)

7. 獲取拉曼訊號數據後畫圖對比變化，並標註特徵峰。

表一 在雷射波長 785nm 下，依標的物的差異所調整的參數 (表格來源：作者共同製作)

	積分時間(秒)	平均次數	光柵(條/mm)	物鏡倍率
香芹酮	20	6	600	20x
檸檬烯	20	3		20x
綠薄荷腺毛	10	4		10x
綠薄荷葉肉	10	4		10x
馬鞭草腺毛	10	4		10x
馬鞭草精油	6	4		10x
百靈油	5	4		10x
辣薄荷精油	10	8		20x

肆、研究結果

一、綠薄荷葉面分泌腺毛的觀察

在顯微鏡觀察下，我們發現綠薄荷腺毛（精油囊）廣佈於葉片表面。以解剖顯微鏡觀測時，則選擇葉脈部位的上下表皮進行觀測，可以免除葉綠素干擾辨識，同時可發現在葉脈附近的上下表皮表面皆也有大量分泌腺毛分布。整體而言，日照量高的葉片上非腺狀毛狀體遠多於日照量低的葉片，日照量高的葉片上盾狀腺毛較大型於日照量低的葉片，兩類葉片各自下表皮腺毛較大型於上表皮，下表皮腺毛密度略大於上表皮。

(一) 薄荷盾狀腺毛是立體的結構，易產生清楚聚焦和模糊聚焦之差異。

因為腺毛是立體的結構，透過改變聚焦點可以觀察到它與其他構造在縱向維度上的不同。初始先將顯微鏡聚焦清楚在所見介面上，然後聚焦點逐漸以遠離植物葉面方向向上移動，直至四周葉肉模糊而腺毛輪廓清晰的介面，以此可以觀察腺毛的存在(圖三)。



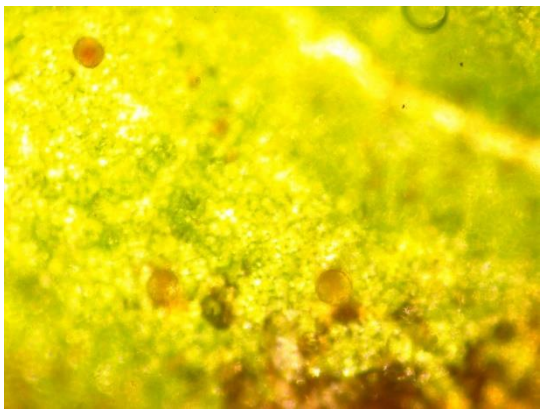
A.表皮聚焦清楚之畫面



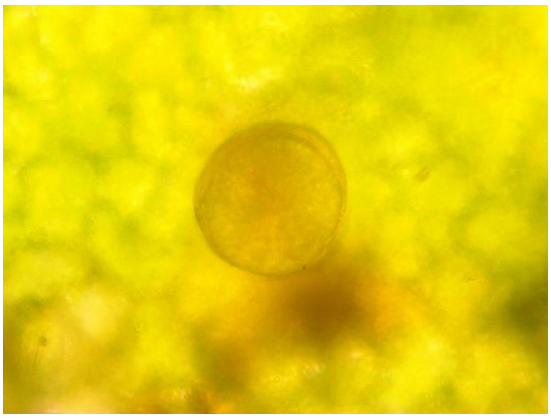
B.表皮聚焦模糊之畫面

圖三 腺毛觀察-聚焦模糊和清楚之比較 (圖片來源：作者共同拍攝)

實驗藉此觀察作為判斷定位精油囊的依據，待顯微鏡從對焦精油囊漸往遠離或靠近植物葉面的方向微量調整焦距時，四周葉肉細胞模糊時，在過程中可見盾狀腺毛是一顆有角質鞘外輪廓包圍的蘑菇狀圓形頭部立體結構，頭部下方中間是多個細胞組成的柄部，乍看似乎排列成兩個同心圓 (圖四)。



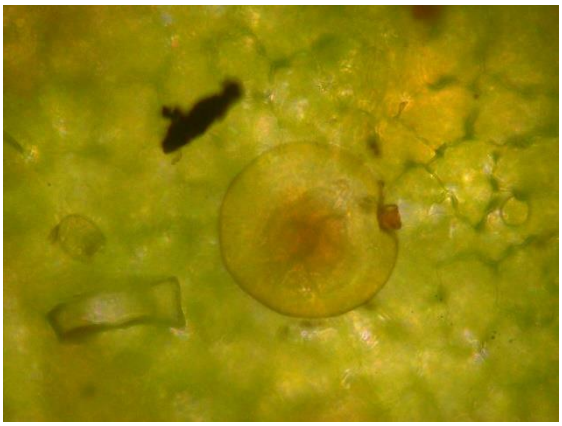
A.葉表面多個盾狀腺毛，倍率 100 倍



B.葉表面單一個盾狀腺毛，倍率 400 倍



C.葉表面單一個盾狀腺毛，倍率 400 倍



D.葉表面單一個盾狀腺毛，倍率 400 倍

圖四 複式顯微鏡調整焦距對盾狀腺毛之觀察 (圖片來源：指導老師與作者共同拍攝)

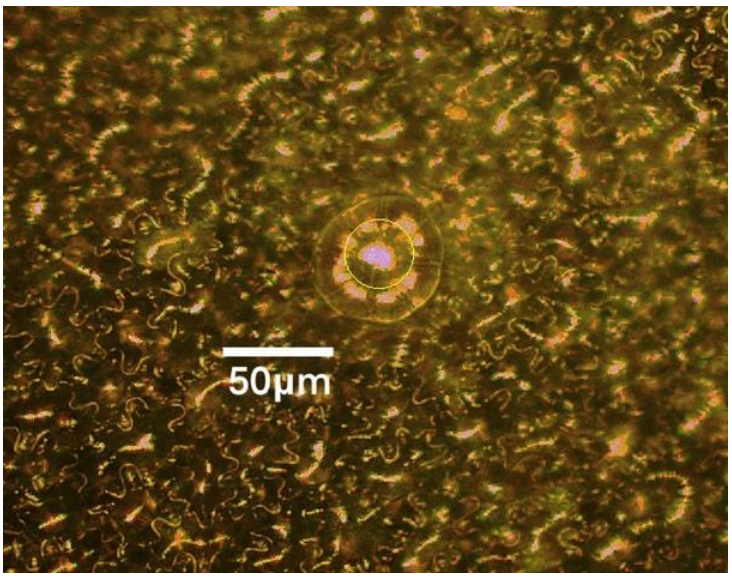
(二) 薄荷腺毛的構造及大小測量

比較光照量高與光照量低的葉片，可以發現光照量高的葉片較厚較深刻皺摺且葉面毛狀觸感明顯，而光照量低之葉片較薄較淺皺摺且葉面毛狀觸感略低，因此可推測日照量影響綠薄荷葉的生長發育(圖五)。

	
光照量高的葉片	光照量低之葉片

圖五 光照量差異影響綠薄荷葉片的生長發育(圖片來源：指導老師與作者共同拍攝)

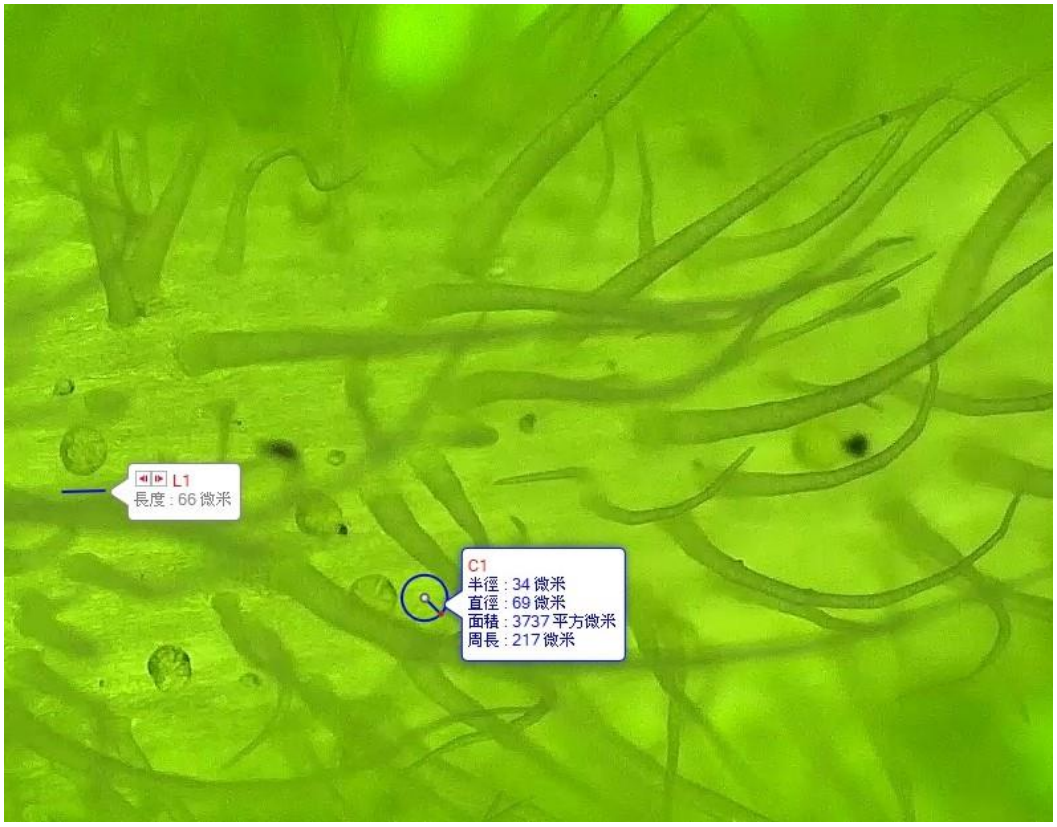
利用反射式顯微鏡觀察精油囊的構造，精油囊在顯微鏡下方像是蘑菇頭狀的球體，看的出來外層被薄薄的角質層包裹。透過左下方比例尺也可以判斷精油囊的大小大約為 50 微米(㎛) (圖六)。



