中華民國第 64 屆中小學科學展覽會

作品說明書

高級中等學校組　農業與食品學科

第三名

052205

以奈米銀蝕刻法鑑別蜂蜜之真偽

學校名稱： 國立嘉義高級中學

作者：	指導老師：
高二 蘇容萱	簡詩展
高二 葉家余	黃冠夫

關鍵詞： 奈米銀、蜂蜜、鹵素蝕刻

摘要

為研究以奈米銀蝕刻法鑑別蜂蜜之真偽之可行性，我們先藉由實驗與調查文獻發現蛋白質為蜂蜜中可以防止奈米銀在加入後發生蝕刻的關鍵物質，並探究蛋白質在不同種類、變性前後、不同蝕刻時間與不同濃度的條件下防止奈米銀蝕刻之效果差異。

接著，我們以不同蜂蜜配製不同蛋白質濃度的溶液進行奈米銀蝕刻實驗，並與純蛋白質溶液的實驗結果進行比較，發現兩者吸光光譜之波峰位移趨勢大致吻合，證明此法可作為判定蜂蜜真偽之標準。

最後，我們利用奈米銀溶液在不同蝕刻程度下呈不同顏色的特質，透過手機軟體分析不同顏色之 RGB 值，歸納出以手機即可簡易辨別蜂蜜真偽之法。

壹、前言

一、研究動機

蜂蜜營養價值豐富，蘊含龐大商機，引得許多不肖廠商與業者推出摻假蜂蜜，以不法手段節省成本並欺詐消費者牟取暴利。因此，若能辨別蜂蜜之真偽即可避免購買摻假蜂蜜。然目前已普及之辨別蜂蜜品質及真偽之方法甚少，網路上流傳許多方法，但眾說紛紜，難以得知是否真能用以判定。國際食品法典委員會雖公開有可辨別蜂蜜之法，但過程過於繁複，一般民眾難以使用此種方法辨別蜂蜜。

天然蜂農蜜之一般成分分析顯示：蜂農蜜水分含量約 15.77~20.85%，灰分含量約 0.09~0.23% ，粗蛋白含量約 0.24~0.55%（鄭，2019）。而市面上普遍流通的摻假蜂蜜皆以單純的糖漿加上香精製成，對比以上參考文獻可知，天然蜂蜜與摻假蜂蜜之最大差異即為蛋白質含量，故我們推測只要能辨別蛋白質含量，便可達到辨識天然蜂蜜與摻假蜂蜜之效。

由於以化學合成法合成之三角形平板奈米銀粒子具可被蝕刻之特性，其稜角易隨蝕刻時間長短被磨平、變得圓鈍，進而導致其吸光光譜之波峰位置產生明顯差異（J. Am. Chem. Soc. 2010, 132, 1, 268－274）。故若存在可包覆住三角形平板奈米銀粒子稜角、且可防止其蝕刻之物質，即可用對比未蝕刻及已蝕刻樣本吸光光譜之差異加以辨識。因此我們想研究不同種類與濃度之蛋白質和蜂蜜是否具防止三角形平板奈米銀粒子蝕刻之效，進而判別蜂蜜蛋白質含量與真偽。若可以此法檢驗蜂蜜，只要將蜂蜜加

入奈米銀樣本，並以手機拍照後用相關軟體檢測其 RGB 值與吸光光譜變化，便可在不進入實驗室之情況下輕鬆辨別蜂蜜之真偽，成為一種簡單且易普及的辨識方法。

二、研究目的

(一)研究蜂蜜中的何種成分具有防止三角形平板奈米銀粒子蝕刻之效果

(二)研究不同種類之蛋白質對奈米銀蝕刻的影響

(三)研究蛋白質在變性前後對奈米銀蝕刻的影響

(四)研究不同濃度之蛋白質對奈米銀蝕刻的影響，並繪製出蛋白質濃度檢量線

(五)研究出不同種類之蜂蜜蛋白質與摻假蜂蜜對奈米銀蝕刻的影響，並對照蛋白質濃度檢量線，辨別出蜂蜜的蛋白質含量與真偽

(六)研究出可辨別蜂蜜真偽之奈米銀溶液色相區間，形成簡單又可有效辨別蜂蜜真偽之方法

三、文獻回顧

(一)蜂蜜之組成

蜂蜜為一種由蜜蜂採集植物蜜腺分泌的花蜜或昆蟲及其他植物的非蜜腺組織的分泌物蜜露後，再攜回巢中釀製與熟化所得的蜜汁（簡，2017）。蜂蜜的主要成分為醣類，另含少量的蛋白質、色素、維生素、礦物質、游離胺基酸、揮發性香氣成份及酵素等。其中蜂蜜所含之酵素中包括澱粉酶、葡萄糖氧化酶與觸酶等，透過檢測澱粉酶之活性多寡即可辨別蜂蜜真偽。蜂蜜不論優劣，只要為未摻假之蜂蜜，其澱粉酶活性值皆會遠高於摻假蜂蜜（許，2008），故推測蛋白質可用以作為檢測蜂蜜真偽之指標。

(二)我國蜂蜜國家標準

在 2016 年 6 月 8 日所公布的蜂蜜品質標準 CNS 1305 中，規定我國普通蜂蜜（非龍眼蜜）之水分含量不得高於 20% ；蔗糖含量不得高於 5 % ；糖類（果糖和葡萄糖含量之總和）含量不得低於 60 %；水不溶物含量不得高於 0.1% ；酸度不得高於 50 meq H+/1,000 g ；澱粉酶活性不得低於 8（Schade unit）；羥甲基糠醛不得高於 40 mg/kg 。

龍眼蜜之成分規範則為水分含量不得高於 20 %；蔗糖含量不得高於 2 %；糖類（果糖和葡萄糖含量之總和）含量不得低於 60 %；水不溶物含量不得高於 0.1% ；酸度不得高於 30 meq H+/1,000 g ；澱粉酶活性不得低於 8（Schade unit）；羥甲基糠醛不得高於 30 mg/kg。

(三)蜂蜜摻假檢測方法之研究

根據國際食品法典委員會（Codex Alimentarius Commission），採用穩定碳同位素分析方法可鑑別蜂蜜成分摻假。因大部分蜜蜂採蜜之花源屬 C3 植物，與常見用於摻假蜂蜜之商業糖漿原料如甘蔗、玉米等 C4 植物不同，可用兩者之 δ13C差異（ 12C 與 13C 之比值）辨別蜂蜜之真偽。判定的標準以 -21.5‰ 及 -23.5‰ 為界線，若　較 -23.5‰ 為負，則判定為純蜂蜜，較 -21.5‰ 為正，則判定為摻假蜂蜜。介於此範圍者則為可疑摻假蜂蜜。而可疑摻假蜂蜜可再以蜂蜜中蛋白質作為內標準品，計算蜂蜜之 δ13C 與蛋白質之 δ13C 差值，若正於 -1‰ 則可判定為純蜂蜜（簡，2017）。

蜂蜜中的醣類主要為葡萄糖及果糖，佔 95% 的固形物。根據研究，養殖蜂蜜、冬蜜與野生蜂蜜之果糖含量約為 38%、36% 與 45%。葡萄糖含量方面，冬蜜約27%，養殖蜂蜜約33%，野生蜂蜜約31%。因此，養殖蜂蜜的果糖和葡萄糖比值約在 1.1 到 1.2 之間，而野生蜂蜜約在 1.4 到 1.6 之間。其他研究也發現了不同種類的蜂蜜具特定的糖組成，可用以檢測是否摻入其他糖類。此外，醣類組成複雜，包括60-70%的單醣和10%的高聚合度寡醣及多醣，故可利用不同方法檢測蜂蜜中的寡醣成分，例如以高效陰離子交換層析等方法檢測糖漿是否摻假。

使用近紅外線光譜、拉曼光譜、低場核磁共振譜等方法亦可檢測摻假蜂蜜中不同糖漿的摻入，但因操作繁複，數據處理難度大（簡，2017）。

(四)奈米銀粒子結晶

合成奈米銀三角板結晶之機制分為以下兩種:

1.球形奈米銀粒子經由檸檬酸鈉光還原成三角形平板奈米銀粒子（鈉燈法）

當光照射在奈米球上，奈米球即產生同調性（coherent）的自由電子的運動，此同調性的電子運動，產生了一個所謂的極化子（polariton），此極化子可以產生一個強大的局部電場，造成周邊溶液中銀離子的分佈不均勻，極化子再驅使熱電子（hot electron）跳至銀離子的空軌域而將其還原，然後形成銀原子沈積在銀粒子

上。另外，熱電子的另一個相對的部分（hot hole熱電洞）則氧化檸檬酸根離子。由於表面電漿子所形成的電場具有方向性，故奈米銀會呈現空間非勻向（anisotropic）的生長。

2.化學合成法

在合成銀奈米粒子的過程中會加入覆蓋劑，覆蓋劑為配位基（Ligand）對奈米粒子的特定晶面選擇性吸附，以達到不同晶面成長的速率差，進而促進特定晶面的成長效果，配位劑的選擇吸附源自於對奈米粒子結合力的差別，取決於配位基的結構對稱性與晶體表面相符，以及大小和表面的晶格常數是否一致，所以在覆蓋劑的影響下，可以得到不同型態的奈米粒子。（陳，2014）

奈米銀粒子常以紫外光／可見光 (UV/Vis) 光譜儀及穿透式電子顯微鏡作為其粒子大小分佈及形狀的鑑定。奈米粒子的形狀越接近球體，其電子所受到的阻抗越小，振盪頻率越高，所對應的電磁波波長越短，反之若是形狀越是有稜有角，其電子所受到的阻抗越大，因此振盪頻率越小，所對應的電磁波波長越長。

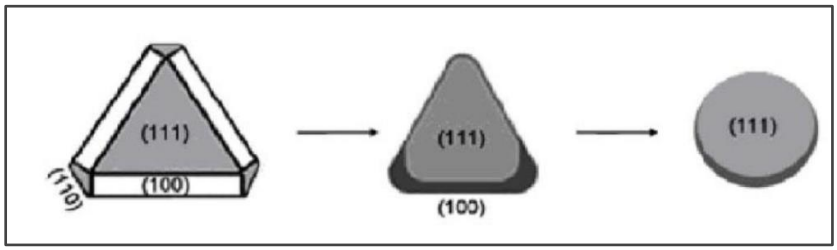
球形奈米銀粒子在吸收光譜中有一特性吸收譜帶，稱為表面電漿子共振譜帶，吸收波長位於 400 nm，與粒子的形狀和大小分佈有關。

三角形平板奈米銀粒子的特性譜帶主要有三，330 nm 附近的「出平面四極電漿子共振」、490 nm 附近的「平面四極電漿子共振」、650 nm 附近的「平面偶極電漿子共振 (In-plane dipole plasmon resonance)」，其中「平面四極電漿子」共振吸收波長和平板的厚度有關，而「出平面電漿子共振」吸收波長和三角形奈米銀粒子的邊長有關，故以紫外光／可見光光譜儀來測量此特性吸收譜帶，來推測合成出來的奈米銀粒子大小及形狀。（吳、陳、蔡，2010）

(五)奈米銀的蝕刻

三角奈米銀可利用添加鹵素鹽類啟動截角，三角奈米銀膠體溶液在添加適當濃度的鹵素鹽類溶液，顏色會由原本的藍轉變為最終的黃色。三角奈米銀平板主要由三個晶面組成，分別為代表面的{111}晶面、尖角的{110}晶面以及邊緣的{100}晶面，平板的尖角與邊緣是表面能量相對較高較不穩定的區域，鹵素離子會選擇這些不穩定的地方進行蝕刻截角的動作，被蝕刻下來的銀原子，一部分會沉積回到原先較穩定的{111}晶面。平板受到鹵素的蝕刻作用而截角，使得長徑比發生改變，長徑

比改變會影響電漿子的共振頻率，變成圓盤後相較於原先的三角平板長徑比小，於是平面偶極電漿子震盪頻率上升使得吸收波峰產生藍位移，而厚度在蝕刻過程中，隨著銀團簇堆疊而增加，因此出平面四極電漿子得頻率下降使得波峰發生了紅位移的現象。



圖一、三角平板奈米銀經鹽類（KBr）蝕刻過程示意圖（邱，2009）

硫與金或者銀具有不錯的鍵結能力，在溶液中添加含硫醇官能基分子使奈米銀的表面活性鈍化，以避免其被鹵素蝕刻。觀察三角奈米銀與添加含硫化合物16-MHDA (16-Mercaptohexadecanoic acid)後的光譜，可以看到添加 16-MHDA 使表面電漿共振光譜發生位移，此紅位移的現象代表著硫醇分子有修飾上三角奈米銀。而將已經添加過16-MHDA 的三角奈米銀膠體溶液添加的鹵素鹽類，可以看到光譜幾乎沒有任何變化，顯見含硫化合物可以保護三角奈米銀免於被鹵素離子截角。（邱，2009）（李，2010）（黎，2020）（陳，2019）

