

中華民國 第 50 屆中小學科學展覽會
作品說明書

高中組 生活與應用科學科

佳作

040809

「犇」跑吧 CO！

學校名稱：高雄市立高雄女子高級中學

作者：	指導老師：
高一 陳沛蓉	王俊豪
高一 賴佩妤	劉崇文
高一 歐思廷	
高一 許家嘉	

關鍵詞：一氧化碳、牛肉

摘要

爲了保持牛肉肉品色澤鮮豔，往往會添加CO，CO對於牛肉中肌紅蛋白有很強的結合力，在冷凍下可保持數個月的鮮紅色澤且不易脫去。我們嘗試各種醇、酸、鹼、鹽類找出萃取肌紅蛋白的最佳條件，並由光譜圖發現：肌紅蛋白內部的鐵二價離子易與CO氣體形成強鍵結，造成肌紅蛋白的吸收光譜產生位移，因此可用以檢驗牛肉中是否含有CO。爲了進一步得知CO添加的含量，我們利用不同的氧化劑及還原劑測試含CO之牛肉，並偵測其光譜變化情形。結果發現：低亞硫酸鈉可以區分有無添加CO的牛肉，並能有效計算CO含量。爲了使偵測方法更爲簡易，我們利用硫酸有效分離CO與肌紅蛋白，並配合自製的電化學CO偵測器，直接檢測出CO氣體濃度及含量，以偵測市售牛肉是否添加CO氣體。

壹、研究動機

前一陣子政府開放美國牛肉進口，引起國人諸多討論，但焦點多在狂牛症，而忽略了影響層面更廣的牛肉添加CO的問題。在台灣，肉品添加CO是違法的，但美國食品暨藥物管理局（FDA）卻允許在牛肉中添加CO，且含量可達肉品所含氣體的0.4%，相當於一磅牛肉可含有2.2 mg的CO。在肉品中添加CO，到底會有什麼影響呢？原來消費者在購買肉品時，常會以肉品的色澤作爲判斷肉品新鮮與否的標準，而CO和牛肉中的肌紅蛋白鍵結後，可使肉品長時間維持鮮紅的色澤。如此一來，縱使肉品已因保存不當而開始腐敗，也能透過CO的偽裝，被消費者吃下肚，間接引起食物中毒。有鑑於此，我們希望能進一步了解添加CO的牛肉與一般牛肉的差異，並發展出能快速且有效地檢測牛肉是否含有CO的方法。

貳、研究目的

- 一、比較含 CO 牛肉與正常牛肉在保存過程中，其外觀上的差異。
- 二、利用造成蛋白質變性的各種方法，萃取出牛肉中的肌紅蛋白，並以紫外-可見光光譜儀測量其吸收光譜。
- 三、利用氧化劑與還原劑辨別牛肉中是否含有 CO。
- 四、找出最佳濃度的酸破壞肌紅蛋白與 CO 的鍵結，使 CO 釋出以便偵測 CO 含量。
- 五、自製簡易電化學儀器，偵測牛肉中的 CO 含量。

【實驗原理】

- 一、環保署檢測肉品是否含有 CO 的方法，是先將肉品置於「正辛醇」與「稀硫酸」中振盪處理 1 小時，再利用氣相層析儀測量 CO 氣體的含量。
- 二、使蛋白質變性的方法很多，包括高溫、高壓、振盪、凍結、酵素、酸、鹼、鹽類等。
- 三、肌紅蛋白（Myoglobin,mb）是由一個原血紅素（Heme）及一個分子量約 17kDa 的球蛋白所構成的小分子蛋白質（圖1）。位於 Heme 中的鐵離子是氧氣的結合位置，正常情況下的鐵離子爲 2 價，而且有氧結合的肌紅蛋白（Oxy-mb）呈鮮紅色，無氧結合的肌紅蛋白

(Deoxy-mb) 呈紫紅色。若鐵離子變為 3 價，則會失去氧合能力而呈暗紅色。此種鐵離子由 2 價變為 3 價的現象稱為自動氧化。

四、動物死前及死後的狀態、光線、pH 值與貯藏溫度，均是影響 Mb 自動氧化速度的重要因素。由於 CO 對 Oxy-mb 或 Deoxy-mb 均有極強的親和力，約為氧氣的 250 倍，因此很容易取代 Mb 中的氧，形成一氧化碳型肌紅蛋白 (CO-mb)，使肉色呈鮮紅色，且一旦形成後，就不易氧化成暗褐色的氧化型肌紅蛋白 (Met-mb)，使得肉品即使在室溫下存放，也可長時間維持其顏色 (圖 2)。

五、利用紫外-可見光光譜儀測定肉品中的 CO-mb 的吸收光譜，可以計算其 CO 含量。

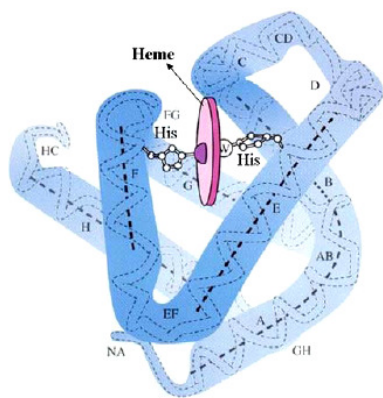


圖 1 肌紅蛋白的分子結構

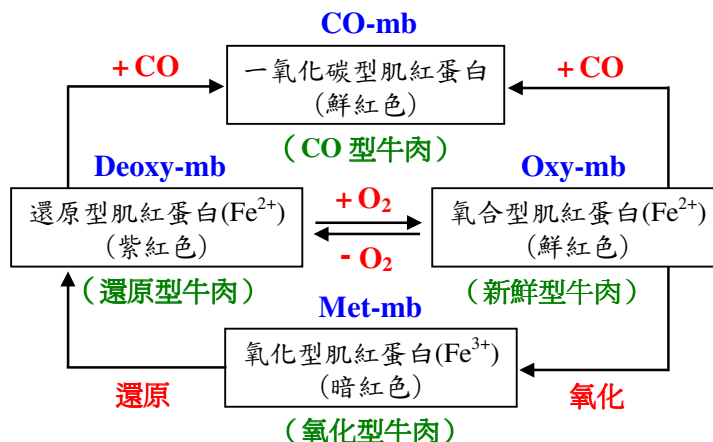


圖 2 肌紅蛋白各種類型

參、研究設備及器材

一、實驗儀器

紫外-可見光光譜儀	離心機	電子天平
-----------	-----	------

二、實驗器材

冷凍庫	針筒	夾鏈袋	膠帶	鱷魚夾	氣體收集袋
離心管	電池	電阻	三用電表	CO 探測器	玻璃密封罐

三、實驗材料與藥品

硫酸鎂 MgSO ₄	碳酸鈉 Na ₂ CO ₃	氯化鈉 NaCl	次氯酸鈉 NaClO	硫酸鈉 Na ₂ SO ₄	硫酸銨 (NH ₄) ₂ SO ₄
氯化銨 NH ₄ Cl	氫氧化鈉 NaOH	鹽酸 HCl	硫酸 H ₂ SO ₄	低亞硫酸鈉 Na ₂ S ₂ O ₄	赤血鹽 K ₃ Fe(CN) ₆
甲醇 CH ₃ OH	乙醇 C ₂ H ₅ OH	丙醇 C ₃ H ₇ OH	丁醇 C ₄ H ₉ OH	戊醇 C ₅ H ₁₁ OH	己醇 C ₆ H ₁₃ OH
庚醇 C ₇ H ₁₅ OH	辛醇 C ₈ H ₁₇ OH	一氧化碳 CO	蒸餾水 H ₂ O	硫代硫酸鈉 Na ₂ S ₂ O ₃	草酸鈉 Na ₂ C ₂ O ₄
焦亞硫酸鈉 Na ₂ S ₂ O ₅	重鉻酸鉀 K ₂ Cr ₂ O ₇	過錳酸鉀 KMnO ₄	氯化鋁 AlCl ₃	硫酸鋁 Al ₂ (SO ₄) ₃	氯化鎂 MgCl ₂

肆、研究流程及方法

一、實驗流程：



二、研究方法：

【實驗一】從市場取得新鮮牛肉進行 CO 氣體填充，並比較有無填充 CO 氣體的牛肉，在冷凍與室溫下外觀上的差異。

一、樣品處理：

從傳統市場取得牛肉後，立即切割成薄片（圖 3），並迅速置於 4℃ 之冰箱中冷藏，以備調氣包裝之用。

二、調氣包裝（modified atmosphere packaging; MAP）流程：

將新鮮牛肉浸漬於 Na_2CO_3 溶液(10%)中 90 秒後，取出清洗。

（為防止牛肉在酸性環境下變性，因此以 Na_2CO_3 鹼化）

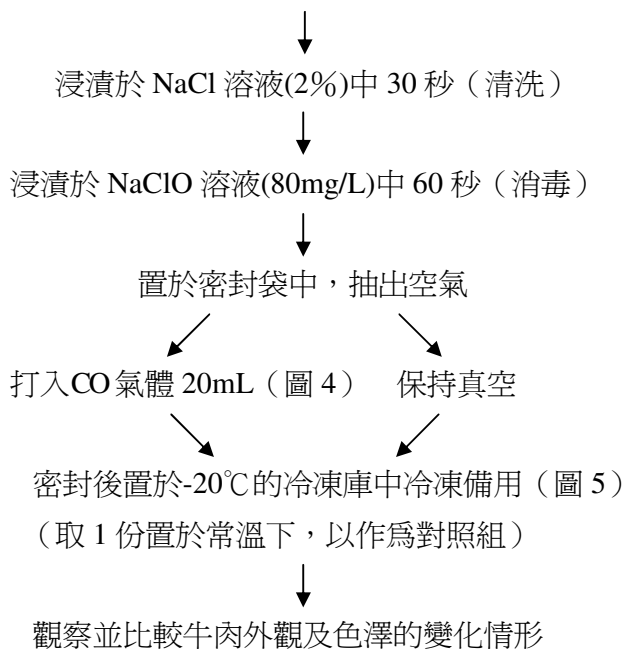


圖 3 將牛肉切成薄片



圖 4 進行調氣包裝



圖 5 置入冷凍庫(-20℃)

【實驗二】利用不同的醇、酸、鹼、鹽類，找出最佳萃取肌紅蛋白的條件，並偵測其光譜。

【實驗 2-1】利用不同的醇、酸、鹼、鹽類，偵測其肌紅蛋白的吸收光譜。

一、配製磷酸緩衝溶液（pH=7.4）：

取 4.14 克的 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 及 16.78 克的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ，
加入 489.08 克的蒸餾水中。