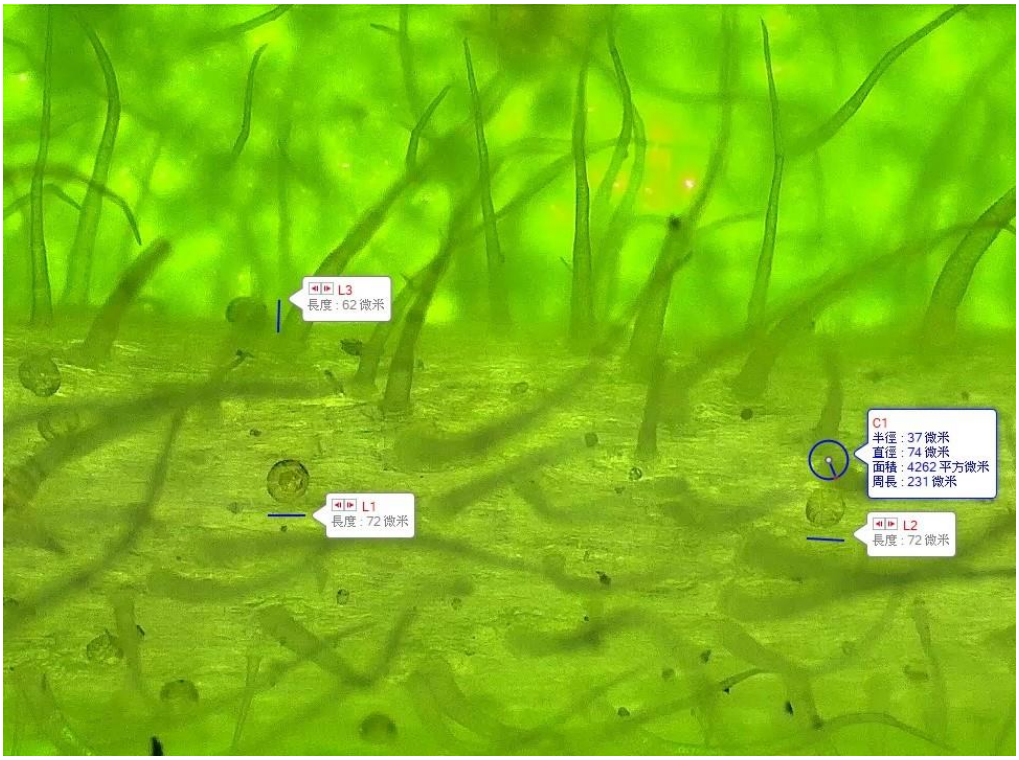
圖六 薄荷盾狀腺毛的大小和構造(比例尺 50um) (圖片來源：作者共同拍攝)

以數位解剖顯微鏡進行光照量差異葉片表面大範圍的觀測及測量，可以量測腺毛的橫徑、高度及面積，整體而言，日照量高的葉片上非腺體類毛狀體遠多於日照

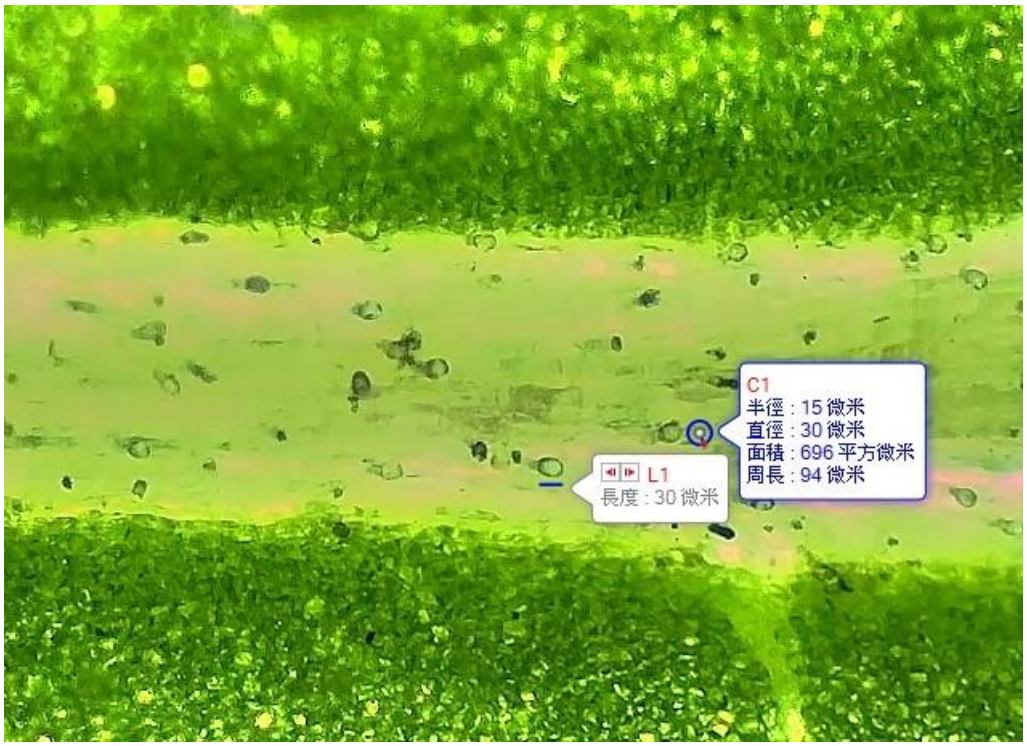
量低的葉片，日照量高的葉片上盾狀腺毛較大型於日照量低的葉片，兩類葉片各自下表皮腺毛較大型於上表皮。



A. 日照量高葉片上表皮腺毛橫徑、面積，倍率 50 倍



B. 日照量高葉片下表皮腺毛橫徑、高度、面積，倍率 50 倍



C. 日照量低葉片上表皮腺毛橫徑、面積，倍率 50 倍



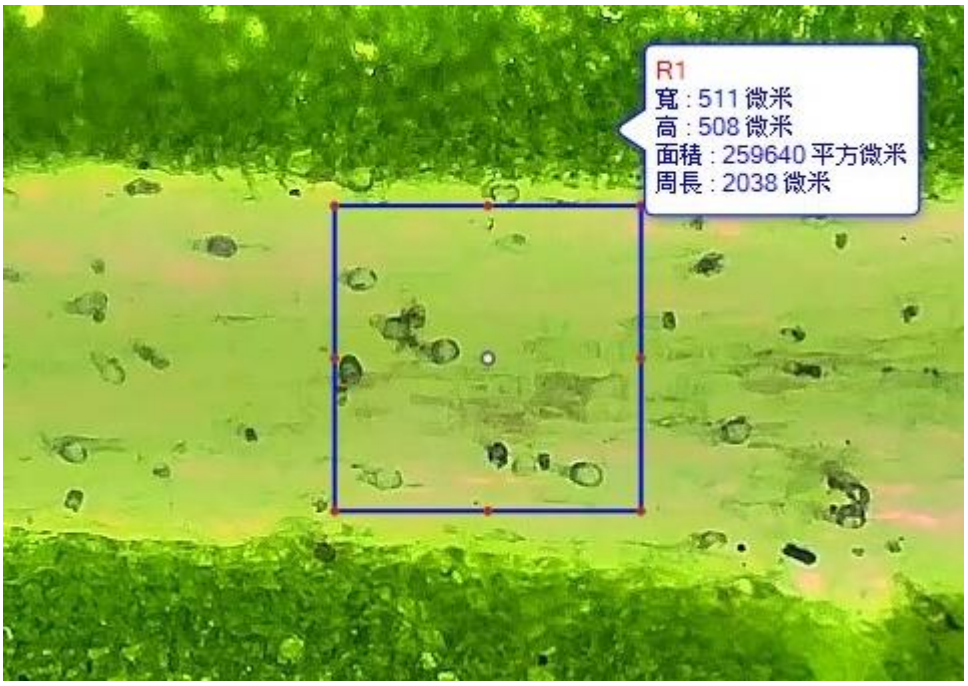
D. 日照量低葉片下表皮腺毛橫徑、高度，倍率 50 倍

圖七 光照量差異影響綠薄荷葉片盾狀腺毛的大小差異

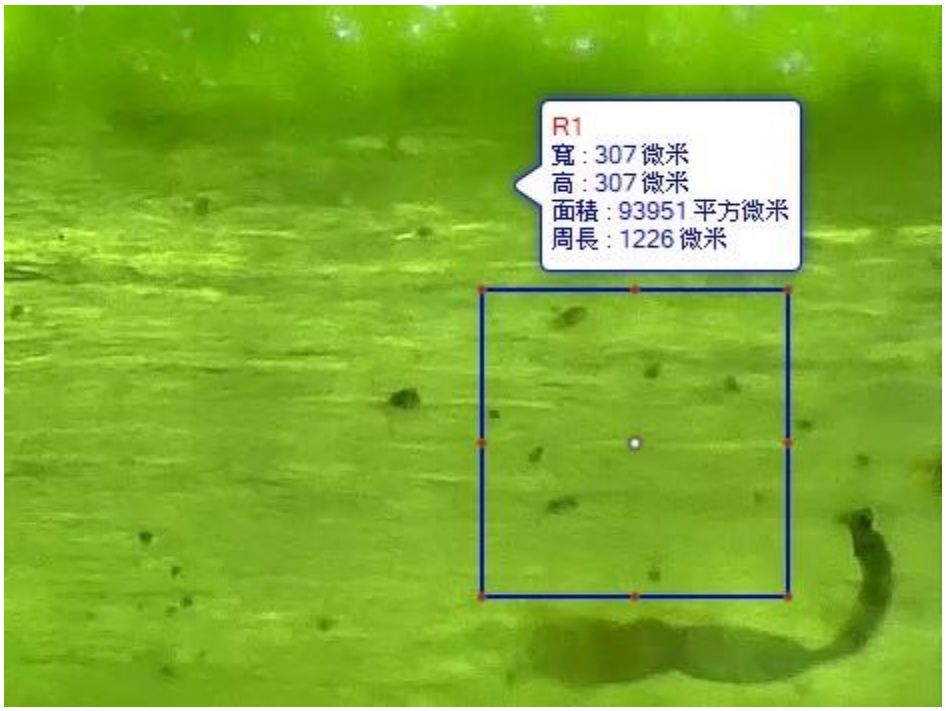
(圖片來源：指導老師與作者共同拍攝)

(三) 綠薄荷下表皮的腺毛精油囊分布比較密集

由於日照量低的葉片非腺狀毛狀體較少，較不會干擾腺毛密度的觀察測量，因此選擇以數位解剖顯微鏡對日照量低葉片表面進行量測，可發現其下表皮腺毛密度大於上表皮（圖八）。



A. 上表皮腺毛密度計算：10 個 / (0.5 mm × 0.5 mm)＝約 40 個/ mm^2 。

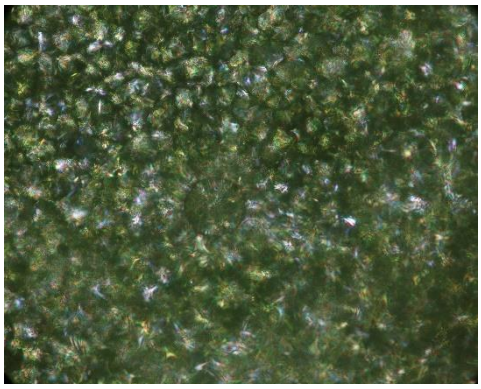


B. 下表皮腺毛密度計算：7 個 / (0.3 mm × 0.3 mm)＝約 78 個/ mm^2 。

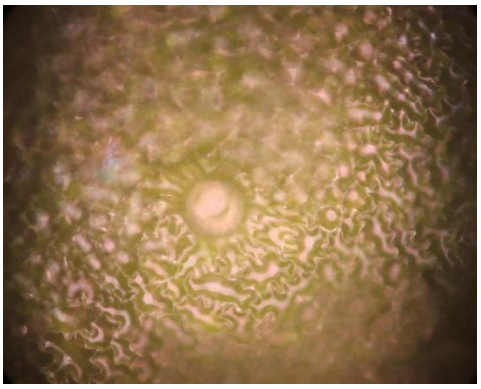
圖八 綠薄荷葉片上下表皮腺毛的密度差異 (圖片來源：指導老師與作者共同拍攝)

