

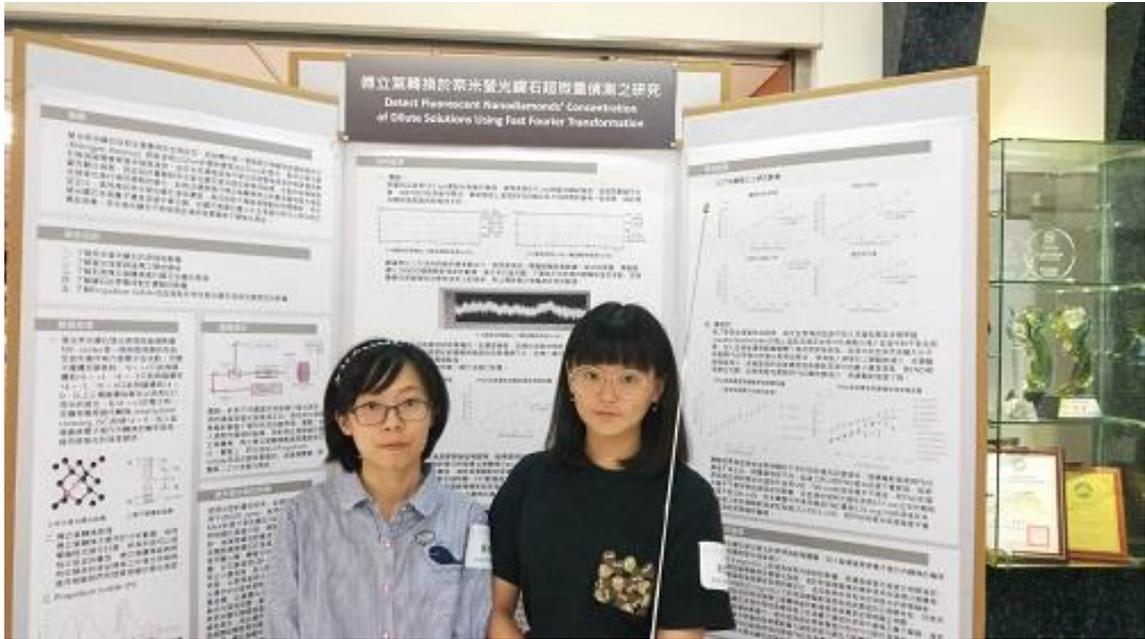
2020 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 160012
參展科別 物理與天文學
作品名稱 傅立葉轉換於奈米螢光鑽石超微量偵測之
研究
得獎獎項 大會獎：三等獎

就讀學校 臺北市立第一女子高級中學
指導教師 張煥正、張清俊
作者姓名 陳珊妮、高歆嵐

關鍵詞 傅立葉轉換(Fourier transform)、
奈米螢光鑽石(fluorescent nanodiamond)、
超微量偵測(concentration measurement of
extreme dilute solution)

作者簡介



我們是陳珊妮跟高歆嵐，來自北一女中數理資優班，由於對於科學有熱忱，都曾經參加過台大物理人才培育計畫先修大學課程，由於對於物理有熱切的求知慾以及恰好有學校資源的配合，我們成功的踏上科展的不歸路。謝謝張煥正教授以及實驗室學長姊的幫助，使我們有良好的環境能夠自由探索。

We are Shan-Ni Chen and Hsin-Lan Kao, from the Mathematics and Science Advanced Class of Taipei First Girls' High School. Because of our passion for science, we have participated in the National Taiwan University Advanced Physics Program as a prerequisite for university courses. With the assistance of TFG, we successfully set on the journey of Science Fair. Thanks for the help of Professor Huan-Cheng Chang and seniors in the laboratory, so that we have a good environment to explore freely.

