

中華民國第 63 屆中小學科學展覽會
作品說明書

高中組 工程學(二)科

第二名

052408

血跡檢測-色素替代試劑與現行酚酞法之比較

學校名稱：國立金門高級中學

作者： 高二 侯思羽 高二 蔡瀨嫻 高二 董芷菱	指導老師： 陳旻玓 李育賢
---	-----------------------------

關鍵詞：血跡檢測、還原酚酞、鑑識科學

摘要

血跡試劑通常利用氧化還原反應，檢測樣品當中是否含有血紅素，現行卡斯特-梅爾呈色試劑成分為還原酚酞，並以肉眼判讀試劑是否由無色變為粉紅。因其呈色易與血液樣品混淆，本研究改用 Python、OpenCV、numpy 進行試劑呈色之飽和度分析，輔助判讀試劑變色變化，並以食用色素靛藍、亮藍取代酚酞，製備顏色變化不同的血跡檢測試劑。結果顯示還原亮藍顏色無明顯變化，而還原靛藍則可取代還原酚酞進行血跡鑑定，且試劑顏色判讀為紅色變為黃色或無色，不易與樣品混淆。在反應速率測試中，還原酚酞與酒精以體積 1.5：1 混合；還原靛藍與酒精以體積 1：1.5 混合，試劑靈敏度最佳，偵測極限分別可達 10^{-4} 與 10^{-3} 的血跡樣品濃度。

壹、前言

一、研究動機

我們發現在許多偵探影集中都應用了鑑識科學的相關原理，而後上網查找血跡鑑定方法，發現現行的血跡檢測為卡斯特-梅爾呈色試驗(Kastle-Meyer 試驗，簡稱 KM 試驗)，其中含有還原態酚酞作為試劑的成分之一，且只需觀察酚酞顏色變化就能判定陰陽性，特別引起我們的興趣，因此想針對此試劑進行深入研究，並尋找其他素材替代之可能性。

二、研究目的

- (一) 以 Python、OpenCV、numpy 改良血跡呈色試驗判讀
- (二) 探討卡斯特-梅爾呈色試劑的反應速率、試劑靈敏度與偽陽性現象
- (三) 尋找傳統血跡推定試劑中酚酞的替代藥品
- (四) 探討替代藥品(亮藍、靛藍色素)之可行性與反應速率、試劑靈敏度及偽陽性現象

三、文獻回顧

(一) 血液成分與檢測法：

血液屬於結締組織，主要由紅血球、白血球、血漿及血小板四部份組成，而現行血跡判定通常以血紅素是否存在作為依據。由於血紅素中含有過氧化氫酶(鐵離子)，能催化雙氧水釋放出氧氣，因此可利用氧化還原之原理，使試劑氧化進而改變呈色。以此原理對血跡進行檢測方法主要有下列四種：

1. KM 試劑：現行主要試劑，基底為還原態酚酞。陽性反應為無色變粉紅色。

2. Leucomalachite green：基底為還原態孔雀綠，陽性反應無色變孔雀綠。
3. TMB 試劑：基底為四甲基聯苯胺，陽性反應由無色變為藍色且同樣以血紅素中鐵離子做為催化劑。

另外，促使血跡發生反應的還有魯米諾(Luminol)試劑，但其原理並非氧化還原，而是使試劑與血跡發生反應，形成 3-氨基苯二甲酸的不穩定激發態，促使電子躍遷進而發出藍色螢光。

除上述方法，還可利用層析法、電泳法、光譜分析法、血紅素衍生物結晶試驗(高山試驗)等進行血跡檢測，然考慮到藥劑及儀器取得之簡便性，本研究將著重現行主要 KM 試劑作為探討以及比對的主軸。

(二) KM 試劑

1. 還原酚酞製備原理：透過鋅粉與酚酞進行化學反應，將鹼性環境中的酚酞(粉紅色)發生氧化還原反應升成還原態酚酞(無色)。相關反應結構變化如圖 1：

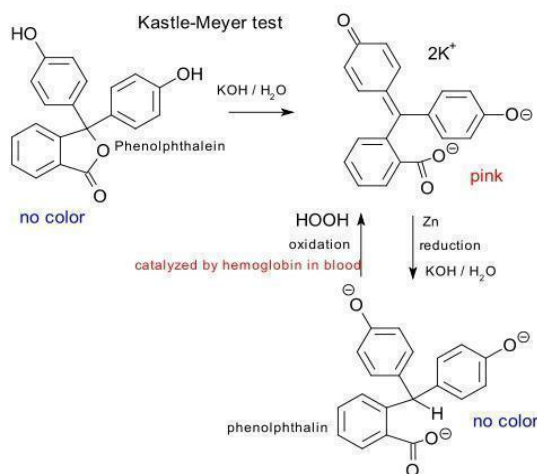


圖 1、還原酚酞製備原理。

圖來源、NNNS Chemistry blog(2008,November 18),CSI in trouble2.KM test.

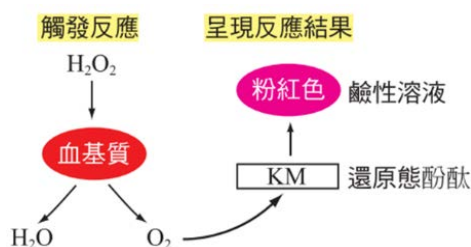


圖 2、KM 試驗檢測原理。

圖來源、陳鴻仁(2018)。化學鑑識-血跡的檢測。科學探究 MIT - 化學，10，1-6。

2. 檢測原理：還原酚酞與氧氣結合時，會重新回到氧化態(即原酚酞)，並呈強鹼性之粉紅色，藉由此呈色變化判斷陽性反應。原理可參考圖 2，由於血紅素當中鐵離子具過氧化氫酶特性，故此試劑會摻入低濃度雙氧水，當樣品中含有血紅素，可使雙氧水產生氧氣，促使還原態酚酞氧化，發生無色變為粉紅色的轉變，藉此判讀樣品中含有血液。
3. 偽陽性反應：

進行 KM 試驗時，若空間含有氧氣、其他含過氧化氫酶的成分，或樣品本身屬氧化劑等三類物質，皆可能導致還原酚酞進行氧化還原反應，進而發生陽性反應造成誤判。相關原理及預防方式分述如下：

- (1) 氧氣：空氣中本就存在氧氣，將還原酚酞長時間置於空氣中亦會變色。故陽性判定通常限制加入試劑後，需於一定秒數內變色方為陽性。
- (2) 過氧化氫酶：除了血紅素，生活常見的食品如馬鈴薯、花椰菜、辣根、紅蘿蔔、酵母粉...等，實驗室取得之其他藥劑如二氧化錳、碘化鉀...等，均含有過氧化氫酶。但植物中的過氧化氫酶會因高溫而失去活性，血紅素則否，若將待測樣品加熱到 100°C 再行血跡檢測，可降低此部份發生偽陽性的機率。
- (3) 氧化劑：直接使還原酚酞氧化，也會導致偽陽性反應，如過錳酸鉀、氯酸鉀、二鉻酸鉀、次氯酸鈉及過碳酸鉀等皆為常見的氧化劑。其中漂白水屬於家中最易取得之氧化劑，亦是我們認為案件現場最容易出現並且影響試驗準確性的材料，故本研究選用以過碳酸鈉、次氯酸鈉兩種藥品為主的家用漂白水，進行偽陽性反應測試。

(三) 酚酞於不同 pH 值呈色狀況與結構

1. 酚酞(C₂₀H₁₄O₄)製備：於濃硫酸下，將鄰苯二甲酸酐與苯酚混合並加熱而得(圖 3)。其為弱酸性物質，易溶於醇類。

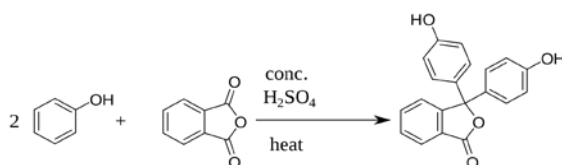


圖 3、酚酞的製備。圖來源、2023/2/15。酚酞。維基百科，自由的百科全書

2. 酚酞於不同 pH 值：

未解離的酚酞(H₂In)為無色，失去兩個電子時呈現粉紅色(此時的酚酞為 In²⁻，醌式結構)；在強鹼下則與三個 OH 結合並呈現無色(此時的酚酞為 In(OH)₃)，也就是說酚酞在酸性當中或鹼性當中且 pH 值過高時均呈現無色。另外在酸性之中且 pH 值過低時，酚酞會與 H⁺ 結合因而呈現橘色(此時的酚酞為 H₃In⁺)，如圖 4。

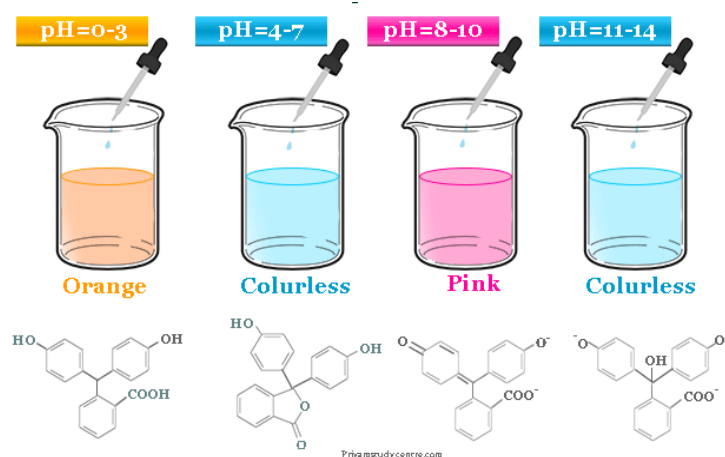


圖 4、酚酞於不同酸鹼下結構與顏色。圖來源、2021/11。Phenolphthalein.Learning Chemistry。

如上所述，酚酞有諸多結構變化，且酸鹼濃度對其亦有影響，故進行 KM 試劑製備或製程改良時，需避免 pH 過高或過低，以免將無色狀態作為還原酚酞使用。而進行色素作為替代試劑時，則應先進行實驗，確定該色素於 pH 值變化時的呈色狀況，做為還原態試劑製備時的依據。

(四) 其他因氧化還原變色之試劑

1. 亞甲藍：

具有氧化還原反應後顏色發生變化的特性，可作為氧化還原指示劑與藍瓶實驗的材料。

在藍瓶實驗中，亞甲藍於鹼性溶液中與葡萄糖(還原劑)反應，使顏色由藍色褪為無色，並透過搖瓶動作使氧氣(氧化劑)摻入，讓無色的還原態亞甲藍氧化變回藍色。該反應相關結構變化如圖 5：

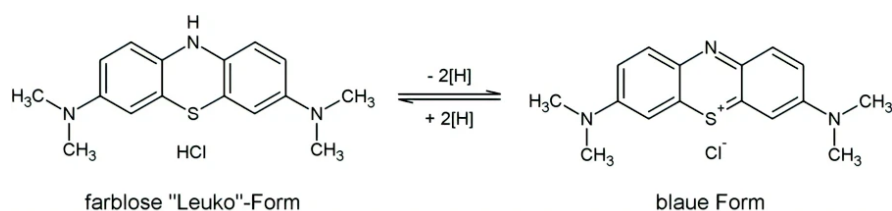


圖 5、亞甲藍氧化與還原時結構與顏色變化。

圖來源、維基百科(2023年3月23日)。藍瓶實驗。

由於亞甲藍符合氧化還原變色，亦有望作為血跡試劑(林建諭、張紘齊、詹柏呈，2011)，且藍瓶實驗中溶液為鹼性，這些特點均與 KM 試劑中的酚酞相似，故本研究搜尋其他可發生、與藍瓶實驗類似之反應，並且為非現行已知血跡鑑定試劑的藥品，進行酚酞替代品研究。

2. 靛藍胭脂紅：

通過藍瓶實驗，我們查找到與其原理相似的紅綠燈實驗。其中的靛藍胭脂紅具有氧化還原反應後顏色發生變化的特性，可作為氧化還原指示劑與酸鹼指示劑。

在紅綠燈實驗中，搖晃錐形瓶時，靛藍胭脂紅會先被氧化進而成進而呈綠色(圖 6)，而其中間過度色紅色為不穩定的中間產物紅色半醌中間體所造成；靜置錐形瓶時，氧化態靛藍胭脂紅與葡萄糖反應還原為黃色。

由於靛藍胭脂紅符合氧化還原變色，故有望作為血跡試劑。但我們擔心靛藍胭脂紅作為氧化還原指示劑，容易氧化變色，造成偽陽性，又靛藍胭脂紅為靛藍磺化而得，所以我們推測靛藍有望作為血跡試劑。

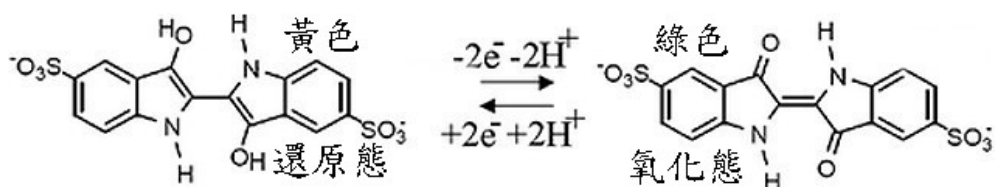


圖 6、靛藍胭脂紅氧化與還原時結構與顏色變化。

圖來源、跟著鄭大師玩科學(2017 年 10 月 23 日)。化學示範實驗(四)紅綠燈。

3. 靛藍與亮藍色素：

我們在查找資料時得知靛藍為食用色素藍色 2 號，而又發現與之顏色、名稱相近之食用色素藍色 1 號，選擇此兩種藍色色素進行替代試劑之實驗。

(1) 亮藍 FCF 色素(食用色素藍色 1 號)：結構如圖 7，為人工合成色素，可溶於水和甘油。一般條件下呈現藍色，但在強鹼中則會呈粉色。加熱會產生毒氣。

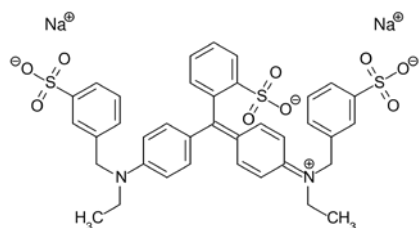


圖 7、亮藍結構。

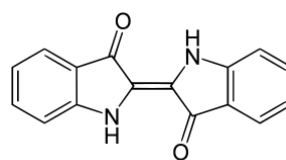


圖 8、靛藍結構。

圖來源、維基百科 (2023 年 2 月 13 日)。亮藍 FCF。

圖來源、維基百科 (2022 年 10 月 18 日)。靛藍。

(2) 靛藍色素(食用色素藍色 2 號)：結構如圖 8，為可由靛藍植物加工製得的天然染料，可溶於熱苯胺。一般條件下為藍色，但於濃硫酸及濃硝酸溶

液分別呈現黃綠色、靛紅色；酸性下無色；鹼性中則呈現淡黃色。加熱會產生毒氣。

(五) 色彩空間介紹

色彩空間(color space)為多種顏色組成的數學空間，由色域(gamut)與色彩模型(color model)決定，可用來描述影片對顏色的儲存方式。色域指色彩空間所能描述的色彩範圍。色彩模型為色彩空間描述色彩的方式，如：RGB 色彩模型、HSV 色彩模型，相關比較如表 1。常見色彩空間：

