

2022 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號	030006
參展科別	化學
作品名稱	分子拓印修飾磁性奈米粒子萃取福壽螺卵中蝦紅素之探討
得獎獎項	二等獎 義大利FAST正選代表 美國材料資訊協會獎
就讀學校	臺北市立建國高級中學
指導教師	張煥宗、廖家榮
作者姓名	吳道賢

關鍵詞 蝦紅素、分子拓印、福壽螺

作者簡介

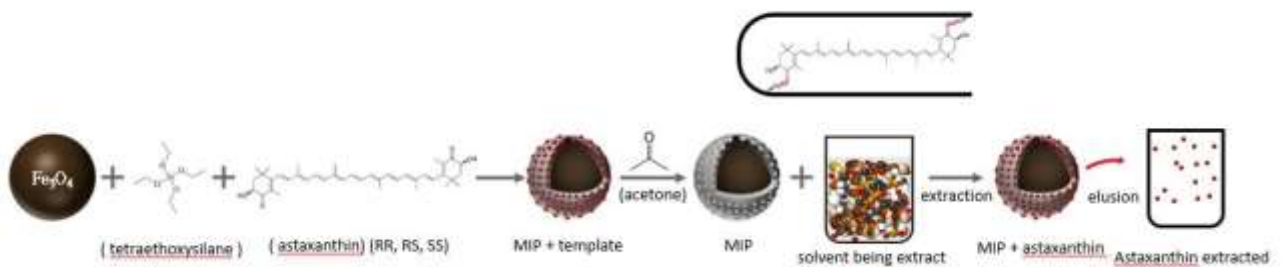


大家好，我是建中數理資優班的吳道賢。自幼就對世界充滿好奇，對科學的探索也很有熱情。高一時有機會進入建中數資班就讀，開始進入專題研究的旅程。想要研究應用科學。不只是純粹追求理論極限，而是將學術成果應用於生活中，讓更多人能夠分享科學的研究成果，造福社會。這次能參加國際科展擴展視野，與同好互相切磋學習，最感謝一路上有許多師長的提攜和指導，讓我收穫很多。我也會把握這的難得的機會，全力以赴。

摘要

本研究以二氧化鐵和三氯化鐵所合成之磁性奈米粒子為基底，包覆上以蝦紅素為模板修飾的二氧化矽，製作出具有蝦紅素專一性的磁性奈米粒子，應用於萃取福壽螺卵中之蝦紅素。

利用干擾物證明磁性奈米萃取粒子具有蝦紅素的專一性，再探討奈米粒子合成及萃取條件的影響。福壽螺卵經過打碎離心後，依序加入 0.2 M 氫氧化鈉及 1 mM 十二烷基硫酸鈉，使蝦紅素水解並去脫去蛋白質轉換為游離態。當模板濃度為 0.059 mg/mL、TEOS 濃度為 1.892 mg/mL 和蝦紅素的濃度為 0.07 mg/mL 時，會有最佳的萃取率達 60.7 %。此磁性奈米粒子在萃取步驟後，再以丙酮進行脫附，至少重複使用 3 次。此技術可減少福壽螺的農害，也極具經濟價值，很值得研究。

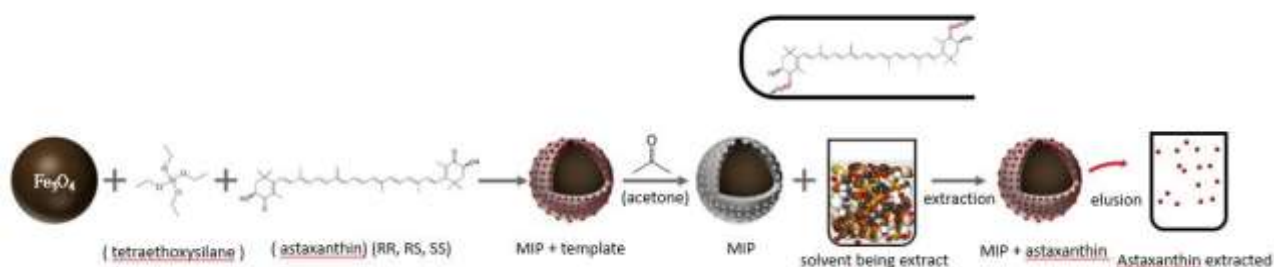


Abstract

The aim of this study is to create an effective method to extract astaxanthin out from the Channeled apple snail (*Pomacea canaliculata*).

In this study, we developed Fe₃O₄ magnetic nanoparticle (MNP) coated with astaxanthin-imprinted SiO₂ (MIP) and extracted astaxanthin from channeled apple snail's (*Pomacea canaliculata*) egg. We proved the extraction specificity using the interfering substance. The optimized extraction efficiency is 60.7 % in the conditions of 0.059 mg/mL template, 1.892 mg/mL TEOS, and 0.07 mg/mL astaxanthin. Astaxanthin was separated from snail eggs via grinding and centrifugation in ethanol. The snail eggs solution then goes through a two-step treatment of 0.2 M NaOH and 1 mM SDS sequentially to hydrolysis and release astaxanthin from protein and lipid. Finally, the solution was extracted by Fe₃O₄@SiO₂ MIP with a surprisingly high 60.7% extraction efficiency and can be reactivated by acetone for at least 3 times. Furthermore, the extracted substance was also analyzed by HPLC and LC - MS / MS and was confirmed to be Astaxanthin.

By extracting astaxanthin out from Channeled apple snail egg can not only solve the ecological problem but also produce substance that is beneficial to human which kill two birds with one stone.



壹、前言

一、研究動機

蝦紅素(Astaxanthin)因為其優異的抗氧化能力而被運用在許多領域中，其中包含抗老、抗氧化等多種產品(Anderson 2005)以及水產養殖業的所使用的魚體增色劑(Samori et al. 2019)等，具有高達每公斤 2500~7000 美元的經濟價值。先前的研究顯示，蝦紅素具有減輕氧化壓力、抗發炎、增強免疫力等功效(Jyonouchi et al. 2000; Diao et al. 2019)，其藉由刺激免疫系統以達到增強自然殺手細胞毒性的目的，同時增加了 T 細胞和 B 細胞的數目(Park et al. 2010)。整體而言，蝦紅素對於人體的抗氧化以及免疫力增強有顯著的益處。

早年由業者引進的福壽螺，對台灣稻田的生態造成嚴重的破壞，所導致的巨大農業經濟損失，早已無法估計。過去所採用的許多防治方法，多半是針對福壽螺的成體來做防治(Wada et al. 2004; Karraker and Dudgeon 2014; Yusa, Sugiura, and Wada 2006; Su Sin 2006)，而關於福壽螺卵則是鮮少被研究。由於每公克福壽螺卵含有 72×10^{-9} 莫爾的蝦紅素，若能將蝦紅素從福壽螺卵中萃取出來，除了可以減少福壽螺對於生態環境的危害和經濟的損失外，更能將其轉化成經濟利益，也對人類的健康有所幫助，是很值得研究開發的。

在過去的研究，「分子拓印二氧化矽奈米粒子」是常被運用在「管柱層析」中的專一性管柱填充物，於是有了將「分子拓印粒子」應用在進行「專一性萃取」的想法；同時學校老師也介紹過「磁性奈米粒子」，於是讓我有利用「磁性」來控制奈米粒子的發想，所以想將兩者結合應用在蝦紅素萃取的研究。

二、研究目的

- (一)、 萃取粒子專一性的驗證
- (二)、 探討合成條件對蝦紅素標準品萃取率之影響
- (三)、 探討萃取條件對蝦紅素標準品萃取率之影響
- (四)、 探討萃取穩定性
- (五)、 初步萃取福壽螺卵中的蝦紅素並定量
- (六)、 探討前處理手法對於真實樣品萃取率的影響

三、研究原理

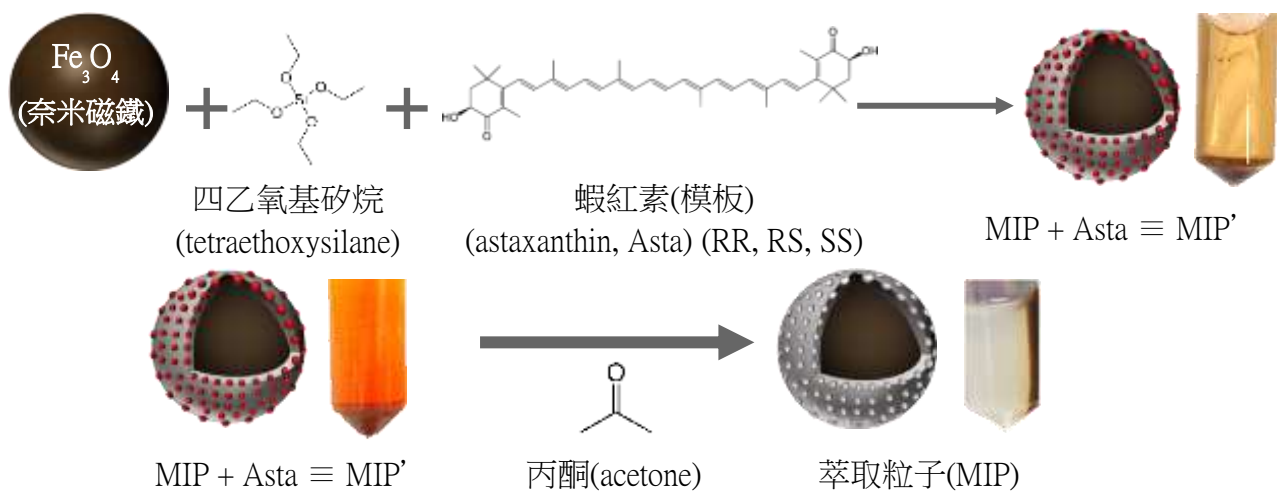
本研究以奈米磁鐵(Fe_3O_4)為基底，將二氧化矽(SiO_2)包覆在上面，在形成二氧化矽殼層時加入蝦紅素(Astaxanthin)，使用「分子拓印技術」將蝦紅素拓印在二氧化矽表面後，再使用丙酮移除來蝦紅素，來當成「拓印模板」。在二氧化矽表面拓印蝦紅素的特異性結合位，使其形成具蝦紅素專一性的「分子拓印奈米粒子」(Molecular Imprinted Nanoparticle, MIP)，再以此奈米粒子來進行福壽螺卵中蝦紅素的固相萃取。在萃取步驟完成後，使用 UV-vis 吸收儀來測量溶液在特定波長(478nm)的吸收值，利用檢量線於適當範圍內轉換成濃度，並且計算萃取前後蝦紅素的重量，以萃取率(萃取後總重/萃取前總重)為標準，來分析各變因對於萃取率的影響，以找出最佳的奈米粒子合成條件，及最佳的蝦紅素的萃取條件。

(一)、磁性奈米粒子與二氧化矽殼層

近年來奈米磁鐵(Fe_3O_4)因其磁性和奈米等級材料的特點，被廣泛應用在各種領域。二氧化矽則有助於避免持續氧化與維持分散狀態的特性，並且具有優異的生物活性、穩定性，可應用於拓印、表面修飾等進階的應用。本研究以二氯化鐵(ferrous chloride, FeCl_2)和三氯化鐵(ferric chloride, FeCl_3)，在氨水(ammonia hydroxide $\text{NH}_3\text{H}_2\text{O}$)的環境下合成「奈米磁鐵」，並以四乙氧基矽烷(tetraethoxysilane, TEOS)為前驅物，在氨水的催化下於奈米磁鐵表面形成二氧化矽。

(二)、分子拓印技術

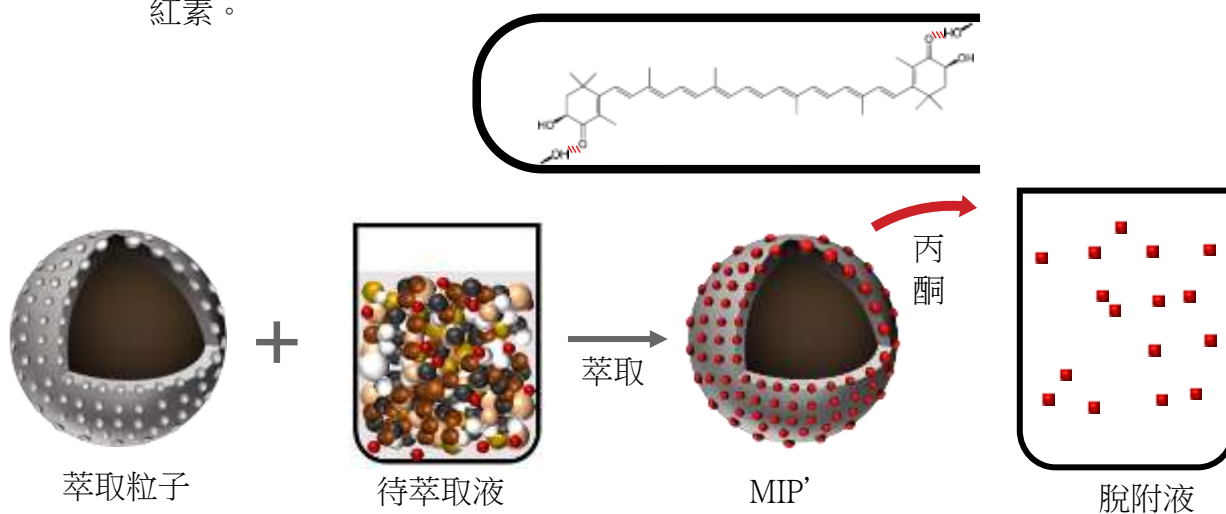
「分子模版拓印技術」已經迅速發展，用來創造新的辨識材料，常應用在管柱層析法中的固定相材料、選擇性催化的觸媒、感測材料…等領域。分子拓印聚合物可設計針對單一物質具有獨特的親和力，藉由此特性來達到「專一性萃取」的目的。本研究以蝦紅素為拓印模板，在二氧化矽單體聚合時參與反應，使二氧化矽上具有蝦紅素的專一性結合位，完成拓印後再利用丙酮清洗移除拓印模板，即可得到萃取粒子。



(圖一，萃取粒子合成流程)

