

編號：CCMP94-RD-021

利用分子模版之技術自中國傳統藥材 提煉異黃酮素之防癌藥劑

周澤川

國立成功大學

摘 要

本研究計畫的目的在於希望利用生物分子模版的方法，代替傳統的分離純化程序，自中國食品及藥材中提煉異黃酮類物質，主要技術即利用所要提煉的異黃酮類物質製造出具有高辨識能力的高分子模版，以此具有選擇性的高分子模版從天然植物中提煉並純化異黃酮類物質，如此便可突破以往傳統分離純化步驟的費時及耗能的問題。大豆異黃酮類物質為近幾年許多研究人員積極研究的物質，由於大豆異黃酮類物質具有抗老化的作用，可以延遲細胞的衰老，使得皮膚保持彈性，以及具有能夠減輕女性更年期綜合症症狀的效果，促成骨質生成而減少骨質流失，並且有降低膽固醇保護心血管及抗癌等作用，已知大豆異黃酮類物質具有上述多種藥效，對於醫療以及藥物應用領域具有相當的貢獻。

本研究利用兩種官能單體，分別為 4VP 以及 MAA 聚合 Genistein-MIPs。以乙醇為溶劑將 genistein 完全溶解後加入官能單體均勻混合，在加入 EGDMA 作為交聯劑，以 AIBN 為起始劑，溶液混合後通以氮氣，隨即於 60°C 的恆溫系統下進行 24 小時的聚合。所得的 bulk polymers 經清洗、研磨及過篩即可進行吸附測試。實驗數據顯示，以 MAA 為官能單體時，目標物較難從模版中被移除，因此，經過目標物移除步驟後所產生的選擇性孔洞相較於以 4VP 為官能單體製備的 MIPs 還少，因此在於吸附目標物或者分離純化萃取液方面之研究數據都顯示出，以 4VP 為官能單體製備的 MIPs 效果較以 MAA 為官能單體製備的 MIPs 對於目標物 Genistein 分子有較佳的吸附能力以及辨識性。Genistein-MIPs 對於 Genistein 在濃度為 10^{-4} M 的吸附量是在濃度為 10^{-5} M 時吸

附量的 7.6 倍，證實了濃度對於 MIPs 之吸附能力具有相當大的影響力。由於 Biochanin A 以及 Daidzein 和 Genistein 在於化學結構上的差異，因此 Genistein-MIPs 對於 Biochanin A 以及 Daidzein 的吸附量相較於對 Genistein 的吸附量低很多，Genistein-MIPs 對於 Genistein 的吸附量大約為 2-5 倍的 Biochanin A 吸附量，1.75 倍的 Daidzein 吸附量。並由 Genistein-MIP 於黃豆萃取液之分離純化及提煉功效的研究結果可見，Genistein 於黃豆萃取液中所佔的比例提高為原本 1.35 倍，而 Daidzein 則降低為原本 0.97 倍，因此利用分子模版之方法對於實際應用於從黃豆粉之萃取液中提煉及純化 Genistein 成份具有初步的功效。

關鍵詞：大豆、異黃酮類、分子模版、分離純化

Number: CCMP94-RD-021

Extraction of Genistein and Biochanin A From Chinese Traditional Herb by Molecularly Imprinted Polymers

Tse-Chuan Chou

National Cheng Kung University

ABSTRACT

Molecular imprinted technique was substantial succeeded in the field of biomolecular sensor and solid phase extraction. Molecularly imprinting polymers (MIPs) are polymeric materials possessing highly selective and affinitive properties. Soybeans contain a variety of phytochemicals, and many beneficial effects have been reported for the isoflavones. It is a challenge to separate and purify one isoflavone deritive from extract from nature plants such as soybean and kudzu root because the procedure of traditional is tedious and power consumption. In this study, we try to use the technique of MIP to replace the outmoded method of separation and purification and focus on the recognition and purification of two kinds of isoflavonoid deritives, genistein and biochanin A.

4', 5, 7-trihydroxyisoflavone (genistein) was chosen as the template molecule and two kinds of functional monomers, 4-vinylpyridine (4VP) and methacrylic acid (MAA) were used respectively and ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA) as cross-linker in the ethanol solution to fabricate molecular imprinted polymers (MIPs). The polymerization was initiated by thermal decomposition of initiator, 2, 2'-azobis-isobutyronitrile (AIBN). Micro-cavities are formed in MIPs and in theory they are sterically and functionally complementary to target molecule. The binding experiments are conducted to investigate the recognition of MIPs by using

biochanin A and daidzein which have similar chemical structure to target molecule. The binding capability of MIPs fabricated by 4VP for genistein is about 400 mg of genistein per gram of polymer and this amount is four times the binding capability for biochanin A and two times for daidzein. From the result of the rebinding experiment by using the solution of soybean extraction, Genistein concentration in the extraction solution from the rebinding Genistein-MIP particles is 135% higher than the original extraction solution from the soybean. However the separation of Genistein from the original solution is unsatisfied.

Keywords: soybeans, kudzu root, isoflavones, molecular imprinted, separation

壹、前言

近年來，國人的飲食生活逐漸西化，強調肉類美食為飲食中心，使得國人日常飲食不均衡及營養攝取不當，因此國人以前很少罹患的疾病如腦中風、動脈硬化、心肌梗塞等腦血管及心臟疾病的比率逐年增加，同時病人年齡有趨於年輕化的跡象，如圖 1.1 顯示，這些疾病目前在台灣地區十大死因中均位居高位⁽¹⁾。

蛋白質的品質是以所含的八種人體必需胺基酸而定。動物性蛋白質如肉、蛋、奶類內含有八種人體所需的必需胺基酸即稱為完全蛋白質，肉類以及蛋類食品固然是蛋白質的主要來源，然而動物性蛋白質若攝取過多，則會引起血膽固醇及壞的膽固醇上升，因而引發心血管疾病⁽²⁾。

根據研究得知，大豆內含有八種必需胺基酸，是植物性食物中唯一可稱為完全蛋白質的植物，大豆是便宜又營養的傳統食品，是優質蛋白質的來源，沒有膽固醇的負擔，容易被人體吸收利用。更深入研究大豆，結果使我們得到更多的驚奇，除了蛋白質，大豆還含有其他具有保健功效的成分如多元不飽和脂肪酸、單元不飽和脂肪酸、礦物質、黃豆卵磷脂、黃豆皂素、黃豆固醇、黃豆纖維、以及異黃酮素。大豆，被稱為「田園之肉」的植物逐漸在食品界中嶄露頭角。

92年度台灣地區死亡原因

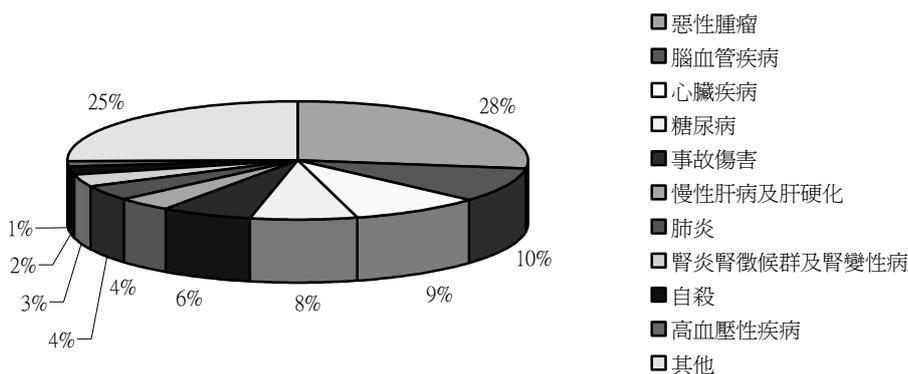


圖 1.1 衛生署 92 年度普查台灣地區死亡原因結果，其中因惡性腫瘤死亡為十大死因的第一高位，因心血管疾病死亡則為其次。

研究數據顯示大豆內含主要成分為水分 13.3%、蛋白質 40.0%、脂肪 16.20%、醣類 19.60%、纖維 45%、灰分 6.4%(³)，除此之外大豆還含有微量的異黃酮素，此類微量物質由於結構和雌激素非常相似，並且具有雌激素活性，因此被稱為天然荷爾蒙(⁴)。

女性年齡平均到達四十五歲後即進入更年期，由於卵巢機能減退，體內雌激素合成與分泌開始減少，導致脂肪和膽固醇代謝失常，使得絕經後的女性鈣質容易流失、血脂和膽固醇升高、情緒不穩定、失眠、心血管疾病的罹患率提高等各種更年期特徵症狀。而大豆內含的異黃酮素是植物性雌激素，與雌激素的結構十分近似，可以刺激雌激素的活性，發揮補充雌激素不足的作用。義大利的臨床研究指出，研究者給予 104 位女性每天服用 76 毫克的異黃酮素，結果發現有 45% 的受試者有減少熱潮紅的現象；美國「臨床婦產科雜誌」的一項研究顯示，每天補充 60 毫克的異黃酮素能夠減少 60% 的更年期症候群。

在過去，荷爾蒙補充療法 (Hormone Replacement Therapy, HRT) 是醫學上幫助年長女性緩和更年期症狀的方法(⁵)，但是美國國家衛生院在 2002 年的重要研究顯示，每一萬位採用 HRT 的婦女一年後在正面結果的數據顯示，其療法可以減少約六例罹患結腸癌以及骨質疏鬆的機率，而於負面結果的數據則指出，每一萬名使用荷爾蒙補充療法的婦女會增加七例心臟疾病、八例中風、八例肺臟血管出現血塊、十三例四肢血管出現血塊以及八例罹患乳癌的機率。因此目前使用荷爾蒙補充療法以及其食品藥物前，必須經由婦產科醫生評估後，認為可以緩和病人更年期不適症狀的優點，高於給病人帶來危險性的情況下才得以使用(⁶)。

由於植物性雌激素與女性荷爾蒙的化學結構非常相似，而且對於人體和女性荷爾蒙一樣具有生理活性(⁷)，但是卻不會發生致癌的危險，而長期的荷爾蒙補充可能會引發癌症，因此相較於荷爾蒙補充療法可能會引發的副作用，植物性雌激素在食品藥物中脫穎而出。

成年人隨著年紀的增加，骨質密度會逐漸降低，因而容易引起骨折以及骨質疏鬆，而女性的骨骼量較少，尤其進入更年期後原本具有抑制骨骼流失機能的雌激素分泌不足，更容易罹患骨質疏鬆症。根據研究數據顯示，通常女性骨質疏鬆症罹患率約為男性的三倍；若相對於成年人每年骨質流失率為 1% 而言，停經後早期婦女的骨質流失率為每年 2%~3%，甚至有流失率達到 5% 的報告。停經後五年以後的骨骼量流失率會變緩，總結而言，婦女在 55 歲到 75 歲期間約會流失總骨量的 20%，如此嚴重而快速的骨骼量流失，會加速骨質疏鬆症的惡化，因此對於更