二、將市場中新鮮牛肉+不同醇類：

- (一)取 2 克適量的牛肉切成薄片，並加入 2 克蒸餾水後靜置。
- (二)加入 1 克的磷酸緩衝溶液，讓牛肉保持在 pH=7.4 的狀態。
- (三)將上述牛肉，分別以 2mL 甲醇、乙醇...、辛醇溶液完全浸泡，持續搖晃 2 分後，離心 15 分鐘(5000 轉/分)。
- (四)甲醇、乙醇、丙醇與水可互溶，分別取出其離心後的上清液，直接進行其波長的偵測。
- (五)丁醇、戊醇、己醇、庚醇、辛醇與水不可互溶，分別取出其離心後的上層上清液與下層上清液（圖 6），再偵測各層溶液的吸光度。
- (六)每個實驗進行 5 次並求其平均值與標準差。

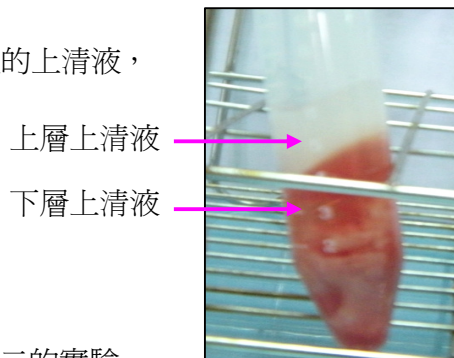


圖 6 辛醇的萃取液

三、將不同的醇類改為酸類、鹼類、鹽類，並重複步驟二的實驗。

【實驗 2-2】分別利用氯化鎂、氯化銨、硫酸鎂、硫酸銨等不同飽和度的溶劑萃取肌紅蛋白，並偵測其吸收光譜。

- 一、準備 20%、40%、60%、80%、100%飽和度的氯化鎂、氯化銨、硫酸鎂、硫酸銨等溶劑，萃取含 CO 牛肉各 2 克，並測量光譜。
- 二、分別測量 5 次，並求其平均值。

【實驗三】利用不同的氧化劑與還原劑，改變其肌紅蛋白的型態，並探求有無 CO 之牛肉加入不同氧化劑與還原劑後，其肌紅蛋白光譜的變化情形。

【實驗 3-1】利用赤血鹽及低亞硫酸鈉，改變肌紅蛋白中心鐵離子的型態，並和先前實驗中有無 CO 牛肉之肌紅蛋白比較，探求其光譜變化情形。

一、各種類型肌紅蛋白的製備（參考文獻）：

- (一)氧化型(mb-Fe³⁺)：殺菌處理過的牛肉浸入 2%赤血鹽溶液(K₃Fe(CN)₆)，持續搖晃 2 分後取出瀝乾，靜置備用。
- (二)還原型(mb-Fe²⁺)：殺菌處理過的 2g 牛肉加入等倍重磷酸緩衝溶液、0.5g 的低亞硫酸鈉固體(Na₂S₂O₄)，持續搖晃 2 分後，靜置備用。靜置期間避免再接觸空氣而氧化。
- (三)CO 型(mb-CO)：殺菌處理過的牛肉加入 0.5g 的低亞硫酸鈉溶液後，取出約 10g 牛肉薄片放置密封袋中，抽出空氣(真空)後，打入 20mL 的 CO 氣體密封，靜置備用。

二、利用硫酸銨溶液（飽和度 60%）萃取各種類型肌紅蛋白進行光譜檢測：

- (一)分別將氧化型、CO 型、與未處理的新鮮型牛肉 2g，加入等倍重蒸餾水、等倍重磷酸緩衝溶液後靜置備用，至於還原型則不再做處理。
- (二)將上述不同種類的牛肉加入硫酸銨溶液（飽和度 60%）6ml，持續搖晃 2 分後，離心 15 分鐘(5000 轉/分)，再取出上清液進行光譜測定，並比較其波長與吸收峰。

【實驗 3-2】利用不同的氧化劑與還原劑，改變其肌紅蛋白的型態，並探求有無 CO 之牛肉加入不同氧化劑與還原劑後，其肌紅蛋白光譜的變化情形。

一、將有無 CO 之牛肉加入不同氧化劑：

將新鮮型和 CO 型牛肉經退冰後取出 2 克，加入等倍重蒸餾水、等倍的磷酸緩衝溶液及 0.5g 還原劑固體，持續搖晃 2 分後靜置。

二、將有無 CO 之牛肉加入不同還原劑：

將新鮮型和 CO 型牛肉經退冰後取出 2 克，浸入 2% 氧化劑後瀝乾，再加入等倍重蒸餾水、等倍的磷酸緩衝溶液，持續搖晃 2 分後靜置。

三、將上述混合物加入硫酸銨溶液（飽和度 60%）6ml，持續搖晃 2 分後，離心 15 分鐘(5000 轉/分)，再取出上清液進行光譜測定，並比較其波長與吸收峰。

【實驗四】利用低亞硫酸鈉和赤血鹽改變含 CO 牛肉的肌紅蛋白吸收度，並計算出牛肉中 CO 型肌紅蛋白佔總肌紅蛋白之比例。

【實驗 4-1】將 CO 型樣品牛肉分別加入低亞硫酸鈉和赤血鹽，並觀察其肌紅蛋白吸收峰位置變化的情形。

一、將含 CO 牛肉分別加入氧化劑和還原劑，並利用硫酸銨（飽和度 60%）萃取。

(一)CO 還原型(mb-CO-Red)：將 CO 型牛肉經退冰後取出 2 克加入等倍蒸餾水，再加入等倍的磷酸緩衝溶液、0.5g 低亞硫酸鈉固體及硫酸銨溶液（飽和度 60%）6mL，持續搖晃 2 分後，進行離心 15 分鐘（5000 轉/分）後，取出澄清液進行肌紅蛋白的光譜檢測。

(二)CO 氧化型(mb-CO-Ox)：將 CO 型牛肉經退冰後取出 2 克先浸泡 2% 赤血鹽溶液約 10 分鐘，取出瀝乾後再加入等倍蒸餾水、等倍的磷酸緩衝溶液及硫酸銨溶液（飽和度 60%）6mL，持續搖晃 2 分後，離心 15 分鐘（5000 轉/分），再取出澄清液進行肌紅蛋白的光譜檢測。

二、與【實驗 3-1】測得之各類型肌紅蛋白光譜作比較。

分別將新鮮型、氧化型(mb-Fe³⁺)、還原型(mb-Fe²⁺)、CO 型(mb-CO)、CO 還原型(mb-CO-Red)、CO 氧化型(mb-CO-Ox)等 6 種肌紅蛋白光譜進行一次微分及二次微分，並比較其差異。

【實驗 4-2】利用 420nm 與 433nm 波長下的吸收度，推導出計算樣品牛肉中 CO 型肌紅蛋白佔總肌紅蛋白之莫耳分率的公式。

一、「CO 型」肌紅蛋白含量 + 「還原型」肌紅蛋白含量 = 總肌紅蛋白（100%）含量。

二、今準備一未知牛肉樣本，內含「CO 型」、「還原型」佔總肌紅蛋白含量之比例分別為 χ_{CO} 、 $\chi_{還}$ ， $\chi_{CO} + \chi_{還} = 1$ 。

三、由比爾定律可得： $A_{CO} = \epsilon_{CO} b C_{CO}$ ； $A_{還} = \epsilon_{還} b C_{還}$

假設：當 $\chi_{CO} = 1$ 時，在 420nm 及 433nm 的吸收度分別為 A_{CO-420}^T 及 A_{CO-433}^T 。

當 $\chi_{還} = 1$ 時，在 420nm 及 433nm 的吸收度分別為 $A_{還-420}^T$ 及 $A_{還-433}^T$ 。

則未知牛肉樣本所測得之光譜，其吸收度可以表示成：

$$\begin{aligned} \therefore \text{波長 } 420\text{nm 下的吸收度爲: } A_{420} &= A_{\text{co-420}}^T \times \chi_{\text{co}} + A_{\text{還-420}}^T \times \chi_{\text{還}} \\ \therefore \text{波長 } 433\text{nm 下的吸收度爲: } A_{433} &= A_{\text{co-433}}^T \times \chi_{\text{co}} + A_{\text{還-433}}^T \times \chi_{\text{還}} \end{aligned}$$

$$\Rightarrow A_{420} = A_{\text{co-420}}^T \times \chi_{\text{co}} + A_{\text{還-420}}^T \times (1 - \chi_{\text{co}})$$

$$A_{433} = A_{\text{co-433}}^T \times \chi_{\text{co}} + A_{\text{還-420}}^T \times (1 - \chi_{\text{co}})$$

$$\Rightarrow A_{420} = \chi_{\text{co}}(A_{\text{co-420}}^T - A_{\text{還-420}}^T) + A_{\text{還-420}}^T$$

$$A_{433} = \chi_{\text{co}}(A_{\text{co-433}}^T - A_{\text{還-433}}^T) + A_{\text{還-433}}^T$$

四、上式交叉相乘後到：

$$\begin{aligned} A_{420} \times [\chi_{\text{co}}(A_{\text{co-433}}^T - A_{\text{還-433}}^T) + A_{\text{還-433}}^T] \\ = A_{433} \times [\chi_{\text{co}}(A_{\text{co-420}}^T - A_{\text{還-420}}^T) + A_{\text{還-420}}^T] \\ \Rightarrow \chi_{\text{co}} A_{420} A_{\text{co-433}}^T - \chi_{\text{co}} A_{420} A_{\text{還-433}}^T + A_{420} A_{\text{還-433}}^T \\ = \chi_{\text{co}} A_{433} A_{\text{co-420}}^T - \chi_{\text{co}} A_{433} A_{\text{還-420}}^T + A_{433} A_{\text{還-420}}^T \end{aligned}$$

五、上式移項後得到：

$$\begin{aligned} A_{420} A_{\text{還-433}}^T - A_{433} A_{\text{還-420}}^T \\ = \chi_{\text{co}} A_{420} A_{\text{還-433}}^T + \chi_{\text{co}} A_{433} A_{\text{co-420}}^T - \chi_{\text{co}} A_{420} A_{\text{co-433}}^T - \chi_{\text{co}} A_{433} A_{\text{還-420}}^T \\ \therefore \text{得知樣品} \chi_{\text{co}} = \frac{A_{420} A_{\text{還-433}}^T - A_{433} A_{\text{還-420}}^T}{A_{420} (A_{\text{還-433}}^T - A_{\text{co-433}}^T) + A_{433} (A_{\text{co-420}}^T - A_{\text{還-420}}^T)} \end{aligned}$$