(三)、固相萃取原理

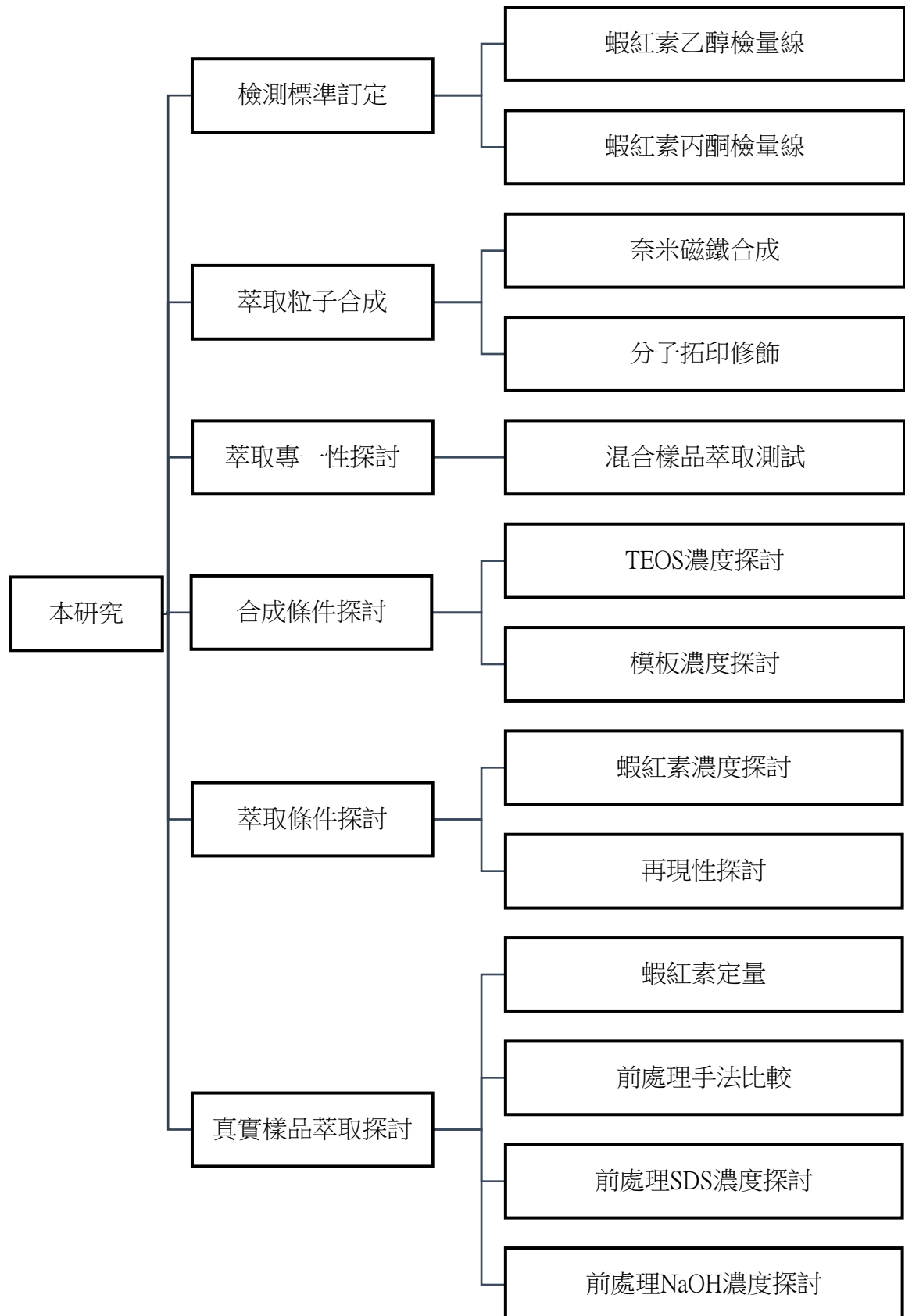
將萃取粒子置入福壽螺卵的初萃取液中，經過一段時間的混合與擾動，福壽螺卵中的蝦紅素會因為專一性結合位與萃取粒子上特定位置之羥基形成氫鍵吸附在萃取粒子上，再透過磁力來移除萃取粒子，並且利用丙酮將蝦紅素脫附，即可得到蝦紅素。



(圖二，蝦紅素萃取流程)

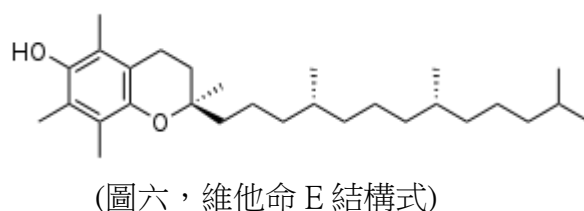
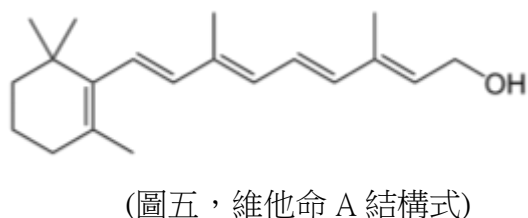
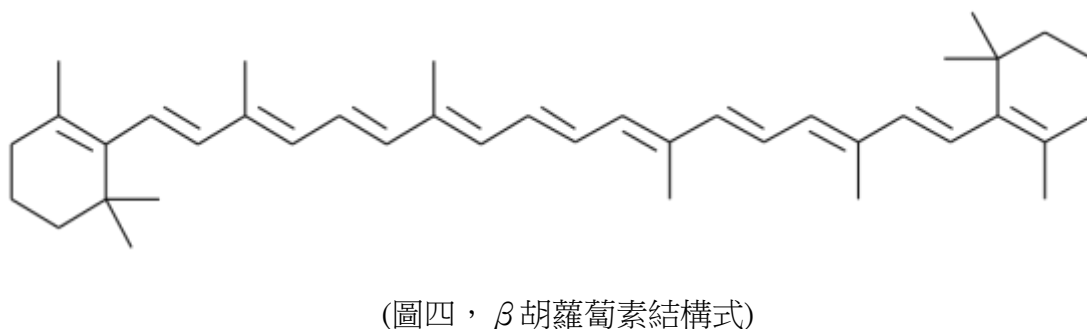
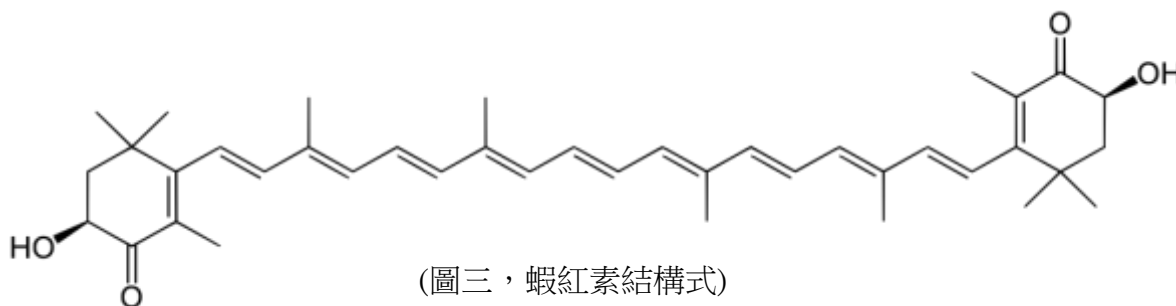
貳、研究方法與過程

一、 研究流程



二、 研究藥品

蝦紅素(astaxanthin) (圖三)、 β 胡蘿蔔素(β -carotene) (圖四)、維他命 A(Vitamin-A) (圖五)、維他命 E(Vitamin-E) (圖六)、乙醇(ethanol, EtOH)、二氯化鐵(ferrous chloride, FeCl₂)、三氯化鐵(ferric chloride FeCl₃)、氨水(ammonia hydroxide NH₃H₂O)、四乙氧基矽烷(tetraethoxysilane ,TEOS)、丙酮(acetone)、十二烷基磺酸鈉(sodium dodecyl sulfonate, SDS)、氫氧化鈉(sodium hydroxide)、磷酸(phosphoric acid, H₃PO₄)。



三、 研究方法與步驟

*每項實驗項目以粗體標示

(一) 蝦紅素乙醇溶液檢量線訂定

1. 秤量 1mg 蝦紅素粉末置於 2 mL 的微量離心管。
2. 加入 1000 μ L 的 99.5% 乙醇進入微量離心管並且使用超音波震盪至固體均勻分散。
3. 從微量離心管中取出混和液置入樣本瓶中，再加入 9000 μ L 的 99.5% 乙醇，即為 0.1 mg/mL 蝦紅素乙醇溶液標準品。
4. 以乙醇稀釋 0.1 mg/mL 蝦紅素乙醇溶液標準品，使濃度為 100、50、25、12.5、6.25、3.13、1.56、0.78 μ g/mL。
5. 依序將上述八溶液加入石英測光皿，用 UV-vis 吸收儀測量其吸收值。
6. 繪製吸收值-濃度圖，取適當線性範圍製作轉換方程式。

(二) 蝦紅素丙酮溶液檢量線訂定

1. 秤量 1mg 蝦紅素粉末置於 2 mL 的微量離心管。
2. 加入 1000 μ L 的 99.5% 丙酮進入微量離心管並且使用超音波震盪至固體均勻分散。
3. 從微量離心管中取出混和液置入樣本瓶中，再加入 9000 μ L 的 99.5% 丙酮，即為 0.1 mg/mL 蝦紅素丙酮溶液標準品。
4. 以丙酮稀釋 0.1 mg/mL 蝦紅素丙酮溶液標準品，使濃度為 100、50、25、12.5、6.25、3.13、1.56、0.78 μ g/mL。
5. 依序將上述八溶液加入石英測光皿，用 UV-vis 吸收儀測量其吸收值。
6. 繪製吸收值-濃度圖，取適當線性範圍製作轉換方程式。

(三) 奈米磁鐵合成與分子拓印修飾

1. 將 15 mL 的無氧去離子水加入 250mL 的燒杯，水浴至 75°C。
2. 加入 0.634 克 FeCl₃、0.254 克 FeCl₂、攪拌子，以 360 rpm 維持 75°C 反應 25 分鐘。
3. 加入 0.12 克的 SDS，再反應 50 分鐘。
4. 將銻磁鐵吸在瓶底，倒出不具磁性之粒子，加入適量去離子水，清洗重複 3 次。
5. 加入 96mL 去離子水，超音波震盪後即為奈米磁鐵懸浮液。
6. 將蝦紅素乙醇溶液標準品 700 μL、乙醇 260 μL、奈米磁鐵懸浮液 192 μL、30 μL 氨水、9.6 μL TEOS 加入 2 mL 微量離心管並使用超音波震盪器混和均勻。
7. 置於搖擺振盪器反應 8 小時。
8. 將強力磁鐵吸附在微量離心管壁旁，使磁性粒子聚集，並移除其他液體。
9. 加入 1mL 丙酮，均勻搖晃後將強力磁鐵吸附在微量離心管壁旁，使磁性粒子聚集，並移除其他液體，重複三次。
10. 加入 1mL 乙醇，均勻搖晃後將強力磁鐵吸附在微量離心管壁旁，使磁性粒子聚集，並移除其他液體，重複兩次。

註：合成條件探討為改變此階段之 TEOS 和拓印模板(蝦紅素)之濃度

(四) 萃取率測試

1. 加入待萃取液，超音波震盪使其與萃取粒子均勻混合。
2. 放上搖擺震盪器搖晃，持續適當時間。
3. 將磁鐵吸附在管壁，移除剩餘液體。
4. 加入丙酮，超音波震盪使其均勻混合。
5. 將磁鐵吸附在管壁，移除剩餘液體，測量其 UV-vis ($\lambda = 476\text{nm}$) 吸收值。
6. 將吸收值透過檢量線換算成濃度，計算脫附總重，重複此步驟直到剩餘液體無色。
7. 計算萃取率，萃取率 = $\frac{\text{脫附出的質量}}{\text{加入萃取的質量}}$

註：萃取專一性探討為改變此階段之待萃取液種類，萃取條件探討為改變此階段之待萃取液濃度。

(五) 福壽螺卵採集與初萃取液置備

1. 至石門嵩山社區(253 新北市石門區北 19 鄉道)梯田間採集(如圖七)採集。



(圖七，分布在稻桿上的福壽螺卵塊)



(圖八，福壽螺卵塊與乙醇置於離心管中)

2. 用無粉乳膠套和乾淨塑膠袋採集，採集後立即放入冰庫保存備用。
3. 取適量冷藏之福壽螺卵塊約 40 克加入 50 毫升離心管，加入乙醇直到液面達 30mL 後，用力震盪使卵殼破裂(如圖八)。
4. 使用乙醇調整重量後離心 3000g(加速度)、10 分鐘，使固體沉澱(如圖九)，抽出上清液，即為初萃取液(如圖十)，保存備用。



(圖九，離心後並移除上清液所留下的沉澱物)



(圖十，福壽螺卵初萃取液)

(六) 蝦紅素定量-回收率檢測

1. 取 1mL 初萃取液測量 UV-vis ($\lambda = 476\text{nm}$)吸收值，並利用蝦紅素乙醇溶液檢量線換算出初萃取液中蝦紅素的大約濃度($W_0 \text{mg/mL}$)。
2. 將初萃取液均分成兩份，第一份加入等體積的乙醇稀釋，稀釋成濃度 $W_0 / 2 \text{mg/mL}$ ；第二份加入等體積、等濃度($W_0 \text{mg/mL}$)的蝦紅素乙醇溶液標準品，使蝦紅素總濃度維持不變($W_0 \text{mg/mL}$)。
3. 分別測量兩份溶液 UV-vis($\lambda = 476\text{nm}$)的吸收值，再利用蝦紅素乙醇溶液檢量線換算出濃度，定義第一份的溶液濃度為($W_a \text{mg/mL}$)、第二份溶液濃度為($W_b \text{mg/mL}$)。
4. 計算回收率：回收率 = $\frac{W_a - W_b}{W_0}$ ，理論回收率應為 100%，80-120%為接受範圍，若超出或不足則代表溶液背景會干擾測量，需使用標準添加法來定量。