年期的骨質的保健，已經成為目前骨質疏鬆症防治的主題。

根據研究報告，異黃酮素具有促進造骨細胞生長、加強骨骼建造的能力，並且可以抑制蝕骨細胞的作用來減少骨骼量的流失。美國心臟病學會期刊的研究報告指出每人每日服用 92 毫克的異黃酮素六個月後，發現人體腰椎的骨密度可增加 2.2%；香港大學對 650 個年齡從 19 歲到 86 歲的女性進行研究調查發現，只有更年期之後的婦女服用異黃酮素才能有效增加骨質密度，而對於年輕的女孩而言並無相關性。異黃酮素除了對於更年期婦女的健康具有相當的療效之外，其最直接的作用即可有效調節血脂、降低膽固醇、保護心血管。

攝取過多的飽和脂肪或高膽固醇的食物會導致過量的飽和脂肪或膽固醇囤積在血管裡，容易引起心血管疾病。根據美國心臟學會報導，含有異黃酮素的黃豆蛋白飲料可以降低血清總膽固醇、低密度脂蛋白膽固醇及三酸甘油脂等含量，但若將飲料中的異黃酮素去除後，則無上述的效果，可知黃豆蛋白中抑制膽固醇活性的成分即是異黃酮素。當異黃酮素的含量愈高其降低總膽固醇及低密度脂蛋白膽固醇的效應就愈好。營養師建議只要每天攝取 25 公克的大豆蛋白，就能夠有效地降低心臟疾病的發生。根據日本京都大學以及東亞大學對於 40 歲至 60 歲的日本女性的調查顯示，每人每天服用約 40 毫克的異黃酮素連續四個禮拜後，發現其血壓以及血清膽固醇量均明顯的下降；另外加拿大的臨床研究顯示攝取黃豆蛋白可以降低罹患心血管疾病的機率，卻不會增加誘發荷爾蒙型癌症的危險性⁽⁸⁻¹³⁾。

由於異黃酮素的分子結構與女性荷爾蒙 17 β -estradiol 類似，具有抗雌激素的作用，因此在醫療應用方面可以避免荷爾蒙補充療法會引發乳癌與子宮內膜癌等缺點⁽¹⁴⁾。國外學者通過長期的流行病學調查發現，無論是在歐美發達國家，或是在亞洲國家，隨著居民每天大豆製品消費的增加，乳腺癌的相對危險性會呈下降趨勢，這其中主要的原因就是異黃酮素具有阻止癌細胞的增殖，並且具有促使癌細胞死亡的作用⁽¹⁵⁾。

異黃酮素是眾多植物類黃酮的總稱。這類植物性雌激素在豆科植物中含量最為豐富。異黃酮素的化學構造有著 C6-C3-C6 的二苯丙烷基本骨架，其中雜環命名為 C 環，與 C 環相鄰的苯環命名為 A 環，而 C 環上第三位置取代的苯環則命名為 B 環⁽¹⁶⁾。豆類除富含優質蛋白外，也被列為異黃酮素的最佳來源，尤其以大豆為主要代表，其他幾種代表性的異黃酮素也是來自豆科植物，如 Puerarin、Biochanin A、Licoisoflavone A 的來源分別是葛根 (Puerariae radix)、紅目蓿 (Red clover) 及甘草

(Licorice)。一般而言，大豆內總異黃酮素含量為總乾重的 0.2 到 0.4wt%，且異黃酮素分佈於種皮、子葉和胚軸中，其中以胚軸的含量最高⁽¹⁷⁻²⁰⁾。

目前各國研究學者對於異黃酮素進行初步的研究，結果發現此類被稱為植物性雌激素的物質對於人體具有良好的保健功能，現今已成為廣泛注意的焦點之一，且已有許多關於異黃酮素的研究論文發表於各專業的期刊。

Genistein 以及 Biochanin A 均屬於異黃酮素，且由於 Genistein 以及 Biochanin A 的化學結構和雌激素相似並具有類似雌激素的活性，因此被歸為植物性雌激素。目前可於許多豆科植物中發現 Genistein 以及 Biochanin A 的存在，其中大豆、葛根及紅花苜蓿是含 Genistein 以及 Biochanin A 較具有代表性的植物⁽²¹⁾。

異黃酮類素由天然的植物中萃取，必須進一步藉由管柱層析或製備級薄膜層層析法、製備級高效液相層析法來達到分離純化的目的，再經由濃縮與再結晶的過程製備純異黃酮素。然而使用這種傳統的分離純化方法，從天然植物提煉異黃酮類素是一項相當浩大的工程，由於傳統的分離純化方法步驟冗長，並且異黃酮類素在天然植物中的含量均相當的微量，使得從天然植物中提煉異黃酮類素變的更加困難。本計畫之實驗方法是希望利用生物分子模版 (Molecular Imprinting Polymer) 的方法，代替傳統的分離純化步驟，自天然的植物中提煉異黃酮類素，即利用所要提煉的目標物，也就是異黃酮類素，製造出對於目標物分子具有高辨識能力的高分子材料，來提煉異黃酮類素，如此便可突破以往傳統分離純化步驟的費時及耗能的問題。

本實驗室已具備在製作生物分子模版的經驗以及基礎的設施，至今已具有許多生物分子的模版已被製造出，其成果也陸續發表於各會議、期刊及專利中，如藥品^(22, 23)、胺基酸⁽²⁴⁾、蛋白質^(25, 26)、以及類固醇⁽²⁷⁻²⁹⁾。分子模板最早期的應用是製備成顆粒狀以填充於液相層析的固定相管柱中，主要即利用其具有良好的辨識能力以及良好的選擇性來達到分離純化的效果。除此之外，分子模版也被應用於醫學診斷、食品加工監製、以及環境污染的監控上⁽³⁰⁻³³⁾。分子模版的技術逐漸趨向成熟，希望廣泛地應用於各領域，尤其是比對傳統中藥的指紋圖譜，並純化其具有活性成分。

由於異黃酮素具有多種潛在的醫療效用，包括可減緩女性更年期症

狀、降低罹患心血管疾病的機率、防止骨質流失以及具有防癌等效果⁽³⁴⁻³⁶⁾，為目前重要的科學發現，此項計畫則希望能結合分子模版技術與中國傳統中藥以及日常重要食品大豆來從中提煉出具珍貴療效的異黃酮素。

貳、材料與方法

所要提煉的目標物也就是模版分子 (template)，與帶有官能基的官能單體 (functional monomer) 作用形成鍵結，目標物以及官能單體兩者之間的作用力可以是以共價鍵結或者非共價鍵結⁽³⁷⁾ 的方式形成錯合物，再經由高比例之交聯劑 (cross-linker) 交聯聚合來穩固鍵結位置而得一高分子聚合物。接著使用有機溶劑洗去此高分子聚合物中的目標物，如此即可製備得一多孔性的高分子模版 (MIP)，且其孔洞的大小、形狀與目標物分子相同，並且具有特殊官能基可以捕捉目標物分子，因此此一分子模版對於目標物分子具有高辨識能力。

圖 2.1.1 和圖 2.1.2 即將分子模版技術的主要概念以模型來表示，並且繪出利用分子模版的方法進行分離純化之情況。

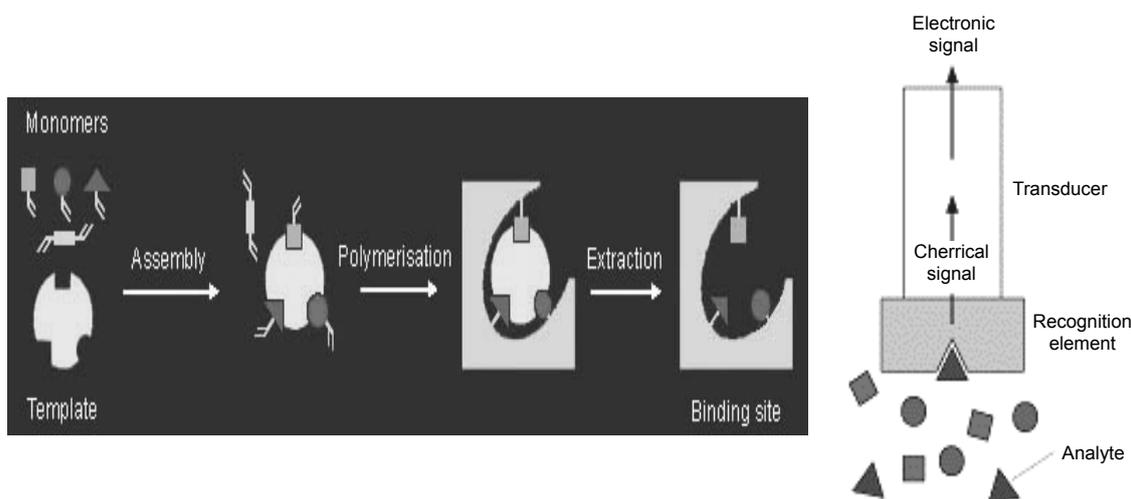


圖 2.1.1 利用模型表示分子模版技術的主要概念，選擇多種適當的官能單體與目標物作用進而交聯聚合得一高分子材料，再以有機溶劑將此材料中的目標物萃取出即可得具有高辨識基座的高分子模版⁽³⁸⁾。

圖 2.1.2 利用模型表示分離純化之過程。分子模版早期即被應用於管柱層析之固定相，利用此概念即可將分子模版實際應用於分離純化⁽³⁹⁾。

有鑒於傳統的分離純化程序繁雜，且能量需求以及效率有限，所以希望能利用近年來已經趨於成熟的分子模版技術來進行異黃酮類物質

的分離及純化。如此一來，對於自中國食品藥材中提煉具有醫療效用的化學物質，並且進行分離純化的領域上即有大規模的突破。

由於 Genistein 以及 Biochanin A 具有類似雌激素的活性，因此在於減輕女性更年期症狀、預防骨質疏鬆、抗致癌物質以及抗氧化等功能上均具有一定的效果⁽⁴⁰⁾。本研究計畫將設計分別以 Genistein 和 Biochanin A 為目標物，配合以多種官能單體聚合製備該分子模版，希望以分子模版方式取代傳統的分離純化步驟⁽⁴¹⁾，從中國天然食品藥材中分別純化製備得到 Genistein 以及 Biochanin A，此項研究計畫結合了中國天然食品藥材以及熱門生物技術，希望能研發出可以取代繁冗的傳統分離純化程序的新技術，以利更快速自天然食品藥材中提煉具藥效的物質，並達到簡化步驟以及節省地球資源的目的。