1. sRGB：由紅色 R、綠色 G、藍色 B 三原色組成，色度座標分別為(0.64, 0.33, 0.03)、(0.30, 0.60, 0.10)、(0.15, 0.06, 0.79)。
2. CIE XYZ：由 X、Y、Z 三個虛構原色組成，為讓 CIE RGB 色彩空間的值皆為正值而來，因色域較大，常為新色彩空間的創立基礎。
3. CIE LUV：由亮度 L、色度 U、色度 V 組成。
4. HSV：由色相 H、飽和度 S、明度 V 組成，色彩飽和度最大時為白色。
5. HSL：由色相 H、飽和度 S、亮度 L 組成，色彩飽和度最大為時為等值灰色。

表 1、色彩空間種類比較。表來源、研究者繪製。

	sRGB	CIE XYZ	CIE LUV	HSV	HSL
色彩模型	RGB	CIE	CIE	HSV	HSL
心理直覺性	較低	較低	較低	較高	較高
位元數	8 位元	無固定	8/16 位元	8/16 位元	8/16 位元
資料處理速度	較快	無固定	較快	較快	較快
常見應用	顯示器、網際網路	定義色彩空間	色差儀	影像處理	影像處理

(六) 本研究採用 sRGB 色彩空間錄製實驗影片，原因如下：

1. 實驗以飽和度 S 分析，色域大小對實驗分析的影響較小。
2. 減少實驗遮罩產生的難度，使之較不會因顯示屏不支援此色彩空間而丟失色彩資訊。
3. 數據分析的處理速度較快。

(七) 本研究採用 HSV 色彩空間對實驗影片形成遮罩、分析，原因如下：

1. 原實驗影片為 sRGB，故色域大小不影響遮罩形成。

2. HSV 色彩模型較 RGB 色彩模型、CIE 色彩模型直覺：方便以 OpenCV 修改參數，遮罩範圍。
3. HSV 的飽和度 S 漸變到白色：透明投影片後的白紙顏色更符合漸變至白色，不是如 HSL 漸變到等值灰色，調整參數較易。
4. 實驗影片形成遮罩時，使用 HSV 的噪點較 HSL、CIE LUV 要小。

(八) 本研究採用 HSV 色彩空間對實驗影片進行分析的原因如下：

1. 色域大小與實驗影片分析的關係較小：實驗影片以 sRGB 色彩空間錄製，無法由轉換色彩空間得到比原影片更大的色域。
2. 飽和度 S 判斷血跡檢驗試劑的反應速率較 RGB、CIE XYZ 色彩模型較易，只需參考一參數。
3. HSV 的飽和度 S 漸變到白色：透明投影片後的白紙顏色更符合漸變至白色，不是如 HSL 漸變到等值灰色。

(九) 色彩空間的轉換：sRGB 轉換為 HSV 的公式，如附圖 9。其中 R、G、B 為原數值縮放後的浮點數，範圍在 0~1 中，一般會將原數值除以 255。雖然此公式可換算 HSV 的值，但後續實驗分析將直接以 OpenCV 的代碼轉換色彩空間，由程式得到飽和度 S 數值。另由於 OpenCV 默認的色彩空間為 BGR，為 RGB 的不同排列，但不影響 BGR 色彩空間轉為 HSV 色彩空間。

$$\begin{aligned}
 V &\leftarrow \max(R, G, B) \\
 S &\leftarrow \begin{cases} \frac{V - \min(R, G, B)}{V} & \text{if } V \neq 0 \\ 0 & \text{otherwise} \end{cases} \\
 H &\leftarrow \begin{cases} 60(G - B) / (V - \min(R, G, B)) & \text{if } V = R \\ 120 + 60(B - R) / (V - \min(R, G, B)) & \text{if } V = G \\ 240 + 60(R - G) / (V - \min(R, G, B)) & \text{if } V = B \\ 0 & \text{if } R = G = B \end{cases} \\
 \text{if } H < 0 \text{ then } H &\leftarrow H + 360. \text{ On output } 0 \leq V \leq 1, 0 \leq S \leq 1, 0 \leq H \leq 360.
 \end{aligned}$$

The values are then converted to the destination data type:

- 8-bit images: $V \leftarrow 255V, S \leftarrow 255S, H \leftarrow H/2(\text{to fit to } 0 \text{ to } 255)$

圖 9、sRGB 轉為 HSV 的公式。圖來源、OPEN CV。

貳、研究設備及器材

				
酚酞	藍色色素 (亮藍/靛藍)	鋅粉	30%雙氧水	95%酒精
				
氫氧化鉀	白鴿牌漂白素 (過碳酸鈉)	白蘭牌漂白水 (次氯酸鈉)	合成血液，後稱假血或樣品 (台灣鑑識科技有限公司)*	
量筒	試管	燒杯	錐形瓶	透明投影片
滴管	玻棒	刮勺	電子秤重器	加熱攪拌器

參、研究過程及方法

一、實驗架構圖

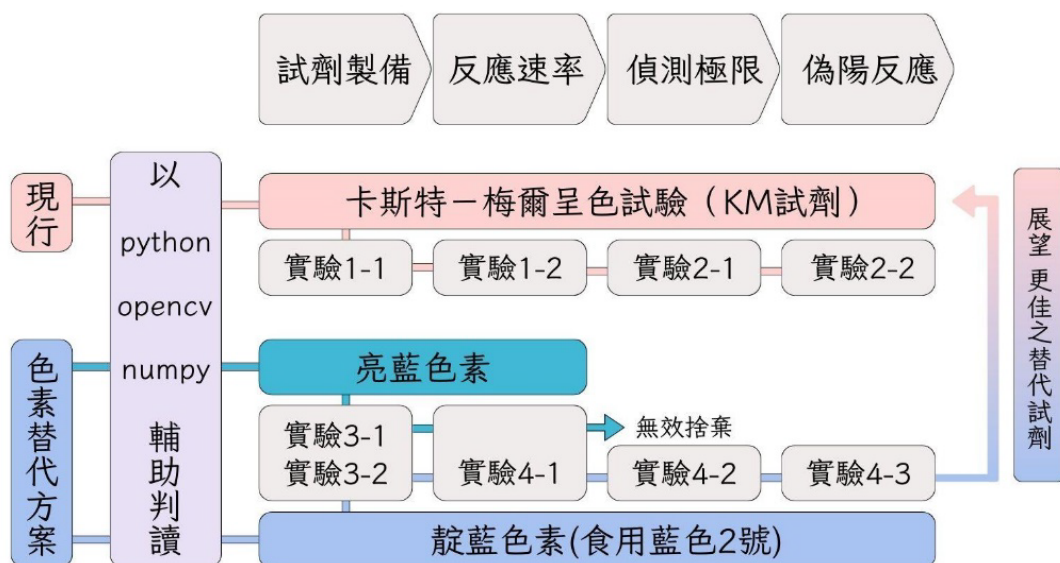


圖 10、實驗架構圖。圖來源、研究者繪製。

二、研究流程

(一) 模組 OpenCV 輔助判讀實驗步驟：

1. 將錄製的影片導入 Google 相簿（版本：6.29.0.519265844）。
2. 將投影片的每一單位方格皆存為一影片，並將影片畫面裁切至溶液所占面積大小，並將實驗樣品接觸試劑時剪為影片開始時。
3. 將影片導入 PyCharm（版本：2022.3.2）。下載 Python（版本 3.11.2）、OpenCV 模組（版本：4.7.0.72）與 numpy 模組（版本：1.24.2），寫入以下圖 11 之程式並運行：

```
# 導入模組
import cv2
import numpy as np

def empty(v):
    pass

# 創立HSV數值滑塊
cv2.namedWindow('Trackbar')
cv2.resizeWindow('Trackbar', 640, 320)
cv2.createTrackbar('H min', 'Trackbar', 0, 179, empty)
cv2.createTrackbar('H max', 'Trackbar', 35, 179, empty)
cv2.createTrackbar('S min', 'Trackbar', 0, 255, empty)
cv2.createTrackbar('S max', 'Trackbar', 255, 255, empty)
cv2.createTrackbar('V min', 'Trackbar', 0, 255, empty)
cv2.createTrackbar('V max', 'Trackbar', 215, 255, empty)

# 將影片放入Test
test = cv2.VideoCapture('C:/Users/zowan/Downloads/Blue 1 A.MPG')

# 迴圈
while True:
    # 放入HSV遮罩範圍
    h_min = cv2.getTrackbarPos('H min', 'Trackbar')
    h_max = cv2.getTrackbarPos('H max', 'Trackbar')
    s_min = cv2.getTrackbarPos('S min', 'Trackbar')
    s_max = cv2.getTrackbarPos('S max', 'Trackbar')
    v_min = cv2.getTrackbarPos('V min', 'Trackbar')
    v_max = cv2.getTrackbarPos('V max', 'Trackbar')

    # 顯示HSV遮罩範圍
    print(h_min, h_max, s_min, s_max, v_min, v_max)

    # 設定顏色範圍
    lower_color = np.array([h_min, s_min, v_min])
    upper_color = np.array([h_max, s_max, v_max])

    # 讀取影片中的一幀
    ret, frame = test.read()

    # BGR轉換成HSV
    hsv = cv2.cvtColor(frame, cv2.COLOR_BGR2HSV)

    # 依據顏色範圍創立遮罩
    mask = cv2.inRange(hsv, lower_color, upper_color)

    # 計算圖片在遮罩範圍內的平均飽和度
    mean_saturation = cv2.mean(hsv, mask=mask)[1]

    # 將遮罩加原圖，放入result
    result = cv2.bitwise_and(frame, frame, mask=mask)

    # 顯示原圖加遮罩的圖像
    cv2.imshow('result', result)

    # 顯示原圖的圖像
    cv2.imshow('hsv', frame)

    # 顯示原圖在遮罩範圍內的平均飽和度
    print(mean_saturation)

    # 等待鍵盤按鍵關閉遮罩，超過1毫秒則直接關閉
    cv2.waitKey(1)

    # 影片播放完或獲取失敗時，退出迴圈
    if not ret:
        break
```

圖 11、寫入程式之畫面截圖。圖來源、研究者拍攝。

4. 移動滑塊尋找遮罩的 HSV 參數，盡可能保留試劑顏色，如圖 12。

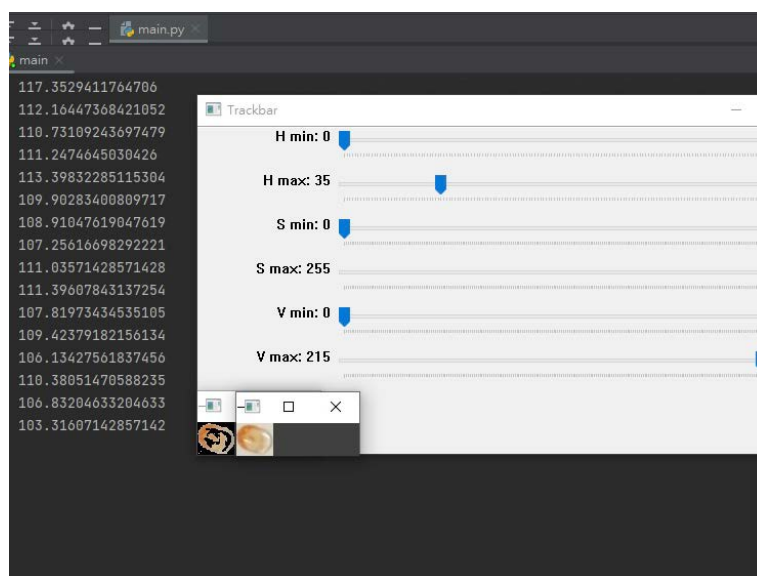


圖 12、移動滑塊尋找遮罩的 HSV 參數畫面截圖。圖來源、研究者拍攝。

- 取消紅色部分的註解(去除前方#)並將藍色部分註解(前方加入#)，將橘色部分改為找到的 HSV 參數。
- 運行程式，並將顯示的平均飽和度複製到 Google 試算表(圖 13)。

圖 13、運行過程還原靛藍之部分數據截圖。圖來源、研究者拍攝。

- 將同比例的飽和度進行平均，將結果製成圖表並觀察各比例之差異。

(二) 實驗檢測流程：

- 在透明投影片上註明試劑比例(圖 14A)、各成分之濃度及樣品名稱(圖 14B)，並以滴管吸取待測樣品，滴 1 滴於透明投影片最小單位方格上(圖 14C、圖 14D)。其中第一行為兩格對照組，其餘每行皆為 5 格，分別為一組實驗，每組重複 5 次。透明投影片編排方式可參考下圖 15 示意圖。

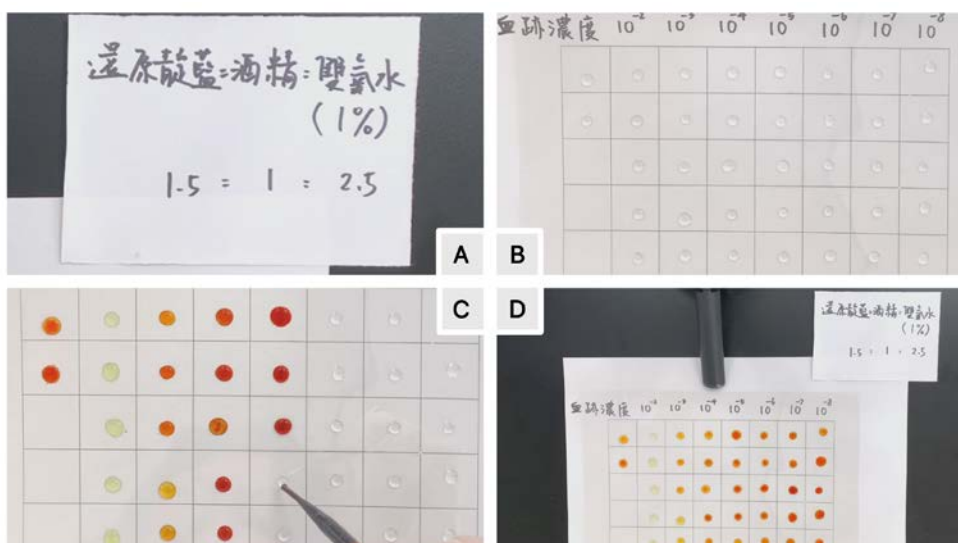


圖 14、實驗裝置與透明投影片示意圖 A~D。圖來源、研究者拍攝

對	A1	B1	C1	D1	E1	F1	G1
照	A2	B2	C2	D2	E2	F2	G2
	A3	B3	C3	D3	E3	F3	G3
	A4	B4	C4	D4	E4	F4	G4
	A5	B5	C5	D5	E5	F5	G5

*英文字母代表不同樣品

圖 15、樣品布置順序示意圖。圖來源、研究者繪製。

- 將手機裝架在上方 30cm 處，使用後置鏡頭錄影，參照各實驗試劑配方或比例表，吸取所需還原試劑與酒精，混於量筒做為預備。
- 以滴管吸取雙氧水 2.5 毫升，並於滴加待測樣品前，才將雙氧水混入步驟(3)之預配藥劑，接著以滴管上下抽吸溶液 2-3 次混合均勻，完成實驗藥劑。
- 以滴管吸取還原試劑，依序滴入步驟(1)之透明投影片上，每格滴加 1 滴，且滴入時以不遮擋拍攝畫面為原則。
- 於最後一滴試劑滴入後 30 秒停止攝影。