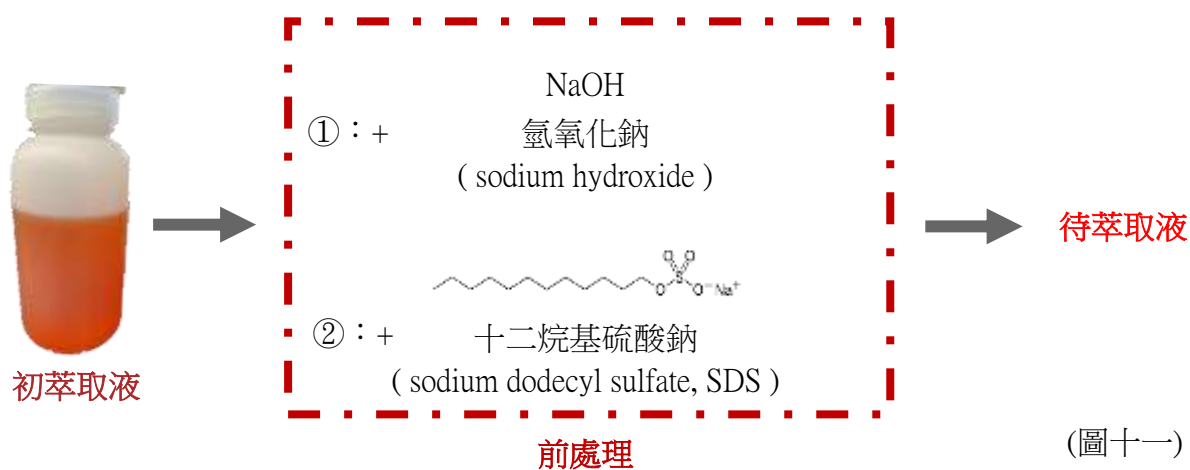
(七) 蝦紅素定量-標準添加法

1. 取 1.5mL 初萃取液，測量其 UV-vis ($\lambda = 476\text{nm}$) 的吸收值，並且利用蝦紅素乙醇溶液檢量線大約換算，可得知初萃取液中蝦紅素的濃度。
2. 將此初萃取液分成三組(每組 0.5mL)，分別加入一、二、三倍濃度的蝦紅素乙醇標準品 (體積 0.5mL)，並測量其 UV-vis ($\lambda = 476\text{nm}$) 的吸收值。作吸收值-濃度圖，並利用回歸線的截距計算初萃取液中蝦紅素的濃度。

(八) 初萃取液前處理

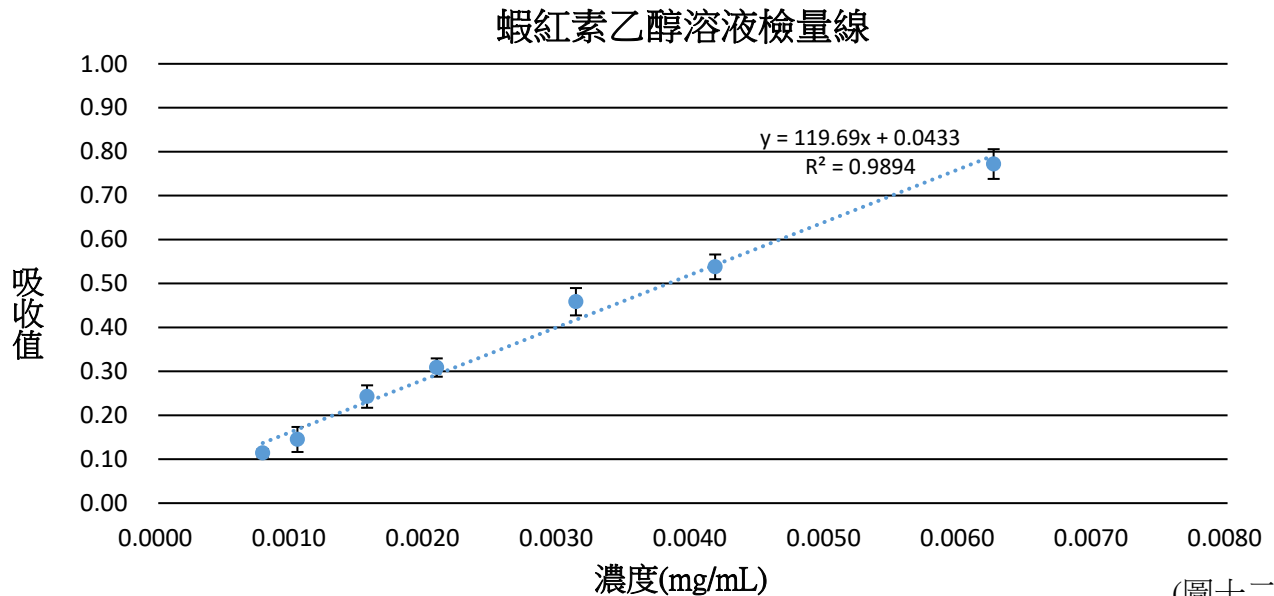
1. 取 1mL 初萃取液置於 2mL 至於微量離心管中，加入 NaOH 使其濃度達 0.02M，反應 8 小時後再加入 H_3PO_4 使其 pH 值回到 7。
2. 加入 SDS 使其濃度達 1mM，反應 8 小時後即完成前處理。

註：真實樣品萃取探討為改變此階段之 NaOH 和 SDS



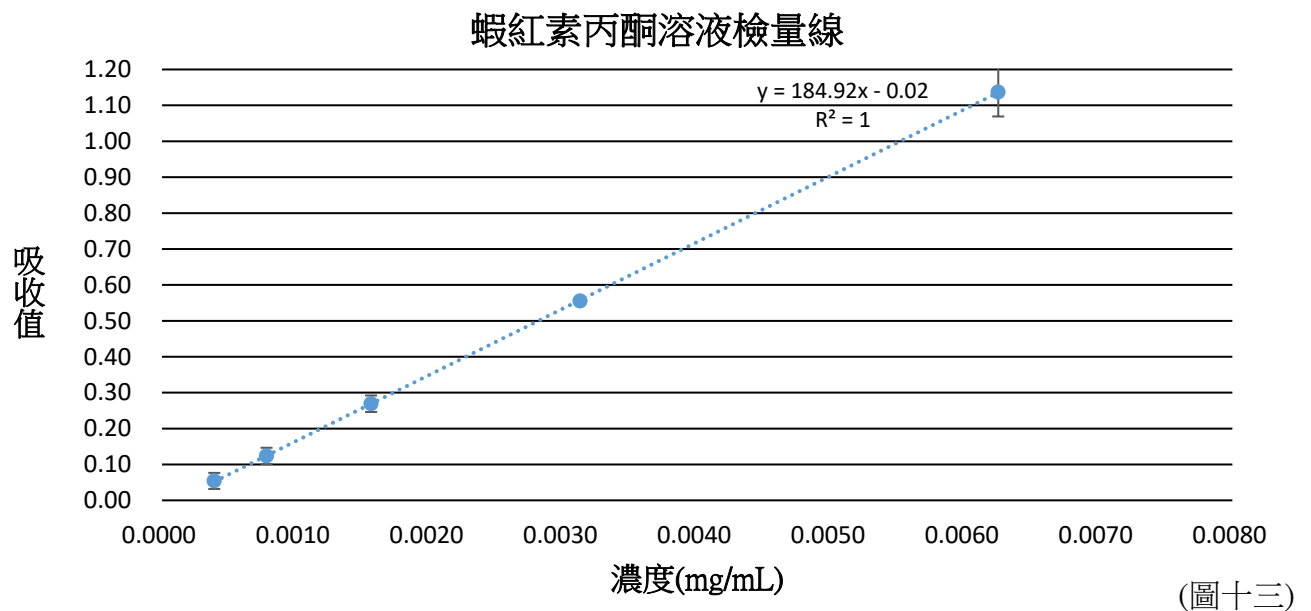
參、研究結果與討論

一、蝦紅素乙醇溶液檢量線



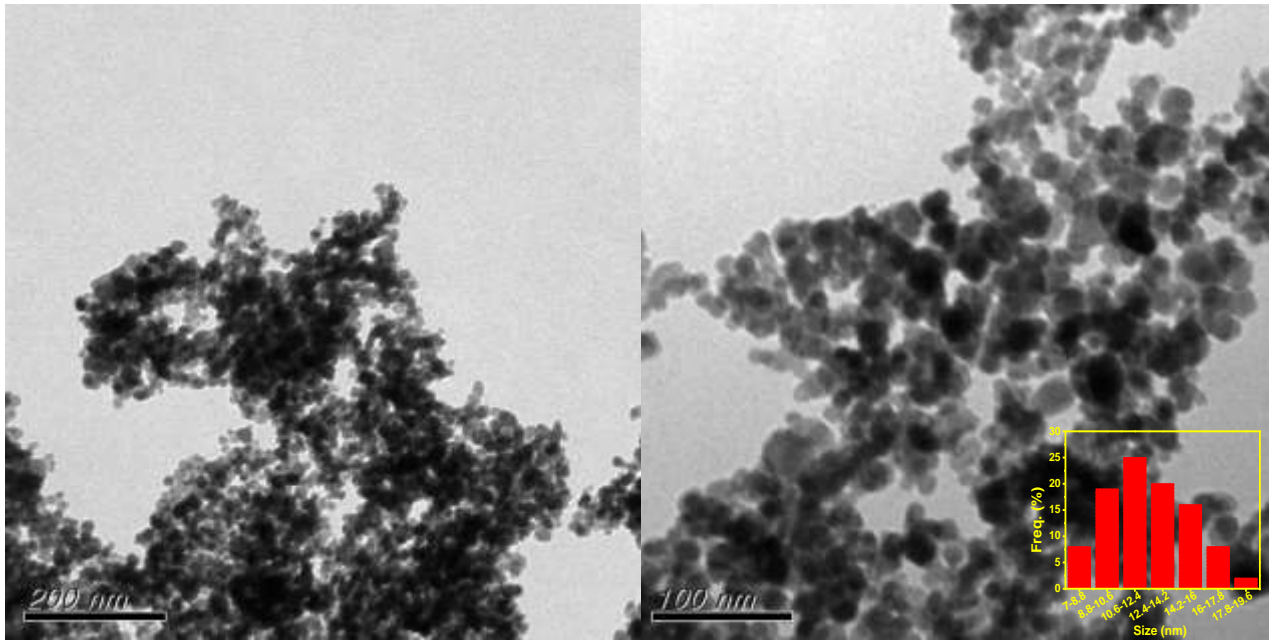
每個數據點皆配製三組溶液並且分別進行測量，經線性回歸， $R^2 = 0.9894$ 。

二、蝦紅素丙酮溶液檢量線



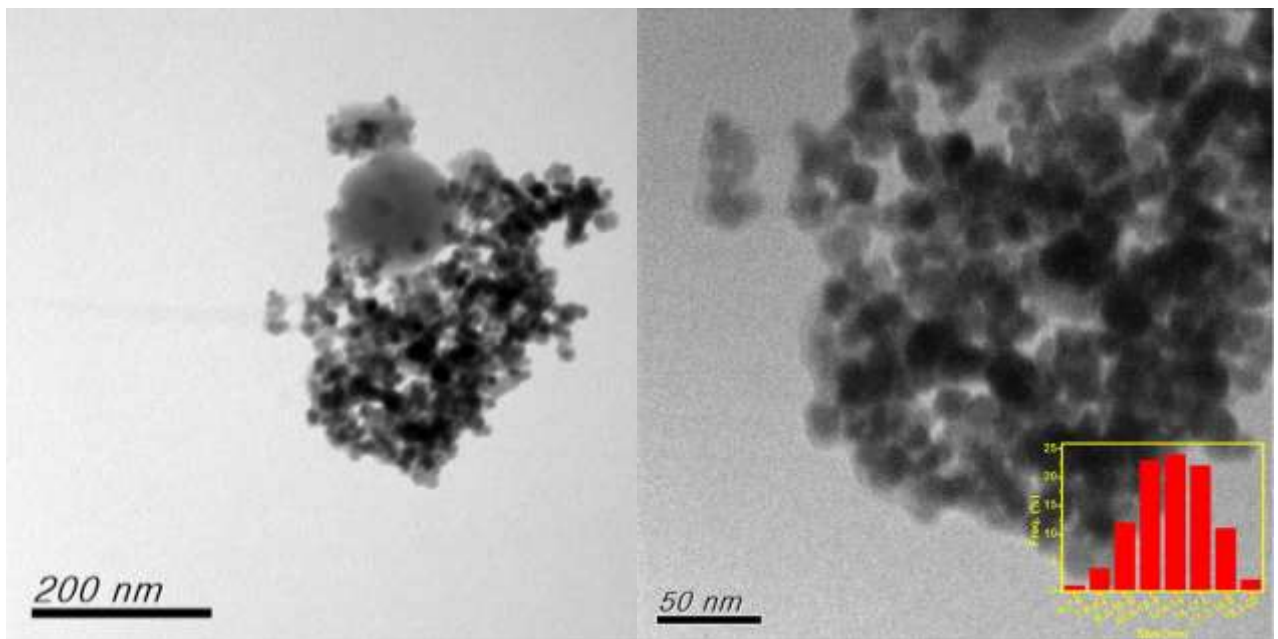
每個數據點皆配製三組溶液並且分別進行測量，經線性回歸， $R^2 = 1.0000$ 。

三、奈米磁鐵合成與分子拓印修飾



(圖十四，奈米磁鐵)

透過二氧化鐵以及三氧化鐵在鹼性環境下所合成之球型奈米磁鐵粒子，其粒徑為 12.56 ± 2.56 nm。



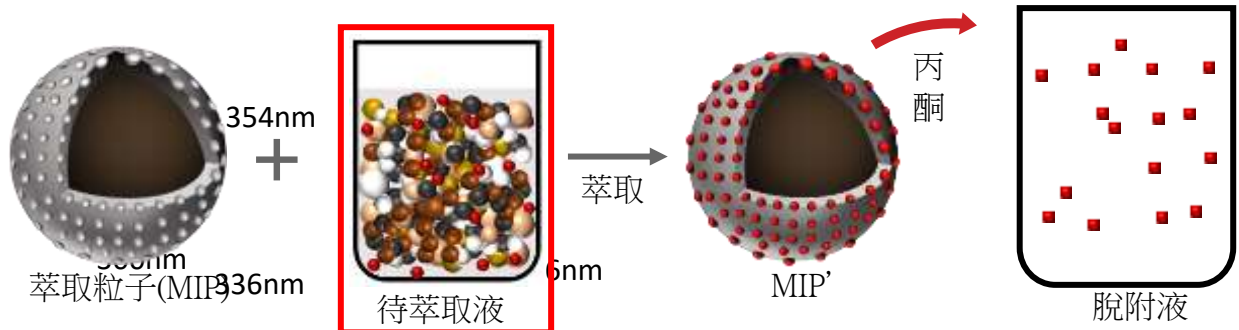
(圖十五，包覆二氧化矽之奈米磁鐵)