圖 2.2 為此研究計畫主要的目標物，Genistein 以及 Biochanin A，並以異黃酮素的結構做為參考。

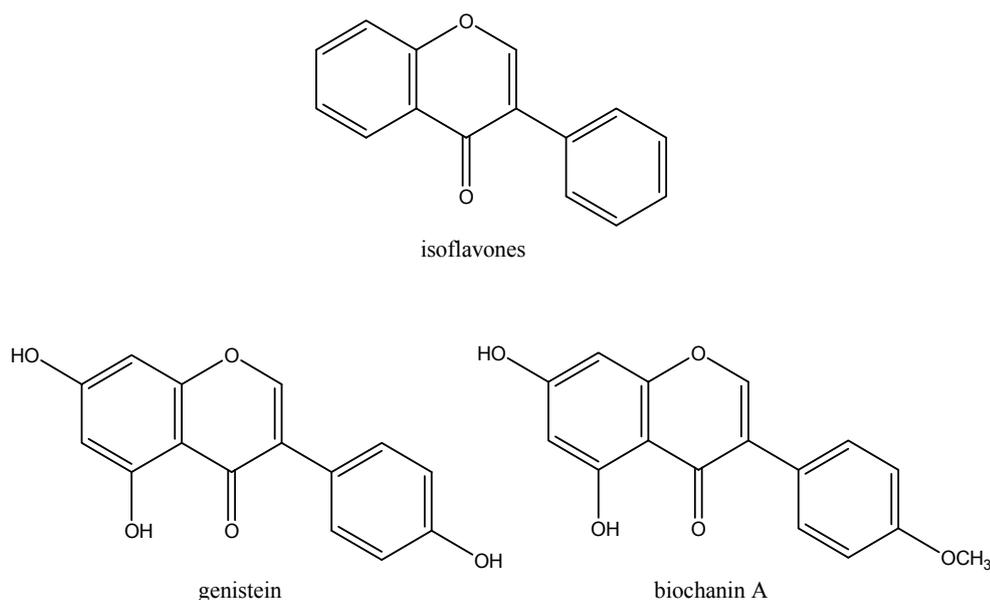


圖 2.2 Genistein 及 Biochanin A 均是異黃酮的一員，異黃酮是一龐大的家族，由於其化學結構和人體的雌激素相當類似，因此有植物雌激素的稱呼，並且由於具有類似雌激素的活性，對於女性更年期不適症候、骨質疏鬆、心血管疾病以及多種癌症具有舒緩或預防之療效，為目前研究員者積極研究之。

一、藥品

(一) 目標物 1.

Genistein (4', 5, 7-trihydroxyisoflavone), 東京化成, 分子量 270.24, 外觀為淡黃色粉末固體, 是黃酮異構物的一種, 具有健康價值。

(二) 目標物 2.

Biochanin A (5,7-Dihydroxy-4'-methoxyisoflavone ; Genistein 4'-methyl ether), Sigma, 分子量 284.3, 外觀為淡黃色粉末固體, 是黃酮異構物的一種, 具有健康價值。

(三) 官能單體 1.

4-Vinyl Pyridine, 中文名為4-乙烯基吡啶, Lancaster, 分子量 105.14, 外觀為橘紅色液體, 具有刺激性的魚腥臭, 並且具有毒性。

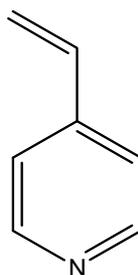


圖 2.3 官能單體 4-Vinyl Pyridine 的結構式。

(四) 官能單體 2.

MAA (Methacrylic acid), 中文名為甲基丙烯酸, Sigma, 分子量 86.09, 熔點 16°C、沸點 160.5°C, 外觀為透明液體, 具有刺鼻性臭味。由於其結構含有羧基, 因此容易和其他化合物作用形成氫鍵, 所以常當製備分子模板的官能單體。

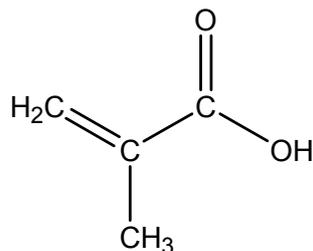


圖 2.4 官能單體 MAA (Methacrylic acid) 的結構式。

(五) 交聯劑

EGDMA (Ethylene glycol dimethacrylate), Showa, 中文名為乙二醇二甲基丙烯酸酯, 分子量 198.2, 熔點 -40°C 、沸點 260°C , 外觀為透明液體, 不溶於水。由結構式可看出其含有兩個不飽和的碳碳雙鍵, 因此容易形成自由基, 所以為常用的交聯劑。

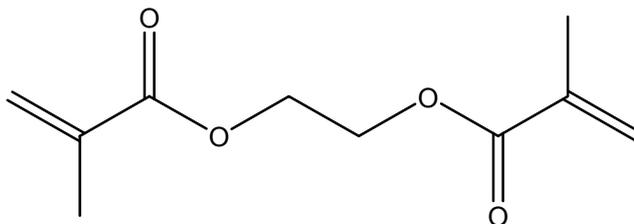


圖 2.5 交聯劑 EGDMA (Ethylene glycol dimethacrylate) 的結構式。

(六) 起始劑

AIBN (2,2-Azobisisobutyronitrile), Tokyo Chemical Co., 中文名為 2,2'-偶氮雙(2-甲基丙月青), 東京化成, 分子量 164.2, 熔點 103°C , 外觀為一白色粉末固體, 是常用的起始劑, 通常反應溫度約在 $50-70^{\circ}\text{C}$, 必須存放於陰涼處。

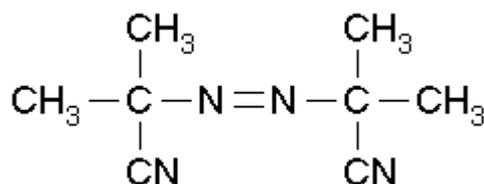


圖 2.6 起始劑 AIBN (2,2-Azobisisobutyronitrile) 的結構式。

二、自天然物中萃取目標物

- (一) 分別量秤 0.5g 的黃豆粉以及葛根粉置於 50cc 的離心管中。
- (二) 分別加入 10mL 的 ethanol, 於 60°C 下進行超音波震盪 30 分鐘。
- (三) 以 4000rpm 的轉速下進行離心 5 分鐘。
- (四) 取澄清液以 HPLC 分析。

(五) 再分別以 10mL 的 acetonitrile, ethanol 為溶劑, 進行三階段的黃豆粉萃取實驗。

三、分子模版製備

(一) 聚合

1. MIP(Genistein-4VP)的製備

表 2.1 MIP (Genistein-4VP) 製備所用配藥。

MIP(Genistein-4VP)				
	template	functional monomer	crosslinker	initiator
chemical	genistein	4VP	EGDMA	AIBN
mg	27.9	91.7	91.7	17.9
mmole	0.109	0.872	4.58	0.109
μL	---	93.6	865	---
mole %	2	16	84	2

量稱 genistein (27.9mg)溶解於 3ml 的 ethanol 中, 隨後加入 4VP (93.6μL), 再加入交聯劑 EGDMA (865μL), 最後加入起始劑 AIBN (17.9mg), 將混合液攪拌均勻成單一液相, 再通以氮氣以防止氧化反應的發生。接著置入定溫 60°C 的烘箱中進行聚合反應, 時間長為 24 小時, 聚合好之聚合物以研鉢研磨成粉末狀。

2. MIP (Genistein-MAA)的製備

表 2.2 MIP (Genistein-MAA)製備所用配藥。

MIP(G-MAA)				
	template	functional monomer	crosslinker	initiator
chemical	genistein	MAA	EGDMA	AIBN
mg	27.9	86.09	91.7	17.9
mmole	0.109	0.872	4.58	0.109
μL	---	74.0	865	---
mole %	2	16	84	2

量稱 genistein (27.9mg)溶解於 3ml 的 ethanol 中, 隨後加入 MAA(74.0μL), 再加入交聯劑 EGDMA(865μL), 最後加入起

始劑 AIBN (17.9mg)，將混合液攪拌均勻成單一液相，再通以氮氣以防止氧化反應的發生。接著置入定溫 60°C 的烘箱中進行聚合反應，時間長為 24 小時，聚合好之聚合物以研鉢研磨成粉末狀。

3. NIP (4VP) 的製備

和上述的 MIP 製備方法步驟相同，唯一的差異在於製備過程中沒有加入 template。

4. NIP (MAA) 的製備

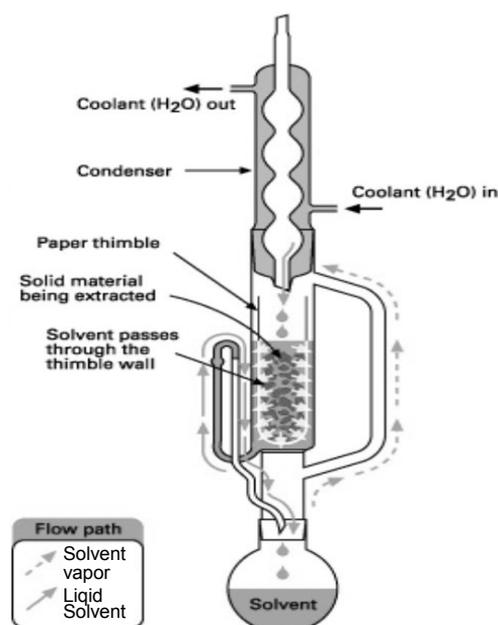
和上述的 MIP 製備方法步驟相同，唯一的差異在於製備過程中沒有加入 template。

(二) 粉碎及過篩

分子模版和非分子模版聚合物在粉碎後，以 mesh200 以及 mesh400 的標準分析篩網篩選，取得粒徑範圍為 37-74 μ m 以及小於 37 μ m 的 particles 進行研究。

(三) 自分子模版移除目標物

以 ethanol 為溶劑，利用索式萃取的方式將目標物從模版中移除。每次使用 250mL 的 ethanol，溫度設定於 78°C，萃取時間為 24 小時，每樣 sample 以上述步驟清洗 3 次。



Soxlet extraction system

- * Solvent : ethanol
- * Temperature : 78°C
- * 24hr for each run
- * 3 times for each MIP or NIP