摘要

螢光奈米鑽石(Fluorescent Nanodiamond, FND)主要應用於生物定位，其結構中與一個氮原子相鄰的晶格缺陷部分(Nitrogen-Vacancy, NV^-)照射波長 532nm 的雷射會發出 637nm 的螢光，對 FND 施加磁場會使螢光強度減弱。由於在低濃度溶液中螢光訊號會被溶液的背景雜訊掩蓋而難以偵測，因此設計實驗對 FND 施加穩定變換的磁場，此動作能夠使螢光強度也進行相同週期的變化。針對此週期進行快速傅立葉轉換(Fast Fourier Transformation, FFT)得出的數值會與螢光強度呈正比，進而推知 FND 濃度，有效排除不隨磁場變動的背景雜訊。研究結果顯示，施加磁場並使用 FFT 能夠成功排除牛血清蛋白(Bovine Serum Albumin, BSA)、碘化丙啶(Propidium Iodide, PI)、水、血液的背景輻射，且 FND 在高離子濃度溶液中會沉澱，在表層包覆 BSA 則可以有效地改善此現象。FND 不易受到血液的背景輻射干擾螢光測定。

Abstract

Fluorescent Nanodiamond(FND) is a carbon based material which exhibits very good biocompatibility. The negatively charged nitrogen-vacancy(NV^-)center is the embedded defect center on FND which emits a highly photostable far-red fluorescence emission that can be used to track for long time. The concentration of FND solution can be calculated by measuring its fluorescent intensity. However, when the FND solution is extremely dilute, the measurement of fluorescent would be interfered with background radiation of the solvent. In this case, we designed an experiment applying a stable-changing magnetic field to dilute FND solution, and this action enables fluorescence intensity to change in the same frequency. After applying Fast Fourier transformation to the magnetic-changing frequency, the Fast Fourier transformation value is proportional to the intensity of the fluorescence, which can effectively exclude background radiation that does not vary with the magnetic field, even when there are Bovine Serum Albumin, Propidium Iodide, or blood in the solution. In our experiment, we discovered that FND tends to precipitate in high ionic concentration solutions, and that the fluorescence measurements of FND solution are not susceptible to the interference of background radiation from blood. The coating of Bovine Serum Albumin on the surface of the diamond can effectively increase the solubility of Fluorescent nanodiamonds.

壹、前言

一、研究動機

因緣際會由學校帶我們參訪原子與分子研究所，對螢光奈米鑽石(Fluorescent Nanodiamond, FND)有了興趣，好奇它有哪些應用。於是我們就經由學校老師的介紹來到了張煥正教授的實驗室。在一年多的摸索之後，發現超微量 FND 溶液難以定量，且對於 FND 居然會被磁場影響性質到好奇，於是著手研究。

二、研究目標

- (一) 了解 FND 的原理和製備
- (二) 了解螢光強度與磁場之間的關係
- (三) 了解利用 FFT 進行 FND 定量的原理
- (四) 了解 FND 的帶電荷對於實驗的影響
- (五) 了解 PI 及血液對於 FND 溶液定量測定的影響

貳、研究過程與方法

一、研究設備與器材

- (一) 製備 FND：Ib 型的鑽石粉末、恆溫箱、粒子加速器、真空管加熱器、超音波震動儀、加壓機、離心機、奈米粒徑分析儀
- (二) 血液的保存處理：血液、抗凝血劑、多聚甲醛、顯微鏡、血球計數板
- (三) 暗箱：脈衝閥控制器、波型產生器、電源供應器、雷射光源(波長 532 nm)、偏振片、反射鏡、聚焦鏡頭、電磁鐵、螢光接受器、電腦、FFT 程式
- (四) 藥品：牛血清蛋白(Bovine Serum Albumin, BSA)、碘化丙啶(Propidium Iodide, PI)、氟化鈉(Sodium fluoride, NaF)
- (五) 其他器材：高斯計、玻璃試管、雷射功率計

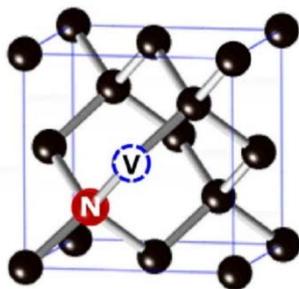
二、FND 製備

使用 Ib 型的鑽石粉末，此類鑽石內部含孤立的氮原子(約 100 ppm)，使用粒子加速器讓 3-MeV 的質子束在攝氏 700 度的環境下連續照射鑽石兩個小時，使鑽石結構中產