在氨水的催化下，TEOS 包覆在奈米磁鐵上形成二氧化矽，所形成之球型萃取粒子粒徑為 13.42 ± 2.80 nm。

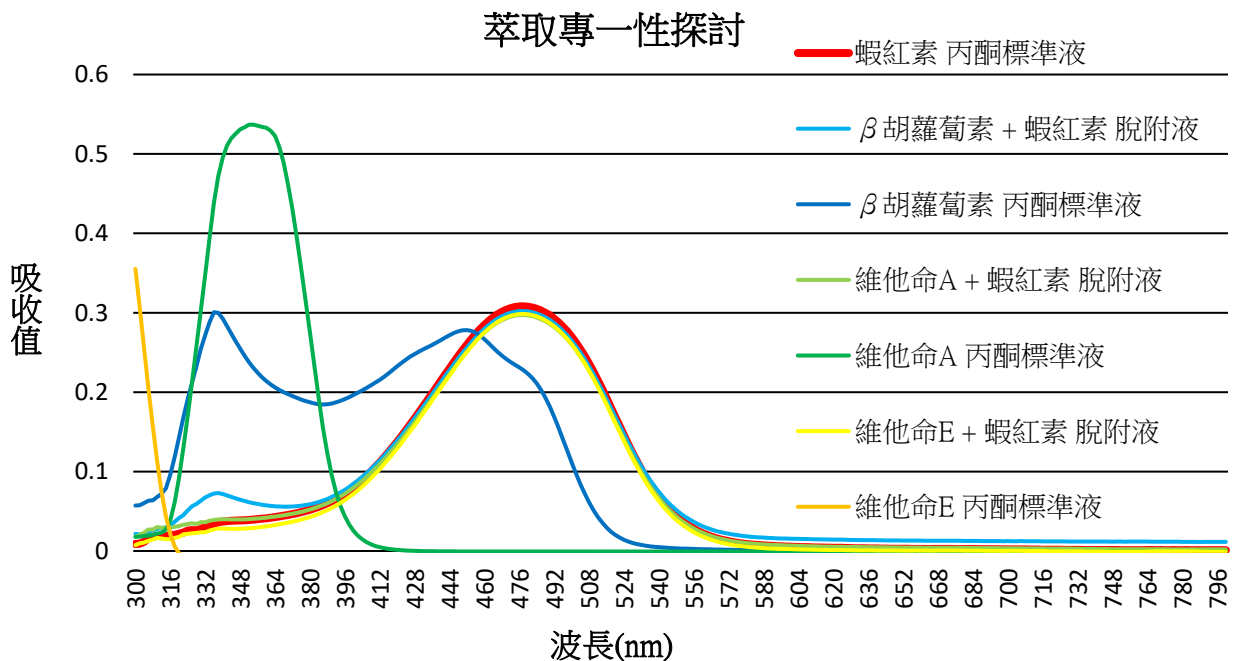
四、萃取專一性探討

(控制變因：材料合成方法、待萃取液濃度)

在相同條件下，改變加入待萃取液中相似結構的干擾物質，並測量脫附液之吸收光譜，觀察干擾物質對於萃取蝦紅素專一性的影響。



(圖十六)



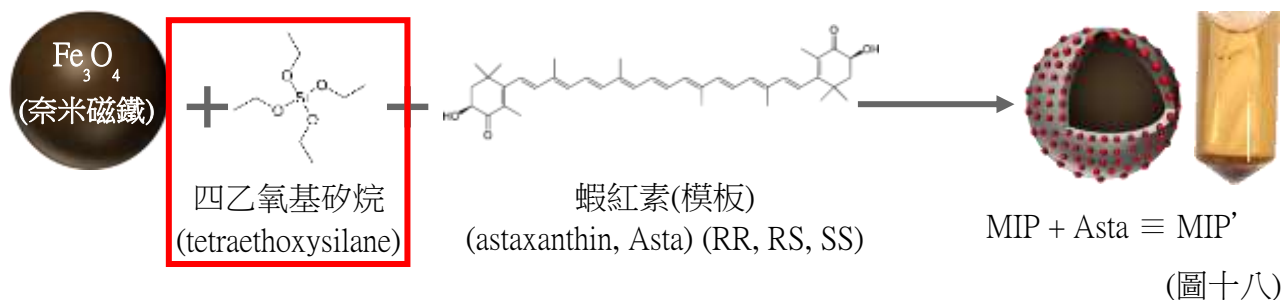
(圖十七)

結果與討論：深藍色線 (β 胡蘿蔔素，特徵波長 336nm)、深綠色線 (維他命 A，特徵波長 354nm)、深黃色線 (維他命 E，特徵波長 300nm)、紅色線 (蝦紅素，特徵波長 476nm)。在干擾物 (β 胡蘿蔔素、維他命 A、維他命 E) 與蝦紅素等濃度均勻混合後，經過 MIP 萃取以及丙酮脫附，測量其吸收光譜，如淺藍色線、淺綠色線、淺黃色線所示，三條線皆在 476nm 有明顯的吸收峰值，且在干擾物之特徵波長並無突起，唯在結構極相似之 β 胡蘿蔔素的特徵峰值 (336nm) 處有些微增長，故證明此材料對於蝦紅素具有優良的專一性，可以應用於後續萃取，並可透過合成與萃取中的條件優化來提升萃取率。

五、合成時 TEOS 濃度對萃取率的影響

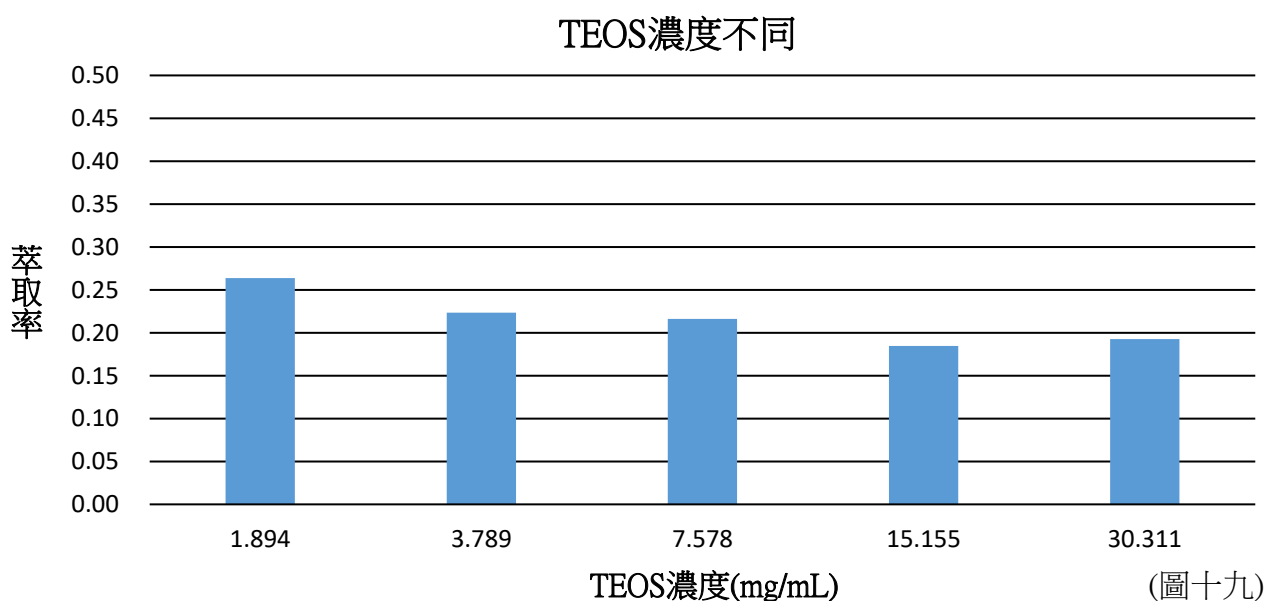
(控制變因：模板(蝦紅素)濃度、奈米磁鐵量、合成時間)

改變合成時 TEOS 的濃度，計算萃取率，觀察合成時 TEOS 濃度對於萃取率的影響。



TEOS 濃度(mg/mL)	1.894	3.789	7.578	15.155	30.311
加入的 TEOS 體積(μL)	2.4	4.8	9.6	19.2	38.4
加入蝦紅素的質量(mg)	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
脫附總質量(mg)	0.0039	0.0037	0.0043	0.0045	0.0053
萃取率(%)	26.37	22.35	21.61	18.47	19.26

表(一)

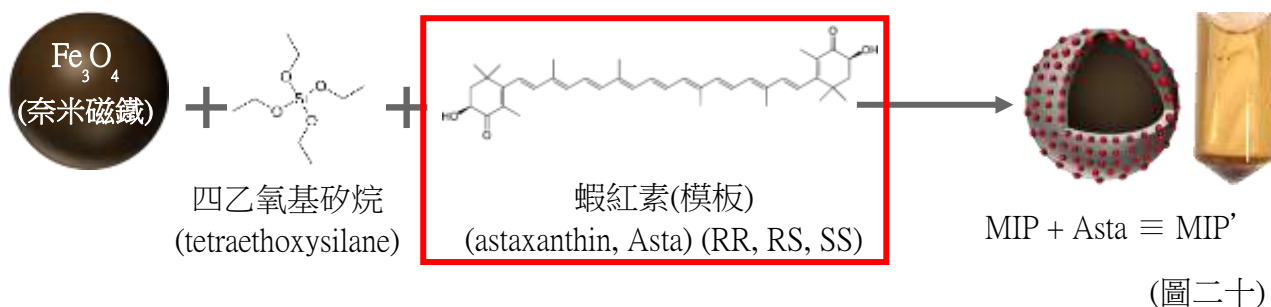


結果與討論：萃取率隨 TEOS 的用量減少而上升。二氧化矽包覆奈米磁鐵上，並且受到模板(蝦紅素)修飾而具有功能性，但是當 TEOS 濃度 (>3.73mg/mL) 過高時，可能會導致模板(蝦紅素)完全被包埋在二氧化矽中，使萃取粒子不具備功能性，反而導致萃取率降低。

六、合成時模板濃度對萃取率的影響

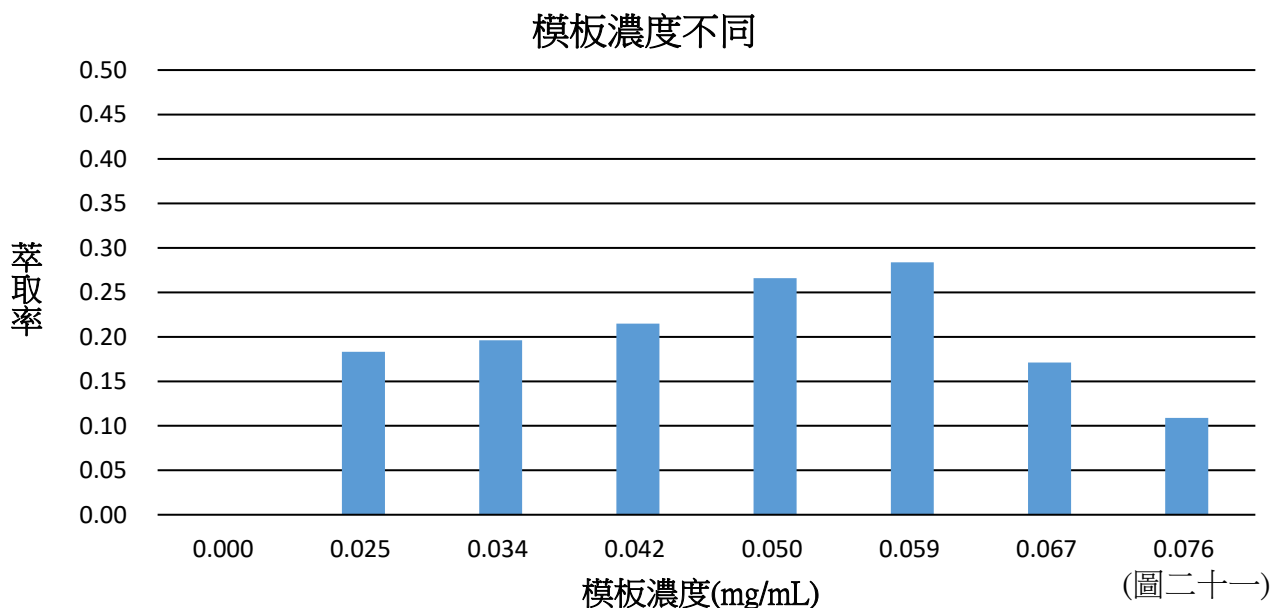
(控制變因：TEOS 濃度、奈米磁鐵量、合成時間)

改變合成時模板的濃度，計算萃取率，觀察合成時模板濃度對於萃取率的影響。



模板濃度(mg/mL)	0.000	0.025	0.034	0.042	0.050	0.059	0.067	0.076
加入蝦紅素的質量(mg)	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
脫附總質量(mg)	0	0.0037	0.0039	0.0043	0.0053	0.0057	0.0034	0.0022
萃取率(%)	0	18.32	19.61	21.48	26.61	28.38	17.11	10.89

表(二)