圖 2.7 Soxlet extraction system 之裝置圖。

四、分子模版吸附目標物

(一) 濃度對於 Genistein-MIPs 吸附 Genistein 能力的影響

1. 配製濃度為 10^{-4} M 的 Genistein 溶液各 100ml，以 acetonitrile 為溶劑。
2. 分別量稱 50mg 的 MIP (G-4VP)、MIP (G-MAA)、NIP (4VP)、以及 NIP (MAA)，置入規格為 15cc 的離心管裡。
3. 分別量取 5ml，濃度 10^{-4} M Genistein 溶液倒入上述裝有 50mg sample 的離心管中。
4. 將各個離心管置入 bath shaker 中，以 50rpm 的轉速，在常溫下進行 24 小時的吸附實驗。
5. 吸附實驗完成後，以 4000rpm 的轉速進行 5 分鐘的離心，取澄清液以 HPLC 分析。
6. 配製濃度為 10^{-5} M 的 Genistein 溶液 100mL，以 acetonitrile 為溶劑，重複上述吸附實驗。

(二) 濃度對於 Genistein-MIPs 吸附 Biochanin A 能力的影響

分別配製 10^{-4} M 的 Biochanin A 溶液、 10^{-5} M 的 Biochanin A 溶液各 100mL，以 acetonitrile 為溶劑，重複上述吸附實驗。

(三) 以 Daidzein 為相似物對於 Genistein-MIPs 選擇性的影響

配製 10^{-4} M 的 Genistein, Daidzein 溶液 100mL，以 acetonitrile 為溶劑，重複上述吸附實驗。

(四) Genistein-MIP 於黃豆萃取液之分離純化及提煉功效

取 3.000g 的黃豆粉，用 60mL 的 ethanol 於 60°C 超音波振盪萃取 30 分鐘，取澄清溶液，以上述步驟進行吸附實驗。

參、結果

本研究的主要結果分為以下數個部分：一、利用有機溶劑自中藥等天然物中初步萃取異黃酮素。二、異黃酮素分子模版之製備。三、應用分子模版吸附異黃酮素 (Genistein)。四、異黃酮素的濃度影響異黃酮素 (Genistein) 分子模版的選擇性。五、異黃酮素 (Genistein) 分子模版對於黃豆萃取液之分離純化及提煉功效。

一、自天然物中萃取目標物

利用溶劑萃取中藥中的有效物質，在傳統的中藥煉製中，所使用的溶劑包括水及酒精等，所以在本研究當中我們也使用溶劑，來初步萃取出所要的物質，所以在本計畫的第一部份就是利用酒精和 acetonitrile 來對葛根或黃豆進行異黃酮素 (Genistein) 的萃取，並以 HPLC 來分析可萃取的總量。

(一) 利用 10mL 的 90% ethanol 對 0.500g 的葛根粉末，在 60°C 下進行超音波震盪 30 分鐘萃取。數據顯示，Genistein 於 HPLC 分析圖譜中，其滯留時間約為 7.5min，於葛根萃取液中的濃度大約為 0.08mg/100ml。以上述之萃取方式，平均每公克葛根可萃取 16 μ g 的 Genistein。滯留時間約為 6.7min 則是另一異黃酮素 Daidzein 之特徵峰。

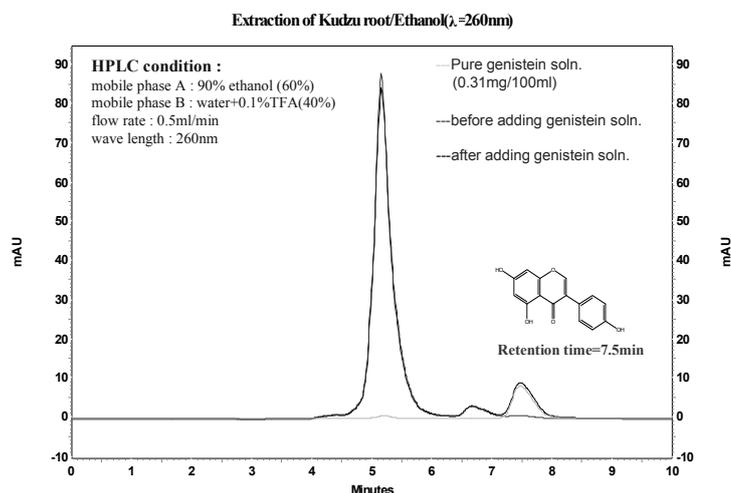


圖 3.1 利用 10mL 的 90% ethanol 對 0.500g 的葛根粉末，在 60°C 下進行超音波震盪 30 分鐘萃取，經 HPLC 分析後所得之分析圖譜。

(二) 利用 10mL 的 90% ethanol 對 0.500g 的黃豆粉末，在 60°C 下進行

超音波震盪 30 分鐘萃取。數據顯示，Genistein 於 HPLC 分析圖譜中，其滯留時間約為 7.5min，Genistein 於黃豆粉末萃取液中的濃度大約為 0.2mg/100ml。以上述之萃取方式，平均每公克黃豆粉末可萃取 40 μ g 的 Genistein。滯留時間約為 6.7min 則是另一異黃酮素 Daidzein 之特徵峰。

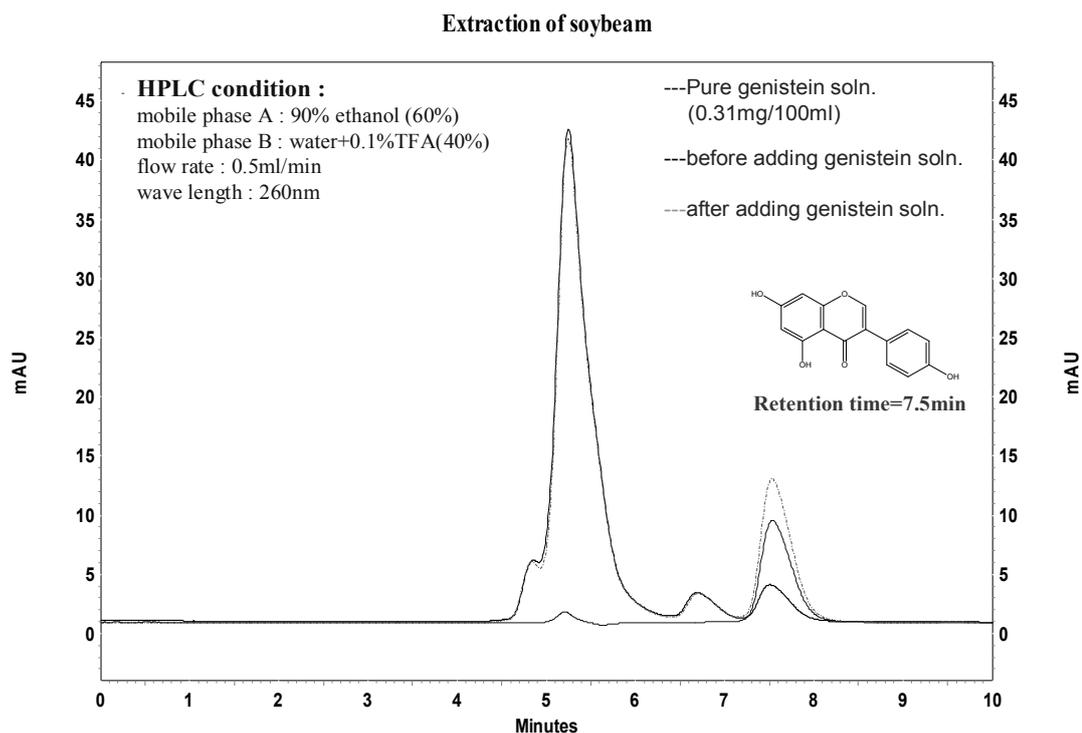


圖 3.2 利用 10mL 的 90% ethanol 對 0.500g 的黃豆粉末，在 60°C 下進行超音波震盪 30 分鐘萃取，經 HPLC 分析後所得之分析圖譜。

(三) 以 10mL 的 90% ethanol 為溶劑，進行三階段的黃豆粉萃取實驗。Genistein 於 HPLC 分析圖譜中，其滯留時間約為 7.5min，滯留時間約為 6.7min 則是另一異黃酮素 Daidzein 之特徵峰。

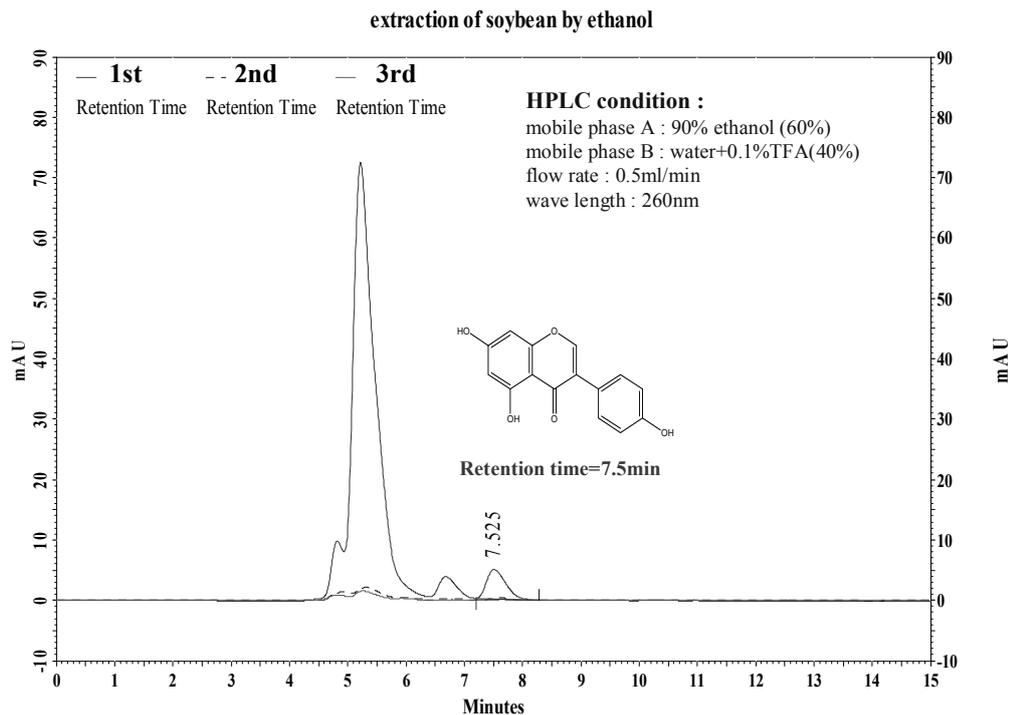


圖 3.3 以 10mL 的 90% ethanol 為溶劑，進行三階段的黃豆粉萃取，經 HPLC 分析後所得之分析圖譜。

表 3.1 以 10mL 的 90% ethanol 為溶劑，進行三階段的黃豆粉萃取之數據。

	retention time(min)	µg	Error bar
1st	7.503	18.05	0.277
2nd	7.535	7.28	0.022
3rd	7.580	6.21	0.004
Total		31.55	

