

2024年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 030029
參展科別 化學
作品名稱 血跡檢測-色素替代試劑與現行酚酞法之比較

就讀學校 國立金門高級中學
指導教師 陳旻玳
作者姓名 侯思羽、蔡瀟嫻、董芷菱

關鍵詞 血跡檢測、還原酚酞、鑑識科學

作者簡介



這份研究由三名金門高中學生合作完成，首先是喜愛鑑識科學的科研社文書，涉獵平面設計和編曲，渴望跨領域學習的侯思羽，再來是懷抱醫生夢想意外闖入自然專題課，開啟科展探索之旅的自嗨型快樂人蔡瀨嫻，還有宅到只願意為美食出門，對綜藝韓劇、影視動漫都感興趣的辯論社公關長董芷菱。我們特質各異，但共同興趣是動手實驗！

摘要

在刑事犯罪案件中，血液經常作為物證出現，檢測血液的存在是鑑識犯罪現場的一項基本任務，因此研發並採用許多血跡檢測方法，魯米諾測試就是其中之一。而卡斯特-梅爾呈色試驗等傳統測試通常用於快速篩選可疑污漬中是否含有血液。這些呈色測試不僅低成本，而且可以快速檢測其為陰性或陽性，使其適合在犯罪現場篩選潛在的血跡。在本研究中，我們將 KM 試劑、靛藍胭脂紅試劑和亮藍試劑透過呈色分析進行血跡檢測，另外使用 OpenCV 來協助判讀試劑顏色變化。結果顯示，KM 試劑的靈敏度優於靛藍胭脂紅試劑，其檢測極限濃度分別為 $10^{-2}\%$ (w/w) 和 $10^{-1}\%$ (w/w)。另外這兩種試劑均對含有次氯酸鈉的漂白水產生偽陽性。

Abstract

Blood is frequently encountered as physical evidence in cases of violent crimes. Detecting the presence of this crucial bodily fluid is a fundamental task in forensic investigations, and various presumptive tests are employed for this purpose, with the forensic luminol test being one of them. Traditional catalytic tests like phenolphthalein are commonly utilized to quickly screen suspected stains for the presence of blood. These colorimetric tests are not only cost-effective but also provide rapid results, making them suitable for on-site screening of potential bloodstains directly at the crime scene. Here, we investigate KM reagent and Indigo Carmine reagent for latent blood trace detection by colorimetric analysis. The OpenCV for assisting in the interpretation of reagent color changes was employed. The results show that the sensitivity of KM reagent is better than Indigo Carmine reagent, and the limit concentrations they can detect are 0.01 % (w/w) and 0.1 % (w/w) respectively. However, both reagents have a false-positive by bleach containing sodium hypochlorite.

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)，其當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。

一、研究目的

- (一) 以 OpenCV 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、靛藍胭脂紅色素)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：透過鋅粉與酚酞的化學反應，將鹼性環境中的酚酞(粉紅色)發生氧化還原升成還原態酚酞(無色)。相關反應結構變化如圖 1：

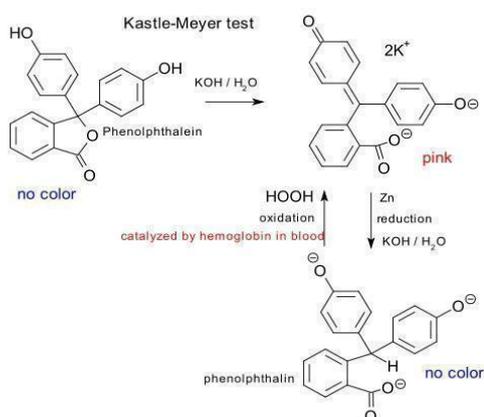


圖 1、還原酚酞製備原理。

圖來源、NNS Chemistry

blog(2008, November 18).CSI in

trouble2.KM test.

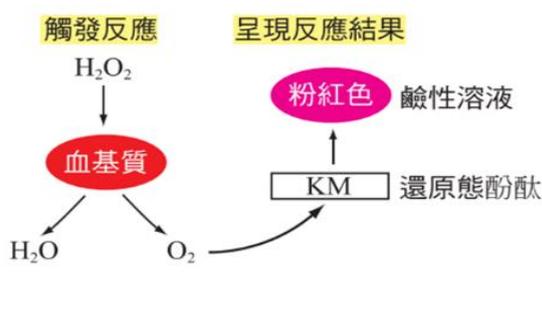


圖 2、KM 試驗檢測原理。

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，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、次氯酸鈉及過碳酸鈉等皆為常見的

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($C_{20}H_{14}O_4$)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。

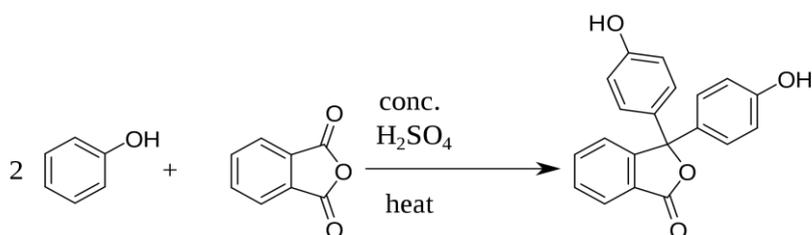


圖 3、酚酞的製備。圖來源、2023/2/15。酚酞。維基百科，自由的百科全書

<https://zh.wikipedia.org/wiki/%E9%85%9A%E9%85%9E>

2. 酚酞於不同 pH 值：

未解離的酚酞(H_2In)為無色，失去兩個電子時呈現粉紅色(此時的酚酞為 In^{2-} ，醜式結構)；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 H_3In^+)，如圖 4。

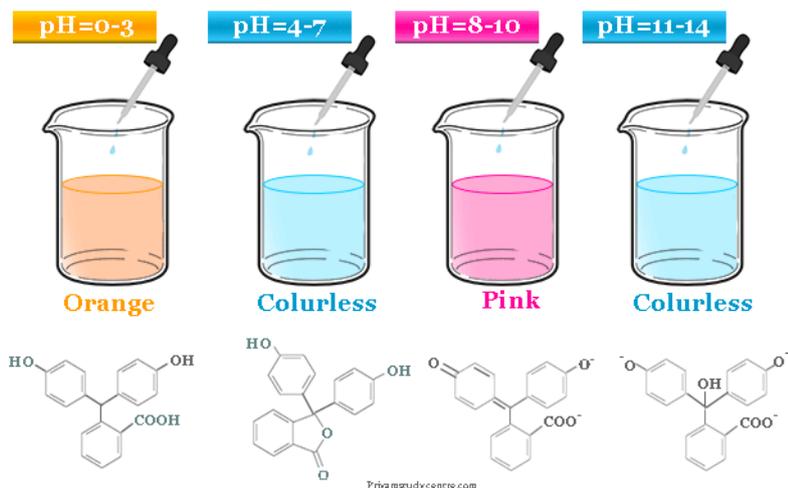


圖 4、酚酞於不同酸鹼下結構與顏色。圖來源、2021/11。Phenolphthalein. Learning Chemistry。 <https://www.priyamstudycentre.com/2021/11/phenolphthalein-indicator.html>

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：

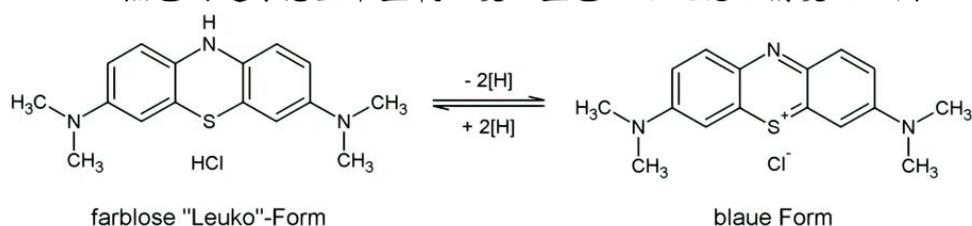


圖 5、亞甲藍氧化與還原時結構與顏色變化。圖來源、維基百科(2023 年 3 月 23 日)。藍瓶實驗。<https://zh.wikipedia.org/zhtw/%E8%93%9D%E7%93%B6%E5%AE%9E%E9%AA%8C>