(四) 穿透式及反射式顯微鏡下的腺毛構造觀察的差異

進行拉曼光譜檢測前，在嘗試判斷精油囊位置的階段，我們會切換穿透與反射式的顯微鏡畫面做再一次地確認，可以發現在穿透式顯微鏡下方的精油囊仍是一顆透明圓形狀，不過相比反射式顯微鏡更顯得不明顯，故我們主要觀察使用之顯微鏡是反射式的(圖九~十)。



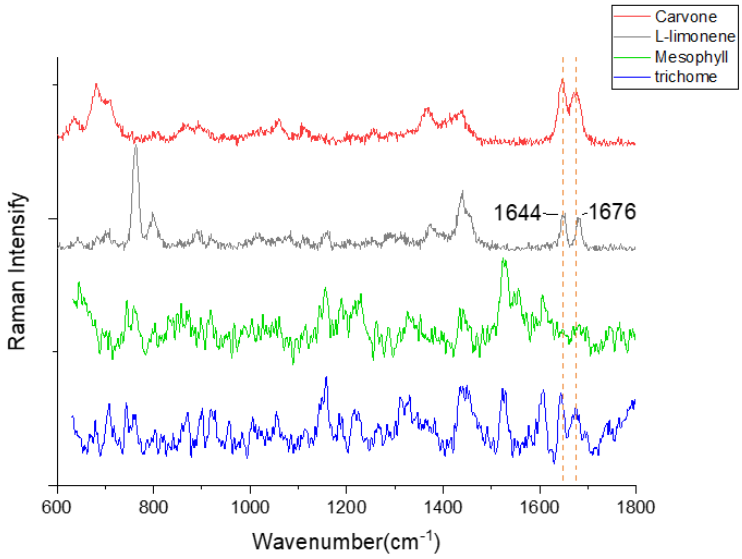
圖九 穿透式顯微鏡下的腺毛構造
(圖片來源：作者共同拍攝)



圖十 反射式顯微鏡下的腺毛構造
(圖片來源：作者共同拍攝)

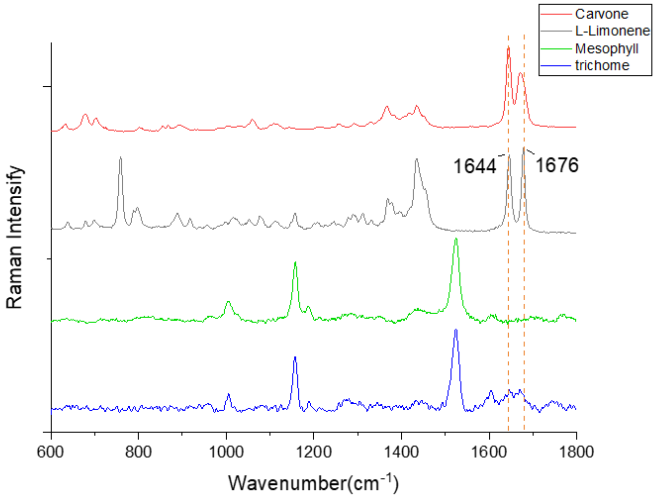
二、香芹酮及檸檬烯之拉曼光譜測量圖

(一) 使用雷射波長 785nm 檢測綠薄荷葉片腺毛、葉肉和精油內的純物質。在波數 1644cm-1 和 1676cm-1 處發現兩支對應的特徵峰，配合文獻了解它是由兩種純物質中的共同特殊官能基貢獻，故往後以此作為標的物。圖中可見腺毛出現了該訊號而葉肉則無(圖十一)。



圖十一 雷射波長 785nm 檢測香芹酮及檸檬烯之拉曼光譜測量圖
(圖片來源：作者共同製作)

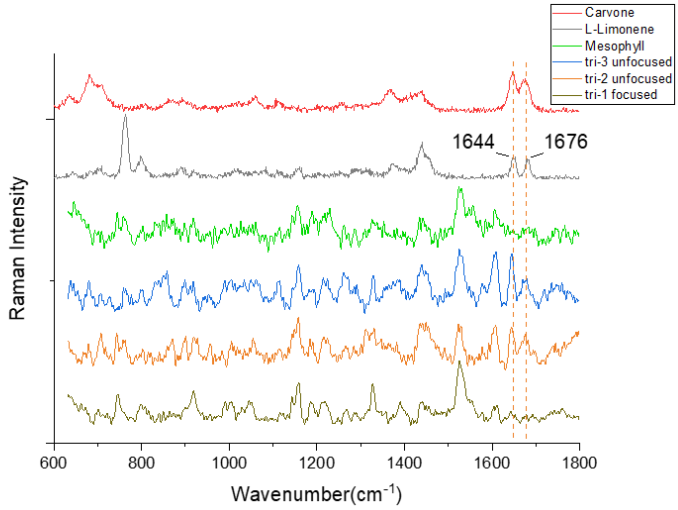
(二) 使用雷射波長 532nm 檢測。對比 785nm，其能量更強、訊雜比更好，且同樣在波數 1644cm-1 和 1676cm-1 處發現了兩支共同特徵峰(圖十二)。



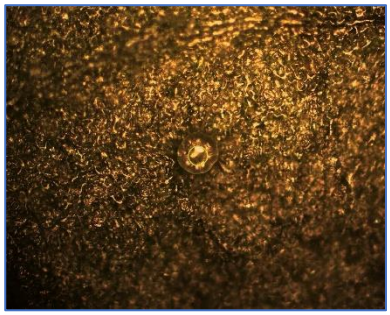
圖十二 雷射波長 532nm 檢測香芹酮及檸檬烯之拉曼光譜測量圖
(圖片來源：作者共同製作)

(三) 雷射波長 785nm 檢測並且比較不同聚焦面之訊號

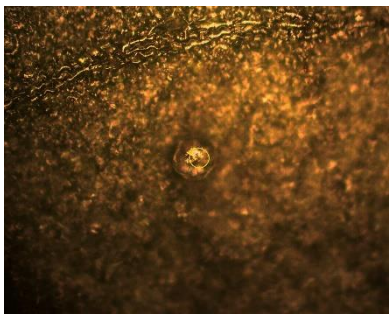
參考腺毛本身是立體圓球形狀，改變聚焦位置使雷射能夠更準確取得腺毛中精油的訊號，而避免使葉肉的訊號過強影響精油訊號的判斷。原先聚焦在四周葉肉清楚且能夠清晰看見腺毛的外輪廓之處(圖十三 B)，到將聚焦稍微遠離葉片直到周圍葉肉變得模糊卻仍可清晰看見腺毛表面的位置(圖十三 C)，分別檢測了兩種情況的訊號，可見前者(focused)的兩支特徵峰十分不明顯，而後者(unfocused)使精油的特徵峰更加明顯容易判別(圖十三 A)



圖十三 A 波長 785nm 之不同聚焦面對比光譜圖 (圖片來源：作者共同製作)



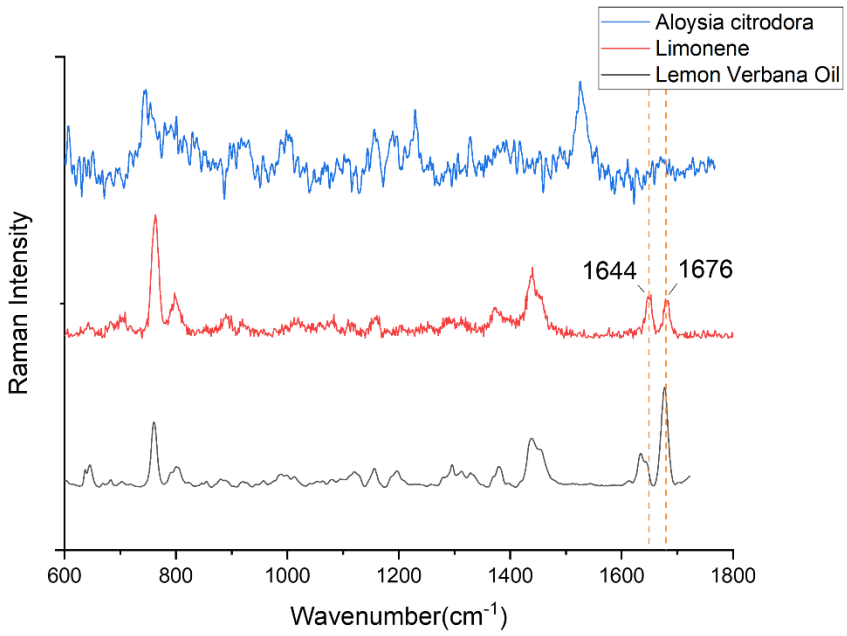
圖十三 B 四周葉肉清楚且能夠看見腺毛外輪廓(focused)
(圖片來源：作者共同拍攝)



圖十三 C 周圍葉肉模糊而腺毛表面清楚(unfocused)
(圖片來源：作者共同拍攝)

三、拉曼光譜即時檢測植物組織精油分泌之通用性探討-以檸檬馬鞭草為例

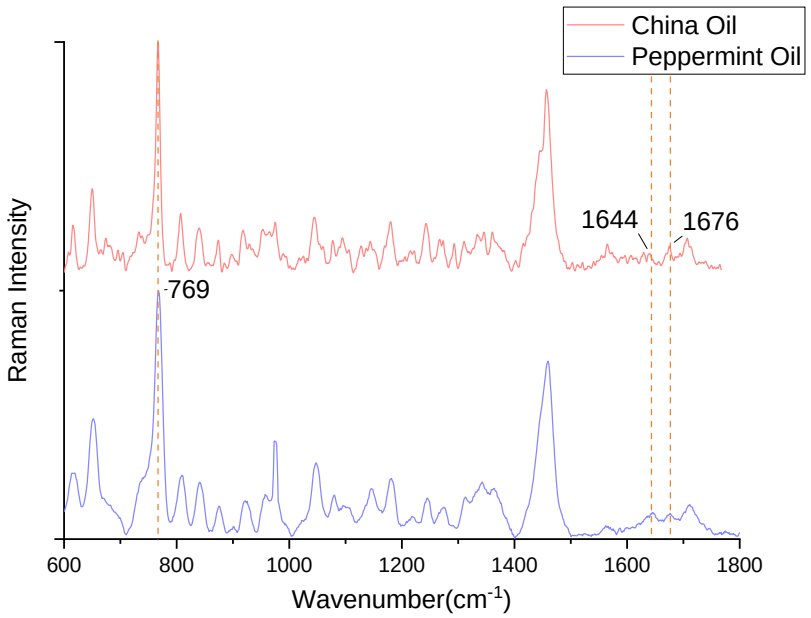
透過文獻已知檸檬馬鞭草精油之純物質中含有檸檬烯之純物質，透過拉曼光譜的檢測發現同樣在波數 1644cm^{-1}、1676cm^{-1} 處發現了兩隻對應的特徵峰，故確認在馬鞭草葉片上同樣可以使用拉曼光譜檢測精油之成分(圖十四)。