利用上述之萃取方法，所得結果記錄於表 3.1 中，第一次 Genistein 之萃取量為 18.05 µg，第二次為 7.28 µg，第三次為 6.21 µg；綜和三次之 Genistein 萃取量為 31.55µg。

extraction of soybean by ethanol

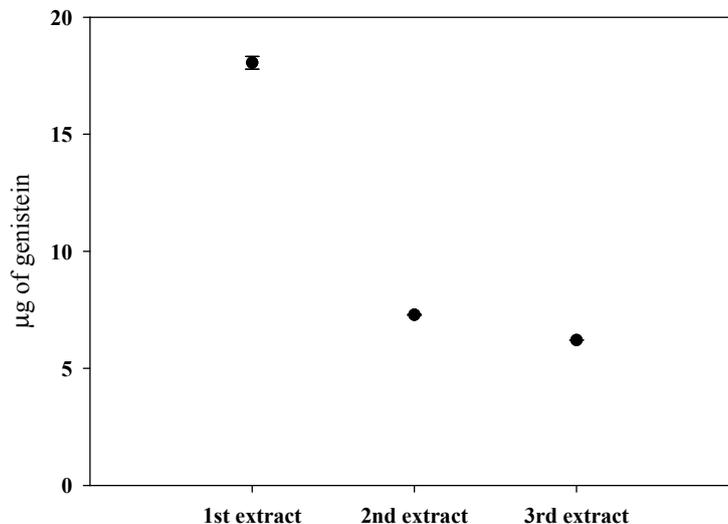


圖 3.4 以 10mL 的 90% ethanol 為溶劑，進行三階段的黃豆粉萃取，綜合三次之 Genistein 萃取量為 30µg。

(四) 以 10mL 的 acetonitrile 為溶劑，進行三階段的黃豆粉萃取實驗，Genistein 於 HPLC 分析圖譜中，其滯留時間約為 7.5min，滯留時間約為 6.7min 則是另一異黃酮素 Daidzein 之特徵峰。

extraction of soybean by acetonitrile

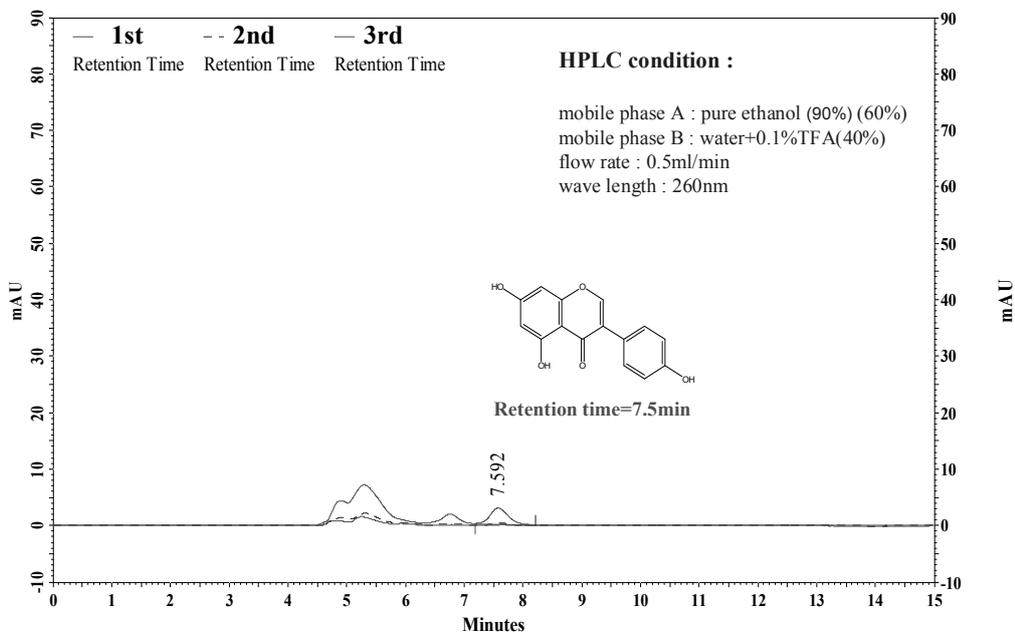


圖 3.5 以 10mL 的 acetonitrile 為溶劑，進行三階段的黃豆粉萃取，經 HPLC 分析後所得之分析圖譜。

表 3.2 以 10mL 的 90% acetonitrile 為溶劑，進行三階段的黃豆粉萃取之數據。

	retention time(min)	μg	Error bar
1st	7.573	7.75	0.0418
2nd	7.596	1.98	0.0102
3rd	7.668	1.45	0.0064
Total		11.18	

extraction of soybean by acetonitrile

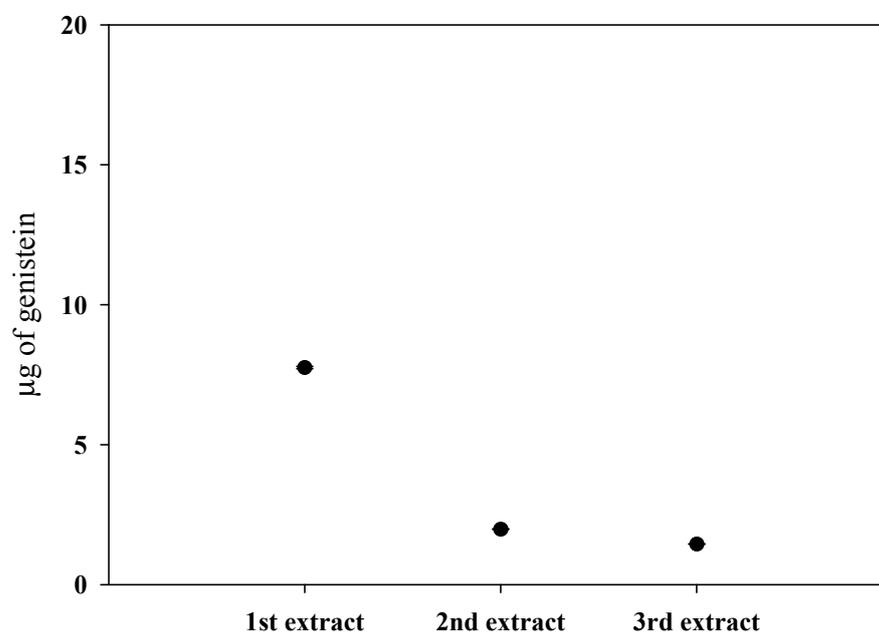


圖 3.6 10mL 的 90% acetonitrile 為溶劑，進行三階段的黃豆粉萃取，綜合三次之 Genistein 萃取量為 10μg。

利用上述之萃取方法，所得結果記錄於表 3.2 中，第一次 Genistein 之萃取量為 7.75μg，第二次為 1.98μg，第三次為 1.45μg；綜合三次之 Genistein 萃取量為 11.18μg。

二、分子模版製備

(一) MIP (Genistein-4VP)的製備

1. 聚合：分子模版聚合之配方如表 3.3 所示。

表 3.3 製備 MIP (Genistein-4VP)所使用的配藥。

	template	functional monomer	crosslinker	initiator
amount	genistein	4VP	EGDMA	AIBN
mg	27.9	91.7	91.7	17.9
mmole	0.109	0.872	4.58	0.109
L	---	93.6	865	---
mole %	2	16	84	2

2. 粉碎及過篩

分子模版和非分子模版聚合物在粉碎後，以 mesh200 以及 mesh400 的標準分析篩網篩選，取得粒徑範圍為 37-74 μ m 以及小於 37 μ m 的 particles 進行研究。

3. 自分子模版移除目標物

表 3.4 利用純度為 90%的 ethanol 對於 MIP (Genistein-4VP)中目標物的移除效率。

	MIP (Genistein-4VP)	MIP (Biochanin A-4VP)
Template used (mg)	29.7	31.0
Template removed by washing (mg)	20.3	20.8
Removal percentage	68%	67%

(二) MIP(Genistein-MAA)的製備

1. 聚合：分子模版聚合之配方如表 3.5 所示。

表 3.5 製備 MIP (Genistein-MAA)所使用的配藥。

	template	functional monomer	crosslinker	initiator
	genistein	MAA	EGDMA	AIBN
mg	27.9	86.09	91.7	17.9
mmole	0.109	0.872	4.58	0.109
μ L	---	74.0	865	---
mole %	2	16	84	2

2. 粉碎及過篩

分子模版和非分子模版聚合物在粉碎後，以 mesh200 以及 mesh400 的標準分析篩網篩選，取得粒徑範圍為 37-74 μ m 以及小於 37 μ m 的 particles 進行研究。

3. 自分子模版移除目標物

表 3.6 利用純度為 90% 的 ethanol 對於 MIP (Genistein-MAA) 中目標物的移除效率。

	MIP(Genistein-MAA)	MIP(Biochanin A-MAA)
Template used (mg)	29.7	31.0
Template removed by washing (mg)	4.01	2.82
Removal percentage	14%	9%

三、分子模版吸附目標物

(一) 濃度對於 Genistein-MIPs 吸附 Genistein 能力的影響

表 3.7 以 10^{-4} M 的 Genistein solution 進行吸附之數據。

Mono-mer	The amount of Genistein absorbed (μ g/g of polymer)				Imprinted efficiency	
	MIP		NIP		37~74 μ m	<37 μ m
	37~74 μ m	<37 μ m	37~74 μ m	<37 μ m		
4VP	402.38	307.12	255.58	251.47	1.57	1.22
MAA	26.29	31.64	21.02	18.93	1.25	1.67