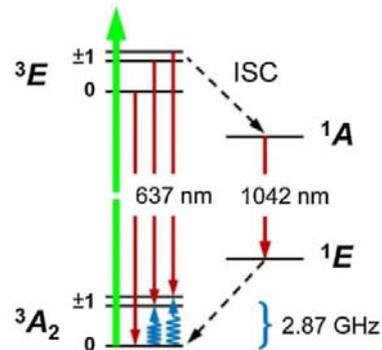
生空缺。接著將加入純水中鑽石配置成溶液，先使用超音波震動儀使鑽石於溶液中均勻分布，接著使用離心機，轉速 15000 rpm，持續十分鐘，此時直徑 100 nm 以上的奈米鑽石會沉澱。取出上方的溶液，放入設定為攝氏 70 度恆溫箱中將溶液烘乾，以取得直徑不超過 100 奈米的鑽石。在真空管加熱器中以攝氏 450 度烘烤除去奈米鑽石表面的石墨結構，以重量比 3:7 將奈米鑽石及氟化鈉均勻混和，並且使用加壓器加壓，氟化鈉晶體在高壓下會將奈米鑽石破壞成更小的顆粒，再以真空管加熱器抽真空以攝氏 800 度烘烤，溫度高，鑽石晶體結構容易改變，此時為了轉變為最低能量結構，鑽石晶體中之氮原子傾向於與空缺結合後形成氮-空缺中心(NV⁻ center)，必須抽真空是為了避免真空管中空氣的氧氣在高溫高壓下與鑽石反應為二氧化碳，最後設置為攝氏 450 度再次除去上一步驟於表面出現的石墨結構。加水使氟化鈉溶解，離心三十分鐘後將沉澱物放入設定為攝氏 70 度恆溫箱中將溶液烘乾，便完成了 FND。在完成了 FND 之後使用奈米粒徑分析儀進行 FND 的粒徑檢測，測出粒徑為 125.5 ± 36.1 nm。

三、實驗原理

(一) FND 發光原理與磁場影響



△ 圖一、FND 晶格結構圖

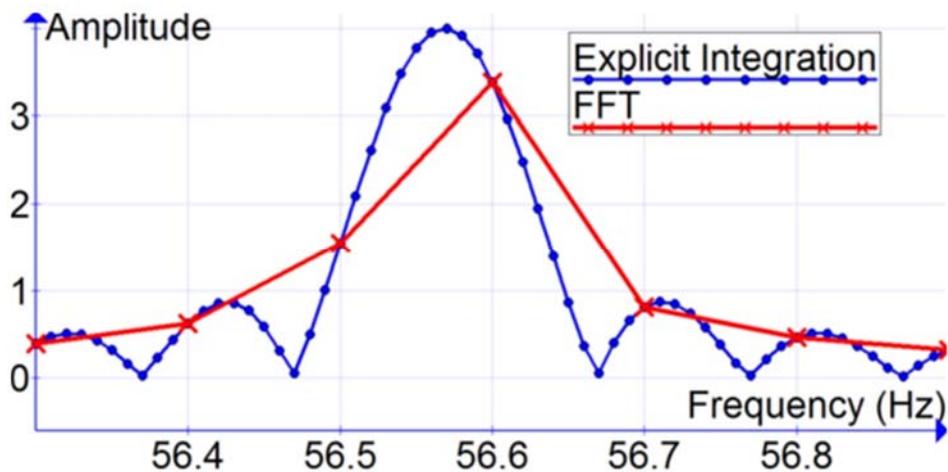


△ 圖二、NV⁻ center 能階示意圖

NV⁻ center 是一個與氮相鄰的空缺(參考圖一)，在這個空缺總共有六個電子在活動。由鄰近的三個碳提供三個電子，由相鄰的氮提供兩個電子，而空缺本身有一個常駐的電子。電子在能階的躍遷會受到量子力學的限制(參考圖二)，隨著激發光的波長不同，光子所攜帶的能量不同，電子躍遷到達的能階也不同。而電子要躍遷下來較低的能階時， $^3E = +1$ 只能夠躍遷到 $^3A = +1$ ， $^3E = -1$ 只能夠躍遷到 3A