圖十四　拉曼光譜即時檢測檸檬馬鞭草植物組織與精油 (圖片來源：作者共同製作)

四、拉曼光譜對比檢測精油成分－辣薄荷精油與百靈油比較為例

市面上賣的百靈油標榜主要成分為辣薄荷精油，以波長 785nm 雷射進行拉曼光譜檢測，實驗結果顯示百靈油成分與辣薄荷之成分極為匹配 (圖十五)。



圖十五　拉曼光譜檢測辣薄荷精油與百靈油 (圖片來源：作者共同製作)

伍、討 論

一、日照量差異會影響葉片發育及腺毛產生型態，印證腺毛產生及精油分泌會受到生物及非生物因子的影響，將使植物精油最佳收穫時間更不容易預測。

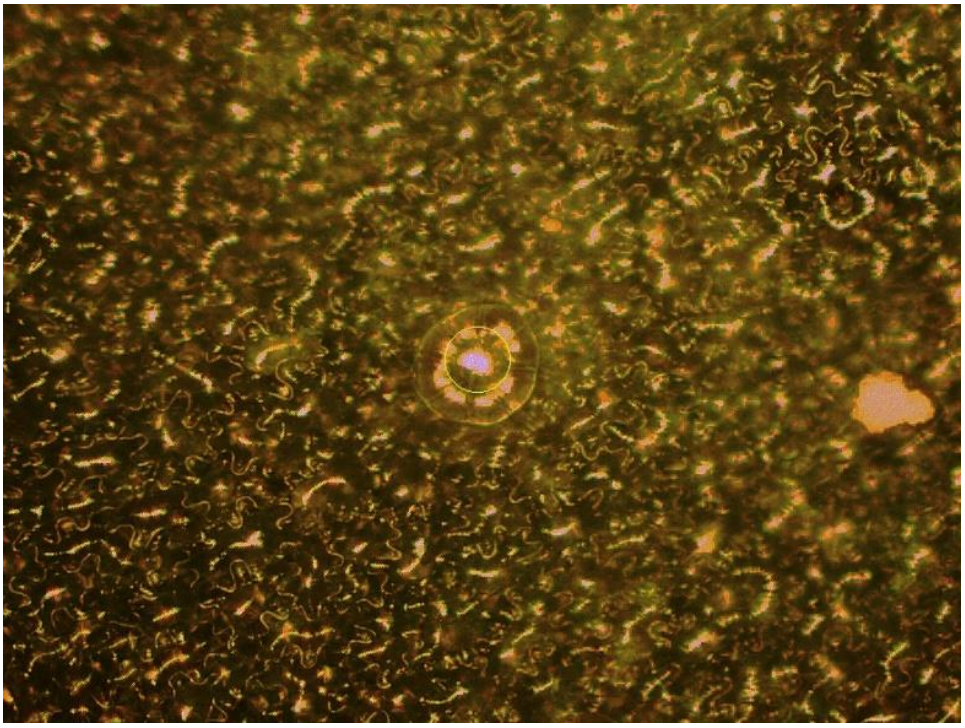
二、發現腺毛於上下表皮皆有分布，下表皮的密度大於上表皮，推測可能因精油成分具有揮發性，下表皮位置可以減少日照降低精油散逸損失。

三、在使用顯微鏡的初期，我們時常將氣孔誤認成薄荷的腺毛，因為他們在顯微鏡下同樣是圓形狀，後來是藉由調整焦距看是否有立體構造，及切換反射式與穿透式顯微鏡來進一步區分。

四、一開始選擇使用波長 785nm 是因為該波長的泛用性高，適用於很多物質的拉曼光譜測量，而且該波長能量較低不容易將樣品燒毀。未來將多加嘗試 532nm，因為其能量較 785nm 來的高，積分時間並不需要像 785nm 那麼長，可以更快速的取得我們要的數據，關鍵特徵峰的訊號也會比 785nm 更加明顯，只是缺點在於使用 532nm 會使樣品燒焦的風險很高，在參數的調整上要有更多次的嘗試。

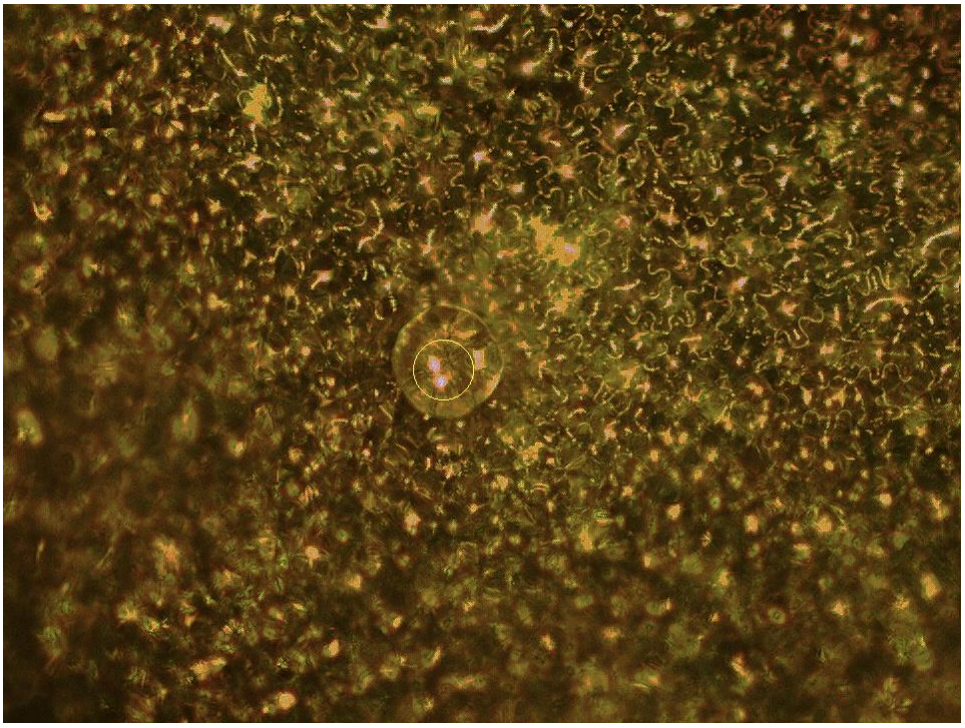
五、為了防止強度過大、曝光時間過長導致測量樣品被雷射光毀損，在參數的調整上我們使用 timelapse 來看強度、曝光時間的適性，利用連續取樣光譜上見到訊號的驟減來判斷。

六、為了使聚焦的區域可以覆蓋更大面積的精油囊，取得更清楚訊號的光譜圖，所以我們採用了較低倍率的 10x 物鏡 (圖十六)。

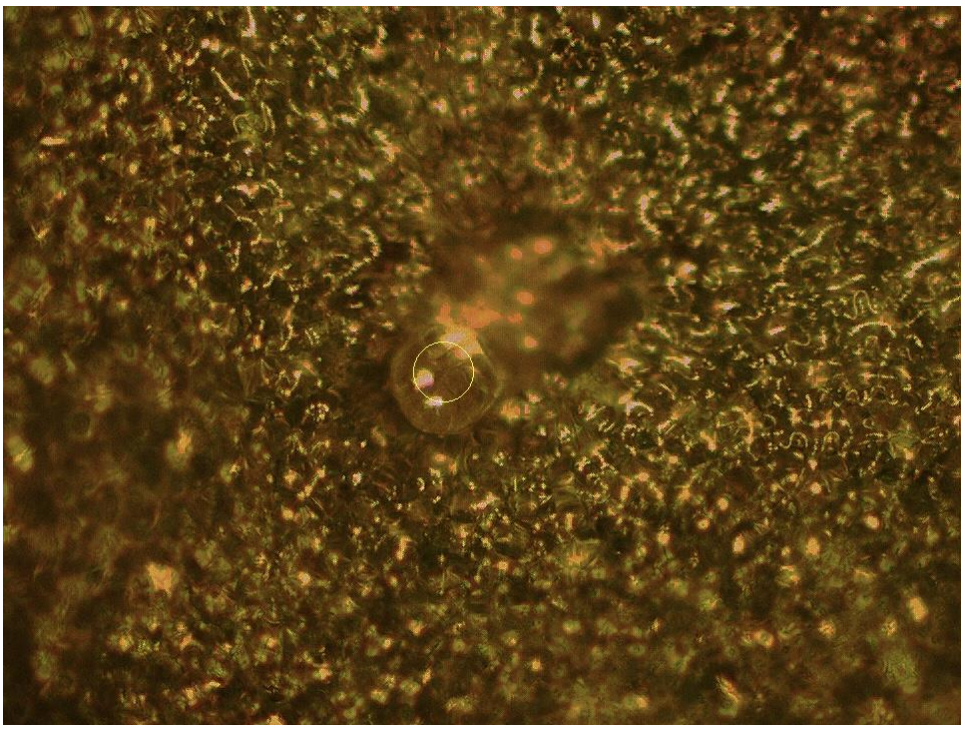


圖十六 中間的黃色圓圈為 10x 的聚焦區域 (圖片來源：作者共同拍攝)

七、接觸光譜的過程並沒有理想中的順利，植物的生理狀況很難預估，並且其承受雷射的程度也會比較差，所以我們不斷調整參數，除了觀察 timelapse 的訊號驟減，我們也會觀察植物組織的型態及顏色變化來判斷是否受雷射光毀損。(圖十七、圖十八)



圖十七 精油囊的正常狀態 (圖片來源：作者共同拍攝)



圖十八 精油囊被打壞的樣子 (圖片來源：作者共同拍攝)

八、未來將進一步探討精油成分拉曼光譜圖中相關特徵峰的特殊原子團類別。

陸、結 論

一、透過顯微鏡可以觀察到薄荷葉面上的盾狀腺毛突出於表面，成蘑菇頭狀的球體，內有精油的分泌與儲存。因葉片狀態及腺毛發展階段差異，腺毛大小橫徑大約介於30 至 70 微米(㎛) 。

二、日照量高的葉片上非腺狀毛狀體遠多於日照量低的葉片，日照量高的葉片上盾狀腺毛較大型於日照量低的葉片，兩類葉片各自下表皮腺毛較大型於上表皮。可推知腺毛產生及精油分泌會受到其他因子的影響，將使植物精油最佳收穫時間更不容易預測。