六、由【實驗 3-1】光譜圖得知，其各最大吸收為：

$$A_{\text{co-420}}^T = 2.229, A_{\text{co-433}}^T = 0.901, A_{\text{還-420}}^T = 1.681 \text{ 及 } A_{\text{還-433}}^T = 2.108$$

$$\text{代入上述公式可得：樣品中} \chi_{\text{co}} \text{ 爲 } = \frac{A_{420} \times 2.108 - A_{433} \times 1.681}{A_{420} \times (1.207) + A_{433} \times (0.548)},$$

故只要測得樣品中 A_{420} 及 A_{433} 的數值，即可知道 χ_{co} 。

【實驗 4-3】取不同重量的 CO 型牛肉測量吸收度，並以上列公式推算 χ_{co} 計算上的相對偏差。

一、取 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 克 CO 型牛肉分別做以下處理：

CO 型牛肉取出退冰後，加入等倍重的蒸餾水，等倍的磷酸緩衝溶液以及其三倍重量的飽和度 60% 硫酸銨溶液，持續搖晃 2 分後靜置。之後再加入 0.5g 低亞硫酸鈉固體，離心 15 分鐘(5000 轉/分)後，取出上清液進行肌紅蛋白的光譜檢測，測量 420nm 及 433nm 波長下的吸收度。

二、每種重量的牛肉萃取出的肌紅蛋白溶液，皆分成三份進行測量，並求其測出的吸收度平均值。

三、將平均吸收度代入上列公式計算其 χ_{co} 。

【實驗五】自製電化學 CO 偵測器，並繪製檢量線。

- 一、市售 CO 氣體偵測器的價格均十分昂貴，且儀器體積太大，無法方便偵測。因此，我們決定自製微小型 CO 氣體電化學偵測器，其零件(圖 5-1)，為一種擴散式的 CO 氣體偵測器。
- 二、我們為了縮小反應體積，增加自製儀器偵測 CO 氣體的靈敏度、符合我們實驗所用的藥品(醇類、酸鹼、鹽類)，我們決定用體積小且為玻璃材質的密封「花茶罐」。
- 三、我們於 CO 探測器加裝了電路板，內含「加熱器」及「電壓感測器」(圖 5-2)，並放於容器的上方，完成線路及電阻的部分。由於儀器是玻璃材質，故我們利用打洞鑽頭來幫助打洞，並放入自製的 CO 探測器，完成本儀器裝置。
- 四、CO 檢量線的製作：
 - (一)我們從中山大學借用 CO 氣體鋼瓶(圖 5-3)，抽出純的 CO 氣體，並用氣體收集帶收集數袋後備用(依環保署公布，在 20°C 時，1mL 的純 CO 標準氣體重量為 1.165mg)。
 - (二)本儀器體積約 150mL，因此為了配製 0~100mg/L 的 CO 氣體濃度，因此分別取出 0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0mL 的 CO 氣體，並用氮氣稀釋 1L，即配製成 0、10、20、30...到 100mg/L 的 CO 氣體濃度，並先用氮氣瓶通入 1 分後，進行檢測。
 - (三)為了製作檢量線，我們在不同電阻下，偵測不同 CO 氣體濃度與電壓值的變化靈敏度關係，並找出最佳偵測 CO 氣體的電阻(如表 5-1)，進行往後的實驗。
- 五、第二代儀器的改良：由於第一代的電路板需耗時去焊接，且易弄壞，我們將整個電路圖改為夾式(圖 5-4+圖 5-5)，不但方便操作也不易損壞，二來在清洗上也比較方便。

【實驗六】將不同類型的肌紅蛋白加入稀硫酸反應，探求其反應情形，並利用【實驗五】的自製儀器檢測實驗結果。

【實驗 6-1】利用硫酸銨萃取各類型肌紅蛋白，再加入硫酸反應，觀察並探討其反應情形。

- 一、以硫酸銨萃取各類型肌紅蛋白，並加入硫酸進行反應。
 - (一)取 2 克各類型牛肉加入等倍重的磷酸緩衝溶液，讓牛肉保持在 pH=7.4 的狀態下。
 - (二)將準備好的上述牛肉，分別添加硫酸銨溶液 6ml 完全浸泡後，持續搖晃 2 分後，離心 15 分鐘(5000 轉/分)，再取出上清液(圖 7)。
 - (三)在上清液中加入 2 倍體積硫酸(濃度 20%)，觀察其加入硫酸後的情形(圖 8)。

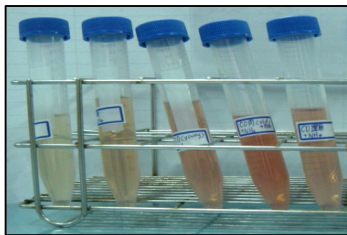


圖 7 各類型牛肉加入硫酸銨萃取

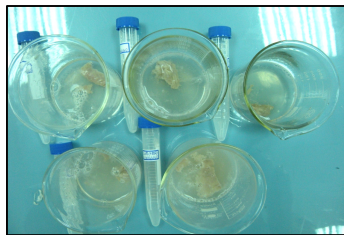


圖 8 各類型牛肉萃取後加入硫酸

【實驗6-2】找出最佳硫酸的濃度，破壞肌紅蛋白與CO鍵結，並使CO逸出。

- 一、以硫酸銨萃取2克各類型牛肉，再加入不同濃度的硫酸，測量特定波長下吸收度隨時間變化的情形。
- 二、將加入硫酸後的混合物離心，並取上清液（圖9）進行光譜測定。



圖 9 離心後的上清液

【實驗 6-3】利用硫酸銨萃取各類型肌紅蛋白，加入最佳濃度硫酸反應，並以【實驗五】的自製儀器配合檢測。

- 一、準備各種不同類型的牛肉 2 克，分別放入自製儀器中，依實驗 6-1 的步驟加入磷酸緩衝液、硫酸銨，持續搖晃 2 分鐘。
- 二、再加入硫酸(20%)22ml，觀察自製儀器中的電壓值變化，如 2 分鐘內不再跳動，即視為反應終止，並記錄電壓值的變化情形。

【實驗七】從市場或大賣場購買市售牛肉，並檢測牛肉中 CO 含量。

- 一、將市售的六種市售牛肉樣品各取出 2 克，加入等倍重蒸餾水及等倍重磷酸緩衝液後靜置，再加入硫酸銨 6ml 完全浸泡，持續搖晃 2 分鐘，進行離心 15 分鐘後(5000 轉/分)。取出澄清液偵測 433nm、420nm 波長下的吸收度，再帶入實驗四公式算出 χ_{co} 。
- 二、將市售的六種市售牛肉樣品各取出 2 克，放入自製儀器中，加入等倍重蒸餾水及等倍重磷酸緩衝液後靜置，再加入硫酸銨 6ml 完全浸泡後，持續搖晃 2 分鐘，再加入硫酸(20%)22ml，觀察自製儀器中的電壓值變化，如 2 分鐘內不再跳動，即視為反應終止，並記錄電壓值的變化情形。

伍、結果與討論

【實驗一】從市場取得新鮮牛肉進行 CO 氣體填充，並比較有無填充 CO 氣體的牛肉，在冷凍與室溫下外觀上的差異。

一、實驗數據：

(一)有無添加 CO 牛肉在常溫與冷凍下外觀隨時間變化的情形

外觀		時間				
		1 天	3 天	1 週	2 週	1 個月
處理方法	常溫(無 CO)	黃褐	黃褐(有異味)	黑褐(有異味)	-	-
	常溫(有 CO)	鮮紅	鮮紅	鮮紅(有異味)	-	-
	冷凍(無 CO)	紅褐	紅褐	黃褐(無異味)	黃褐(無異味)	黃褐(無異味)
	冷凍(有 CO)	鮮紅	鮮紅	鮮紅	鮮紅	鮮紅