$= -1$ ， ${}^3E = 0$ 只能夠躍遷到 ${}^3A = 0$ ，以上三種躍遷皆會放出波長 637 奈米的螢光。在 ${}^3E = \pm 1$ 的電子有一定機率會經過內轉換(intersystem crossing, ISC)到達 ${}^3A = 0$ 。而物質在非絕對零度的情況下，微觀世界中的粒子都會進行震動，其動能與溫度呈現正相關。能階也有著不同的高低差異，因此即便是固定由此三種躍遷放出波長 637 nm 的螢光，以光譜儀檢視時，螢光的發射光譜呈現連續分布，並非僅有波長 637 nm 的光束。FND 的製備良好與否有兩項要素：直徑約分布於 100 nm 左右，標準差低，實驗時才能將依據需要使用不同大小的 FND；發射光譜顯現出的 637 nm 必須要有明顯的峰值，而不能是低平的連續分布，實驗時才能明確的測量出螢光，而不是被背景輻射掩蓋。加入磁場會使 ${}^3E = -1$ 和 ${}^3E = +0$ 及 ${}^3A = -1$ 和 ${}^3A = +0$ 之間的距離變大，電子進行內轉換的機率提高，進而使螢光的強度變弱。

(二) 快速傅立葉轉換原理

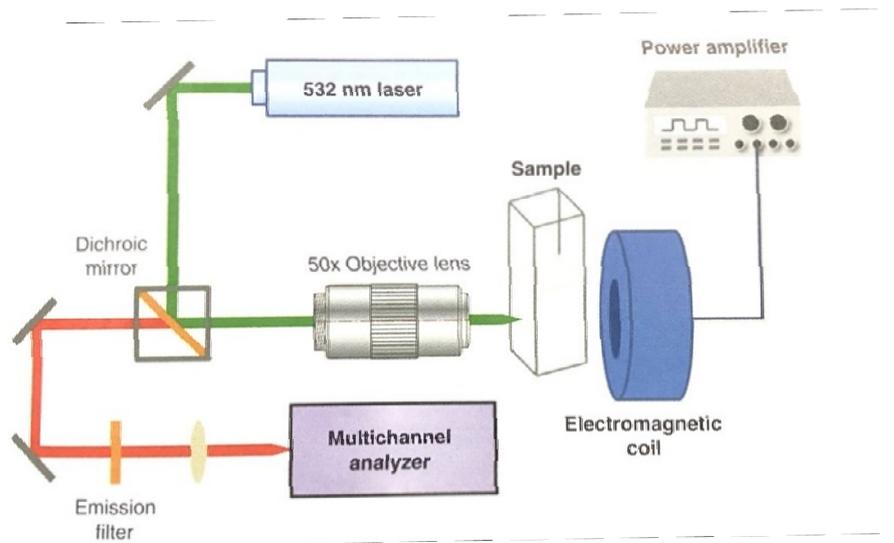


△ 圖三、快速傅立葉轉換示意圖

快速傅立葉轉換是分析數據的主要原理，利用程式進行計算。

任何的函數都能夠視為正弦波的疊加，而傅立葉轉換能夠將時域轉成頻域，在實驗中我們將與磁場變換頻率相同的波挑出來檢視。而快速傅立葉轉換雖然較不精確，但其處理速度比傅立葉轉換還要快約一千倍，因此我們選用快速傅立葉轉換。

四、實驗器材架設



△ 圖四、儀器架設圖

整套器材於暗箱暗室中進行操作，以避免其他光源激發影響實驗結果。首先發射波長 532 nm 的雷射，在光路徑放上偏振片以適當調節螢光強度，經過鏡頭聚焦到樣本，再將樣本發出的波長 637 nm 螢光反射到螢光接受器。(參考圖四)螢光接收器前有兩片偏振片，一片是為了將波長 532 nm 的雷射濾掉，因為波長 532 nm 雷射強度太大，是強烈的雜訊，另一片是為了濾掉波長 500 nm 以下的電磁波，因為水的背景輻射也是雜訊的主要來源，濾掉 500 nm 以下的電磁波能使實驗要觀察的波長 637 nm 螢光更加明顯。在樣本旁邊放置以一定頻率改變磁場的電磁鐵。利用脈衝閥控制器及波行產生器控制磁場大小及改變的頻率。