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呈綠色(圖 6)，其過渡色紅色為不穩定中間產物紅色半醌中間體所造成；靜置錐形瓶氧化態靛藍胭脂紅與葡萄糖反應還原為淡黃色。

由以上實驗我們得知靛藍胭脂紅色素符合氧化還原變色，所以我們推測其有望作為血跡試劑。

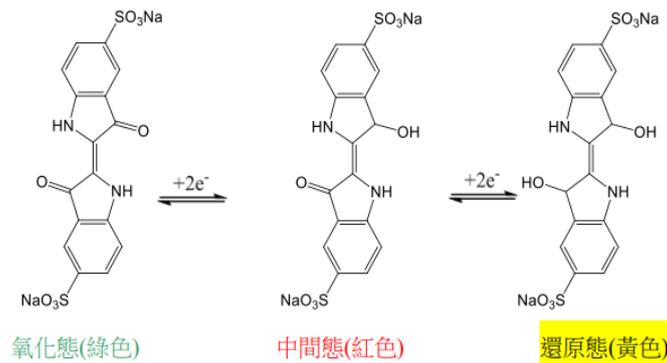


圖 6、靛藍胭脂紅氧化與還原時結構與顏色變化。

圖來源、中華民國第 56 屆中小學科學展覽會作品說明書，變吧！變吧！七彩霓虹燈！探討靛胭脂的氧化還原。藍世聰、陳柏安、伍德源。

3. 靛藍胭脂紅與亮藍色素：

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

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

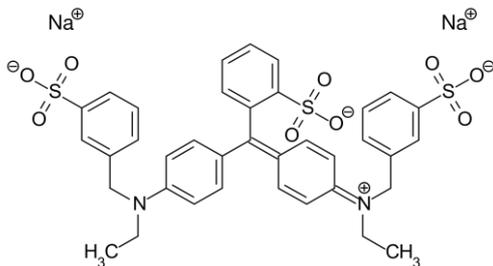


圖 7、亮藍結構。

圖來源、維基百科 (2023 年 2 月 13 日)。亮藍 FCF。

https://en.wikipedia.org/wiki/Brilliant_blue_FCF

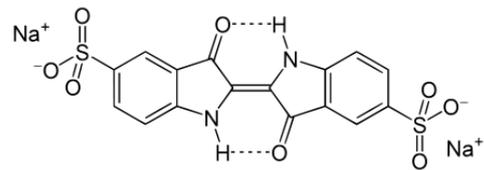


圖 8、靛藍胭脂紅結構。

圖來源、維基百科 (2022 年 7 月 29 日)。靛藍胭脂紅。
[https:// zh.wikipedia.org/zh-tw/靛藍胭脂紅](https://zh.wikipedia.org/zh-tw/靛藍胭脂紅)

4. 靛藍胭脂紅色素(食用色素藍色 2 號)：

結構如圖 8，其分子式為 $C_{16}H_8N_2Na_2O_6S_2$ ，是一種合成食用色素但是有致癌可能性，常用於調配冷飲等的色澤、醫學成像染色或正極材料。通常由靛藍磺化後或酸性狀態下的靛藍胭脂紅與氫氧化鈉縮合而得，可溶於水且微溶於乙醇與其他有機溶液。另外作為 pH 指示劑，在 pH 值為 11.5~14 時由藍色變為黃色。

(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(gut)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 位元/16 位元	8 位元/16 位元	8 位元/16 位元
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 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、CIE 色彩模型直覺：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。

(七) 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 判斷試劑之變化較 RGB、CIE XYZ 色彩模型易，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。

(八) 色彩空間轉換：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。由於 OpenCV 默認的色彩空間為 BGR，為 RGB 的不同排列，不影響 BGR 色彩空間轉為 HSV 色彩空間。

$$V \leftarrow \max(R, G, B)$$

$$S \leftarrow \begin{cases} \frac{V - \min(R, G, B)}{V} & \text{if } V \neq 0 \\ 0 & \text{otherwise} \end{cases}$$

$$H \leftarrow \begin{cases} 60(G - B) / (V - \min(R, G, B)) & \text{if } V = R \\ 120 + 60(B - R) / (V - \min(R, G, B)) & \text{if } V = G \\ 240 + 60(R - G) / (V - \min(R, G, B)) & \text{if } V = B \\ 0 & \text{if } R = G = B \end{cases}$$

If $H < 0$ then $H \leftarrow H + 360$. On output $0 \leq V \leq 1, 0 \leq S \leq 1, 0 \leq H \leq 360$.

The values are then converted to the destination data type:

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

圖 9、sRGB 轉為 HSV 的公式。圖來源、OPEN CV。

https://docs.opencv.org/3.4/de/d25/imgproc_color_conversions.html#color_convert_rgb_hsv

貳、研究設備及器材

				
酚酞	藍色色素	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	

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

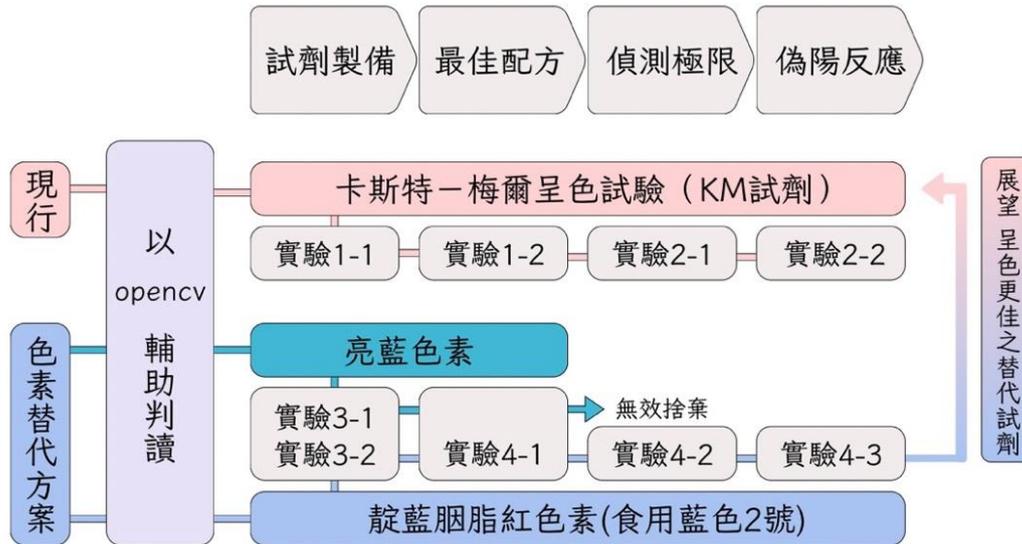


圖 10、實驗架構圖。圖來源、研究者繪製。

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():
    pass

# 創建 HSV 調整滑塊
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.MP4')
# 循環
while True:
    # 輸入 HSV 調整範圍
    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 調整範圍
    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)
    # 依據顏色範圍創建掩碼
    mask = cv2.inRange(hsv, lower_color, upper_color)
    # 計算圖片在掩碼範圍內的平均飽和度
    mean_saturation = cv2.mean(hsv, mask=mask)[1]
    # 將處理後圖片放入 result
    result = cv2.bitwise_and(frame, frame, mask=mask)
    # 顯示原圖與處理後的圖片
    cv2.imshow('result', result)
    # 顯示原圖的圖片
    cv2.imshow('hsv', frame)
    # 顯示原圖在處理範圍內的平均飽和度
    print(mean_saturation)
    # 等待按鍵按鍵關閉視窗，經過 3 毫秒對真實關閉
    cv2.waitKey(1)
    # 影片播放完或按鍵按步時，退出循環
    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。