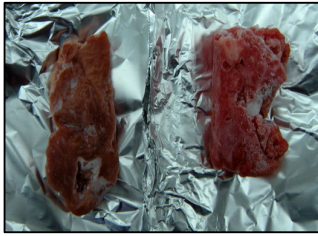


圖 1-1 未添加 CO(左)與添加 CO(右)的牛肉，冷凍 1 週後的外觀

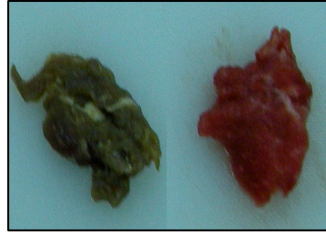


圖 1-2 未添加 CO(左)與添加 CO(右)的牛肉，冷凍 4 月後的外觀

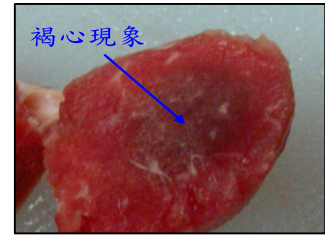


圖 1-3 添加 CO 的牛肉，冷凍 4 月後，其內外的顏色差異

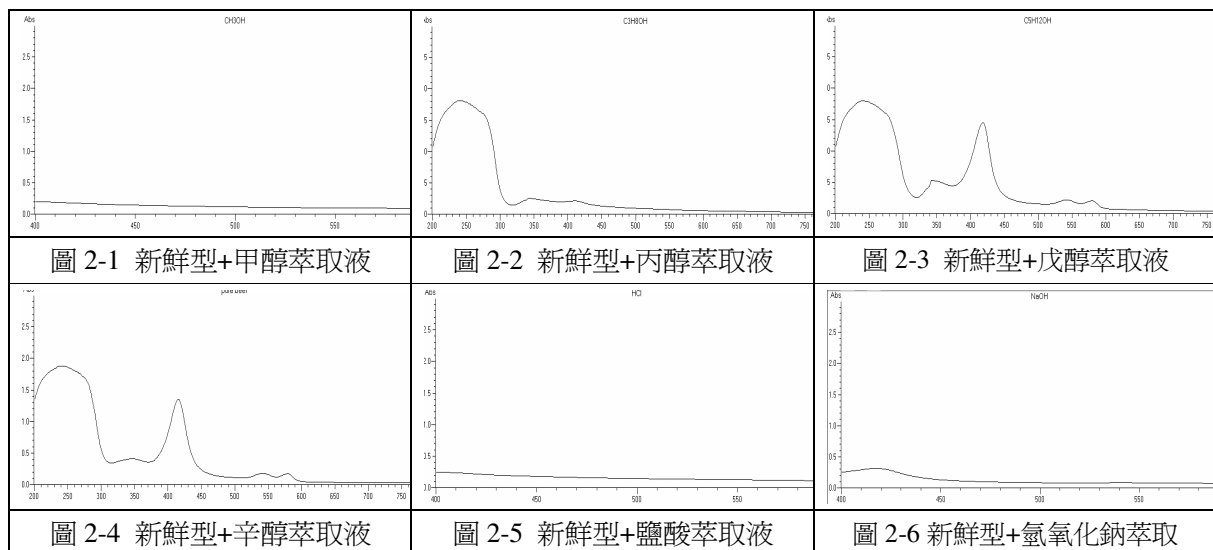
二、結果分析和討論：

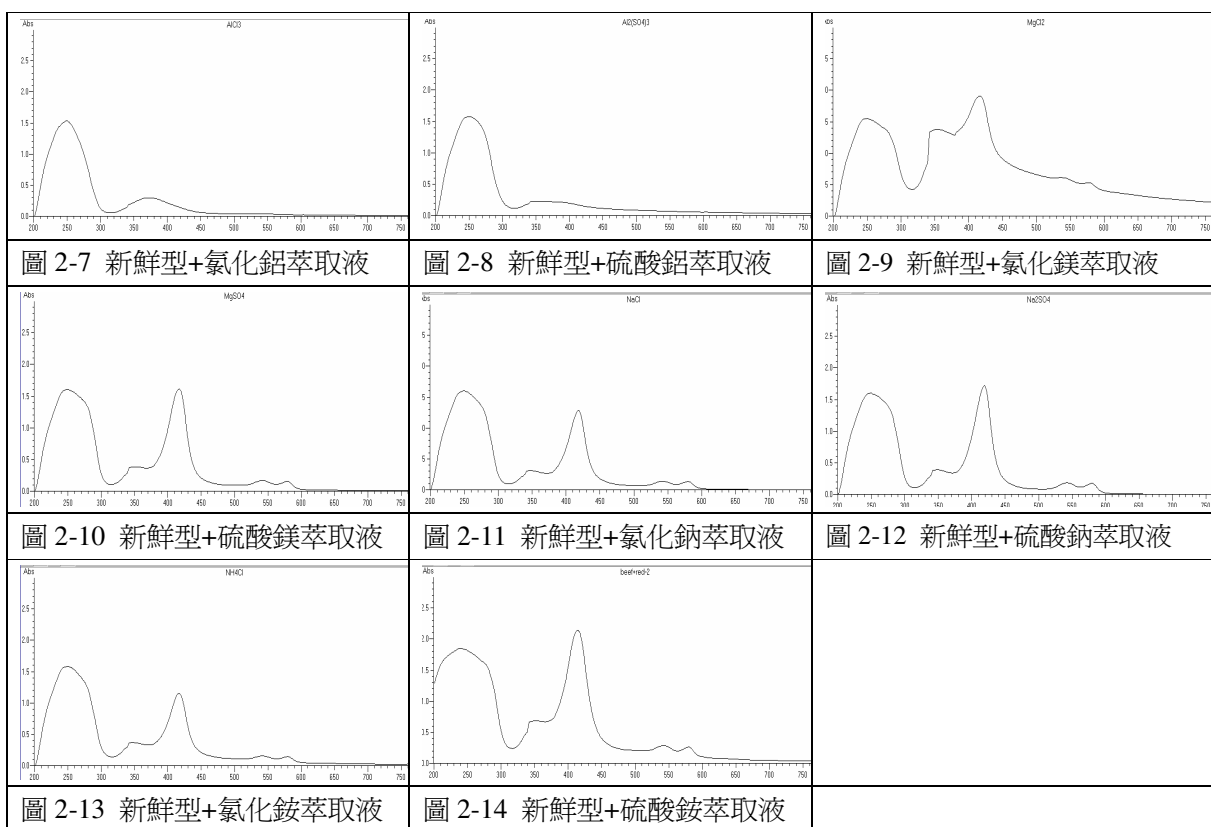
- (一)爲了減少肉質的改變，並保持新鮮度，我們先進行殺菌及鹼性處理，以減少誤差。
- (二)填充 CO 的牛肉，在常溫下一週以上仍可保持其外觀色澤，但會產生惡臭，顯示肉質還是有所變化，故不再往下進行實驗。
- (三)填充 CO 的牛肉，冷凍 1 個月後，其色澤十分鮮紅。持續冷凍 4 個月後，其色澤仍然十分鮮紅。
- (四)未進行 CO 填充的肉品，冷凍 1 週後雖然無異味產生，但其色澤略呈褐色，顯示牛肉一般冷凍情況下，無法確實保持外觀鮮紅。
- (五)在肉品中的蛋白質部分，會與 CO 氣體反應的結構爲肌紅蛋白。肌紅蛋白內部有鐵二價離子，而且 CO 氣體易與鐵二價離子形成強鍵結，不易斷鍵。我們與老師討論後發現，當 CO 氣體與肌紅蛋白中的鐵二價離子形成強鍵後，會產生吸收光譜的位移。爲了解其差異，我們利用分光光度計進行肌紅蛋白吸收光譜的檢測。

【實驗二】利用不同的醇、酸、鹼、鹽類，找出最佳萃取肌紅蛋白的條件，並偵測其光譜。

一、實驗數據：

(一)各溶劑萃取新鮮型牛肉中肌紅蛋白的光譜圖





註：1. 分子量大於丙醇的醇類，與水不互溶，我們取上、下層的上清液分別發現：上層的上清液為醇類，沒有明顯波峰。下層的上清液有明顯波峰，可以萃取出肌紅蛋白。因此以上圖表我們便以下層上清液的光譜圖為主。

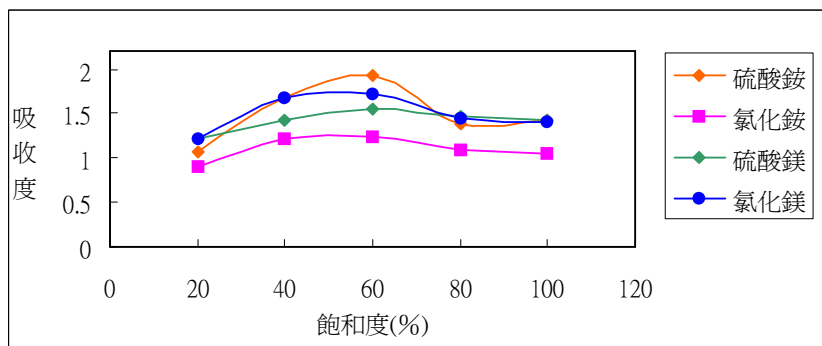
2. 肌紅蛋白的吸收波峰是在 400nm~420nm。

(二) 各溶劑萃取牛肉中肌紅蛋白在 416nm 波長下的吸收度比較

溶劑	波長 416nm 吸收度	溶劑	波長 416nm 吸收度
甲醇	0.000(無吸收)	丙醇	0.211±0.005
戊醇	1.351±0.114	辛醇	1.427±0.135
鹽酸	0.000(無吸收)	氫氧化鈉	0.313±0.021
氯化鋁	0.000(無吸收)	硫酸鋁	0.000(無吸收)
氯化鎂	1.803±0.117	硫酸鎂	1.573±0.161
氯化鈉	1.282±0.096	硫酸鈉	1.621±0.155
氯化銨	1.151±0.103	硫酸銨	2.037±0.174

註：波長 416nm 為新鮮牛肉主要的吸收峰位置。

(三)不同鹽類各濃度下，萃取牛肉中肌紅蛋白的吸收度比較



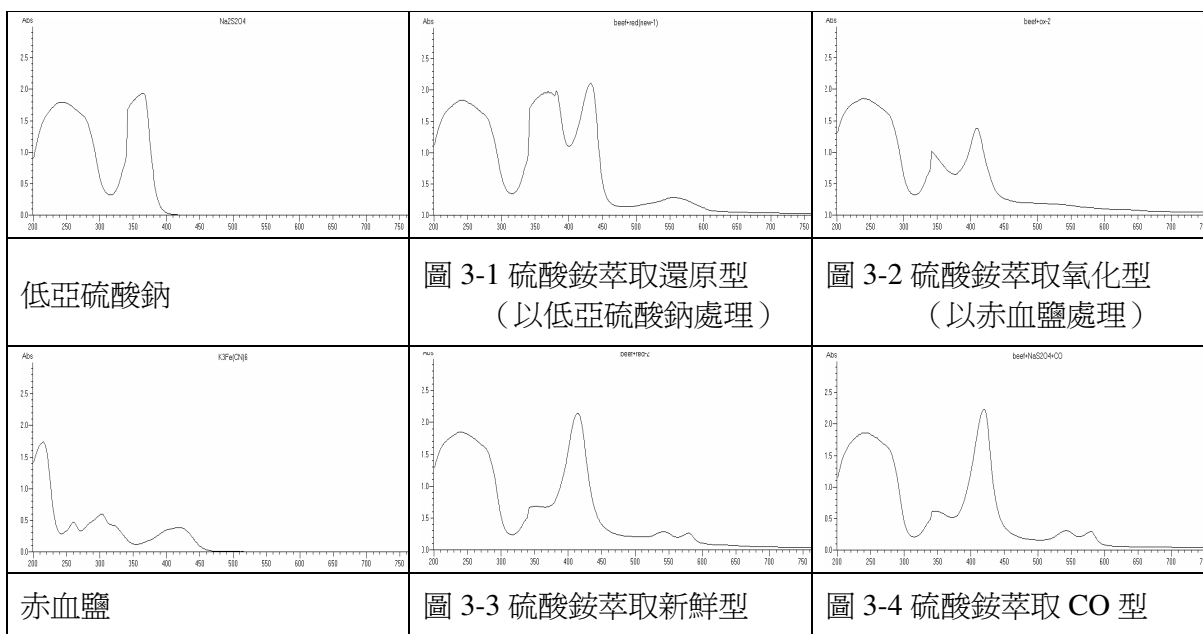
二、結果分析和討論：

- (一)本實驗利用不同的醇類來萃取肌紅蛋白，發現在戊醇以上即有良好的萃取效果，但戊醇有很強的揮發性，而辛醇的揮發性最不明顯且效果最好，其肌紅蛋白能析出在下面水層。
- (二)從各種鹽類萃取效果來說，大致上均比醇、酸、鹼類來得好。
- (三)在氯鹽的系列中，以氯化鎂的效果最佳，在硫酸鹽的系列中，以硫酸銨的效果最好。
- (四)以不同濃度的氯化鎂、氯化銨、硫酸鎂、硫酸銨等溶劑萃取肌紅蛋白，其中效果以飽和度 60% 的硫酸銨最好。
- (五)不論是何種鹽類，當濃度太高時，其萃取效果反而會變差。

