

# 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 化學科

050208

高效奈米印跡粒子萃取大葉欖仁液中單寧之特  
性研究

學校名稱： 新北市立樹林高級中學

作者：  高二 詹于靚  高二 陳佳淇  高二 施星佑	指導老師：  黃俊昇  陳佩琪
---	-----------------------------

關鍵詞： 奈米磁性氧化鐵粒子 (MNP)、單寧、拓印  
奈米粒子 (MIP)

## 摘要

本研究以  $\text{FeCl}_2$  及  $\text{FeCl}_3$  莫耳數比 1:2 一鍋化合成 MNP 粒子並以 TEOS 包覆矽殼, APTES 於表面修飾胺基, 單寧為模板分子, 丙酮為溶劑脫附單寧後可得對單寧具專一性的 MIP 粒子, 產率 75.73%, 由 BET 氮氣吸脫附曲線知 MIP 具較窄孔為尺寸均勻的球體。以波長 279 nm 最大吸收度製作單寧檢量線  $y=13.15x+0.022$  定量未知液單寧濃度, 欖仁葉釋放單寧濃度的條件探討選定吸收度最近 1 的最佳稀釋比 1/5, 煮液越久、越高溫釋放單寧濃度越高, 且煮液時間與釋放濃度為線性關係, 吸附測試過濾效果以 Filter 最佳, 加奈米粒子量越多吸附率增加, 達吸附飽和所需量不同, 萃取率隨 MIP 加入量而增加, 0.08g 為最佳量, 萃取率 82.634%, HPLC 分析欖仁液主成分為單寧, MIP 萃取率高達 98.97%, 並開發新製程 MIP 粒子合成法高效提升單寧分子吸附率。

## 壹、研究動機

學校中有許多的大葉欖仁樹，每到秋天樹葉轉紅或黃，為校園增添一道美麗風景，但同時大量的落葉也造成校園環境的破壞甚至孳生蚊蟲，因此我們發現在 youtube 頻道上，有人以大葉欖仁葉製備水族缸黑水，在黑水中可穩定魚兒的情緒，提高魚群的生存率，並能調節水族箱水質的酸鹼度，並能延緩水族箱內生物死後發霉速率，具抑制黴菌生長的功用，經文獻查詢後發現葉中含有的單寧造成。因此想探究葉中的單寧成分，本研究建立標準單寧檢量線用以定量未知濃度欖仁液中單寧含量，將磁性奈米鐵粒子包覆矽殼，加以表面修飾有機官能基胺基，加入模板分子單寧拓印後並脫附，製取得到的奈米印跡拓印高分子便對欖仁萃液中單寧成份具吸附性，便可進行吸附及萃取試驗，以測定不同變因下欖仁液中單寧的萃取率，並將造成環境汙染的大量欖仁葉作最佳利用。



圖1.校園大葉欖仁樹落葉(本照片為作者/指導老師拍攝。)

## 貳、研究目的

### 一、研究目的

- (一) 從校園原生植物大葉欖仁樹，取葉部製取標準試樣粉末，達到廢物循環再生目的。
- (二) 以奈米鐵粒子為核心，使用溶膠－凝膠法製作包覆奈米鐵的矽殼，表面修飾有機官能基以辨識及吸附受質分子單寧，並驗證拓印高分子對單寧分子的專一性。
- (三) 在製備拓印分子過程中，以傅立葉轉換紅外光譜儀(FT-IR)檢視拓印高分子表面的官能基以確認表面修飾的正確性，並以 X 光粉末繞射儀(PXRD)檢測奈米粒子晶面及純度，再以穿透式電子顯微鏡(TEM)檢視奈米粒子尺度及顆粒完整性。
- (四) 熟悉紫外光譜並活用 Beer's Law，建立單寧標準液檢量線定量欖仁液中單寧含量。
- (五) 探討不同煮液變因(溫度高低、時間長短)對於欖仁液中單寧含量的影響。

- (六) 合成法三步產物奈米粒子(MNP、MNP 表面修飾、MIP)對標準單寧液吸附率差異。
- (七) 探討加入不同量的奈米印跡粒子(MIP)對單寧標準液吸附率及萃取率的影響
- (八) 奈米印跡粒子(MIP)對欖仁標準液中單寧萃取率的探究。
- (九) 理解高效液液相層析初階原理，定性及定量欖仁液中單寧成分。

## 二、文獻回顧

(一)單寧:又稱鞣酸類物質，含有鞣皮性的植物成分，鞣皮作用的主體為多酚結構。單寧泛指結構較大的多酚化合物，可和  $Fe^{3+}$  結合而形成深綠色乃至紫色的錯合物，廣泛分佈於植物體中。在橡樹、五倍子樹等植物的木質部、樹皮、葉均含有單寧。單寧共分為兩大類，水解性單寧是以沒食子酸為主成份，水解後可產生沒食子酸(Gallic acid)和芥子酸，而縮合型單寧則以黃烷類(flavane)化合物為主要骨架。其分子量範圍廣從 500 到 3000(如沒食子酸酯)，甚至可達 20000(如原花青素)。單寧為植物細胞的一種防衛用化學成分具抗菌作用對病蟲害具有防禦作用，亦可保護植物趨避紫外線的傷害。

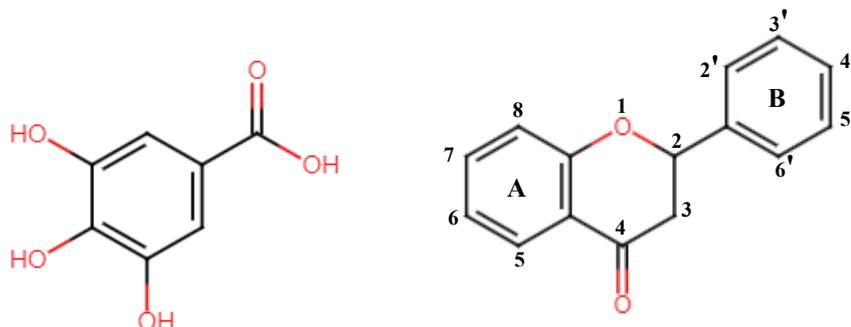


圖 2. 沒食子酸及類黃酮化合物(本圖為作者/指導老師使用 chemical-sketch 繪製。)

(二)大葉欖仁樹:學名 *Terminalia catappa* L，為使君子科欖仁樹屬，葉大形長 20~25cm 寬約 10cm，葉為橢圓形或吉他形，佐佐木舜一編輯的《藥用植物誌》一書中記載欖仁樹老葉煎汁具有清熱解毒功效且樹皮含單寧可製黑色染料，其種子富含油脂可榨油。



圖 3.大葉欖仁樹及其落葉造成校園環境汙染(本照片為作者/指導老師拍攝。)

(三)研究方法:本研究將磁性奈米鐵粒子( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ )以溶膠凝膠法進行交聯反應，將 MNP 包覆矽殼( $\text{SiO}_2$ )，並表面修飾等有機官能基如胺基( $-\text{NH}_2$ )，加入模板分子單寧(Tannin)後便獲得分子拓印奈米粒子(Molecular Imprinted Nanoparticle, MIP)，其矽殼表面上產生和單寧分子具互補性的結構，使 MIP 具有吸附單寧分子的專一性，以丙酮為溶劑洗脫 MIP 上的單寧分子便可獲得拓印模板，並應用銻磁鐵對奈米鐵粒子的磁性吸附高效分離拓印模板和溶液，進而以 MIP 粒子進行欖仁液中單寧成份的固相萃取，並以紫外-可見光譜儀(UV-vis)測量溶液在波長 279 nm 的吸收度，並配製標準品建立單寧濃度檢量線，應用檢量線性方程計算欖仁液中單寧的濃度。並以萃取率(萃取後脫附液吸收度/萃取前欖仁液吸收度)為依據，探討各變因對單寧萃取率的影響以找到最佳單寧萃取條件。

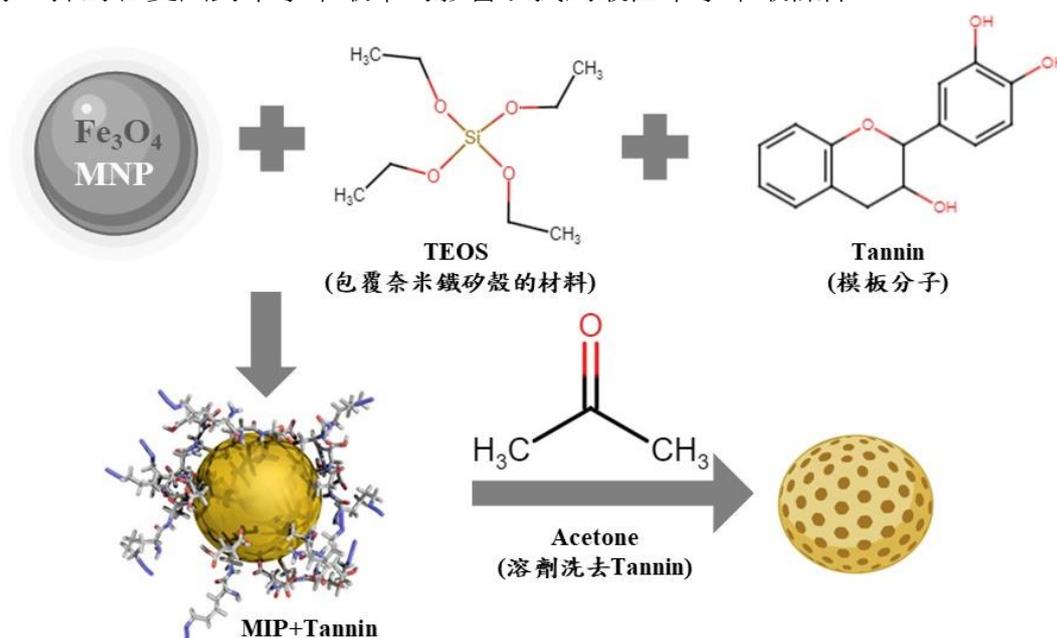


圖 4.分子拓印原理簡介(本圖為作者/指導老師使用 Biorender、chemical-sketch 繪製。)

(四)比爾定律(Beer's Law):光通過有色溶液時溶液的吸光度與其濃度之間的關係，光被吸收的量正比於光徑中吸光分子數目。

$$\text{數學表示為：} A = -\log(I/I_0) = \log(1/T) = \epsilon \cdot C \cdot l \quad , \quad T = I/I_0$$

其中 $I_0$ 和 $I$ 分別為入射光及透射光強度， $\epsilon$ 為吸光比例係數，與吸收物質的性質及入射光的波長 $\lambda$ 有關。當介質厚度 $l$ 以 $\text{cm}$ 為單位，當濃度 $C$ 採用體積莫耳濃度時， $\epsilon$ 為莫耳吸收係數，其單位為 $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ， $T$ 為穿透度。比爾定律只適用於極稀薄溶液，當高濃度時，分子對光的吸收度受四周鄰近分子影響大，分子間的相互影響不能忽略，比爾定律不再成立。

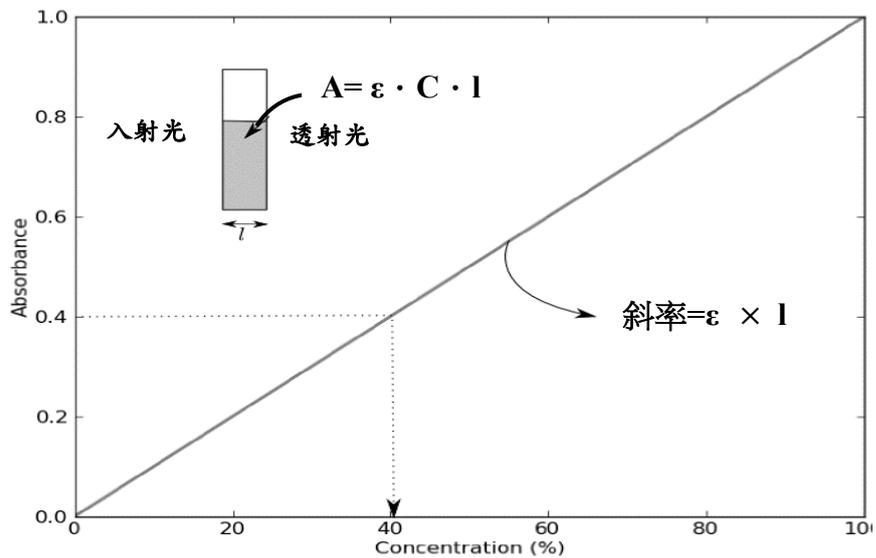


圖 5.比爾定律與檢量線(本圖為作者/指導老師使用 powerpoint、word 軟體繪製。)

### 參、研究設備及器材

表 1.實驗器材及設備

<b>藥品:</b>	乙醇( $C_2H_5OH$ )、氨水( $NH_4OH$ )、溴化十六烷基三甲銨(CTAB)、四乙氧基矽烷(TEOS)、3-氨基丙基三乙氧基矽烷(APTES)、單寧(Tannin)、丙酮(Acetone)、氯化亞鐵( $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ )、氯化鐵( $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ )、氫氧化鈉( $NaOH$ )。
<b>耗材及器皿:</b>	燒杯、1mL量筒、1mL針筒、250mL圓底燒瓶、錐形瓶、10mL容量瓶、20mL樣本瓶、鋁箔紙、塑膠手套、秤紙、刮勺、玻棒、攪拌子、標籤紙、強力鉤磁鐵、溫度計、小飛碟Syringe Filter、parafilm、拭鏡紙。
<b>儀器及軟體:</b>	五位數電子天平(shimadzu)、電磁加熱攪拌器(CORNING)、超音波震盪機、烘箱、紫外-可見光譜儀(Agilent Cary8454 UV-VIS,190-1100 nm)、傅立葉轉換紅外光譜(FT-IR)、X-射線繞射分析儀(PXRD)、穿透式電子顯微鏡(TEM)、高效液相層析(HPLC)、離心機、溶氧分析儀。



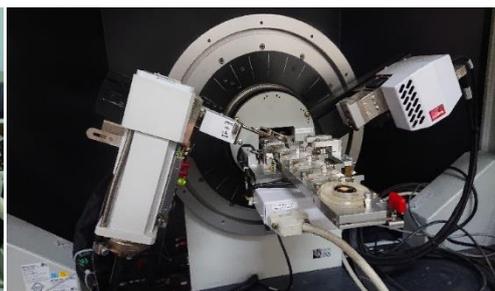
A.比表面積孔洞分析儀(BET)



B.穿透式電子顯微鏡(TEM)



C.紅外線光譜儀(FT-IR)



D.紫外-可見光譜儀(UV-Vis)

E.X 光粉末繞射儀(PXRD)

F.真空手套箱

圖 7.研究設備及儀器介紹(本照片由第 1 指導教師或作者經實驗室同意後拍攝)

## 肆、研究過程及方法

### 一、研究架構流程圖：

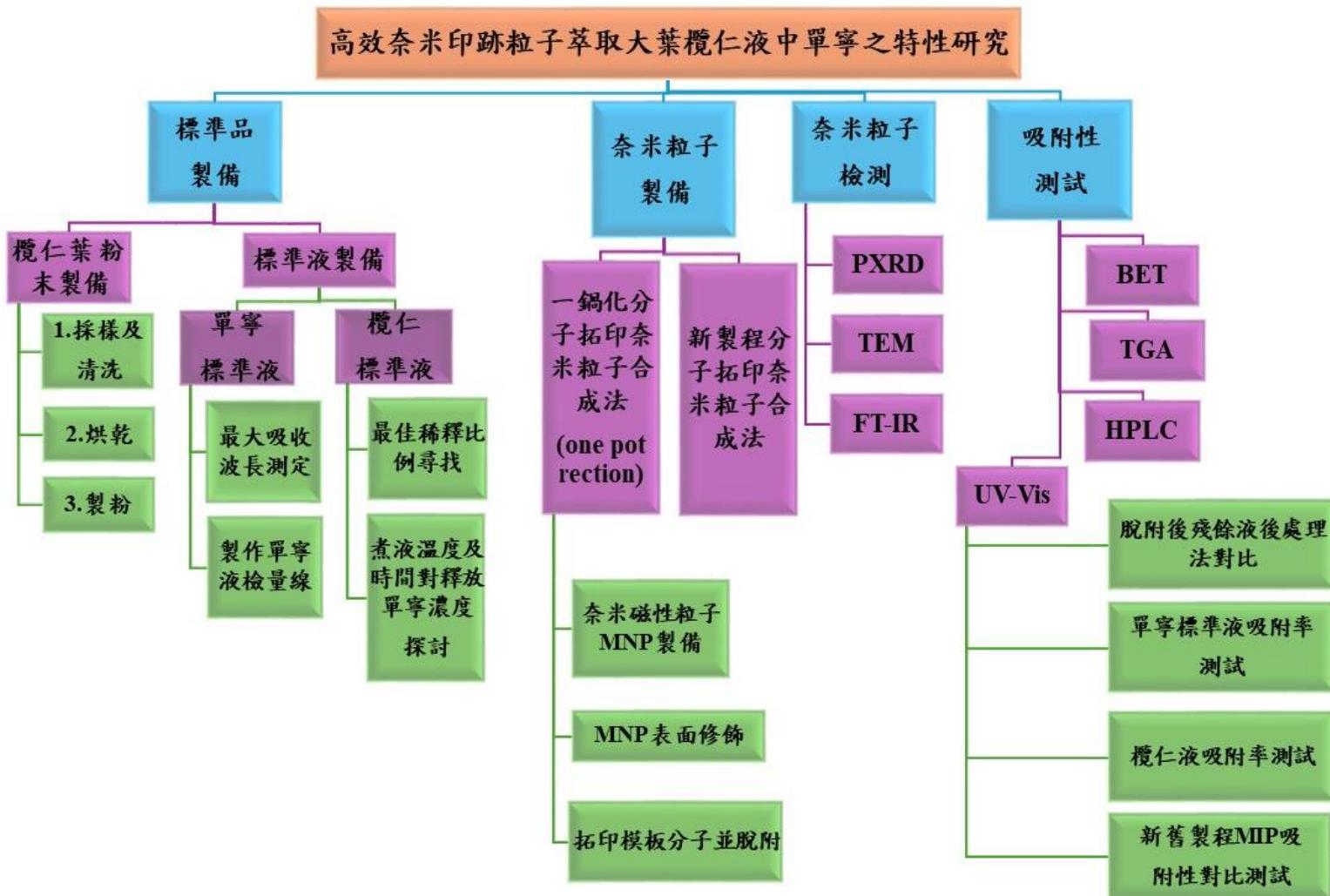


圖 8.實驗流程設計(本圖為作者/指導老師使用 powerpoint 軟體繪製。)

### 二、一鍋化分子拓印奈米粒子合成法及標準欖仁葉試樣粉末之製備

#### (一)製備奈米磁性鐵粒子MNP製備

- 1.量筒量取50mL去離子水加入150mL燒杯內，置於電磁加熱攪拌器上加熱溫度設定85°C。
- 2.天平精稱1.625gFeCl<sub>2</sub>、1gFeCl<sub>3</sub>、0.182g CTAB於燒杯攪拌反應，轉速400rpm，溫度85°C。
- 3.固體試樣全溶後加入5mL氨水，反應時間120min，丙酮洗脫並烘箱45°C烘乾3小時，即可獲得奈米磁性氧化鐵粒子(MNP)。