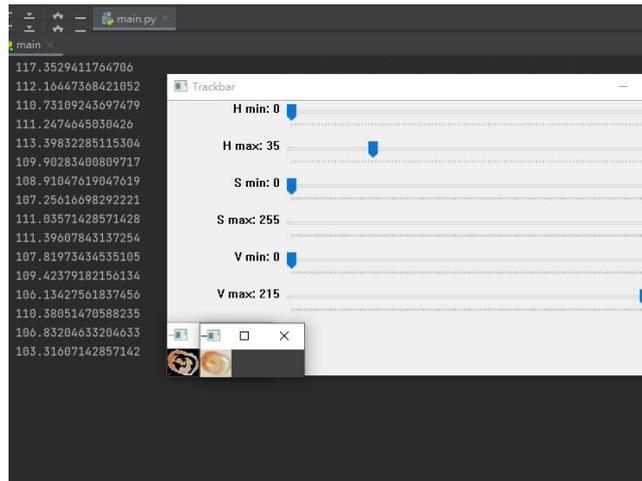


圖 12、移動滑塊尋找遮罩的 HSV 參數畫面截圖。圖來源、研究者拍攝。

- 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)。
- 將同比例的飽和度進行平均，將結果製成圖表觀察各比例差異。

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q
1	117.352842	86.38435282	108.3958137	103.7019807	73.5157385	142.235474	120.893869	101.6771037	143.0588235	158.2702709	121.7047308	128.0838053	103.7062044	102.0573914	115.0220964	121.544028	129.50871
2	112.1644737	100.228936	100.2019132	102.800531	76.77384198	152.0253846	126.495103	86.3075731	157.5183099	161.9175847	121.4285714	127.8700955	105.8235577	102.7982384	119.4523889	129.50871	129.50871
3	110.7310824	94.51603453	98.89878033	100.4557196	70.03949635	155.315042	119.5692308	80.0742857	166.5236769	164.7710583	128.6971756	129.4337349	106.8513761	107.3435115	121.143454	128.42833	128.42833
4	111.2474645	104.3601463	102.1955207	96.91977612	74.21666667	162.7222222	122.9123173	99.9884375	166.0865972	178.223301	133.4863636	129.5128904	111.8084291	124.1829781	124.1829781	131.90023	131.90023
5	113.3983229	105.6885417	100.9184549	92.42972536	65.7515528	161.7432836	121.9190871	94.04245974	166.0543478	183.8792651	141.7090352	130.9247863	116.0489565	115.7719626	127.3408135	133.50078	133.50078
6	109.902834	105.844463	97.96810934	92.43256579	69.00258398	163.4626886	125.2004219	92.77496274	164.5857888	190.9583333	147.7819905	126.9501608	125.6097561	114.9425926	130.8885714	137.30599	137.30599
7	108.9104762	99.91678907	102.9957356	90.90366972	70.62566845	163.4992145	126.8375862	99.4027778	163.6209913	196.9115044	148.4130781	135.1148099	127.528169	117.6072566	131.3040349	138.85243	138.85243
8	107.256167	95.69327074	102.7909654	90.58910162	70.97586234	161.958209	135.193358	97.80867347	170.3519972	197.2044575	148.4180653	139.8322359	129.6976321	119.7230769	130.7229437	140.87284	140.87284
9	111.0357143	95.14799036	104.2271693	98.89259699	73.60206718	162.0177515	136.8314088	99.40125786	167.4969325	199.4154223	152.0572391	145.1993355	129.2357143	122.6407599	131.2373372	145.21383	145.21383
10	111.3960784	95.6076662	104.1900238	87.14640884	75.32920792	164.2848665	144.2971576	106.9102555	168.6859756	199.8309456	149.8528428	148.4918301	131.1765766	127.024735	133.4378788	144.27134	144.27134
11	107.8197343	96.14705682	103.935867	86.58481538	70.42385787	164.6290801	142.2252475	105.0384615	166.5866275	149.306425	151.9242424	136.1678322	129.0555566	132.6363636	147.63523	147.63523	147.63523
12	109.4237918	95.70325203	111.2993197	86.80475594	71.60520095	155.5029412	154.1382114	109.505632	170.334465	197.5386819	152.4955462	158.3273381	137.25	136.7553191	140.3689462	148.3	148.3
13	106.1342756	97.78236475	108.9416244	86.44880735	68.90231362	164.2456947	156.7526216	114.3012698	167.9780302	197.1161473	157.8764706	158.1474777	139.3645633	130.6258985	143.4819897	147.32168	147.32168
14	110.3805147	100.7977839	111.0374655	85.34113737	68.9847819	164.359882	158.0773481	121.9581281	172.244108	196.7432836	156.2058824	159.0189815	140.3758741	147.2118066	151.01598	151.01598	151.01598
15	108.320463	99.19027507	110.3745342	85.94019139	69.46901942	164.8537313	150.0537084	126.7835178	170.5891892	199.1348974	156.6626712	157.0534759	148.4300959	143.4524237	150.75	156.13784	156.13784
16	103.3160714	97.9189441	111.9428625	84.77538829	71.28743961	166.3018293	159.9273743	131.6833034	174.1491713	198.3223881	160.0765217	159.5209472	151.5408163	150.5874126	158.5714380	151.45380	151.45380
17	96.5068896	97.0346154	112.7684211	84.65320685	65.16167685	165.5195195	159.1880109	136.8343634	173.2219251	199.9590843	163.0454545	159.1294964	149.7722008	150.1597222	151.96387	151.96387	151.96387
18	92.33220911	96.05289673	112.3463796	84.70666667	65.49198141	166.3701493	160.6898247	138.777011	176.0539084	199.9914286	164.8127208	161.7354015	151.4852866	148.3779528	156.7111775	153.75775	153.75775
19	97.9902322	96.09762533	111.5163776	83.50595453	66.73429252	166.6066747	161.0997051	140.7557116	182.0633099	201.1505602	165.7326947	162.7796296	152.9097222	156.7800649	152.7730995	162.26273	162.26273
20	96.93274336	95.19461444	111.2467786	81.42358604	66.82808435	165.9513678	164.0484935	142.7907543	182.2187771	200.8011396	166.7185541	164.1954887	153.6439523	159.1974895	168.16774	168.16774	168.16774
21	96.9384249	94.21601942	110.4779271	81.36033857	65.99726157	166.2878788	163.8638888	145.2251185	180.6275806	199.6167665	166.7234043	165.7547117	151.6455322	151.9482522	161.9288561	168.97231	168.97231
22	97.5896456	94.25961538	111.62818	80.59300244	69.84918482	165.7566766	163.5887324	144.7456234	182.2138889	199.7138643	166.9537367	165.1858736	156.0783646	156.2271762	163.9105839	168.51935	168.51935
23	100.1731749	92.21638142	109.5254237	80.05910736	70.78922717	166.56231	162.7114846	145.9147659	182.635887	198.739645	166.4084507	167.0037951	157.9132211	158.938739	164.2680025	171.45380	171.45380
24	99.87652174	91.7251462	111.963035	79.60338773	76.06854839	165.5421687	162.800578	149.7653886	182.501355	197.760355	166.7142857	167.2140152	157.9470085	159.0599174	162.7308378	172.53745	172.53745
25	99.81016949	90.8206893	111.3017751	78.43297746	75.43534483	164.0362338	163.0591972	149.72061	182.1428571	197.9942529	167.0439367	168.1859563	159.5867898	162.5970149	164.0679785	172.63192	172.63192
26	96.01309329	91.83354531	110.4402777	76.90334129	77.46382979	162.5582026	163.8815026	152.598412	183.5339027	196.8559078	167.4048296	168.2937653	156.5333333	159.1974895	168.16774	172.53583	172.53583
27	97.93613445	99.9192618	110.4474187	76.00239318	77.58744395	163.6096906	164.6819484	152.5846414	184.3719977	196.8881306	167.9700704	170.5475285	159.015	165.8021505	163.6368643	177.77777	177.77777
28	98.0950764	89.8896141	110.4799241	74.55920281	80.85319149	164.8780488	165.480826	151.6207729	183.9262295	195.114551	168.8108581	170.4724858	160.6888108	165.1582734	179.25335	179.25335	179.25335
29	97.1863123	89.49421296	110.4738878	75.03110048	77.5745614	165.896966	165.7695706	153.7868631	182.5187166	194.242236	168.4676007	172.5885714	160.0753769	165.6838977	164.8273381	180.74285	180.74285
30	99.18589744	89.2089522	109.9857143	74.19480519	79.05175983	162.6071429	164.746538	152.7876531	181.6236842	195.5427729	168.9143357	171.9621212	160.378319	167.3802198	165.3700361	181.09484	181.09484
31	97.9595432	88.3751192	109.2552381	74.31914884	75.81914884	162.6746269	165.5738036	152.432304	180.5581467	194.894282	168.0451389	172.3924366	161.8023256	167.3989328	167.3502621	181.55166	181.55166
32	96.0334681	83.34603175	104.1612319	69.3778626	75.06451613	165.202454	166.5934959	150.8900451	179.8531848	191.7907609	174.1758821	170.6289425	165.089701	168.0889371	166.3414634	180.50811	180.50811
33	95.16984127	81.17672414	102.7995652	69.04266667	76.02731092	163.4143302	166.5951743	149.5106383	178.037037	193.182979	174.2972509	172.5297398	165.5898963	168.197367	166.3702422	180.60423	180.60423
34	95.28333333	80.21948608	103.8372483	68.8252149	75.99800399	163.3869892	166.8828787	150.5239412	180.2556962	195.0460358	174.5927835	171.9925651	165.5841584	169.9475983	165.7506554	180.27154	180.27154