貳、研究設備及器材

一、實驗儀器

(一)鈉燈

(二)超音波震盪儀

(三)磁力攪拌器

(四)UV光譜儀（HITACHI/ U-3010）

二、實驗器材

(一)燒杯

(二)平底試管

(三)磁攪拌子/電磁攪拌器/取出棒

(四)微量吸量管/頭

(五)試管架

(六)定量瓶（ 10 毫升、50 毫升及 100 毫升）

(七)蒸餾水瓶

(八)鋁箔

(九)剪刀

(十)簽字筆

(十一)微量離心管

(十二)電子秤

(十三)手機（iPhone 15 Pro Max）

(十四)手機軟體 Color Picker

(十五)白紙

三、實驗材料

(一)硝酸銀（$AgNO_3$）

(二)硼氫化鈉（$NaBH_4$）

(三)檸檬酸

(四)10^{-4}M 溴化鉀（KBr）水溶液

(五)乳清蛋白/酪蛋白

(六)糖（砂糖、蔗糖）

(七)澱粉

(八)蒸餾水

(九)龍眼蜜

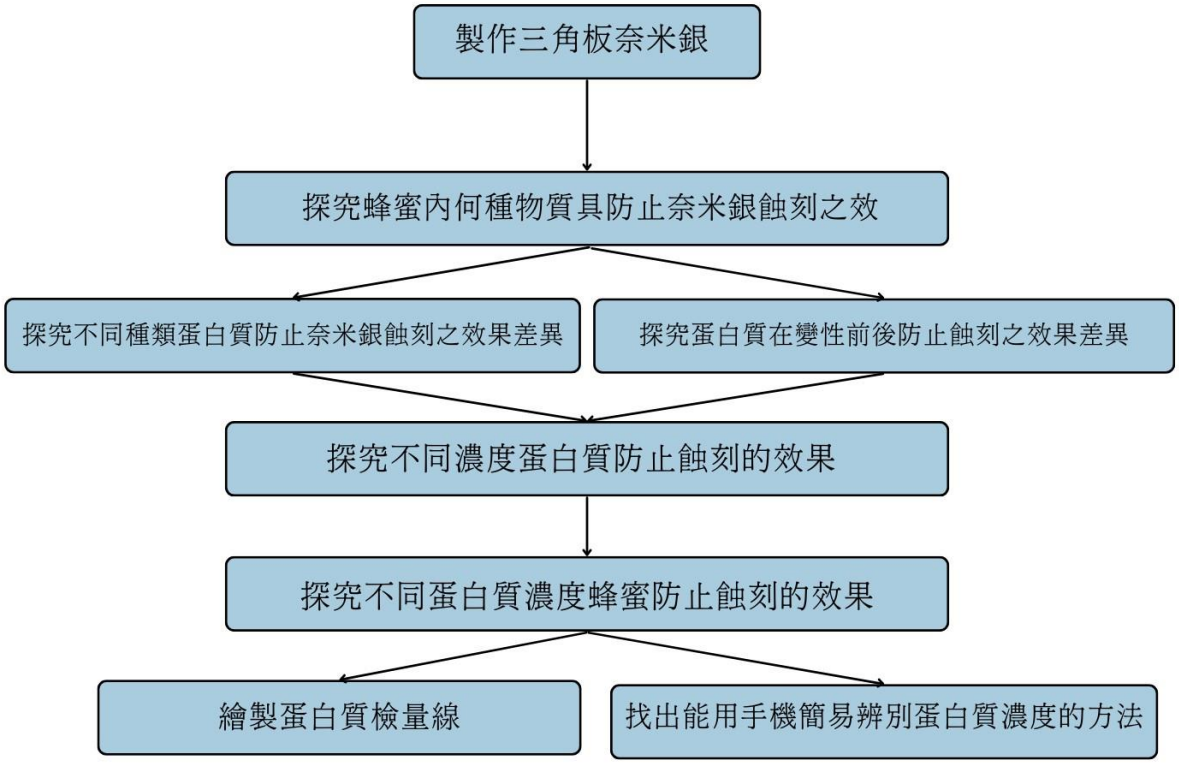
(十)一般蜂蜜（百花蜜）

龍眼蜜之營養標示	百花蜜之營養標示
	

表一、龍眼蜜與百花蜜之營養標示

參、研究過程或方法

一、實驗架構圖



圖二、實驗架構圖

二、研究方法及步驟

(一)製備三角形平板奈米銀粒子溶液

1.配製溶液

(1)以電子秤秤取 0.0170 克之硝酸銀（$AgNO_3$）後將其加入 10 毫升之定量瓶，並放入超音波震盪儀搖勻 3 分鐘後取出靜置備用

(2)以電子秤秤取 0.0880 克之檸檬酸後將其加入 10 毫升之定量瓶，並放入超音波震盪儀搖勻 3 分鐘後取出靜置備用

(3)以電子秤秤取 0.0189 克之硼氫化鈉後將其加入 100 毫升之定量瓶，並放入超音波震盪儀搖勻 3 分鐘後取出靜置備用

2.在燒杯中放入磁攪拌子後將其置於磁力攪拌器上，並加入 88 毫升之蒸餾水

3.加入 10 毫升之檸檬酸至燒杯中，並靜候3分鐘

4.以微量吸量管逐滴加入 1 毫升之硝酸銀至燒杯中，並靜候3分鐘

5.以微量吸量管用每 3~5 秒鐘一滴的速度加入 1 毫升之硼氫化鈉至燒杯中，靜候5分鐘後將所得溶液倒入平底試管中，再以鋁箔封口

6.將溶液以鈉燈照光 90 分鐘後即可得三角形平板奈米銀粒子溶液

(二)分別在三角形平板奈米銀粒子溶液中加入砂糖、蔗糖及蛋白質，並觀測其與添加相同體積蒸餾水的對照組對比其蝕刻結果差異

1.配製 100 ppm 之砂糖、蔗糖與乳清蛋白溶液，並分別以微量吸量管取出 0.1 毫升置於微量離心管中，再以簽字筆在離心管上標註

2.分別在三離心管中加入 0.5 毫升之蒸餾水及 0.1 毫升之溴化鉀

3.再取一離心管，其中放入 0.6 毫升之蒸餾水及 0.1 毫升之溴化鉀

4.在四離心管中加入 0.5 毫升之奈米銀溶液，並放入超音波震盪儀搖勻 5 分鐘，再將所得之四管溶液置入UV光譜儀，得其吸光光譜

5.比較並分析四者之吸光光譜差異

(三)分別在三角形平板奈米銀粒子溶液中加入不同種類與不同濃度之蛋白質，並觀測其與添加相同體積蒸餾水的對照組對比其蝕刻結果差異

1.分別配製不同濃度之乳清蛋白與酪蛋白之溶液後，各取 0.1 毫升分別加入不同離心管

2.分別在各離心管中加入 0.5 毫升之蒸餾水及 0.1 毫升之溴化鉀

3.再取一離心管，其中放入 0.6 毫升之蒸餾水及 0.1 毫升之溴化鉀

4.在各離心管中加入 0.5 毫升之奈米銀溶液，並放入超音波震盪儀搖勻 5 分鐘，再將所得之所有離心管溶液置入UV光譜儀，得其吸光光譜

5.比較並分析所得各吸光光譜差異

(四)分別在三角形平板奈米銀粒子溶液中加入不同濃度之未變性蛋白質與變性蛋白質，並觀測其與未添加其他物質的對照組之蝕刻結果差異

1.分別配製不同濃度之未變性之乳清蛋白與加熱至 100 ℃ 之變性乳清蛋白溶液後，各取 0.1 毫升分別加入不同離心管

2.重複(三)之步驟 2. ~ 5.

(五)分別在三角形平板奈米銀粒子溶液中加入不同濃度之蛋白質，並觀察在不同時間下之蝕刻結果差異，繪製出蛋白質檢量線

1.分別配製不同濃度之乳清蛋白溶液後，各取 0.1 毫升分別加入不同離心管

2.重複(三)之步驟 2. ~ 3.

3.在各離心管中加入 0.5 毫升之奈米銀溶液，並在放入超音波震盪儀搖勻 3、 5 與 7 分鐘後，將所得之所有離心管溶液置入UV光譜儀，得其吸光光譜

4.繪製出不同濃度乳清蛋白之檢量線

(六)分別在三角形平板奈米銀粒子溶液中加入不同蛋白質濃度之一般蜂蜜、龍眼蜜與摻假蜂蜜，並觀察三者之蝕刻程度差異

1.製備摻假蜂蜜：將 2 克的蒸餾水與 8 克的砂糖混合並充分攪拌，使其達飽和狀態

2.分別配製不同蛋白質濃度之一般蜂蜜、龍眼蜜與摻假蜂蜜溶液後，各取 0.1 毫升分別加入不同離心管

3.重複(三)之步驟 2. ~ 5.

(七)以手機拍照紀錄在加入不同蛋白質濃度與不同時間下，三角形平板奈米銀粒子的蝕刻結果差異，並以手機軟體 Color Picker 分析其溶液的色彩佔比

1.分別配製不同濃度之乳清蛋白溶液後，各取 0.1 毫升分別加入不同離心管

2.重複(三)之步驟 2. ~ 3.

3.在各離心管中加入 0.5 毫升之奈米銀溶液，並倒入塑膠比色槽中

4.將比色槽置於白紙上，並以手機拍攝各溶液在不同蝕刻時間下所呈之顏色

5.分析各待測溶液蝕刻後所呈之色相，並與(五)所得之實驗結果進行對比

(八)以手機拍照紀錄在加入不同蜂蜜所含蛋白質濃度與不同時間下，三角形平板奈米銀粒子的蝕刻結果差異，並以手機軟體 Color Picker 分析其溶液的色彩佔比

1.分別配製不同濃度之一般蜂蜜、龍眼蜜與摻假蜂蜜溶液後，各取 0.1 毫升分別加入不同離心管

2.重複(三)之步驟 2. ~ 3.

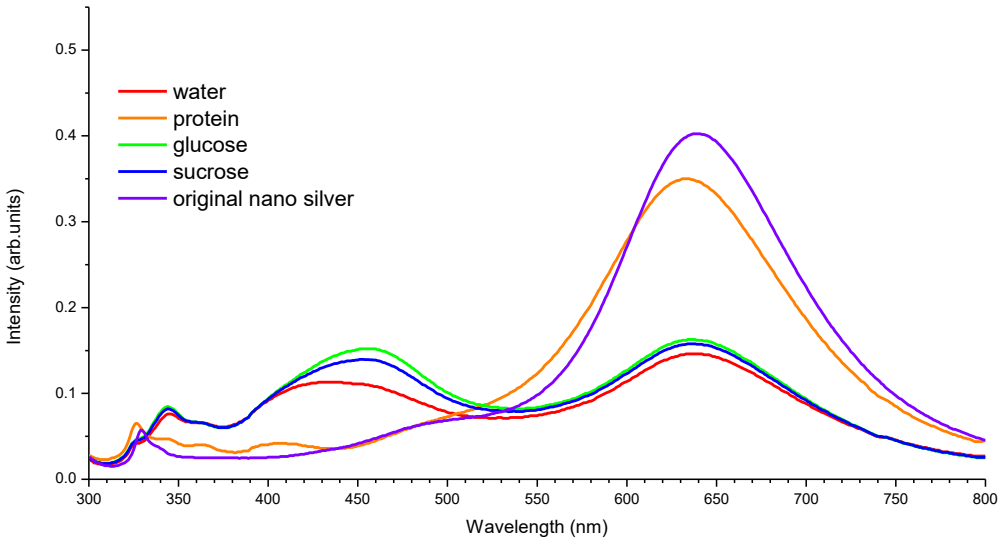
3.重複(七)之步驟 3. ~ 4.