## (二) MNP表面修飾及拓印模板分子-單寧

### 1.表面修飾

(1)燒杯中加入皆為2mL的氨水、去離子水、四乙氧基矽烷(TEOS)和3-氨基丙基三乙氧基矽烷(APTES)，室溫下以400rpm攪拌6小時。

(2)丙酮洗脫，45°C烘乾3小時，獲得表面修飾奈米鐵產物。

### 2.拓印模板分子

(1)電子天平精秤0.1g單寧加入燒杯攪拌均勻，室溫下靜置反應6小時。

(2)上述(一)、(二)的反應不以丙酮洗脫後處理，反應時間到便加入反應試劑稱之一鍋化反應。

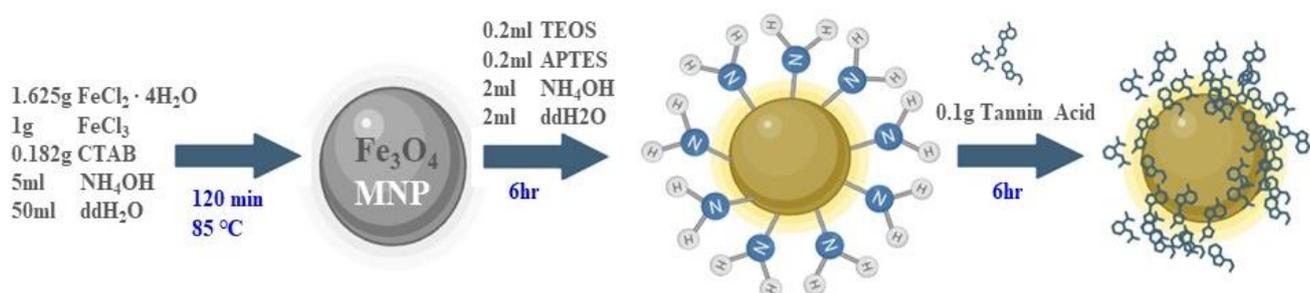


圖 9.一鍋化分子拓印奈米粒子合成法(本圖為作者/指導老師使用 Biorender 軟體繪製。)

## (三)丙酮溶劑洗脫單寧分子製取MIP

### 1.丙酮脫附

(1)量取10mL丙酮作為脫附溶劑，加入燒杯並以parafilm包覆杯口。

(2)燒杯置於超音波震盪機內，頻率設定42kHz，震盪3分鐘。

(3)強力鉤磁鐵置於燒杯底部吸附修飾後的MNP奈米粒子，靜置吸附30秒後倒除丙酮剩餘液。

### 2.洗淨後處理

(1)重複上述洗淨步驟10次，燒杯置於45°C烘箱內風乾，收集得到MIP奈米粒子秤重計算產率。

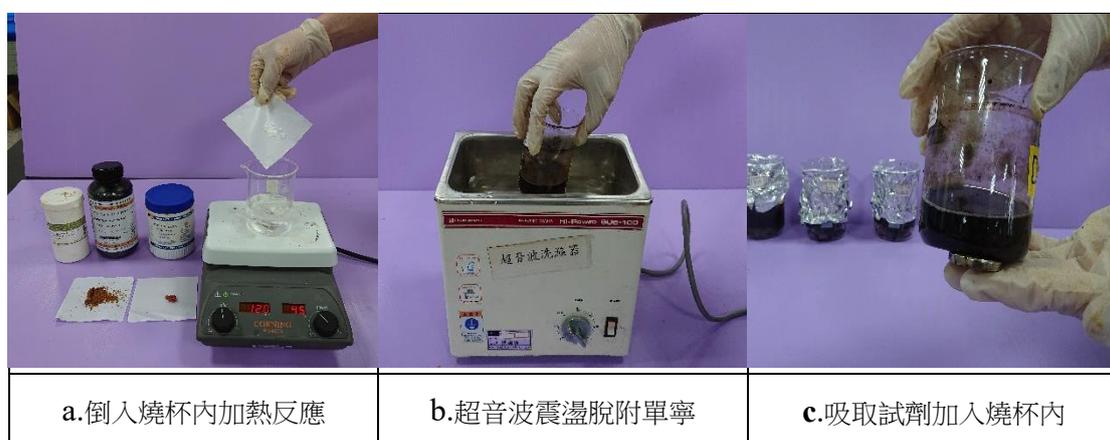


圖 10.一鍋化分子拓印奈米粒子合成法(本照片為作者/指導老師拍攝。)

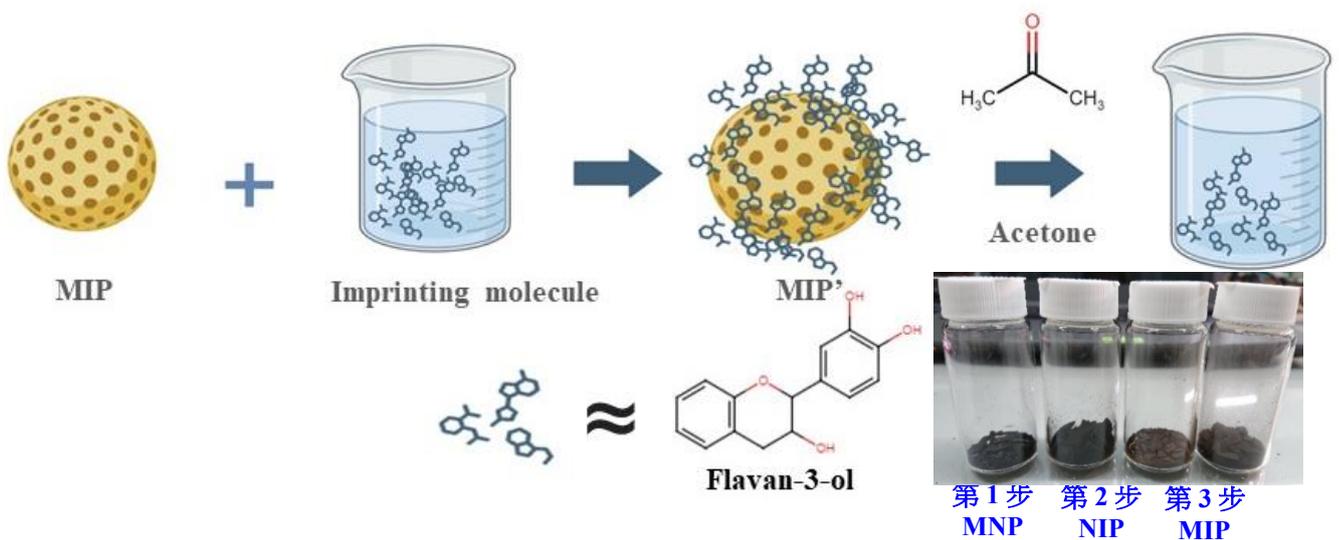


圖 11.MIP 吸附欖仁液中單寧、丙酮洗脫後處理及 3 步產物照  
(圖片為作者/指導老師使用 Biorender 製圖)

#### (四)上機檢測MNP及MIP

1. PXRD檢測:比較MNP及MIP奈米顆粒的以繞射峰位置 $2\theta$ 與繞射峰相對強度等繞射特徵，和文獻數據(JCPDS或ICDD)對比，以檢驗奈米粒子的完整性。(自費送測貴儀)
2. FT-IR:檢測MNP在表面修飾前後，官能基的差異性。(自費送測貴儀)
3. TEM:檢視奈米粒子粒徑。(自費送測貴儀)
4. BET:比表面積分析儀測定氮氣吸脫附等溫線。(自費送測貴儀)

### 三、單寧標準品檢量線訂定

#### (一)單寧最大吸收光譜波長尋找實驗

- 1.精秤26.5mg單寧置於燒杯內並加入50ml去離子水，於 $25^{\circ}\text{C}$ 、轉速400rpm攪拌至完全溶解。
- 2.取1ml單寧溶液加入100ml容量瓶，並加去離子水至瓶頸刻度線處，蓋瓶蓋搖晃均勻混合。
- 3.取2ml單寧液於Cuvette中置入UV分析槽，掃波長200-1100nm找最大吸收度之波長。

#### (二)製作單寧標準品檢量線

- 1.精秤26.5mg、20.0mg、13.2mg、6.6mg、3.3mg、1.6mg單寧粉加去離子水攪拌至完全溶解。
- 2.100ml容量瓶配製0.156、0.117、0.078、0.039 mM、0.0195、0.00975mM標準液。
- 3.取2.0ml單寧標準液加入Cuvette中置於UV分析槽，測定波長199 nm、279 nm波峰吸收度。
- 4.以Excel繪製吸收度-濃度散佈圖，加上趨勢線並於圖上顯示線性公式及R平方值( $R^2$ )。

## 五、欖仁液標準品製備

### (一)標準欖仁葉試樣粉末製備

- 1.校園採集秋冬大葉欖仁樹落葉，水洗落葉後以3300流明強光探照燈光照6小時乾燥。
- 2.以果汁機30000轉將樹葉打碎成粉，均勻研磨10分鐘。



圖 12. 標準欖仁葉試樣粉末之製備過程(本照片為作者/指導老師拍攝。)

### (二)欖仁液標準品最佳稀釋比例尋找

- 1.秤1g欖仁葉粉末置於250mL圓底燒瓶，加入100mL去離子水，放入攪拌子，用加熱包加熱，並置於電磁加熱攪拌器上攪拌，設定轉速360rpm，溫度85°C，煮50min。
- 2.以分度吸量管吸取欖仁液1mL加入樣本瓶內，各別加去離子水1mL、3mL、4mL、9mL、24mL於樣本瓶，達到1:2、1:4、1:5、1:10、1:25等稀釋倍率，搖晃均勻混合。
- 3.取出2ml欖仁液，加入比色皿Cuvette中，以紫外光譜儀測定波長279 nm波峰的吸收度。
- 4.以單寧標準品檢量線回歸方程求欖仁液中單寧含量。

### (三)不同煮液溫度及煮液時間對欖仁葉釋放單寧濃度的探討

- 1.確認最佳稀釋比例後，如(二)1、2步驟並依最佳稀釋比例製備欖仁標準液。
- 2.煮液操縱變因設定:
  - (1)煮液溫度為40、55、70、85、100°C。
  - (2)煮液時間為5、10、15、20、25、30、35、40、45、50min。
- 3.以紫外光譜儀測定波長279 nm波峰的吸收度，以單寧標準品檢量線回歸方程求欖仁液中的單寧含量，以探討各變因造成欖仁液中單寧含量變化。

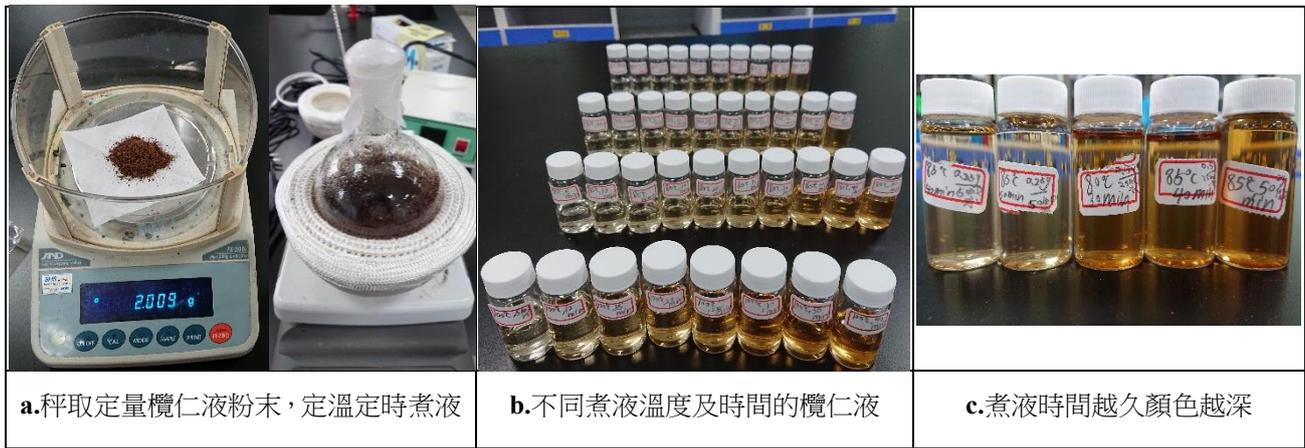


圖 13. 標準欖仁液煮液過程及成品照(本照片為作者/指導老師拍攝。)

## 六、微孔比表面積與孔徑分布測定

### (一)比表面積及孔洞特性分析儀 BET 上機樣品前處理

- 1.關閉樣品室閥門，打開樣品室、真空一(視壓力情況打開真空二)閥門，抽真空。
- 2.待壓力下降後，等待1~2分鐘。
- 3.關閉真空一、真空二閥門，打開樣品室、外氣室閥門，二次抽真空。
- 4.輕輕敲實樣品管內樣品，勿過度用力敲擊樣品管。

### (二)上機測定

- 1.上機條件:樣品孔比表面積大於1000樣品量需大於0.05g，比表面積大於200則需大於0.2g，而比表面積大於5則需大於1.5g，使用氮氣 $N_2$ 作為脫附氣體，熱分解溫度大於 $400^{\circ}C$ 。
- 2.測定吸附線isotherm，計算比表面積BET、孔徑分布DFT pore size。

## 七、欖仁標準液中單寧吸附性測試

### (一)MIP吸附標準單寧液後，4種後處理法對比：

- 1.秤0.17g單寧，加50mL去離子水，並加入攪拌子，設定轉速360rpm，於 $25^{\circ}C$ 下攪拌。
- 2.將單寧液濃度稀釋1/25，以滴管取出1mL單寧液，加入25mL容量瓶內，並加去離子水至刻度線處，混合均勻。
- 3.容量瓶內取出3mL單寧溶液於樣本瓶中，再加0.02g的MIP奈米粒子，將樣本瓶置於超音波震盪機，每次震盪3分鐘，頻率設定42kHz。

4.後處理法操縱變因:

- (1)濾紙抽氣過濾。
- (2)鈷磁鐵於樣本瓶底部吸附1分鐘後吸取澄清液。
- (3)離心機4000rpm離心3分鐘。
- (4)以Syringe Filter過濾。

5.上述4種後處理濾除MIP粒子後，取2mL吸附後殘餘液加入Cuvette中，以紫外光譜儀測定279 nm波峰的吸收度，比較4種後處理法的差異。

(二)標準單寧液吸附測試：不同質量的奈米粒子對吸附率的影響

- 1.按(一)1、2步驟配製標準單寧溶液。
- 2.容量瓶內取出3mL單寧溶液於樣本瓶中，再加入不同質量的MIP，將樣本瓶置於超音波震盪機，每次震盪3分鐘，頻率設定42kHz。
- 3.操縱變因: MIP奈米粒子各別為0.02g、0.04g、0.06g、0.08g、0.10g、0.12g。
4. MIP過濾採複合方式，以鈷磁鐵於樣本瓶底部吸附1分鐘後，用1mL針筒吸取澄清液，再以Syringe Filter過濾得吸附後殘餘液。
- 5.取2ml殘餘液加入比色皿Cuvette中，上機觀測波長279 nm波峰的吸收度，比較不同質量的MIP奈米粒子對吸附率的差異。
- 6.重複上述步驟1-5，改加入不同質量的MNP、NIP及MIP奈米粒子，比較三步產物奈米粒子吸附率的差異。

$$7. \text{吸附率} = \left[ 1 - \left( \frac{\text{殘餘液於279nm的吸收度}}{\text{吸附前單寧標準液於279nm的吸收度}} \right) \right] \times 100\%$$

(三)標準欖仁液吸附測試：不同質量的奈米粒子對吸附率的影響

- 1.按實驗五(二)步驟1、2，並採取加熱溫度100°C，加熱時間50分鐘，並採取1:4的稀釋倍率製備標準欖仁液。
- 2.重複實驗七(二)步驟2至6，進行吸附測試。

## 八、脫附液萃取率分析及 HPLC 鑑定

### (一)MIP吸附單寧標準液後脫附液之製備

- 1.按實驗七(二)步驟1、2，並加0.002、0.004、0.008、0.012g MIP進行吸附性測試。
- 2.按實驗七(二)步驟3，過濾所得MIP置於樣本瓶內並加入3ml乙醇，樣本瓶置於超音波震盪機，震盪3分鐘，震盪頻率設定42kHz，此溶液變為脫附液。
- 3.按實驗七(二)步驟3後處理後的脫附液及吸附前的單寧標準液，以光譜儀觀測279 nm吸收度並送測HPLC。

### (二)MIP吸附欖仁標準液後脫附液之製備

- 1.按實驗五(二)步驟1、2，並採取加熱溫度100°C，加熱時間50分鐘，並採取1:5的稀釋倍率製備標準欖仁液。
- 2.重複實驗八(一)步驟1，以0.012g MIP 奈米粒子吸附欖仁標準液
- 3.重複實驗八(一)步驟2及3製備吸附欖仁標準液後之脫附液，測定UV並送測HPLC。



圖 14. 高效液相層析儀照(本照片由第 1 指導教師或作者經實驗室同意後拍攝。)

## 伍、研究結果

### 一、紅外線光譜儀(FT-IR)檢測結果

#### (一)樣品上機前處理: KBr 打錠

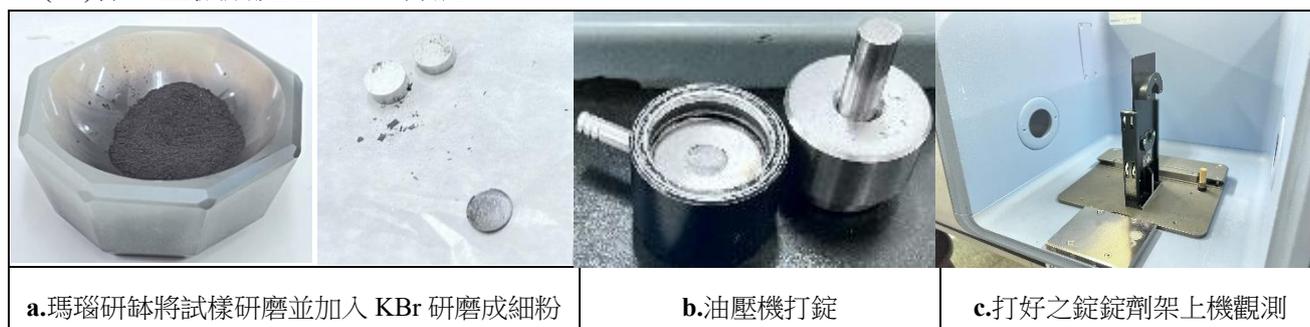


圖 15. FT-IR 樣品上機前處理(本照片由第 1 指導教師或作者經實驗室同意後拍攝)