圖 13、運行過程藍胭脂紅試劑之部分數據截圖。圖來源、研究者拍攝。

(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。

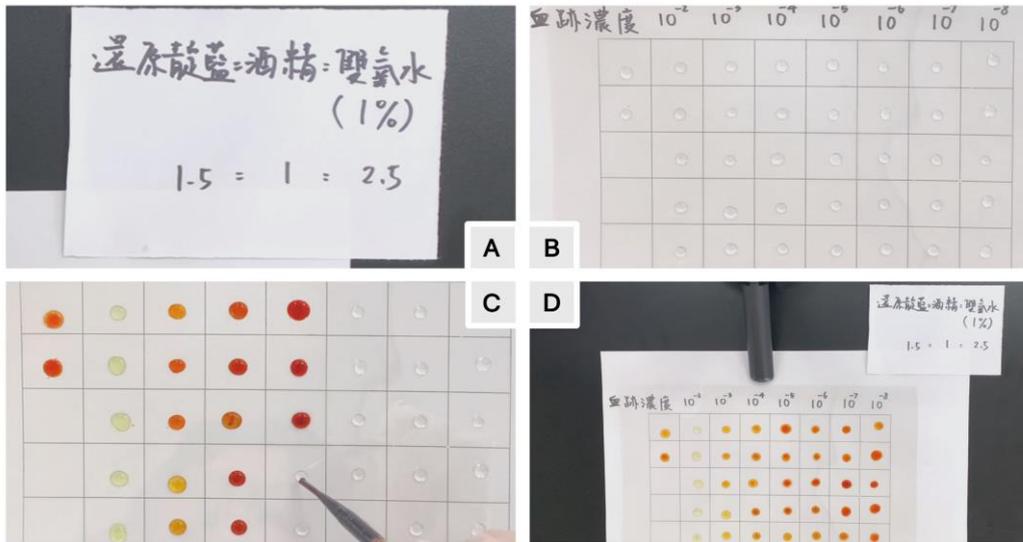


圖 14、實驗裝置與透明投影片示意圖 A~D。圖來源、研究者拍攝

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

1. 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。
2. 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。
3. 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

1. 以電子秤量取 56g 氫氧化鉀(KOH=56.1)及少許蒸餾水，放入 250mL 燒杯中以玻璃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 容量瓶中，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 鋅粉末、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，覆蓋鋁箔紙再將電磁加熱攪拌器調整 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 (陳旆玓, 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 2-1KM 試劑偵測極限率

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 $10^0\%$ (w/w) 至 $10^{-6}\%$ (w/w) 的血跡樣品。
3. 比例選用：參考輔助判讀分析實驗 1-2 數據，選用比例如表 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	10^0	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
比例 D	10^0	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}

單位：重量百分濃度 (w/w)

(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
$\text{Na}_2\text{H}_2\text{CO}_6$	NaClO	H_2O

(九) 實驗 3-1 色素在不同 pH 值呈色狀況

1. 實驗目的：觀測靛藍胭脂紅及亮藍色素於鹼性環境下之呈色。
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 靛藍胭脂紅色素，以蒸餾水稀釋至 100g，得 1% 靛藍胭脂紅溶液。
 - (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) 吸取亮藍色素溶液滴入步驟(1)試管，觀察並記錄顏色。
 - (3) 重複步驟(1)、(2)，以靛藍胭脂紅溶液取代亮藍色素溶液。

(十) 實驗 3-2 靛藍胭脂紅與亮藍的製備

1. 實驗目的：製備靛藍胭脂紅與亮藍。
2. 參考配方：參考實驗 1-1 還原酚酞配方，以靛藍胭脂紅、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。實驗目的：製備靛藍胭脂紅與亮藍。
4. 濃度：亮藍：溶液總重 101.07g，含亮藍 1g，重量百分濃度約為 1%，簡稱亮藍；靛藍胭脂紅：靛藍胭脂紅溶液總重 103.29g，含靛藍胭脂紅 1g，重量百分濃度約為 1%，簡稱靛藍胭脂紅。

(十一) 實驗 4-1 亮藍與靛藍胭脂紅試劑反應速率

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，以靛藍胭脂紅/亮藍替代還原酚酞。配方為靛藍胭脂紅或亮藍 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，得出之待測試劑(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。

	靛藍胭脂紅/亮藍(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，以靛藍胭脂紅與亮藍製備比例 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 靛藍胭脂紅試劑偵測極限

1. 實驗目的：尋找靛藍胭脂紅試劑之偵測極限。
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 10⁰% (w/w) 至 10⁻⁶% (w/w) 的血跡樣品。
3. 比例選用：經輔助判讀分析實驗 4-1 後選用比例 C、D。調整靛藍胭脂紅及雙氧水濃度後得待測比例如下表 7。

表 7、靛藍胭脂紅試劑偵測極限實驗待測比例。表來源、研究者繪製。

	靛藍胭脂紅 (mL)	酒精 (mL)	雙氧水 (mL)	靛藍胭脂紅 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%	1%
比例 L	1	1.5	2.5	2%	1.5%
比例 M	1	1.5	2.5	2%	3%
比例 N	1	1.5	2.5	4%	0.3%
比例 O	1	1.5	2.5	4%	1%
比例 P	1	1.5	2.5	4%	1.5%
比例 Q	1	1.5	2.5	4%	3%
比例 R	1.5	1	2.5	1%	1%
比例 S	1.5	1	2.5	1%	1.5%
比例 T	1.5	1	2.5	1%	3%
比例 U	1.5	1	2.5	4%	0.3%
比例 V	1.5	1	2.5	4%	1%
比例 W	1.5	1	2.5	4%	1.5%
比例 X	1.5	1	2.5	4%	3%