4.分析各代測溶液蝕刻後所呈之色相，並與(六)所得之實驗結果進行對比

5.歸納出可辨別蜂蜜真偽之溶液色相區間

肆、研究結果

一、研究蜂蜜中的何種成分具有防止三角形平板奈米銀粒子蝕刻之效果

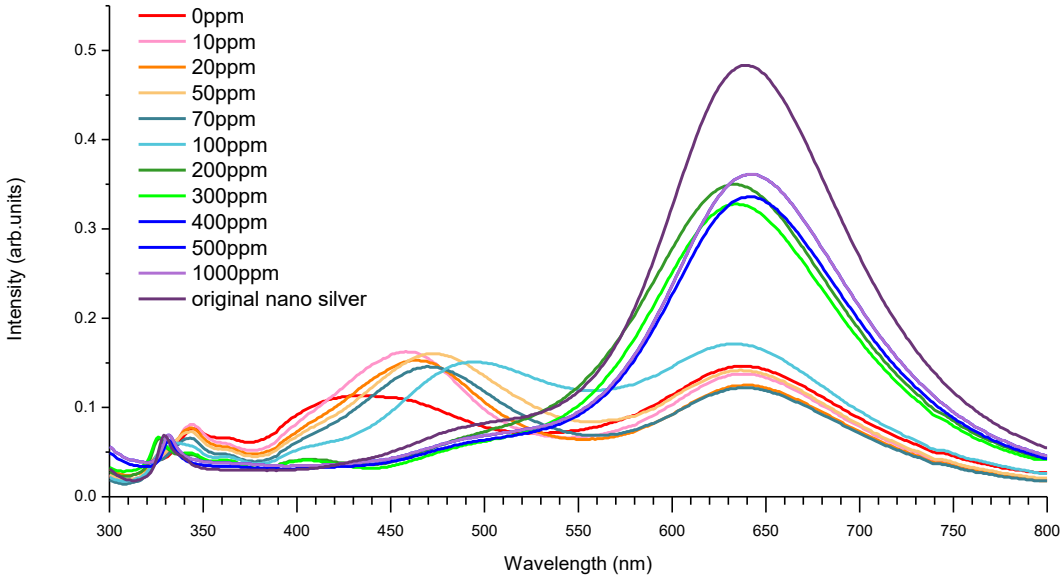


圖三、奈米銀溶液加入蜂蜜中各成分後蝕刻五分鐘之吸光光譜

（對照組為相同奈米銀樣品加入與實驗組加入的蛋白質溶液相同體積之蒸餾水，並以同濃度之 KBr 蝕刻）

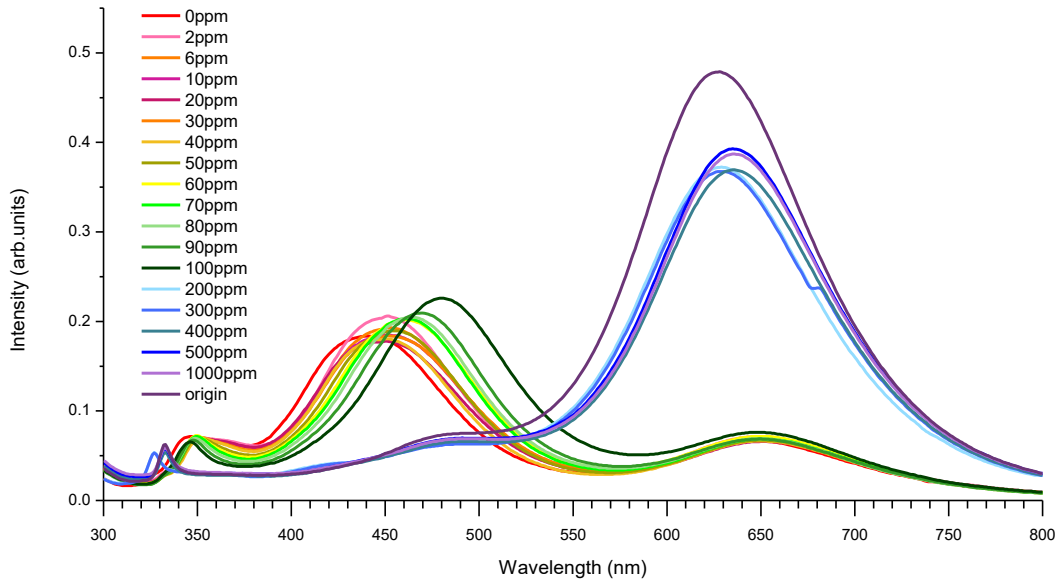
二、研究不同種類之蛋白質對奈米銀蝕刻的影響

(一)乳清蛋白對奈米銀蝕刻的影響



圖四、奈米銀溶液加入不同濃度之乳清蛋白後蝕刻五分鐘之吸光光譜

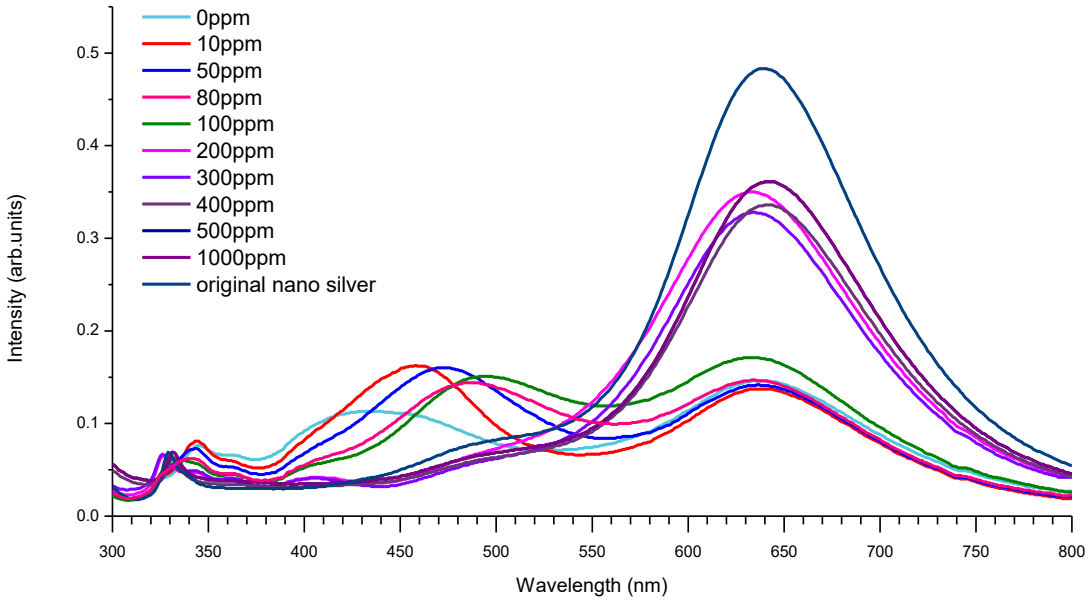
(二)酪蛋白對奈米銀蝕刻的影響



圖五、奈米銀溶液加入不同濃度之酪蛋白後蝕刻五分鐘之吸光光譜

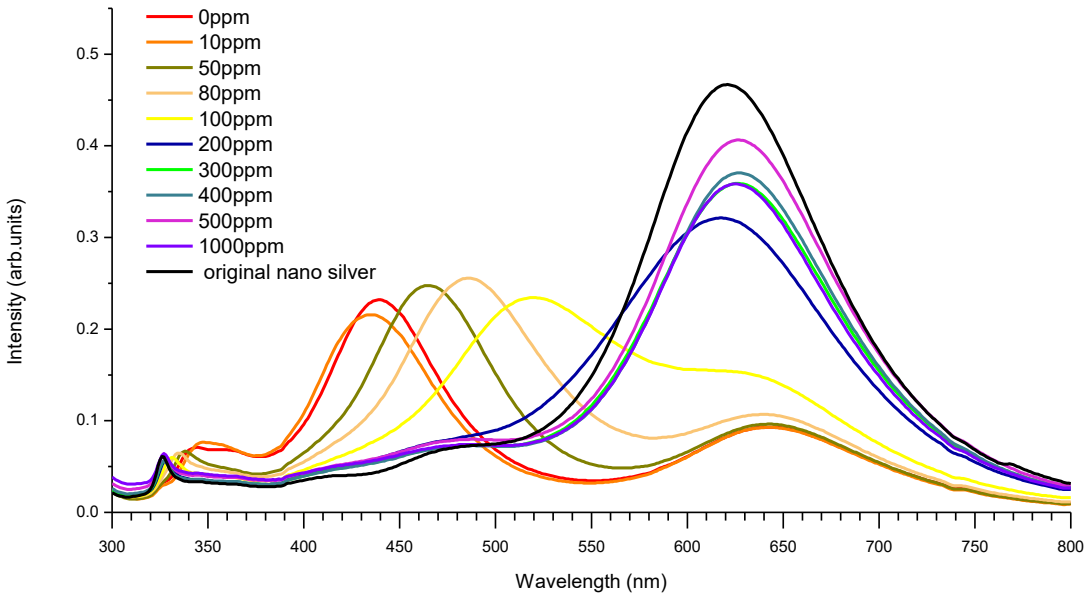
三、研究蛋白質在變性前後對奈米銀蝕刻的影響

(一)未變性蛋白質對奈米銀蝕刻的影響



圖六、奈米銀溶液加入不同濃度之未變性乳清蛋白後蝕刻五分鐘之吸光光譜

(二)變性蛋白質對奈米銀蝕刻的影響

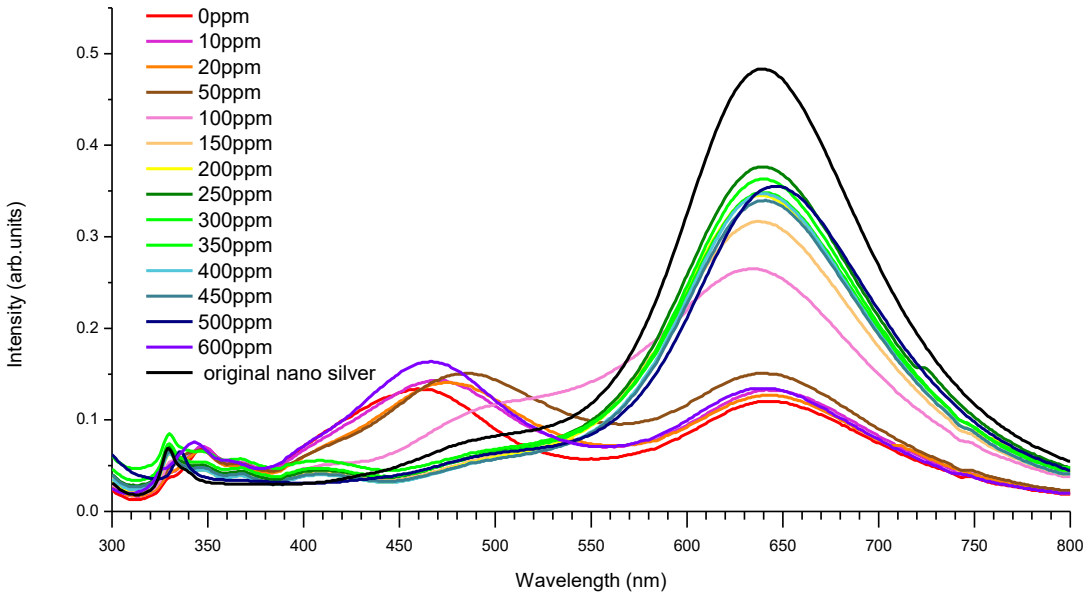


圖七、奈米銀溶液加入不同濃度之變性乳清蛋白後蝕刻五分鐘之吸光光譜

四、研究不同濃度之蛋白質對奈米銀蝕刻的影響，並繪製出蛋白質濃度檢量線

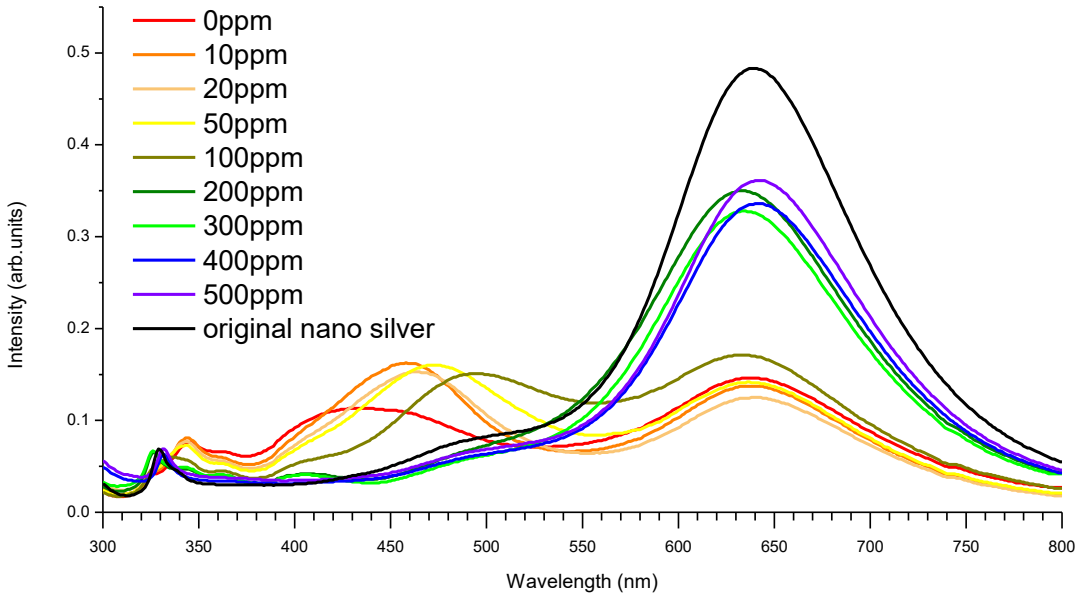
(一)研究蝕刻不同時長下的奈米銀吸光光譜，找出最利於辨識不同蛋白質濃度之蝕刻時長

1.奈米銀蝕刻三分鐘



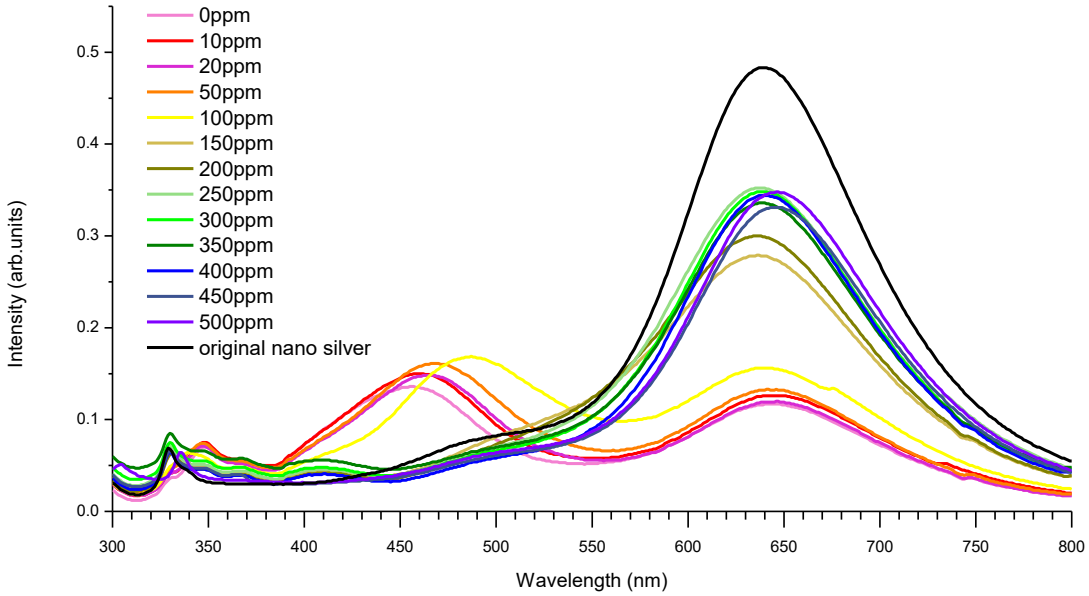
圖八、奈米銀溶液加入不同濃度之乳清蛋白後蝕刻三分鐘之吸光光譜

2.奈米銀蝕刻五分鐘



圖九、奈米銀溶液加入不同濃度之乳清蛋白後蝕刻五分鐘之吸光光譜

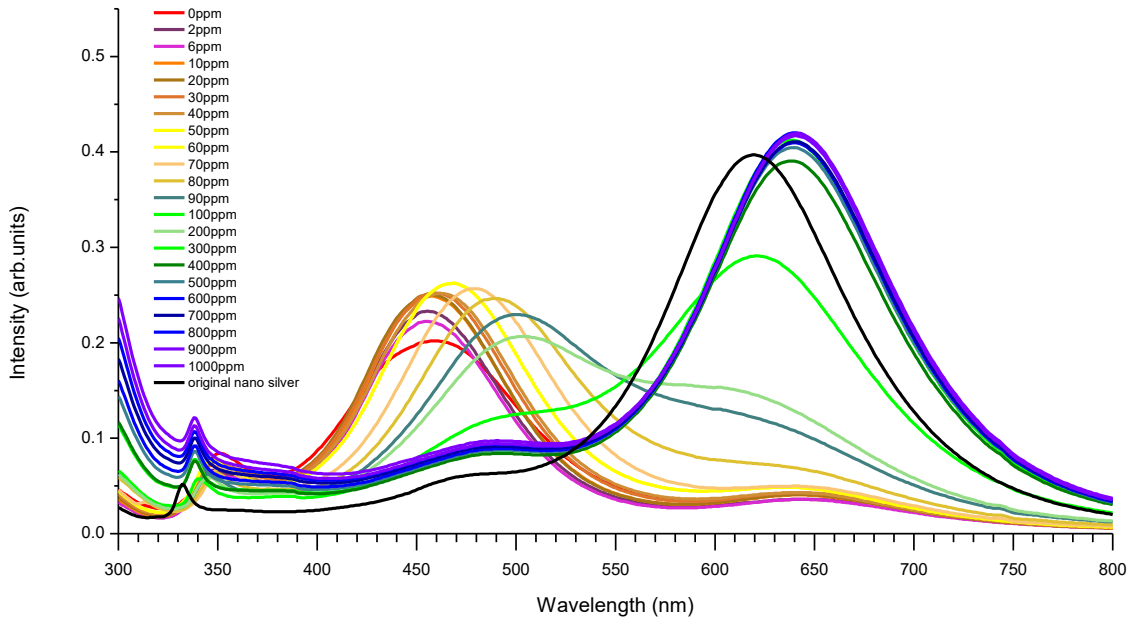
3.奈米銀蝕刻七分鐘



圖十、奈米銀溶液加入不同濃度之乳清蛋白後蝕刻七分鐘之吸光光譜

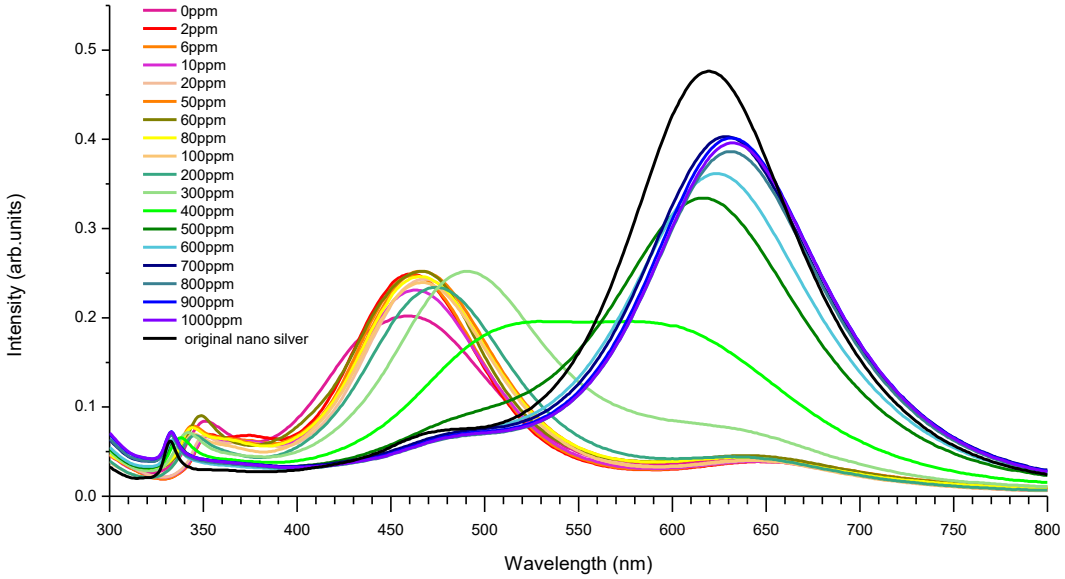
五、研究出不同種類之蜂蜜蛋白質與摻假蜂蜜對奈米銀蝕刻的影響，並對照蛋白質濃度檢量線，辨別出蜂蜜的蛋白質含量與真偽