(三) 待測樣品製備

- 假血樣品：以電子秤量取 1g 假血原液及 9g 蒸餾水至一燒杯中，得重量百分濃度為 10%的血跡樣品，再取稀釋液 1g 以逐步稀釋法將血跡樣品稀釋為原液 1%、0.1%...等，保留每次稀釋之樣品，並以 10^{-n} 表示濃度。另以蒸餾水做為各實驗之對照組。
- 偽陽性樣品過碳酸鈉：使用白鴿牌漂白水，為氧化劑，可取代血液中鐵離子及雙氧水的角色，氧化 KM 試劑。按照瓶身說明，取 0.1g 的漂白粉加入 12.5g 清水(此指蒸餾水)稀釋。
- 偽陽性樣品次氯酸鈉：使用白蘭牌漂白水，為氧化劑，可取代血液中鐵離子及雙氧水的角色，氧化 KM 試劑。按照瓶身說明，0.1c.c.漂白水加入 10 毫升清水(此指蒸餾水)稀釋。

(四) 氫氧化鉀溶液的製備

- 以電子秤量取 56g 氫氧化鉀(KOH=56.1)及少許蒸餾水，放入 250mL 燒杯中以玻棒攪拌至固體全數溶解，倒入 250mL 容量瓶，以蒸餾水潤洗燒杯倒入容量瓶 2 次，最後加水至刻度線，完成 4M 之氫氧化鉀水溶液。

2. 以分度吸量管分別吸取 4M 氫氧化鉀溶液 75mL、50mL、25mL 置於 100mL 容量瓶，加蒸餾水稀釋至刻度線，完成 3M、2M、1M 溶液。
3. 取 1M 氫氧化鉀水溶液 10mL 置於 100mL 容量瓶，加蒸餾水稀釋至刻度線製得 10^{-1} M 水溶液，再取稀釋液重複步驟，逐步稀釋製備 10^{-1} M~ 10^{-5} M 之水溶液。

(五) 實驗 1-1 還原酚酞的製備

1. 實驗目的：製備還原態酚酞。
2. 參考配方：本作品參考之還原酚酞配方為 1g 酚酞、16g 氫氧化鉀、20g Zn 粉末、100 毫升蒸餾水(陳鴻仁，2018)。
3. 製備步驟：
 - (1) 燒杯裝入蒸餾水後將上述參考配方於燒杯中混合，置於電磁加熱攪拌器上並加入磁石攪拌子，調整旋鈕至 340RPM 攪拌。
 - (2) 因氫氧化鉀稀釋劇烈放熱使溶液升溫，故待混合液溫度下降後，覆蓋鋁箔紙再將電磁加熱攪拌器調整至 340RPM/210°C 加熱。
 - (3) 加熱同時觀察溶液呈色，至酚酞顏色全數褪去即可關閉攪拌器。
 - (4) 降溫後過濾，並將澄清液保存於棕色瓶中密封冷藏。
4. 還原酚酞濃度：還原態酚酞總重 100.27g，含酚酞 1g，重量百分濃度約 1%，後簡稱還原酚酞。

(六) 實驗 1-2 KM 試劑反應速率

1. 實驗目的：尋找反應速率較快之試劑比例。
2. 參考配方：還原酚酞 1 毫升、酒精 1.5 毫升、0.3%雙氧水 2.5 毫升(陳旻玳，2021)。
3. 比例選用：固定 0.3%雙氧水為 2.5 毫升、還原酚酞與酒精混合液 2.5 毫升，調整還原酚酞於試劑中比例自 0 毫升逐次遞增 0.5 毫升直至 2.5 毫升；酒精自 2.5 毫升逐次遞減 0.5 毫升直至 0 毫升，完成下表 2 之比例 A~F。

表 2、KM 試劑反應速率實驗待測比例。表來源、研究者繪製。

	還原酚酞(mL)	酒精(mL)	0.3%雙氧水(mL)
比例 A	0	2.5	2.5
比例 B	0.5	2	2.5

比例 C	1	1.5	2.5
比例 D	1.5	1	2.5
比例 E	2	0.5	2.5
比例 F	2.5	0	2.5

4. 實驗步驟：

- (1) 參照研究方法之檢測流程，以還原酚酞製備比例 A~F 之 KM 試劑並以 1% 血跡樣品檢測、錄製。
- (2) 錄製影片後依照模組 OpenCV 輔助判讀程序取得實驗數據。

(七) 實驗 2-1 KM 試劑偵測極限

1. 實驗目的：尋找還原酚酞試劑之偵測極限。
2. 樣品選用：參照研究流程之待測樣品製備，配製重量百分濃度自 10^{-2} 至 10^{-8} 的血跡樣品。
3. 比例選用：參考輔助判讀分析實驗 1-2 數據後，選用比例如下表 3。

表 3、KM 試劑偵測極限實驗待測比例。表來源、研究者繪製。

	還原酚酞(mL)	酒精(mL)	0.3%雙氧水(mL)
比例 C	1	1.5	2.5
比例 D	1.5	1	2.5

4. 實驗步驟：參照研究方法之檢測流程，進行比例 C~D 之偵測極限檢測，錄製影片後依照模組 OpenCV 輔助判讀程序取得實驗數據。

表 4、KM 試劑偵測極限實驗交叉配對。表來源、研究者繪製。

比例 C	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}
比例 D	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}

(八) 實驗 2-2 KM 試劑偽陽性反應

1. 實驗目的：確認 KM 試劑與漂白水之反應情形。
2. 樣品選用：參照研究流程之待測樣品製備，配製過碳酸鈉及次氯酸鈉溶液。
3. 比例選用：經輔助判讀分析實驗 2-1 後選用比例 D。
4. 實驗步驟：參照研究方法之檢測流程，進行比例 D 於三種樣品(D1~D3)之偽陽性反應檢測，錄製影片後依照模組 OpenCV 輔助判讀程序取得實驗數據。

表 5、KM 試劑偽陽性實驗樣品對照。表來源、研究者繪製。

比例 D1	比例 D2	比例 D3
NaCO ₃	NaClO	H ₂ O

(九) 實驗 3-1 色素在不同 pH 值呈色狀況

1. 實驗目的：觀測靛藍及亮藍色素於不同程度鹼性環境下之呈色。
2. 溶液製備：
 - (1) 參照研究流程之鹼性溶液的製備，配製氫氧化鉀溶液。
 - (2) 取 1g 靛藍色素，以蒸餾水稀釋至 100g，得 1%靛藍溶液。
 - (3) 取 1g 亮藍色素重複步驟(2)，得 1%亮藍溶液。
3. 實驗步驟：
 - (1) 以滴管分別吸取不同濃度鹼性溶液 10mL 至不同試管中備用。
 - (2) 以滴管吸取亮藍色素溶液滴入步驟(1)之試管，觀察並記錄顏色。
 - (3) 重複步驟(1)、(2)，以靛藍色素溶液取代亮藍色素溶液。

(十) 實驗 3-2 還原態靛藍與亮藍的製備

1. 實驗目的：製備還原態靛藍與亮藍。
2. 參考配方：參考實驗 1-1 還原酚酞配方，以靛藍、亮藍色素粉末替代酚酞。配方為 1g 色素、16g 氫氧化鉀、20g Zn 粉末、100 毫升蒸餾水。
3. 製備步驟：參照實驗 1-1 還原酚酞製備步驟混合材料，攪拌或加熱至藥品顏色改變且溶液維持 5 分鐘不變色後，過濾並取澄清液保存於棕色瓶中冷藏。
4. 濃度：
 - (1) 亮藍：還原態亮藍總重 101.07g，含亮藍 1g，重量百分濃度約為 1%，後簡稱還原亮藍試劑。
 - (2) 靛藍：還原態靛藍總重 103.29g，含靛藍 1g，重量百分濃度約為 1%，後簡稱還原靛藍試劑。

(十一) 實驗 4-1 亮藍與還原靛藍試劑反應速率

1. 實驗目的：尋找反應速率較快之試劑比例。
2. 參考配方：參考實驗 1-2 KM 試劑配方，以還原靛藍/亮藍替代還原酚酞。配方為還原靛藍或還原亮藍 1 毫升、酒精 1.5 毫升、0.3%雙氧水 2.5 毫升。
3. 比例選用：參考實驗 1-2 試劑比例調整，得出最終待測試劑(毫升)如下表。

表 6、替代試劑反應速率實驗待測比例。表來源、研究者繪製。

	還原亮藍/靛藍(mL)	酒精(mL)	0.3%雙氧水(mL)
比例 A	0	2.5	2.5
比例 B	0.5	2	2.5
比例 C	1	1.5	2.5
比例 D	1.5	1	2.5
比例 E	2	0.5	2.5
比例 F	2.5	0	2.5

4. 實驗步驟：

- (1) 參照研究方法之檢測流程，以還原靛藍與還原亮藍製備比例 A~F 之試劑並以 1%血跡樣品檢測、錄製。
- (2) 錄製影片後依照模組 OpenCV 輔助判讀程序取得實驗數據。

(十二)實驗 4-2 還原靛藍偵測極限

1. 實驗目的：尋找還原靛藍試劑之偵測極限。
2. 樣品選用：參照研究流程之待測樣品製備，配製重量百分濃度自 10^{-2} 至 10^{-8} 的血跡樣品。
3. 比例選用：
 - (1) 經輔助判讀分析實驗 4-1 後選用比例 C、D。
 - (2) 調整還原靛藍及雙氧水濃度後得待測比例如下表 7。

表 7、還原靛藍試劑偵測極限實驗待測比例。表來源、研究者繪製。

	還原靛藍 (mL)	酒精 (mL)	雙氧水 (mL)	還原靛藍 濃度	雙氧水濃 度
比例 A	0	2.5	2.5	1%	0.3%
比例 B	0.5	2	2.5	1%	0.3%
比例 C	1	1.5	2.5	1%	0.3%
比例 D	1.5	1	2.5	1%	0.3%
比例 E	2	0.5	2.5	1%	0.3%
比例 F	2.5	0	2.5	1%	0.3%
比例 G	1	1.5	2.5	1%	1%

比例 H	1	1.5	2.5	1%	1.5%
比例 I	1	1.5	2.5	1%	3%
比例 J	1	1.5	2.5	2%	0.3%
比例 K	1	1.5	2.5	2%	0.4%
比例 L	1	1.5	2.5	2%	0.5%
比例 M	1	1.5	2.5	2%	0.6%
比例 N	1	1.5	2.5	2%	1%
比例 O	1	1.5	2.5	2%	1.5%
比例 P	1	1.5	2.5	2%	3%
比例 Q	1	1.5	2.5	4%	0.3%
比例 R	1	1.5	2.5	4%	1%
比例 S	1	1.5	2.5	4%	1.5%
比例 T	1	1.5	2.5	4%	3%
比例 U	1.5	1	2.5	1%	1%
比例 V	1.5	1	2.5	1%	1.5%
比例 W	1.5	1	2.5	1%	3%
比例 X	1.5	1	2.5	4%	0.3%
比例 Y	1.5	1	2.5	4%	1%
比例 Z	1.5	1	2.5	4%	1.5%
比例 AA	1.5	1	2.5	4%	3%

4. 實驗步驟：

- (1) 參照研究方法之檢測流程，以還原靛藍搭配不同濃度雙氧水，製備比例 C~AA(比例 E、F 除外)之試劑，並以重量百分濃度 10^{-2} 至 10^{-8} 的血跡樣品檢測、錄製。
- (2) 錄製影片後依照模組 OpenCV 輔助判讀程序取得實驗數據。

(十三)實驗 4-3 還原靛藍試劑偽陽性反應

1. 實驗目的：確認還原靛藍試劑於漂白水發生之偽陽性反應狀況。
2. 樣品選用：參照研究流程之待測樣品製備，配製過碳酸鈉及次氯酸鈉溶液。
3. 比例選用：經輔助判讀分析實驗 4-2，選用比例 J。

4. 實驗步驟：參照研究方法之檢測流程，進行比例 J 於三種樣品(J1~J3)之偽陽性反應檢測，錄製影片後依照模組 OpenCV 輔助判讀程序取得實驗數據。

表 8、還原靛藍偽陽性實驗樣品對照。表來源、研究者繪製。

比例 J1	比例 J2	比例 J3
NaCO ₃	NaClO	H ₂ O

肆、研究結果

(一) KM 試劑配方探究

1. 實驗 1-1 還原酚酞的製備

(1) 配方：1g 酚酞、16g 氫氧化鉀、20gZn 粉末、100 毫升蒸餾水。

(2) 濃度：約 1%（重量百分濃度）。

2. 實驗 1-2 KM 試劑反應速率

陽性指標：10 秒內變色。KM 試劑不同比例平均飽和度變化結果如圖 16。

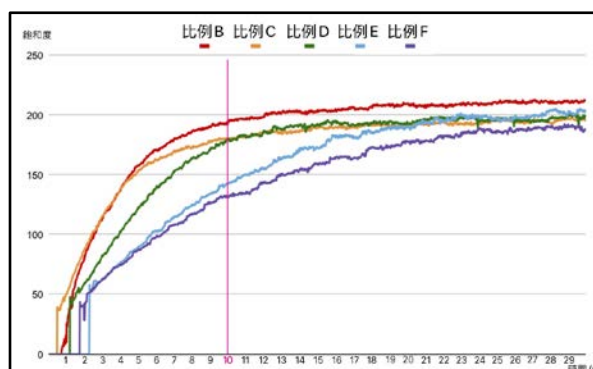


圖 16、KM 試劑反應速率實驗分析圖。

比例 A 還原酚酞體積為零，故起始飽和度為零且無飽和度變化。10 秒內飽和度變化量為比例 B>比例 C≈比例 D>比例 E>比例 F，其中比例 B、比例 C、比例 D 的飽和度變化量最為明顯，而當中又以比例 B、比例 C 在 4 秒內的飽和度相近，比例 C、比例 D 在 10 秒後的飽和度相近。