4. 實驗步驟：

- (1) 參照研究方法之檢測流程，以靛藍胭脂紅搭配不同濃度雙氧水，製備比例 C~X(比例 E、F 除外)之試劑，並以重量百分濃度血跡樣品 $10^0\%$ (w/w) 至 $10^{-6}\%$ (w/w) 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 靛藍胭脂紅試劑偽陽性反應

1. 實驗目的：確認靛藍胭脂紅試劑於漂白水發生偽陽性反應狀況。
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、靛藍胭脂紅試劑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
$\text{Na}_2\text{H}_2\text{CO}_6$	NaClO	H_2O

肆、研究結果

一、KM 試劑配方探究

(一)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)。

(二)實驗 1-2 KM 試劑反應速率

1. 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。

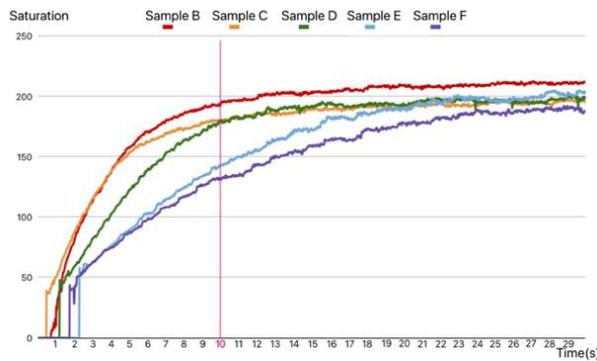


圖 16、KM 試劑反應速率實驗分析圖。

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

(一)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。

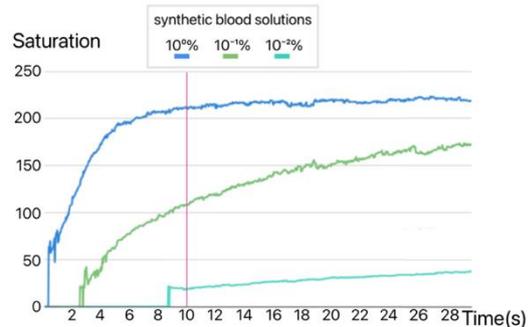
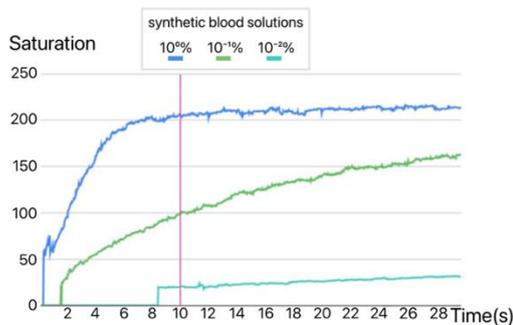


圖 17、KM 試劑比例 C 偵測極限分析圖。 圖 18、KM 試劑比例 D 偵測極限分析圖。

兩者在陽性判定時間(10 秒)內與濃度 $10^0\%$ (w/w)、 $10^{-1}\%$ (w/w) 及 $10^{-2}\%$ (w/w) 之血跡樣品反應，其顏色變化與飽和度變化分別達肉眼、飽和度判讀程式可辨識之標準，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 $10^{-2}\%$ (w/w) 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 $10^{-1}\%$ (w/w)，無法準確判讀濃度等於 $10^{-2}\%$ (w/w) 或更低之血跡樣品；比例 D 對 $10^{-2}\%$ (w/w) 的五組數據皆為陽性，推測偵測極限達血跡濃度 $10^{-2}\%$ (w/w)。

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	10^0	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
1:1.5:2.5	O	O	O*	X	X	X
1.5:1:2.5	O	O	O	X	X	X

血跡濃度單位為重量百分濃度(w/w) O 表示陽性 X 表示陰性 *表示試劑有偽陰性可能

(二)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。

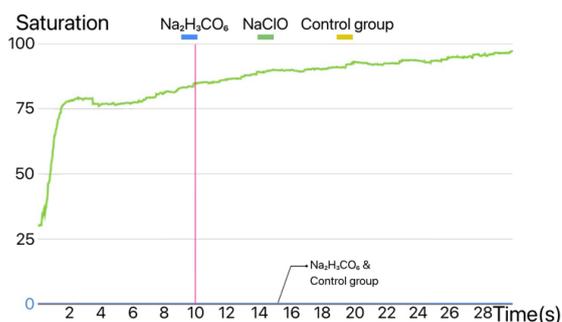


表 10、KM 試劑偽陽性測試。

	過碳酸鈉 (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

圖 19、KM 試劑比例 D 偽陽性實驗分析圖。

二、酚酞替代藥品靛藍胭脂紅與亮藍色素檢測

(一)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}	10^{-6}
亮藍	水藍	水藍	水藍	亮藍	亮藍	亮藍	深藍	深藍	深藍	深藍
靛藍 胭脂紅	黃	黃	黃	黃	淺黃	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^{-6} M。



圖 22、靛藍胭脂紅呈色，由左而右為 4~1M。



圖 23、靛藍胭脂紅呈色，由左而右為 10^{-1} ~ 10^{-6} M。

(二) 實驗 3-2 靛藍胭脂紅與亮藍的製備

1. 亮藍：亮藍溶液總重 101.07g，含亮藍 1g，重量百分濃度約為 1%，製備完成之亮藍顏色為紅褐色。
2. 靛藍胭脂紅：靛藍胭脂紅溶液總重 103.29g，含靛藍胭脂紅 1g，重量百分濃度約為 1%，製備完成之靛藍胭脂紅顏色為深紅色。

四、替代試劑的血跡反應檢測

(一) 實驗 4-1 替代試劑反應速率-亮藍

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。

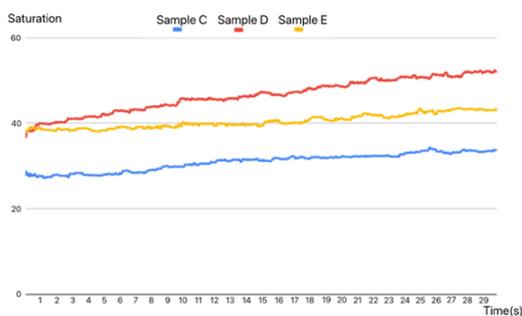


圖 24、亮藍試劑反應速率實驗分析圖。

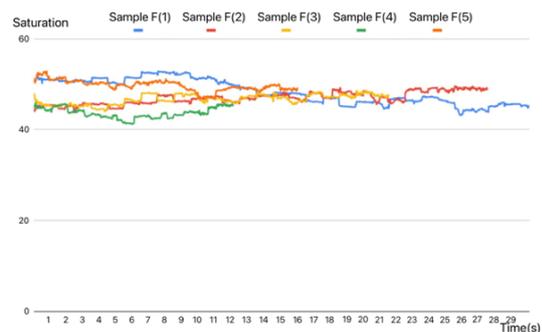


圖 25、亮藍試劑比例 F 反應速率分析。

比例 A 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、D、E 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。