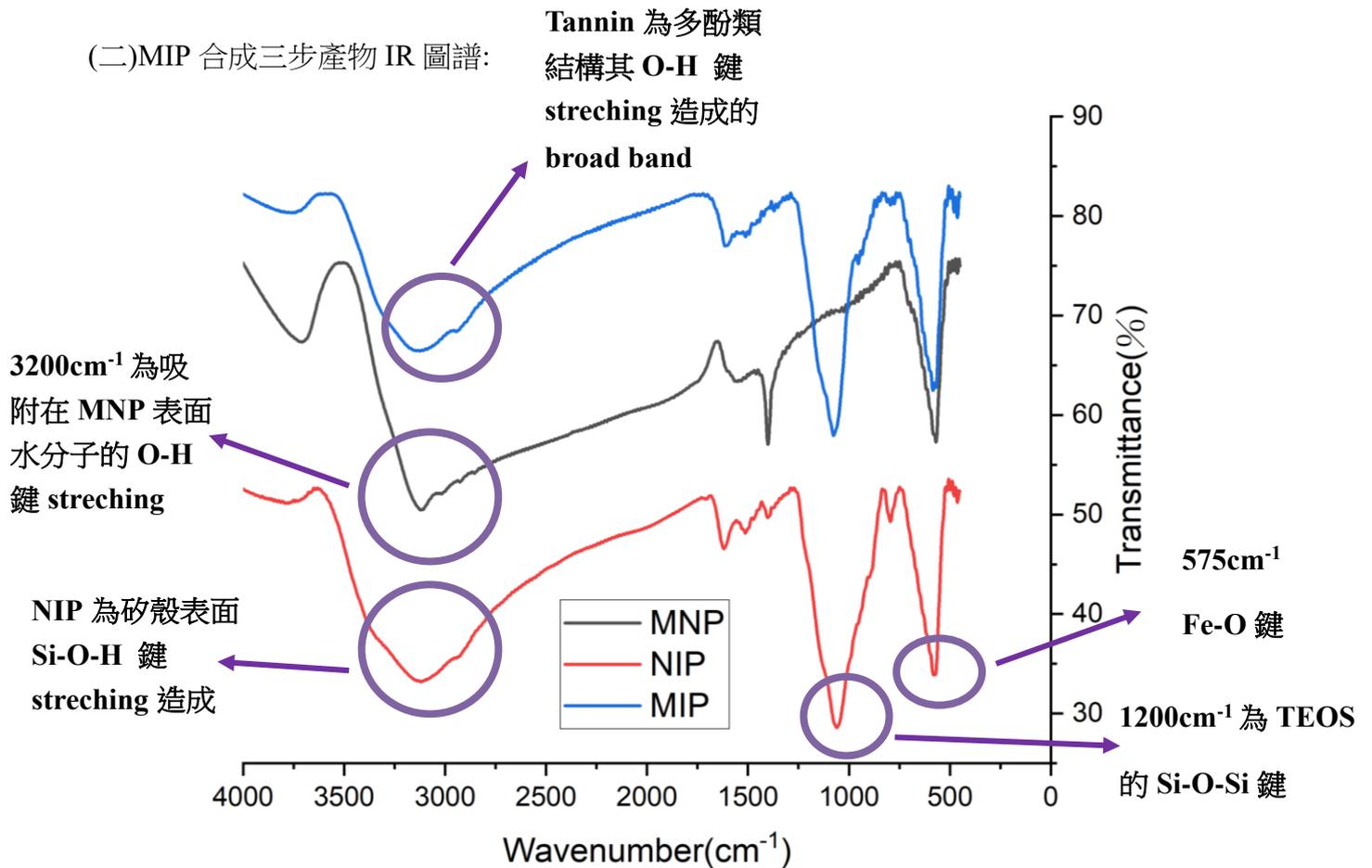


圖 16. 三步產物 IR 圖譜對比(本圖為作者/指導老師使用 Origin 軟體繪製。)

(三)實驗結論：由圖16，分析得知

1. 三圖皆有 575cm<sup>-1</sup> 吸收峰為 Fe-O 鍵 stretching 所致，由圖 A 及 B 對比得知，MNP 在加入 TEOS 後，NIP 及 MIP 明顯多 1200cm<sup>-1</sup> 的 peak，此為 MNP 和 TEOS 進行交聯反應，TEOS 的 Si-O-Si 鍵 stretching 造成。再由圖對比得知，MNP 在加入 TEOS、及 APTES 並充分反應後，1200cm<sup>-1</sup> 的訊號的消失代表 TEOS 的酯基充分水解成矽醇使 MNP 包覆矽殼，而在 MNP 圖於 3550cm<sup>-1</sup> 有一根較為 broad 的 peak，此為吸附在 MNP 表面水分子的 O-H 鍵 stretching 造成，NIP 圖及 MIP 圖可見相較於 MNP 有較為 broad 的峰值，為 TEOS 進行交聯反應後生成矽殼包覆 MNP，裸露在矽殼外 Si-O-H 鍵 stretching 造成，佐證了使用溶膠凝膠法包覆 MNP 矽殼的反應完成度，NIP 與 MIP 圖相似，但在指紋區 1700 cm<sup>-1</sup> 仍可見細微的差異性。

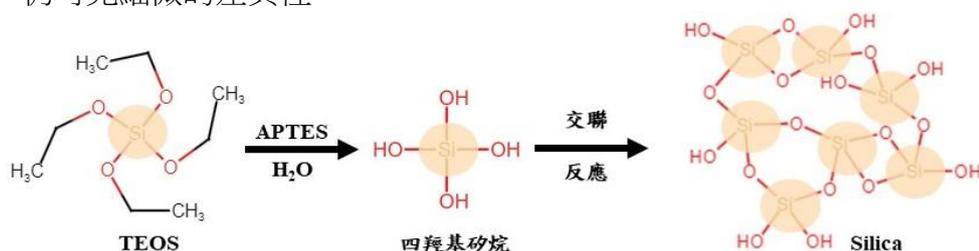


圖 17. TEOS 在鹼性環境下水解縮合進行交聯反應生成矽殼包覆 MNP

(本圖為作者/指導老師使用 Powerpoint 及 chemical-sketch 繪製。)

## 二、X 光粉末繞射儀(PXRD)檢測結果

### (一) PXRD 粉末繞射圖

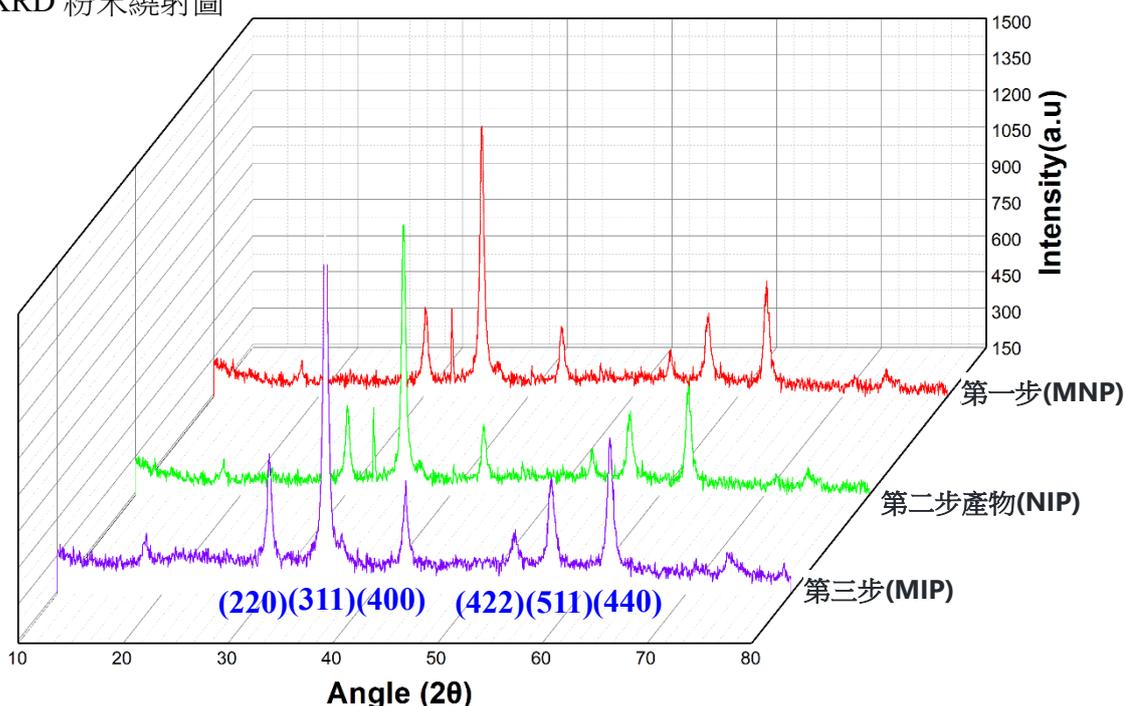


圖 18. 三步合成產物 PXRD 圖(本圖為作者/指導老師使用 Origin 軟體繪製。)

(二)實驗結論：由圖18分析得知 (標準圖譜請參考評作品講解投影片附錄五圖 43，引用自 JCPDS(#75-0033))

- 1.可知奈米磁性氧化鐵粒子(MNP)主要有6根強度峰，分別在 $2\theta$ 值 $30.1^\circ$ 、 $35.5^\circ$ 、 $43.1^\circ$ 、 $53.4^\circ$ 、 $57.0^\circ$ 、 $62.6^\circ$ 對照國際衍射數據中心(ICDD)資料庫，可知依次為MNP奈米鐵 $Fe_3O_4$ 的(220)、(311)、(400)、(422)、(511)、(440)晶面所造成。
- 2.由圖可知奈米磁性氧化鐵粒子(MNP)再加入TEOS包覆系殼後多數peak訊號並未消失或減弱，但MIP相較於前兩步產物在 $2\theta$ 值 $32.5^\circ$ 的minor peak消失了。
- 3.由圖18疊圖第一、二步產物和第3步產物MIP對比可知，在拓印單寧分子前後，二圖強度峰的 $2\theta$ 值位置幾乎相同，因二者皆包含奈米磁性氧化鐵MNP的晶形顆粒，從PXRD圖無法看出拓印單寧分子前後的區別，因MNP表面修飾劑TEOS、APTES及單寧分子為有機物皆非晶態PXRD無法獲取相關訊息，故加入試劑不會成強度峰的偏移。

## 三、穿透式電子顯微鏡(TEM)檢測結果

### (一) TEM 上機樣品前處理

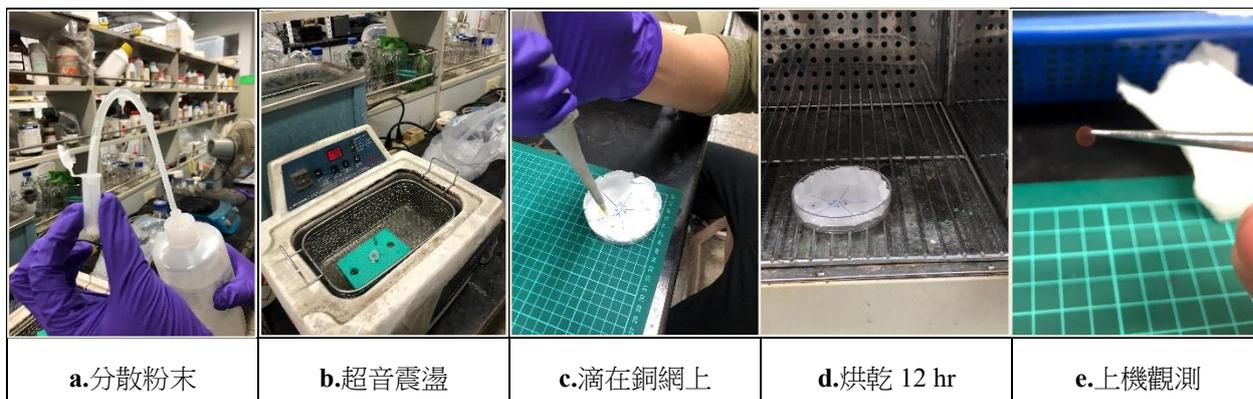


圖 19. TEM 樣品上機前處理(本照片由第 1 指導教師或作者經實驗室同意後拍

(二) MNP 不同倍率下的電顯圖

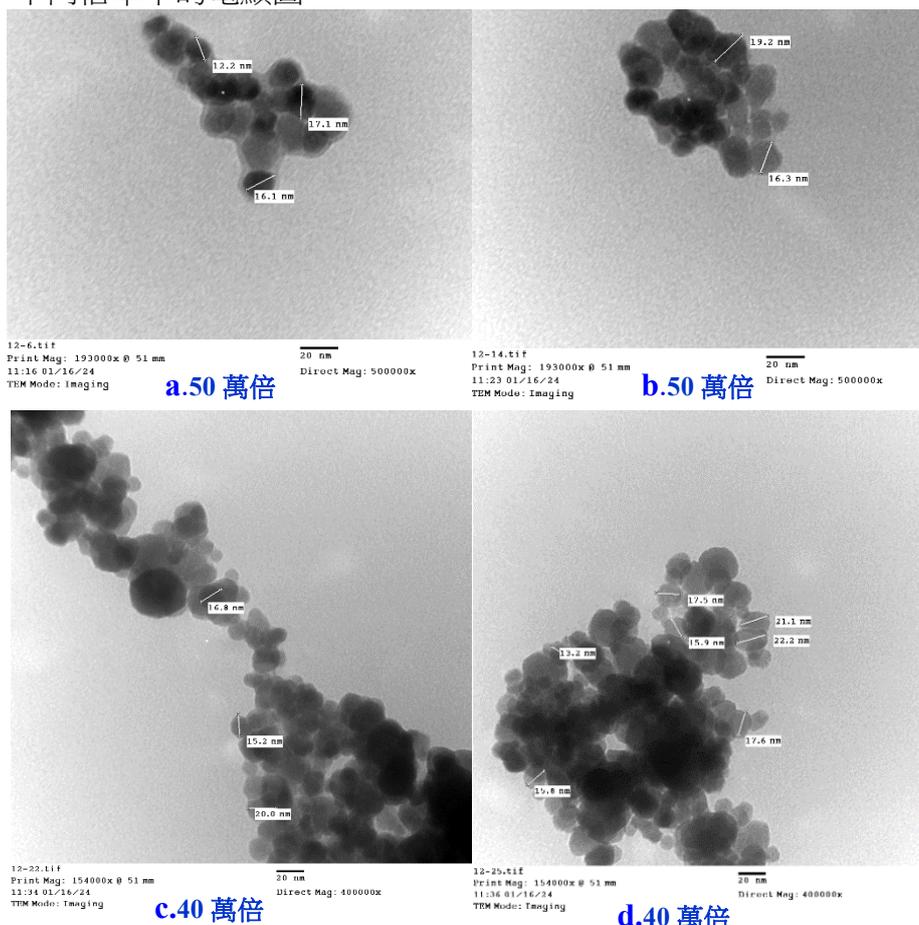
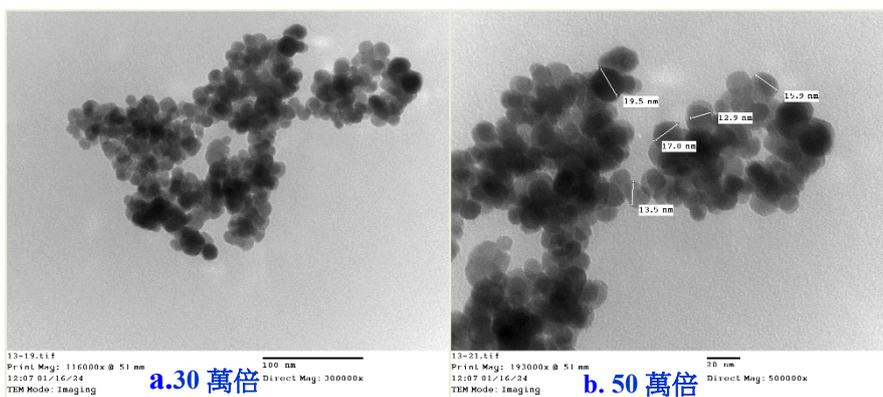


圖 20. MNP 電顯圖(圖形下方附有尺標，本照片由自費送測貴儀中心取得)

(三) MNP 加 TEOS 及 APTES 後表面修飾的產物電顯圖



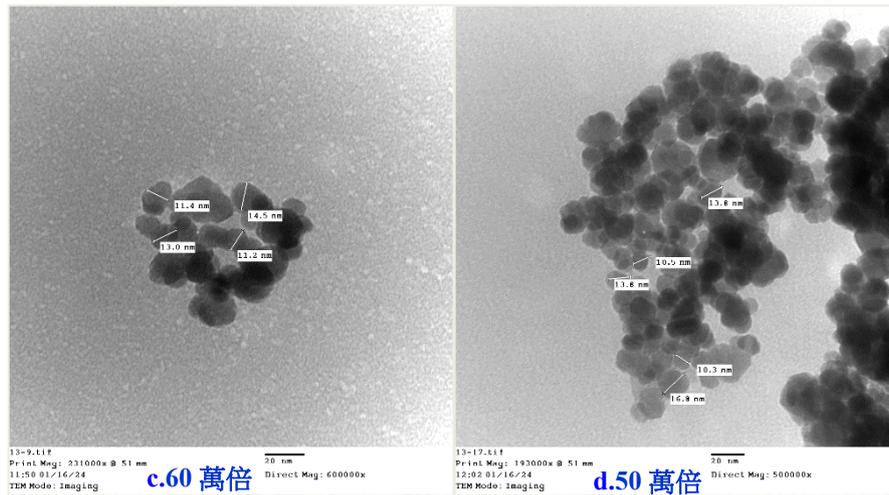


圖 21.第二步產物電顯圖(圖形下方附有尺標，本照片由自費送測貴儀中心取得)

(四)第三步產物 MIP 電顯圖

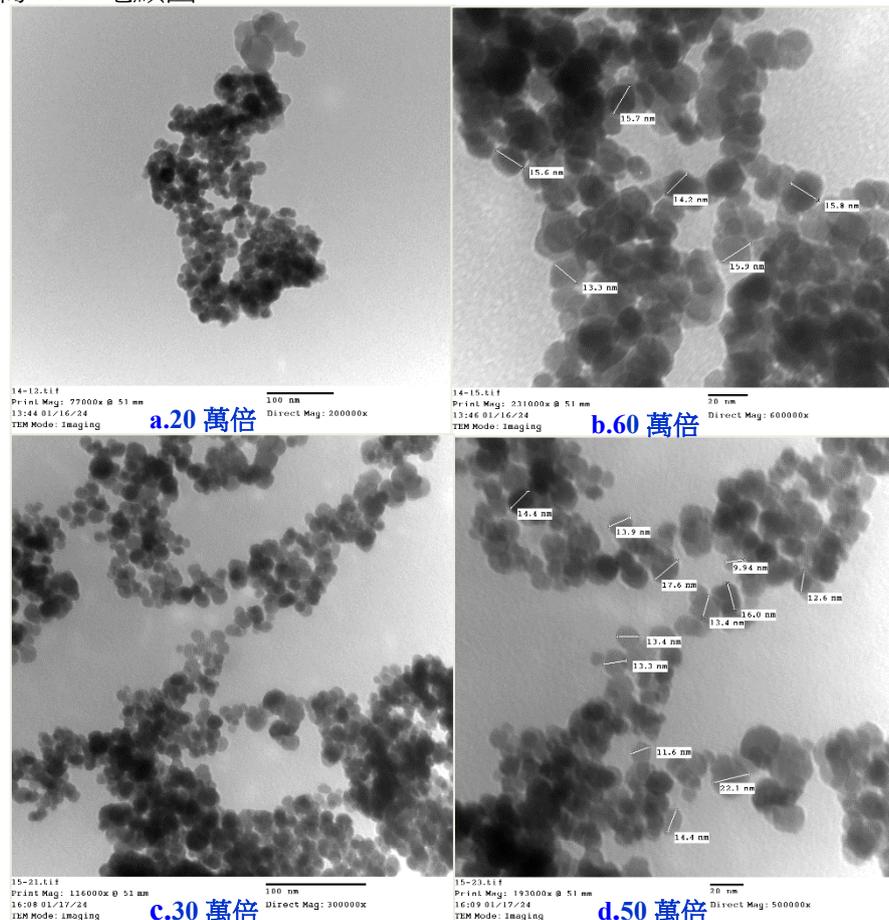


圖 22.第三步產物 MIP 電顯圖(圖形下方附有尺標，本照片由自費送測貴儀中心取得)