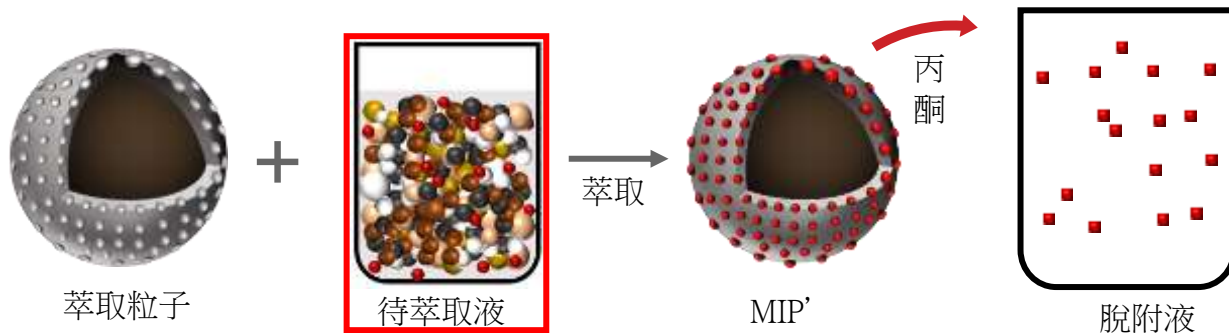


結果與討論：模板濃度為 0.059mg/mL 時萃取率最高。沒有受到模板修飾的奈米粒子是無法被萃取的，萃取率則會隨模板濃度增加而升高，而在達到一定濃度後下降。當模板濃度小於 0.059mg/mL 時，越多模板在合成時修飾二氧化矽，就會製作出越多具有專一性結合位，所得到的萃取率就越高；但是模板濃度過高(>0.059mg/mL)時，因為模板過度修飾二氧化矽，反而使結合位失去專一性，最後會導致萃取率的下降。

七、蝦紅素濃度對萃取率的影響

(控制變因：材料合成方法、萃取時間)

改變萃取時待萃取液中蝦紅素的濃度，計算萃取率，觀察萃取時蝦紅素濃度對於萃取率的影響。



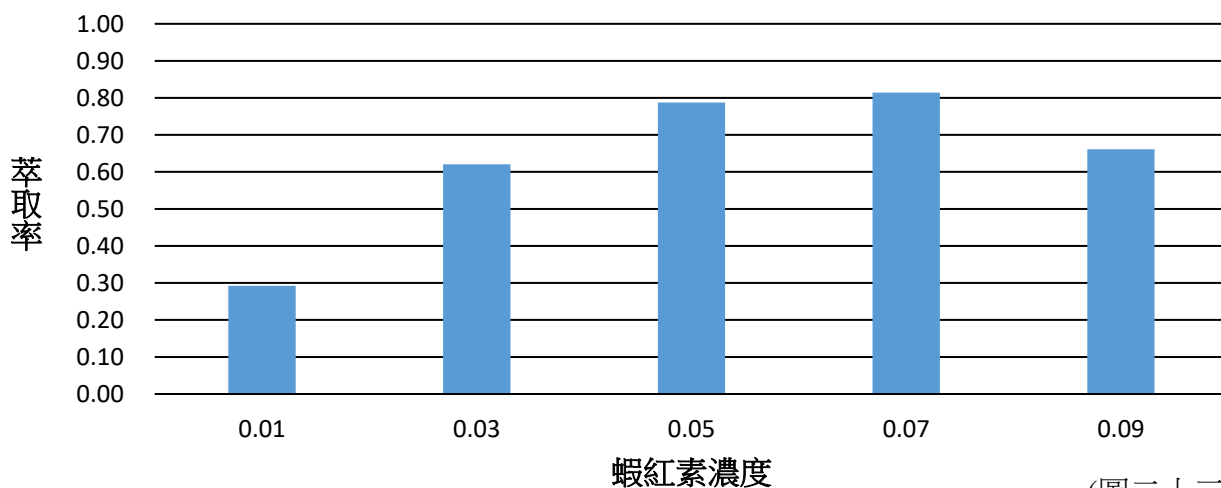
(圖二十二)

蝦紅素濃度(mg/mL)*	0.01	0.03	0.05	0.07	0.09
加入蝦紅素的質量(mg)	0.01	0.03	0.05	0.07	0.09
脫附總質量(mg)	0.0029	0.0186	0.0394	0.0570	0.0595
萃取率(%)	29.25	62.05	78.75	81.42	66.13

*透過改變蝦紅素乙醇標準品與乙醇的比例來調整

表(三)

蝦紅素濃度不同



(圖二十三)

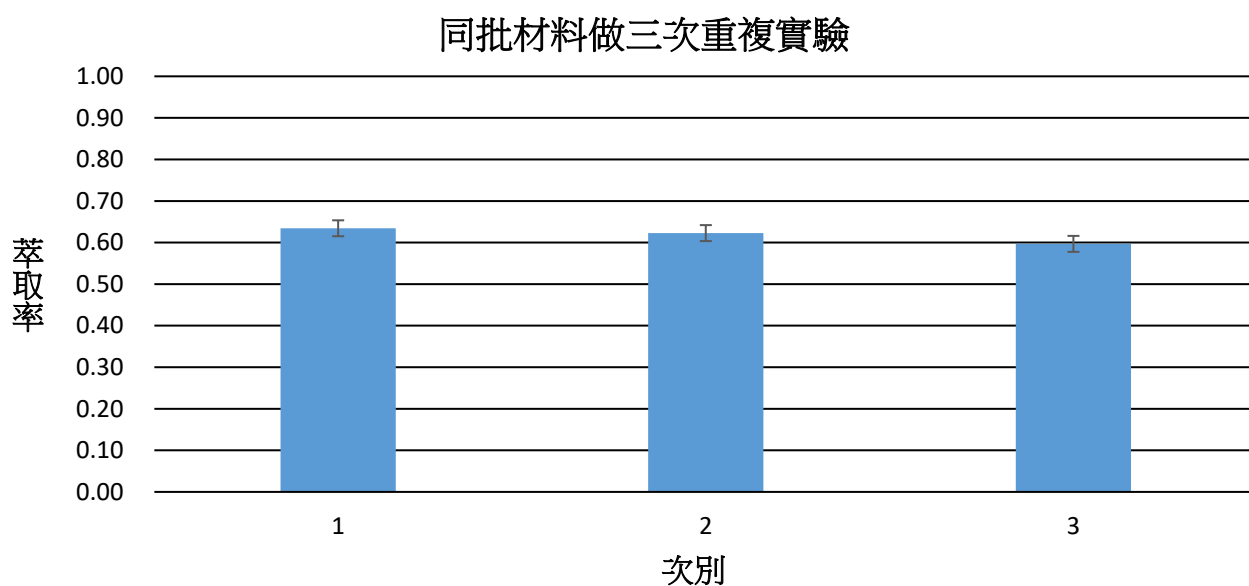
結果與討論：當蝦紅素濃度越高，萃取粒子與蝦紅素的碰撞機率就越大，就更有機會吸附蝦紅素，所以蝦紅素的萃取率則會隨著蝦紅素濃度升高。當蝦紅素濃度達到 0.07mg/mL 時，萃取粒子所吸附的蝦紅素達到飽和，若繼續提高蝦紅素濃度，則萃取率下降。

八、同批材料做三次重複實驗

(控制變因：材料合成方法、萃取時間、萃取之標準品濃度)

次別	1	2	3
加入總質量(mg)	0.05	0.05	0.05
脫附總質量(mg)	0.0317	0.0311	0.0298
萃取率(%)	63.44	62.28	59.68

表(四)



結果與討論：三次實驗的相對標準偏差為 1.9%，差異小，可靠度高。

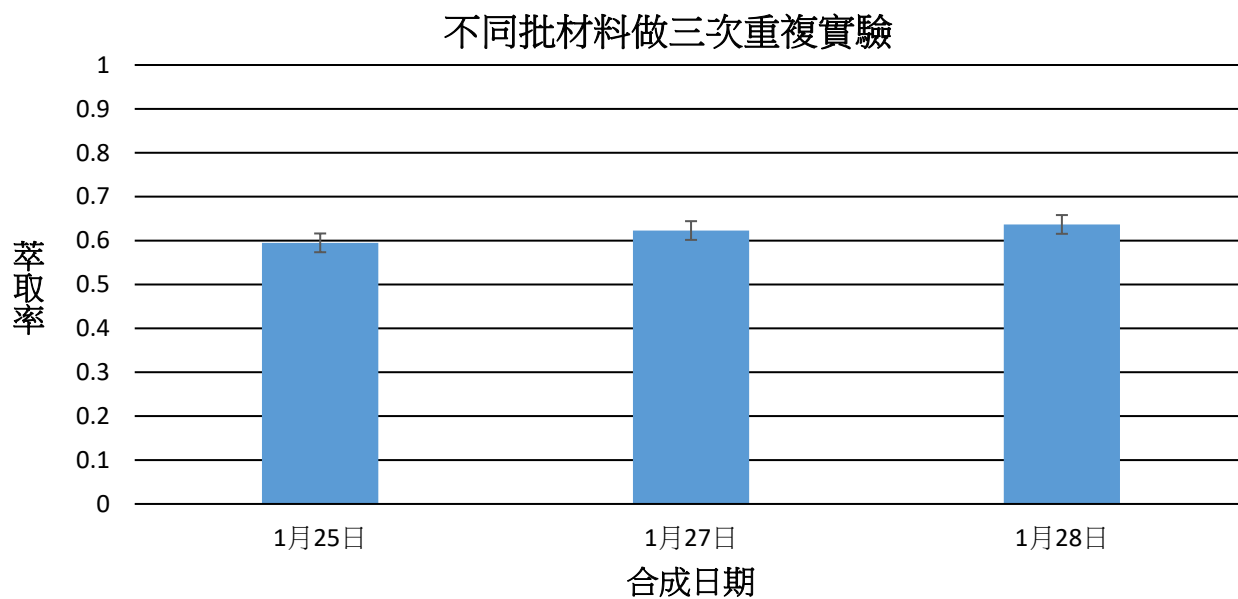
(圖二十四)

九、不同批材料做三次重複實驗

(控制變因：材料合成方法、萃取時間、萃取之標準品濃度)

合成日期	1/25	1/27	1/28
加入總質量(mg)	0.05	0.05	0.05
脫附總質量(mg)	0.0297	0.0311	0.0318
萃取率(%)	59.48	62.29	63.67

表(五)

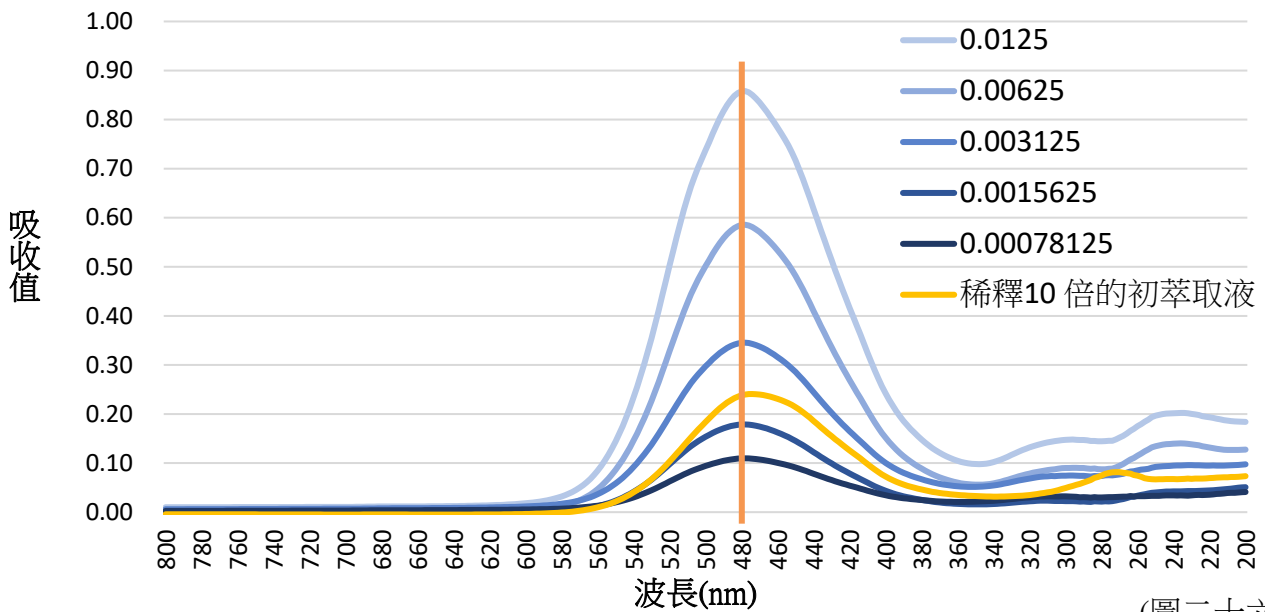


結果與討論：三次實驗的相對標準偏差為 2.1%，差異小，可靠度高。

(圖二十五)

十、定量福壽螺卵初萃取液中的蝦紅素濃度並嘗試萃取

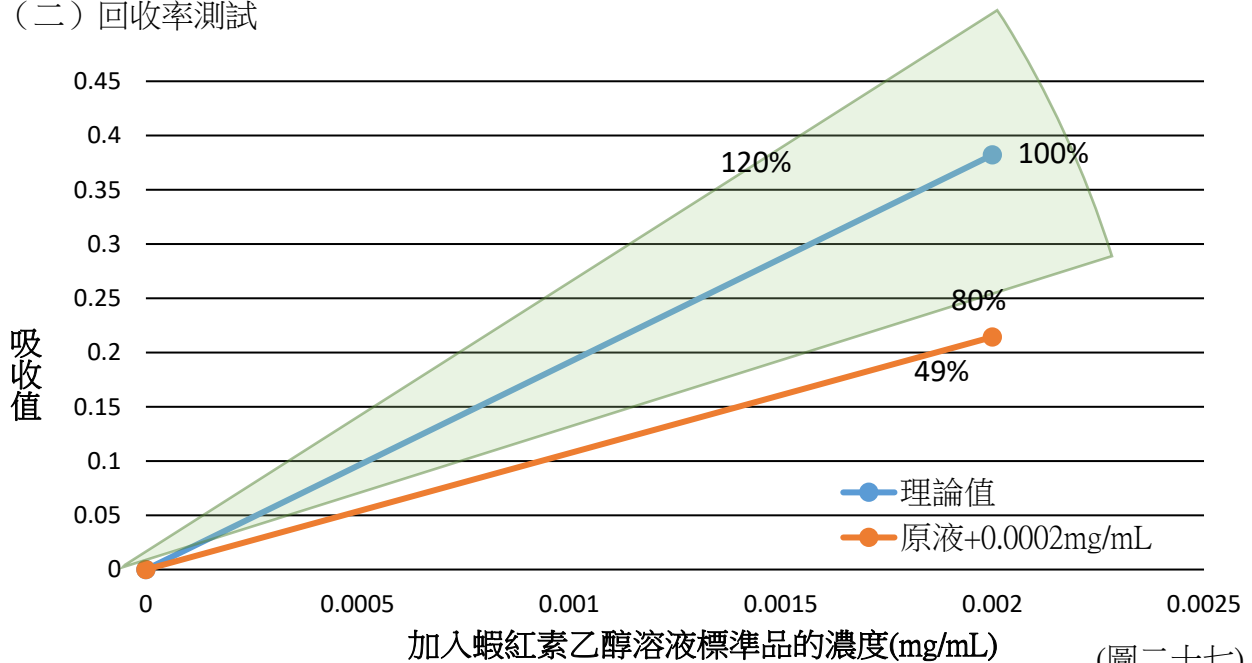
(一) 吸收值-波長 (UV-vis 吸收光譜)