【實驗三】利用不同的氧化劑與還原劑，改變其肌紅蛋白的型態，並探求有無 CO 之牛肉加入不同氧化劑與還原劑後，其肌紅蛋白光譜的變化情形。

一、實驗數據：

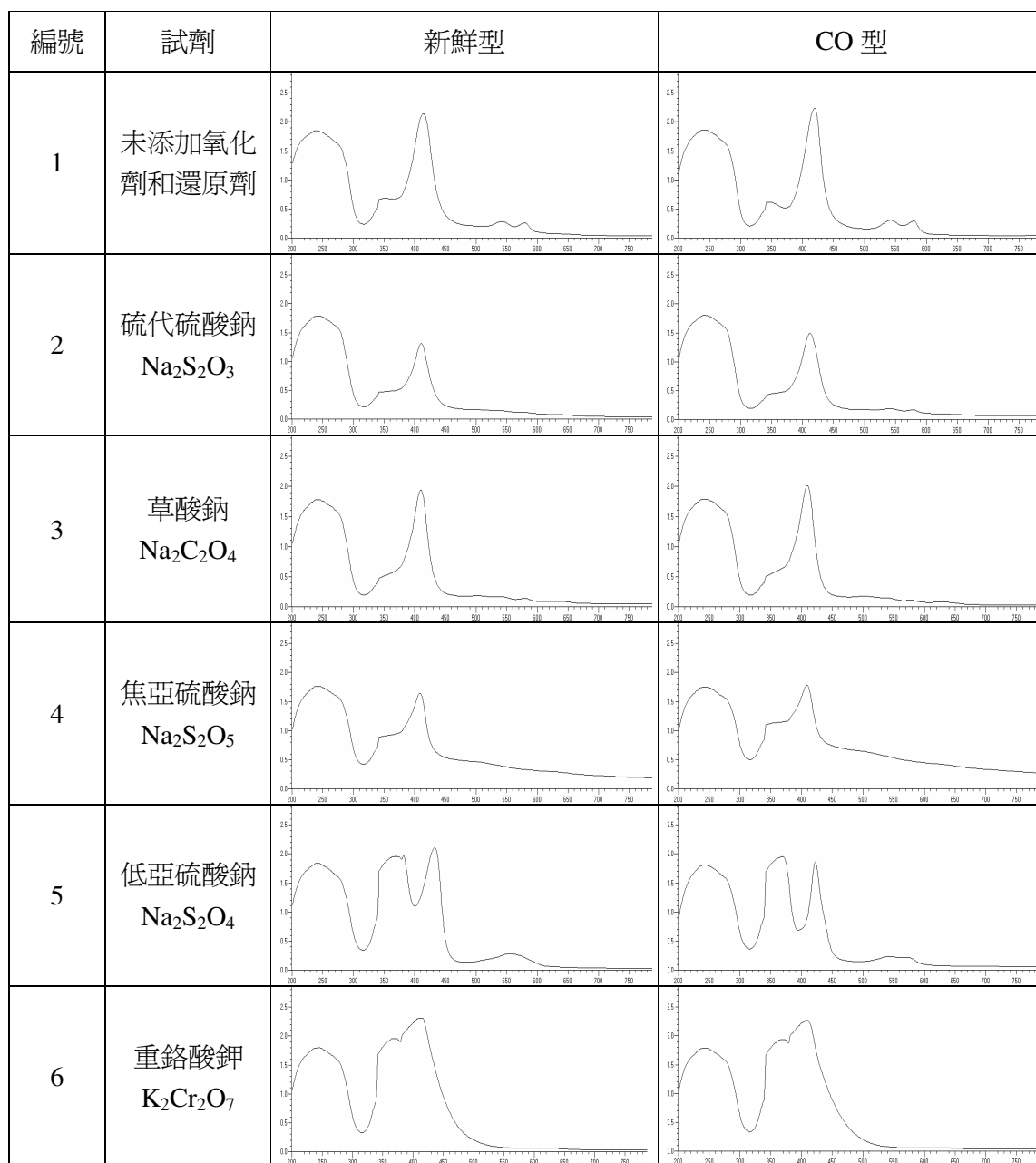
(一)各種類型肌紅蛋白的吸收光譜圖

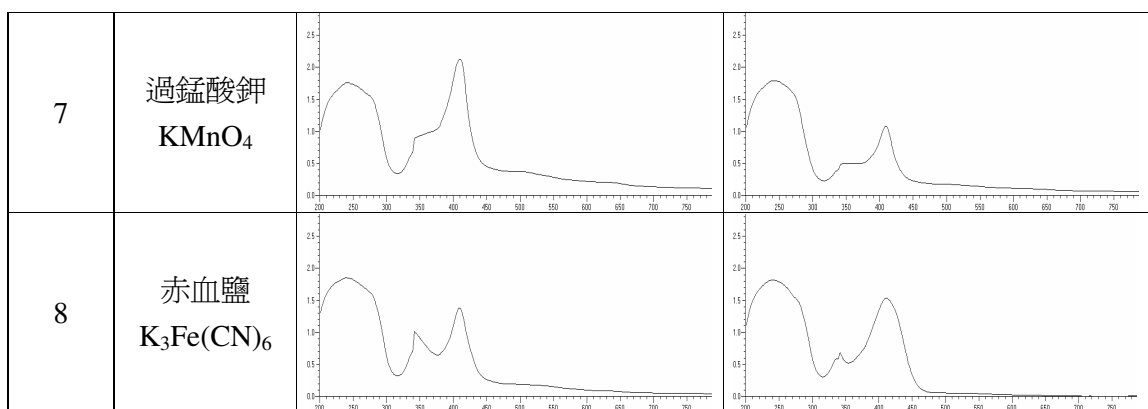


(二)各種類型肌紅蛋白的吸收波長比較

編號	處理方式	吸收波長 / 吸收度		
1	還原型（低亞硫酸鈉）	556nm / 0.283		433nm / 2.108
2	氧化型（赤血鹽）	無		409nm / 1.382
3	新鮮型	580nm / 0.261	542nm / 0.284	416nm / 2.137
4	CO 型	579nm / 0.294	543nm / 0.308	420nm / 2.229

(三)新鮮型和 CO 型牛肉未添加及加入不同還原劑、氧化劑的肌紅蛋白光譜圖





(四)新鮮型和 CO 型牛肉加入不同還原劑、氧化劑後肌紅蛋白的主要吸收峰波長比較

編號	試劑	吸收峰波長 / 吸收度	
1	未添加		新鮮型 / CO 型
2	還原劑	硫代硫酸鈉	416nm / 2.137 420nm / 2.229
3		草酸鈉	416nm / 1.307 417nm / 1.492
4		焦亞硫酸鈉	415nm / 1.939 415nm / 2.009
5		低亞硫酸鈉	414nm / 1.644 414nm / 1.780
6		低亞硫酸鈉	433nm / 2.108 423 nm / 1.863
7	氧化劑	重鉻酸鉀	
8		過錳酸鉀	
9		赤血鹽	
			415nm / 2.119 414nm / 1.077
			409nm / 1.382 412nm / 1.533