(四)實驗結論：由圖19-22所示

由圖20分析知MNP平均粒徑介於12.2-20.0nm間，由圖21分析知MNP加入TEOS表面包覆矽殼後並加入APTES於矽殼表面修飾胺基後，平均粒徑達到13.0-19.5間，粒徑較包覆矽殼前增加，粒徑增加因此時溶劑為水，TEOS水解成矽烷的反應仍然持續進行，矽殼厚度仍持續增加，而由圖22可知在拓印完單寧分子後，MIP的粒徑介於13.4-22.1nm間，平均粒徑增加因使用丙酮作為溶劑脫附模板分子-單寧，仍有少量單寧分子被矽烷包覆無法完全洗脫乾淨，故造成如圖22所示個別粒徑差異甚大。

#### 四、單寧標準品檢量線訂定

##### (一)單寧最大吸收光譜波長尋找實驗

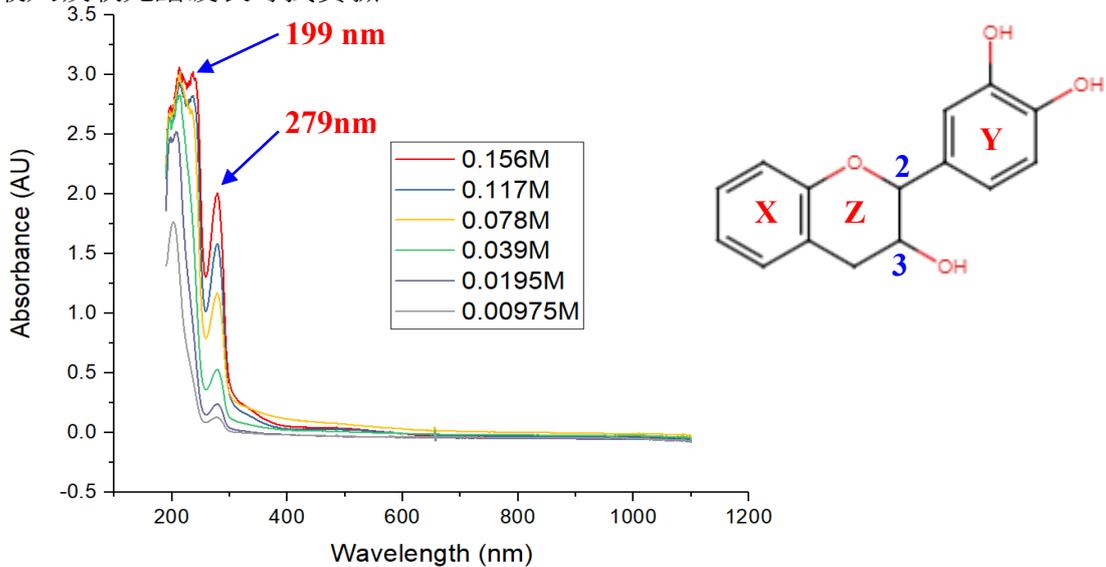


圖 23.單寧最大吸收光譜波長尋找實驗及各濃度下之吸收度(本圖為作者/指導老師使用 Origin 軟體繪製。)

##### (二)實驗結論：如圖23所示

1.不同濃度之單寧水溶液，測到的吸光度不同，但是最大吸收波長都在199 nm及279 nm，因此製作單寧標準品檢量線，選用測定波長199 nm及279 nm波峰的吸收度。

2.經文獻查詢可知279 nm為兒茶素(Catechin)的特性吸收峰。

##### (三)製作單寧標準品檢量線：

1.測定波長199 nm特性吸收峰的吸收度(詳請參考表2及圖24)

2.測定波長279 nm特性吸收峰的吸收度(詳請參考表3及圖25)

表 2.單寧標準液波長 199 nm 吸收度測定數據

項次	1	2	3	平均	標準差
單寧濃度 (mM)	吸光值				
0.156	2.5514	2.5414	2.9214	2.6714	0.2166
0.117	2.2984	2.5284	2.9084	2.5784	0.3081
0.078	2.4192	2.4992	2.9992	2.6392	0.3143
0.039	2.2494	2.5494	2.8194	2.5394	0.2851
0.0195	2.3135	2.3735	2.6135	2.4335	0.1587
0.00975	1.5571	1.6371	1.9571	1.7171	0.2117

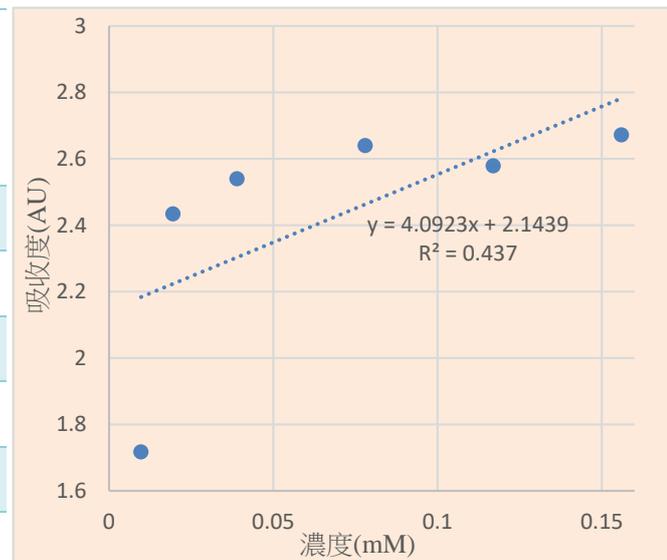


圖 24.測波長 199 nm 吸收度檢量線圖 (本圖為作者/指導老師使用 EXCEL 繪製。)

表 3.單寧標準液波長 279nm 吸收度測定數據

項次	1	2	3	平均吸光值	標準差
單寧濃度 (mM)					
0.156	1.9264	2.0184	2.0804	2.0084	0.0775
0.117	1.4566	1.6166	1.6686	1.5806	0.1105
0.078	1.1538	1.1628	1.1868	1.1678	0.0171
0.039	0.5149	0.5217	0.5462	0.5276	0.0165
0.0195	0.2147	0.2417	0.2567	0.2377	0.0213
0.00975	0.1156	0.1236	0.1406	0.1266	0.0128

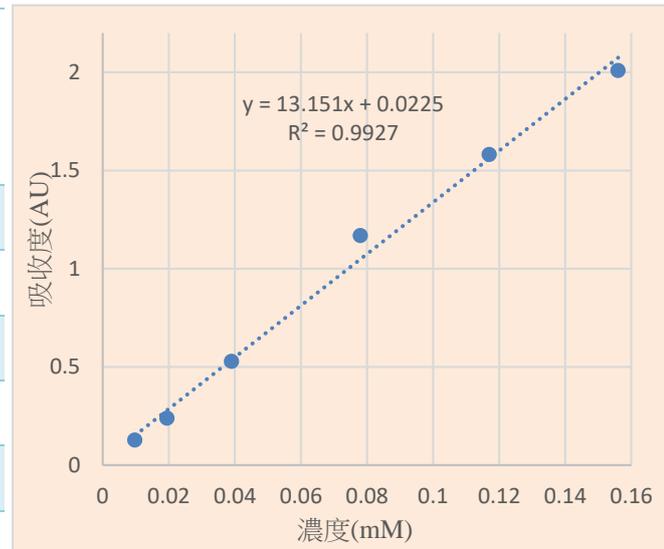


圖 25.測波長 279 nm 吸收度檢量線圖  
(本圖為作者/指導老師使用 EXCEL 繪製。)

(四)實驗結論：如圖24、25所示

- 1.由圖24可知選定波長199 nm測定吸收度時，濃度越濃吸收度未必越高，且線性回歸值 $R^2$ 為0.437遠低於1，相較於279 nm的 $R^2=0.9927$ 較接近1線性良好，且波長199 nm多數吸收度皆超過2，根據Beer's Law，當溶液低濃度時，溶液吸收度和濃度才具良好線性關係Beer's Law才適用，當吸收度超過2時即代表穿透度小於1/100，此溶液**濃度過濃**，已不適用**線性關係濃度和吸收度的對應已具明顯偏差**，由圖25可知選定波長279 nm測定吸收度時，隨濃度增加吸收度明顯線性成長，故選定波長279 nm吸收度來製作單寧標準液檢量線。
- 2.單寧標準品濃度個別為0.156mM、0.117mM、0.078mM、0.039mM、0.0195mM、0.00975mM，在279 nm吸收度依序為： $(2.0084 \pm 0.0775)$ 、 $(1.5806 \pm 0.1105)$ 、 $(1.1678 \pm 0.0171)$ 、 $(0.5276 \pm 0.0165)$ 、 $(0.2377 \pm 0.0213)$ 、 $(0.1266 \pm 0.0128)$ 。
- 3.不同濃度單寧標準液呈現**濃度愈高吸收度上升越多**，其判定係數 $R^2 = 0.9927$ 。
- 4.由圖25之迴歸方程式： $y = 13.151x + 0.0225$ 以推算欖仁液中的單寧含量，而**檢量線的斜率13.151**即比爾定律 $A = \epsilon \cdot C \cdot l$ 中的 $\epsilon$ 為吸光比例係數。

## 五、欖仁液標準品製備

(一)欖仁液標準品最佳稀釋比例尋找

表 4.不同稀釋比例欖仁液於 279 nm 吸收度測定數據

實驗次數	1	2	3	平均	標準差	單寧含量
稀釋比例				吸光值	單寧含量 (mM)	
原液	2.4127	2.4197	2.4387	2.4237	0.0135	0.1826
1:2	1.9424	1.9584	2.0194	1.9734	0.0406	0.1483
1:4	1.3463	1.4013	1.4173	1.3883	0.0372	0.1039
1:5	1.0365	1.0705	1.0865	1.0645	0.0255	0.0792
1:10	0.4377	0.4797	0.5607	0.4927	0.0625	0.0358
1:25	0.2274	0.2274	0.2514	0.2354	0.0139	0.0162

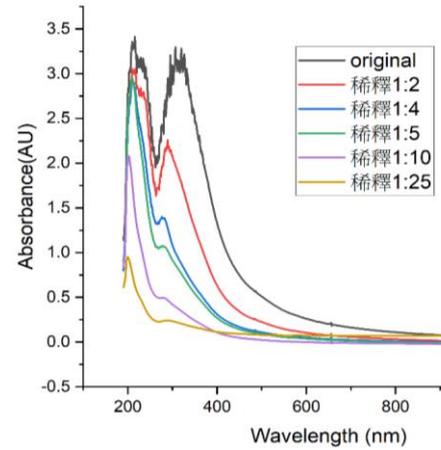


圖 26.欖仁液標準品最佳稀釋比例尋找 (本圖為作者/指導老師使用 Origin 繪製)

### (二)實驗結論：如表4所示

- 由表4可知電子天平精秤1g標準欖仁葉試樣粉末配製成100ml溶液，並設定加熱條件煮液溫度設定85°C，煮液時間50min，攪拌子轉速設定360rpm，製得的欖仁原液各別稀釋達到1:2、1:4、1:5、1:10、1:25稀釋倍率，由表4可知濃度稀釋比愈高，吸收度下降越多。
- 由圖25標準單寧液檢量線迴歸方程式： $y = 13.151x + 0.0225$ 求欖仁液中的單寧含量，當稀釋比例1/2時，吸收度為2.0194則單寧含量為0.1483 mM，當稀釋比例1/5時吸收度為1.0645，則單寧含量為0.0792 mM，當稀釋比例1/25時，吸收度為0.2354，則單寧含量為0.0162 mM，對比原液與1:2稀釋液的吸收度與濃度，吸收度並未隨著濃度稀釋一半而減半，但對比1:5與1:10的稀釋倍率，吸收度約隨著濃度減半而變1/2，應證了Beer's Law 濃度與吸收度對應的線性關係僅適用於較低濃度，溶液吸收度小於2時才具普遍性。
- 紫外光譜最合適的吸收度範圍為0.2~0.7，當吸收度達1時待測溶液也會有著4%因歧光效應造成偏差，在越高濃度的情況下偏差越大，故本研究選定欖仁標準液稀釋比例為1:5。

### (三)不同煮液溫度對欖仁葉釋放單寧濃度的探討

#### 1.不同煮液溫度(40°C、55°C、70°C、85°C、100°C)吸收度變化UV-Vis圖譜

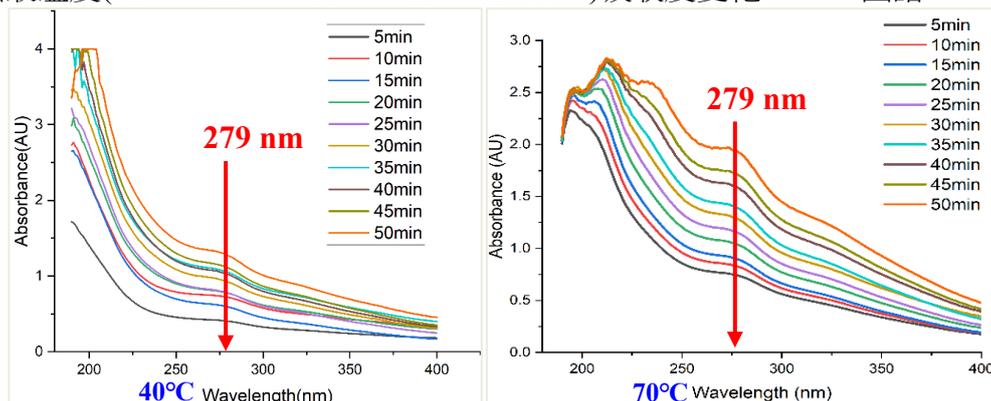


圖 27.不同煮液溫度對欖仁液中單寧含量變化(本圖為作者/指導老師使用 Origin 繪製)

(四)實驗結論：如圖27所示 (各煮液溫度對欖仁液中單寧含量變化請參照作品講解投影片附錄圖 27)

- 1.煮液條件及稀釋倍率請參考作品講解投影片附錄二。
- 2.由圖27可知在相同煮液溫度時，隨著煮液時間(5-50min，時距5min)增加，吸收度隨之上升，以煮液溫度85°C為例各煮液時間的吸收度請參考附錄二，煮液時間越久，欖仁葉釋放的單寧濃度越高，其中50min時釋放的單寧濃度為5min時3.87倍。
- 3.當吸收度超過1時，待測溶液會有顯著因歧光效應造成偏差，由圖27可知當欖仁液煮液時間最短5min且低溫40°C下的冷泡法，波長199 nm吸收度為1.4356，而當20min已達2.6388，吸收度已遠大於2，故選波長199 nm的吸收度作為判定單寧含量並不合宜，而波長279 nm 5min時吸收度為0.4062，10min時吸收度則為0.7792吸收度皆未超過1在良好線性範圍內。

(五)不同煮液時間對欖仁葉釋放單寧濃度的探討 (各時間圖詳請參照作品講解投影片附錄圖 28)

- 1.不同煮液時間(5-50min，時距 5min)吸收度變化 UV-Vis 圖譜

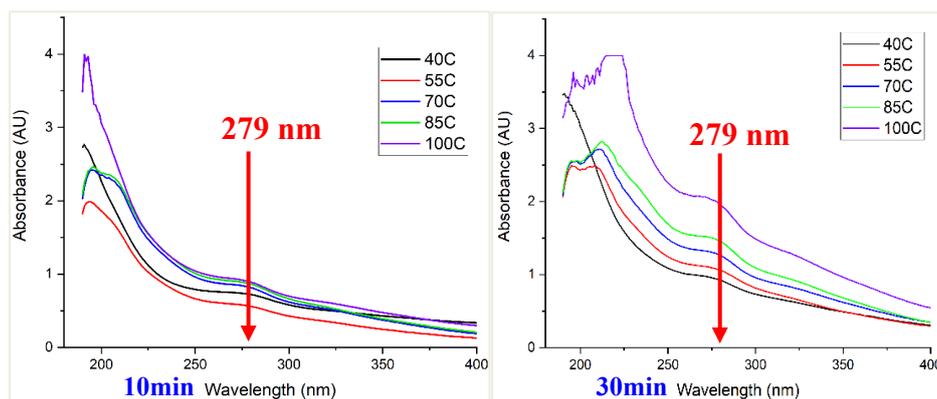


圖 28 不同煮液時間對欖仁液中單寧含量變化(本圖為作者/指導老師使用 Origin 繪製)

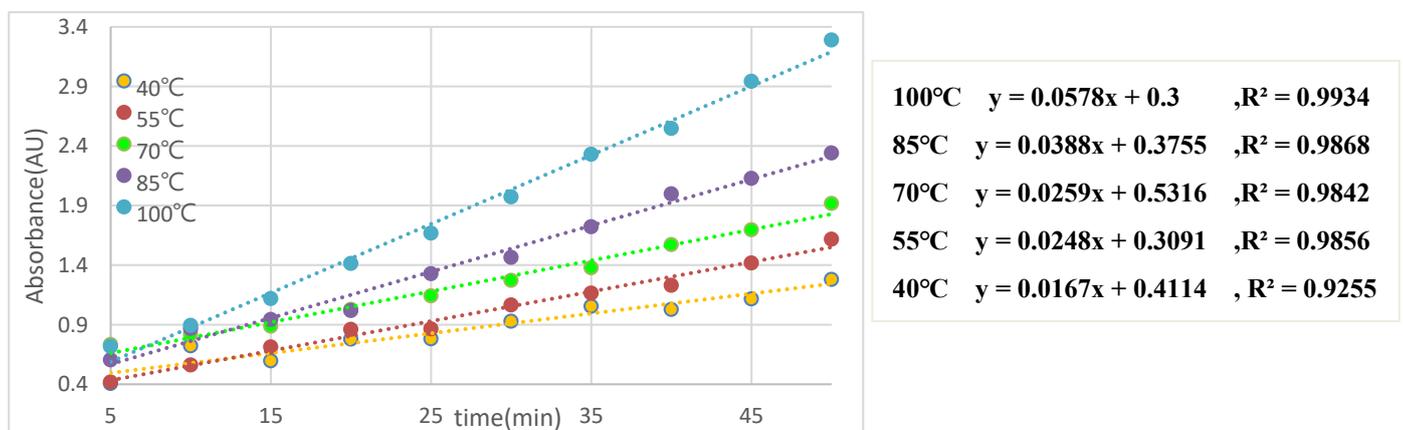


圖 29 不同煮液時間欖仁液於 279 nm 吸收度變化及線性回歸 R<sup>2</sup> 值 (本圖為作者/指導老師使用 EXCEL 繪製。)

(六)實驗結論：如圖28、29所示

- 1.同煮液時間內隨溫度升高吸收度增加，以30min為例各煮液溫度吸收度請參考作品講解投影片附錄三，溫度越高欖仁葉釋放單寧濃度越高100°C欖仁葉釋放濃度為40°C的2.13倍。
- 2.由圖29知不同煮液時間欖仁液吸收度變化，吸收度不僅隨煮液時間增加吸收度增加，且欖仁液隨煮液時間釋放單寧濃度，二者對應關係近乎線性，除40°C其R<sup>2</sup>值為0.9255外，其餘煮液溫度R<sup>2</sup>值皆在0.98以上，100°C線性回歸R<sup>2</sup>值甚至達0.9934，如100°C煮液10分鐘時吸收度為0.8939，20min時吸收度為1.4133近乎隨時間等倍率增加。

## 六、微孔比表面積與孔徑分布測定

(一)比表面積及孔洞特性分析儀 BET 上機樣品製備

- 1.依實驗七(二)標準單寧液吸附測試步驟1-4，配製標準單寧液並取3ml置於20ml樣本瓶中，加0.02g的MIP奈米粒子並超音波震盪，頻率設定42kHz，震盪3分鐘後，溶液倒入離心管，轉速設定4000轉離心3分鐘後取出，吸取上層澄清液，殘餘液倒入樣本瓶再加入5ml丙酮超音波震盪洗脫，鈷磁鐵於瓶底部吸附1分鐘後倒除丙酮，洗脫3次後45°C烘乾送測BET。