(圖二十六)

作圖中藍色系線為蝦紅素乙醇標準品的吸收值-波長(200-800nm)，黃色線為稀釋 10 倍的福壽螺卵初萃取液，而黃色和藍色系線的峰值都同樣落在 476nm，故推測福壽螺卵初萃取液中含有蝦紅素。

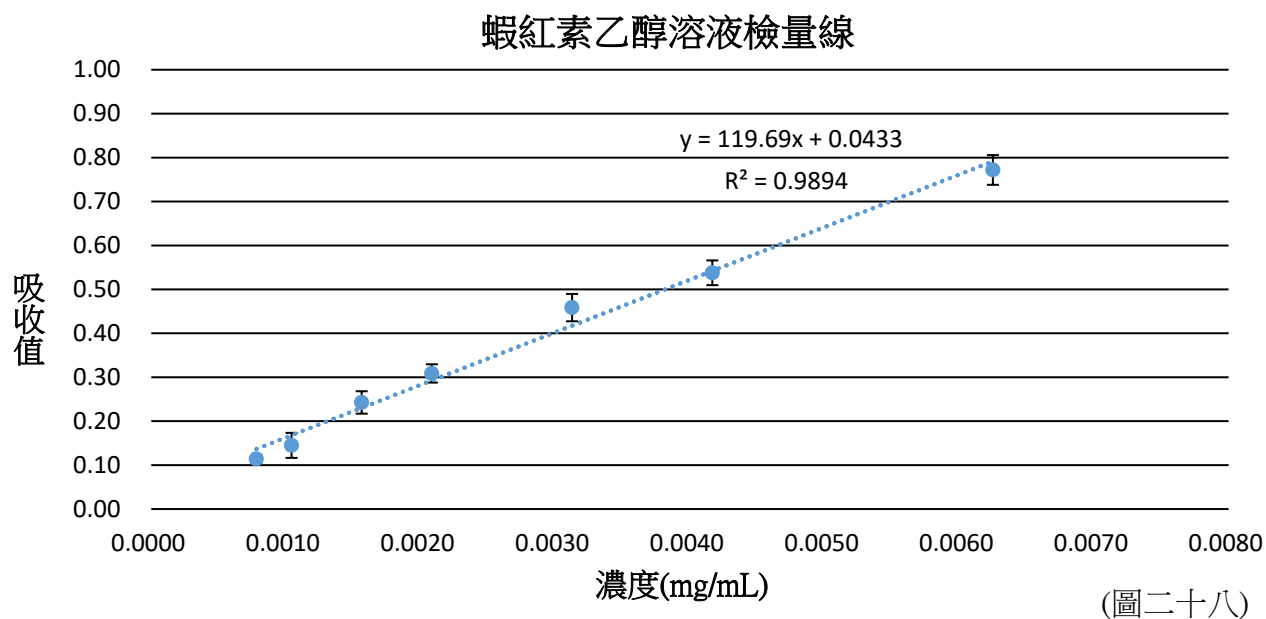
(二) 回收率測試



(圖二十七)

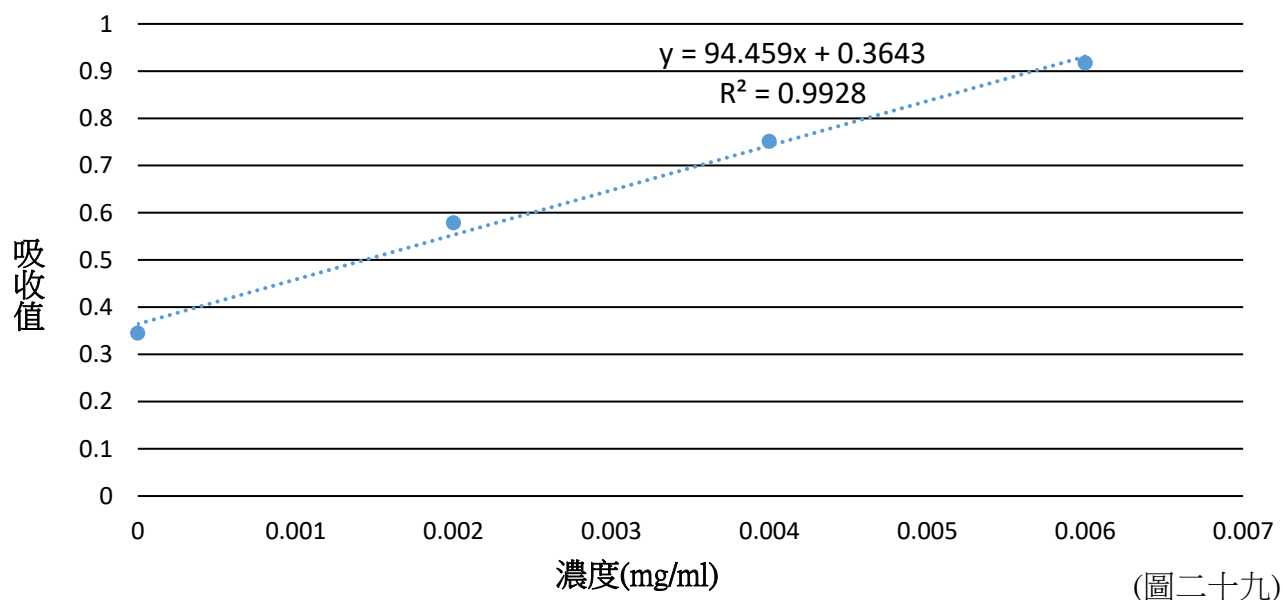
蝦紅素初萃取液回收率測試結果為 49%，不在可接受之誤差範圍(80%~120%)內，說明初萃取液中的雜質會干擾吸收值測量，因此不可以只用檢量線來換算吸收質與濃度，應該使用標準添加法定量。

(三) 檢量線估計



10 倍稀釋福壽螺卵初萃取液之吸收值為 0.3648，經檢量線估計大約濃度後，決定加入濃度分別為 0.002、0.004、0.006 mg/mL 的蝦紅素乙醇溶液標準品來進行標準添加法的測量。

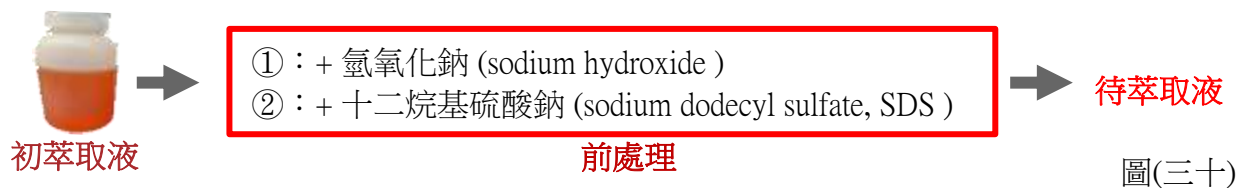
(四)標準添加法



回歸線斜率為 94.459，而 10 倍稀釋福壽螺卵初萃取液之吸收值為 0.3648，經計算後得知，初萃取液的濃度為 0.0386 mg/mL。

十一、初萃取液前處理方法對萃取率的影響

使用上述實驗方法，所得出之最佳萃取方法來合成萃取粒子，並在最佳萃取條件下針對福壽螺卵初萃取液來進行實驗時，其萃取率不超過 5%。經過文獻探討 (Dreon et al. 2004) 發現，初萃取液中的蝦紅素並和標準液不同，而是以「游離態」存在的。而在和脂肪酸結合時，則是以酯態的形式存在，並和黏液蛋白交纏在一起，故必須先使用 NaOH 水解酯使蝦紅素回歸游離態，再用 SDS 來將黏液蛋白展開後，使其成為可供萃取的待萃取液。以下三實驗分別探討前處理中的各種因素對萃取率的影響。



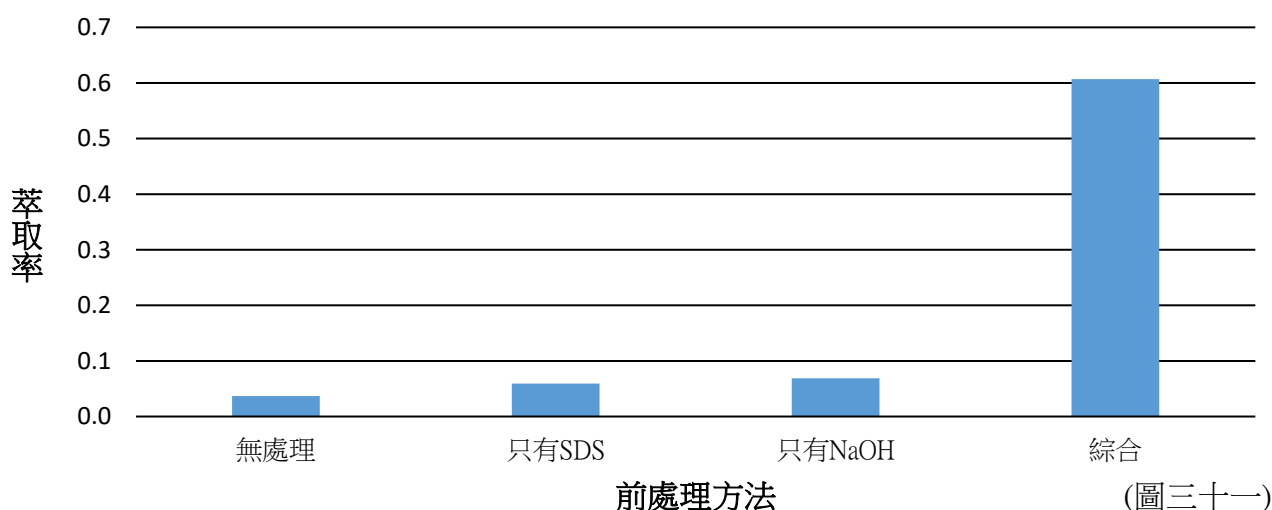
(控制變因：材料合成方法、萃取時間、初萃取液)

處理方法	SDS (1mM)	NaOH (0.2M)	綜合	無處理
加入總質量(mg)*	0.071	0.022	0.025	0.104
脫附總質量(mg)	0.004	0.002	0.015	0.004
萃取率(%)	5.9	6.9	58.4	3.7

*：由前處理過後初萃取液中的蝦紅素濃度換算而來

表(六)

初萃取液前處理方法對萃取率的影響



結果與討論：SDS 和 NaOH 對於提高蝦紅素的萃取率皆有顯著得影響，而且兩者需要配合處理。SDS 可以展開黏液蛋白，使蝦紅素釋放出來；而 NaOH 則可以將酯態的蝦紅素水解出來，成為游離態，以便萃取。

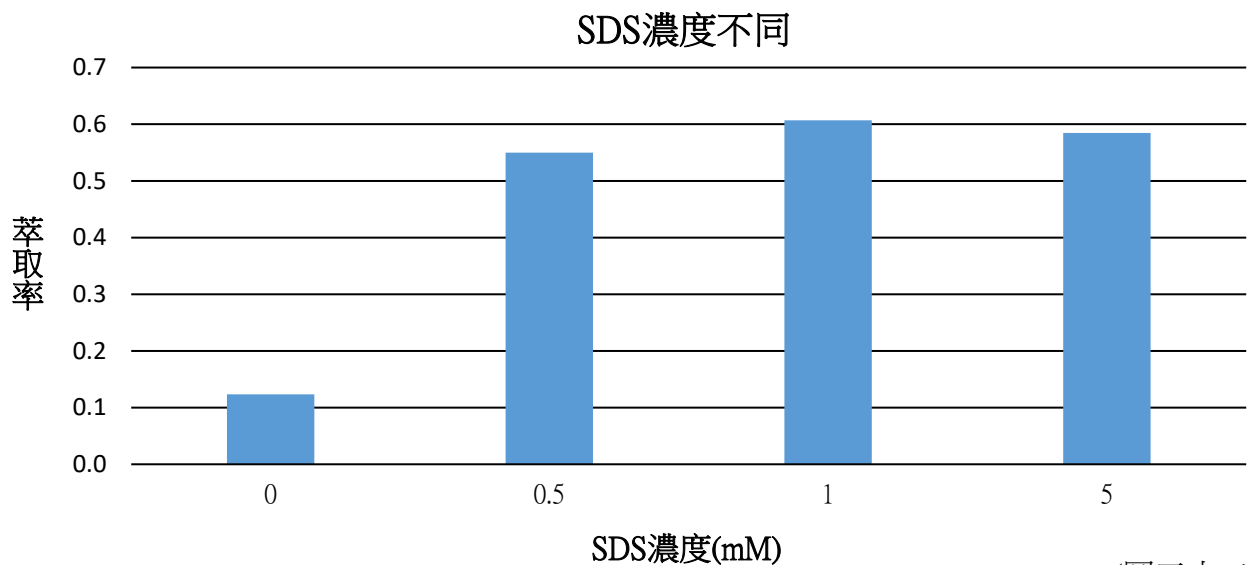
十二、前處理時 SDS 濃度對萃取率的影響

(控制變因：材料合成方法、萃取時間、初萃取液前處理 NaOH 的濃度)