(二)實驗 4-1 替代試劑反應速率-靛藍胭脂紅

靛藍胭脂紅試劑之不同比例飽和度變化如圖 26。

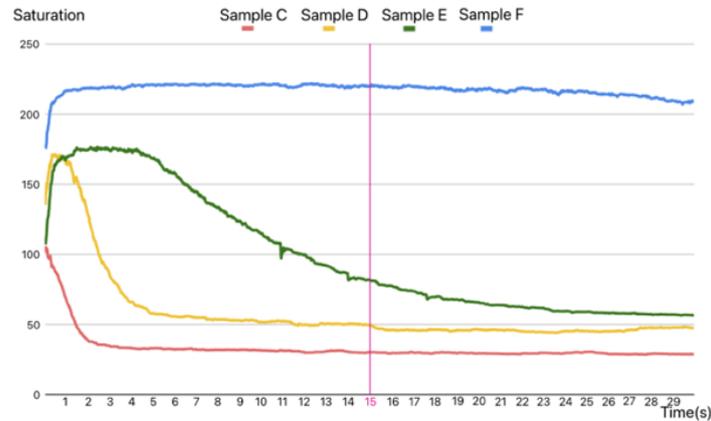


圖 26、靛藍胭脂紅試劑反應速率實驗分析圖

比例 A 靛藍胭脂紅體積為零，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。

(三)實驗 4-2 靛藍胭脂紅試劑偵測極限

陽性指標為 15 秒內變色。靛藍胭脂紅試劑於比例 G、J、N、S、W 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。

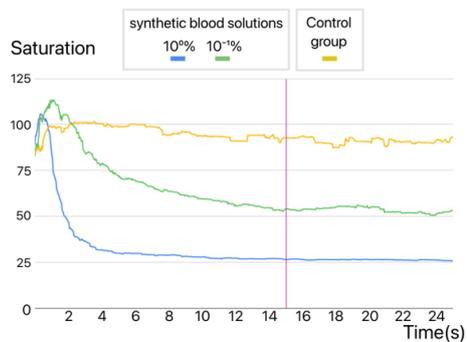


圖 27、靛藍胭脂紅試劑比例 G 偵測極限分析圖。

試劑偵測 10%(w/w) 的假血時產生劇烈的飽和度變化且有肉眼可見的明顯變化，判定為陽性；試劑對 10⁻¹(w/w) 的假血產生的飽和度變化較小，肉眼難以判讀出明顯差異，判定陰性。

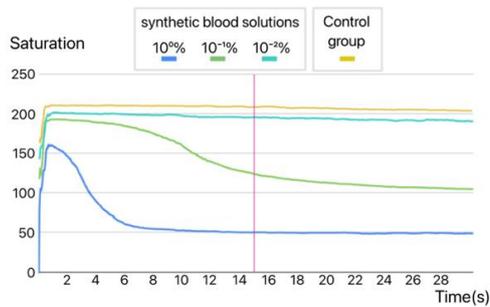


圖 28、靛藍胭脂紅試劑比例 J 偵測極限分析圖。

試劑偵測 10%(w/w) 的假血時產生劇烈的飽和度變化，視為陽性；試劑對 10⁻¹(w/w) 的假血產生的飽和度變化較小，但下降幅度仍遠大於蒸餾水，視為陽性；試劑對 10⁻²(w/w) 的假血產生的飽和度變化較小，且下降幅度接近蒸餾水，視為陰性。

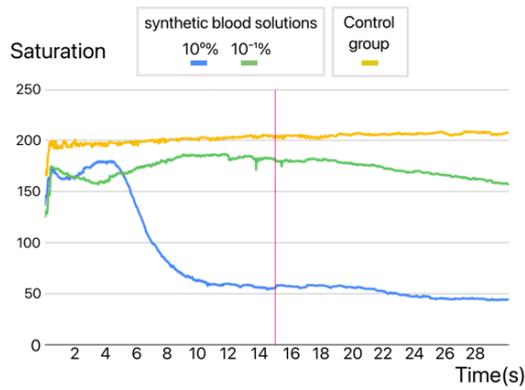


圖 29、靛藍胭脂紅試劑比例 N 偵測極限分析圖

試劑偵測 10%(w/w) 的假血時產生劇烈的飽和度變化，視為陽性；試劑對 10⁻¹%(w/w) 的假血產生的飽和度變化較小，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，對應靛藍胭脂紅試劑之顏色變化為原試劑顏色轉變為咖啡色。

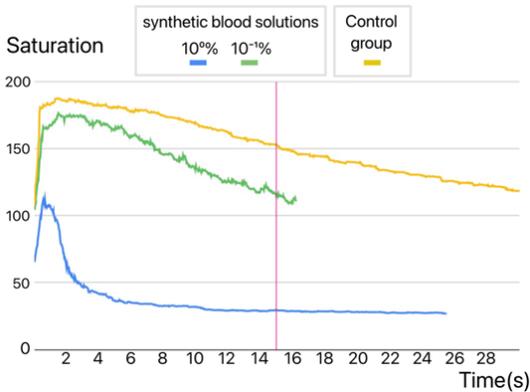


圖 30、靛藍胭脂紅試劑比例 S 偵測極限分析圖。

試劑偵測 10%(w/w) 的假血時產生劇烈的飽和度變化，視為陽性；試劑對 10⁻¹%(w/w) 的假血產生的飽和度變化較小，視為陰性；比例 S 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。

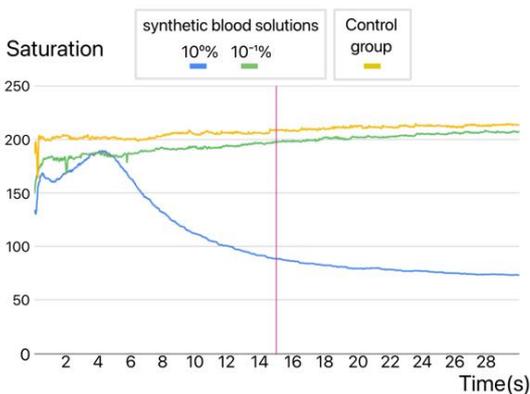


圖 31、靛藍胭脂紅試劑比例 W 偵測極限分析圖。

試劑偵測 10%(w/w) 的假血時產生劇烈的飽和度變化，視為陽性；試劑對 10⁻¹%(w/w) 的假血產生的飽和度變化較小，視為陰性；試劑在檢測 1%(w/w) 假血時呈現短暫（3 秒）的飽和度上升，對應靛藍胭脂紅試劑之顏色變化為原試劑顏色轉變為咖啡色。

表 12、靛藍胭脂紅試劑偵測極限結果整理。表來源、研究者繪製。

Concentration of H ₂ O ₂		0.3%	1%	1.5%	3%
Concentration of RI					
1:1.5:2.5 (mL)	4%	-2	△	△	△
	2%	-3	△	△*	△*
	1%	-2	-2	△	△
Concentration of H ₂ O ₂		0.3%	1%	1.5%	3%
Concentration of RI					
1.5:1:2.5 (mL)	4%	-2	-2	-2	△
	2%	-2*	-2*	-2*	△*
	1%	-2	-2	-2	△

△:Unable to detect (discarded) -n:Detection limit * represents "surmise"

(四)實驗 4-3 靛藍胭脂紅試劑偽陽性反應

此比例下靛藍胭脂紅試劑偵測次氯酸鈉時產生劇烈的飽和度變化，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。

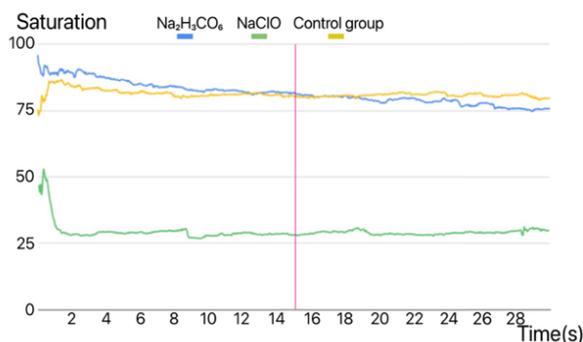


表 13、靛藍胭脂紅試劑比例 J 結果

	過碳酸鈉 (白鴿牌)	次氯酸鈉 (白蘭牌)
靛藍胭脂紅 比例 J	X	O

O 代表陽性、X:代表陰性

圖 32、靛藍胭脂紅試劑比例 J 偽陽性分析

伍、討論

一、反應速率

(一)KM 試劑

此處反應速率係指以在陽性指標內(0~10 秒)取飽和度割線之平均反應速率，分析實驗結果(如圖 33)後，可發現在 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。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。