(二)BET 測定結果:表 5.MIP 粒子測定數據

Single point surface area (m <sup>2</sup> g <sup>-1</sup> )	BET surface area (m <sup>2</sup> g <sup>-1</sup> )	BJH Adsorption surface area (m <sup>2</sup> g <sup>-1</sup> )
50.3956	53.7238	48.2441
BJH Adsorption Pore volume (cm <sup>3</sup> g <sup>-1</sup> )	BJH Adsorption Pore size (Å)	Nanoparticle size Median pore width(Å)
0.270782	224.510	11.971

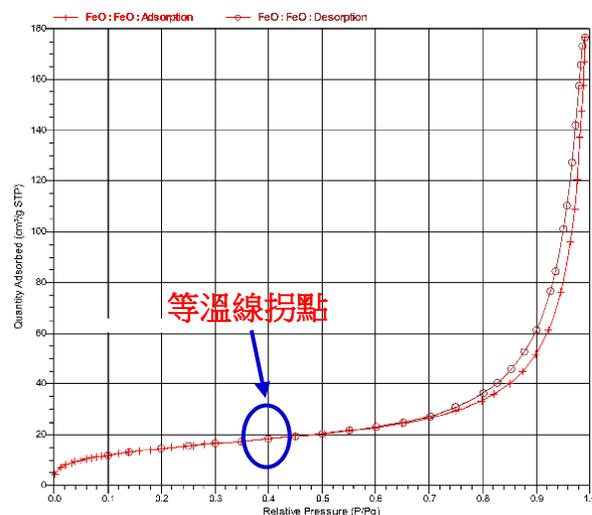


圖 30.MIP+tannin 吸附-脫附等溫線  
(本照片由自費送測貴儀中心取得)

實驗結論：BET 比表面積 53.72 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>，平均粒徑 11.97 Å 符合奈米尺度，由氮氣吸脫附等溫線知在較低的相對壓力下吸附量驟升且曲線上凸，等溫線拐點出現在單層吸附時，隨壓力的增加便逐步形成多層吸附，吸脫附曲線形成的回滯環為均勻孔模型，此型滯回線代表 MIP 粒子具較窄孔洞特性和 MIP 粒子為尺寸均勻的球形顆粒聚集體，這和 TEM 的觀測結論一致。

## 七、欖仁標準液中單寧吸附性測試

(一)單寧標準液稀釋 1/25 後以 MIP 吸附，4 種後處理法過濾 MIP 粒子其殘餘液吸收光譜圖

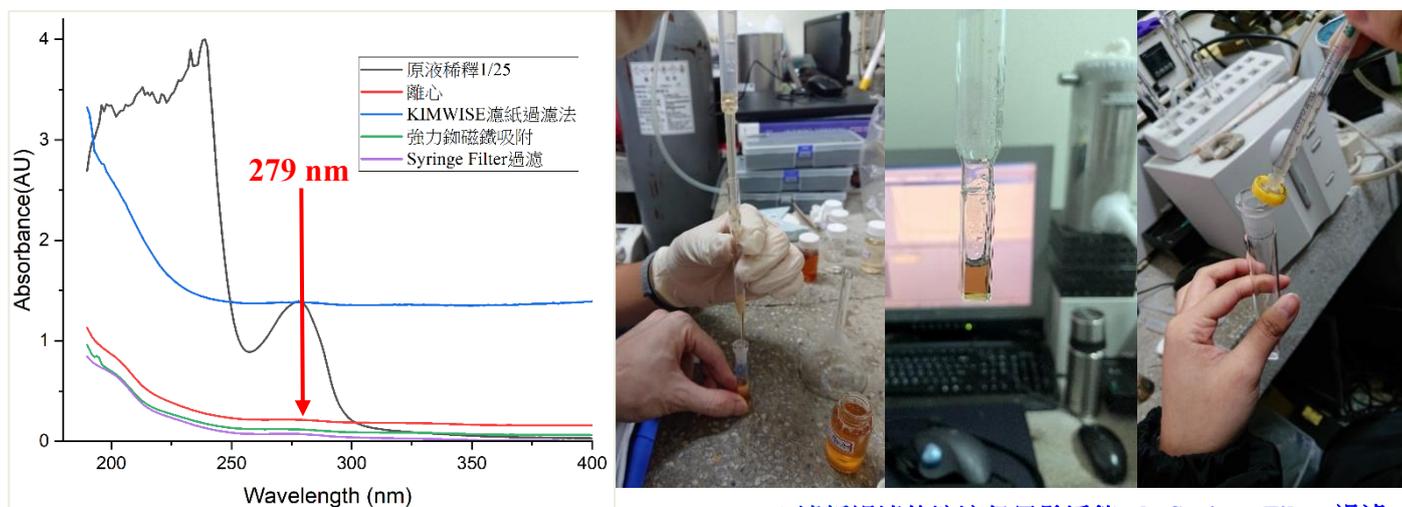


圖 31. MIP 吸附標準單寧液後 4 種後處理法對比(本圖為作者/指導老師使用 Origin 繪製)

(二)實驗結論：如圖31所示

1.以KIMWIPES濾紙過濾MIP粒子效果最差，過濾後MIP粒子在液中仍呈現懸浮狀態，如圖30所示測出基線背景值遠大於0，且279 nm的特徵吸收峰消失，原液稀釋1/25在279 nm的吸收度為1.3843，而使用離心法過濾吸收度則降至0.2141，而使用強力鈷磁鐵吸附1分鐘後吸取上層澄清液吸收度更是降至0.1180，而過濾效果最佳的則為使用Syringe Filter過濾吸收度最低達到0.07236，但費用較高1個為15元，因此考慮經濟及方便性，強力鈷磁鐵吸附1分鐘後吸取上層澄清液是最為環保的選擇。

(三)3步產物對標準單寧液吸附測試：不同質量的奈米粒子對吸附率的影響

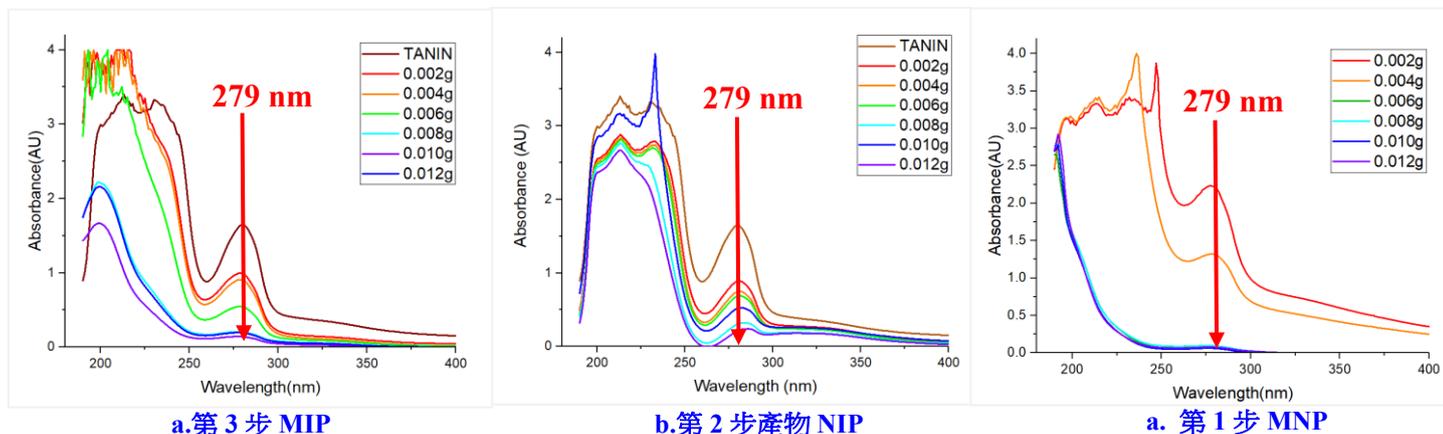


圖 32. 三步產物吸附標準單寧液後殘餘液吸收光譜(本圖為作者/指導老師使用 Origin 繪製)

## 2. 三步產物對標準單寧液吸附率

表 6. 三步產物對標準單寧液吸附率

奈米粒子 質量	第 3 步 MIP		第 2 步 NIP		第 1 步 MNP	
	吸光值	吸附 率%	吸光值	吸附 率%	吸光值	吸附 率%
原液	1.6430	-	1.6430	-	1.6430	-
0.02g	0.9965	39.349	0.8796	46.464	2.2265	-
0.04g	0.9084	<b>44.711</b>	0.7375	55.113	1.3197	<b>19.676</b>
0.06g	0.5476	<b>66.671</b>	0.6759	<b>58.862</b>	0.0804	<b>95.107</b>
0.08g	0.2071	<b>87.395</b>	0.2953	<b>82.027</b>	0.0950	94.218
0.10g	0.1419	91.363	0.5092	69.008	0.0610	96.287
0.12g	0.1954	88.107	0.2019	87.712	0.0757	95.393

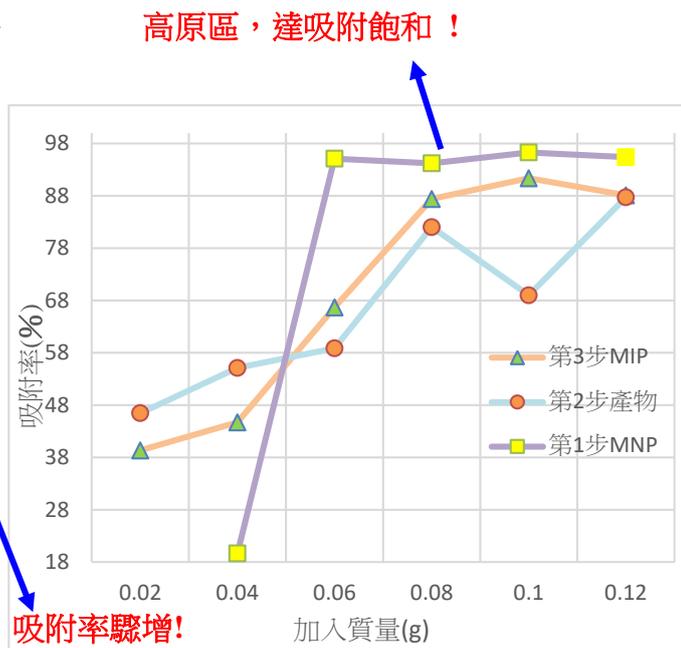


圖 33. 不同三步產物質量對標準單寧液吸附率(本圖為作者/指導老師使用 EXCEL 繪製)

(四) 實驗結論：如圖33及表6所示

1. 本實驗的後處理方法皆以強力鈷磁鐵吸附樣本瓶底1分鐘後再以Syringe Filter過濾，Promax Syringe Filter規格為13mm, 0.22 $\mu$ ，Nylon，100(p)。
2. 隨著第3步MIP加入量的增加，過濾後殘餘液吸收度降低，吸附率隨之增加，但加入0.12g時吸收度相較於0.1g降低，吸附率減少，推論因溶液中的單寧成份被MIP吸附，吸附率已達九成，逐漸達吸附飽和，此時過量的MIP粒子反而增加了吸收度背景值。
3. 而第二步包覆矽殼並表面修飾後的NIP，也隨著加入奈米粒子質量增加吸收度降低，且初期吸收度相較於第三步MIP來的低，在加入0.02g及0.04g時NIP的吸附率較高，但是加入0.06g-0.12g則為第三步MIP吸附率較高，推論加入奈米粒子在少量時主要藉由中孔洞或微孔洞效應吸附，而達定量MIP奈米粒子後，由於拓印過單寧結構的高分子具有單寧結構互補性，使MIP吸附率大於NIP。NIP於加入0.1g時吸附率大降，而在加入0.12克時才再次回升，加入0.1g與加入0.12g的實驗重複三次，皆出現不規律的數據跳動情形，推論加入0.10g NIP已達Syringe Filter過濾的最大量，相較於MIP粒子NIP的粒徑更小，更不易使用Syringe Filter過濾。
4. 加入第一步產物MNP 0.02g時，吸收度為2.2265甚至超過原溶液1.6430，實驗三重複仍出現此一不規律現象，MNP奈米粒子的粒徑為三種奈米粒子中最小，應證了粒徑越小越不易使用Syringe Filter過濾，在加入0.04g吸附率為19.676%，但加入0.06克吸附率為已達95.107%，

故推論加入0.06g已逐漸達吸附飽和，由數據可知粒徑越小越快達吸附飽和，如MIP粒子在加入0.06g至0.08克的時候吸附率驟增，但MNP則在加入0.04g至0.06g的時候吸附率驟增此因粒徑越小中孔洞效應明顯，加入粒子量越少可達吸附飽和。

5.表 6 知除 0.04g 外等克數 MIP 吸附率低於 MNP 不符實驗預期，故開發新製程 MIP 合成法。

## 八、新製程分子拓印奈米粒子合成法

(一)設計理念:舊製程是先將奈米鐵包覆矽殼後，才和單寧模板自組結合，而新製程是先將單寧和官能基單體 APTES 結合，二者作用以 APTES 行分子辨識生成與單寧具互補性的結構後，再加 TEOS 進行交聯反應後修飾於矽殼上，以提升吸附量。

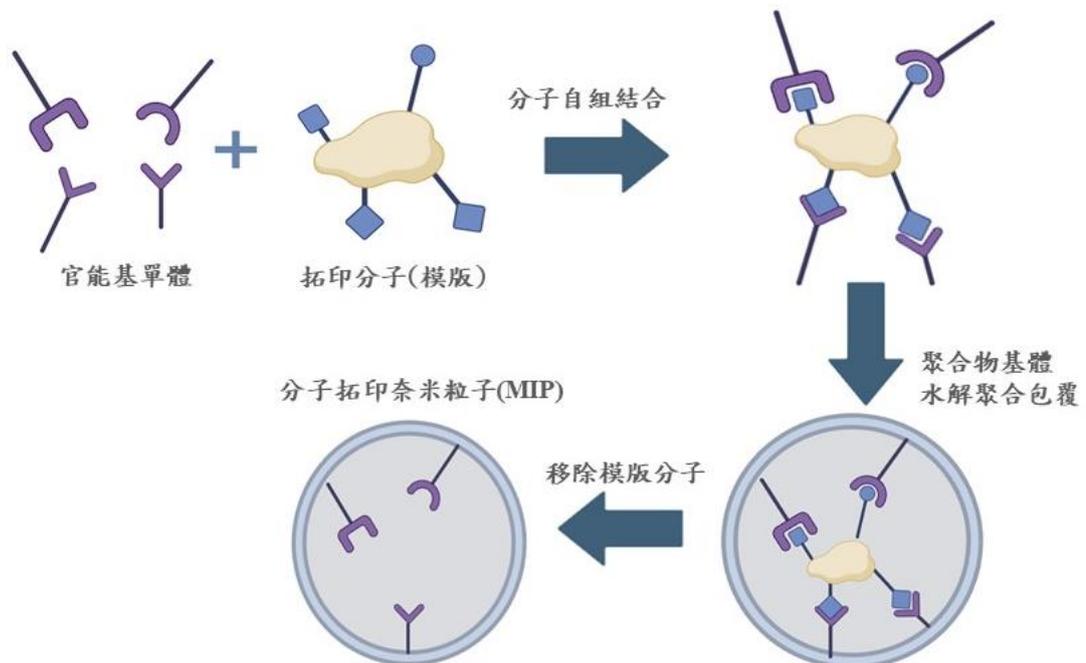


圖 34.新製程 MIP 粒子合成法設計理念(本圖為作者/指導老師使用 Biorender 軟體繪製。)

### (二)實驗步驟

- 1.樣本瓶加入 0.1g 單寧及 0.2mL APTES，置入微型攪拌子，攪拌 24 小時，設定轉速 360rpm。
- 2.取 1.625g 氯化亞鐵、1g 氯化鐵、0.182g CTAB、5mL 氨水和 50mL 去離子水，加入 100mL 燒杯內，置入攪拌子轉速 360rpm，溫度維持 85°C 反應 2 小時後便可得 MNP。
- 3.將步驟 1 與 2 產物混合，並加入 0.2mL TEOS、2mL 氨水、2mL 去離子水，攪拌 24 小時。
- 4.後處理同時驗二步驟(三)丙酮溶劑洗脫單寧分子製取MIP。

### (三)吸附率測試結果

表 7.新製程 MIP 與 MNP 吸附率對比

	新製程第 3 步 MIP		第 1 步 MNP	
	吸光值	吸附率%	吸光值	吸附率%
原液	1.0797	-	1.0797	-
0.02g	0.1124	89.589	0.1071	90.080
0.04g	0.1184	89.034	0.2787	74.186
0.06g	0.1566	85.495	0.221	79.531
0.08g	0.3042	71.825	0.2009	81.392
0.10g	0.2551	76.372	0.1616	85.032

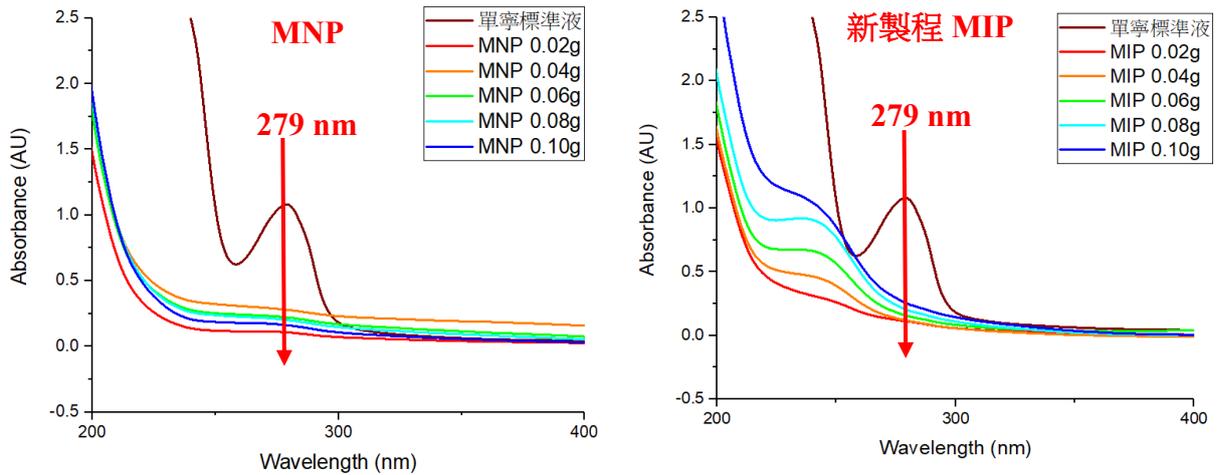


圖 35.新製程 MIP 和 MNP 吸收光譜圖 (本圖為作者/指導老師使用 Biorender 軟體繪製。)