(二) KM 試劑偵測極限與干擾因素

1. 實驗 2-1 偵測極限：

陽性指標：10 秒內變色。得 KM 試劑 C、D 比例之對不同濃度血跡樣品之平均飽和度變化如圖 17、圖 18。

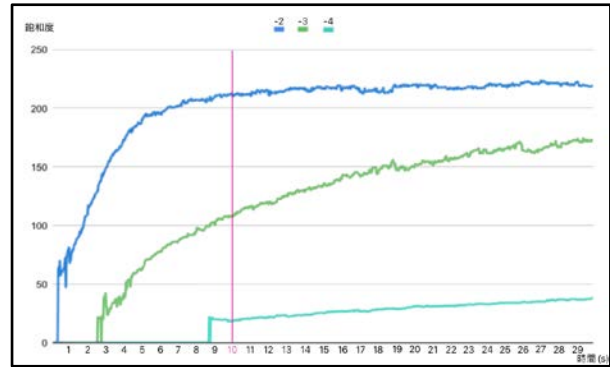
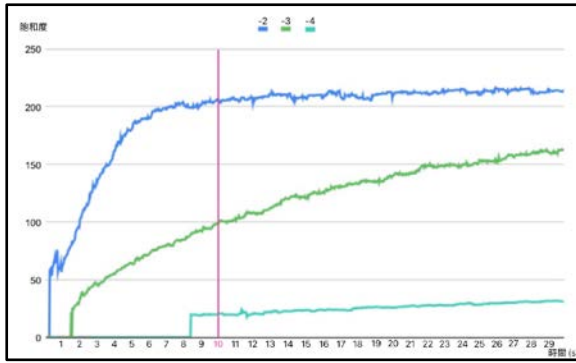


圖 17、KM 試劑比例 C 偵測極限分析圖

圖 18、KM 試劑比例 D 偵測極限分析圖。

兩者在陽性判定時間(10 秒)內與濃度 10^{-2} 、 10^{-3} 及 10^{-4} 之血跡樣品反應後飽和度皆大於 15，達肉眼可辨識標準，故視為陽性反應，且血跡樣品的濃度愈小試劑飽和度變化愈小、愈慢。比例 C 對血跡濃度為 10^{-4} 的五組數據中，有一組呈偽陰性(未能變色)，故推測比例 C 的偵測極限僅達血跡濃度 10^{-3} ，無法準確判讀濃度等於 10^{-4} 或更低之血跡樣品；比例 D 對 10^{-4} 的五組數據皆為陽性，推測偵測極限達血跡濃度 10^{-4} 。

表 9、KM 試劑偵測極限結果整理。表來源:研究者繪製。

還原酚酞:酒精:雙氧水/ 血跡樣品濃度	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
1:1.5:2.5	o	o	o*	x	x	x
1.5:1:2.5	o	o	o	x	x	x

o 表示陽性 x 表示陰性 *表示試劑有偽陰性可能

2. 實驗 2-2 偽陽性反應

陽性指標：10 秒內變色。平均飽和度變化量如圖 19，分析結果於表 10。

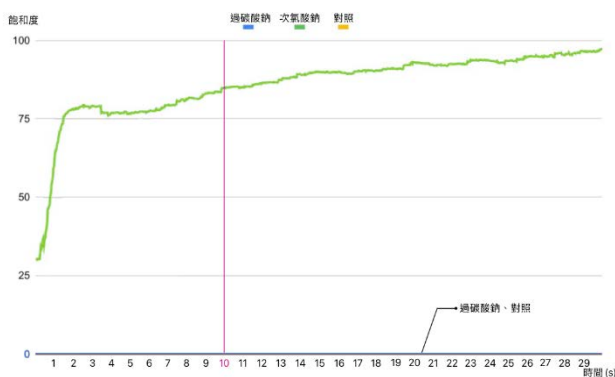


圖 19、KM 試劑比例 D 偽陽性實驗分析圖。

表 10、KM 試劑偽陽性測試。

	過碳酸鉀 (白鴿牌)	次氯酸鈉 (白蘭牌)
KM 試劑 (比例 D)	x	o

o 表示陽性 x 表示陰性

(三) 酚酞替代藥品靛藍與亮藍檢測

1. 實驗 3-1 色素於不同濃度鹼性溶液呈色狀況

實驗結果如圖 20~23，顏色與鹼性溶液濃度整理於表 11。

表 11、色素於不同濃度鹼性溶液呈色。表來源、研究者繪製。

OH濃度(M)	4	3	2	1	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
亮藍	水藍	水藍	水藍	亮藍	亮藍	深藍	深藍	深藍	深藍
靛藍	黃	黃	黃	黃	黃綠	水藍	水藍	水藍	水藍



圖 20、亮藍呈色，由左而右為 4~1M。 圖 21、亮藍呈色，由左而右為 10^{-1} ~ 10^{-5} M。



圖 22、靛藍呈色，由左而右為 4~1M。 圖 23、靛藍呈色，由左而右為 10^{-1} ~ 10^{-5} M。

2. 實驗 3-2 還原態靛藍與亮藍的製備

- (1) 還原亮藍：還原態亮藍總重 101.07g，含亮藍 1g，重量百分濃度約為 1%，製備完成之還原亮藍溶液顏色為紅褐色。
- (2) 還原靛藍：還原態靛藍總重 103.29g，含靛藍 1g，重量百分濃度約為 1%，製備完成之還原靛藍溶液顏色為深紅色。

(四) 替代試劑的血跡反應檢測

1. 實驗 4-1 替代試劑反應速率-還原亮藍

還原亮藍試劑於不同比例、同比例不同次數之飽和度變化結果如圖 24、25。

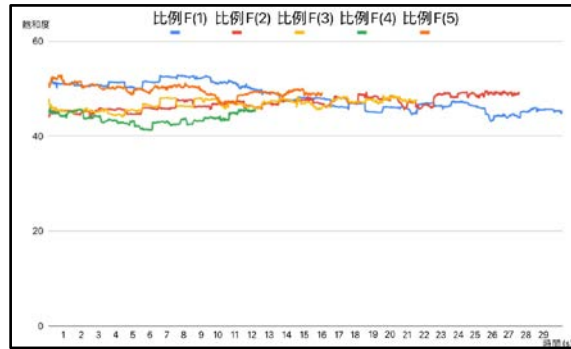
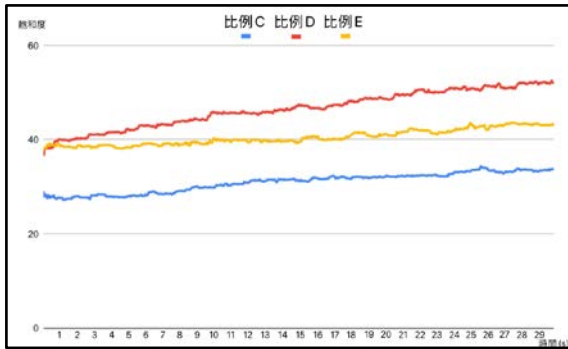


圖 24、還原亮藍反應速率實驗分析圖。 圖 25、還原亮藍比例 F 反應速率分析。

比例 A 還原亮藍體積為零，故起始飽和度為零且無飽和度變化；比例 B 之飽和度無法為程式所偵測，肉眼亦難以判讀；比例 C 及比例 D 及比例 E 之飽和度僅微幅上升，且該上升程度難以肉眼辨識，故推測比例 C、D、E 的還原亮藍試劑難作為血跡檢驗試劑；比例 F 飽和度變化量不大，且各組變化未呈相似趨勢。

綜上四點，作為偵測血跡用亮藍試劑並不合適，故捨棄。

2. 實驗 4-1 替代試劑反應速率-還原靛藍

還原靛藍試劑之不同比例飽和度變化如圖 26。

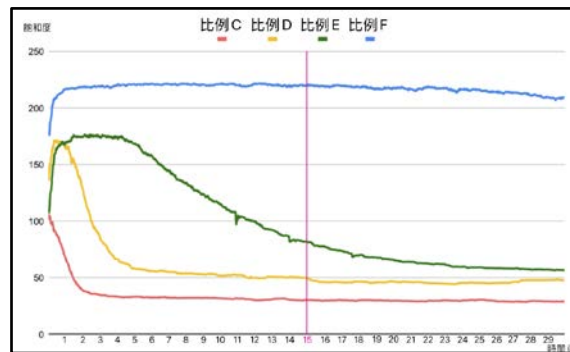


圖 26、還原靛藍試劑反應速率實驗分析圖

比例 A 還原靛藍體積為零，故起始飽和度為零且無飽和度變化；比例 B 之飽和度無法為程式所偵測，肉眼亦難以判讀；比例 C 及比例 D 的飽和度分別在 2 秒、3 秒內劇烈下降；比例 F 之圖形平緩，飽和度無明顯變化。

3. 實驗 4-2 還原靛藍試劑偵測極限

陽性指標為 15 秒內變色。還原靛藍試劑於比例 G、J、Q、V、Z 之偵測極限實驗之飽和度變化如圖 27~31，所有判讀結果整理於表 12。

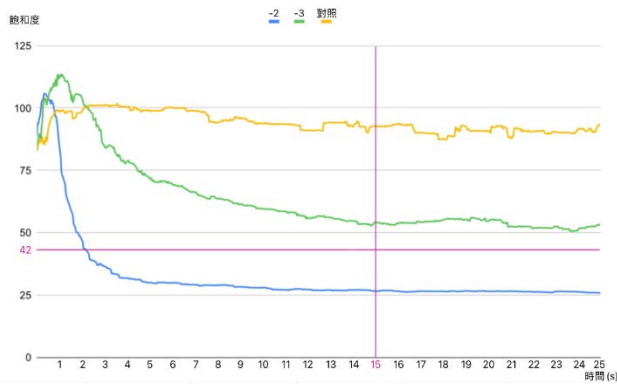


圖 27、還原靛藍試劑比例 G 偵測極限分析圖。

試劑偵測 10^{-2} 的假血時產生劇烈的飽和度變化且與蒸餾水的飽和度差達到 60 以上，有肉眼可見的明顯變化，判定為陽性；試劑對 10^{-3} 的假血產生的飽和度變化較小，與蒸餾水的飽和度差小於 50，肉眼難以判讀出明顯差異，判定陰性。

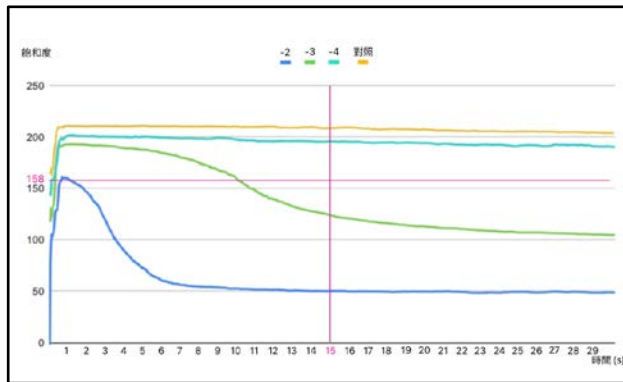


圖 28、還原靛藍試劑比例 J 偵測極限分析圖。

試劑偵測 10^{-2} 的假血時產生劇烈的飽和度變化且與蒸餾水的飽和度差大於 100，視為陽性；試劑對 10^{-3} 的假血產生的飽和度變化較小，但與蒸餾水的飽和度差大於 50，視為陽性；試劑對 10^{-4} 的假血產生的飽和度變化較小，且與蒸餾水的飽和度差距極小，視為陰性。

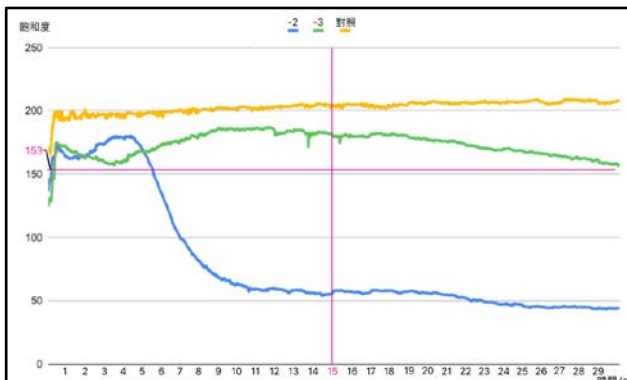


圖 29、還原靛藍試劑比例 Q 偵測極限分析圖

試劑偵測 10^{-2} 的假血時產生劇烈的飽和度變化且與蒸餾水的飽和度差大於 50，視為陽性；試劑對 10^{-3} 的假血產生的飽和度變化較小，與蒸餾水的飽和度差小於 50，視為陰性；試劑在檢測假血時會造成短暫（3 秒）或較長時間(8 秒)飽和度上升，對應還原靛藍試劑之顏色變化為原試劑顏色轉變為咖啡色。

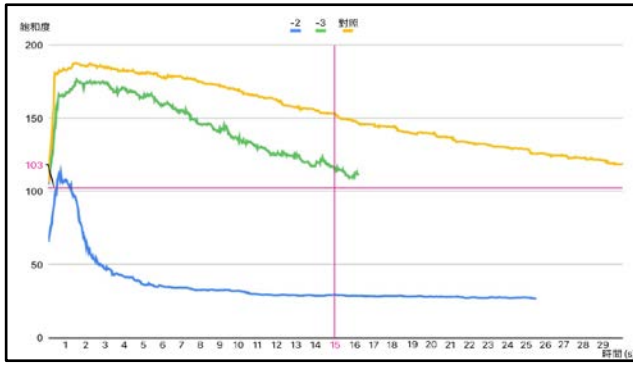


圖 30、還原靛藍試劑比例 V 偵測極限分析

圖。

試劑偵測 10^{-2} 的假血時產生劇烈的飽和度變化且與蒸餾水的飽和度差大於 50，視為陽性；試劑對 10^{-3} 的假血產生的飽和度變化較小，與蒸餾水的飽和度差小於 50，視為陰性；比例 V 於蒸餾水的對照實驗，飽和度較其他實驗有更明顯下降趨勢，雖降幅均小於含假血樣本，但有較高機會產生偽陽性反應。

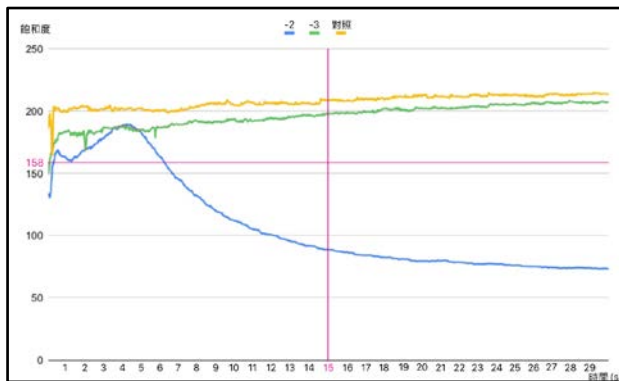


圖 31、還原靛藍試劑比例 Z 偵測極限分析圖。

試劑偵測 10^{-2} 的假血時產生劇烈的飽和度變化且與蒸餾水的飽和度差大於 50，視為陽性；試劑對 10^{-3} 的假血產生的飽和度變化較小，與蒸餾水的飽和度差小於 25，視為陰性；試劑在檢測 10^{-2} 假血時呈現短暫（3 秒）的飽和度上升，對應還原靛藍試劑之顏色變化為原試劑顏色轉變為咖啡色。