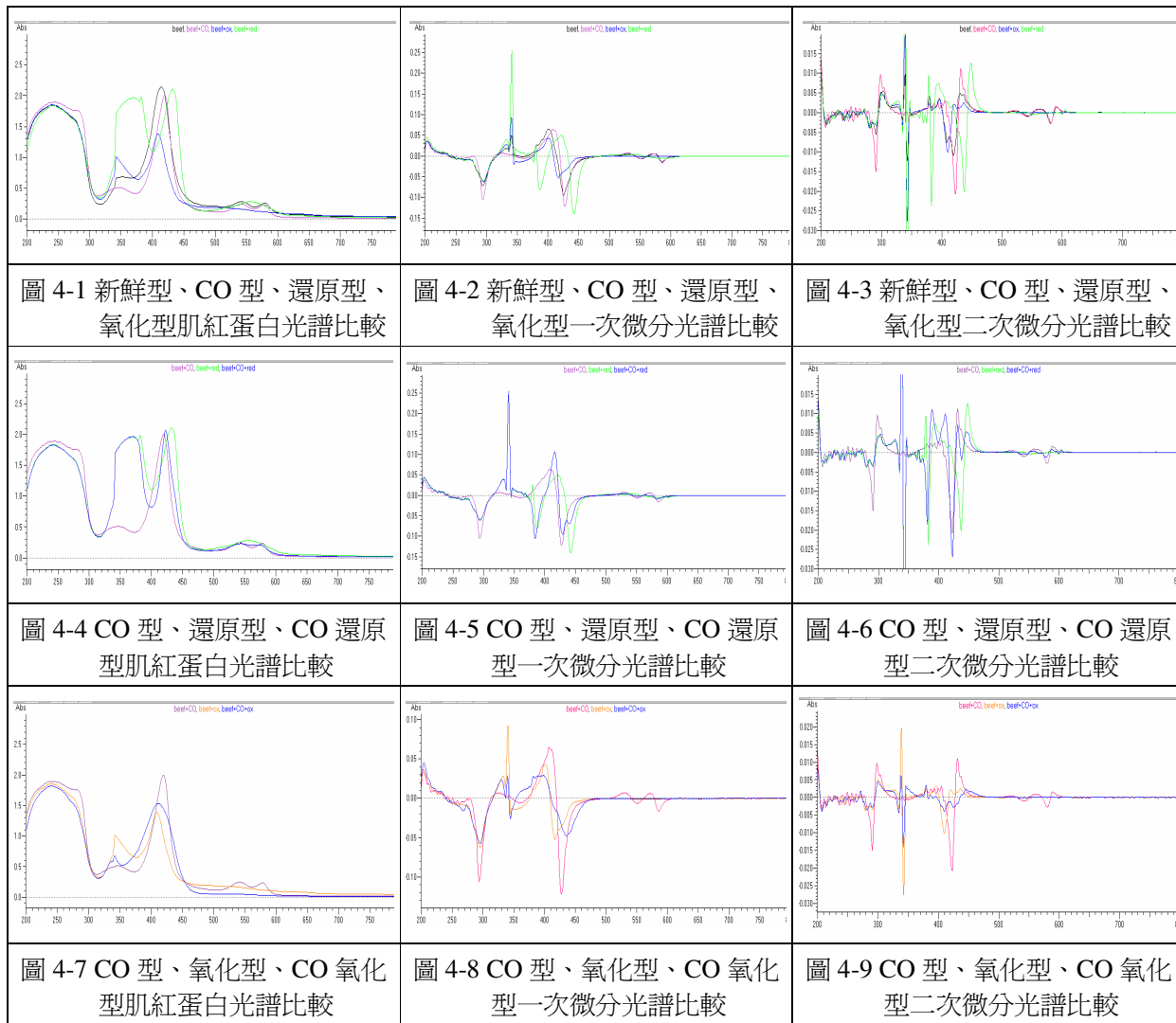
二、結果分析和討論：

- (一)以硫酸銨進行萃取，新鮮型的吸收峰約在 416nm、542nm 及 580nm(如圖 3-3)；而氧化型的吸收峰只在 409nm 一處(如圖 3-2)。
- (二)還原型的吸收波長約在 433nm、556nm 兩個峰(如圖 3-1)；表示當肌紅蛋白的鐵離子被還原成 2 價時，波峰從 416nm 位移至 433nm。
- (三)CO 型的吸收峰約在 420nm、542nm 及 579nm (如圖 3-4)；表示當肌紅蛋白 2 價鐵離子上的氧氣被 CO 取代時，其主要吸收波長有部分位置從 416nm 移到 420nm，但 542nm 及 579nm 兩個峰仍可保存，這表示 CO 能取代 O_2 ，維持原來的吸收度。
- (四)在【實驗 3-1】已得知：新鮮型肌紅蛋白主要吸收峰約在 416nm，CO 型肌紅蛋白主要吸收峰約在 420 nm。經不同氧化劑及還原劑處理後，發現在還原劑中：以低亞硫酸鈉造成的效果最顯著，不論新鮮型或 CO 型肌紅蛋白，加入低亞硫酸鈉後其主要吸收峰皆有明顯位移。
- (五)在氧化劑部分，以赤血鹽的效果最顯著，加入新鮮型或 CO 型肌紅蛋白後其主要吸收峰皆有明顯位移，因此之後的實驗我們便利用這兩種試劑進行 CO 型牛肉的偵測。

【實驗四】利用低亞硫酸鈉和赤血鹽改變含 CO 牛肉的肌紅蛋白吸收度，並計算出牛肉中 CO 型肌紅蛋白佔總肌紅蛋白之含量。

一、實驗數據：

(一)各類型的光譜圖以及一次微分和二次微分圖

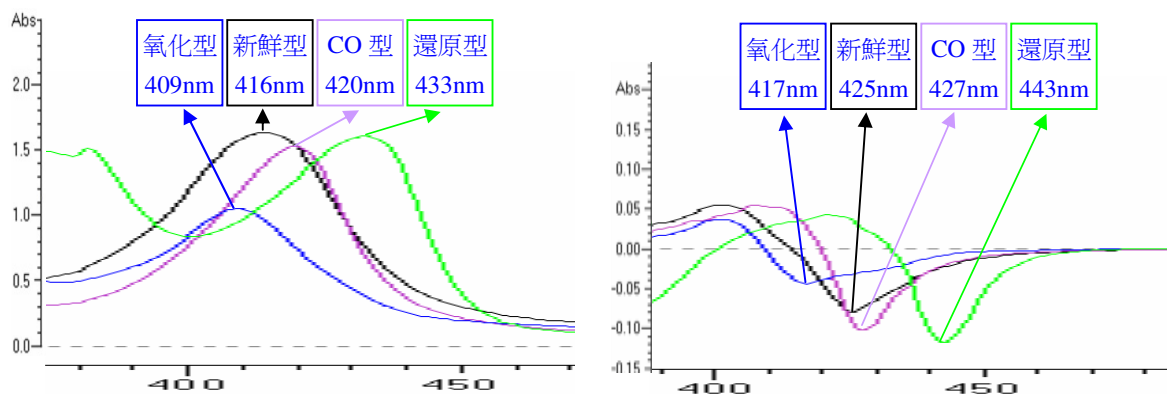


(二)各種類型肌紅蛋白於可見光波長內的吸收峰波長比較

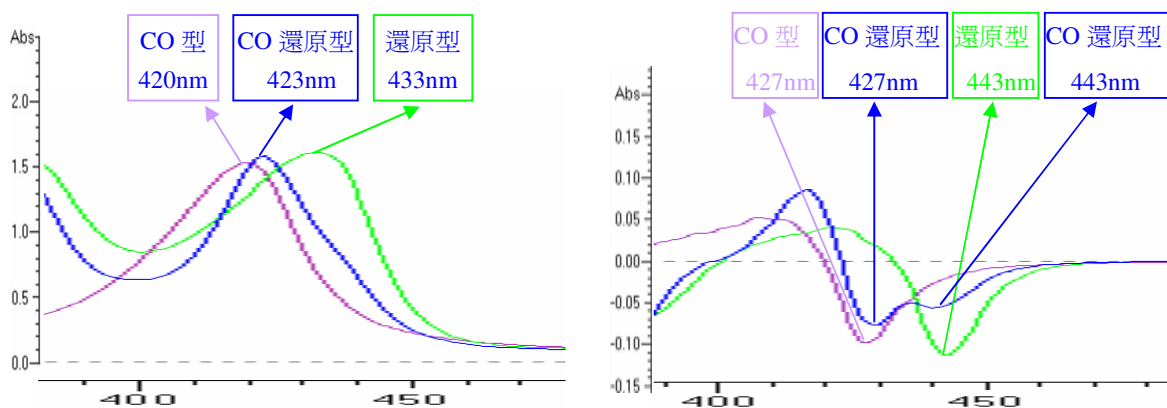
編號	肌紅蛋白類型	吸收峰波長 / 吸收度		
1	還原型	556nm / 0.283		433 nm / 2.108
2	CO 還原型	545nm / 0.229		423 nm / 2.071
3	CO 型	579nm / 0.294	543nm / 0.308	420nm / 2.229
4	氧化型	無		409nm / 1.382
5	CO 氧化型	無		412nm / 1.533

(三)各種類型肌紅蛋白於可見光波長內的最大吸收波長比較

1.新鮮型、CO 型、還原型、氧化型肌紅蛋白光譜之最大吸收波長與一次微分後比較：



2.CO 型、還原型、CO 還原型肌紅蛋白光譜之最大吸收波長與一次微分後比較：



(四)不同重量牛肉，由吸收度 A_{420} 及 A_{433} 所算出之 χ_{CO} 含量及其相對偏差

牛肉重量 (g)	平均 A_{420}	平均 A_{433}	χ_{CO}	相對偏差
0.5	0.359	0.278	0.494	1.54%
1.0	0.709	0.530	0.527	4.92%
1.5	1.121	0.839	0.526	4.70%
2.0	1.439	1.121	0.489	2.64%
2.5	1.769	1.399	0.475	5.44%

χ_{CO} 的標準差：0.0207 平均值：0.502

二、結果分析和討論：

(一)由實驗結果得知：還原型肌紅蛋白的最大吸收波長為 433nm，CO 型肌紅蛋白的最大吸收波長為 420nm，氧化型則是 409nm。

(二)將 CO 型牛肉加入氧化劑 ($K_3Fe(CN)_6$) 後測其肌紅蛋白光譜，發現：

CO 型肌紅蛋白原本在 420nm 的吸收峰完全消失，這表示鍵結在肌紅蛋白中的 CO 在加入氧化劑後，會因中心鐵離子被氧化而逸失，吸收峰位移到 412nm 處。

(三)將 CO 型牛肉加入還原劑 ($Na_2S_2O_4$) 後測其肌紅蛋白光譜，發現：

1. 原本在 420nm 的吸收峰波長位移到 423nm。

2. 在一次微分後的光譜圖中，CO 還原型的吸收波微分出兩個吸收峰。

3. 與 CO 型、還原型肌紅蛋白的一次微分圖作比較後發現：CO 還原型微分出的兩個波峰，其波長分別與 CO 型吸收峰波長(427nm)、還原型吸收峰波長(443nm)相同。

(四)推測上述現象之原因為：原來 CO 型肌紅蛋白中，有部分肌紅蛋白並未與 CO 鍵結。

這些未鍵結的肌紅蛋白再加入還原劑後形成還原型肌紅蛋白，呈現出 433nm 位置的波峰；而原本已經跟 CO 鍵結的肌紅蛋白，則不受還原劑影響，波峰位置保持在 420nm。兩種不同肌紅蛋白的波經加乘後呈現出波長位置在 423nm 的波。

(五)由上述實驗結果，可以利用還原劑檢測市售牛肉，並偵測 420nm 及 433nm 的吸收峰，推算出牛肉中 CO 的莫耳分率。

(六)在上述實驗裡， $A_{co-420}^T=2.229$ 、 $A_{co-433}^T=0.901$ 、 $A_{還-420}^T=1.681$ 及 $A_{還-433}^T=2.108$ 等數值是由我們實驗數據所得，為固定值。然而，不同樣品牛肉中肌紅蛋白含量和濃度並不相同，會造成 A_{420} 和 A_{433} 數值有所差異，根據比爾定律 $A=\epsilon bC$ ，若濃度 (C) 增為 n 倍，則吸收度也會增為 n 倍，如此一來可能會造成 χ_{co} 計算上出現偏差。

(七)針對上述問題，本公式採取交叉相乘的方式去除了計算上的誤差，如下述：

當吸收度會因樣品中總肌紅蛋白濃度不同出現 n 倍偏差：

$$n \times A_{420} = \chi_{co} \times (A_{co-420}^T - A_{還-420}^T) + A_{還-420}^T$$

$$n \times A_{433} = \chi_{co} \times (A_{co-433}^T - A_{還-433}^T) + A_{還-433}^T$$

若採取交叉相成的方式則有抵銷 n 倍的效果：

$$\begin{aligned} n \times A_{420} \times [\chi_{co} \times (A_{co-433}^T - A_{還-433}^T) + A_{還-433}^T] \\ = n \times A_{433} \times [\chi_{co} \times (A_{co-420}^T - A_{還-420}^T) + A_{還-420}^T] \end{aligned}$$