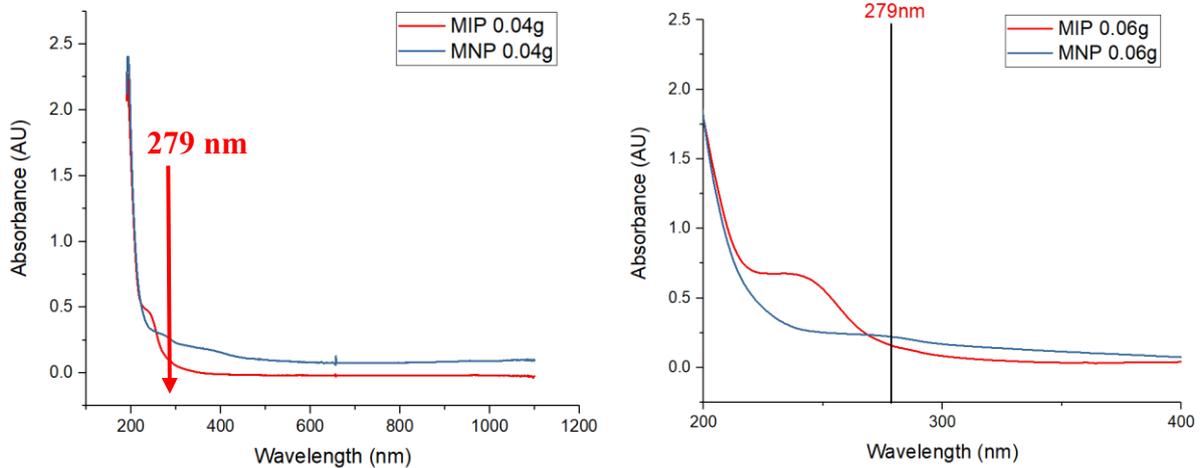


圖 36.同克數 MIP 和 MNP 吸收光譜對比 (本圖為作者/指導老師使用 Biorender 軟體繪製。)

(四)實驗結論：如圖35、36及表7所示

- 1.由圖35知隨著加入MNP粒子量增加吸附率遞增，而新製程的MIP粒子則隨加入量吸附率遞減，這和舊製程MIP不同，舊製程MIP亦隨著加入量增加吸附率上升，因粒子表面具有中孔洞，隨加入量增加孔洞效應明顯吸附率上升，新製程MIP粒子由於矽殼表層完整修飾官能基單體，因此對模板分子的吸附並非是孔洞效應效應，吸附率不和加入量正相關。

2.由表7可知新製程MIP粒子在0.02g時達最佳吸附率89.589%，而由表6知舊製程MIP粒子在0.02g時吸附率僅為39.349%，因此新製程高效提升了單寧分子的吸附率，由圖36知在加入量0.04g及0.06g時MIP吸附率甚至大於以中孔洞效應吸附為主的MNP，在0.02g至0.06g區間範圍內可以維持85%以上的高吸附率。

## 九、脫附液萃取率分析及送測 HPLC 鑑定

### (一)標準單寧液萃取率測試

1.吸附的標準單寧溶液配製:精秤0.17g的單寧粉，以50ml容量瓶配成均勻溶液，取出1ml加入25ml容量瓶並加去離子水至瓶頸刻度線處，單寧液濃度稀釋1/25以供萃取測試用本單寧試藥分子量1701.2，故濃度為0.080mM。

2.將吸收值以單寧標準品檢量線 $y = 13.151x + 0.0225$ ，換算成體積莫耳濃度。

3.計算萃取率:  $\frac{\text{脫附出的單寧濃度}}{\text{萃取前標準櫟仁中含有單寧的濃度}} \times 100\%$

### (二)單寧標準品萃取率測試:

表 8. 單寧標準品萃取率測試

加入MIP質量(g)	0(原液)	0.002	0.004	0.008	0.012
單寧濃度(mM)	0.080	0.080	0.080	0.080	0.080
波長279nm吸收度	1.0591	0.9161	0.5791	0.2052	0.1842
殘餘液濃度(mM)	0.0788	0.0680	0.0423	0.0140	0.01230
總脫附濃度(mM)	-	0.0121	0.0377	0.0661	0.0677
萃取率(%)	-	15.063	47.095	82.634	84.630

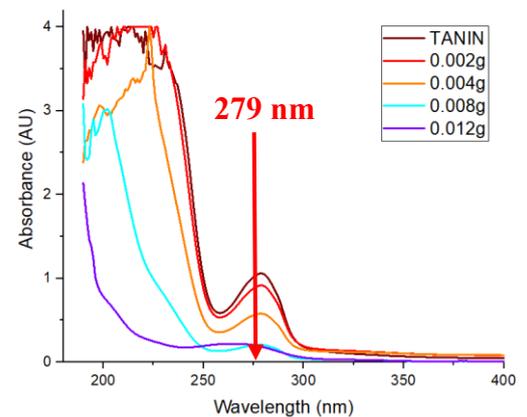


圖 37.萃取試驗紫外光譜圖

(本圖為作者使用 Biorender 軟體繪製)

### (三)實驗結論：如表7、圖37所示

1.加入MIP質量0.002g時萃取率15.063%，而加入0.004g和0.008g時，萃取率各47.095%及82.634%萃取率驟增，而0.012g時萃取率僅緩增為84.630%，推論如圖33橘色線段所示加入0.008g MIP時，已進入平緩高原區達吸附飽和狀態，故在0.080mM單寧標準濃度下，MIP最佳萃取劑量為0.08g，萃取率則會隨拓印奈米粒子(MIP)加入量增加而升高。

### (四)櫟仁標準液萃取率測試

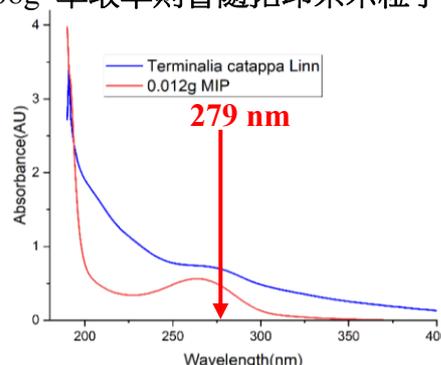


圖 38.萃取櫟仁標準液紫外光譜圖

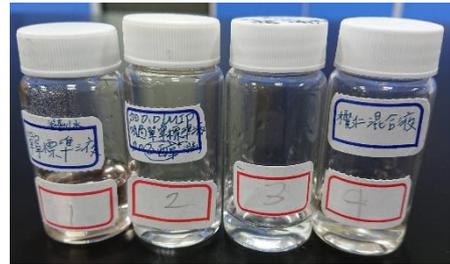
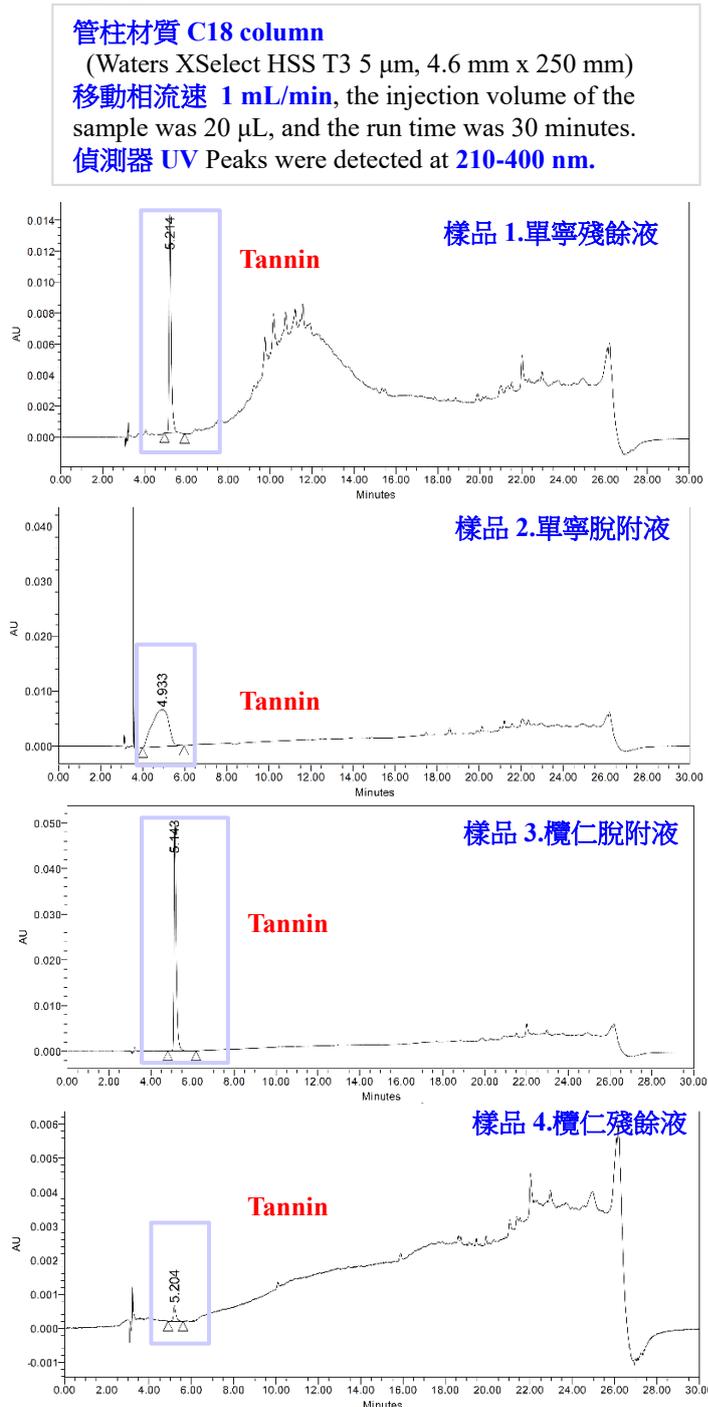
(本圖為作者使用 Biorender 軟體繪製)

(五)實驗結論：如圖 38 所示

1. 欖仁標準液於波長279 nm吸收度0.6817，由單寧檢量線回歸公式 $y = 13.151x + 0.0225$ 求出標準品含單寧濃度為0.0501mM，當加入MIP質量0.012g時脫附液吸收度0.4418，含有單寧濃度 0.0319 mM，故萃取率為 64.8086%。

(六)HPLC 高效液相層析結果分析

1.HPLC圖譜



**Peak Results**

Name	RT	% Area	Area	Height
1	5.214	100.000	98893	14142

**Peak Results**

Name	RT	% Area	Area	Height
1	4.933	100.000	369390	6710

**Peak Results**

Name	RT	% Area	Area	Height
1	5.143	100.000	371036	51098

**Peak Results**

Name	RT	% Area	Area	Height
1	5.204	100.000	3832	468

圖 39.萃取試驗 HPLC 圖(本照片由自費送測貴儀中心取得)

(七)實驗結論：如圖 39 所示

1. 樣品1為單寧標準液吸附後殘餘液，樣品2為加入0.012g MIP粒子吸附後並過濾的脫附液，樣品4為欖仁標準液吸附後殘餘液，樣品3為加入0.012g MIP粒子吸附後並過濾再以超音波震盪洗脫MIP吸附的單寧的脫附液，1、4殘餘液溶劑為水，2、3脫附液溶劑則為乙醇。
2. HPLC送測的4個樣品皆使用0.012g MIP粒子進行萃取，定性上可看分析物peak的滯留時間，為成分由注射器進入系統達到偵測器呈現其最大訊號之時間，而定量上可看分析物的峰值積分面積大小來決定分析物的濃度，樣品1至4在retention time 4至6分鐘有明顯峰值，且peak位置近乎重疊，不同濃度標準品的RT滯留時間重疊度越高，代表再現性佳，HPLC移動相和固定相的條件極為穩定，待測樣品的數據可信度很高，因此**樣品1至4四根peak訊號在定性上有一致性，可確定在4至6分鐘的峰值為單寧的訊號。**
3. 由HPLC圖譜，對比樣品1與2的積分面積值可求出萃取率，樣品1殘餘液分值98893，樣品2脫附液積分值則為369390，殘餘液積分值遠小於脫附液，代表多數單寧已被MIP粒子吸附，而MIP粒子用乙醇洗脫後其萃取率為 $369390/(98893+369390)=78.88\%$ ，樣品3與4對比，樣品4殘餘液分值3832樣品3脫附液積分值則為371036，**萃取率高達 $371036/(374868)=98.97\%$ ，MIP對欖仁液中的單寧具極佳的萃取效果。**

## 陸、討論

- 一、一鍋化合成拓印奈米粒子(MIP)最佳製備比例:1.625g氯化亞鐵、1g氯化鐵、7mL氨水、0.182gCTAB、0.2mL TEOS、0.2 mL APTES，依實驗一所述依序加入試劑，其中第一步製備MNP時反應溫度需控制在85°C且在鹼性環境pH值大於10，且FeCl<sub>2</sub>及FeCl<sub>3</sub>莫耳數比為**1:2可達最佳產率**，而第二步包覆矽殼、矽殼表面修飾及第三步驟拓印模板單寧分子在室溫25°C下反應即可，合成步驟的第1及2步**氨水需過量**pH值大於10，此時可獲得1.988g的深黑色且具磁性的MIP粒子產率高達75.73%，一鍋化合成法高產率是因避免多步反應造成產量的流失，而後處理時以**丙酮脫附單寧分子**及洗淨表面修飾試劑TEOS、及APTES時需確實，否則在進行MIP萃取實驗，易使溶液黏稠度增加造成UV-vis圖譜雜訊明顯，且後處理需強力鈷磁鐵吸附1分鐘後以Syringe Filter過濾MIP粒子，若未濾除乾淨溶液呈現懸浮態將提高279 nm的吸收度背景值，影響萃取率的測試，最後收集得到的MIP粒子置於烘箱低溫45°C風乾，以免氧化成紅棕色Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>而失去功能性。化學反應方程式如下:



- 二、由PXRD粉末繞射圖6根強度峰，各別由(440)、(511)、(422)、(400)、(311)、(220)晶面所

造成，佐證了MNP為 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 磁性奈米鐵粒子，對比MNP及MIP的IR圖 $1200\text{cm}^{-1}$ 的訊號的消失證明TEOS的酯基水解後包覆MNP矽殼的反應完成度，TEM觀測可知以 $\text{FeCl}_2$ 及 $\text{FeCl}_3$ 為原料在鹼性環境下所合成之MNP粒徑介於12.2-20.0nm間，而TEOS包覆在MNP上並以APTES表面修飾後拓印單寧模板分子，粒徑介於13.0-19.5nm間，丙酮洗脫tannin的MIP粒子平均粒徑介於13.4-22.1nm間，**每一步驟試劑的添加皆增加了粒徑**，其中拓印單寧分子後粒徑個別粒徑差異大，因少量單寧分子被矽烷包覆無法完全洗脫乾淨所致。

三、由最大吸收波長實驗知單寧在199 nm及279 nm各有吸收峰，前者由於吸收度遠大於2且 $R^2=0.437$ 遠低於1無法呈濃度與吸收度對應線性關係，改以279nm測定吸收度其 $R^2=0.9927$ 線性良好，製作單寧標準液檢量線由迴歸方程可用以推算未知液中的單寧含量，方程式為 $y = 13.151x + 0.0225$ ，斜率13.151即比爾定律中的 $\epsilon$ 吸光比例係數，如表4所示取1g標準欖仁葉試樣粉，煮液溫度 $85^\circ\text{C}$ 時間45min配製成100ml單寧原液，含單寧濃度為0.1826mM，考慮線性及吸收度最近1，故**選定最佳稀釋比例為1/5，其單寧濃度為0.0792 mM**。

四、由圖27-28知煮液時間越久、煮液溫度越高，欖仁葉釋放的單寧濃度越高，且欖仁液隨煮液時間釋放的單寧濃度，二者對應關係近乎線性，除 $40^\circ\text{C}$ 其 $R^2$ 值為0.9255外，其餘溫度 $R^2$ 值皆在0.98以上，在煮液溫度 $100^\circ\text{C}$ 20分鐘釋放的單寧濃度為10分鐘的1.58倍。

五、吸附測試時因MIP粒子於水中為咖啡色懸浮液，會提升吸收度背景值故需濾除才可上機測吸收度，如圖31所示，0.17g單寧粉配製成50ml溶液再稀釋1/25，得到標準單寧溶液於279 nm的吸收度為1.6430，離心法過濾降至0.2141，鈷磁鐵吸附後吸取澄清液降至0.1180，而Syringe Filter過濾吸收度最低達0.07236，過濾效果為**Filter > 鈷磁鐵吸附 > 離心 >**

**KIMWIPES濾紙過濾**，考慮經濟及簡便性鈷磁鐵吸附是最為環保的選擇，但在粒徑更小的NIP及MNP吸附測試中需複合式後處理，鈷磁鐵吸附瓶底1分鐘後再以Filter過濾。

六、在單寧標吸附率測試中，隨著加入奈米粒子量越多，溶液吸收度下降，吸附率上升，由圖33，MIP粒子在加0.04-0.08g時吸附率驟增，**超過0.08g便進入高原區達吸附飽和吸附曲線漸趨平穩**，NIP粒子則在加入0.06-0.08g時吸附率驟增，而MNP粒子則更少量在0.04-0.06g吸附率驟增，過了0.06g達吸附飽和區，故粒徑越小中孔洞效應越明顯。

七、本研究開發新製程MIP粒子合成法，**先將單寧和官能基單體APTES結合行分子辨識**，再TEOS進行交聯反應包覆矽殼，在0.02g時新製程MIP粒子達最佳吸附率89.589%，而舊製程MIP粒子僅為39.349%，**新製程MIP粒子高效提升了單寧分子的吸附率**。

八、由表 8 標準單寧液萃取率測試，標準單寧濃度 0.080mM 下加入 MIP 粒子 0.004 和 0.008g 時萃取率驟增，後者萃取率 82.634%，而 0.012g 時萃取率僅增為 84.630%，如圖 33 加入 0.008gMIP 時，已進入平緩高原區達吸附飽和狀態，故 **0.08g 為最佳萃取量**，而由欖仁標準液萃取率測試，當加入 MIP 質量 0.012g 時萃取率為 64.8086%，由圖 3 經 HPLC 鑑定分析可知，**樣品 1-4 在相同滯留時間 5.12 分時有明顯峰值**，定性上有一致性為單寧的訊號，定量上由面積積分值計算萃取率，使用 0.012g MIP 粒子萃取標準單寧溶液萃取率為 78.88%，而萃取欖仁標準液萃取率高達 98.97%。

九、BET 測出 MIP 粒子比表面積  $53.72 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ ，平均粒徑  $11.97 \text{ \AA}$ ，吸脫附曲線形成的回滯環為均勻孔型，證明 MIP 粒子具較窄孔洞特性及 MIP 粒子為奈米尺寸均勻的球形顆粒。

十、由講解投影片附錄四熱重分析 TGA 圖，3 種奈米粒子熱重分析曲線型態不同，可區別三種奈米粒子，MNP 於  $100^\circ\text{C}$  區間熱損率可高達 20%，NIP 及 MIP 在  $50\text{-}800^\circ\text{C}$  曲線類似。

## 柒、結論

本研究以一鍋化合成法， $\text{FeCl}_2$ 和 $\text{FeCl}_3$ 莫耳比1:2並控制pH大於10，表面修飾可得拓印MIP奈米粒子最佳產率75.73%，影響產率主因為 $\text{FeCl}_2$ 及 $\text{FeCl}_3$ 莫耳數。在PXRD測定下奈米粒子皆有相同6根強度峰，各別由(440)、(511)、(422)、(400)、(311)、(220)晶面所造成，以TEM佐證各奈米粒子粒徑，其中MIP粒子平均粒徑介於13.4-22.1nm間，以BET測出MIP比表面積 $53.72 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ ，平均粒徑 $11.97 \text{ \AA}$ ，由吸脫附曲線回滯環證明MIP粒子具較窄孔洞及尺寸均勻的球形顆粒。選用279 nm最大吸收波峰製作單寧標準液檢量線由其迴歸方程 $y = 13.151x + 0.0225$ 可定量未知溶液中的單寧濃度，考慮線性選定最佳稀釋比例1/5作欖仁葉釋放單寧濃度的探討，煮液時間越久、溫度越高，欖仁葉釋放的單寧濃度越高，且煮液時間與釋放的單寧濃度對應關係近乎線性，吸附測試MIP過濾效果為Filter > 鈷磁鐵吸附 > 離心 > 濾紙過濾，且隨著加入奈米粒子量越多，吸附率上升，但3種奈米粒子達吸附飽和所需量不同，MIP粒子為0.08g，MNP用量最少因粒徑小中孔洞吸附明顯，萃取率測試隨加入MIP質量增加萃取率增加，0.08g為最佳萃取加入量，萃取率為82.634%，由HPLC分析欖仁液主要成分為單寧，且以積分值求出MIP萃取率可高達98.97%，並開發新製程MIP粒子合成法高效提升了單寧分子的吸附率。

## 捌、參考資料及其他 (詳細文獻請參考作品講解投影片附錄六)

一、BelBruno, J. J. (2019). Molecularly Imprinted Polymers. *Chemical Reviews*, 119(1), 94-119.