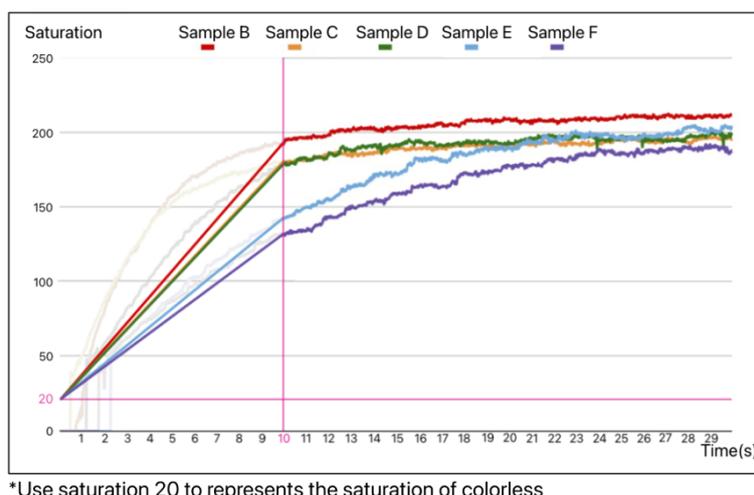


圖 33、KM 試劑反應速率實驗分析圖(含割線)。

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 $10^{-2}\%$ (w/w) 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，故取靈敏度較高之比例 D 進行後續偽陽性實驗。

(二) 靛藍胭脂紅試劑

此處反應速率係指時間在零秒至濃度趨於定值之間飽和度割線之平均反應速率。針對不同比例之靛藍胭脂紅試劑實驗結果，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，為了探討靛藍胭脂紅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 之靛藍胭脂紅試劑在 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 14)。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，進行後續靛藍胭脂紅試劑偵測極限實驗。

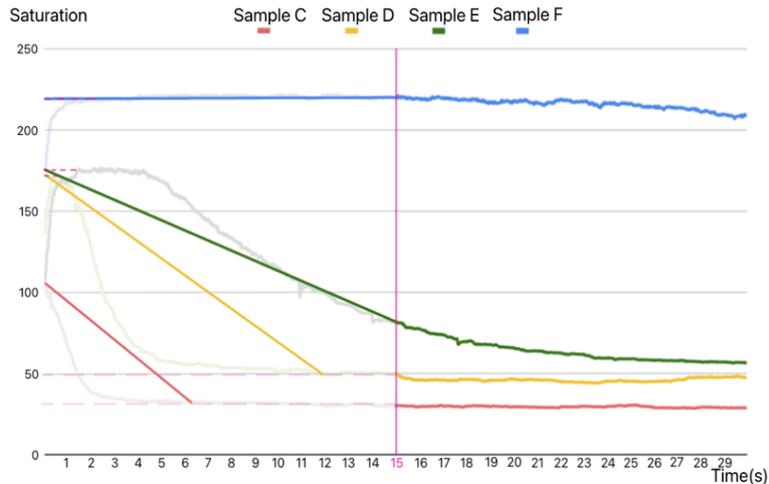


圖 38、靛藍胭脂紅試劑反應速率實驗分析圖(含割線)。

表 14、不同比例之靛藍胭脂紅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

二、偵測極限

(一)KM 試劑

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。

(二)靛藍胭脂紅試劑

由於按原配方 1%靛藍胭脂紅、0.3%雙氧水進行實驗後，發現靛藍胭脂紅試劑之偵測極限不如 KM 試劑，便嘗試調整靛藍胭脂紅及雙氧水濃度以進行改良，尋找靈敏度更佳之靛藍胭脂紅試劑配方。調整後交叉混合比例列舉於實驗 4-1 表 7。

在改良階段，我們首先挑選出肉眼較明顯觀察到褪色現象之試劑比例 G、J、N、S、W，並透過儀器輔助分析，計算出實驗組與對照組之平均飽和

度比值(如圖 39)。由該圖可知比例 J 優點有三，一是相對飽和度變化最大，有利於肉眼判讀；二是靈敏度最佳，可到達 10-1%(w/w)；三是其對照組飽和度變化最小，較不易產生偽陽性，故推斷比例 J 為最佳配方，於實驗 4-3 靛藍胭脂紅試劑偽陽性反應選用該比例。此外，為與現行 KM 試劑進行比較，此處定義(KM 試劑取陽性秒數內最大值)，計算出 KM 試劑與靛藍胭脂紅試劑之平均飽和度比值(如圖 40)。發現 KM 試劑相對飽和度變化較靛藍胭脂紅試劑為大且各比例試劑變色率相當，若靛藍胭脂紅試劑欲進一步改良顯色程度及穩定度可向現行 KM 試劑取法。

	0	-1	對照
ratioG	79.9921	62.7895	17.5223
ratioG	4.5652	3.5834	1.0
ratioJ	112.3867	88.4335	12.4438
ratioJ	9.0315	7.1066	1.0
ratioQ	150.9851	139.8689	17.1698
ratioQ	8.7936	8.1462	1.0
ratioV	136.5946	84.8428	19.2005
ratioV	7.1141	4.4188	1.0
ratioZ	116.4602	40.4989	16.1703
ratioZ	7.2021	2.5045	1.0

圖 39、靛藍胭脂紅靈敏度實驗數據分析。圖來源：研究者拍攝。

IC		KM	
ratioG	79.9921	ratioB	212.6739
ratioG	0.4406	ratioB	1.0612
ratioJ	112.3867	ratioC	197.7653
ratioJ	0.6996	ratioC	1.0605
ratioN	150.9851	ratioD	200.5399
ratioN	0.2523	ratioD	1.0877
ratioS	311.4762	ratioE	205.1017
ratioS	0.7604	ratioE	1.3093
ratioW	116.4602	ratioF	192.2614
ratioW	0.6135	ratioF	1.3435

圖 40、現行試劑與自製試劑變色率比較。圖來源：研究者拍攝。

三、顏色轉變推論

(一)KM 試劑

強鹼環境下的酚酞結構如圖 41 所示，將其與鋅粉、氫氧化鈉、水共熱可得四羥基合鋅酸鈉及氫離子(eq1)，接收氫離子使其能夠暫時轉為無色之還原態酚酞。而當實驗滴入血跡時，血紅素將作為催化劑催化雙氧水分解出氧氣(eq2)，故還原態酚酞被氧化並再次回到左方含雙鍵之酚紅色結構，使肉眼與儀器足辨識之。觀察結構，發現左側之結構含雙鍵，推測其顯色原因為電子在共振系統間自由移動的電子躍遷大，發射波長正好位於可見