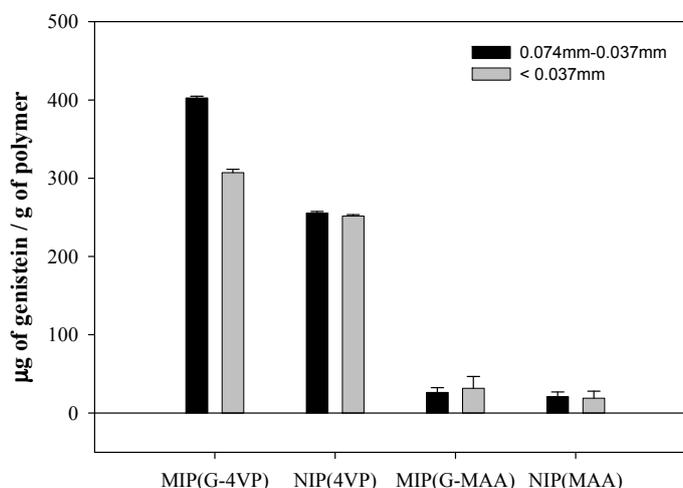


圖 3.7 以 10^{-4} M 的 Genistein solution 進行吸附之圖示。

表 3.8 以 $10^{-5}M$ 的 Genistein solution 進行吸附之數據。

Mono-mer	The amount of Genistein absorbed ($\mu\text{g/g}$ of polymer)				Imprinting efficiency	
	MIP		NIP		37~74 μm	<37 μm
	37~74 μm	<37 μm	37~74 μm	<37 μm		
4VP	52.84	55.91	34.89	36.21	1.51	1.54
MAA	-8.44	-3.01	4.53	2.83	---	---

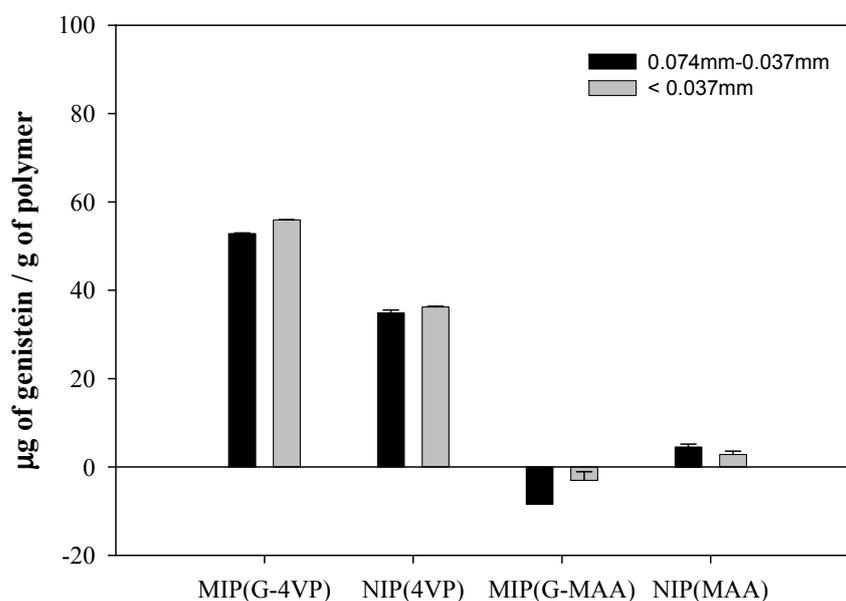


圖 3.8 以 $10^{-5}M$ 的 Genistein solution 進行吸附之圖示。

(二) 濃度對於 Genistein-MIPs 吸附 biochanin A 能力的影響

表 3.9 以 $10^{-4}M$ 的 Biochanin A solution 進行吸附之數據。

Monomer	The amount of Biochanin A absorbed ($\mu\text{g/g}$ of polymer)			
	MIP		NIP	
	37~74 μm	<37 μm	37~74 μm	<37 μm
4VP	90.75	90.26	96.85	109.27
MAA	-28.85	-30.55	31.67	38.72

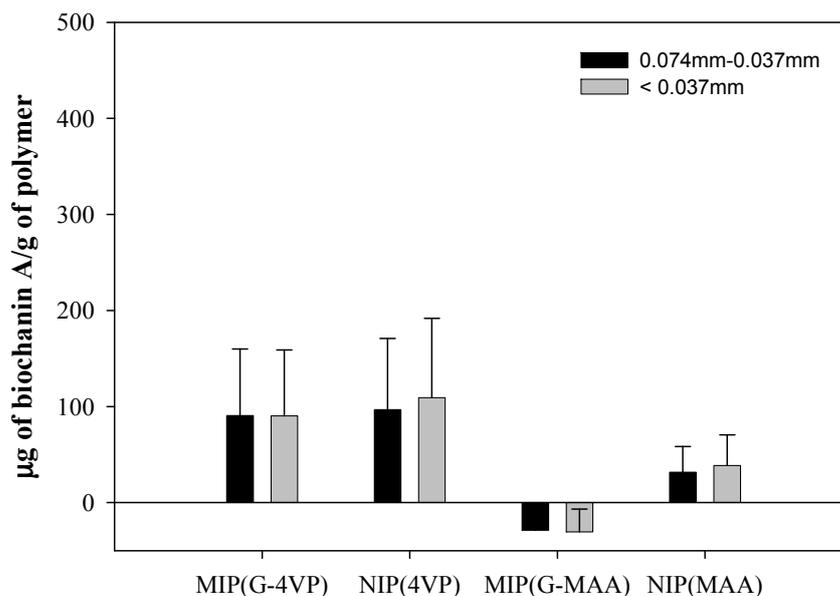


圖 3.9 以 10⁻⁴ M 的 Biochanin A solution 進行吸附之數據。

表 3.10 以 10⁻⁵ M 的 Biochanin A solution 進行吸附之數據。

Monomer	The amount of Biochanin A absorbed (µg/g of polymer)			
	MIP		NIP	
	37~74µm	<37µm	37~74µm	<37µm
4VP	26.28	27.14	15.48	17.96
MAA	3.04	3.21	2.76	2.85

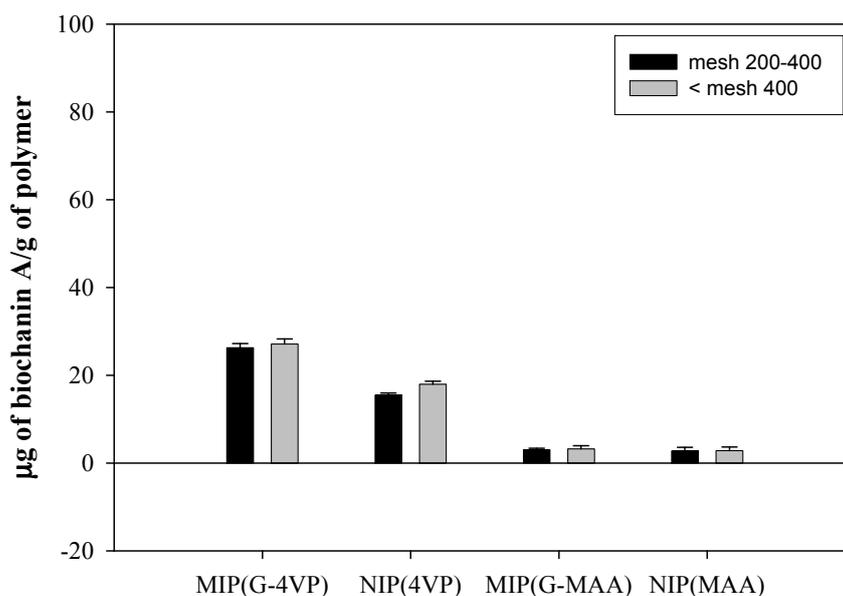


圖 3.10 以 10⁻⁴ M 的 Biochanin A solution 進行吸附之圖示。

四、濃度對於 Genistein-MIPs 選擇性的影響

(一) 以 Biochanin A 為相似物

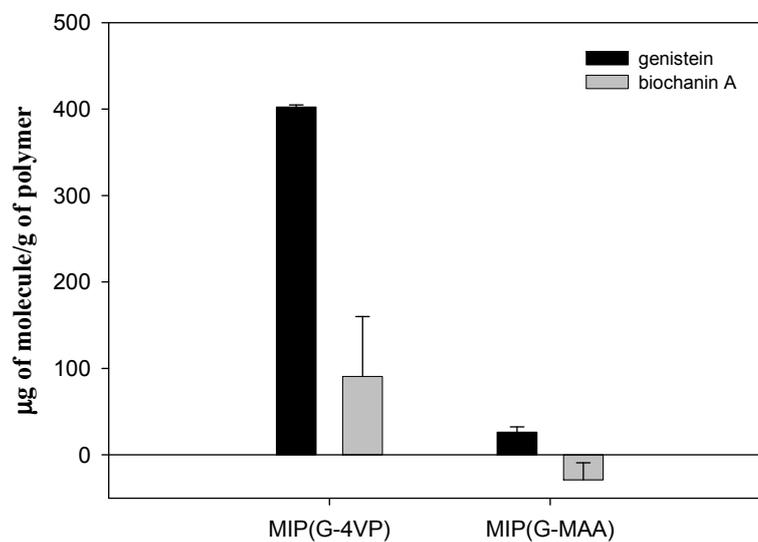


圖 3.11 在濃度為 10^{-4} M 的溶液下比較 Genistein-MIPs 的選擇性。

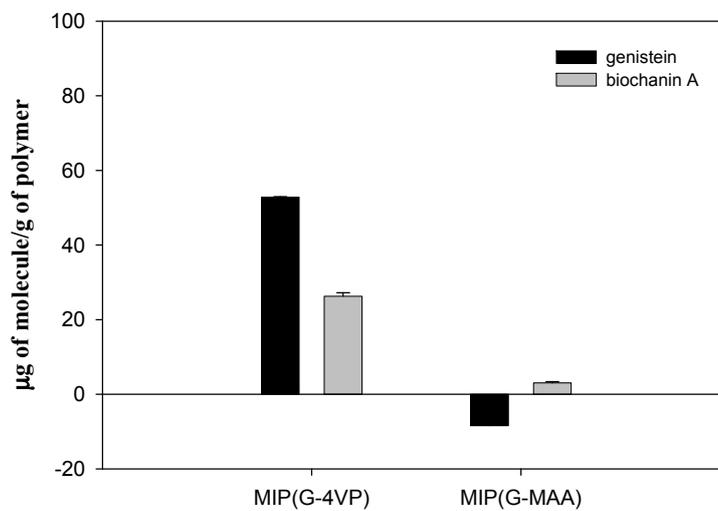


圖 3.12 在濃度為 10^{-5} M 的溶液下比較 Genistein-MIPs 的選擇性。

(二) 以 Daidzein 為相似物

表 3.11 在等莫耳的 Genistein 及 Daidzein，且濃度為 $10^{-4}M$ 的溶液下比較 Genistein-MIPs 的選擇性。

The amount of molecule absorbed ($\mu\text{g/g}$ of polymer)				Imprinted efficiency	Selectivity
MIP		NIP			
Genistein	Daidzein	Genistein	Daidzein		
373.79	213.25	253.56	142.57	1.47	1.75