(一)一般蜂蜜對奈米銀蝕刻的影響



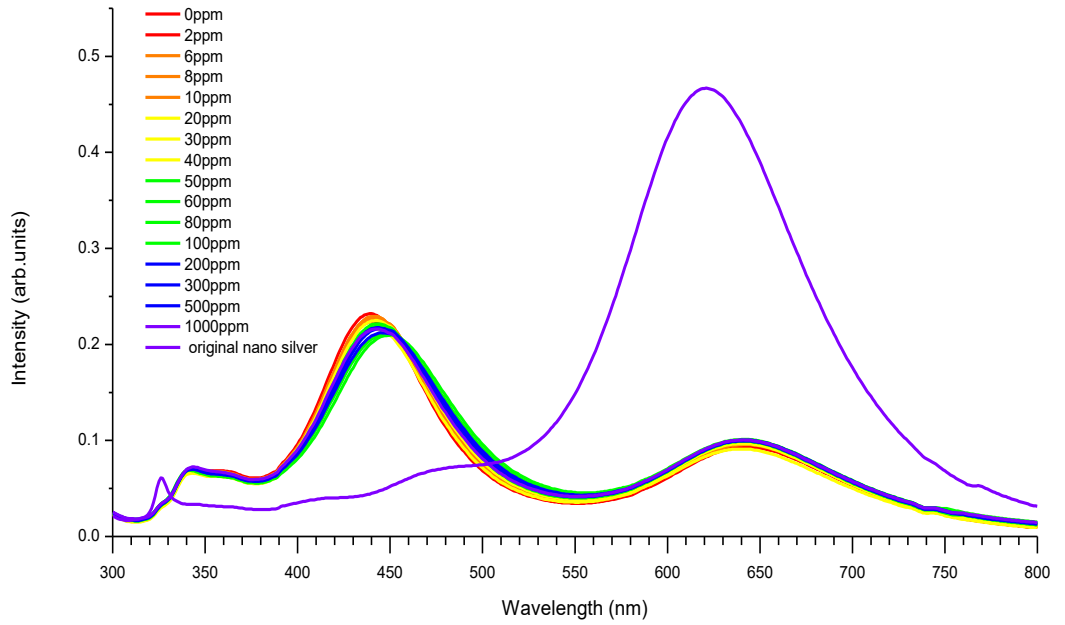
圖十一、奈米銀溶液加入不同蛋白質濃度之一般蜂蜜蝕刻五分鐘後之吸光光譜

(二)龍眼蜜對奈米銀蝕刻的影響



圖十二、奈米銀溶液加入不同蛋白質濃度之龍眼蜜蝕刻五分鐘後之吸光光譜

(三)摻假蜂蜜對奈米銀蝕刻的影響



圖十三、奈米銀溶液加入不同濃度之摻假蜂蜜龍眼蜜蝕刻五分鐘後之吸光光譜

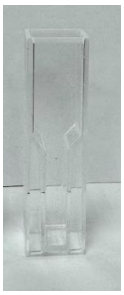
六、研究出可辨別蜂蜜真偽之奈米銀溶液色相區間，形成簡單又可有效辨別蜂蜜真偽之方法

(一)奈米銀溶液加入不同濃度之蛋白質蝕刻五分鐘後所呈之色相



圖十四、以手機拍攝奈米銀溶液加入不同蛋白質濃度之一般蜂蜜蝕刻五分鐘後之圖

（圖中加入蛋白質濃度（ppm）分別為 1000、900、800、700、600、500、400、300、200、100、90、80、70、60、50、40、30、20、10、6、2）

			
圖片名稱	背景 （空容器）	未蝕刻奈米銀 （純奈米銀稀釋）	對照組 （未加蛋白質）
RGB值	(199,208,203)	(50,161,182)	(160,180,126)
吸光度	無	(0.600,0.111,0.047)	(0.095,0.063,0.207)

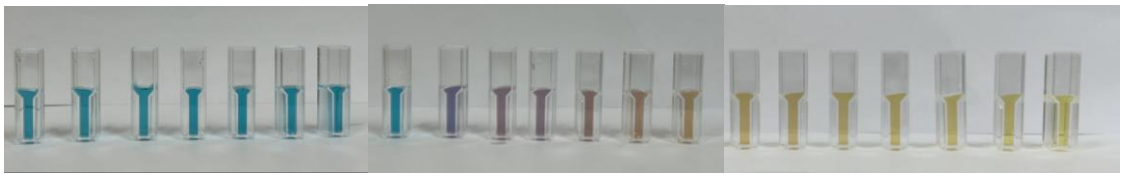
表二、背景、未蝕刻之奈米銀溶液與對照組奈米銀溶液蝕刻五分鐘之RGB值

表中吸光度為 RGB 經數據處理後，在 λ = 700.0 nm、546.1 nm、438.8 nm之吸光度。相關數據處理法在伍、討論中詳細敘述。

							
加入之蛋白質濃度(ppm)	2~30	40~60	70~80	90	100	200	300~1000
RGB值	(163,178,127)	(167,169,129)	(171,167,135)	(162,150,137)	(153,136,153)	(118,128,181)	(63,160,183)
吸光度	(0.087, 0.068, 0.204)	(0.076, 0.090, 0.197)	(0.066, 0.095, 0.177)	(0.089, 0.142, 0.171)	(0.114, 0.185, 0.123)	(0.227, 0.142, 0.171)	(0.500, 0.114, 0.045)

表三、奈米銀溶液中加入不同濃度之蛋白質蝕刻五分鐘之RGB值

(二)奈米銀溶液加入不同蛋白質濃度之一般蜂蜜蝕刻五分鐘後所呈之色相



圖十五、以手機拍攝奈米銀溶液加入不同蛋白質濃度之一般蜂蜜蝕刻五分鐘後之圖（圖中加入一般蜂蜜之蛋白質濃度（ppm）分別為 1000、900、800、700、600、500、400、300、200、100、90、80、70、60、50、40、30、20、10、6、2）

			
圖片名稱	背景（空容器）	未蝕刻奈米銀（純奈米銀稀釋）	對照組（未加蛋白質）
RGB值	(165,167,178)	(38,120,137)	(170,167,99)
吸光度	無	(0.638,0.144,0.114)	(-0.013,0.000,0.255)

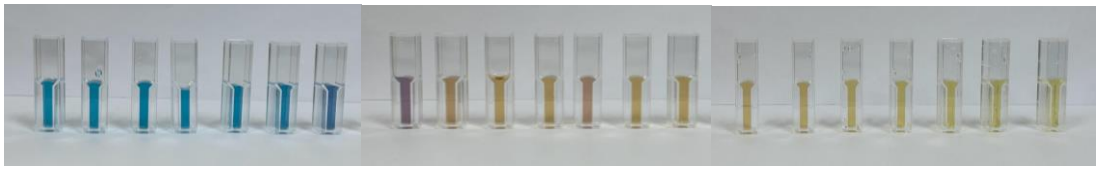
表四、背景、未蝕刻之奈米銀溶液與對照組奈米銀溶液蝕刻五分鐘之RGB值

					
加入之蜂蜜中蛋白質濃度(ppm)	2~10	20~40	50	60	70
RGB值	(166,155,98)	(166,155,98)	(156,142,96)	(123,103,97)	(123,103,107)
吸光度	(-0.003,0.032, 0.259)	(0.024,0.070, 0.268)	(0.062,0.119, 0.273)	(0.128,0.210, 0.264)	(0.128,0.210, 0.221)

					
加入之蜂蜜中蛋白質濃度(ppm)	80	90	100	200~300	400~1000
RGB值	(115,101,106)	(113,102,112)	(121,113,122)	(91,93,117)	(40,118,139)
吸光度	(0.157,0.218, 0.225)	(0.164,0.214, 0.201)	(0.135,0.170, 0.164)	(0.258,0.254, 0.182)	(0.615,0.151, 0.107)

表五、奈米銀溶液中加入不同蛋白質濃度之一般蜂蜜蝕刻五分鐘之RGB值

(三) 奈米銀溶液加入不同蛋白質濃度之龍眼蜜蝕刻五分鐘後所呈之色相

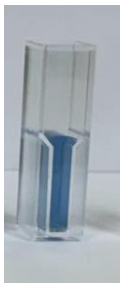


圖十六、以手機拍攝奈米銀溶液加入不同蛋白質濃度之龍眼蜜蝕刻五分鐘後之圖（圖中加入龍眼蜜之蛋白質濃度（ppm）分別為 1000、900、800、700、600、500、400、300、200、100、90、80、70、60、50、40、30、20、10、6、2）

			
圖片名稱	背景 （空容器）	未蝕刻奈米銀 （純奈米銀稀釋）	對照組 （未加蛋白質）
RGB值	(165,167,178)	(38,120,137)	(170,167,99)
吸光度	無	(0.638,0.144,0.114)	(-0.013,0.000,0.255)

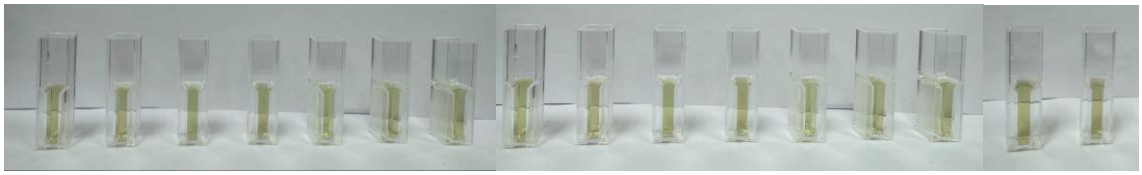
表六、背景、未蝕刻之奈米銀溶液與對照組奈米銀溶液蝕刻五分鐘之RGB值

					
加入之龍眼蜜中蛋白質濃度(ppm)	2~20	30~50	60~70	80	90
RGB值	(144,141,80)	(170,153,105)	(168,149,98)	(161,144,94)	(161,144,93)
吸光度	(-0.008,0.005,0.264)	(0.000,0.035,0.233)	(-0.003,0.055,0.268)	(0.011,0.064,0.277)	(0.011,0.064,0.282)

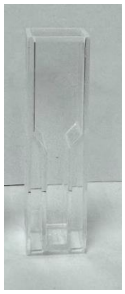
					
加入之龍眼蜜中蛋白質濃度(ppm)	100	200	300	400	500~1000
RGB值	(157,133,97)	(155,132,111)	(107,94,104)	(60,98,134)	(44,120,136)
吸光度	(0.022,0.099, 0.264)	(0.027,0.102, 0.205)	(0.188,0.250, 0.123)	(0.439,0.231, 0.123)	(0.574,0.144, 0.117)

表七、奈米銀溶液中加入不同蛋白質濃度之龍眼蜜蝕刻五分鐘之RGB吸光度值

(四) 奈米銀溶液加入不同濃度之摻假蜂蜜蝕刻五分鐘後所呈之色相



圖十七、以手機拍攝奈米銀溶液加入不同濃度之摻假蜂蜜蝕刻五分鐘後之圖

				
圖片名稱	背景	未蝕刻奈米銀	對照組	2-1000ppm
RGB值	(199,208,203)	(50,161,182)	(160,180,126)	(160,180,126)
吸光度	無	(0.600,0.111, 0.047)	(0.095,0.063, 0.207)	(0.095,0.063, 0.207)

表八、背景、未蝕刻之奈米銀溶液與對照組奈米銀溶液蝕刻五分鐘之RGB值

在本實驗中，所有實驗組奈米銀溶液之 RGB 值皆與對照組相同。

伍、討論

由文獻回顧可知，奈米銀三角板粒子溶液在吸光光譜上之波長位置約在 650 nm 處，而以被蝕刻之球形奈米銀粒子波長約在 400 nm處。在奈米銀三角板溶液中加入鹵素蝕刻，若未被蝕刻則溶液內多為奈米銀三角板，其在吸光光譜上之波峰（此波蜂在以下討論稱為波峰一）約在波長位置 650 nm左右；若奈米銀已被蝕刻，則溶液內會出現為球形奈米銀，表示除波峰一外，其吸光光譜波長位置約在 400nm處（此波蜂在以下討論稱為波峰二）會出現另一波峰。故觀察分析奈米銀吸光光譜上波峰之相對位置以及吸光值其大小即可推測其被蝕刻程度。

一、研究蜂蜜中的何種成分具有防止三角形平板奈米銀粒子蝕刻之效果

觀察分析圖三，可發現在蜂蜜所含成分當中，僅有加入了蛋白質（在此採用較易取得的乳清蛋白）的奈米銀溶液之吸光光譜在波長約 400 nm處未出現波峰二，表示溶液中的奈米銀未出現被截角之情形，且蛋白質具備防止奈米銀蝕刻之效。

單純加入了水、砂糖（成分包含葡萄糖及果糖）或蔗糖之奈米銀溶液之吸光光譜則皆出現了波峰二，且波峰一的吸光值也明顯變小，可知溶液中已有奈米銀遭到截角，故可知蜂蜜中除蛋白質外之成分皆不具防止蝕刻之效。

二、研究不同種類之蛋白質對奈米銀蝕刻的影響

觀察分析圖四，可發現加入了各濃度乳清蛋白之奈米銀溶液蝕刻五分鐘後的吸光光譜圖形上，波峰一之位置與波鋒二之波長位置差值隨著加入的蛋白質濃度遞增而遞減，而加入濃度在 100 ppm 以上乳清蛋白之奈米銀溶液之吸光光譜上未出現波峰二，故知其可防止奈米銀蝕刻。

而觀察分析圖五則可發現，其與圖四出現了相似的效果，可知酪蛋白與乳清蛋白同具防止奈米銀蝕刻之效，表示防止蝕刻的現象並非僅在單一種蛋白質上出現，具通用性。而乳清蛋白與酪蛋白兩者常見蛋白當中，由於酪蛋白溶液配製過程較為不易，故往後實驗所使用之蛋白質皆使用乳清蛋白。

三、研究蛋白質在變性前後對奈米銀蝕刻的影響

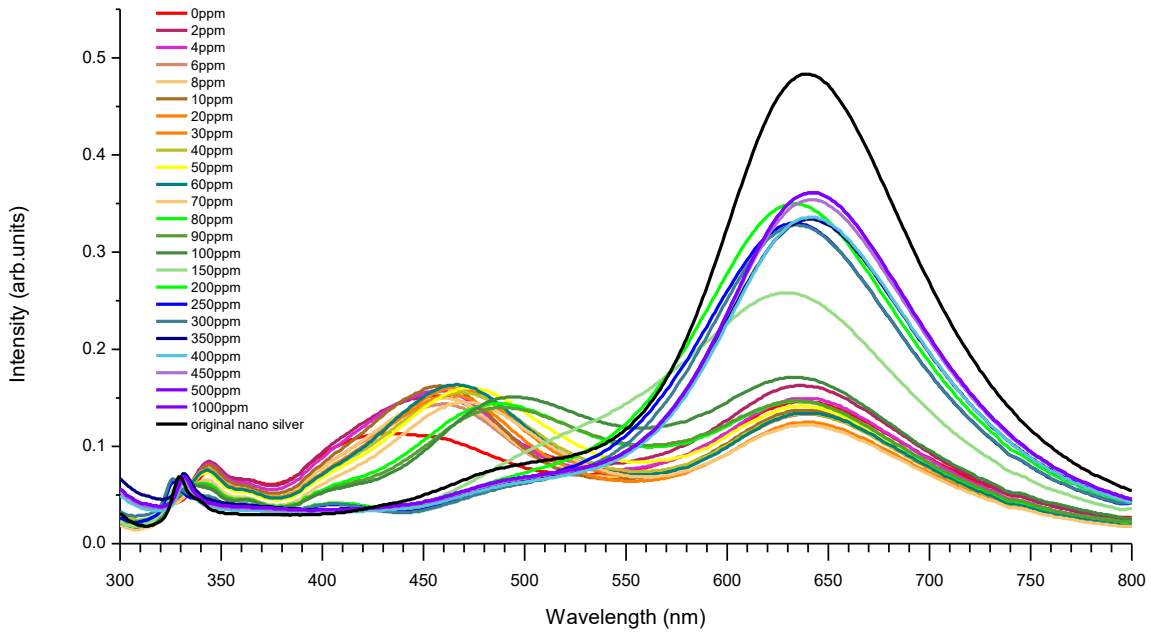
觀察分析並對照圖六及圖七，可發現乳清蛋白在變性前與變性後對於防止蝕刻的效果無太大改變，加入已變性蛋白質之奈米銀溶液吸光光譜上之波峰二的吸光值雖比加入未變性蛋白稍高，但兩者吸光光譜上波峰一與波峰二之位置並無太大變化，因此在經反覆實驗後，我們推測乳清蛋白變性後應不會對其所含的硫醇基（蛋白質可防止三角板奈米銀被蝕刻之主因）之結構造成顯著影響，故仍具備防止蝕刻之效。由此可證，即使在實驗環境中存在溫度變化（100 ℃以下），也不會造成實驗結果之差異。