表 12、還原靛藍試劑偵測極限結果整理。表來源、研究者繪製。

還原靛藍濃度		雙氧水濃度						
		0.3%	0.4%	0.5%	0.6%	1%	1.5%	3%
1:1.5:2.5 (mL)	4%	-2				△	△	△
	2%	-3	G	△*	△	△	△*	△*
	1%	-2				-2	△	△
還原靛藍濃度		雙氧水濃度						
		0.3%	0.4%	0.5%	0.6%	1%	1.5%	3%
1.5:1:2.5 (mL)	4%	-2				-2	-2	△
	2%	-2*				-2*	-2*	△*
	1%	-2				-2	-2	△

G:與血跡反應後停留於綠色

△:無法偵測

-n:可偵測血跡濃度極限

*表推測之結果

4. 實驗 4-3 偽陽性反應

此比例下還原靛藍試劑偵測次氯酸鈉時產生劇烈的飽和度變化，且與蒸餾水的飽和度差大於 50，可判定為陽性反應，故次氯酸鈉溶液產生偽陽性，而對過碳酸鈉則無。飽和度變化如圖 32，判讀結果整理於表 13。

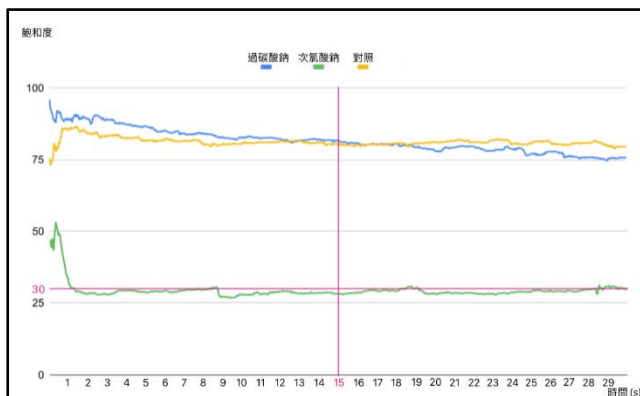


表 13、還原靛藍試劑比例 J 結果

	過碳酸鉀 (白鴿牌)	次氯酸鈉 (白蘭牌)
還原靛藍 比例 J	X	O

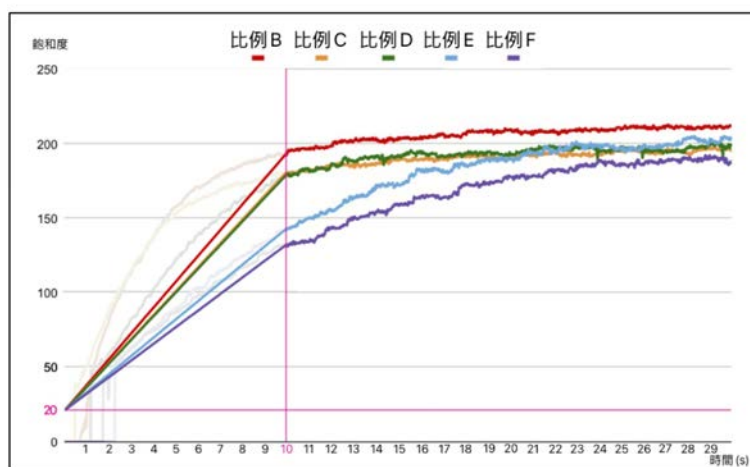
O 代表陽性、X:代表陰性

圖 32、還原靛藍試劑比例 J 偽陽性分析

伍、討論

(一) KM 試劑製備與反應速率比例與偵測極限比例

分析 KM 試劑實驗結果(如圖 33)後，我們發現在 3 至 10 秒間比例 E 與比例 F 的斜率較小，單位時間內的飽和度變化量較不明顯，不利於結果的判讀，故捨棄此兩種比例。剩餘三者中比例 C 與 D 在陽性指標(10 秒)時飽和度有較相近數值，考量陽性指標的訂定應以精確、小範圍為佳，我們取比例 C 與 D 進行後續偵測極限實驗(兩者比較整理於下表 14)。



*以飽和度20表示0秒時的透明狀態

圖 33、KM 試劑反應速率實驗分析圖(含割線)。

表 14、KM 試劑比例 C 與比例 D 特色比較。表來源、研究者繪製。

	比例 C	比例 D
飽和度	飽和度變化較小，恐不利判讀	飽和度變化較大，有利於判讀
割線斜率絕對值	斜率較大，表示反應速率較快	斜率較小，表示反應速率較慢

接著在 KM 試劑偵測極限實驗中，我們觀察到比例 C、D 皆可對濃度為 10^{-4} 的血跡樣品呈現陽性反應，唯比例 C 在五組數據中有一組出現偽陰性，顯示其在該濃度下無法 100% 偵測出血液存在，故取靈敏度較高之比例 D 進行後續偽陽性實驗。

(二) 還原靛藍試劑製備的顏色轉變推論

參考酚酞的配方與變色過程，並依照實驗 3-1 的結果，我們原先的猜測為還原靛藍於強鹼下呈現黃色(圖 34 示意圖 1)，經還原變回藍色。實際實驗觀察到的現象卻為：靛藍溶液原為藍色，加入氫氧化鉀後變為黃色，加入鋅粉後變為紅色(圖 34 示意圖 2)。

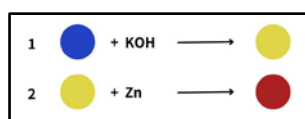


圖 34、還原靛藍試劑在不同狀態時的顏色變化示意圖。圖來源、研究者繪製。

所以我們推測在加入氫氧化鉀時，產生靛藍(indigo)在 $\text{pH} > 11$ 時變為靛白(leucoindigo)的反應，相關結構與對應之 pH 值如(圖 35)，因此可以觀察到溶液顏色由藍色變為黃色。靛白也是靛藍氧化之產物，或稱為氧化靛藍。另外實驗 3-1 製備的靛藍水溶液經數月放置後，也觀察到溶液由藍轉變為黃棕色(圖 36)，顯示靛藍溶液若保存不當，也可能氧化產生靛白使溶液顏色改變。

鹼性靛藍溶液(黃色)加入鋅粉後的紅色產物可能為靛玉紅(indirubin)。靛藍與靛玉紅皆為吲哚酚(indoxyl)的氧化物，結構於下圖 37，由於兩者互為同分異構物，所以我們推測在此條件下加入鋅粉，不只能促使靛白還原成靛藍，靛藍還會發生結構轉變產生靛玉紅，進而生成使溶液呈現紅色。

雖然我們在製備還原靛藍試劑時並未在加入鋅粉後肉眼看到藍色的出現，但我們認為加入鋅粉後，靛藍的變化有兩種可能途徑：靛白還原成靛玉紅(顏色由黃轉紅)或靛白還原成靛藍，而靛藍迅速地變為靛玉紅(顏色由黃轉紅)。

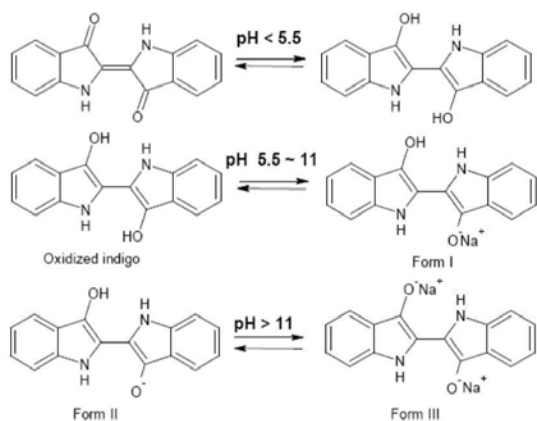


圖 35、不同 pH 值下靛藍的不同結構。圖來源、DYEING NYLON WITH INDIGO IN VARIOUS PH REGIONS。

圖 36、靛藍溶液氧化。圖來源、研究者拍攝。

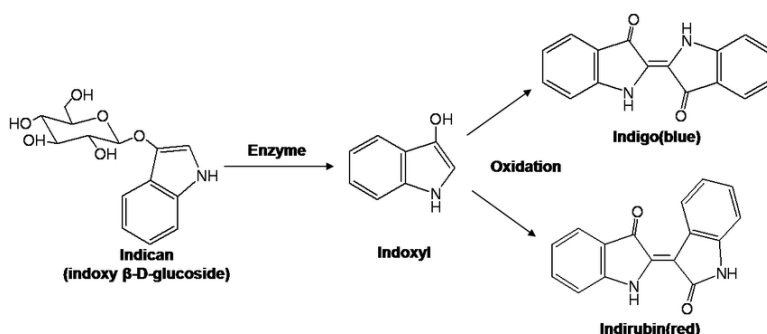


圖 37、靛藍與靛玉紅之形成。

圖來源、Process Balance of Natural Indigo Production based on Traditional Niram Method。Researchgate。

(三) 還原靛藍試劑

針對不同比例之還原靛藍試劑實驗結果，可以觀察到比例 F 之飽和度幾乎沒有變化，比例 E 之飽和度則變化較小，為了探討還原靛藍試劑各比例的飽和度變化速率，我們以飽最大飽和度向 0 秒延伸水平線，並以其值作為 0 秒時試劑的飽和度，見圖 38，若某比例在 15 秒前已趨近於某一定值，則以通過達該值的飽和度作為割線，而比例 C 以及比例 D 之還原靛藍試劑在 2~3 秒內飽和度劇烈下降、15 秒時數值較對照組有明顯差異，且肉眼可觀察到顏色變化等特點。

再來，以割線斜率絕對值做為 15 秒內之平均反應速率數值大小的判讀依據，可以發現比例 D 平均反應速率最快近似比例 C，四種比例之飽和度特性整理如下(表 15)。最終選用飽和度變化較快且明顯、能以肉眼觀察到顏色變化的比例 C 以及比例 D，進行後續還原靛藍試劑偵測極限實驗。

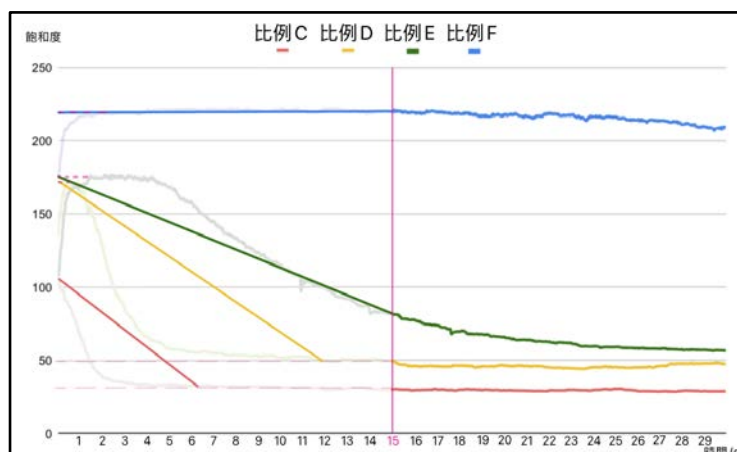


圖 38、還原靛藍試劑反應速率實驗分析圖(含割線)。

表 15、不同比例之還原靛藍試劑比例反應速率結果比較。表來源、研究者繪製

	割線斜率絕對值	判讀狀況
比例 C	近似於比例 D	變色快速、飽和度數值變化明顯，且能以肉眼察覺到顏色變化。
比例 D	近似於比例 C	變色快速、飽和度數值變化明顯，且能以肉眼察覺到顏色變化。
比例 E	次小	變色較慢，10 秒內飽和度降幅較小，需近 30 秒才降至與比例相同程度，增加發生偽陽性的可能。
比例 F	最小	無法判讀

(四) KM 試劑與自製還原靛藍試劑之偵測極限

在 KM 試劑之比例 D 與比例 C 之偵測極限實驗中，發現比例 D 表現較佳，顯示於該比例下 KM 試劑靈敏度較高，我們推測原因受酚酞占總試劑比例影響，提高濃度促使反應加速，使低濃度血跡樣品能在時限內達到陽性飽和度指標。

因為欲使自製還原靛藍試劑達到與 KM 試劑相同的偵測極限，我們先按照原配方 1% 靛藍、0.3% 雙氧水進行實驗，而後發現還原靛藍試劑的偵測極限不如 KM 試劑，便嘗試以兩個方面進行改良，分別是固定靛藍濃度、提高雙氧水濃度，以及固定雙氧水濃度，提高還原靛藍濃度，以找出靈敏度更佳的還原靛藍試劑比例。

最後我們根據還原靛藍與雙氧水兩者濃度變化，進行實驗後做數據處理後，發現還原靛藍於試劑中之含量與雙氧水於試劑中之含量的比值相同的時，實驗結

果並不完全相同(見圖 39)，且雙氧水在整個試劑中的濃度與反應速率沒有一定的關係(見圖 40)，故無法推得反應速率與偵測極限的關係，而還原靛藍在整個試劑中的濃度相同的時候，還原靛藍於試劑中之含量與雙氧水於試劑中之含量的比值越小，反應速率越快(見圖 41)。

比例	還原靛藍(mL)	還原靛藍濃度	雙氧水濃度	靛/雙 比值	實驗結果
比例K	1	2%	0.40%	2	B
比例D	1.5	1%	0.30%	2	-2
比例Z	1.5	4%	1.50%	1.6	-2
比例R	1	4%	1%	1.6	X
比例L	1	2%	0.50%	1.6	X
比例M	1	2%	0.60%	1.333333333	X
比例C	1	1%	0.30%	1.333333333	-2
比例AA	1.5	4%	3%	0.8	X
比例N	1	2%	1.00%	0.8	X
比例T	1	4%	3%	0.533333333	X
比例O	1	2%	1.50%	0.533333333	X
比例V	1.5	1%	1.50%	0.4	-2
比例G	1	1%	1%	0.4	-2
比例P	1	2%	3.00%	0.266666667	X
比例H	1	1%	1.50%	0.266666667	X

圖 39、還原靛藍試劑偵測極限實驗數據處理圖。

比例	還原靛藍(mL)	還原靛藍濃度	雙氧水濃度	雙氧水在整個試劑中的濃度	靛/雙 比值	實驗結果
比例AA	1.5	4%	3%	1.50%	0.8	X
比例T	1	4%	3%	1.50%	0.533333333	X
比例P	1	2%	3.00%	1.50%	0.266666667	X
比例W	1.5	1%	3%	1.50%	0.2	X
比例I	1	1%	3%	1.50%	0.133333333	X
比例Z	1.5	4%	1.50%	0.75%	1.6	-2
比例S	1	4%	1.50%	0.75%	1.066666667	X
比例O	1	2%	1.50%	0.75%	0.533333333	X
比例V	1.5	1%	1.50%	0.75%	0.4	-2
比例H	1	1%	1.50%	0.75%	0.266666667	X
比例Y	1.5	4%	1%	0.50%	2.4	-2
比例R	1	4%	1%	0.50%	1.6	X
比例N	1	2%	1.00%	0.50%	0.8	X
比例U	1.5	1%	1%	0.50%	0.6	-2
比例G	1	1%	1%	0.50%	0.4	-2
比例X	1.5	4%	0.30%	0.15%	8	-2
比例Q	1	4%	0.30%	0.15%	5.333333333	-2
比例J	1	2%	0.30%	0.15%	2.666666667	-3
比例D	1.5	1%	0.30%	0.15%	2	-2
比例C	1	1%	0.30%	0.15%	1.333333333	-2