(八)資料顯示：每一份牛肉樣品中，肌紅蛋白含量都有些許差異，而且每次填充的 CO 滲入牛肉中的比例也會造成肌紅蛋白中 χ_{CO} 不同。

(九)我們用同一份但切割成不同重量的 CO 型牛肉進行測量，以公式算出其 χ_{CO} ，再經上述方法計算後得知：其 χ_{CO} 的偏異值在 5.5% 以下，代表本公式能有效算出牛肉中肌紅蛋白的 χ_{CO} 。

【實驗五】自製電化學 CO 偵測器，並繪製檢量線。

一、實驗數據：

(一)自製電化學 CO 偵測器及其電路圖



圖 5-1 CO 探測器

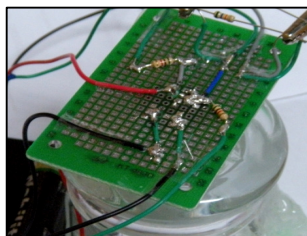


圖 5-2 第一代 CO 偵測器



圖 5-3 CO 鋼瓶

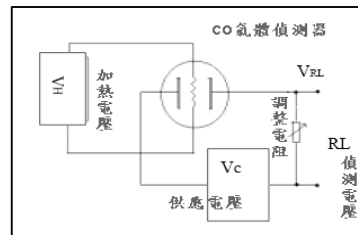
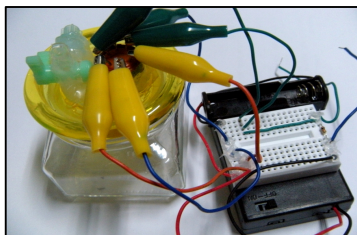
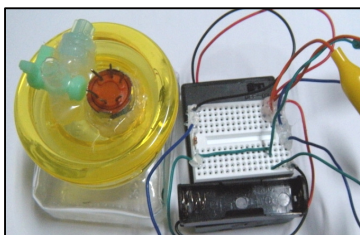
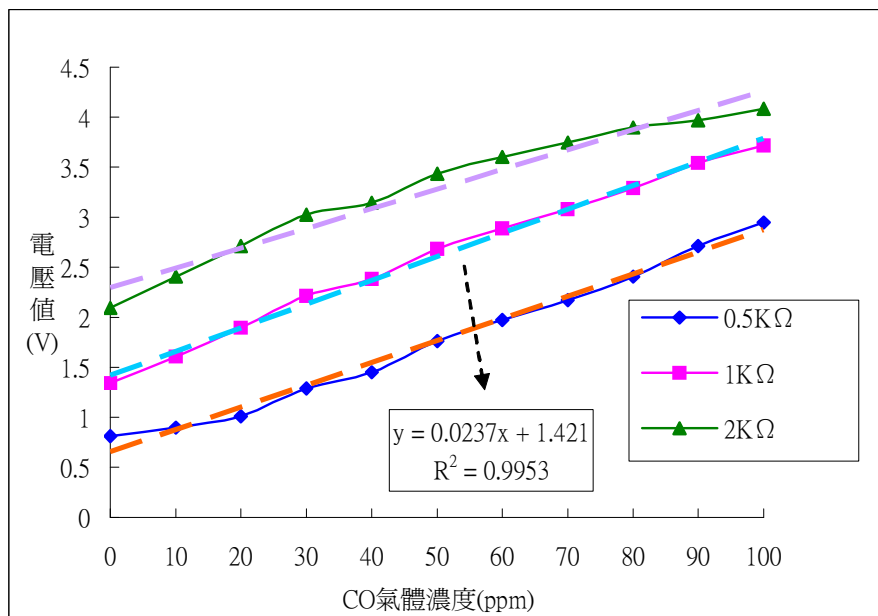


圖 5-4 第二代偵測器完成圖 1 圖 5-5 第二代偵測器完成圖 2 圖 5-6 電路圖

(二)不同電阻下與不同 CO 濃度的相對應電壓值(偵測器 2) (表 5-1)

偵測電壓(V) (0~100ppm)		電阻(KΩ)					
		0.5	1.0	2.0	5.1	8.2	10
CO 濃度 (ppm)	0	0.781	1.343	2.096	3.183	3.643	3.806
	10	0.968	1.609	2.408	3.448	3.854	3.993
	20	1.183	1.897	2.716	3.682	4.033	4.149
	30	1.440	2.213	3.025	3.894	4.188	4.283
	40	1.552	2.343	3.145	3.970	4.242	4.330
	50	1.863	2.681	3.435	4.144	4.363	4.433
	60	2.071	2.890	3.602	4.237	4.427	4.487
	70	2.272	3.080	3.746	4.313	4.479	4.530
	80	2.508	3.290	3.897	4.390	4.530	4.573
	90	2.812	3.541	4.068	4.473	4.584	4.618
	100	3.045	3.720	4.184	4.527	4.619	4.648

(三)不同電阻在不同 CO 濃度下的檢量線



二、結果分析和討論：

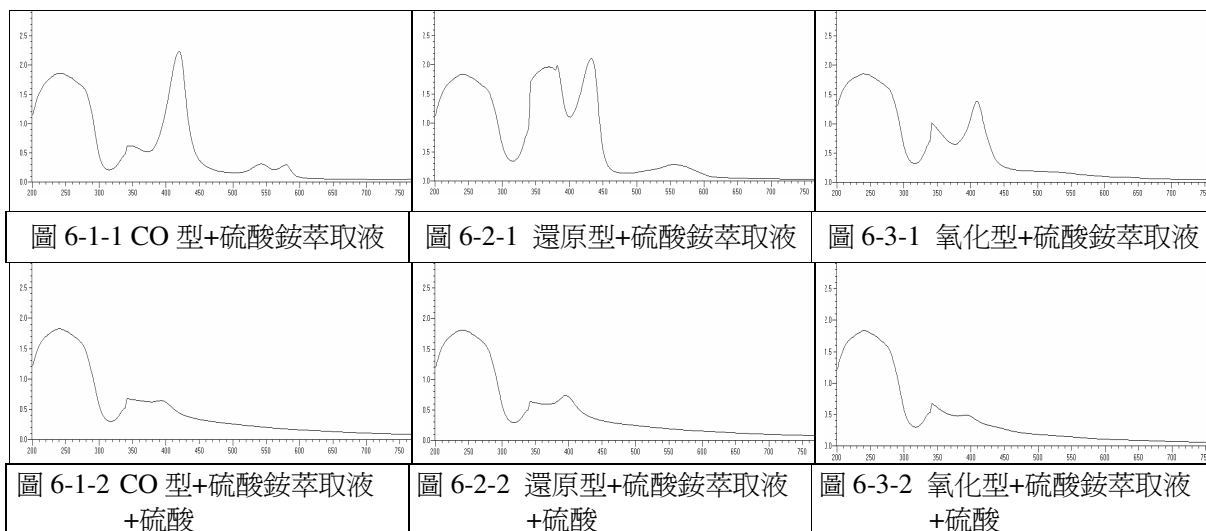
(一)我們的自製儀器利用縮小體積方式可有效的提高 CO 濃度偵測上的靈敏度，並利用不同電阻，找出最佳偵測條件。

(二)自製的 CO 偵測器以 1kΩ 電阻的靈敏度最高，相關性為【電壓值】= 0.0237 × 【CO 濃度】+ 1.421，相關係數為 $R^2 = 0.9953$ ，亦即當電壓值增加 0.001V，CO 濃度約上升 0.04ppm。

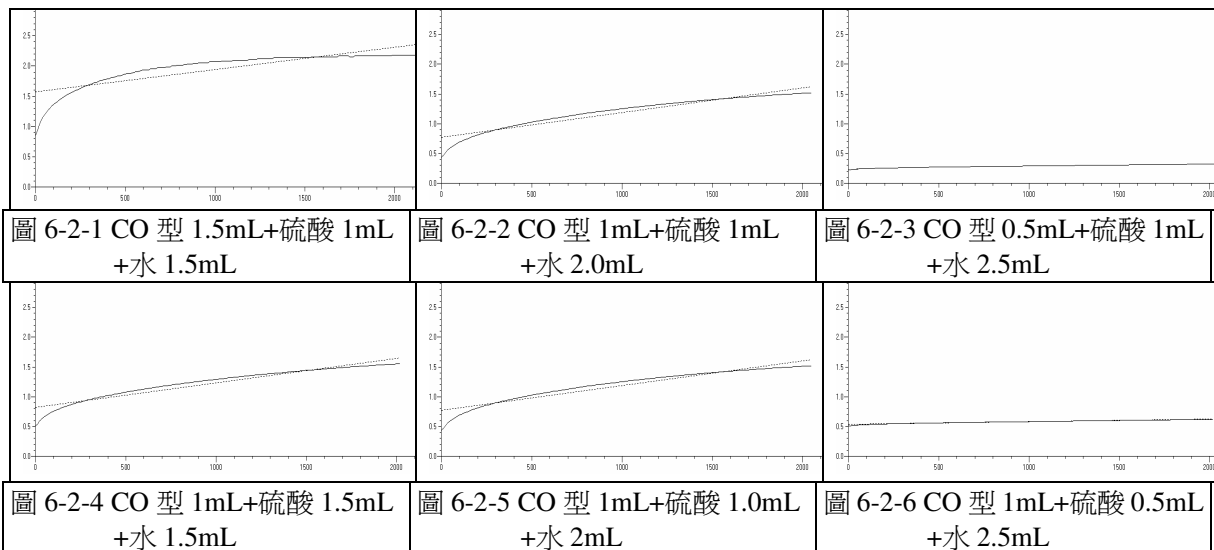
【實驗六】將不同類型的肌紅蛋白加入稀硫酸反應，探求其反應情形，並利用【實驗五】的自製儀器檢測實驗結果。