四、研究不同濃度之蛋白質對奈米銀蝕刻的影響，並繪製出蛋白質濃度檢量線

(一)研究蝕刻不同時長下的奈米銀吸光光譜，找出最利於辨識不同蛋白質濃度之蝕刻時長

觀察分析圖八、圖九與圖十，可發現在蝕刻五分鐘的條件下，吸光光譜在波長約 400奈米處的波峰二出現的濃度分界最為清晰。在蝕刻三分鐘的實驗中，有幾組奈米銀溶液尚未能完全截角，而蝕刻七分鐘的實驗結果則顯示幾乎所有待測溶液皆完成截角，不利於繪製檢量線，故往後實驗皆選擇以五分鐘作為蝕刻時長。

(二)繪製蛋白質濃度檢量線



圖十八、奈米銀溶液加入不同濃度之乳清蛋白後蝕刻五分鐘之吸光光譜

透過上述實驗結果可發現，加入各蛋白質濃度蝕刻五分鐘後的吸光光譜上，在波長約330、400 與 650 nm處各有一波峰，而在約 400 與 650 奈米處之波峰（即波峰二與波峰一）與奈米銀截角之現象間的關聯更為明顯，兩者在橫軸上的位置隨著加入蛋白質濃度增加成一定趨勢移動，兩波峰的吸光值也會隨之變化。故檢量線的繪製將會與此二波峰之波長位置相關。

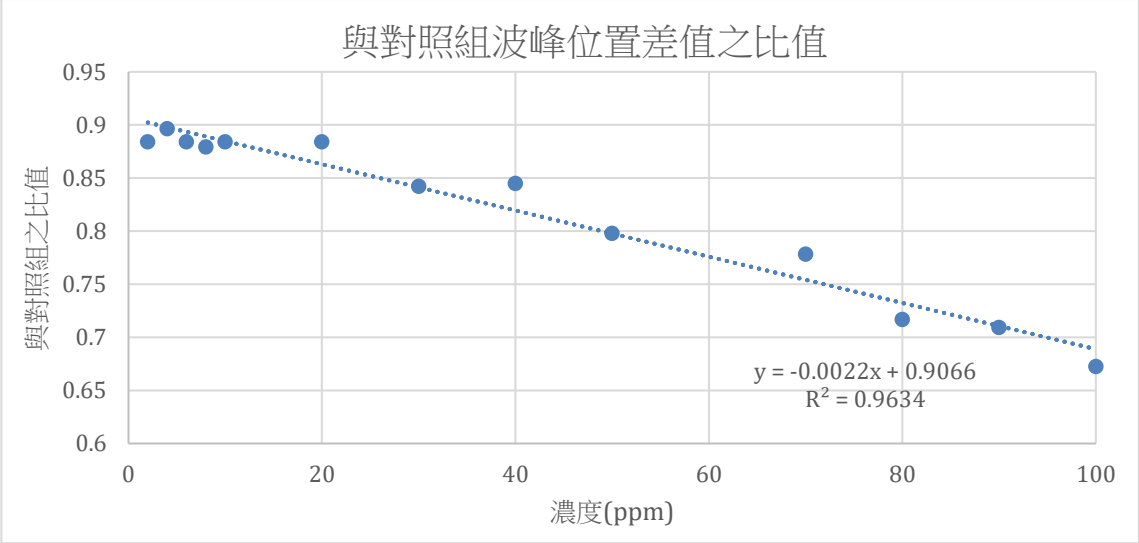
波峰二的波長位置會隨著加入蛋白質濃度減少而逐漸藍移（往300nm處），而吸光值則逐漸增加。波峰一則恰相反，其波長位置隨著加入蛋白質濃度減少會逐漸紅移（往700nm處），且吸光值減少。觀察到此現象後，我們分別繪製出了兩波峰位置的變化趨勢圖，然而發現其變化量不大，容易受實驗誤差影響，也不具明顯趨勢，不足以繪製出檢量線。

再次檢視吸光光譜後，我們發現在加入蛋白質在低濃度（0 ~ 90 ppm）時可以明顯區別兩波峰，且距離較遠；在高濃度（100 ppm以上）時僅出現波峰一；在臨界濃度（100 ppm）時則可觀察到兩波鋒的距離十分接近，有合併的趨勢。因此，在加入低濃度蛋白質的情況下，將兩波峰間波長位置差與濃度之關係繪圖後，我們即發現濃度越高兩波鋒距離越近的趨勢明顯。但考慮到每次實驗做出的奈米銀品質與對照組（未加入蛋白質）之吸光光譜圖都會有些許不同，必須找到方法以校正此實驗誤差。是故我們將兩波峰的波長位置差值除以對照組（相同奈米銀樣品加入與實驗組加入的蛋白質溶液相同體積之蒸餾水，並以同濃度之 KBr 蝕刻）的兩波峰波長位置差值，即可校正不同奈米銀樣品所產生的誤差，增加實驗的再現性。

加入奈米銀之蛋白質濃度	三角板奈米銀波峰(650nm處)位置(nm)	球形奈米銀波峰(400nm處)位置(nm)	三角板(650nm)、球形(400nm)波峰位置差值	實驗組與對照組(0ppm)波峰位置差值之比值
對照組(0ppm)	636	433	203	1
2ppm	635	455.5	179.5	0.8842
4ppm	638.5	456.5	182	0.8966
6ppm	640	460.5	179.5	0.8842
8ppm	640	461.5	178.5	0.8793
10ppm	637.5	458	179.5	0.8842
20ppm	638	463	175	0.8620
30ppm	638.5	467.5	171	0.8424
40ppm	636	468.5	167.5	0.8251
50ppm	636	474	162	0.7980
60ppm	634	473	161	0.7931
70ppm	634	482	152	0.7488
80ppm	633.5	488	145.5	0.7167
90ppm	633	489	144	0.7094
100ppm	633	496.5	136.5	0.6724

表九、不同蛋白質濃度之三角板奈米銀波峰與球型奈米銀波峰位置

最後，再將加入的蛋白質濃度與得到的比值繪製成 XY 散佈圖，發現比值有隨著濃度增加減少的趨勢，以 Excel擬合成線性回歸直線可得 $y = -0.0022x + 0.9066$，R^2 值為 0.9634。



圖十九、蛋白質濃度檢量線

此回歸直線 y = -0.0022x + 0.9066即可作為蛋白質濃度檢量線。將未知濃度蛋白質溶液加入奈米銀，並以 KBr 進行蝕刻後，繪製出的吸光光譜圖兩波峰波長位置差值除以對照組兩波峰波長位置得出的比值為 y 值，再代入此檢量線，可得其蛋白質濃度。但此檢量線仍具限制，因只要蛋白質濃度超過了 100 ppm 以上，吸光光譜上即不會同時出現波峰一與波峰二，不存在波峰差值。故希望在未來的研究當中，我們可以擴大此檢量線的使用區間，增添其實用性。

五、研究出不同種類之蜂蜜蛋白質與摻假蜂蜜對奈米銀蝕刻的影響，並對照蛋白質濃度檢量線，辨別出蜂蜜的蛋白質含量與真偽

觀察分析並比較圖十一、圖十二、圖十三與圖十八，可發現除圖十三以外，其他三者波峰位移趨勢相近，可由此分辨出假蜂蜜中不含蛋白質且不具防止蝕刻之效，而圖十一與圖十二則可證明一般蜂蜜與龍眼蜜中皆含蛋白質，對奈米銀具保護效果，為真蜂蜜。依據蜂蜜品質標準 CNS 1305，我國一般蜂蜜與龍眼蜜對於蛋白質含量之規範相同，故可推知兩者防止奈米銀蝕刻之效力相近，與實驗結果相符。

然而，若嘗試將圖十一與圖十二中所得之各蜂蜜中所含蛋白質濃度下波峰位置差值擬合成回歸直線，可發現其 R^2 值皆介於 0.6 與 0.7 之間，趨勢仍大致吻合，但相較圖十九中回歸直線的 R^2 值小了很多，不足以作為檢量線。我們推測此應是因為蜂蜜為混合物導致其中蛋白質分布不均的緣故。

六、研究出可辨別蜂蜜真偽之奈米銀溶液色相區間，形成簡單又可有效辨別蜂蜜真偽之方法

由比爾-朗伯定律，可知吸光度A=-log $\frac{I_t}{I_0}$（其中I_0為入射光的強度、I_t為透射光的強度），將經分析所得樣品之RGB值與背景之 RGB 值代入此公式，即可得到此樣品分別在R紅色（λ=700.0nm）、G綠色（λ=546.1nm）以及B藍色（λ=438.8nm）之吸光度。（MIHAI&STRĂJESCU，2010）

觀察分析表三、表五及表七中加入蛋白質濃度與其 RGB 吸光度可發現，隨加入蛋白質濃度上升，紅色（λ=700.0nm）之吸光度逐漸增加；藍色（λ=438.8nm）之吸光度逐漸減少；而綠色（λ=546.1nm）之吸光度增減則無一定規律。此結果恰與圖十六奈米銀溶液加入不同濃度之乳清蛋白後蝕刻五分鐘之吸光光譜中隨加入蛋白質濃度上升，波峰二吸光值增加、波峰一吸光值減少的結果相符。

透過拍照分析 RGB 值方法可得知蛋白質濃度之大約區間。因摻假蜂蜜中不含蛋白質，故加入摻假蜂蜜之實驗組蝕刻後顏色與吸光度皆與對照組相同。當加入蛋白質濃度界於 2~30 ppm 以下時，各實驗組防止奈米銀蝕刻效果皆不佳，蝕刻後顏色相當接近對照組（加入蛋白質含量0ppm），故無法直接用拍照區分；同理，當加入蛋白質濃度界於 400~1000 ppm 以上時防止奈米銀蝕刻效果極佳，各實驗組加入奈米銀蝕刻後顏色相當接近未蝕刻奈米銀，無法直接以拍照區分。

對照表三、表五及表七可發現相同蛋白質濃度之蛋白質溶液、一般蜂蜜及龍眼蜜防止奈米銀蝕刻之效果大致相同，但一般峰蜜及龍眼蜜防止奈米銀蝕刻效果較不穩定，此結果與前面討論第五點中的分析相同，可能源自於蜂蜜成分的不穩定度。另外，雖然不同奈米銀樣品之間的品質可能有所差異，但其顏色與 RGB 值皆差異不大，故對實驗結果無太大影響。

七、誤差討論

(一)奈米銀樣品品質差異

由於奈米銀樣品在配製完成後會漸漸變質，故需時常重新配製奈米銀，導致每次配製出的奈米銀樣品品質不一，其吸光光譜上顯示的各波峰波長位置及吸光值也不盡相同。針對此實驗誤差，我們在繪製蛋白質檢量線時以實驗組得出的結果與當次實驗使用的奈米銀樣品對照組（相同奈米銀樣品加入與實驗組加入的蛋白質溶液

相同體積之蒸餾水，並以同濃度之 KBr 蝕刻）彼此進行校正，最終才得以改善此實驗誤差，順利繪出R^2 值大於 0.95 之回歸直線。

(二)蜂蜜中蛋白質濃度含量差異

蜂蜜為混合物，非勻相溶液，因此在依據蜂蜜的營養成分標示配製蜂蜜中所含蛋白質之溶液時，無法準確判定我們所取樣的蜂蜜中各成分的濃度是否真如營養成分標示上所示。為避免影響實驗結果，我們將蜂蜜拌勻後，分別在蜂蜜罐中的不同位置取樣蜂蜜並反覆實驗，再將所得實驗數據平均後重新繪製成吸光光譜，但仍無法完全避免此現象所導致的誤差。

(三)以手機拍攝奈米銀溶液實驗組之光線與背景差異

以手機拍攝奈米銀溶液實驗組時，因每次盛裝容器的擺放位置皆略有不同，且照光條件及背景顏色無法保持完全一致，容易產生陰影影響測出的 RGB 值。另外手機光學鏡頭的精密度以及內建軟體在處理影像時也可能造成的影像失真，導致實驗結果產生影響。為保持拍攝環境一致，我們使用相同的儀器拍攝以及相同的白紙作為背景，並標示盛裝容器的擺放位置，維持照光亮度與角度不變，即可得出更準確之實驗結果。

陸、結論

一、結論

(一)蜂蜜中具防止奈米銀蝕刻之效的關鍵成分為蛋白質

(二)不同種類之蛋白質都可防止奈米銀蝕刻，且保護效果大致相同

(三)蛋白質在未變性與已變性的情況下吸光光譜波峰位置大致相同，具相同防止奈米銀蝕刻之效果

(四)蛋白質防止奈米銀蝕刻五分鐘之臨界濃度為 100 ppm，若濃度大於 100 ppm 則可以完全防止奈米銀被蝕刻；若濃度小於 100 ppm 則奈米銀會隨蛋白質被蝕刻程度會隨加入蛋白質濃度遞減而遞增

(五)當加入奈米銀溶液中的蛋白質濃度遞減，在蝕刻時間相同的條件下，奈米銀溶液的吸光光譜上波長位置約 400 nm之波峰（以下稱波峰一）逐漸藍移、吸光值增加，波長位置約 650 nm之波峰（以下稱波峰二）則逐漸紅移、吸光值減少，兩波峰位置彼此距離漸遠，表示奈米銀遭蝕刻的程度越大

(六)運用吸光光譜右側兩波峰位置距離隨蛋白質濃度下降而增加的趨勢可做出檢量線，而當加入奈米銀之蛋白質濃度大於 100 ppm 時，其吸光光譜上波峰一不明顯，無法判斷其與波峰二之波長位置差值，故蛋白質檢量線有效範圍為 0~100 ppm

(七)相同蛋白質濃度之龍眼蜜與一般峰蜜防止奈米銀蝕刻之效果大致相同，且可用蛋白質檢量線檢驗其蛋白質濃度

(八)若依蜂蜜營養成分標示配製出各濃度的蜂蜜中所含蛋白質溶液與純蛋白質溶液防止蝕刻的效果大致相同，則此蜂蜜為真；若前者防止蝕刻之效明顯較差，則此蜂蜜可能為稀釋過後或完全不含蛋白質之摻假蜂蜜，而將所得實驗結果代入蛋白質檢量線可大致釐清蜂蜜樣品的摻假程度