三、下表皮腺毛較上表皮大型且密集，推測是因為精油成分具有揮發性，下表皮位置可以減少日照降低精油散逸損失。

四、使用波長 785nm 測量綠薄荷腺毛、葉肉及綠薄荷精油主要成份的檸檬烯和香芹酮，從數據對比可以發現檸檬烯和香芹酮的兩支特徵峰有與腺毛的光譜特徵峰重疊，而在葉肉沒有，可以判斷已成功直接從葉面組織測量到了精油的訊號，確定了拉曼光譜測量精油與腺毛方法的可行性。

五、拉曼光譜直接測量植物組織的精油分泌狀態在檸檬馬鞭草這種植物也是適用的。

六、拉曼光譜檢測百靈油成分與辣薄荷精油成分的實驗，證實以拉曼光譜檢測萃取的精油成分也是可行的。

七、期望在證實並且標準化該技術的使用後可以使用手持式拉曼光譜儀對待測的精油植物測量，透過即時分析拉曼光譜中的特徵峰快速分析植物精油中的物質組成，協助確認精油是否處於最佳的收成時機。期望該技術在農業上展現價值。

柒、參考文獻資料

拉曼顯微系統操作手冊(2022)。取自: https://www.ntu-ccms.ntu.edu.tw/lab/ultrafast/photonicedu/001/Upload/1183/relfile/81693/107228/de950fb6-67fc-4fdf-ab86-d95b49b45900.pdf

Glas, J.J., Schimmel, B.C., Alba, J.M., Escobar-Bravo, R., Schuurink, R.C., Kant, M.R.(2012). Plant glandular trichomes as targets for breeding or engineering of resistance to herbivores. Int J Mol Sci. 2012 Dec 12;13(12):17077-103. doi: 10.3390/ijms131217077. PMID: 23235331; PMCID: PMC3546740.

Huchelmann, A., Boutry, M., Hachez, C. (2017). Plant Glandular Trichomes: Natural Cell Factories of High Biotechnological Interest. Plant Physiol. Sep;175(1):6-22. doi: 10.1104/pp.17.00727. Epub 2017 Jul 19. PMID: 28724619; PMCID: PMC5580781.

Jin, J., Panicker D., Wang Q. , Kim M. J.,Liu J.,Yin J. L., Wong L., Jang I. C., Chua N. H.,and Sarojam R. (2014). Next generation sequencing unravels the biosynthetic ability of Spearmint (Mentha spicata) peltate glandular trichomes through comparative transcriptomic. BMC

Li, J., Wijesooriya, C. S., Burkhow S. J., Brown, L. K. B., Collet, B. Y., Greaves, J. A., and Smith, E. A.(2021). Measuring Plant Metabolite Abundance in Spearmint (Mentha spicata L.) with Raman Spectra to Determine Optimal Harvest Time. ACS Food Science & Technology 1 (6): 1023-1029

Maffei, M., Bertea, C. M.,and Mucciarelli, M. (2007). Anatomy, physiology, biosynthesis, molecular biology, tissue culture and biotechnology of mint essential oil production. In: Mint. the genus Mentha (Chapter: 2) .Lawrence, B. M. Eds, CRC Press, pp.41-85.

【評語】052206

1. 本作品使用拉曼光譜技術測量檸檬烯和香芹酮，發現檸檬烯和香芹酮的特徵峰與綠薄荷的腺毛光譜特徵峰重疊，認為拉曼光譜測量精油與腺毛的方法具有可行性。實驗結果為顯微鏡觀察圖與拉曼光譜測量圖，而無量化之實驗數據，故實驗結果是否夠客觀，較有疑異。

2. 引用部分須列出參考文獻！（文獻回顧）才能知「出處」！否則會有「抄襲」之嫌！此外部分雖有標出處，但寫法有誤。觀察之影像最好要能數據化，並設置重複，結果才能進行統計分析，結果才有說服力（例如：日照量高之腺毛大於低日照量者。）日照量及腺毛量均應設法量化。

3. 討論未與其他學者相關之研究進行比較，很多僅是作者們的推測，並未有科學之證據，此部分日後應予加強。

4. 此項研究並未設置重複，因此無法進行統計分析，確認結果之差異性，無法排除機差之影響。

5. 本項研究須用到高級儀器，如 GC/MS，GC/FID 不易普及，應用性並不高。

作品簡報

一言「薄荷」就打拉曼

壹、前言

精油作為一種廣泛應用的天然產物，在醫療、食品等領域的應用不斷擴展，在農業上擁有著巨大的經濟價值。然而，精油的收成往往會因季節、環境和氣候的變化而有所不同，收成時機也會影響品質，進而關乎其所帶來的經濟收益。基於此，我們希望可以藉由拉曼光譜技術的非侵入、非直接破壞式且精準的優勢，快速地檢測植物中蘊含的精油，以幫助採收者確認最佳的收成時機。

貳、研究目的

一、綠薄荷精油分泌腺毛的型態與構造之觀察
二、拉曼光譜技術檢測綠薄荷精油分泌狀況之探討
三、拉曼光譜技術檢測精油植物分泌之適用性探討
　以檸檬馬鞭草為例
四、拉曼光譜檢測比較相關精油產品成分之探討
　以百靈油和辣薄荷精油為例

肆、研究過程及方法

一、薄荷葉片腺毛的觀察
將部分葉片剪下放置載玻片上，滴上蒸餾水使用蓋玻片覆蓋，兩側用膠帶黏貼，防止葉片不平整不利顯微鏡觀察，紀錄腺毛分布與大小。

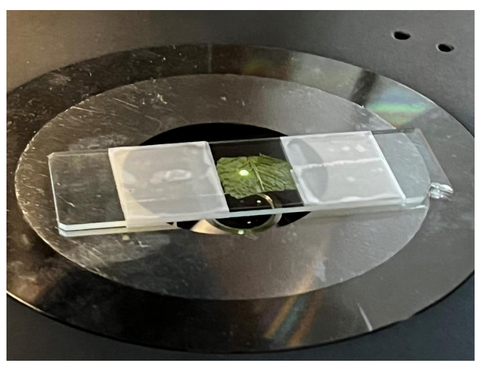


圖5 以解剖顯微鏡觀察
（圖片由作者共同拍攝）

二、拉曼光譜檢測
實驗原理:當一雷射光源照射在樣品上，絕大多數光子會以彈性散射的方式反射；極少部分光子會與樣品分子產生交互作用，造成反射出的光子能量改變。此能量改變的非彈性散射現象即稱為拉曼散射。藉由蒐集拉曼散射的光子能譜，即為拉曼光譜。