一、實驗數據：

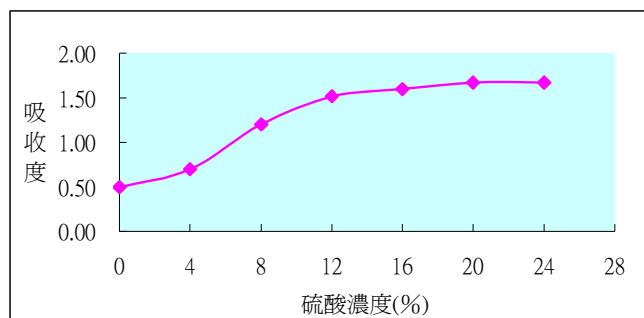
(一)硫酸銨萃取牛肉中肌紅蛋白，並加入硫酸前後的吸收光譜：



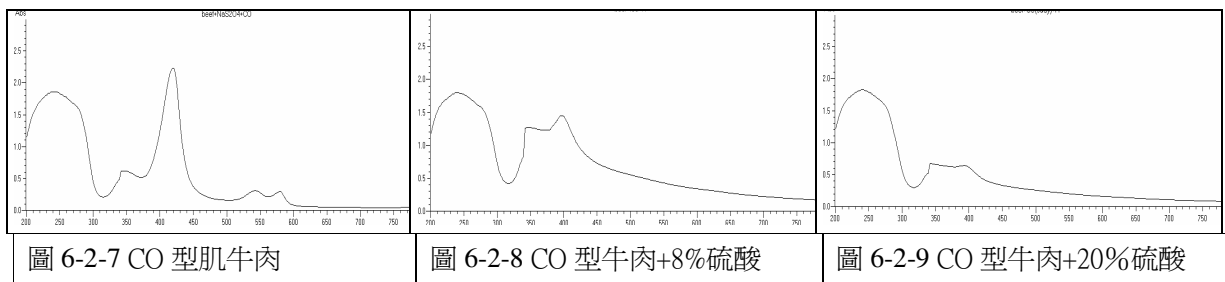
(二)不同濃度的 CO 型肌紅蛋白在不同濃度硫酸下，其吸收度隨時間的變化情形：



(三)不同濃度硫酸定波長下反應最終吸收度比較：



(四)不同濃度硫酸對肌紅蛋白反應後其吸收光譜變化情形：



(五)自製儀器偵測各類型肌紅蛋白加入硫酸後的電壓值變化情形：

編號	處理方式	電壓值(V) (加酸後)	增加 CO 濃度 (由【實驗五】公式算出)
1	新鮮型	1.421	0ppm
2	還原型	1.421	0ppm
3	CO 型	2.120	29.49ppm
4	氧化型	1.422	0.04ppm

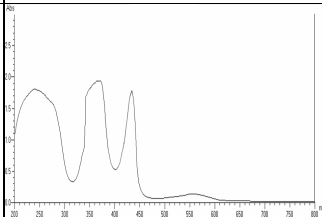
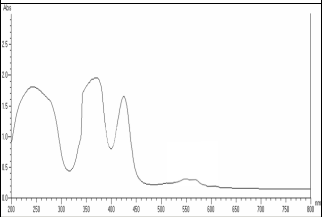
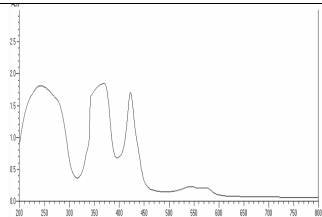
二、結果分析和討論：

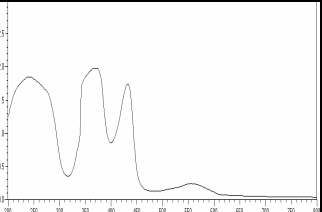
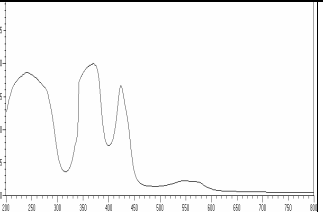
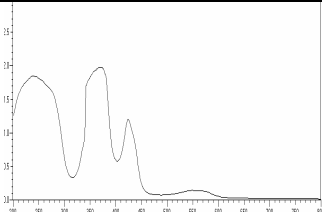
- (一)經硫酸銨所萃出來的肌紅蛋白，加入稀硫酸，並靜置約 10 分鐘後，CO 型有較混濁的情形發生，其他類型的牛肉溶液則較為清澈，其混濁程度：CO 型 > 還原型 > 氧化型 > 新鮮型。
- (二)本實驗發現，當有添加 CO 的牛肉經硫酸銨萃取後，加入適量的硫酸，其反應過程中會持續產生氣泡，而未添加 CO 的牛肉則無此現象產生，故我們推想，該氣泡很可能是 CO，由於酸會破壞肌紅蛋白，而使 CO 逸出。因此，我們配合自製儀器，看看是否能偵測 CO 氣體的存在，以檢驗此推測，並計算釋出 CO 的量。
- (三)加入的硫酸濃度太低時，無法完全切斷肌紅蛋白和 CO 的鍵結，而當硫酸濃度在 20% 以上時，可以完全破壞肌紅蛋白，使 CO 氣體逸出。
- (四)CO 型測出的 CO 莫耳分率確實較高，表示本儀器可有效偵測 CO 氣體的存在。
- (五)利用本儀器偵測 CO 型，反應後測得其電壓值為 2.12V，經公式換算，其 CO 濃度約為 29.49ppm，換算後 CO 含量為 4.33 μ g。

【實驗七】從市場或大賣場購買市售牛肉，並檢測牛肉中 CO 含量。

一、實驗數據：

- (一)從市場或大賣場購買市售牛肉，並檢測 CO 含量

來源		樣品 A	樣品 B	樣品 C
紫外可見光光譜儀	光譜圖			
	A ₄₂₀	1.38	1.19	1.21
	A ₄₃₃	1.69	1.31	1.19
	χ_{co}	0.024	0.142	0.260
電化學 CO 偵測器	電壓	1.44	1.61	1.79
	CO 濃度	0.80	7.97	15.57

來源		樣品 D	樣品 E	樣品 F
紫外 可見 光光 譜儀	光 譜 圖			
	A ₄₂₀	1.36	1.33	0.99
	A ₄₃₃	1.69	1.46	1.14
	χ_{CO}	0.01	0.145	0.094
電化學 CO 偵測器	電壓	1.43	1.62	1.57
	CO 濃度	0.38	8.40	6.29

二、結果分析和討論：

- (一)我們從市場及大賣場挑選一些市售牛肉，分別進行光譜檢測及自製儀器檢測後發現：加入還原劑之後的牛肉，其 420nm 附近的吸收峰較大，則代表添加 CO 的比例也較大，其中在 550nm 左右的位置也易形成兩個峰。
- (二)當牛肉在加入還原劑之後，其 420nm 附近的吸收峰較小，即添加 CO 的比例也較小，其中在 550nm 左右的位置只形成一個峰。
- (三)我們經由紫外可見光光譜儀可得知肌紅蛋白中 CO 型的比例(即 χ_{CO})，由自製電化學 CO 氣體偵測器，能測出 CO 逸失到空氣中的濃度，當 χ_{CO} 越高，其 CO 氣體濃度也越高。
- (四)我們經由分光光度計跟公式這兩種方法，均可以偵測出牛肉中是否有添加 CO 氣體的存在。

陸、結論

- 一、牛肉在冷凍的過程中，CO 組在 4 個月後仍呈鮮紅色。而真空組在 1 週後，牛肉的顏色則變成灰褐或紫紅，表示添加 CO 的牛肉在冷凍的過程可以保持其色澤亮度，未添加 CO 的牛肉則否。
- 二、肌紅蛋白內部有鐵二價離子，易與 CO 氣體形成強鍵結，其肌紅蛋白的吸收光譜會因此產生位移。實驗結果發現，新鮮牛肉的最大吸收度在 416nm，當肌紅蛋白與 CO 形成鍵結後，最大吸收度位移到 420nm。
- 三、爲了有效萃取肌紅蛋白來檢測，我們嘗試各種醇類、酸類、鹼類及鹽類，發現飽和度 60%的硫酸銨最能有效萃取肌紅蛋白，故實驗最後採用 60%硫酸銨作為標準萃取液。
- 四、CO 型肌紅蛋白經還原劑處理後，吸收峰不會產生位移，而新鮮型肌紅蛋白經還原劑處理後，波峰則位移至 433nm 處。將光譜一次微分後，能發現其兩者吸收峰位置的差異。

所以我們可以利用 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 來還原並檢測市售牛肉是否添加 CO，由光譜中的 420nm 及 433nm 的吸收度，推算出牛肉中 CO 的莫耳分率。其公式為：

$$\chi_{\text{CO}} = \frac{A_{420} \times 2.108 - A_{433} \times 1.681}{A_{420} \times 1.207 + A_{433} \times 0.548}$$

- 五、經硫酸銨萃取出含有 CO 的肌紅蛋白，加入硫酸後會有混濁的情形發生，並產生氣泡，反觀其他溶液則沒有此現象。由光譜圖亦可看出，酸會破壞肌紅蛋白，並釋出 CO 氣體。所以我們自製一氧化碳偵測器中來偵測，並算出 CO 的濃度。
- 六、在自製一氧化碳偵測器時，我們測試其最佳電阻測試值為 $1\text{k}\Omega$ ，其相關性為【電壓值】 $= 0.0237 \times \text{【CO 濃度】} + 1.421$ ，相關係數為 $R^2 = 0.9953$ ，當電壓值增加 0.001V ，CO 濃度約上升 0.04ppm 。
- 七、自製電化學 CO 偵測器與紫外可見光光譜儀(光學法)均能有效偵測市售牛肉是否添加 CO。

柒、參考資料

- 一、行政院環境保護署環檢所（民 95）。魚肉中一氧化碳之檢驗方法。署授食字第 0951800034 號公告。
- 二、聶方珮、彭清勇（民 90）。冷藏牛肉之氧化肌紅蛋白還原與肌肉色澤之變化。中國海事商業專科學校學報。p75-92。
- 三、陳維婷（民 96）編譯。「鮮」紅的迷思：以一氧化碳保存肉品色澤 美提案立法標示。台灣環境資訊協會-環境資訊中心。摘譯自 2007 年 7 月 26 日 ENS 美國華府報導。
- 四、江守山（民 95）。一氧化碳的起死回鮮。新光醫訊，第 176 期。
- 五、行政院衛生署（民 95），生魚片使用一氧化碳 保色不保鮮，藥物食品安全週報（Food & Drug Consumer Newsletter），ISSN: 1817-3691，12，第 23 期。
- 六、陳偉民(民 96)，鮮紅的魚肉。發現月刊，第 126 期。

【評語】 040809

本研究對於肌紅蛋白與一氧化碳的作用有頗為深入的探討，尤其開發出一氧化碳的分析方法（肉品中），十分難得；惟新分析方法未與既有標準分析方法的結果做對照比較，或可在未來補充，更驗證新方法的可靠性。