SDS 濃度	0	0.5	1	2
加入總質量(mg)*	0.0252	0.0252	0.0275	0.0254
脫附總質量(mg)	0.0031	0.0138	0.0166	0.0148
萃取率(%)	12.3	54.9	60.6	58.4

*：由前處理過後初萃取液中的蝦紅素濃度換算而來

表(七)



(圖三十二)

結果與討論：當固定前處理時 NaOH 的濃度時，萃取率隨著 SDS 濃度的提升而提升，在 SDS 濃度為 1mM 時達到最大；若繼續提升 SDS 濃度，則對萃取率無顯著影響。SDS 藉由展開黏液蛋白，使得蝦紅素能夠釋放出來，有效提高萃取率。

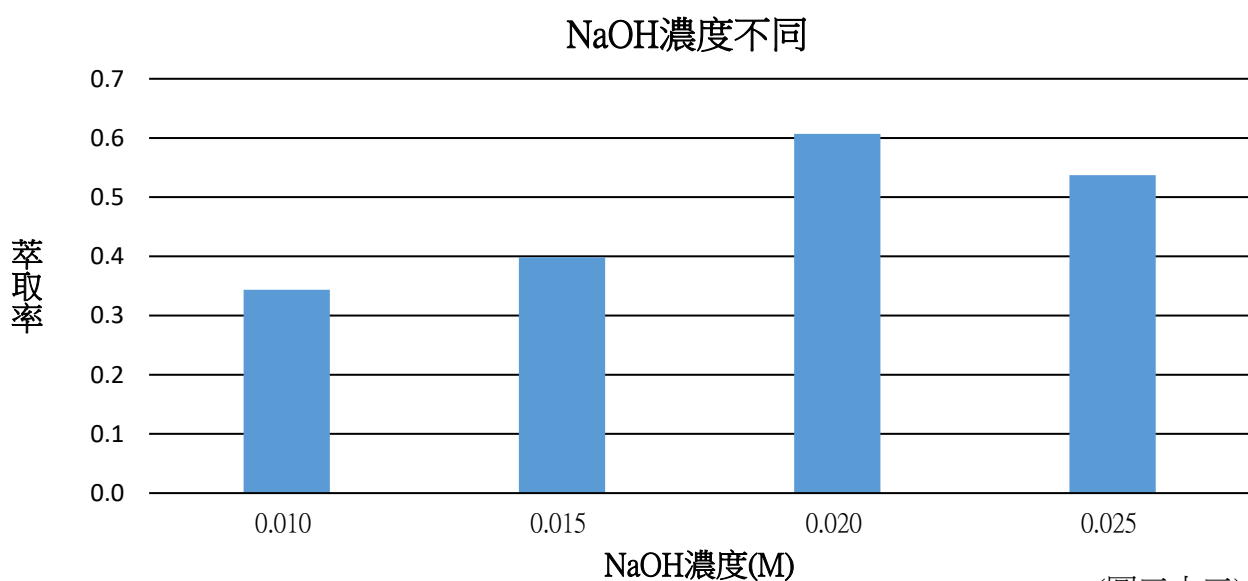
十三、前處理時 NaOH 濃度對萃取率的影響

(控制變因：材料合成方法、萃取時間、初萃取液前處理 SDS 的濃度)

SDS 濃度	0.01	0.015	0.02	0.025
加入總質量(mg)*	0.0399	0.0336	0.0275	0.0252
脫附總質量(mg)	0.0137	0.0133	0.0166	0.0135
萃取率(%)	34.35	39.85	60.67	53.71

*：由前處理過後初萃取液中的蝦紅素濃度換算而來

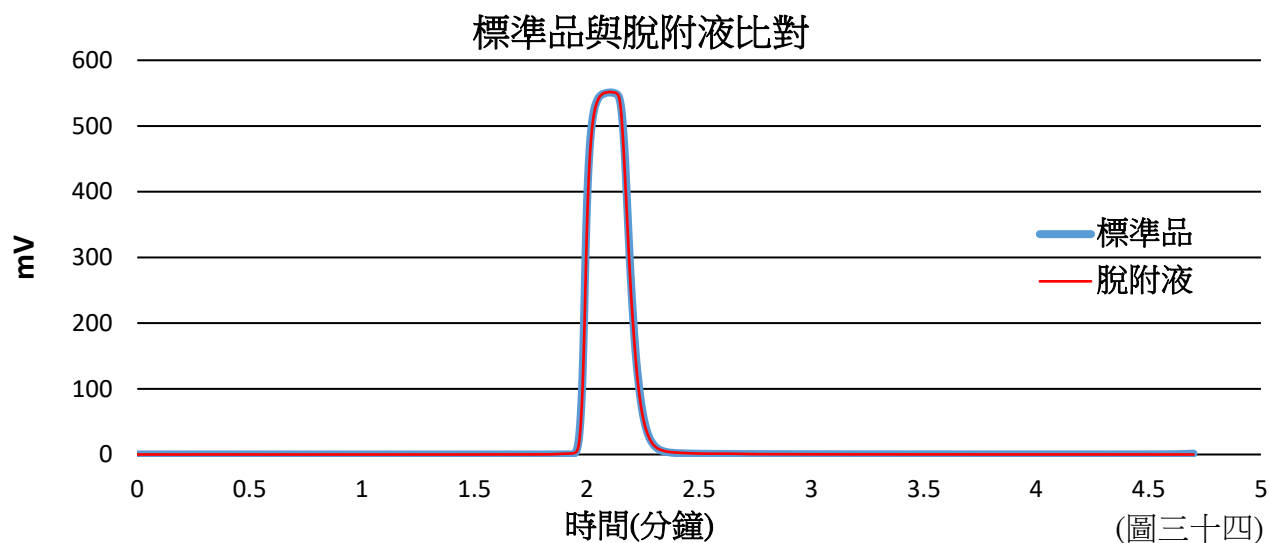
表(八)



(圖三十三)

結果與討論：當固定前處理時 SDS 濃度時，萃取率會隨著 NaOH 的濃度提高而提高，在 NaOH 濃度為 0.2M 時，萃取率可以達到最大；若繼續提升 NaOH 濃度，則對萃取率無顯著影響。NaOH 藉由水解酯態的蝦紅素，使其成為游離態，能夠有效提高萃取率。

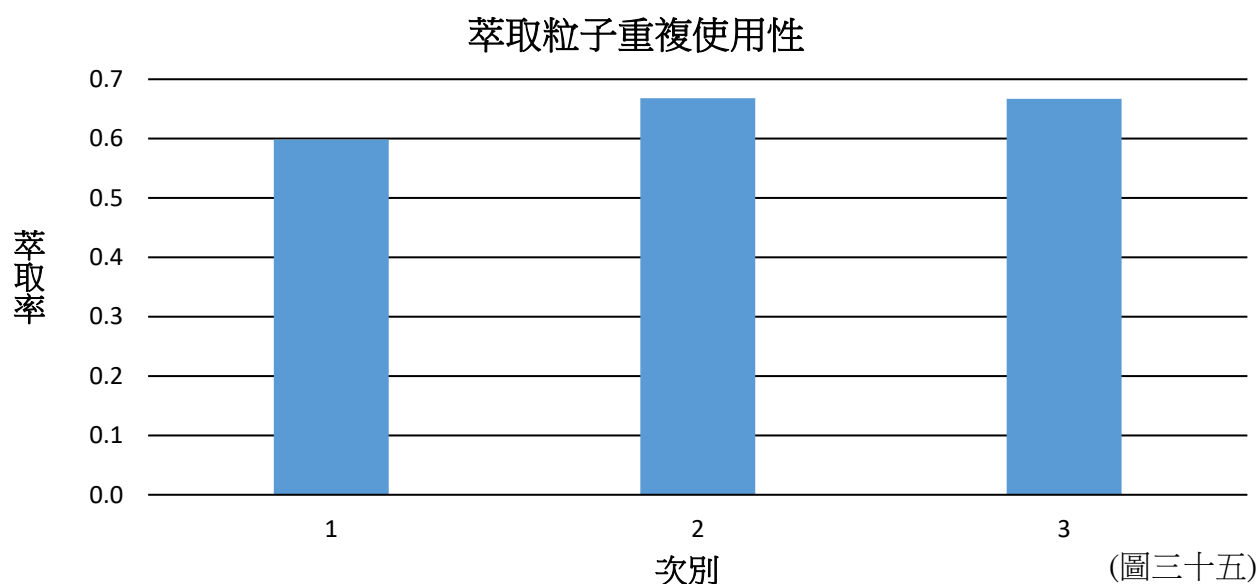
十四、高效液相層析 (HPLC, high performance liquid chromatography) 分析



結果與討論：利用萃取粒子，將蝦紅素從待萃取液中萃取出來後，使用丙酮進行脫附，以 HPLC 分析脫附液 (流動相：甲醇，流速：1，取樣波長：290nm)。如上圖所示，其二者之滯留時間幾乎相同，圖形接近吻合，故以此證明脫附之液體確實含有蝦紅素。

十五、萃取粒子重複使用對萃取率的影響

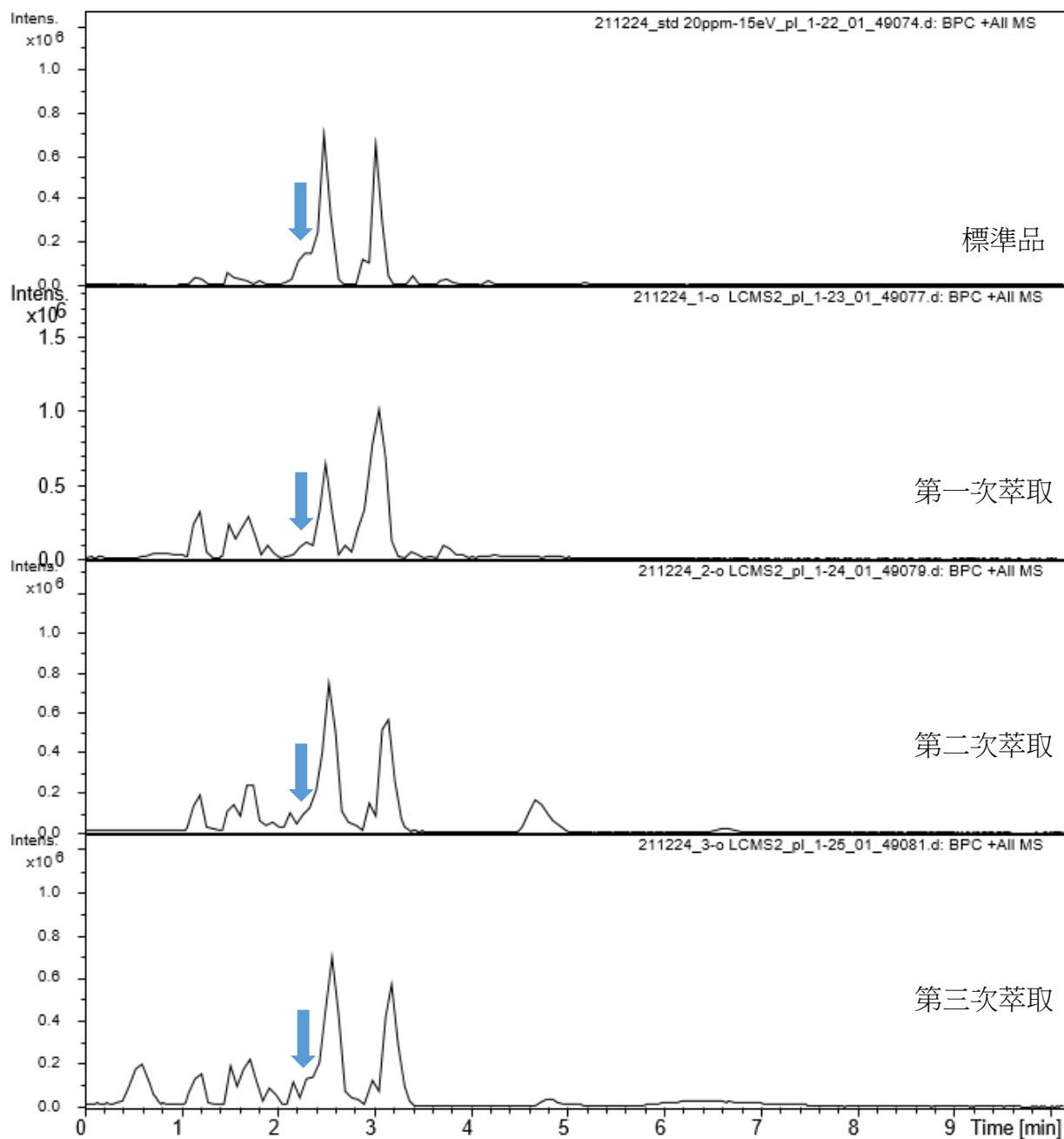
利用丙酮將蝦紅素從萃取粒子上脫附後，使用酒精將萃取粒子上的丙酮洗滌乾淨，再次進行萃取，觀察重複使用對於萃取率的影響。