(九)以手機拍照分析所得奈米銀溶液蝕刻後之 RGB 值，可推知加入奈米銀中的蜂蜜所含蛋白質濃度的大致區間，進而鑑別蜂蜜之真偽。隨所含蛋白質濃度上升，R（ λ =700nm）之吸光度會增加，而 B（ λ=439nm）吸光度則減少

二、未來展望

(一)奈米銀製程改良

本次實驗中的奈米銀三角板是以鈉燈法製成，而鈉燈法所製之奈米銀雖品質穩定，但需用到一般實驗室不常有的鈉燈，且其中所用藥品之一硼氫化鈉（$NaBH_4$）較難取得。另一種奈米銀製法——化學合成法成功率低，製出之奈米銀品質也較不

穩定，與鈉燈法各有缺點。因此若要使本研究中歸納出的鑑別蜂蜜之法更普及，需要改良出較簡易、成功率高之奈米銀製法。

(二)找出最適合蝕刻之 KBr 濃度

因本次實驗著重在研究蛋白質防止奈米銀被鹵鹽蝕刻之效果，並未深入探究用以蝕刻奈米銀的 KBr 之最適當濃度區間，希望在未來可加以研究此方面。

(三)擴大蛋白質檢量線有效使用區間

本次實驗中雖成功繪出了蛋白質檢量線，但其有效使用區間有限，故希望在未來能研究出擴大其有效使用區間的方法。

(四)進一步探討蛋白質內硫醇基與保護蝕刻效果的關係

目前實驗只確定保護蝕刻效果與蛋白質內的硫醇基有關聯，若未來找出蛋白質保護蝕刻效果與其含硫百分比之確切關係，則可針對一特定種類蛋白質做出更精確的濃度檢量線

(五)深入探討蛋白質濃度與其加入奈米銀蝕刻後之RGB值關係

本實驗目前找出一些特定濃度蛋白質加入奈米銀蝕刻後的呈色，拍照並得到其RGB值以及吸光度，但只能確定其濃度大約位在何區間內，若找出濃度與其吸光度數值關係便可以測得更準確蛋白質濃度，不需要用精密UV光譜儀、只用手機便能確定蛋白質濃度，達到本實驗在日常生活中簡易測得蛋白質濃度的目的。

柒、參考文獻資料

一、曹碧鳳（2002）。蜂蜜真偽之鑑定及其品質之評估。

二、鄭宜鳳（2019）。蜂蜜蛋白體特徵於蜂蜜的糖漿、產國及蜜源摻偽鑑定

三、簡亦翎（2017）。以醣類及酚類組成作為蜂蜜摻假的指標

四、陳泓安、賴勁翰（2007）。分子篩包覆奈米銀製作與應用

五、Martin J. Mulvihill, Xing Yi Ling, Joel Henzie, and Peidong Yang.(2010).Anisotropic Etching of Silver Nanoparticles for Plasmonic Structures Capable of Single-Particle SERS
六、羅翊瑋、楊水平（2011）。化學實驗室實驗：銀奈米粒子的合成（Synthesis of Silver Nanoparticles）
七、陳冠達（2019）。探討不同烷基鏈之硫醇分子對十面體膠體奈米銀之吸附動力學
八、許婷琬（2008）。利用電子鼻及電子舌辨別蜂蜜真假之研究
九、黎偉杰（2020）。探討不同長度烷基鏈之硫醇分子對平板奈米銀之吸附動力學
十、李燿彰（2010）。探討溫度對光誘導銀奈米粒子生成的影響
十一、邱仕宏（2009）。探討以三角平板奈米銀為基質且在不同激發波長下的各種指示劑表面增強拉曼散射效應
十二、吳世雄、陳育如、蔡旻志（2007）。舊鈔變新鈔—奈米銀抗菌大作戰
十三、Dragoş MIHAI&Eugen STRĂJESCU.(2010). FROM WAVELENGTH TO RGB FILTER. U.P.B. Sci. Bull., Series D, Vol. 69, No. 2, 2007

【評語】052205

1. 以蜂蜜中所含之微量蛋白質可以保護奈米銀，避免蝕刻之假說，以探討鑑別蜂蜜真偽之可行性。

2. 研究構想佳，試驗設計與試驗測試符合科學精神、循序漸進，獲得科學論證。

3. 本次開發之檢測方法應可以利用更多的蜂蜜樣品(包括摻入樣品)加以測試、驗證，將可提高此方法的可信度及實際應用性。

作品簡報

以奈米銀蝕刻法
鑑別蜂蜜之真偽

摘要

為研究以奈米銀蝕刻法鑑別蜂蜜之真偽之可行性，我們先藉由實驗與調查文獻發現蛋白質為蜂蜜可以防止三角板奈米銀被溴化鉀蝕刻成球形奈米銀的關鍵物質，並探究蛋白質在不同種類、變性前後、不同蝕刻時間與不同濃度的條件下防止奈米銀蝕刻之效果差異。接著，我們以不同蜂蜜配製不同蛋白質濃度的溶液進行奈米銀蝕刻實驗，並與純蛋白質溶液的實驗結果進行比較，發現兩者吸光光譜之波峰位移趨勢大致吻合，證明此法可作為判定蜂蜜真偽之標準。最後，我們利用奈米銀溶液在不同蝕刻程度下呈不同顏色的特質，透過手機軟體分析其 RGB 值，歸納出以手機即可簡易辨別蜂蜜蛋白質含量之法。

壹、研究目的

一、研究蜂蜜中的何種成分具有防止三角形平板奈米銀粒子蝕刻之效果

二、研究不同種類之蛋白質對奈米銀蝕刻的影響

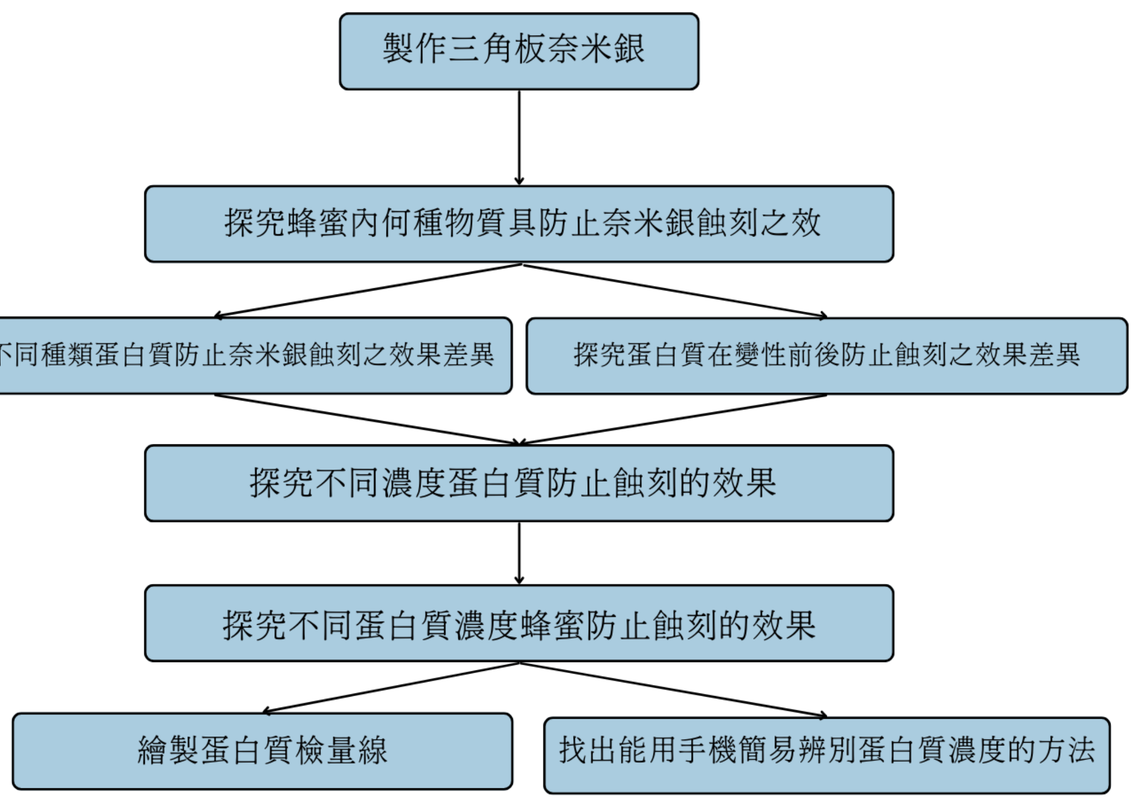
三、研究蛋白質在變性前後對奈米銀蝕刻的影響

四、研究不同濃度之蛋白質對奈米銀蝕刻的影響，並繪製出蛋白質濃度檢量線

五、研究出不同種類之蜂蜜蛋白質與摻假蜂蜜對奈米銀蝕刻的影響，並對照蛋白質濃度檢量線，辨別出蜂蜜的蛋白質含量與真偽

六、研究出可辨別蜂蜜蛋白質含量之奈米銀溶液色相區間，形成簡單又可有效辨別蜂蜜蛋白質含量之方法

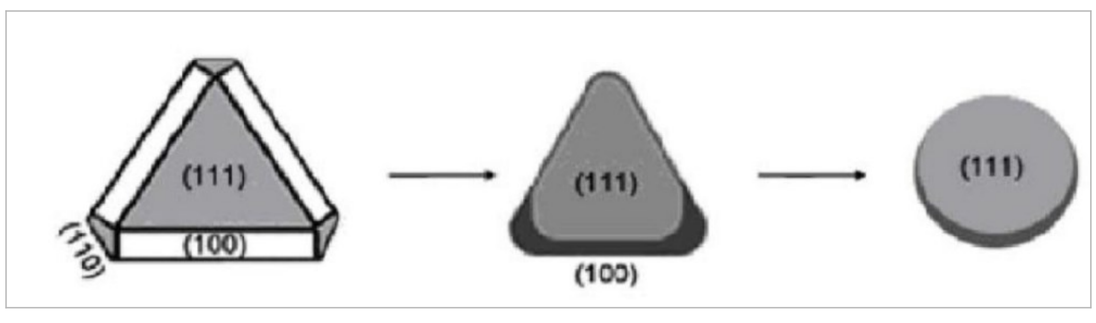
貳、研究過程或方法



圖一、研究流程圖

參、研究結果與討論

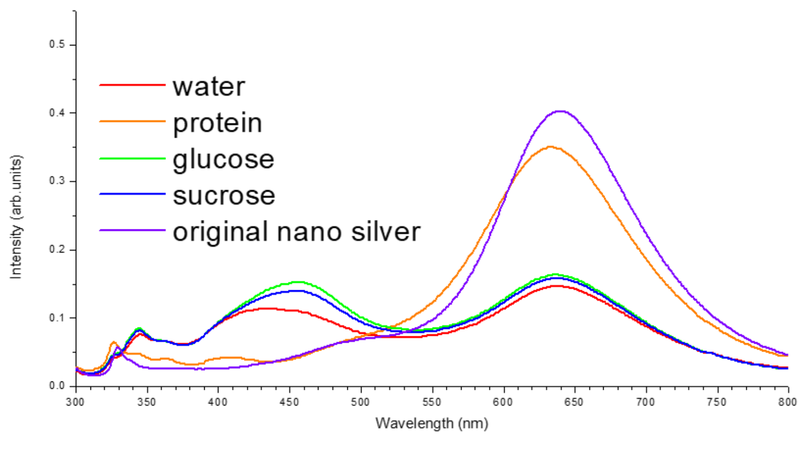
在三角板奈米銀溶液中加入鹵素蝕刻會被截角成球形奈米銀，若未被蝕刻則溶液內多為奈米銀三角板，其在吸光光譜上之波峰（以下討論稱為波峰一）約在波長位置 650 奈米左右；若奈米銀已被蝕刻，則溶液內會出現為球形奈米銀，表示除波峰一外，其吸光光譜波長位置約在 400 奈米處會出現另一波峰（以下討論稱為波峰二）。故分析奈米銀吸光光譜上波峰之相對位置以及吸光值的大小即可推測其被蝕刻程度。



圖二、三角板奈米銀經鹽類（KBr）蝕刻過程示意圖（邱，2009）

實驗一、研究蜂蜜中的何種成分具有防止三角板奈米銀粒子蝕刻之效果

分析圖三可發現在蜂蜜所含成分當中，僅有加入了蛋白質的奈米銀溶液之吸光光譜在波長約 400 奈米處未出現波峰二，表示蛋白質具備防止奈米銀蝕刻之效。故可知本次實驗所使用的蜂蜜中除蛋白質外之成分皆不具防止蝕刻之效。