圖 40、還原靛藍試劑偵測極限實驗數據處理圖。

據處理圖。圖來源、研究者拍攝。

圖來源、研究者拍攝。

比例	還原靛藍(mL)	還原靛藍濃度	雙氧水濃度	靛藍在整個試劑中的濃度	靛/雙 比值	實驗結果
比例X	1.5	4%	0.30%	1.20%	8	慢
比例Y	1.5	4%	1%	1.20%	2.4	反應速率
比例Z	1.5	4%	1.50%	1.20%	1.6	-2
比例AA	1.5	4%	3%	1.20%	0.8	快
比例Q	1	4%	0.30%	0.80%	5.333333333	-2
比例R	1	4%	1%	0.80%	1.6	X
比例S	1	4%	1.50%	0.80%	1.066666667	X
比例T	1	4%	3%	0.80%	0.533333333	X
比例J	1	2%	0.30%	0.40%	2.666666667	-3
比例K	1	2%	0.40%	0.40%	2	B
比例L	1	2%	0.50%	0.40%	1.6	X
比例M	1	2%	0.60%	0.40%	1.333333333	X
比例N	1	2%	1.00%	0.40%	0.8	X
比例O	1	2%	1.50%	0.40%	0.533333333	X
比例P	1	2%	3.00%	0.40%	0.266666667	X
比例D	1.5	1%	0.30%	0.30%	2	-2
比例U	1.5	1%	1%	0.30%	0.6	-2
比例V	1.5	1%	1.50%	0.30%	0.4	-2
比例W	1.5	1%	3%	0.30%	0.2	X
比例C	1	1%	0.30%	0.20%	1.333333333	-2
比例G	1	1%	1%	0.20%	0.4	-2
比例H	1	1%	1.50%	0.20%	0.266666667	X
比例I	1	1%	3%	0.20%	0.133333333	X

圖 41、還原靛藍試劑偵測極限實驗數據處理圖。圖來源、研究者拍攝。

(五) 偽陽性反應

在實驗中，我們取用兩種分別含有次氯酸鈉及過硼酸鈉之市售漂白水，並依據瓶身「清洗頑強污漬（含血跡）」之比例配得藥劑，模擬犯罪現場被漂白水清洗後，可能產生偽陽性的環境。

最終實驗結果顯示不論 KM 試劑或是還原靛藍試劑，均會對次氯酸鈉漂白水有陽性之顏色變化，對過硼酸鈉漂白水則無，表示前者有偽陽性反應之可能。即採樣的案發現場若經過次氯酸鈉漂白水洗刷，將混淆樣品採檢之準確度。

過硼酸鈉雖未產生偽陽性，但其本身也是氧化劑，故推測可能是在該清潔濃度下，過碳酸鈉含量不足所以氧化的效果不佳，導致難以肉眼觀察到 KM 試劑以及還原靛藍試劑變色。

(六) KM 試劑與還原靛藍試劑綜合比較

根據研究結果，還原靛藍確實能做為血跡檢測之試劑，其陽性顏色變化由紅色轉為黃色或無色，飽和度則隨條件不同有持續下降，或先升後降之兩種趨勢。

另外，相較於 KM 試劑之還原酚酞製備過程中，於添加鋅粉後，需長時間加熱煮製才能變色，還原靛藍試劑之還原靛藍的製備更加迅速，幾乎於混入鋅粉後立刻發生肉眼可見之顏色變化，可大幅度降低試劑製備的時間。但該試劑保存期限較短，且偵測極限較 KM 試劑稍差，為還原靛藍替代 KM 試劑的不利因素。兩試劑之綜合比較如下表 16。

表 16、試劑綜合比較表。表來源、研究者繪製。

	價格	偵測極限	陽性顏色變化	偽陽性*	保存期限	製程耗時
還原靛藍試劑	低	10^{-3}	紅色→黃色或無色	有	短	短
還原酚酞試劑	高	10^{-4}	無色→洋紅	有	長	長

*僅對含次氯酸鈉之白鴿漂白水有偽陽性反應

由於靛藍即是食用色素藍色 2 號，可於化工行或食品材料行購得大包裝藥品，所需成本較低，雖不利保存但製備過程迅速，所以我們認為可以採用與還原酚酞不同的保存方式，例如製備後不進行過濾，而直接將還原靛藍與鋅粉的混合物共同保存，減少發生變質的可能。

(七) 血跡檢測相關實務訪問紀錄

針對相關研究結果與實務層面的應用，我們就血跡採樣工具、KM 試劑對血跡之破壞程度、在實務上用以辨認偽陽性反應的方法等三個問題，訪問具有現場經驗之鑑識人員，並記錄於下：

1. 現場會使用什麼樣的血跡採樣用具，操作方式是？

在一般情況下的血跡採樣皆是使用棉棒，因其價格低且易取得，實作時先以去離子水潤濕棉棒再進行採樣，不過若血跡較稀少亦會考慮使用尼龍棒，其價格較高但與棉棒相比洗脫更為容易。

2. 現場的血跡若經過 KM 試劑實行血跡檢測，還能做 DNA 鑑定嗎？

國內目前沒有將 KM 試劑血跡檢測過的血跡樣本，進行 DNA 鑑定比對的實驗，因 KM 試劑本身為強鹼物質，有損害 DNA 之虞。不過亦有國外文獻認為 KM 試劑進行血跡檢測，對血跡樣品本身影響不大，針對這點可能須進一步實驗再討論。

3. 實務上如何辨認或避免偽陽性判讀？

刑事人員實際在案發現場進行血跡檢測時，不會於一開始就將還原酚酞與雙氧水混合，而是先滴入還原酚酞等待數秒，確認沒有試劑變色後才滴加雙氧水。若待測物本身為氧化劑，則滴入還原酚酞時就會變色，此時變色即視為偽陽性反應；若待測物含過氧化氫酶(例如血液中的血紅素)，需加入雙氧水才發生顏色變化。

陸、結論

(一) 還原酚酞製備 KM 試劑檢測：

1. 於 1% 樣品中，10 秒內飽和度變化量為比例 B>比例 C≈比例 D>比例 E>比例 F。
2. 偵測極限以比例 C 與 D 最佳，濃度可達假血原液稀釋至 10^{-4} ，但僅比例 D 可 100% 檢測出陽性，比例 C 有偽陰性可能。
3. 比例 D 於偽陽性反應檢測中，對次氯酸鈉漂白水稀釋液呈現偽陽性

(二) 仿照還原酚酞步驟製備出之還原亮藍試劑，不論採用何種比例，滴加於 1% 血跡樣品後飽和度變化量均極小，且各次實驗結果均相差頗大，顯示自製還原亮藍無法作為血跡檢驗試劑。

(三) 仿照還原酚酞步驟製備出之還原靛藍試劑，顏色呈現紅色，且滴於 1% 血跡樣品多數有顏色變化，表示自製還原靛藍試劑可以作為血跡檢測替代試劑。

(四) 自製還原靛藍試劑檢測：

1. 陽性反應之判讀：在一定秒數內試劑由紅色退至黃色或無色，能以肉眼觀察到明顯顏色變化，且飽和度有明顯下降。
2. 各調配比例之還原靛藍試劑，加入 1% 樣品後以比例 C、D 之飽和度在 15 秒內發生變化最大，比例 E 在 30 秒內發生明顯變化，比例 F 則無明顯變化。
3. 偵測極限比例 J 最佳，濃度達原液稀釋至 10^{-3} ，實驗過程 100% 檢測出陽性。
4. 比例 J 之還原靛藍試劑於偽陽性反應檢測中，對次氯酸鈉漂白水稀釋液呈現出偽陽性反應。

柒、未來展望

通過本研究我們發現自製還原靛藍具有製備快速、成本低廉，且肉眼可判讀出明顯顏色變化等特點，可作為血跡檢測替代試劑。若能針對試劑儲存方式、配方調整或確認其產物與反應途徑進行研究，優化試劑保存並使檢測靈敏度達現行 KM 試劑之水準，有望搭配現行 KM 試劑，作為可針對不同現場應用之血跡檢測試劑。

捌、參考文獻資料

1. 台灣法醫學誌；5卷1期(2013/06/01)，P28-40 血液鑑別方法及 DNA 鑑定系統靈敏度之評估
2. 徐嘉駿、周素蓮、楊秋和與白崇彥(2011)。KM 靈敏度與顏色外觀狀似血液(斑)物質之特異性檢測。刑事科學，201103，17-27。
3. 長庚科技大學環境安全衛生室。常見的氧化劑。
<https://safety.cgust.edu.tw/var/file/18/1018/img/72/221096782.pdf>
4. 陳鴻仁(2018)。化學鑑識-血跡的檢測。科學探究 MIT-化學，10，1-6。
https://www.ltedu.com.tw/Web/Upload/Upload_File/Source13/%E5%88%8A%E7%89%A9%E5%8C%96%E5%AD%B8%E9%91%91%E8%AD%98%EF%BC%8D%E8%A1%80%E8%B7%A1%E7%9A%84%E6%AA%A2%E6%B8%AC.pdf
5. 陳旻玓(2021)。鑑識科學。
<https://ghresource.mt.ntnu.edu.tw/uploads/1637740557008Vib1Wmo1.pdf>
6. 廖旭茂、陳熾竹、羅珮綺、林芳瑜(2015年6月30號)。探究「紅綠燈」示範實驗的多彩顏色。台灣化學教育。<http://chemed.chemistry.org.tw/?p=7857>
7. Baig, G. A. (2010). Dyeing nylon with indigo in various pH regions. *AUTEX research Journal*, 10, 21-25.
<http://www.dibanas.ir/fa/images/pdf/Nylon/DYEING-NYLON-WITH-INDIGO-IN-VARIOUS-PH-REGIONS.pdf>
8. Brilliant Blue FCF.
PubChem.<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/19700#section=LogP>
9. Indigo Carmine. PubChem.<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/19700#section=LogP>
10. ISHI (2014) PRESUMPTIVE DETECTION OF BLOOD BY LEUCOMALACHITE GREEN ,phoenix,AZ · SEP.29-OCT.02,2014
<https://s3.amazonaws.com/media.guidebook.com/upload/22658/extra/2ISHI.A1Leucomalachitegreenv2.pdf>
11. Kerr, D. A. (2010). The CIE XYZ and xyY color spaces. *Colorimetry*, 1(1), 1-16.
12. Palus, H. (1998). Representations of colour images in different colour spaces. *The Colour image processing handbook*, 67-90.
13. DiCarlo, A. M., & Jasra, S. K. (2016). A qualitative evaluation of the effects cleaning products have on the Bluestar test for latent blood. *Journal of Emerging Forensic Sciences Research*, 1(1), 48-60.

【評語】 052408

目前血跡檢測多用 KM 試劑，本研究探討以「還原靛藍試劑」取代之可能性，具創新性。製備不同組成的混合物(還原靛藍:酒精:雙氧水)，觀察其與假血(血基質)之反應；透過色澤飽和度分析結果，尋找最佳組成。該作法成本低，且更容易透過肉眼判讀(呈現黃色反應，而非 KM 之粉紅色反應)。研究內容有關氧化還原變色試劑種類、變色機制及色彩空間等說明清晰完整，採用 RGB 與 HSV 色彩空間錄製與分析影片，研究內容與步驟具科學精神，研究成果具新穎性與應用價值。

作品海報

壹、摘要

血跡試劑通常利用氧化還原反應檢測樣品當中之血紅素，現行KM試劑成分為還原酚酞，陽性判讀為無色變為粉紅。因呈色易與血液混淆，本研究改用Python、OpenCV、numpy進行試劑呈色之飽和度輔助分析，並取食用色素靛藍、亮藍自製血跡檢測試劑。結果顯示還原靛藍可作為替代試劑，陽性判讀為紅色褪為黃色或無色，在反應速率測試中，還原酚酞與酒精以體積1.5:1混合表現最佳；還原靛藍與酒精以1:1.5混合試劑則有最佳靈敏度，偵測極限分別可到達血跡樣品濃度 10^{-4} 與 10^{-3} 。

貳、研究目的

- (一) 以Python、OpenCV、numpy改良血跡呈色試驗判讀
- (二) 探討卡斯特-梅爾呈色試劑的反應速率、試劑靈敏度與偽陽性現象
- (三) 尋找傳統血跡推定試劑中酚酞的替代藥品
- (四) 探討替代藥品之可行性與反應速率、試劑靈敏度及偽陽性現象

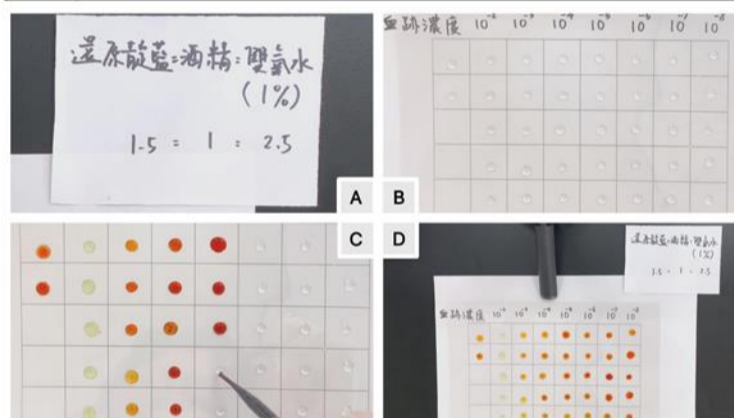
參、研究流程與方法

一、研究試劑與樣品準備

還原酚酞	將酚酞、KOH、Zn粉末、蒸餾水混合於燒杯並加熱攪拌至顏色褪去，過濾而得。後簡稱(1%)還原酚酞。
還原靛/亮	參考酚酞配方進行製備。
檢測試劑	將上述還原態酚酞、靛藍、亮藍，與雙氧水及95%酒精依設計配方混合製成試劑。
血跡樣品	以市售訓練用合成血液做為原液。

二、血跡檢測流程

編號	說明
A	註明試劑、濃度及樣品名稱
B	滴入1滴欲偵測之樣品
C	開始錄影，滴管取試劑滴1滴於透明投影片方格內
D	最後一滴試劑滴入後30秒停止錄影



以程式輔助計算影片各幀之平均飽和度(範圍: 0~255)

1. 導入影片、寫入程式並運行(見左上圖)
2. 以劃塊尋找欲分析物的HSV參數
3. 將HSV參數填入橘色部分
4. 取消紅色部分的註解(刪除#)並將藍色部分註解(加#)
5. 運行程式並將結果複製至google試算表
6. 重複步驟1~5，待影片均分析完後製成圖表