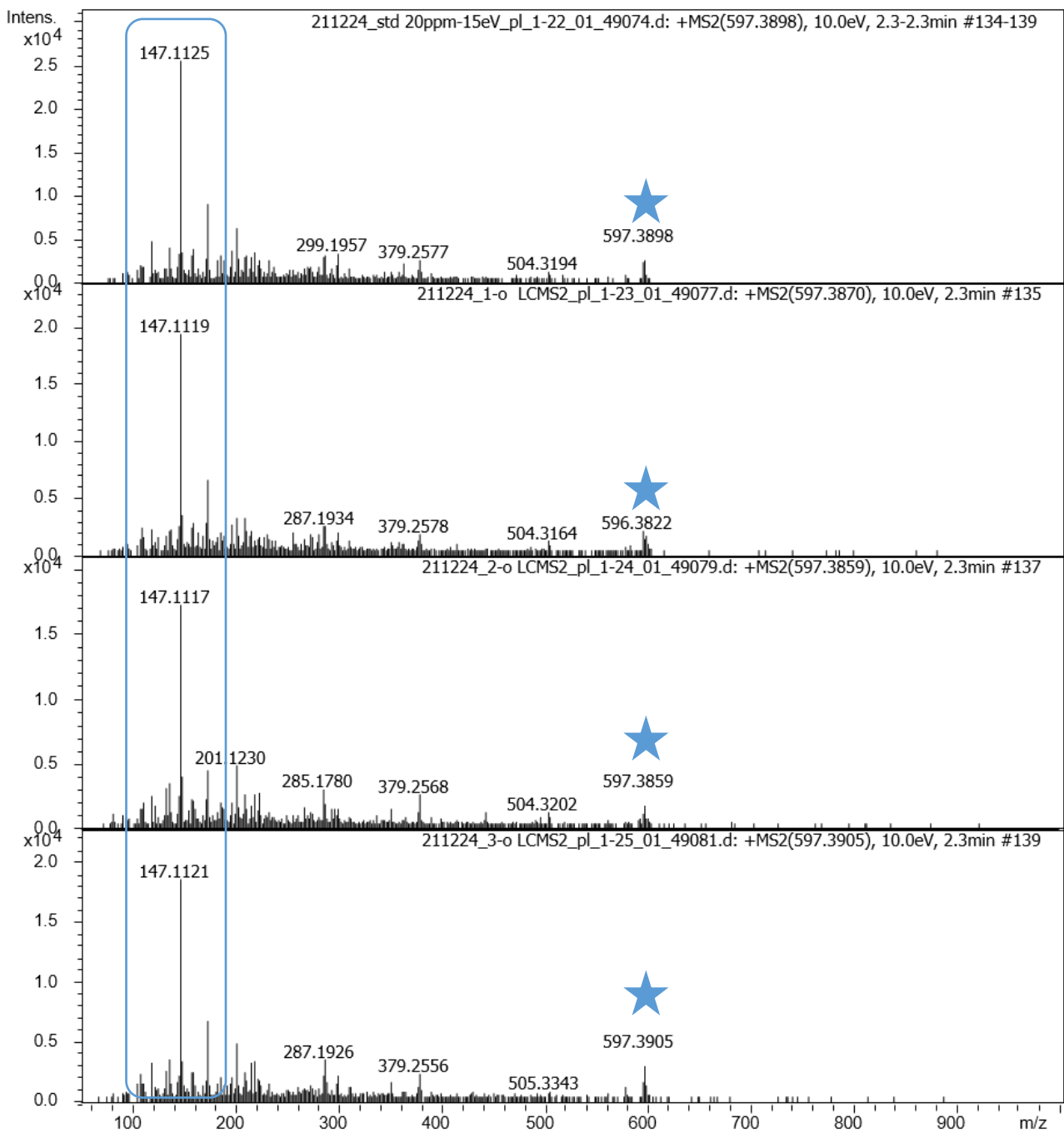
結果與討論：如圖所示，重複使用萃取粒子進行萃取並不會導致萃取率降低，可見其二氧化矽修飾層結構穩定，不易受到重覆吸附與脫附的影響。

十六、液相層析串聯質譜 (LC - MS / MS) 分析

將重複使用萃取粒子所萃取得知蝦紅素利用液相層析串聯質譜分析並與標準品對比



(圖三十六)



(圖三十七)

結果與討論：如圖所示，重複使用萃取粒子所萃取得之蝦紅素訊號與標準品近乎吻合，可見其專一性萃取能力不受重複使用影響。

綜合討論

透過二氯化鐵(FeCl_2)以及三氯化鐵(FeCl_3)在鹼性環境下所合成之球型奈米磁鐵粒子，其粒徑為 $12.56 \pm 2.56 \text{ nm}$ ；在氨水的催化下，TEOS 包覆在奈米磁鐵上形成二氧化矽 (SiO_2)，所形成之球型萃取粒子粒徑為 $13.42 \pm 2.80 \text{ nm}$ 。

在干擾物 (β 胡蘿蔔素、維他命 A、維他命 E) 與蝦紅素均勻混合後，經過 MIP 萃取以及丙酮脫附，測量其吸收光譜，三條線皆在 476nm 有明顯的吸收峰值，且在干擾物之特徵波長並無突起，唯在結構極相似之 β 胡蘿蔔素的特徵峰值 (336nm) 處有些微增長，故證明此材料對於蝦紅素具有優良的專一性，可以應用於後續萃取，並透過合成與萃取中的條件優化來提升萃取率。

萃取率會隨著 TEOS 的用量減少而上升。二氧化矽包覆在奈米磁鐵上，受到模板修飾而具有特定的功能性。但是當 TEOS 濃度 ($>3.73\text{mg/mL}$) 過高時，可能因為模板完全被包埋在矽中，使表面只剩下二氧化矽，反而讓粒子不具備功能性，導致萃取效率降低。

當模板濃度為 0.059mg/mL 時，萃取率達到最高。而沒受到模板修飾的奈米粒子，是無法被萃取的。萃取率會隨模板濃度提高而升高，而在達到一定濃度後下降。當模板濃度小於 0.059mg/mL 時，會有越多模板在合成時修飾二氧化矽，可以製作出越多專一性結合位，所得的萃取率就越高；但是當模板濃度 ($>0.059\text{mg/mL}$) 過高時，因為模板過度修飾二氧化矽，反而使結合位失去專一性，最後導致萃取率下降。

當蝦紅素濃度越高，萃取粒子與蝦紅素的碰撞機率就越大，就更有機會吸附蝦紅素，所以蝦紅素的萃取率則會隨著蝦紅素濃度升高。當蝦紅素濃度達到 0.07mg/mL 時，萃取粒子所吸附的蝦紅素達到飽和，若繼續提高蝦紅素濃度，則萃取率下降。

此方法在三次重複實驗以及三日間重複實驗的萃取率差異小，相對標準偏差分別為 1.9% 及 2.1%，證明本方法的誤差小，穩定性高。

蝦紅素初萃取液回收率測試結果為 49%，不在可接受之誤差範圍(80%~120%)內，說明初萃取液中的雜質會干擾吸收值測量，因此不可以只用檢量線來換算吸收質與濃度，應該

使用標準添加法定量。在加入濃度為 0.002、0.004 以及 0.006mg/mL 的蝦紅素乙醇溶液標準品後，得到的斜率為 94.459；而 10 倍體積稀釋的初萃取液吸收值為 0.3648，經計算後得知，初萃取液的濃度為 0.0386 mg/mL。

使用上述實驗方法，所得出之最佳萃取方法來合成萃取粒子，並在最佳萃取條件下針對福壽螺卵初萃取液來進行實驗時，其萃取率不超過 5%。經過文獻探討 (Dreon et al. 2004) 發現，初萃取液中的蝦紅素並和標準液不同，而是以「游離態」存在。但和脂肪酸結合時，卻是以酯態的形式存在，並和黏液蛋白交纏在一起，所以必須先使用 SDS 來將黏液蛋白展開後，再用 NaOH 水解酯使蝦紅素回歸游離態。

實驗結果顯示 SDS 和 NaOH 都對於提高萃取率有重要的貢獻，而且兩者都須參與前處理，缺一不可。當固定前處理時 NaOH 的濃度時，萃取率隨著 SDS 濃度的提升，在 SDS 濃度為 1mM 時達到最大；若繼續提升 SDS 濃度，則對萃取率無顯著影響。當固定前處理時 SDS 濃度時，萃取率會隨著 NaOH 的濃度提高而提高，在 NaOH 濃度為 0.2M 時，萃取率可以達到最大；若繼續提升 NaOH 濃度，則對萃取率無顯著影響。

經過一連串之條件優化，從福壽螺卵中萃取之蝦紅素萃取率最高可達到 60%，並利用 HPLC 與 LC - MS / MS 對比同濃度之標準品，兩者圖形近乎吻合，再次證明所萃取之物質確實為蝦紅素。

肆、結論與應用

一、研究結論

(一) 萃取粒子合成與其萃取條件探討

1. 本研究利用二氯化鐵及三氯化鐵以共沉澱法製備出奈米磁鐵，並成功利用蝦紅素修飾其二氧化矽包覆層，使此磁性奈米粒子表面具有蝦紅素的專一性結合位，也證明此結構對於蝦紅素的選擇性良好，就算存在結構相似的干擾物，萃取蝦紅素時也幾乎不受影響，可做為蝦紅素之萃取材料。
2. 以奈米磁鐵為基底合成萃取粒子時，TEOS 的最佳濃度為 1.894 mg/mL，而其修飾模板（蝦紅素）之最佳濃度則是 0.059 mg/mL。
3. 在萃取時，待萃取液中蝦紅素的最佳濃度為 0.07 mg/mL，且此材料的萃取率再現性高。

(二) 真實樣品萃取與條件探討

1. 本研究利用酒精對福壽螺卵進行初步萃取，並測量其吸收光譜與蝦紅素標準品之吸收光譜對照，發現皆具有明顯峰值(476nm)，以此為據證實福壽螺卵中確實具有蝦紅素。
2. 本研究成功以標準添加法對初萃取液中蝦紅素濃度定量，其濃度為 0.0386 mg/mL
3. 本研究成功找出較平價且易達成之前處理方式，使以脂態存在於福壽螺卵中之蝦紅素可以透過加入 NaOH 水解釋放出來，並以 SDS 展開黏液蛋白，以免造成不必要之干擾。前處理 NaOH 的最佳濃度為 0.02 M，而 SDS 的最佳濃度則為 1 mM。
4. 經過一連串之條件探討與優化，福壽螺卵中蝦紅素的萃取率最高可以達到 60.7%，以 HPLC 與 LC - MS / MS 分析其脫附液後，發現其圖形幾乎吻合蝦紅素標準品，以此為據證明萃取粒子從福壽螺卵中所萃取到的確實為蝦紅素。

二、研究應用

分子模版拓印技術，有鑑於其可針對特定分子設計專一性結合位、對單一分子具有獨特的親和力常數等特色，可以用來製備具選擇性的辨識材料，現今被廣泛應用於層析中的固定相物質、感測器、催化劑、基因篩選、化合物合成、藥物釋放控制等對於專一性有極高要求的領域。

分子模版拓印技術在學理上可行，有許多成功的應用實例，但也有許多困難需要克服。本文利用分子拓印修飾磁性奈米粒子，成功製作出對於蝦紅素具有專一性的萃取粒子，並且以固相萃取的方式成功地從福壽螺卵中萃取出純度高的蝦紅素。然而，在選擇性的部分仍有加強空間，結構極度相似的分子，如： β 胡蘿蔔素，仍會和蝦紅素競爭專一性結合位。目前計畫在合成時加入 3-氨基丙基三乙氧基矽烷 (3-Aminopropyltriethoxysilane, APTES)，利用可與 TEOS 交聯卻有具又外露之胺基的特性，進一步加強萃取粒子和蝦紅素之間的作用力以提高選擇性和萃取率，但還須考慮到此作用力不可大於蝦紅素和丙酮之間的作用力，否則會造成洗滌與脫附上的困難，值得更深入研究。

伍、參考文獻

1. Anderson, M. L. 2005. 'A preliminary investigation of the enzymatic inhibition of 5 α -reduction and growth of prostatic carcinoma cell line LNCap-FGC by natural astaxanthin and Saw Palmetto lipid extract in vitro', *J Herb Pharmacother*, 5: 17-26.
2. Diao, W., W. Chen, W. Cao, H. Yuan, H. Ji, T. Wang, W. Chen, X. Zhu, H. Zhou, H. Guo, and X. Zhao. 2019. 'Astaxanthin protects against renal fibrosis through inhibiting myofibroblast activation and promoting CD8(+) T cell recruitment', *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, 1863: 1360-70.
3. Dreon, M. S., G. Schinella, H. Heras, and R. J. Pollero. 2004. 'Antioxidant defense system in the apple snail eggs, the role of ovorubin', *Arch Biochem Biophys*, 422: 1-8.
4. Jyonouchi, H., S. Sun, K. Iijima, and M. D. Gross. 2000. 'Antitumor activity of astaxanthin and its mode of action', *Nutr Cancer*, 36: 59-65.
5. Karraker, Nancy E., and David Dudgeon. 2014. 'Invasive apple snails (*Pomacea canaliculata*) are predators of amphibians in South China', *Biological Invasions*, 16: 1785-89.
6. Park, J. S., J. H. Chyun, Y. K. Kim, L. L. Line, and B. P. Chew. 2010. 'Astaxanthin decreased oxidative stress and inflammation and enhanced immune response in humans', *Nutr Metab (Lond)*, 7: 18.
7. Samorì, Chiara, Laura Pezzolesi, Paola Galletti, Margherita Semeraro, and Emilio Tagliavini. 2019. 'Extraction and milking of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* cultures', *Green Chemistry*, 21: 3621-28.
8. Su Sin, Teo. 2006. 'Evaluation of different species of fish for biological control of golden apple snail *Pomacea canaliculata* (Lamarck) in rice', *Crop Protection*, 25: 1004-12.
9. Wada, Takashi, Katsuya Ichinose, Yoichi Yusa, and Naoyuki Sugiura. 2004. 'Decrease in density of the apple snail *Pomacea canaliculata* (Lamarck) (Gastropoda: Ampullariidae) in paddy fields after crop rotation with soybean, and its population growth during the crop season', *Applied Entomology and Zoology*, 39: 367-72.
10. Yusa, Yoichi, Naoyuki Sugiura, and Takashi Wada. 2006. 'Predatory Potential of Freshwater Animals on an Invasive Agricultural Pest, the Apple Snail *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae), in Southern Japan', *Biological Invasions*, 8: 137-47.
11. Lai, J. P., Y. Jiang, X. W. He, J. C. Huang, and F. Chen. 2004. 'Separation and determination of astaxanthin from microalgal and yeast samples by molecularly imprinted microspheres', *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 804: 25-30.

【評語】 030006

本研究以氧化鐵磁性奈米粒子為基底，在外層包覆上以蝦紅素為模板修飾的二氧化矽，製作出的磁性奈米粒子，應用在萃取福壽螺卵中的蝦紅素。實驗數據完整，呈現之結果明確。有幾項建議：

1. 應嘗試以分子結構說明所謂吸附蝦紅素的專一性，實驗並未顯示不會吸附其他物種。
2. 為何二氧化矽越薄，吸附蝦紅素的效果越好？應說明。
3. 模板濃度過高時，吸附蝦紅素的效果變差，是因為模板過度修飾二氧化矽，反而使結合位失去專一性，不太合理。