五、實驗一：在沒有磁場的情況下進行螢光測定

(一) 實驗目的與原理：

螢光強度理論上會與 FND 溶液濃度呈正比，此實驗目的是為了知道是否任意濃度的 FND 都能夠以此方法檢測，若出現無法以正比關係推定的數據，則推測其無法繼續適用的臨界濃度。並且與實驗二的研究結果相比較。

(二) 實驗步驟：

1. 將不同濃度的 FND 溶液 1ml 裝入個別的可透光玻璃試管中。
2. 將 FND 溶液放入暗箱中，並且開啟雷射及電腦。

3. 利用光束分析儀檢測，旋轉偏振片，將雷射的每秒平均輸出功率調整至 20 mW。
4. 確認光線路徑上沒有障礙物並開始測定。
5. 利用電腦分析螢光數據。

六、實驗二：使用磁場後進行螢光測定

(一) 實驗目的與原理：

基於在實驗一中求得溶液有無法測定的臨界濃度。藉由電磁鐵的磁場變化，使 FND 螢光強度呈現週期性的高低變化，再針對電磁鐵的磁場變化週期進行快速傅立葉轉換，得出和電磁鐵磁場變換週期相同的螢光，排除水的背景輻射，得出 FND 的原始螢光強度，最後再以已濾除雜訊的螢光強度與濃度繪製線性圖形推測濃度，並與實驗一的結果相比較。

(二) 實驗步驟：

1. 將 FND 溶液 1ml 裝入可透光的玻璃試管中。
2. 將 FND 溶液放入暗箱，並且開啟雷射及電腦。
3. 利用光束分析儀檢測，旋轉偏振片，將雷射的每秒平均輸出功率調整至 20 mW。
4. 利用高斯計檢測電磁鐵的磁場強度是否正確，確認無誤後，將電磁鐵放置於 FND 溶液旁。磁場強度約為 3 mG(毫高斯)。
5. 確認光線路徑上沒有障礙物並開始測定。
6. 利用電腦分析螢光數據。

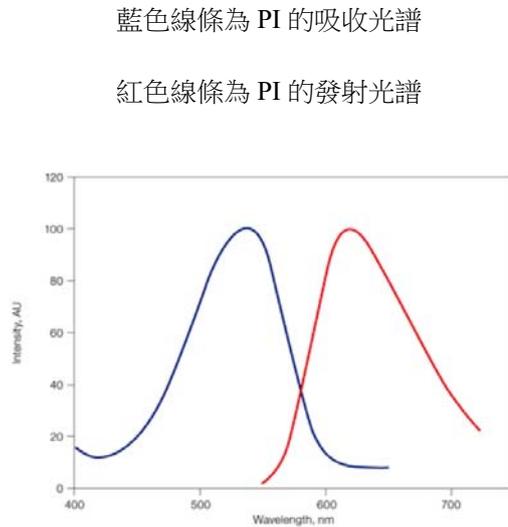
七、實驗三：對於加入 PI 的 FND 溶液分別在有磁場及無磁場情形下進行螢光測定

(一) 實驗目的與原理：

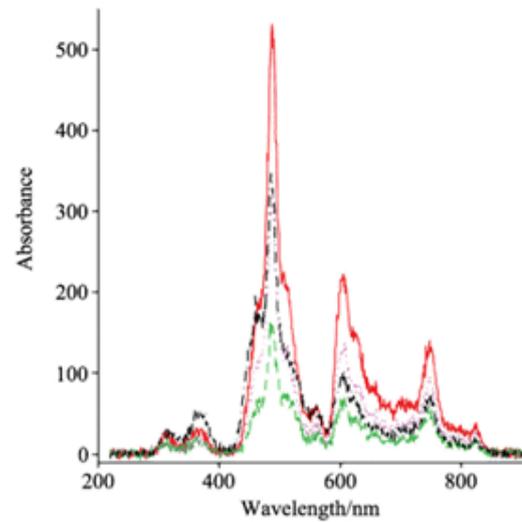
加入 PI 的目的是為了增加背景雜訊。此實驗設計是為了與實驗二相對照，若實驗二成功將 FND 溶液的背景雜訊去除，而得出濃度與螢光輻射強度的正比結果，則代表加入磁場並且進行快速傅立葉轉換的方法對於去除僅有水的背景雜訊可行。若此實驗成功，則代表使用磁場變換並且進行快速傅立葉轉換的方式能夠