光光譜；而右圖之結構不含雙鍵，電子僅停留在苯環中，電子躍遷較小，推測發射波長過短而不足為肉眼所辨識。

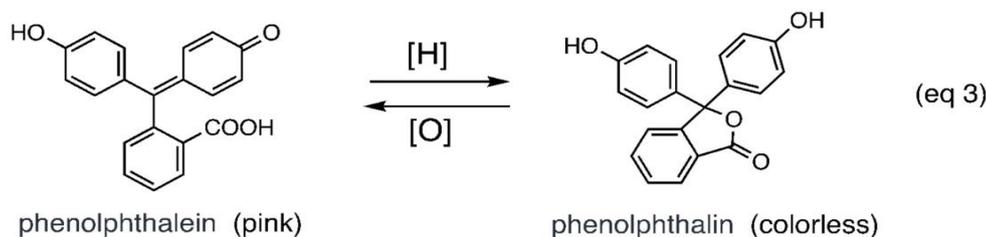


圖 41、KM 試劑氧化還原方程式暨結構示意圖。

(二) 靛藍胭脂紅試劑

針對靛藍胭脂紅試劑顏色轉變，我們結合實驗結果與參考文獻推測結構轉變如下。由實驗 4-2 偵測極限之結果可知，靛藍胭脂紅試劑 (pH>13) 在遇到 10% 的假血時，呈現的陽性顏色為無色，不存在於隨氧化還原變化之顏色中(見圖 42)，故此試劑的原理可能不只有氧化還原反應。參閱相關文獻後，我們推測此褪色可能與芬頓反應造成的色素降解有關(見圖 43)。

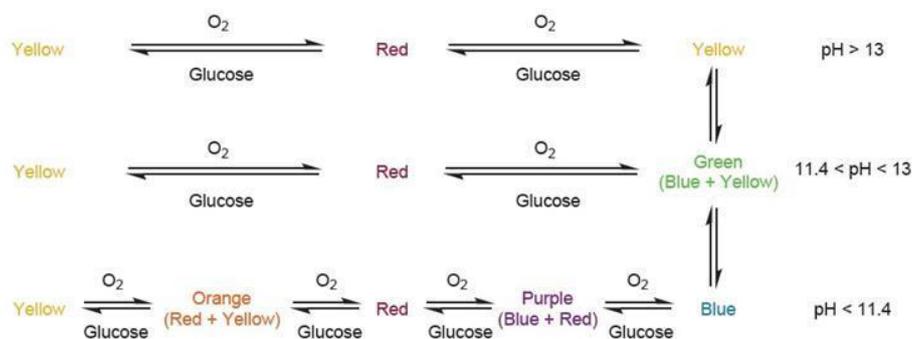


圖 42、靛藍胭脂紅在不同 pH 值下隨氧化還原變化之顏色。

圖來源: Declan Fleming (2014 年 5 月 6 日)。Beyond the 'blue bottle' - redox and colour chemistry。https://edu.rsc.org/exhibition-chemistry/beyond-the-blue-bottle/2000041.article

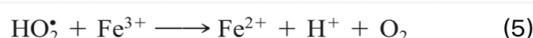
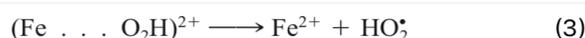
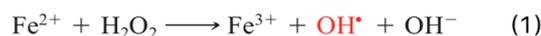


圖 43、芬頓反應反應式。

其中鐵離子可能由血紅素供應，與過氧化氫反應產生氫氧自由基，而後氫氧自由基與靛藍胭脂紅色素反應，使其降解褪色。此外當 pH 值愈高時，氫氧自由基的氧化還原電位愈低，色素降解的速度愈慢，故推測當靛藍胭脂紅試劑處於鹼性情況下時，可能使其偵測極限降低。

四、偽陽性

在實驗中，我們取用兩種分別含有次氯酸鈉及過碳酸鈉之市售漂白水，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 試劑或是靛藍胭脂紅試劑，均會對次氯酸鈉漂白水產生偽陽性，對過碳酸鈉漂白水則無。其中 KM 試劑的變色可能由次氯酸鈉氧化還原酚酞造成，而靛藍胭脂紅的變色可能由次氯酸鈉加速色素降解造成。

實驗中試劑皆未對過碳酸鈉漂白水雖產生偽陽性，但其本身也是氧化劑，故推測濃度超越某一極限，也可能使試劑變色影響試劑檢驗準確度。

五、KM 試劑與靛藍胭脂紅試劑綜合比較

根據研究結果，靛藍胭脂紅試劑確實能做為血跡檢測之試劑，其陽性顏色變化由紅轉黃，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，靛藍胭脂紅試劑之靛藍胭脂紅的製備更加迅速，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。兩試劑之綜合比較如下表 15。

表 15、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
靛藍胭脂紅試劑	低	$10^{-1}\%$ (w/w)	紅色→無色或淡黃色	有	短	短
還原酚酞試劑	高	$10^{-2}\%$ (w/w)	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

由於靛藍胭脂紅即是食用色素藍色 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，而直接將靛藍胭脂紅與鋅粉的混合物共同保存，減少發生變質的可能。

六、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：

(一)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，因其價格低兼之易取得，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。

(二)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。

(三)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，確認試劑無變色後才滴加雙氧水。若待測物為氧化劑，則滴入還原酚酞時就會變色，此時變色視為偽陽性反應；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：

- (一)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。
- (二)偵測極限以比例 C 與 D 最佳，濃度可達假血原液稀釋至 10⁻²%(w/w)，但僅比例 D 可 100% 檢測出陽性，比例 C 有偽陰性可能。
- (三)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、亮藍試劑製備與試劑檢測：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，難作為血跡檢驗試劑。

三、靛藍胭脂紅試劑製備與試劑檢測：

- (一)製備之試劑呈紅色，陽性反應之判讀為試劑退至淡黃或無色。試劑能以肉眼觀察到明顯顏色變化，且飽和度有明顯下降，可作為血跡檢測替代試劑。

- (二)各調配比例之靛藍胭脂紅試劑，於加入 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。
- (三)偵測極限比例 J 最佳，濃度達原液稀釋至 10^{-1} %(w/w)。而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靛藍胭脂紅試劑具有製備快速、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，有望對搭配現行 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. 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。https://en.wikipedia.org/wiki/Sodium_zincate
3. 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。
4. 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>
5. 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
6. 陳旻玳(2021)。鑑識科學。
<https://ghresource.mt.ntnu.edu.tw/uploads/1637740557008Vib1Wmol.pdf>
7. 廖旭茂、陳嫻竹、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>
8. Baig, G. A. (2010). Dyeing nylon with indigo in various pH regions. *AUTEX research Journal*, 10, 21-25.

<http://www.dibanasj.ir/fa/images/pdf/Nylon/DYEING-NYLON-WITH-INDIGO-IN-VARIOUS-PH-REGIONS.pdf>

9. Camarero, L. M., > Peche, R., & Collado, A. (1997). Kinetic study of the oxidation of indigocarmine by hydrogen peroxide with ferrous and ferric ions in acid medium. *International journal of chemical kinetics*, 29(8), 575-578.
10. Chemical reactions of the Kastle-Meyer test (SOURCE: Chemello, 2007). 8 | Download Scientific Diagram (researchgate.net)
11. 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.AllLeucomalachitegreenv2.pdf>
12. Kerr, D. A. (2010). The CIE XYZ and xyY color spaces. *Colorimetry*, 1(1), 1-16.
13. National Center for Biotechnology Information (2023). PubChem Compound Summary for CID 19700, Brilliant Blue FCF. Retrieved October 24, 2023 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Brilliant-Blue-FCF>.
14. National Center for Biotechnology Information (2023). PubChem Compound Summary for CID 2723854, Indigo carmine. Retrieved October 24, 2023 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Indigo-carmine>.
15. Palus, H. (1998). Representations of colour images in different colour spaces. *The Colour image processing handbook*, 67-90.
16. Terres, J., Battisti, R., Andreaus, J., & de Jesus, P. C. (2014). Decolorization and degradation of Indigo Carmine dye from aqueous solution catalyzed by horseradish peroxidase. *Biocatalysis and Biotransformation*, 32(1), 64-73.

【評語】 030029

本工作嘗試研發新型血跡檢測試劑色素，以替代試劑與現行酞酞法。動機有趣值得鼓勵，但在成果表現上，新試劑靈敏度尚不及現行酞酞法，一些變因與偽陽因素尚有待探討。