二、周澤川，分子模版拓印技術-仿人造抗體之合成介紹，科儀新知第二十四卷第三期 91.12

## 【評語】 050208

此研究工作運用校園在地植物做原料來使用，同時實驗數據用到大量分析測量工具。下列幾點建議：1)在數據呈現上，除了放入圖片以外，應要加以說明，解釋數據為什麼符合、或是不符合預期。2)可以加強詳述設計此奈米粒子的理由，如：氧化鐵核心存在的用意？使用氧化矽殼層的目的？3) 用具觀的『拓印』的概念來設計材料表面性質是一個有趣的想法，但是需要更嚴謹的實驗證據來證實拓印後的表面對於待測物分子具有專一性，而且此專一性來自於『拓印』。

## 作品簡報

高效奈米印跡粒子萃取大葉欖仁  
液中單寧之特性研究

# 壹、簡介

本研究以 $\text{FeCl}_2$ 及 $\text{FeCl}_3$ 莫耳數比1:2一鍋化合成分子拓印奈米粒子並以四乙氧基矽烷(TEOS)包覆矽殼，三乙氧基矽烷(APTES)於表面修飾胺基，單寧為模板分子，丙酮為溶劑脫附單寧後可得對單寧具專一性的分子拓印奈米粒子(MIP)，產率75%，由BET氮氣吸脫附曲線知MIP具較窄孔為尺寸均勻的球體。以波長279 nm最大吸收度製作單寧檢量線 $y=13.15x+0.022$ 定量未知液單寧濃度，欖仁葉釋放單寧濃度的條件探討選定吸收度最近1的最佳稀釋比1/4，煮液越久、越高溫釋放單寧濃度越高，且煮液時間與釋放濃度為線性關係，吸附測試過濾效果以小飛碟最佳，加奈米粒子量越多吸附率增加，達吸附飽和所需量不同，萃取率隨MIP加入量而增加，0.08g為最佳量，萃取率82%，HPLC分析欖仁液主成分為單寧，MIP萃取率高達98%，並開發新製程粒子合成法高效提升單寧分子吸附率。

# 貳、研究目的

## 一、分子拓印原理簡介

本研究將磁性奈米鐵粒子( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ )以溶膠凝膠法進行交聯反應，將MNP**包覆矽殼**( $\text{SiO}_2$ )，並表面**修飾有機官能基**如胺基( $-\text{NH}_2$ )，加入模板分子單寧後便獲得分子拓印奈米粒子，其矽殼表面上產生和單寧分子具**互補性**的結構，使MIP具吸附單寧分子的專一性，以丙酮為溶劑洗脫MIP上的單寧分子便可獲得拓印模板。

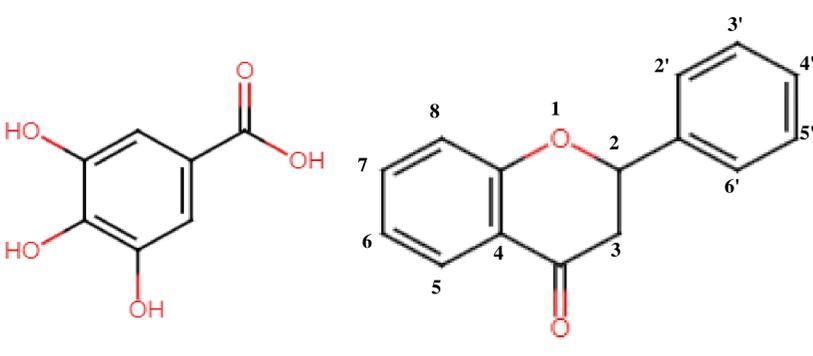
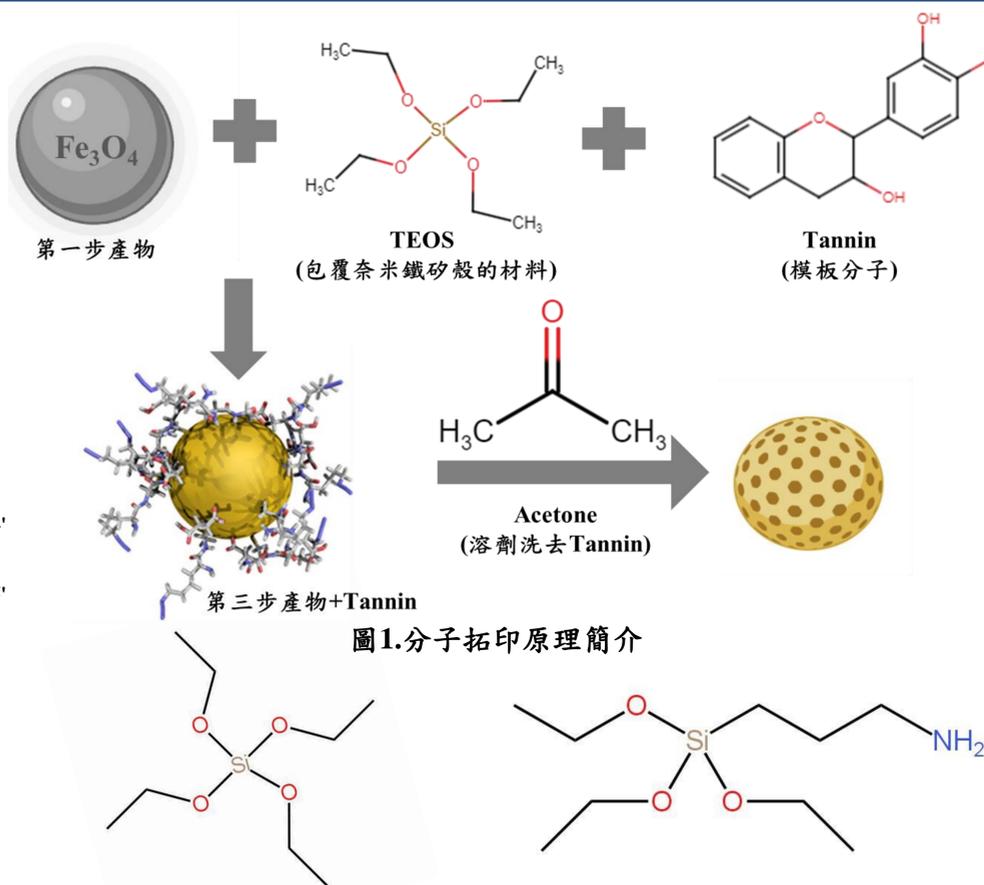
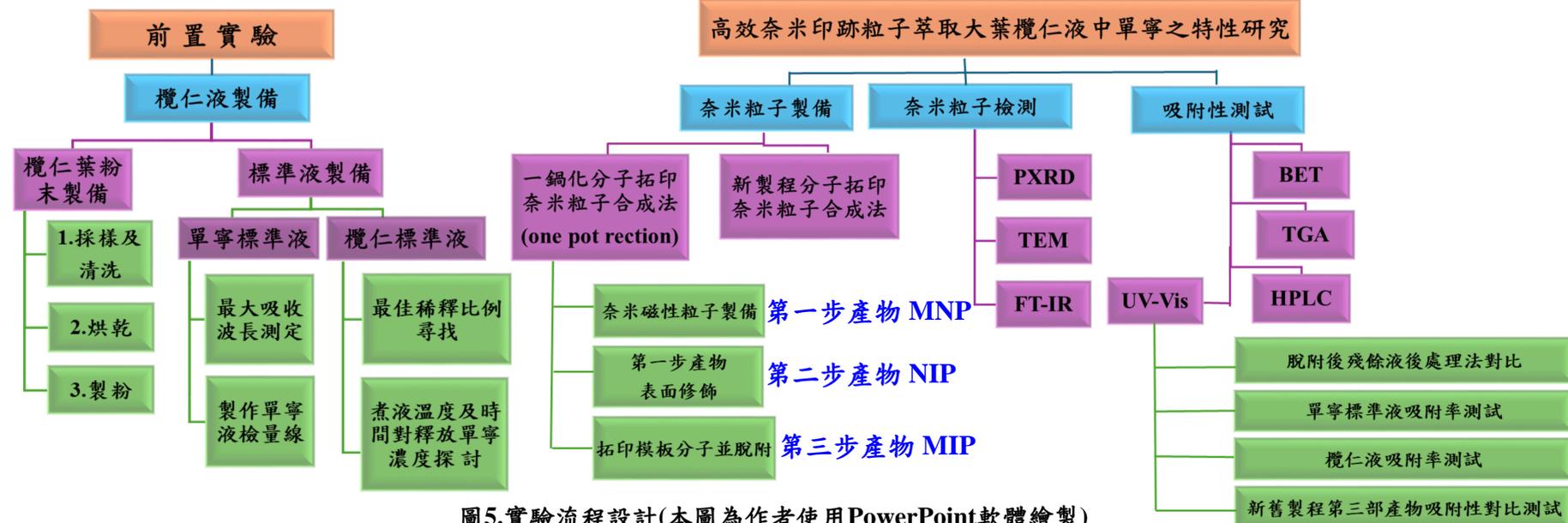


圖3.四乙氧基矽烷(TEOS)結構式

圖4.三乙氧基矽烷(APTES)結構式

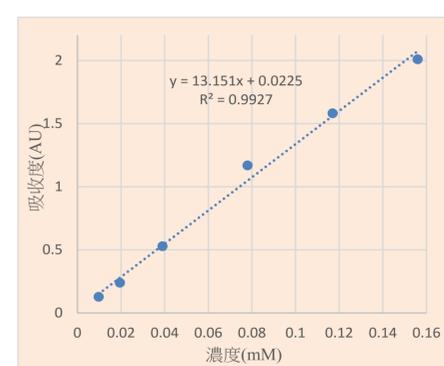
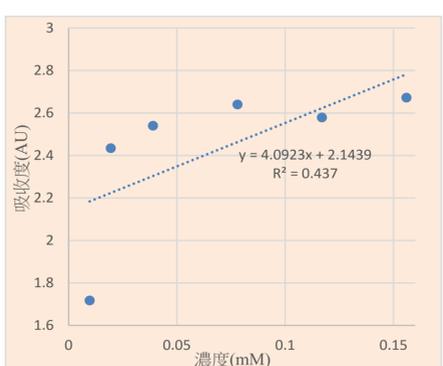
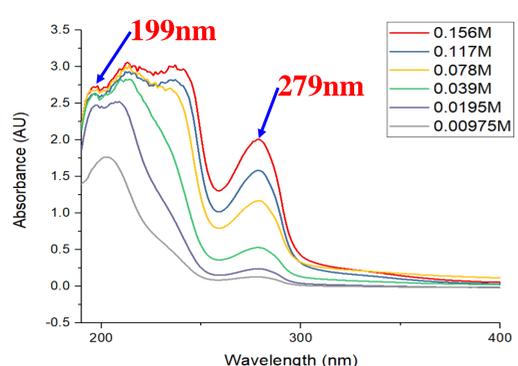
(圖1~圖4為作者使用chemical-sketch軟體繪製)

## 二、研究架構



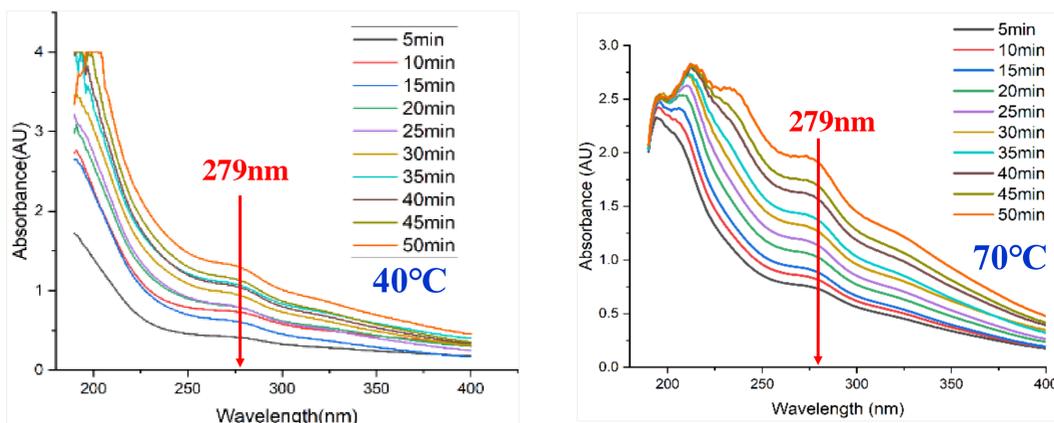
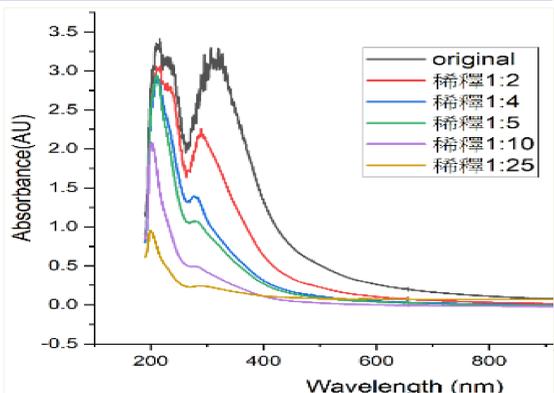
# 參、前置實驗

## 一、單寧標準品檢量線訂定



討論：選用**279 nm**最大吸收波峰製作單寧標準液檢量線。

## 二、欖仁液標準品最佳稀釋比例尋找



討論：1.迴歸方程 $y = 13.151x + 0.0225$ 定量未知溶液中的單寧濃度。  
2.考慮線性選**最佳稀釋倍率1/4**作欖仁葉釋放單寧濃度的探討。

### 三、不同煮液時間對欖仁葉釋放單寧濃度的探討

討論：1.煮液時間越久、溫度越高，欖仁葉釋放的單寧濃度越高。  
2.煮液時間與釋放的單寧濃度對應關係近乎線性。

煮液操縱變因設定：

- (1)煮液溫度為40、55、70、85°C。
- (2)煮液時間為5、10、15、20、25、30、35、40、45、50min。

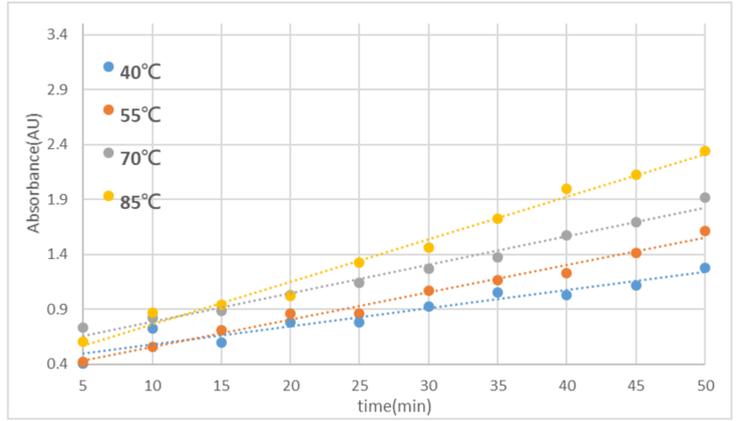
$$85^{\circ}\text{C} \quad y = 0.0388x + 0.3755, R^2 = 0.9868$$

$$70^{\circ}\text{C} \quad y = 0.0259x + 0.5316, R^2 = 0.9842$$

$$55^{\circ}\text{C} \quad y = 0.0248x + 0.3091, R^2 = 0.9856$$

$$40^{\circ}\text{C} \quad y = 0.0167x + 0.4114, R^2 = 0.9255$$

圖11.不同煮液時間欖仁液於279nm吸收度變化及線性回歸R<sup>2</sup>值 (本圖為作者使用Excel繪製)



## 肆、結果與討論

### 一、新舊製程一鍋化分子拓印奈米粒子合成法

討論：1.FeCl<sub>2</sub>和FeCl<sub>3</sub>莫耳比1:2並控制pH值大於10。  
2.表面修飾可得拓印奈米粒子最佳產率75%。  
3.影響產率主因為FeCl<sub>2</sub>及FeCl<sub>3</sub>莫耳數。

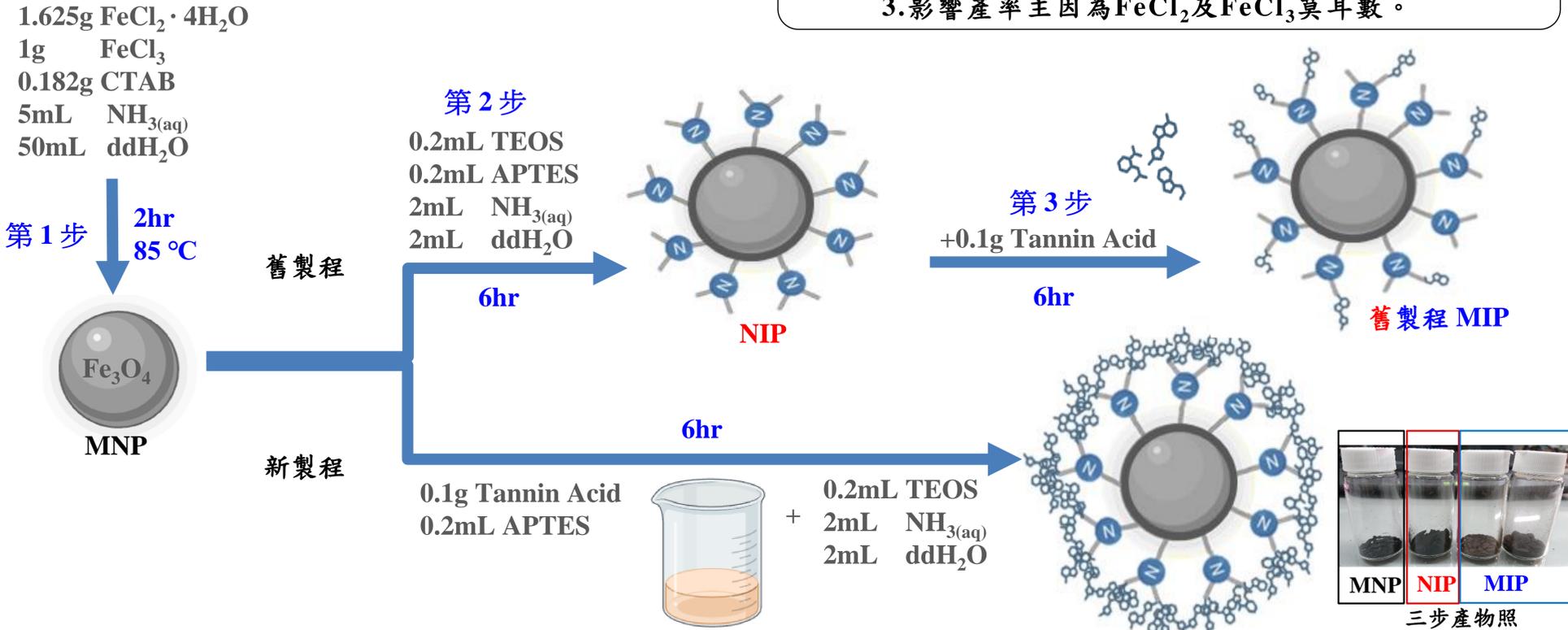


圖12.新舊製程一鍋化分子拓印奈米粒子合成法 (本圖為作者使用Biorender軟體繪製) 新製程 MIP

### 二、紅外線光譜儀(FT-IR)檢測結果

### 三、X光粉末繞射儀(PXRD)及穿透式電子顯微鏡(TEM)檢測結果

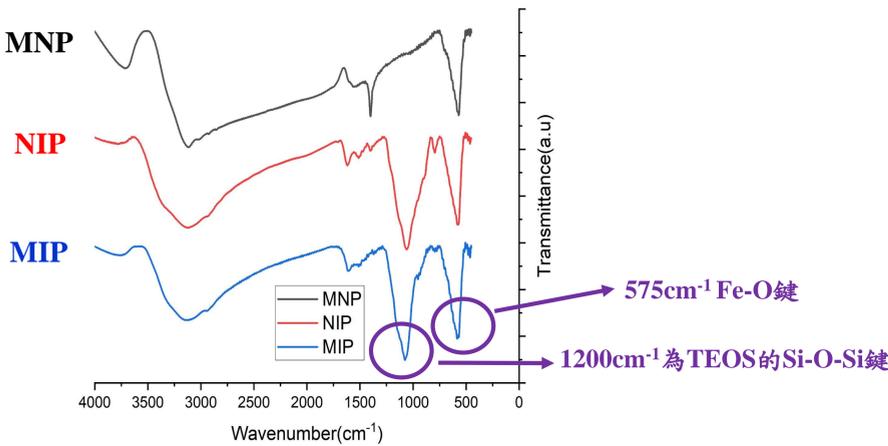


圖13.三步產物IR圖譜對比 (本圖為作者使用Origin繪製)