肆、研究結果

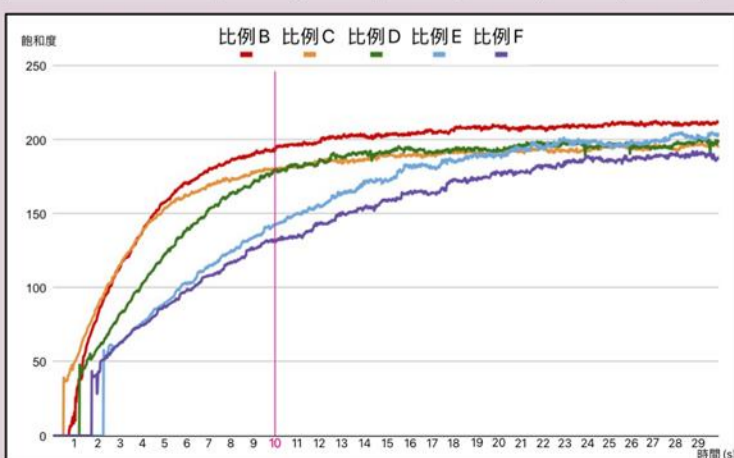
實驗1-1 還原酚酞的製備

還原酚酞配方與顏色：1克酚酞、16克氫氧化鉀、20克鋅粉、100毫升蒸餾水。100.27克重量百分濃度約1%，簡稱還原酚酞。

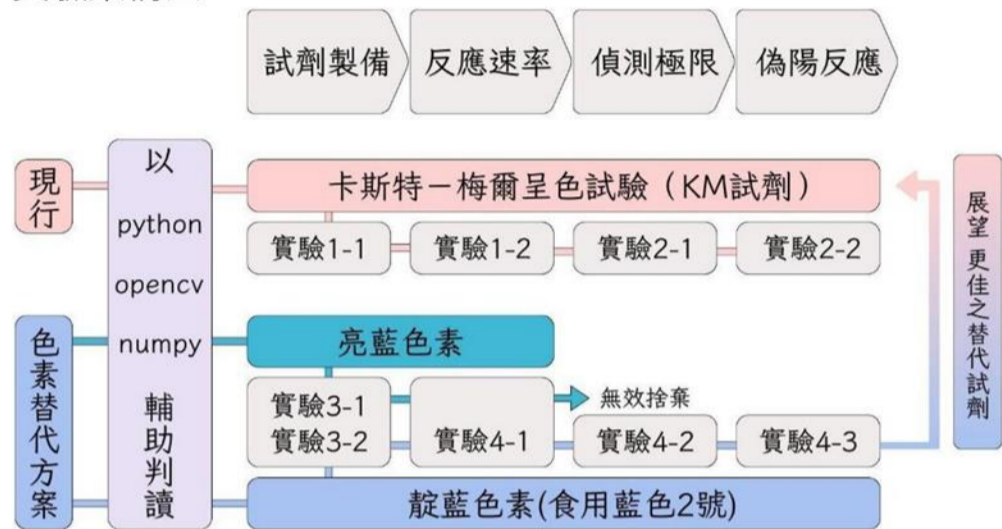
實驗1-2 KM試劑反應速率

陽性指標：10秒內變色。

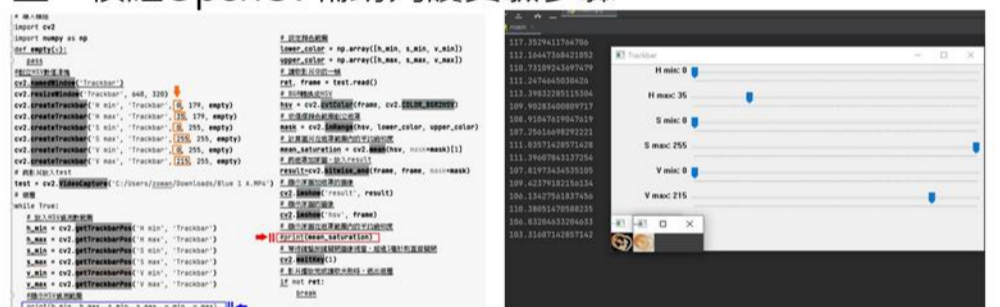
	比例A	比例B	比例C	比例D	比例E	比例F
還原酚酞(mL)	0	0.5	1	1.5	2	2.5
95%酒精(mL)	2.5	2	1.5	1	0.5	0
0.3%雙氧水(mL)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5



實驗架構圖



三、模組OpenCV輔助判讀實驗步驟



▲計算欲分析物平均飽和度之程式

▲移動劃塊尋找遮罩的HSV參數

Frame	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X	Y	Z	
1	117.262842	98.384362	108.858137	103.701807	73.515735	142.236474	120.893609	101.677107	143.098235	158.270270	121.704730	129.093005	103.790244	102.957814	115.020994	121.540278	122.588774	128.790264	128.508774	128.508774	128.508774	128.508774	128.508774	128.508774	128.508774	128.508774	128.508774

▲還原靛藍平均飽和度部分數據截圖

實驗3-1 色素在不同pH值呈色狀況

OH ⁻ 濃度(M)	4	3	2	1	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
亮藍	水藍	水藍	水藍	亮藍	亮藍	深藍	深藍	深藍	深藍
靛藍	黃	黃	黃	黃	黃	水藍	水藍	水藍	水藍



▲亮藍呈色(濃度左而右遞減) ▲靛藍呈色(濃度左而右遞減)

由酚酞結果推測氧化前後若有顏色變化，則可作為血跡試劑。此實驗顯示亮藍、靛藍色素皆有顏色變化，其中靛藍色素隨pH值轉變顏色的情形更加明顯。

實驗3-2 還原態靛藍與亮藍的製備

還原亮藍配方與顏色：參考酚酞配方，溶液呈紅褐色，總重101.07克。含亮藍1克，重量百分濃度約1%，簡稱還原亮藍。還原靛藍配方與顏色：參考酚酞配方，溶液呈深紅色，總重103.29克。含靛藍1克，重量百分濃度約1%，簡稱還原靛藍。

實驗4-1 替代試劑反應速率-還原靛藍

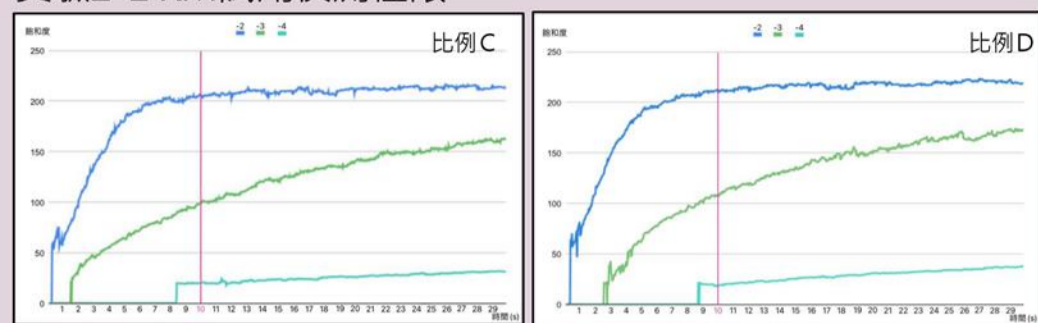
	比例B	比例C	比例D	比例E	比例F
還原靛藍(mL)	0.5	1	1.5	2	2.5
95%酒精(mL)	2	1.5	1	0.5	0
0.3%雙氧水(mL)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5

固定雙氧水為2.5毫升、還原酚酞與酒精混合液為2.5毫升，調整還原靛藍於試劑中比例自0毫升逐次遞增0.5毫升直至2.5毫升；酒精則反之，依照上述步驟完成左表比例A~F的試劑。

左右側裁切空間

比例A還原酚酞體積為零，故無飽和度變化。10秒內飽和度變化量為比例B>比例C≈比例D>比例E>比例F，比例B、C、D的飽和度變化量最明顯，又以比例B、C在4秒內的飽和度相近，比例C、比例D在10秒後的飽和度相近。

實驗2-1 KM試劑偵測極限

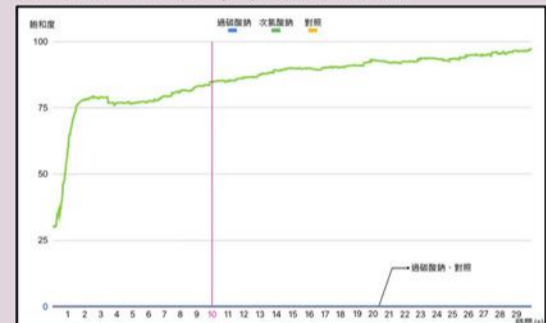


比例/血跡濃度	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷
比例C	○	○	○*	x	x	x
比例D	○	○	○	x	x	x

○表示陽性 x表示陰性 *表示試劑有偽陰性可能

比例C在偵測血跡濃度為10⁻⁴的實驗中，五組數據之一呈現偽陰性，故推測比例C的偵測極限僅達血跡濃度10⁻³，且無法判定比例C能否準確偵測更低濃度的血跡樣品。比例D的偵測極限可達血跡濃度10⁻⁴。

實驗2-2 KM試劑偽陽性



漂白水屬於家中最易取得之氧化劑，亦是我們認為案件現場最常出現並且影響試驗準確性的材料

	過碳酸鈉	次氯酸鈉
KM試劑(比例D)	x	○

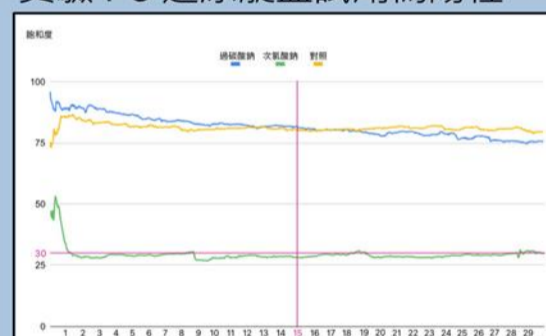
○表示陽性 x表示陰性
▲KM試劑的比例D對次氯酸鈉產生偽陽性

還原靛藍試劑偵測極限部分結果整理

比例/血跡濃度	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	備註
比例G	○	x	x	
比例Q	○	x	x	檢測假血時會造成短暫(第3秒)或較長時間(第8秒)飽和度上升，對應還原靛藍試劑之顏色變化為原試劑顏色轉變為棕色
比例V	○	x	x	對照組飽和度的下降趨勢較其他比例要明顯，雖然降幅均小於含假血樣本，但有較高機會產生偽陽性反應
比例Z	○	x	x	檢測10 ⁻² 假血時呈現短暫(第3秒)的飽和度上升，對應還原靛藍試劑之顏色變化為原試劑顏色轉變為棕色
比例J	○	○	x	

○表示陽性 x表示陰性 ▲還原靛藍試劑比例J的偵測極限可達血跡濃度10⁻³

實驗4-3 還原靛藍試劑偽陽性



還原靛藍試劑對次氯酸鈉時產生劇烈飽和度變化，與蒸餾水的飽和度差大於50，判定為陽性反應，故次氯酸鈉溶液產生偽陽性，而過碳酸鈉則無。

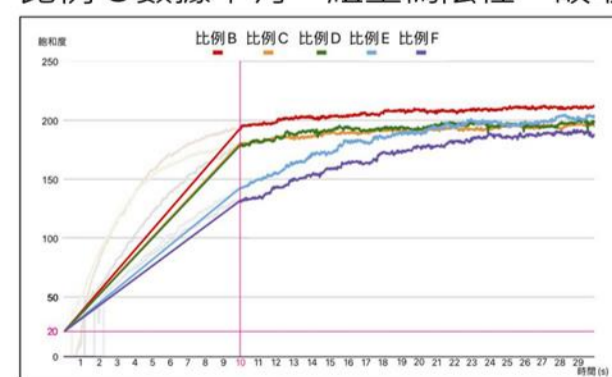
	過碳酸鈉	次氯酸鈉
還原靛(比例J)	x	○

○表示陽性 x表示陰性

伍、討論

(一) KM試劑之反應速率與偵測極限實驗

如圖，在10秒內比例E與F的斜率較小，不易判讀結果，故捨棄。剩餘三者中比例C與D在第10秒時飽和度較相近，考量陽性指標的訂定以精確、小範圍為佳，故取比例C與D進行後續實驗。偵測極限實驗中，比例C、D可對血跡濃度10⁻⁴樣品呈陽性，唯比例C數據中有一組呈偽陰性，故取靈敏度較高之比例D行後續偽陽性實驗。



	比例C	比例D
飽和度變化	前期較劇烈，較利於判讀	前期較和緩，較不利於判讀
割線斜率絕對值	斜率略大，表示平均反應速率略快	斜率略小，表示平均反應速率略慢

▲KM試劑反應速率實驗分析圖(含割線)。其中以飽和度20表示0秒時的透明狀態

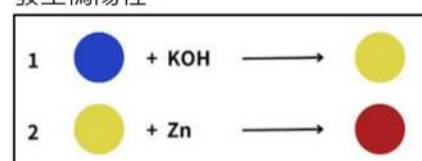
(二) 還原靛藍試劑製備的顏色轉變推論

	靛藍加入氫氧化鉀後	鹼性靛藍(pH>11)加入鋅粉後
推測變化	藍→黃	黃→藍
實際變化	藍→黃	黃→紅
反應推論	靛藍→靛白(氧化靛藍)	1.靛白→靛玉紅(靛藍之同分異構物) 2.靛白→靛藍(短暫存在)→靛玉紅

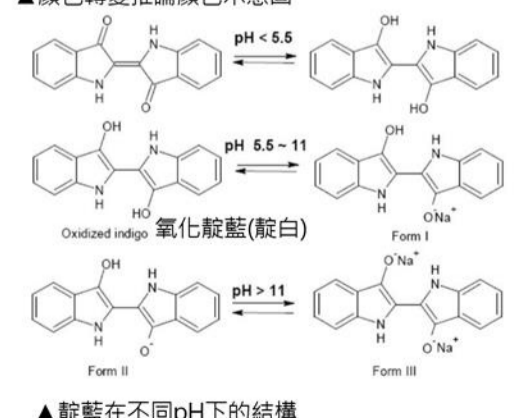
我們參考酚酞的配方與變色過程，並依照實驗3-1的結果推測製備時的顏色變化，但實驗3-2的結果未完全符合推論，參考顏色變化並查找與靛藍結構類似之物質後的反應推論如表所示。在鹼性靛藍加入鋅粉後，推測由黃色的靛白轉為靛玉紅，但在文獻中並未發現直接轉變為靛玉紅的反應，故列入第二種推論，轉為靛藍再轉為靛玉紅的反應