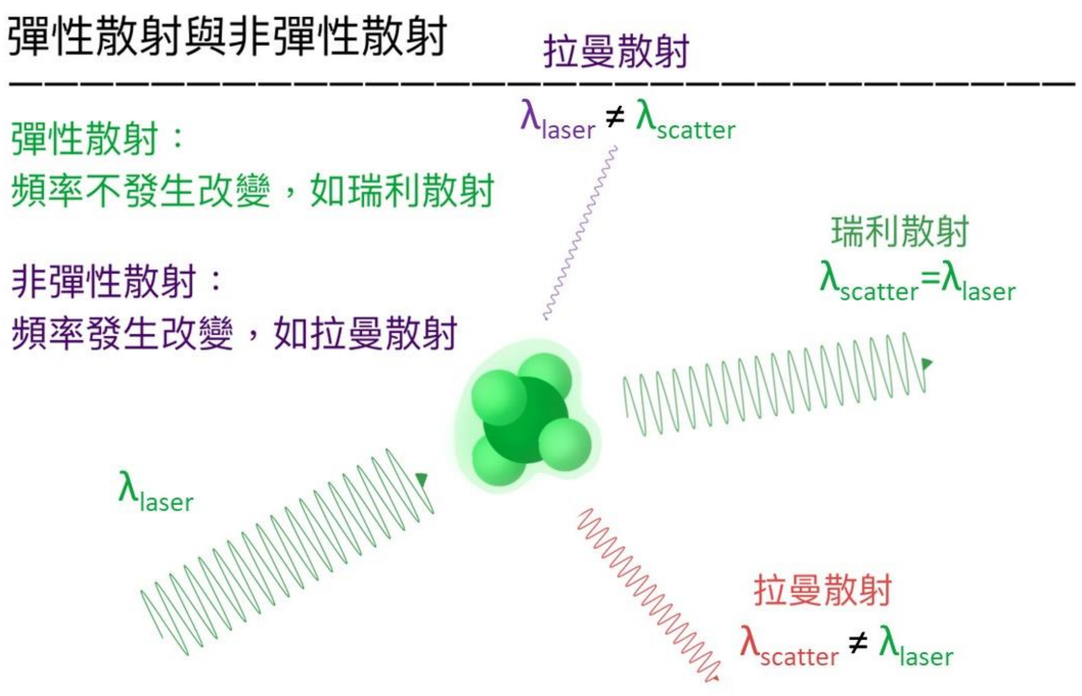


圖6 拉曼光譜原理示意圖
（作者1使用Procreate和GeoGebra繪製）

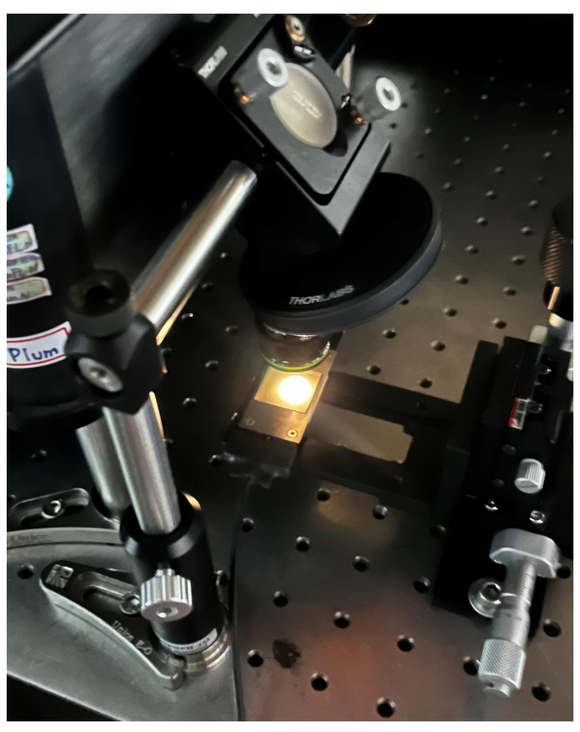


圖8 檢測植物葉片時調整焦距
（圖片由作者共同拍攝）

參、研究設備及器材

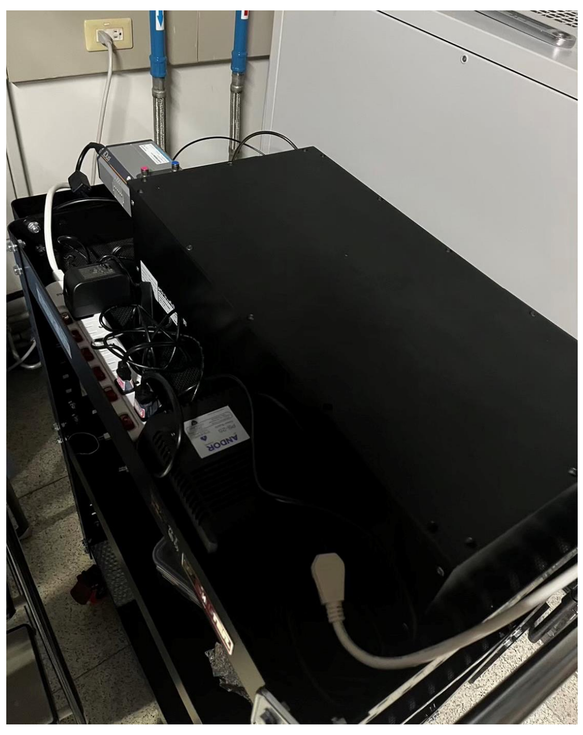


圖1 拉曼光譜儀
（圖片由作者共同拍攝）



圖2 拉曼光譜系統
（圖片由作者共同拍攝）



圖3 綠薄荷精油主要成分-香芹酮
（圖片由作者共同拍攝）

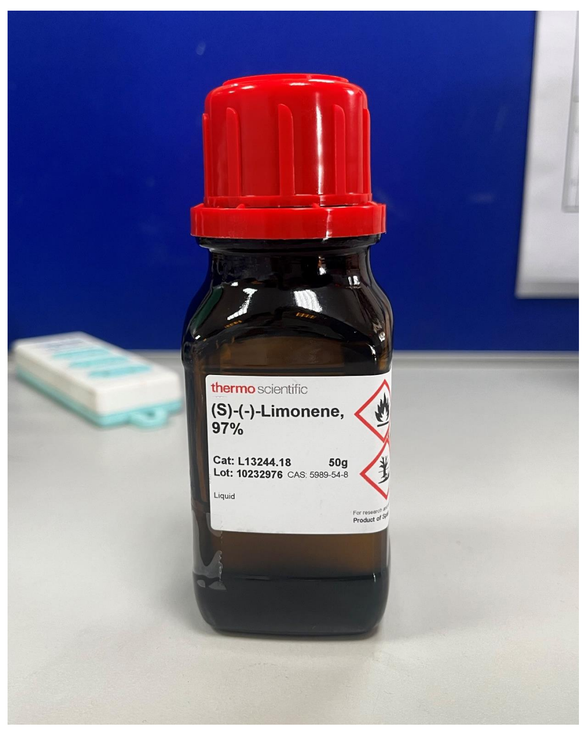


圖4 綠薄荷精油主要成分-檸檬烯
（圖片由作者共同拍攝）

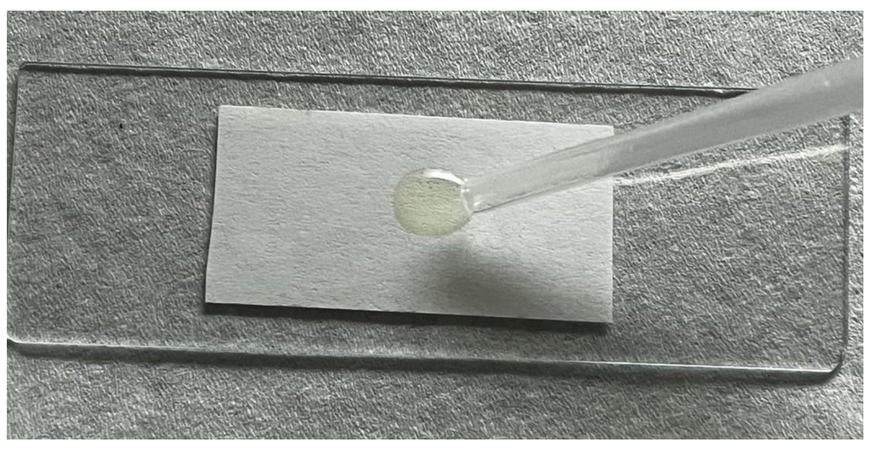


圖7 將精油滴在雙面膠光滑面

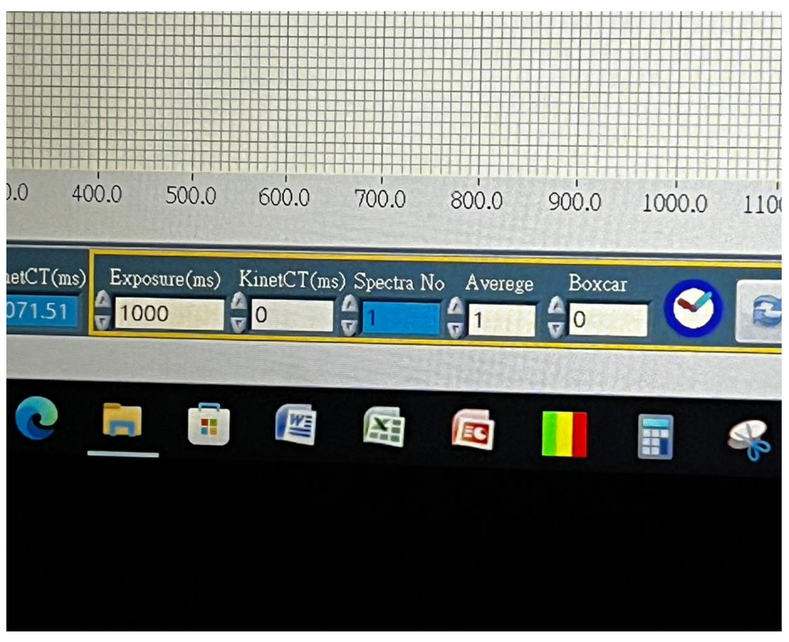


圖9 拉曼光譜檢測之參數調整
（圖片由作者共同拍攝）

(一)不同類型檢測樣品製備
　a.以玻璃槽個別盛裝香芹酮及檸檬烯兩項綠薄荷精油之純物質成分。
　b.用雙面膠將綠薄荷葉片、馬鞭草葉片黏貼在載玻片上方。
　c.將雙面膠黏貼在載玻片上，不撕下另一面而直接在上方以微量吸管或滴管滴上精油。(圖7)
(二)把樣品放到載物臺上
(三)設定雷射波長
(四)調整焦距以及雷射強度確保樣品不會被燒毀，並且足以產生拉曼訊號。(圖8)
(五)調整參數中的積分時間(exposure)、平均次數(average)以取得有較好訊雜比的數據。(圖9)
(六)獲取拉曼訊號數據後畫圖對比變化，並標註特徵峰。

伍、研究結果

一、綠薄荷葉面腺毛的觀察

透過顯微鏡測量以及文獻參考，發現綠薄荷腺毛在葉脈附近較容易觀察，且下表皮之密度大於上表皮。

(一)以顯微鏡觀察綠薄荷腺毛

（圖10、圖11由作者共同拍攝）

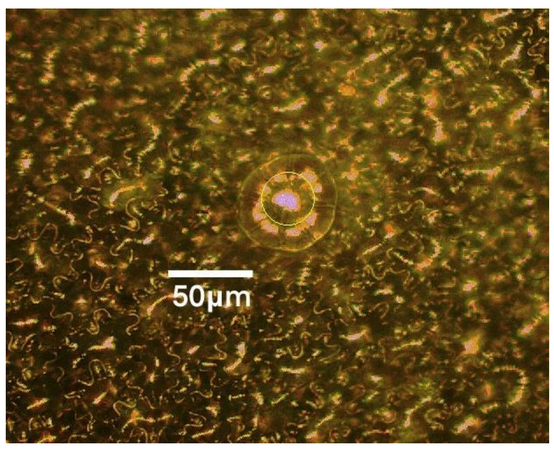


圖10 綠薄荷腺毛之大小和構造(比例尺50μm)