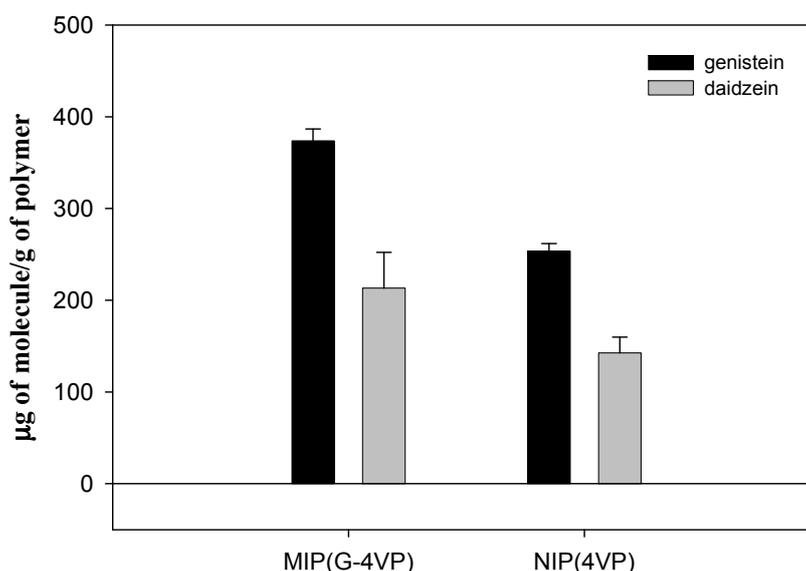


圖 3.13 在等莫耳的 Genistein 及 Daidzein，且濃度為 $10^{-4}M$ 的溶液下 Genistein-MIPs 的選擇性比較圖示。

五、Genistein-MIP 於黃豆萃取液之分離純化及提煉功效

表 3.12 Genistein-MIP 對於黃豆萃取液之分離純化功效。

Chemicals	Retention time (min)	conc. (mole%)		after/before rebinding conc. Ratio
		before rebinding	after rebinding	
Unknown	4.667	8.30	6.10	0.73
Unknown	5.236	82.35	82.58	1.00
Daidzein	6.671	3.54	3.43	0.97
Genistein	7.491	5.81	7.89	1.35

肆、討論

一、自天然物中萃取目標物

每 100g 的黃豆粉中約含有 50~300mg 的大豆異黃酮(0.05%~0.3%)，不同的黃豆來源、或經過不同的製程，其中黃豆異黃酮含量差異極大。其 genistein 含量由 6.6 μ g/g 到 40.2 μ g/g 不等，而 daidzein 含量由 33.7 μ g/g 到 105.6 μ g/g 不等。

依本計畫之萃取方法，平均每公克葛根粉末可萃取 16 μ g 的 Genistein (圖 3.1)；而平均每公克黃豆粉末可萃取 40 μ g 的 Genistein (圖 3.2)。

由於結果顯示黃豆粉中 Genistein 的含量約為葛根粉末的 3 倍，因此我們將初步利用分子模版之方法，以黃豆粉之萃取液作為分離純化的對象，而由於 Biochanin A 成分於此萃取實驗中，以液相層析儀無法分析，因此本計畫將重點放於 Genistein 的分析以及分離純化。

利用 acetonitrile 為萃取溶劑，對 0.5000 克重的黃豆粉於 60°C 下以超音波震盪進行萃取。比較溶劑 acetonitrile 以及 90% 的 ethanol 對於黃豆粉的萃取效率，發現以 90% 的 ethanol 之 Genistein 萃取量約為以 acetonitrile 為溶劑的 2.3 倍(如圖 3.3-3.6、表 3.1-3.2 所示)。

因此本計畫發現，對於黃豆粉之最佳萃取條件為在 60°C 之酒精(純度 90%) 萃取溶劑中，超音波震盪下進行 Genistein 萃取。

二、分子模版製備

Genistein 為本計畫所要提煉的目標物，也就是模版分子(template)，可與帶有官能基的官能單體(functional monomer)作用形成鍵結，目標物以及官能單體兩者之間的作用力可以是以共價鍵結或者非共價鍵結的方式形成錯合物，再經由高比例之交聯劑(cross-linker)交聯聚合來穩固鍵結位置而得一高分子聚合物。接著使用有機溶劑洗去此高分子聚合物中的目標物，如此即可製備得一多孔性的高分子模版(MIP)，且其孔洞的大小、形狀與目標物分子相同，並且具有特殊官能基可以捕捉目標物分子，因此此一分子模版對於目標物分子具有高辨識能力。

在此計畫中，選擇 4-Vinyl Pyridine (4VP) 以及 Methacrylic acid (MAA) 為官能單體，和本計劃所要提煉的目標物 Genistein 形成非共

價鍵結，再經由高比例的交聯劑 Ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA)交聯聚合得一高分子，接著使用純度為 90%的 ethanol 來移除高分子中的 Genistein，如此即得一多孔性的高分子模版 (MIP)。

三、自分子模版移除目標物

利用 4VP 為官能單體製備 MIPs 時 (表 3.3)，其目標物移除量約為 65-70% (表 3.4)，以 MAA 為官能單體製備 MIPs 時 (表 3.5)，則約為 9-15% (表 3.6)。此數據顯示，以 MAA 為官能單體時，目標物較難從模版中被移除，因此，經過目標物移除步驟後所產生的選擇性孔洞相較於以 4VP 為官能單體製備的 MIPs 還少，因此在於吸附目標物或者分離純化萃取液方面，都會較以 4VP 為官能單體製備的 MIPs 效果差。

四、分子模版吸附目標物

在吸附實驗中，探討濃度對於 MIPs 對於目標物吸附能力的影響，分別配製 10^{-4}M 以及 10^{-5}M 的目標物濃度進行吸附實驗，經表 3.7、表 3.8 可以發現，Genistein-MIPs 對於 Genistein 在濃度為 10^{-4}M 的吸附量 ($402.38\mu\text{g/g}$ of polymer) 是在濃度為 10^{-5}M ($52.84\mu\text{g/g}$ of polymer) 的 7.6 倍，證實濃度對於 MIPs 之吸附能力具有相當大的影響力。

在本計畫中，取顆粒直徑範圍在於 $37-74\mu\text{m}$ 以及小於 $37\mu\text{m}$ 的 Genistein-MIPs 顆粒進行吸附研究，比較 Genistein-MIPs 的顆粒大小對於吸附 Genistein 的能力有何影響。通常粒徑較小的顆粒，其表面積較大，因此吸附量會比粒徑較大的顆粒多。

經實驗結果發現，除了圖 3.7 中，粒徑大小對於 Genistein-MIPs 的吸附量有較大的影響外，其他的 MIPs 以及 NIPs，並沒有受粒徑大小的影響，而在吸附量上表現出很大的差異 (表 3.7-3.8 以及圖 3.7-3.8)。這可能是因為兩粒徑範圍 ($37-74\mu\text{m}$ 、小於 $37\mu\text{m}$) 沒有有很大的差異，因此 MIPs 以及 NIPs 並沒有表現出粒徑對於吸附量的影響。

五、濃度對於 Genistein-MIPs 選擇性的影響

(一) 以 Biochanin A 為相似物

在此選擇性實驗當中，Genistein-MIPs 分別以濃度為 10^{-4}M 以及 10^{-5}M 的 Biochanin A 溶液去進行吸附 (表 3.9-3.10、表

3.9-3.10), 圖 3.11 以及圖 3.12 為 Genistein-MIPs 進行吸附實驗之選擇能力結果, 發現在濃度為 10^{-4}M 的條件下, 不僅有利於 Genistein-MIPs 對於目標物 Genistein 的吸附能力, 也有利於 Genistein-MIPs 對於目標物 Genistein 的選擇性。由圖 3.11 及圖 3.12 可以看出, 隨濃度由 10^{-4}M 降低成 10^{-5}M , Genistein-MIPs 對於目標物 Genistein 的選擇性也由 4.43 降低成 2.01。

Biochanin A 以及 Genistein 化學結構上的差異為苯環上的取代基不同, Biochanin A 化學結構中苯環上的取代基為甲氧基, 而 Genistein 的化學結構中苯環上的取代基則是氫氧基。由於 Genistein-MIPs 為一多孔性高分子, 且其孔洞的大小、形狀與目標物分子, 也就是和 Genistein 相同, 並且其孔洞上具有特殊的官能基可以捕捉 Genistein, 並且對於 Genistein 具有高辨識能力。由於 Biochanin A 和 Genistein 在於化學結構上的差異, 因此 Genistein-MIPs 對於 Biochanin A 的吸附量相較於對 Genistein 的吸附量低很多, 由圖 3.11 及圖 3.12 可看出, Genistein-MIPs 對於 Genistein 的吸附量大約為 2-5 倍的 Biochanin A 吸附量。

(二) 以 Daidzein 為相似物

在此選擇性實驗當中, Genistein-MIPs 以濃度為 10^{-4}M 的等莫耳數 Genistein 以及 Daidzein 溶液去進行吸附研究。

異黃酮素的化學構造有著 C6-C3-C6 的二苯丙烷基本骨架, 其中雜環命名為 C 環, 與 C 環相鄰的苯環命名為 A 環, 而 C 環上第三位置取代的苯環則命名為 B 環。

Daidzein 以及 Genistein 化學結構上的差異為 A 環上的氫氧取代基數目不同。Daidzein 在 A 環上只有一個氫氧取代基, 而 Genistein 在 A 環上則有兩個氫氧取代基。

由圖 3.13 可得知, Genistein-MIPs 對於 Genistein 的吸附量大約為 1.75 倍的 Daidzein 吸附量。在此以 Daidzein 為相似物的選擇性實驗中, Genistein-MIPs 對於 Genistein 的辨識性不如以 Biochanin A 為相似物的辨識性高, 這是由於 Daidzein 和 Genistein 化學結構上的差異在於 Daidzein 少了一個氫氧取代基, 和 Genistein 相較起來, Daidzein 分子較 Genistein 分子小; 而 Biochanin A 和 Genistein 在於化學結構上的差異則是甲氧基和氫氧基的差異, 由分子的尺寸來看, Biochanin A 由於甲氧基所造

成的立體障礙的關係，較 Daidzein 難吸附於 Genistein-MIPs 內之辨識性孔洞，因此在於以 Biochanin A 為相似物的選擇性實驗中，Genistein-MIPs 會有較佳的選擇性（約 2-5）；而 Daidzein 分子因為較目標物 Genistein 分子還小的關係，較容易吸附於 Genistein-MIPs 內之辨識性孔洞，因此在於以 Daidzein 為相似物的選擇性實驗中，Genistein-MIPs 會有較差的選擇性（約 1.75）。