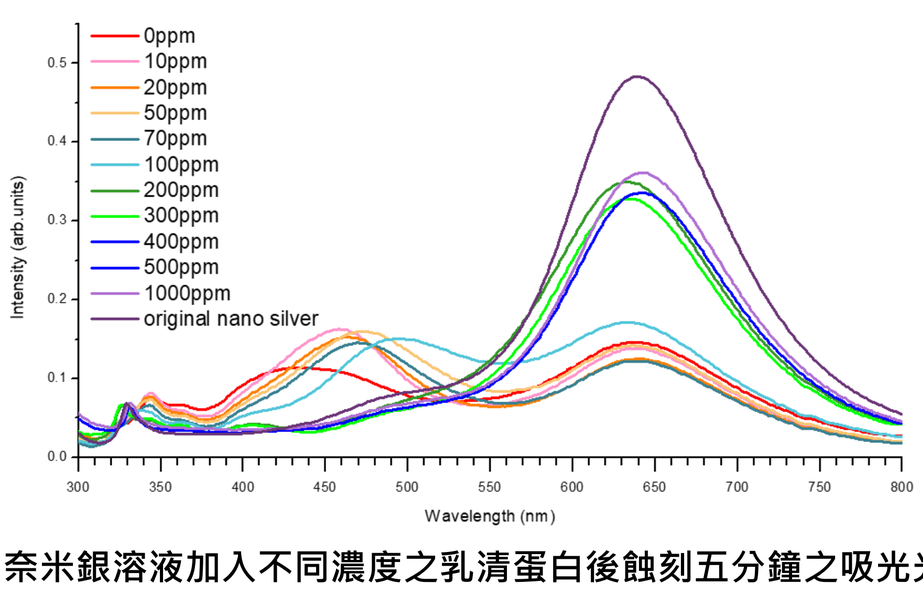


圖三、奈米銀溶液加入蜂蜜中各成分後蝕刻五分鐘之吸光光譜

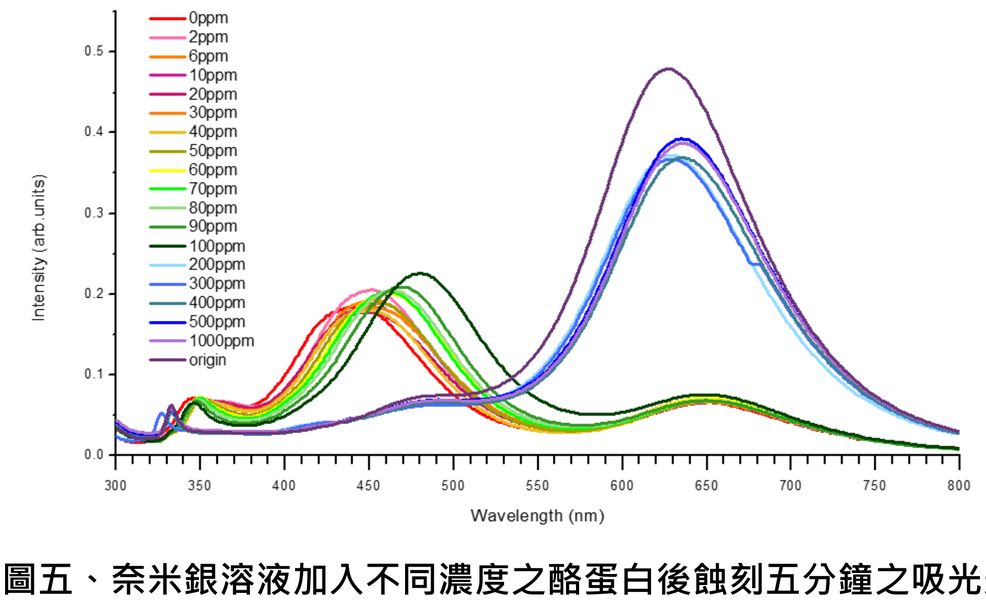
實驗二、研究不同種類之蛋白質對奈米銀蝕刻的影響

分析圖四，可發現加入濃度在 100 ppm 以上乳清蛋白之奈米銀溶液之吸光光譜上未出現波峰二，故知其可防止奈米銀蝕刻。

分析圖五則可發現，其與圖四出現了相似的效果，可知酪蛋白與乳清蛋白同具防止奈米銀蝕刻之效，表示防止蝕刻的現象並非僅在單一蛋白上出現，在多數蛋白質中具通用性。



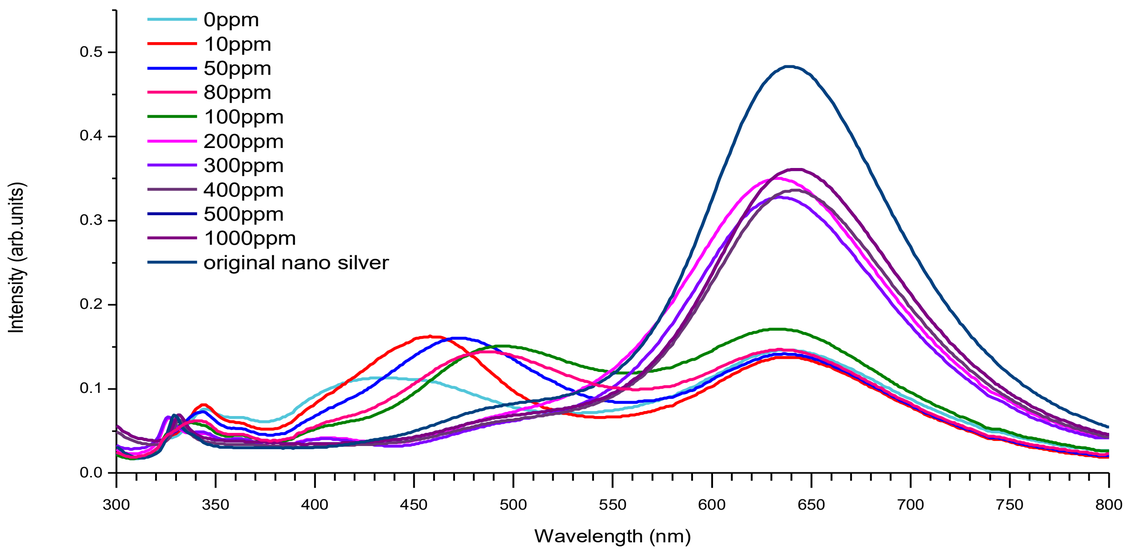
圖四、奈米銀溶液加入不同濃度之乳清蛋白後蝕刻五分鐘之吸光光譜



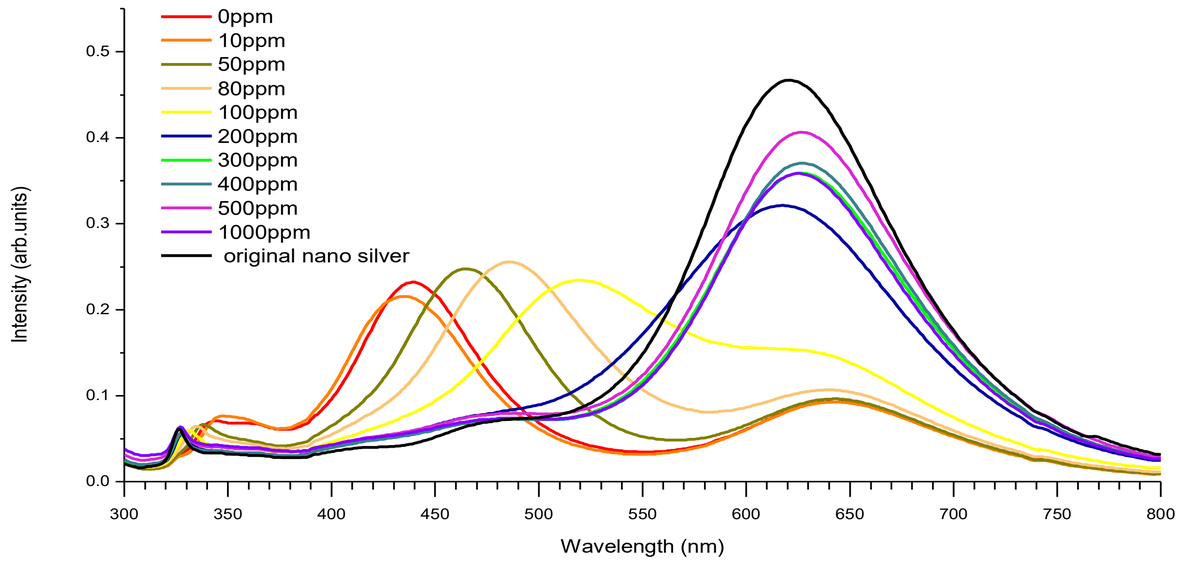
圖五、奈米銀溶液加入不同濃度之酪蛋白後蝕刻五分鐘之吸光光譜

實驗三、研究蛋白質在變性前後對奈米銀蝕刻的影響

對照圖六及圖七，可發現乳清蛋白在變性前與變性後對於防止蝕刻的效果無太大改變化，推測乳清蛋白變性後應不會對其所含的硫醇基（蛋白質可防止三角板奈米銀被蝕刻之主因）之結構造成顯著影響，故仍具備防止蝕刻之效。因此，即使在實驗環境中存在溫度變化（100 °C 以下），也不會造成太大實驗結果之差異。



圖六、奈米銀溶液加入不同濃度之未變性乳清蛋白後蝕刻五分鐘之吸光光譜

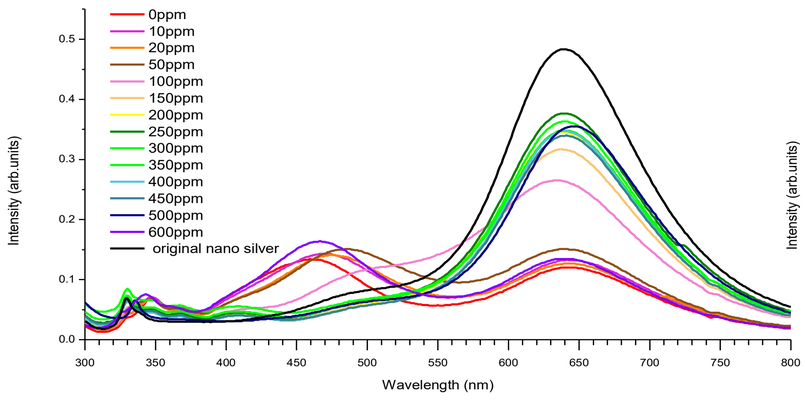


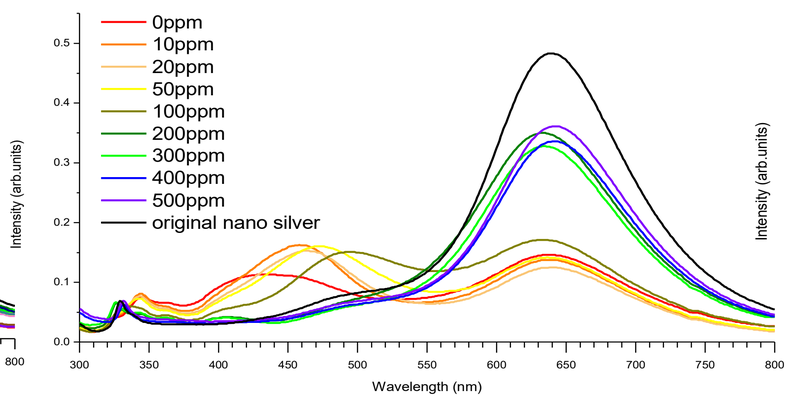
圖七、奈米銀溶液加入不同濃度之變性乳清蛋白後蝕刻五分鐘之吸光光譜

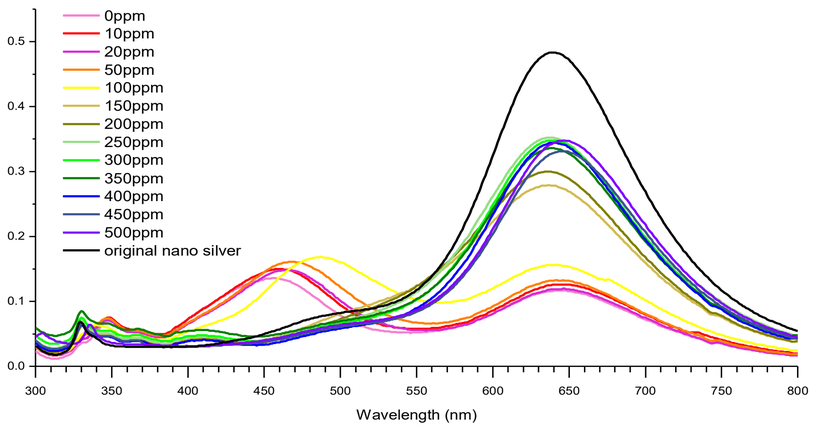
實驗四、研究蛋白質在變性前後對奈米銀蝕刻的影響

(一)研究蝕刻不同時長下的奈米銀吸光光譜，找出最利於辨識不同蛋白質濃度之蝕刻時長

觀察分析圖八、圖九與圖十，可發現在蝕刻五分鐘的條件下，吸光光譜在波長約 400奈米處的波峰二出現的濃度分界最為清晰。在蝕刻三分鐘的實驗中，有幾組奈米銀溶液尚未能完全截角，而蝕刻七分鐘的實驗結果則顯示幾乎所有待測溶液皆完成截角，不利於繪製檢量線，故往後實驗皆選擇以五分鐘作為蝕刻時長。







(由左至右)

圖八、奈米銀溶液加入不同濃度之乳清蛋白後蝕刻三分鐘之吸光光譜

圖九、奈米銀溶液加入不同濃度之乳清蛋白後蝕刻五分鐘之吸光光譜

圖十、奈米銀溶液加入不同濃度之乳清蛋白後蝕刻七分鐘之吸光光譜

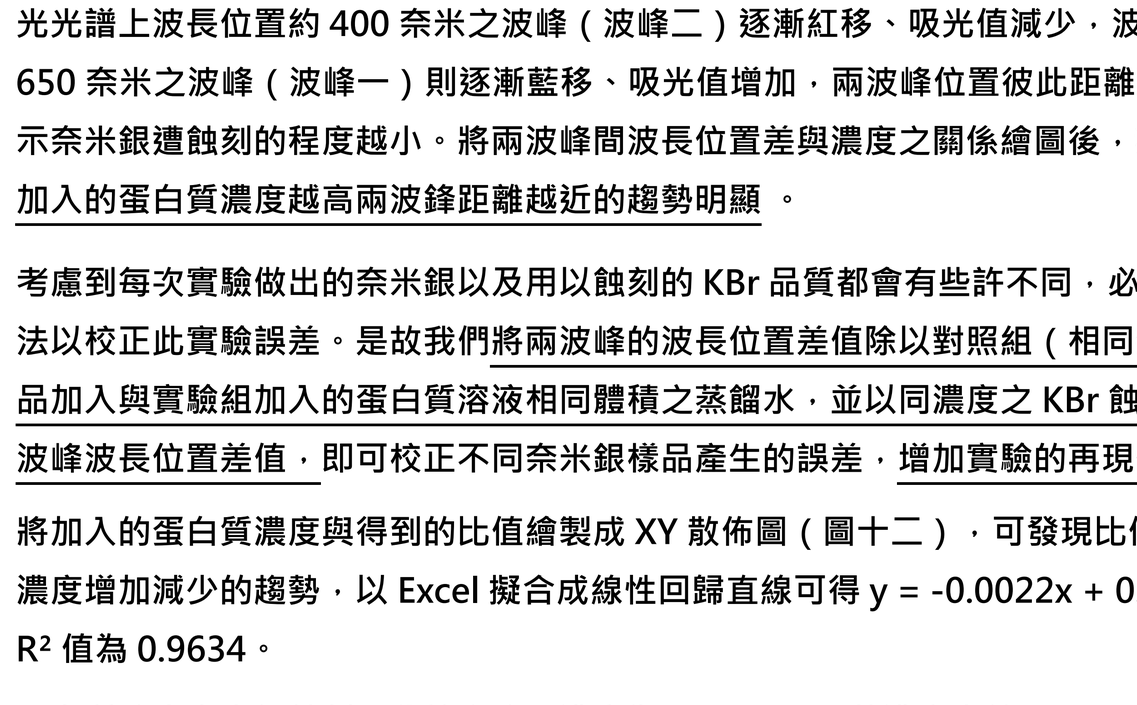
(二)繪製蛋白質濃度檢量線

當加入奈米銀溶液中的蛋白質濃度遞增，在蝕刻時間相同的條件下，奈米銀溶液的吸光光譜上波長位置約 400 奈米之波峰（波峰二）逐漸紅移、吸光值減少，波長位置約 650 奈米之波峰（波峰一）則逐漸藍移、吸光值增加，兩波峰位置彼此距離漸近，表示奈米銀遭蝕刻的程度越小。將兩波峰間波長位置差與濃度之關係繪圖後，我們發現加入的蛋白質濃度越高兩波鋒距離越近的趨勢明顯 。