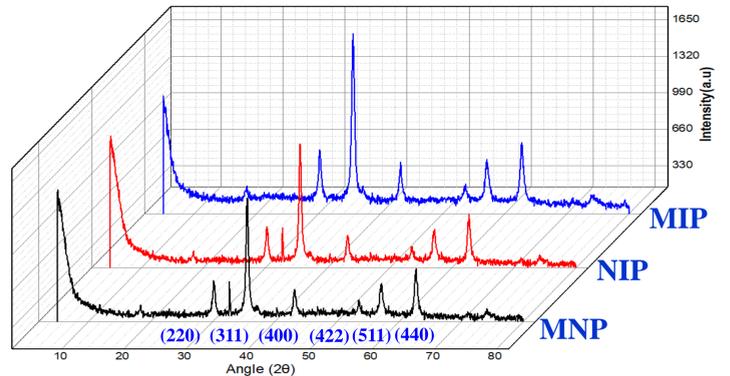


圖15.三步合成產物PXRD圖 (本圖為作者使用Origin繪製)

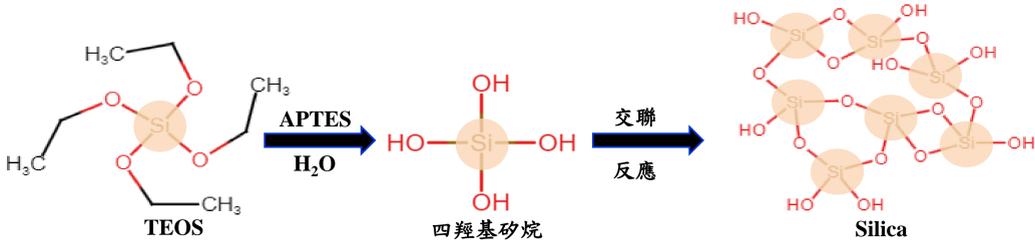


圖14. TEOS在鹼性環境下水解縮合進行交聯反應生成矽殼包覆MNP (本圖為作者使用PowerPoint及chemical-sketch繪製)

討論：IR圖1200cm<sup>-1</sup>的訊號的出現，證明TEOS的酯基水解後包覆MNP矽殼。

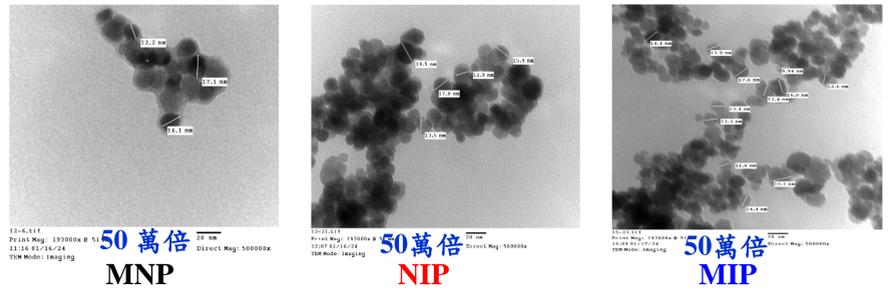


圖16.三部產物電顯圖(圖形下方附有尺標，本照片由自費送測貴儀中心取得)

討論：1.奈米粒子皆有相同6根強度峰，各別由(440)、(511)、(422)、(400)、(311)、(220)晶面所造成。  
2.MIP平均粒徑介於13.4-22.1 nm間。

### 四、微孔比表面積與孔徑分布測定

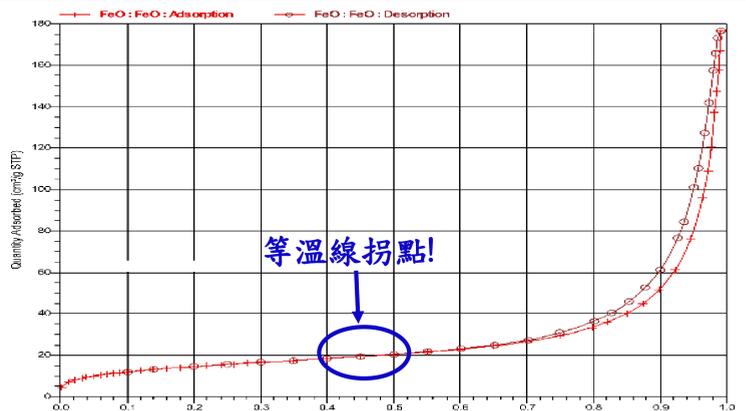


圖17.MIP+Tannin氮氣吸脫附等溫線 (本照片由自費送測貴儀中心取得)

討論：由吸脫附曲線回滯環證明MIP具較窄孔洞及尺寸均勻的球形顆粒。

Single point surface area (m <sup>2</sup> g <sup>-1</sup> )	BET surface area (m <sup>2</sup> g <sup>-1</sup> )	BJH Adsorption surface area (m <sup>2</sup> g <sup>-1</sup> )
50.3956	53.7238	48.2441
BJH Adsorption Pore volume (cm <sup>3</sup> g <sup>-1</sup> )	BJH Adsorption Pore size (Å)	Nanoparticle size Median pore width(Å)
0.270782	224.510	11.971

表1.MIP粒子BET測定數據(本圖為作者使用Excel繪製)

## 五、欖仁標準液中單寧吸附性測試

MIP吸附標準單寧液後，4種後處理法對比：

後處理法操縱變因：

- (1) 離心機4000 rpm離心3分鐘。
- (2) 濾紙抽氣過濾(過濾孔徑大)。
- (3) 鈷磁鐵於樣本瓶底部吸附1分鐘後吸取澄清液。
- (4) 0.22 μm Syringe Filter小飛碟過濾。(昂貴、孔徑小)

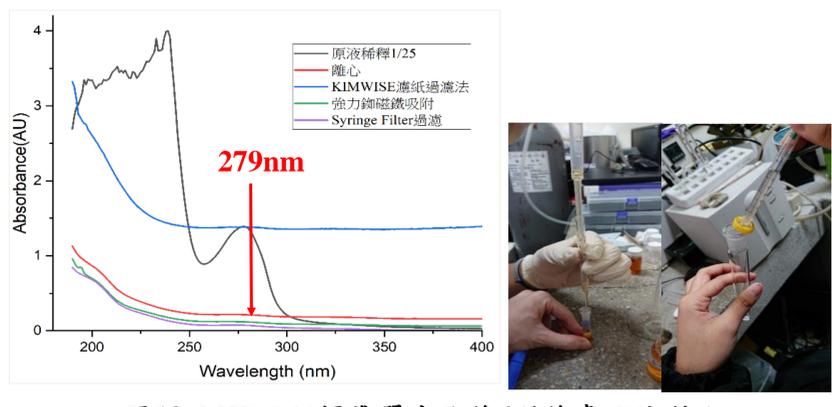


圖18. MIP吸附標準單寧液後4種後處理法對比 (本圖為作者使用Origin繪製與拍攝)

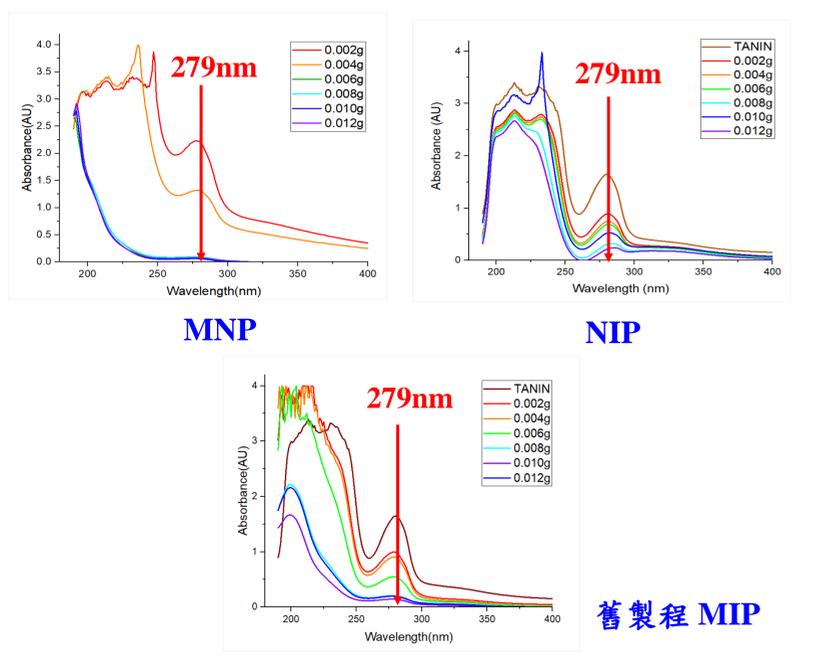


圖19. 三步產物吸附標準單寧液後殘餘液吸收光譜 (本圖為作者使用Origin繪製)

## 六、標準單寧液萃取率測試

加入MIP質量(g)	0.002	0.004	0.008
單寧濃度(mM)	0.080	0.080	0.080
波長279nm吸收度	0.9161	0.5791	0.2052
殘餘液濃度(mM)	0.0680	0.0423	0.0140
總脫附濃度(mM)	0.0121	0.0377	0.0661
萃取率(%)	15.063	47.095	82.634

表2. 單寧標準品萃取率測試 (本圖為作者使用Excel繪製)

討論：1. 加入MIP的質量增加萃取率增加。  
2. 0.008 g為最佳萃取加入量，萃取率為82%。

## 八、新製程分子拓印奈米粒子合成法

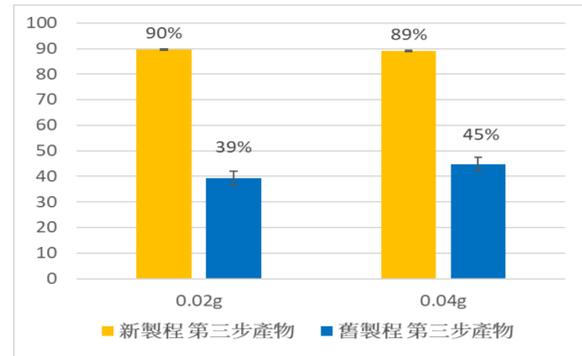
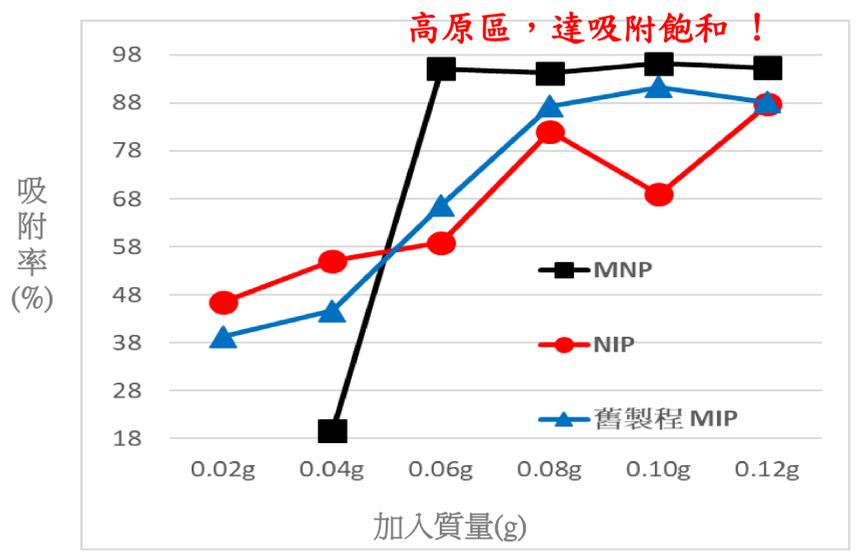


圖23. 新舊製程吸附率比較 (本圖為作者使用Excel繪製)



高原區，達吸附飽和！

證明：粒徑越小越快速達吸附飽和。

圖20. 不同質量奈米粒子吸附率比較 (本圖為作者使用Excel繪製)

討論：1. 以物理法磁性吸附分離MIP與殘餘液，簡化後處理流程，符合綠色化學。  
2. 隨著加入奈米粒子量越多，吸附率上升。  
3. MNP達吸附飽和用量最少是因粒徑小中孔洞吸附明顯。

## 七、脫附液萃取率分析及HPLC鑑定

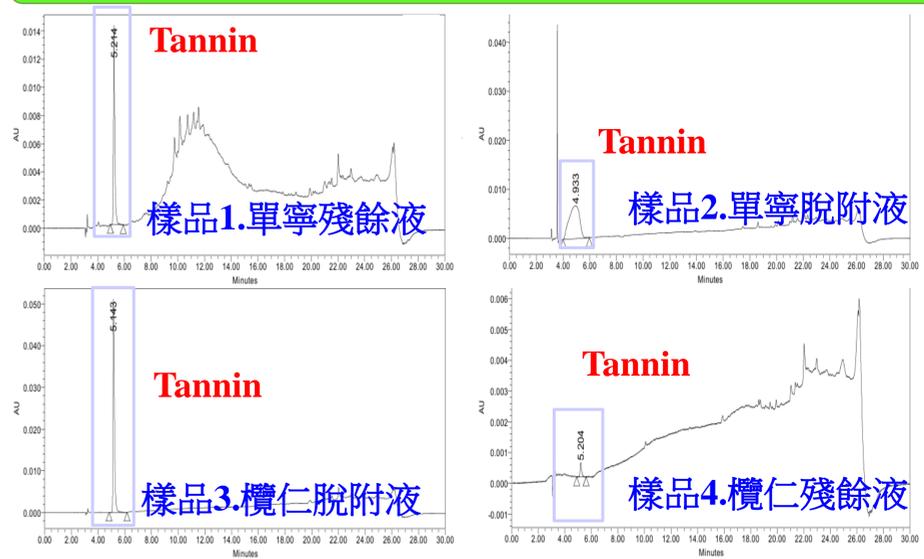


圖21. 萃取測試 HPLC圖 (本照片由自費送測貴儀中心取得)

討論：1. 分析欖仁液主要成分為單寧。  
2. 以積分值求出MIP萃取率可高達98%。

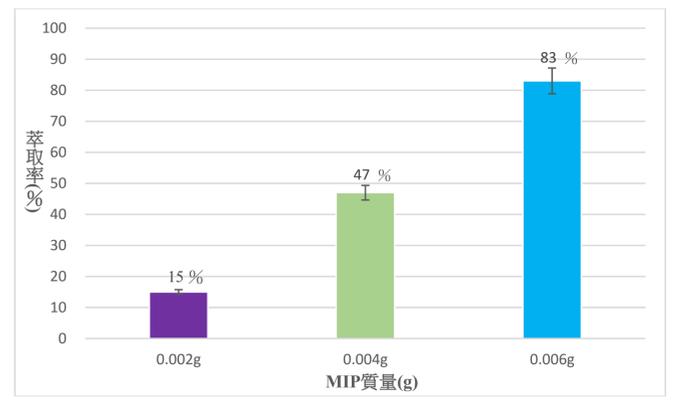


圖22. MIP不同質量萃取率比較 (本本圖為作者使用Excel繪製)

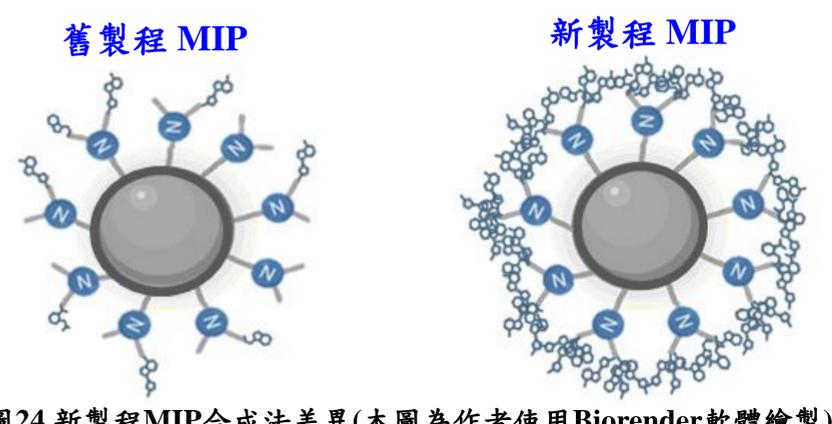


圖24. 新製程MIP合成法差異(本圖為作者使用Biorender軟體繪製)

討論：1. 新製程改變試劑加入的次序，高效提升了單寧分子的吸附率。  
2. 0.04 g時，吸附率：新製程 MIP > NIP > 舊製程 MIP > MNP。

## 伍、結論

- (一) 選用279 nm吸收波峰製作單寧標準液檢量線，定量未知溶液中的單寧濃度。
- (二) 以最佳稀釋倍率1/4作欖仁葉釋放單寧濃度的探討，且煮液時間與釋放的單寧濃度對應關係近乎線性。
- (三) FeCl<sub>2</sub>和FeCl<sub>3</sub>莫耳比1:2並控制pH值>10，影響產率主因為FeCl<sub>2</sub>及FeCl<sub>3</sub>莫耳數。
- (四) 在PXRD測定下皆有相同6根強度峰。MIP平均粒徑介於13.4-22.1nm間，且具較窄孔洞及尺寸均勻的球形顆粒。
- (五) 4種後處理分離MIP效率：小飛碟 > 磁吸 > 離心 >> 濾紙，選用物理法磁性吸附MIP可極大簡化後處理流程。
- (六) 三步產物達吸附飽和所需量不同，MNP用量最少因粒徑小中孔洞吸附明顯，MIP則以氫鍵等分子間引力為主。
- (七) 萃取率測試隨加入的MIP質量增加萃取率增加，由HPLC分析欖仁液主要成分為單寧。
- (八) 新製程第三步產物合成法高效提升了單寧分子的吸附率。
- (九) 未來可將吸附過後的奈米粒子重複使用，符合綠色化學、循環使用的原則。