六、Genistein-MIP 於黃豆萃取液之分離純化及提煉功效

利用 10ml 純度為 90% 的 ethanol 為溶劑，對 0.5000 克重的黃豆粉於 60°C 下以超音波震盪進行萃取，所得的萃取液以 Genistein-MIPs 去做分離純化，結果列於表 3.12 中。由實驗結果可見，Genistein 與 Daidzein 於分離前之組成比例分別為 5.81 mole% 以及 3.54 mole%，而分離後之組成比例分別為 7.89 mole% 以及 3.43 mole%，由此數據可以發現，Genistein 所佔的比例提高為原本 1.35 倍，而 Daidzein 所佔的比例則降低為原本 0.97 倍，由此可見，利用分子模版之方法對於實際應用於從黃豆粉之萃取液中提煉及純化 Genistein 成份具有初步的功效。

伍、結論與建議

一、結論

在此計畫中，選擇 4-Vinyl Pyridine (4VP) 以及 Methacrylic acid (MAA) 為官能單體，可和本計畫所要提煉的目標物 Genistein 形成非共價鍵結，再經由高比例的交聯劑 Ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA) 交聯聚合得一高分子，接著使用純度為 90% 的 ethanol 來移除高分子中的 Genistein，即可得到一多孔性的高分子模版 (MIP)。

實驗數據顯示，以 MAA 為官能單體時，目標物較難從模版中被移除，因此，經過目標物移除步驟後所產生的選擇性孔洞相較於以 4VP 為官能單體製備的 MIPs 還少，因此在於吸附目標物或者分離純化萃取液方面之研究數據都顯示出，以 4VP 為官能單體製備的 MIPs 效果較以 MAA 為官能單體製備的 MIPs 對於目標物 Genistein 分子有較佳的吸附能力以及辨識性。

粒徑大小對於 MIPs 在吸附量上並沒有很大的差異。這可能是因為兩粒徑範圍 (37-74 μm 或小於 37 μm) 沒有有很大的差別，因此 MIPs 並沒有表現出粒徑對於吸附量的影響。

依實驗數據可以發現，Genistein-MIPs 對於 Genistein 在濃度為 10^{-4}M 的吸附量是 402.38 $\mu\text{g/g}$ of polymer，而在濃度為 10^{-5}M 時，吸附量 52.84 $\mu\text{g/g}$ of polymer 的 7.6 倍，證實了濃度對於 MIPs 之吸附能力具有相當大的影響力。

由於 Biochanin A 以及 Daidzein 和 Genistein 在於化學結構上的差異，因此 Genistein-MIPs 對於 Biochanin A 以及 Daidzein 的吸附量相較於對 Genistein 的吸附量低很多，Genistein-MIPs 對於 Genistein 的吸附量大約為 2-5 倍 Biochanin A 吸附量，1.75 倍的 Daidzein 吸附量。

由 Genistein-MIP 於黃豆萃取液之分離純化及提煉功效的研究結果可見，Genistein 於黃豆萃取液中所佔的比例提高為原本 1.35 倍，而 Daidzein 則降低為原本 0.97 倍，由上述研究結果可見，利用分子模版之方法對於實際應用於從黃豆粉之萃取液中提煉及純化 Genistein 成份具有初步的功效。

二、建議

在此計畫中主要研究重點放在功能性單體的選擇、MIPs 之粒徑大小以及濃度對於 Genistein-MIPs 的吸附能力和辨識能力的影響，然而在製備分子模版 (MIP) 的程序中不止這些因素會影響分子模版的特性，例如溶劑的選擇、溶液的酸鹼值、聚合溫度、清洗模版的次數及所用溶劑劑量的多寡等都會影響分子模版的性質。除了探討製備程序的條件外，也同時必須討論吸附研究時的操作條件對於模版吸附能力及選擇能力的影響，如溶液的酸鹼值、溫度、時間的長短等。因此未來可以依這些變因來實驗以更深入討論各因素對於模版特性的影響。另外可以選擇更多的功能性單體做比較，並且依目標物的結構考慮同時用兩個以上的功能性單體來製備分子模版。

分子模版除了對目標物分子必須具有優良的吸附性以及選擇性之外，我們希望分子模版同時具備化學穩定性質、熱穩定性以及抗機械性等性質，具備以上的特性，分子模版的功能才較為完善，而且在應用上也較不受限制。因此建議在完成製備及吸附條件的探討後能測量分子模版的化學及物理穩定性和抗機械能力。

誌謝

本研究計畫承蒙行政院衛生署中醫藥委員會，計畫編號 CCMP94-RD-021 提供經費贊助，使本計劃得以順利完成，特此誌謝。

陸、參考文獻

1. 衛生統計資訊網頁死亡統計結果數據 (2003)
<http://www.doh.gov.tw/statistic/index.htm>
2. Zhang, Ke-lan, Zhang, Si-zhong, Zheng, Ke-qin, He, Yong, Zhang, Li, Su, Zhi-guang, Sun, Yan, Shi, Jia-jun, Kong, Xiang-dong, Tong, Yu 2003; *Chinese Journal of Medical Genetics* 2003; 20: 135-137.
3. 方宜文，大豆的效用與療法，1989.
4. Mimura, Akio, Yazaki, Shin-Ichi, Tanimura, Hiroshi: *ACS Symposium Series* 1998; 701: 127-137.
5. Enserink, Martin: *Science* 2002;297: 325-326.
6. Murphy, Marina, Chemistry and Industry, London, 2004.
7. Hendrich, Suzanne: *Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences. Journal of Chromatography B* 2002; 777: 203-210.
8. Suthar, A.C., Banavalikar, M.M., Biyani, M.K.: *Indian Journal of Experimental Biology* 2001; 39: 511-519.
9. Suthar, A.C., Banavalikar, M.M., Biyani, M.K.: *Indian Journal of Experimental Biology* 2001;39: 520-525.
10. An, Jinping: *Journal of Biological Chemistry* 2001; 276: 17808-17814.
11. Kojima, Takashi, Uesugi, Takehiko, Toda, Toshiya, Miura, Yutaka, Yagasaki, Kazumi *Lipids* 2002; 37: 261-265.
12. Bennetau-Pelissero, C., Latonnelle, K., Sequeira, V., Lamothe, A.: *Analusis* 2000; 28: 763-775.
13. Rickard, Sharon E., Thompson, Lilian U.: *ACS Symposium Series* 1997; 662: 273-293.
14. Murata, Mariko, Midorikawa, Kaoru, Koh, Masashi, Umezawa, Kazuo, Kawanishi, Shosuke *Biochemistry* 2004;43, 2569-2577.
15. Doerge, Daniel R., Chang, Hebron C.: *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 2002; 777: 269-279.

16. Siddiqui, Bina S., Khan, Shazia, Kardar, M. Nadeem, Aslam, Huma: *Helvetica Chimica Acta* 2004; 87: 1194-1201.
17. Wang, Chin-Yu, Huang, Hsi-Ya, Kuo, Kuang-Lung, Hsieh, You-Zung: *Journal of Chromatography A* 1998; 802: 225-231.
18. Nurmi, T., Mazur, W., Heinonen, S., Kokkonen, J. & Adlercreutz, H.: *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2002; 28:1-11.
19. van de Weijer, P. H. M. & Barentsen, R. *Maturitas* 2002; 42: 187-193.
20. Setchell, K. D. et al.: *The Journal Of Nutrition* 2001; 131:1362S-1375S.
21. Krenn, Liselotte: *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 2002, 777: 1-2.
22. G. Vlatakis, L. I. Andersson, K. Mosbach, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, in press.
23. M. Kempe, K. Mosbach, 1994, *J. Chromatogr. A*, 664, 276-279.
24. B. Ekberg, K. Mosbach, 1989, *Trends Biotechnol.*, 7, 92-96.
25. S. Mallik, S. D. plunkett, P. K. Dhal, R. D. Johnson, D. Shnek, F. H. Arnold: *New J. Chem.* 1994; 18: 299-04.
26. P. K. Dhal, D. R. Shnek, D.W. Pack, D.Y. Sasaki, F. H. Arnold: *Langmuir* 1994; 10: 2382-2388.
27. S.A. Pilesky, I.A. Butovich, V.P. Kukhar, 1992, *Zh. Anal. Khim.*, 47, 1681-1684.
28. S.A. Pilesky, Y.P. Parhometz, N.V. Lavryk, T.L. Panasyuk, A.V. El'skaya: *Sens. Actuators B* 1994; 18-19: 629-631.
29. M.J. Whitcombe, M.E. Rodriguez, P. Villar, E.N. Vulfson: *J.Am. Chem. Soc.* 1995; 117: 710-7111.
30. Jianchun Xie, Lili Zhu, Hongpeng Luo, Li Zhou, Chongxi Li, Xiaojie Xu: *Journal of chromatography A* 2001; 934: 1-11.
31. Weiss R, Molinelli A, Jakusch M, Mizaikoff B: *Bioseparation* 2001; 10: 379-387.
32. Molinelli A, Weiss R, Mizaikoff B: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2002; 50: 1804-1808.
33. Suarez-Rodriguez JL, Diaz-Garcia ME: *Analytica Chimica Acta* 2000; 405:

- 67-76.
34. Arjmandi, B. H. & Smith, B. J.: *The Journal of Nutritional Biochemistry* 2002; 13: 130-137.
35. Djuric, Z., Chen, G., Doerge, D. R., Heilbrun, L. K. & Kucuk, O.: *Cancer Letters* 2001; 172: 1-6 .
36. Watanabe, S., Uesugi, S. & Kikuchi, Y.: *Biomedecine & Pharmacotherapy* 2002; 56: 302-312.
37. Caro, E. et al.: *Journal of Chromatography A* 2002; 963: 169-178.
38. Molecular imprinting is a way of creating recognition sites in polymeric materials. <http://www.chem.leeds.ac.uk/People/RJA/molimp.html>
39. New possibilities for sensor technology. Molecular imprinting-based biomimetic sensors could provide an alternative to often unstable biosensors for industry, medicine, and environmental analysis.
<http://pubs.acs.org/hotartcl/ac/97/jun/mol.html>
40. Product information and offers. http://www.gettingwell.com/drug_info/nmdrug_profiles/nutsupdrugs/bio_0220.html
41. Du, Q., Li, Z.; Ito, Y.: *Journal of Chromatography A* 2001; 923: 271-274.