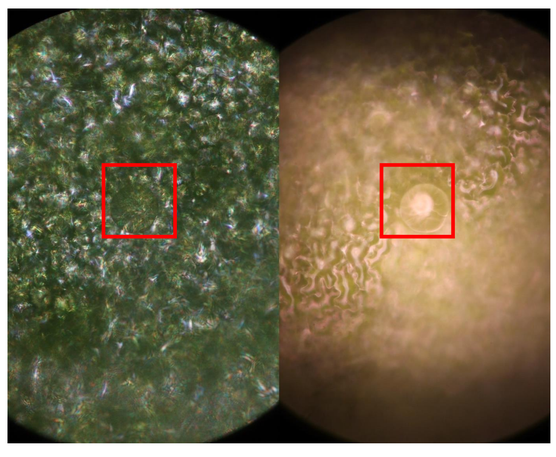


圖11 穿透式與反射式顯微鏡下的薄荷腺毛

(二)腺毛是立體的結構易產生清楚聚焦和模糊聚焦之差異（圖12、圖13由作者共同拍攝）

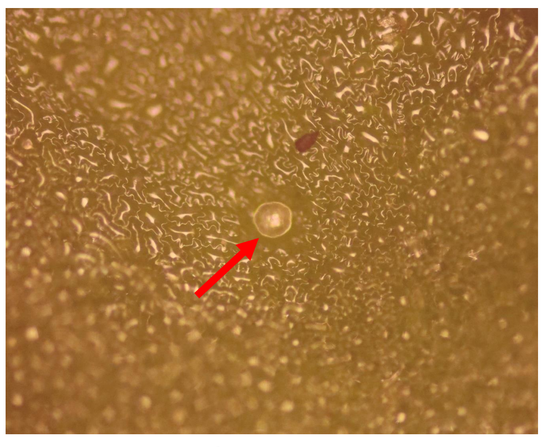


圖12 綠薄荷腺毛上表皮清楚介面

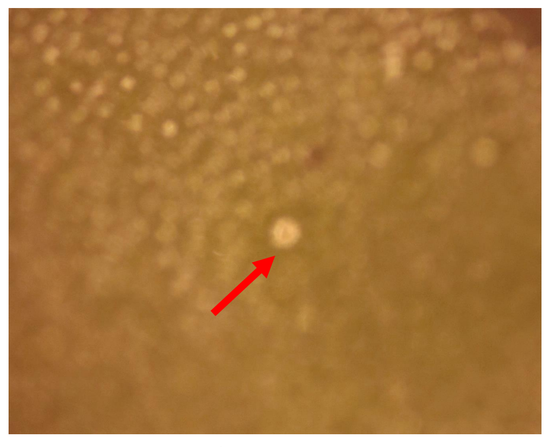


圖13 綠薄荷腺毛上表皮模糊介面

(三)顯微鏡觀察光照量不同的上表皮腺毛構造、大小

（圖14、圖15由作者和指導老師共同拍攝）

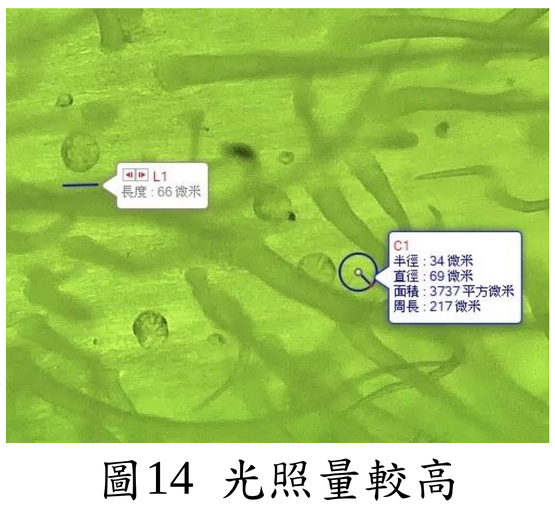


圖14 光照量較高上表皮腺毛



圖15 光照量較低上表皮腺毛

(四)顯微鏡觀察上下表皮腺毛密度之差異

（圖16、圖17由作者和指導老師共同拍攝）

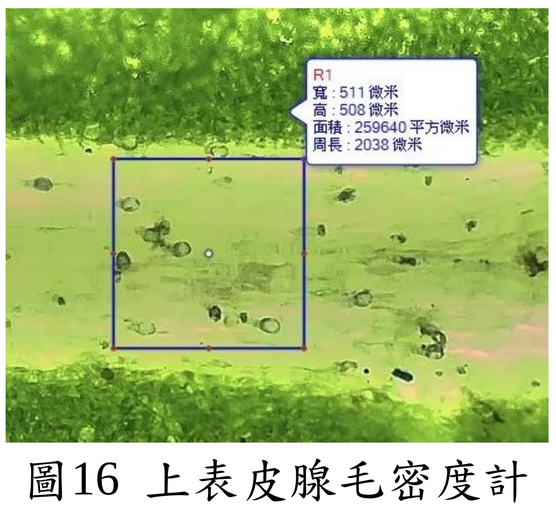


圖16 上表皮腺毛密度計算約40個/ mm^2

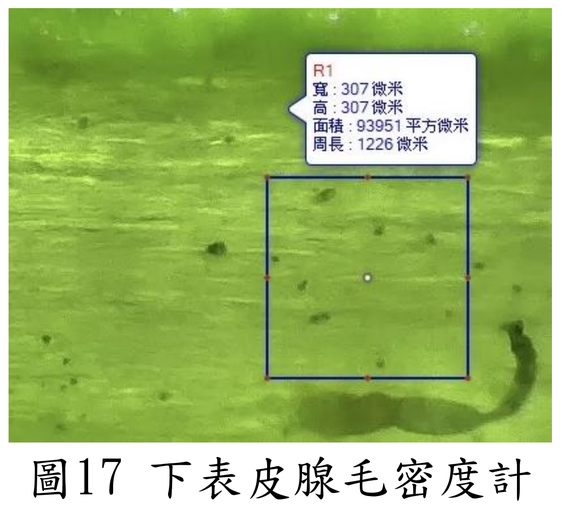


圖17 下表皮腺毛密度計算約78個/ mm^2

二、拉曼光譜即時檢測綠薄荷精油分泌狀況之探討

(一)不同雷射波長檢測綠薄荷精油純物質、腺毛、葉肉

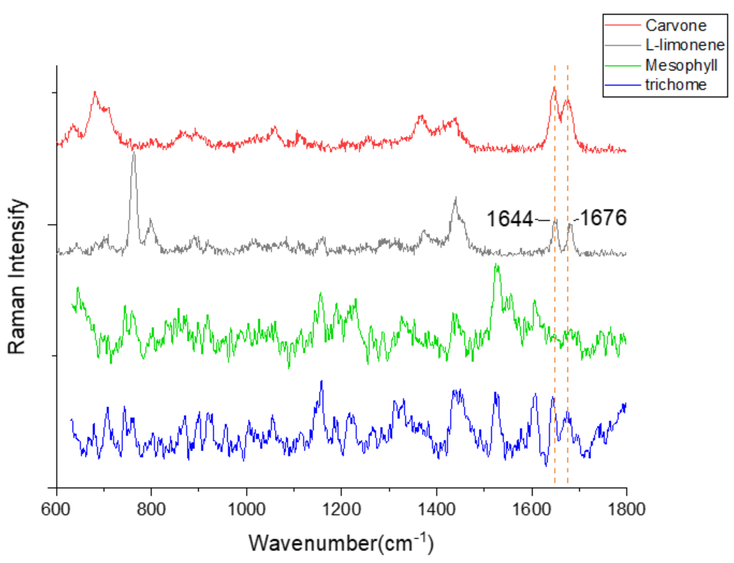


圖18 波長785nm拉曼光譜檢測（圖片由作者共同繪製）

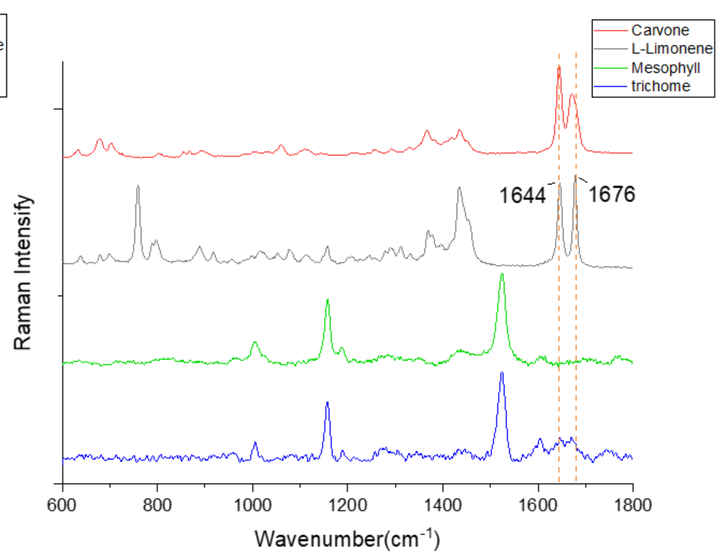


圖19 波長532nm拉曼光譜檢測（圖片由作者共同繪製）

圖18 使用雷射波長785nm檢測綠薄荷葉片腺毛、葉肉和精油內的純物質。在波數1644cm^{-1}和1676cm^{-1}處發現兩支對應的特徵峰，配合文獻了解它是由兩種純物質中的共同特殊官能基貢獻，故往後以此作為標的物。圖中可見腺毛出現了該訊號而葉肉則無。

圖19 使用雷射波長532nm檢測。對比785nm，其能量更強、訊雜比更好，同樣在波數1644cm^{-1}和1676cm^{-1}處發現了兩支共同特徵峰。

(二)雷射波長785nm檢測並且比較不同聚焦面之訊號

參考腺毛本身是立體圓球形狀，改變聚焦位置使雷射能夠更準確取得腺毛中精油的訊號，而避免使葉肉的訊號過強影響精油訊號的判斷。

原先聚焦在四周葉肉清楚且能夠清晰看見腺毛的外輪廓之處(圖21)，到將聚焦稍微遠離葉片直到周圍葉肉變得模糊卻仍可清晰看見腺毛表面的位置(圖22)，分別檢測了兩種情況的訊號，可見前者(focused)的兩支特徵峰十分不明顯，而後者(unfocused)使精油的特徵峰更加明顯容易判別。

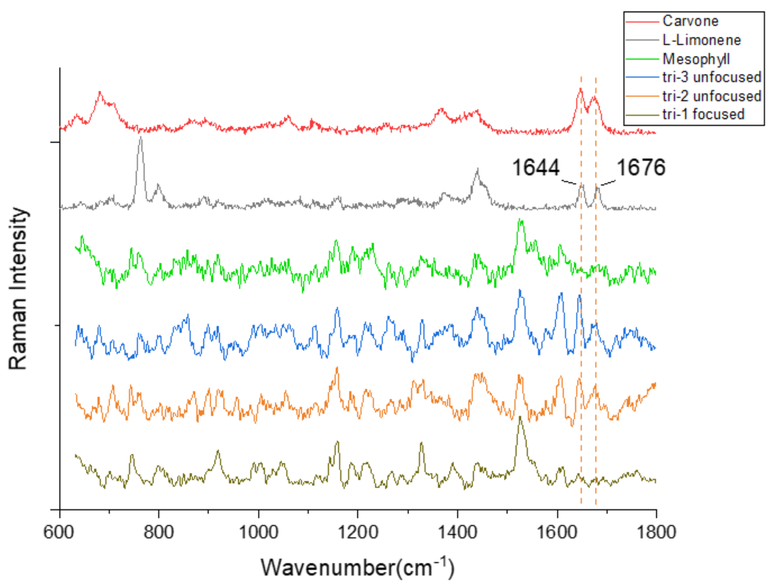


圖20 波長785nm拉曼光譜檢測不同聚焦面之訊號對比（圖片由作者共同繪製）

focused

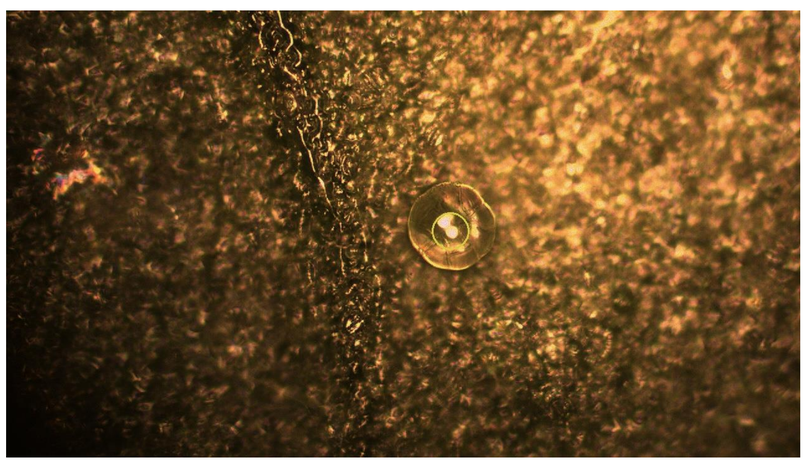


圖21 四周葉肉清楚且能夠看見腺毛外輪廓處(focused)（圖片由作者共同拍攝）

unfocused

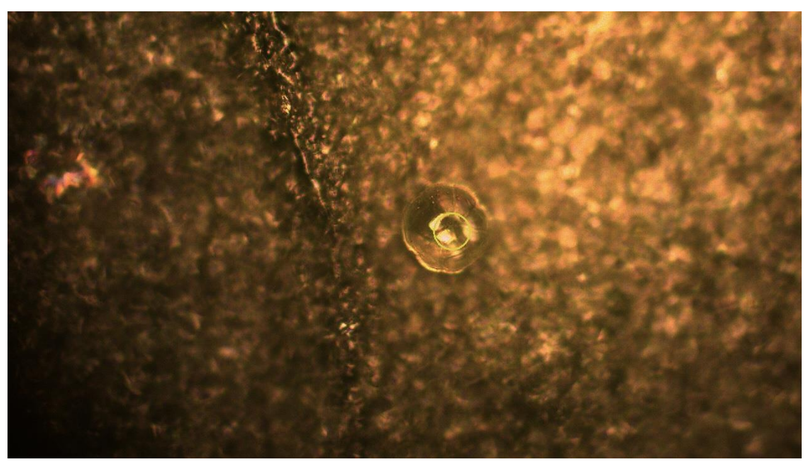


圖22 周圍葉肉模糊而腺毛表面清楚之處(unfocused)（圖片由作者共同拍攝）

三、拉曼光譜即時檢測植物組織精油分泌之通用性探討-以檸檬馬鞭草為例(圖23)