比例C、D的比較如表所示，可知比例C較比例D要容易判讀結果，但也可能較比例D易發生偽陽性。

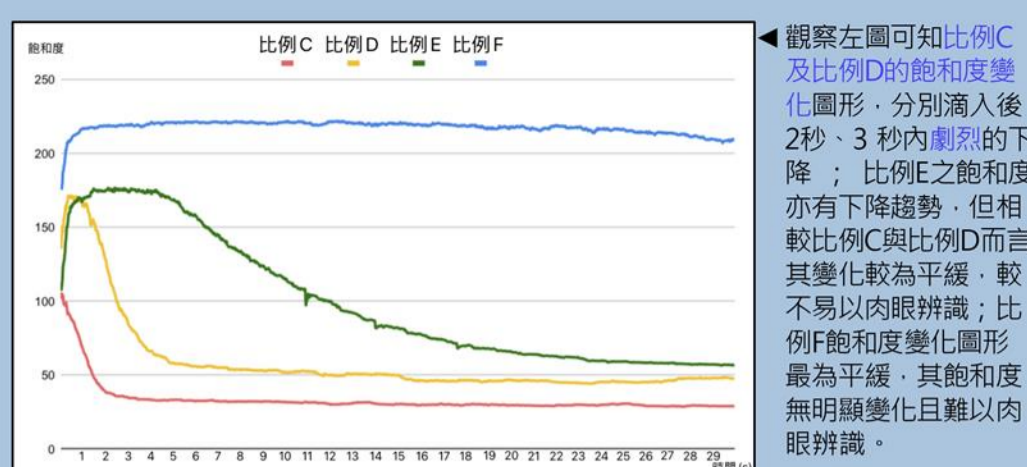


▲顏色轉變推論顏色示意圖



(三) 還原靛藍試劑之反應速率實驗

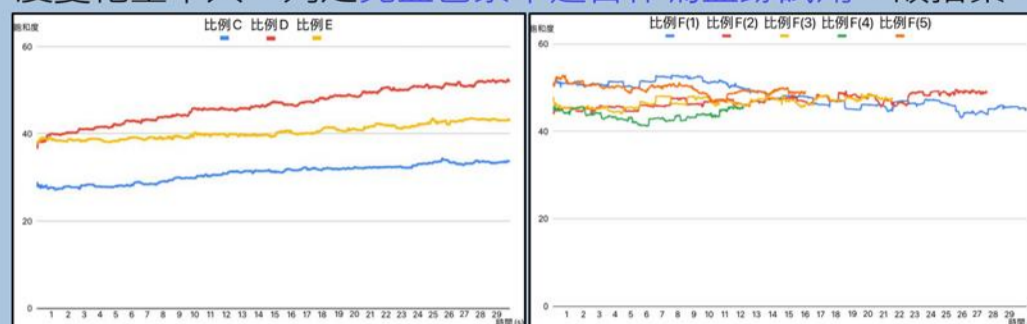
我們以最大飽和度向0秒延伸水平線，並以其值作為0秒時試劑的飽和度。觀察下圖不同比例之還原靛藍試劑實驗結果並分析，最終選用飽和度變化較快且明顯、能以肉眼觀察到顏色變化的比例C以及D進行後續還原靛藍試劑偵測極限實驗。



觀察左圖可知比例C及比例D的飽和度變化圖形，分別滴入後2秒、3秒內劇烈的下降；比例E之飽和度亦有下降趨勢，但相較比例C與比例D而言其變化較為平緩，較不易以肉眼辨識；比例F飽和度變化圖形最為平緩，其飽和度無明顯變化且難以肉眼辨識。

實驗4-1 替代試劑反應速率-還原亮藍

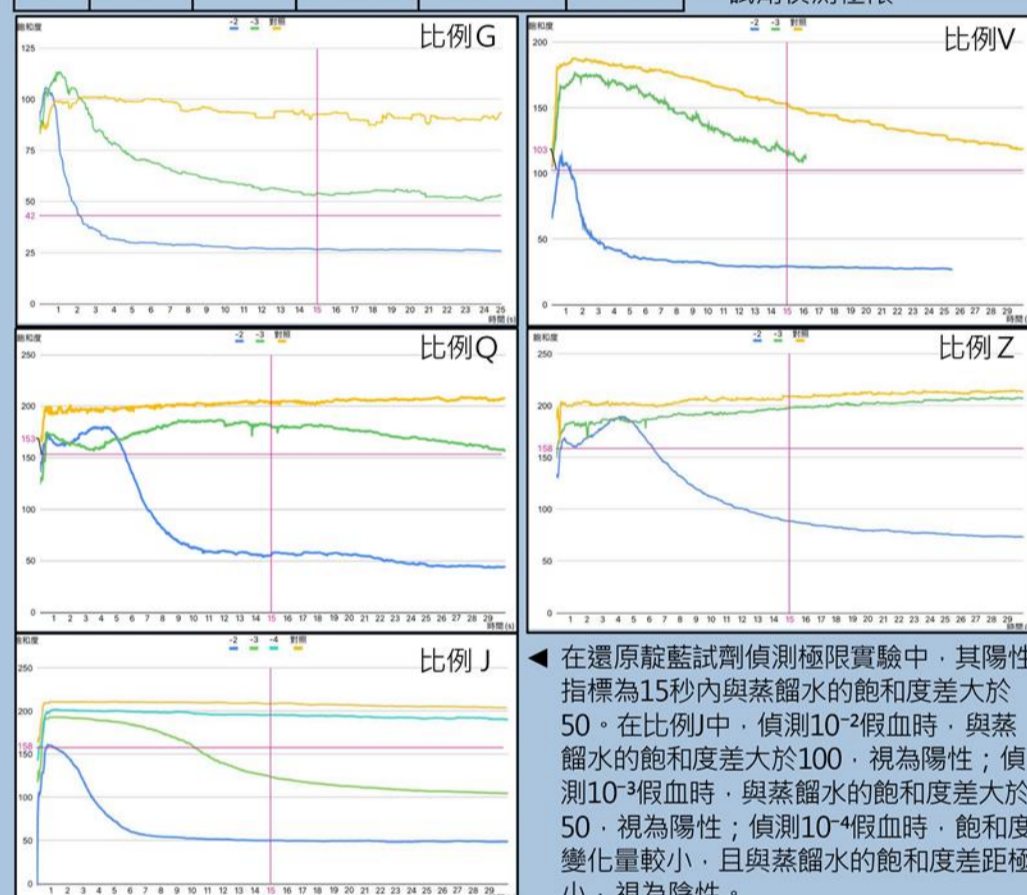
比例C、D、E飽和度微幅上升，但肉眼難以辨識，比例F飽和度變化量不大，判定亮藍色素不適合作為血跡試劑，故捨棄。



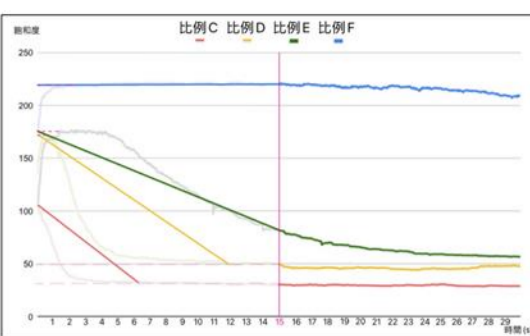
實驗4-2 還原靛藍試劑偵測極限

	還靛(mL)	酒精(mL)	雙氧水(mL)	還原靛藍濃度	雙氧水濃度
比例G	1	15	25	1%	1%
比例V	15	1	25	1%	15%
比例Q	1	15	25	4%	0.3%
比例Z	15	1	25	4%	15%
比例J	1	15	25	2%	0.3%

此實驗最初比照實驗2-1(KM試劑偵測極限)，延續4-1所挑選之比例進行實驗，但其偵測極限均不及KM試劑，故調整雙氧水濃度(以關鍵比例G、V說明)，與還原靛藍濃度(以關鍵比例Q、Z、J說明)進行實驗，欲提高靛藍試劑偵測極限。



在還原靛藍試劑偵測極限實驗中，其陽性指標為15秒內與蒸餾水的飽和度差大於50。在比例J中，偵測10⁻²假血時，與蒸餾水的飽和度差大於100，視為陽性；偵測10⁻³假血時，與蒸餾水的飽和度差大於50，視為陽性；偵測10⁻⁴假血時，飽和度變化量較小，且與蒸餾水的飽和度差距極小，視為陰性。



割線斜率絕對值	判讀狀況
比例C	近似於比例D 變色快速、飽和度數值變化明顯，且能以肉眼察覺到顏色變化
比例D	近似於比例C 變色快速、飽和度數值變化明顯，且能以肉眼察覺到顏色變化
比例E	次小 變色較慢，10秒內飽和度降幅較小，需近30秒才降至與比例相同程度，增加發生偽陽性的機率
比例F	最小 無法判讀

▲以割線斜率絕對值做為15秒內之平均反應速率數值大小的判讀依據，整理四種比例之飽和度特性（變色速度、飽和度數值變化程度、肉眼能否察覺顏色變化、發生偽陽性的機率）如上表。

(四) KM試劑與還原靛藍試劑之偵測極限

在KM試劑之比例D與比例C之偵測極限實驗中，發現比例D表現較佳，顯示於該比例下KM試劑靈敏度較高，我們推測原因受酚酞占總試劑比例影響，提高濃度促使反應加速，使低濃度血跡樣品能在時限內達到陽性飽和度指標。因為欲使自製還原靛藍試劑達到與KM試劑相同的偵測極限，我們先按照原配方1%靛藍、0.3%雙氧水進行實驗，而後發現還原靛藍試劑的偵測極限不如KM試劑，便嘗試以兩個方面進行改良，分別是固定靛藍濃度、提高雙氧水濃度，以及固定雙氧水濃度，提高還原靛藍濃度，以找出靈敏度更佳的還原靛藍試劑比例。最後我們根據還原靛藍與雙氧水兩者濃度變化，進行實驗後做數據處理後，發現還原靛藍濃度與雙氧水濃度的比值相同時實驗結果並不完全相同，且還原靛藍濃度與反應速率並無一定關係。最後，還原靛藍在整個試劑中的濃度相同的時候，雙氧水濃度愈高，反應速率愈快。

還原靛藍濃度		雙氧水濃度						
		0.3%	0.4%	0.5%	0.6%	1%	1.5%	3%
1:1.5:2.5 (mL) (還原靛藍:酒精:雙氧水)	4%	-2				△	△	△
	2%	-3	G	△*	△	△	△*	△*
	1%	-2				-2	△	△
還原靛藍濃度		雙氧水濃度						
		0.3%	0.4%	0.5%	0.6%	1%	1.5%	3%
1.5:1:2.5 (mL) (還原靛藍:酒精:雙氧水)	4%	-2				-2	-2	△
	2%	-2*				-2*	-2*	△*
	1%	-2				-2	-2	△

G:與血跡反應後停留於綠色
△:無法偵測
-n:可偵測血跡濃度極限
*表推測之結果

▲還原靛藍試劑偵測極限結果總整理。

還原靛藍(mL)	還原靛藍濃度	雙氧水濃度	雙氧水在整個試劑中的濃度	配製 比值	實驗結果
比例AA	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例AB	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例AC	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例AD	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例AE	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例AF	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例AG	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例AH	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例AI	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例AJ	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例AK	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例AL	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例AM	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例AN	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例AO	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例AP	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例AQ	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例AR	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例AS	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例AT	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例AU	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例AV	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例AW	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例AX	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例AY	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例AZ	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例BA	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例BB	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例BC	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例BD	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例BE	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例BF	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例BG	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例BH	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例BI	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例BJ	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例BK	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例BL	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例BM	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例BN	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例BO	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例BP	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例BQ	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例BR	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例BS	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例BT	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例BU	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例BV	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例BW	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例BX	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例BY	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例BZ	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例CA	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例CB	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例CC	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例CD	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例CE	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例CF	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例CG	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例CH	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例CI	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例CJ	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例CK	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例CL	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例CM	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例CN	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例CO	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例CP	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例CQ	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例CR	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例CS	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例CT	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例CU	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例CV	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例CW	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例CX	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例CY	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例CZ	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例DA	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例DB	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例DC	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例DD	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例DE	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例DF	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例DG	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例DH	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例DI	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例DJ	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例DK	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例DL	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例DM	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例DN	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例DO	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例DP	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例DQ	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例DR	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例DS	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例DT	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例DU	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例DV	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例DW	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例DX	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例DY	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例DZ	1.5	4%	3%	1.50%	X

還原靛藍(mL)	還原靛藍濃度	雙氧水濃度	雙氧水在整個試劑中的濃度	配製 比值	實驗結果
比例AA	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例AB	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例AC	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例AD	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例AE	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例AF	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例AG	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例AH	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例AI	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例AJ	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例AK	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例AL	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例AM	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例AN	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例AO	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例AP	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例AQ	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例AR	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例AS	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例AT	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例AU	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例AV	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例AW	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例AX	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例AY	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例AZ	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例BA	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例BB	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例BC	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例BD	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例BE	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例BF	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例BG	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例BH	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例BI	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例BJ	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例BK	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例BL	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例BM	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例BN	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例BO	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例BP	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例BQ	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例BR	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例BS	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例BT	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例BU	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例BV	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例BW	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例BX	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例BY	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例BZ	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例CA	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例CB	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例CC	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例CD	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例CE	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例CF	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例CG	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例CH	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例CI	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例CJ	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例CK	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例CL	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例CM	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例CN	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例CO	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例CP	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例CQ	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例CR	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例CS	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例CT	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例CU	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例CV	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例CW	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例CX	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例CY	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例CZ	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例DA	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例DB	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例DC	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例DD	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例DE	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例DF	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例DG	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例DH	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例DI	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例DJ	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例DK	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例DL	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例DM	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例DN	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例DO	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例DP	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例DQ	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例DR	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例DS	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例DT	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例DU	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例DV	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例DW	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例DX	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例DY	1.5	4%	3%	1.50%	X
比例DZ	1.5	4%	3%	1.50%	X

▲實驗數據顯示，還原靛藍在整個試劑中的濃度相同時，雙氧水濃度越高，反應速率越快。

▲還原靛藍與雙氧水(含量或濃度)比值固定時之實驗結果比較。藍色區塊表示同比值結果並不相同，粉色區塊表示同比值結果相同。

▲雙氧水濃度相同時，還原靛藍在整個試劑中的濃度與實驗結果並無一定關係。

(五) 還原靛藍試劑之偽陽性反應

我們取用兩種主要含次氯酸鈉及過碳酸鈉之漂白水，依據瓶身「清洗頑強污漬(含血跡)」之比例配得藥劑，模擬犯罪現場被漂白水清洗後，可能產生偽陽性的環境。結果顯示不論KM或還原靛藍試劑，均對次氯酸鈉產生偽陽性，對過碳酸鈉漂白水無。實驗中過碳酸鈉雖未產生偽陽性，但也是氧化劑，故推測可能是在該清潔濃度下，過碳酸鈉含量不足所以氧化的效果不佳，導致難以肉眼觀察到KM試劑以及還原靛藍試劑變色。

(六) KM試劑與還原靛藍試劑綜合比較

	價格	偵測極限	顏色變化	偽陽性	保存期	製程
還靛試劑	低	10 ⁻³	紅→黃/無	有	短	短
還酚試劑	高	10 ⁻⁴	無→洋紅	有	長	長

(