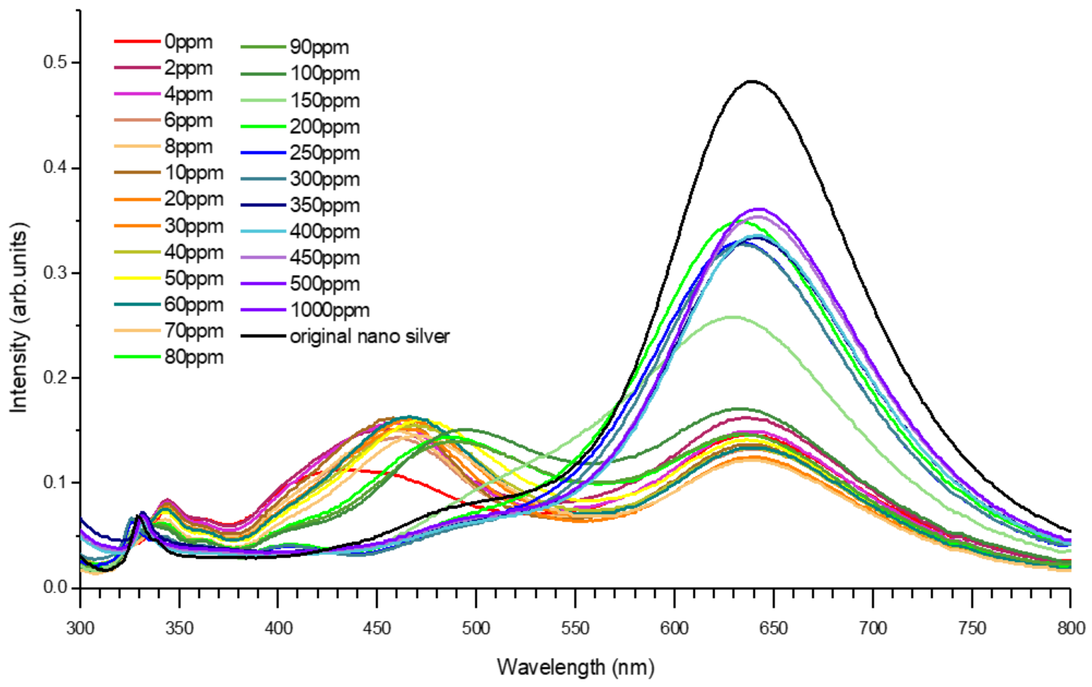
考慮到每次實驗做出的奈米銀以及用以蝕刻的 KBr 品質都會有些許不同，必須找到方法以校正此實驗誤差。是故我們將兩波峰的波長位置差值除以對照組（相同奈米銀樣品加入與實驗組加入的蛋白質溶液相同體積之蒸餾水，並以同濃度之 KBr 蝕刻）的兩波峰波長位置差值，即可校正不同奈米銀樣品產生的誤差，增加實驗的再現性。

將加入的蛋白質濃度與得到的比值繪製成 XY 散佈圖（圖十二），可發現比值有隨著濃度增加減少的趨勢，以 Excel 擬合成線性回歸直線可得 y = -0.0022x + 0.9066，R^2 值為 0.9634。

蛋白質防止奈米銀蝕刻五分鐘之臨界濃度為 100 ppm，若濃度大於 100 ppm 則可以完全防止奈米銀被蝕刻；若濃度小於 100 ppm 則奈米銀會隨蛋白質被蝕刻程度會隨加入蛋白質濃度遞減而遞增當加入。且當奈米銀之蛋白質濃度大於 100 ppm 時，其吸光光譜上波峰一不明顯，無法判斷兩波長位置差值，故蛋白質檢量線有效範圍為 0~100 ppm



圖十二、蛋白質濃度檢量線



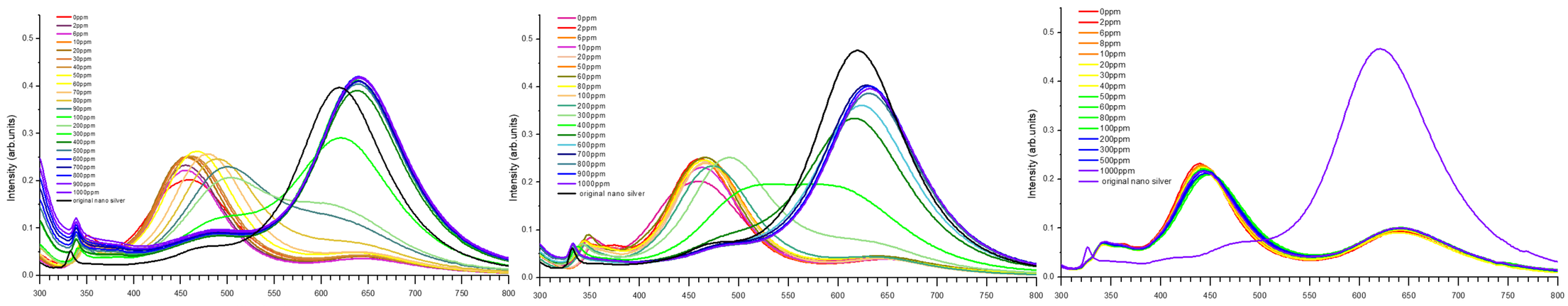
圖十一、奈米銀溶液加入不同濃度之乳清蛋白後蝕刻五分鐘之吸光光譜

	三角板奈米銀波峰(650nm處)位置(nm)	球形奈米銀波峰(400nm處)位置(nm)	三角板(650nm)球形 (400nm)波峰位置差值	實驗組與對照組波峰位置差值之比值
對照組(0ppm)	636	433	203	1.0000
2ppm	635	455.5	179.5	0.8842
4ppm	638.5	456.5	182	0.8966
6ppm	640	460.5	179.5	0.8842
8ppm	640	461.5	178.5	0.8793
10ppm	637.5	458	179.5	0.8842
20ppm	638	463	175	0.8620
30ppm	638.5	467.5	171	0.8424
40ppm	636	468.5	167.5	0.8251
50ppm	636	474	162	0.7931
70ppm	634	482	152	0.7488
80ppm	633.5	488	145.5	0.7167
90ppm	633	489	144	0.7094
100ppm	633	496.5	136.5	0.6724

表一、不同蛋白質濃度之三角板奈米銀波峰與球型奈米銀波峰位置

實驗五、研究不同種類與濃度之蜂蜜蛋白質與假蜂蜜對奈米銀蝕刻影響，對照蛋白質濃度檢量線，辨別出蜂蜜的蛋白質含量與真偽

觀察分析並比較圖十三、圖十四、圖十五與圖十一，可發現除圖十五以外，其他三者波峰位移趨勢相近，可由此分辨出假蜂蜜中不含蛋白質且不具防止蝕刻之效，而圖十三與圖十四則可證明一般蜂蜜與龍眼蜜中皆含蛋白質，對奈米銀具保護效果，為真蜂蜜。



圖十三、奈米銀溶液加入不同蛋白質濃度之一般蜂蜜蝕刻五分鐘後之吸光光譜

圖十四、奈米銀溶液加入不同蛋白質濃度之龍眼蜜蝕刻五分鐘後之吸光光譜

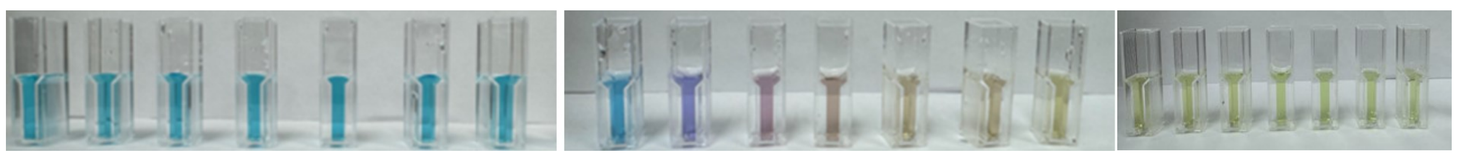
圖十五、奈米銀溶液加入不同濃度之摻假蜂蜜龍眼蜜蝕刻五分鐘後之吸光光譜

實驗六、研究出可辨別蜂蜜真偽之奈米銀溶液色相區間，形成簡單又可有效辨別蜂蜜真偽之方法

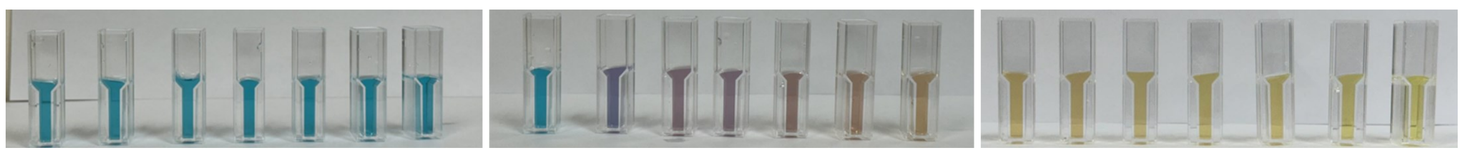
由比爾-朗伯定律，可把拍照後用手機軟體測得之溶液顏色 RGB 值換算成溶液分別在 R 紅色、G 綠色以及 B 藍色波長之吸光度。分析表二中加入蛋白質濃度與其 RGB 吸光度可發現:隨加入蛋白質濃度上升，紅色（λ=700.0nm）之吸光度逐漸增加；藍色（λ=438.8nm）之吸光度逐漸減少；而綠色（λ=546.1nm）之吸光度增減則無一定規律。

觀察圖十一、圖十三與圖十四可發現相同蛋白質濃度之蛋白質溶液、一般蜂蜜及龍眼蜜防止奈米銀蝕刻之效果大致相同，雖一般峰蜜及龍眼蜜防止奈米銀蝕刻效果較不穩定，但其顏色與 RGB 值皆差異不大，故以此方法辨別蜂蜜內之蛋白質濃度為可行。

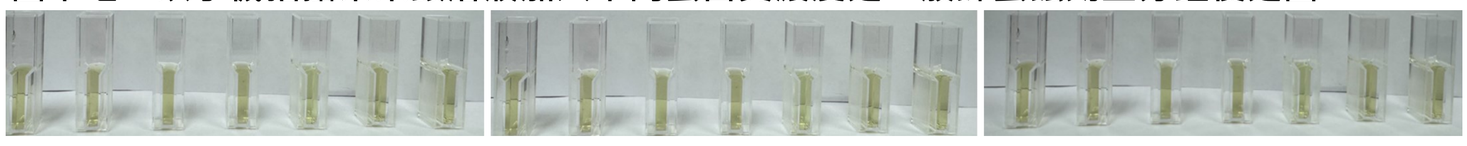
當加入蛋白質濃度界於 2~30 ppm 以下時，各實驗組防止奈米銀蝕刻效果皆不佳，蝕刻後顏色相當接近對照組（加入蛋白質含量 0ppm）；同理，當加入蛋白質濃度界於 400~1000 ppm 以上時防止奈米銀蝕刻效果極佳(顏色相當接近未蝕刻奈米銀)，無法直接以拍照區分。故此方法在一定的有效範圍內準確度較高。



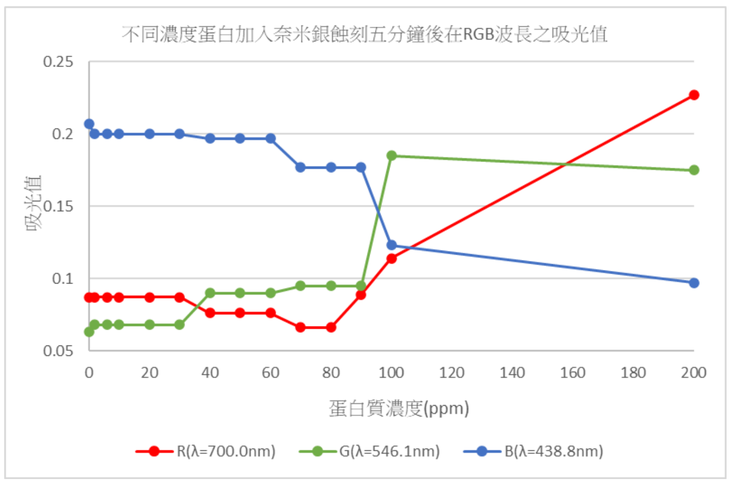
圖十六、以手機拍攝奈米銀溶液加入不同乳清蛋白質濃度五分鐘後之圖



圖十七、以手機拍攝奈米銀溶液加入不同蛋白質濃度之一般蜂蜜蝕刻五分鐘後之圖

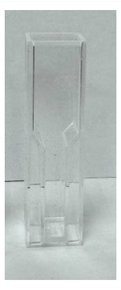
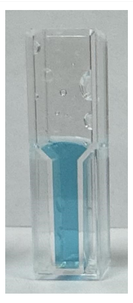
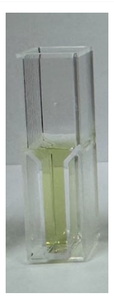


圖十八、以手機拍攝奈米銀溶液加入不同濃度之摻假蜂蜜蝕刻五分鐘後之圖



圖十九、不同濃度蛋白加入奈米銀蝕刻五分鐘後在 R、G、B 三波長之吸光值變化

(圖十六、十七中加入蛋白質濃度（ppm）以及圖十八加入之假蜂蜜濃度皆分別為 1000、900、800、700、600、500、400、300、200、100、90、80、70、60、50、40、30、20、10、6、2）

										
加入之蛋白質濃度(ppm)	背景（空容器）	未蝕刻奈米銀（純奈米銀稀釋）	對照組（未加蛋白質）	2~30ppm	40~60ppm	70~80ppm	90ppm	100ppm	200ppm	300~1000ppm
RGB 值	(199,208,203)	(50,161,182)	(160,180,126)	(163,178,127)	(167,169,129)	(171,167,135)	(162,150,137)	(153,136,153)	(118,128,181)	(63,160,183)
吸光度(紅,綠,藍)	無	(0.600, 0.111, 0.047)	(0.095, 0.063, 0.207)	(0.087, 0.068, 0.200)	(0.076, 0.090, 0.197)	(0.066, 0.095, 0.177)	(0.089, 0.142, 0.171)	(0.114, 0.185, 0.123)	(0.227, 0.175, 0.097)	(0.500, 0.114, 0.045)

表二、奈米銀溶液中加入不同濃度之蛋白質蝕刻五分鐘之 RGB 值與換算成在紅色(λ=700.0nm)、綠色(λ=546.1nm)與藍色(λ=438.8nm)波長之吸光值

肆、結論

一、蜂蜜中具防止奈米銀蝕刻之效的關鍵成分為蛋白質

二、不同種類之蛋白質都可防止奈米銀蝕刻，且保護效果大致相同

三、蛋白質在未變性與已變性的情況下吸光光譜波峰位置大致相同，具相同防止奈米銀蝕刻之效果

四、蛋白質防止奈米銀蝕刻五分鐘之臨界濃度為 100 ppm，若濃度大於 100 ppm 則可以完全防止奈米銀被蝕刻；

若濃度小於 100 ppm， 則奈米銀被蝕刻程度會隨加入蛋白質濃度遞減而遞增

五、運用吸光光譜兩波峰位置距離隨蛋白質濃度下降而增加的趨勢可做出檢量線，蛋白質檢量線有效範圍為 0~100 ppm

六、相同蛋白質濃度之龍眼蜜與一般峰蜜防止奈米銀蝕刻之效果大致相同，且可用蛋白質檢量線檢驗其蛋白質濃度

七、以手機拍照分析所得奈米銀溶液蝕刻後之 RGB 值，可推知加入奈米銀中的蜂蜜所含蛋白質濃度的大致區間。

八、未來希望透過適當改變實驗條件增加蛋白質檢量線有效範圍

伍、參考文獻資料

一、曹碧鳳（2002）。蜂蜜真偽之鑑定及其品質之評估。

二、邱仕宏（2009）。探討以三角平板奈米銀為基質且在不同激發波長下的各種指示劑表面增強拉曼散射效應

三、鄭宜鳳（2019）。蜂蜜蛋白體特徵於蜂蜜的糖漿、產國及蜜源摻偽鑑定

四、陳冠達（2019）。探討不同烷基鏈之硫醇分子對十面體膠體奈米銀之吸附動力學

五、Martin J. Mulvihill, Xing Yi Ling, Joel Henzie, and Peidong Yang.(2010).Anisotropic Etching of Silver Nanoparticles for Plasmonic Structures Capable of Single-Particle SERS