以拉曼光譜波長785nm檢測檸檬馬鞭草葉片、精油以及其純物質之一檸檬烯，由實驗證實拉曼光譜技術亦可通用於檸檬馬鞭草植物。

四、拉曼光譜檢測比較相關精油產品成分之探討-以百靈油和辣薄荷精油為例(圖24)

以拉曼光譜波長785nm檢測，可以發現百靈油和辣薄荷油之拉曼訊號重疊性極高，推斷其成分極其相似，證實拉曼光譜可以直接檢測精油成分。

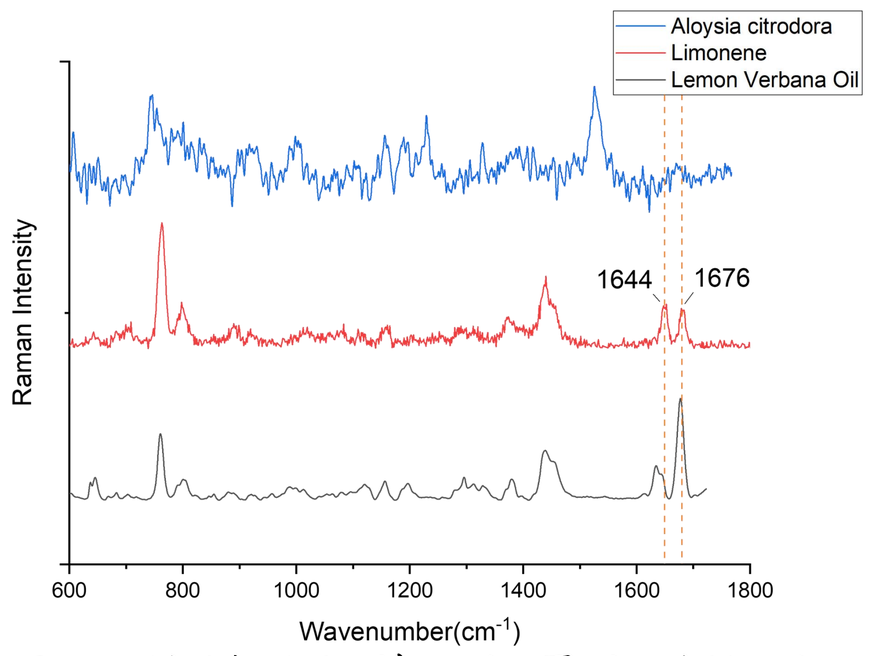


圖23 檸檬馬鞭草之拉曼光譜檢測
（圖片由作者共同繪製）

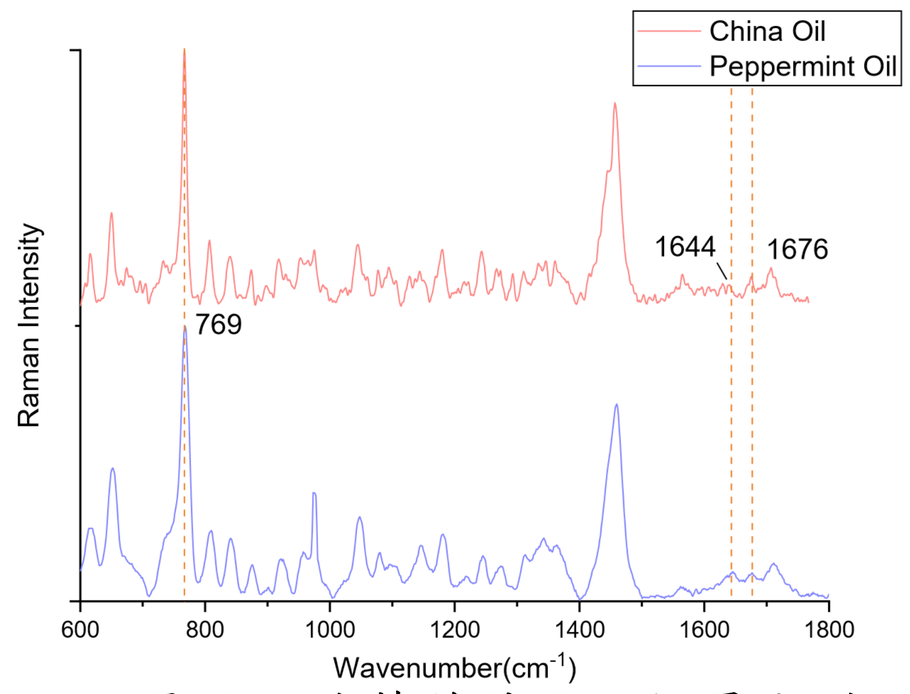


圖24 百靈油、辣薄荷精油之拉曼光譜檢測
（圖片由作者共同繪製）

陸、討論

一、發現腺毛分布並不如文獻中寫的主要分布在上表皮，而是下表皮的密度大於上表皮，推測可能因為精油成分具有揮發性，下表皮位置可以減少日照降低精油散逸損失。比較光照量高與光照量低的葉片，可以損現光照量高的葉片較厚較深刻皺摺且葉面毛狀觸感明顯，而光照量低之葉片較薄較淺皺摺且葉面毛狀觸感略低，因此可推測是日照量影響綠薄荷葉的生長發育。

（圖25-28 由作者和指導老師共同拍攝）



圖25 光照量較高之綠薄荷葉片



圖26 光照量較低之綠薄荷葉片

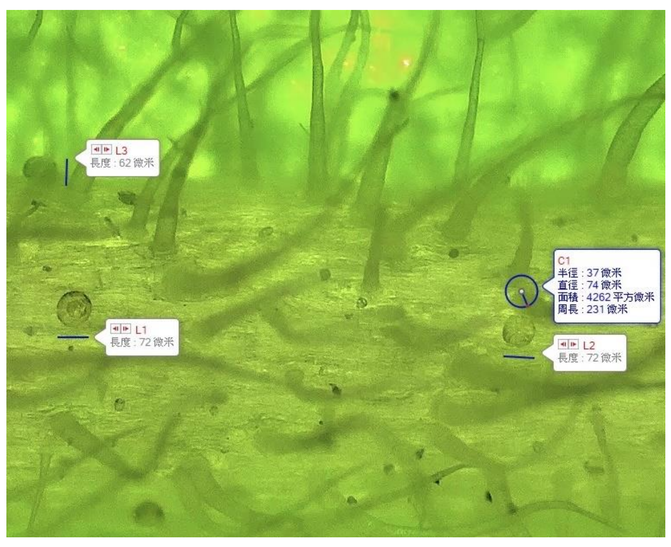


圖27 光照量較高之綠薄荷葉片下表皮腺毛

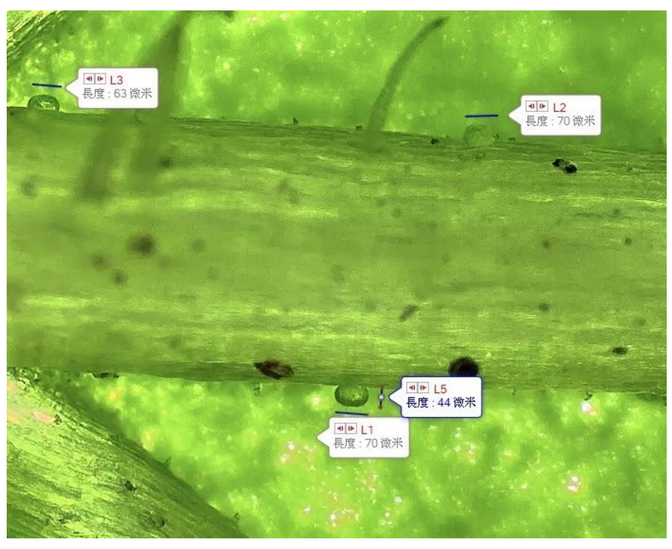


圖28 光照量較低之綠薄荷葉片下表皮腺毛

二、為了防止強度過大、曝光時間過長導致測量樣品被雷射光毀損，在參數的調整上我們使用timelapse來看強度、曝光時間的適性，利用連續取樣光譜上見到訊號的驟減來判斷。

三、為了使聚焦的區域可以覆蓋更大面積的精油囊，取得更清楚訊號的光譜圖，所以採用了較低倍率的10x物鏡。(圖29)

四、操作光譜檢測的過程並沒有理想中的順利，除了植物的生理狀況很難預估，植物組織也較容易受到雷射光破壞，所以需要不斷調整參數，除了注意timelapse的訊號驟減狀況，也必須隨時觀察植物組織的型態及顏色變化來判斷是否受雷射光毀損。(圖30、圖31)

圖29 中間的黃色圓圈為10x聚焦區域(圖片由作者共同拍攝)

圖30 綠薄荷精油囊正常狀態
（圖片由作者共同拍攝）

圖31 綠薄荷精油囊破裂狀態
（圖片由作者共同拍攝）

柒、結論

一、腺毛大小橫徑大約介於30至70微米(μm)。

二、腺毛產生及精油分泌會受到光照量差異影響。

三、下表皮腺毛較上表皮大型且密集。

四、拉曼光譜技術可以測量到綠薄荷腺毛中精油。

五、拉曼光譜技術亦適用於檸檬馬鞭草。

六、拉曼光譜檢測百靈油成分與辣薄荷精油成分的實驗，驗證以拉曼光譜檢測萃取精油成分的可行性。

七、在證驗並且標準化該技術的使用後，期望可直接以手持式拉曼光譜儀對待測的精油植物測量，協助確認精油是否處於最佳的收成時機，使該技術在農業上展現價值。

捌、參考文獻

Li, J., Wijesooriya, C. S., Burkhow S. J., Brown, L. K. B., Collet, B. Y., Greaves, J. A., and Smith, E. A.(2021). Measuring Plant Metabolite Abundance in Spearmint (*Mentha spicata* L.) with Raman Spectra to Determine Optimal Harvest Time. ACS Food Science & Technology 1 (6): 1023-1029.

Maffei, M., Bertea, C. M.,and Mucciarelli, M. (2007). Anatomy, physiology, biosynthesis, molecular biology, tissue culture and biotechnology of mint essential oil production. In: Mint. the genus Mentha (Chapter: 2) .Lawrence, B. M. Eds, CRC Press, pp.41-85.