有效排除除了水以外的背景輻射。

(二) 選擇 PI 的目的



△ 圖五



△ 圖六、血液放射光譜曲線

PI 的顏色為紅色，其發射光譜與血液於 600~660 nm 之間的發射光譜相似，PI 在實驗中經常做為生物染劑使用，無強烈毒性。(參考圖五、圖六)PI 的發射光譜由圖四的紅線所代表，最大發射波長為 617 nm。本實驗想藉由 PI 與血液於波長 600~660 nm 的放射光譜相似且皆為紅色的特性來模擬 FND 於血液中的情形。FND 是對於生物沒有危害的材料，能夠有效適用於生物體。因此，若 FND 置於 PI 中仍然能夠準確測定 FND 濃度，則代表 FND 於生物血液中的濃度有極大機率能夠被定量分析而不受血液的發射光譜影響，提高 FND 於生物體的應用價值。

(三) 實驗步驟：

1. 將 FND 與 PI 溶液 1 ml 裝入可透光的玻璃試管中。
2. 將溶液放入暗箱，並且開啟雷射及電腦。
3. 利用光束分析儀檢測，旋轉偏振片，將雷射的每秒平均輸出功率調整至 20 mW。
4. 利用高斯計檢測電磁鐵的磁場強度是否正確，確認無誤後，將電磁鐵放置於 FND 溶液旁。磁場強度約為 3 mG(毫高斯)。
5. 確認光線路徑上沒有障礙物並開始測定。

6. 將磁場關掉，進行無磁場情形下的測定。
7. 利用電腦分析螢光數據。

八、實驗三的修正實驗：對於加入 BSA 以及 PI 的 FND 溶液分別在有磁場及無磁場情形下進行螢光測定

(一) 加入 BSA 的目的及原理：

基於在實驗三中得知 FND 會於高離子濃度溶液中沉澱，在此修正實驗中加入 BSA 以防止 FND 沉澱。因為 BSA 有著親水性的官能基，和 FND 表面的碳氫氧官能基形成氫鍵，使 BSA 包覆 FND，能有效提高 FND 於水溶液中的溶解度。

(二) 實驗步驟：

1. 將 FND+BSA+PI 溶液 1ml 裝入可透光的玻璃試管中。
2. 將 FND 溶液放入暗箱，並且開啟雷射及電腦。
3. 利用光束分析儀檢測，旋轉偏振片，將雷射的每秒平均輸出功率調整至 20 mW。
4. 利用高斯計檢測電磁鐵的磁場強度是否正確，確認無誤後，將電磁鐵放置於 FND 溶液旁。磁場強度約為 3 mG(毫高斯)。
5. 確認光線路徑上沒有障礙物並開始測定。
6. 利用電腦分析螢光數據。

九、實驗四：對於加入全血的 FND 溶液分別在有磁場及無磁場情形下進行螢光測定

(一) 實驗目的與原理：

加入血液的目的是為了增加背景雜訊。若此實驗成功，則代表加入磁場能夠成功去除生物體內的血液所產生的背景輻射。配合 FND 與生物相容性佳的特性，FND 於生物體的應用價值會大幅上升。

(二) 使用血液前的事先處理

在取得新鮮血液後，加入抗凝血劑，以免血液在實驗中凝血結塊。接著加入多聚甲醛(paraformaldehyde)，多聚甲醛與血液體積比為 1:4，將細胞形狀固定，

同時使細胞失去功能死亡。固定細胞是為了減少血液中的不安定因素。利用顯微鏡及血球計數板進行細胞計數，得出血液中的血球濃度約為 3.576×10^9 個/ml(包含紅血球、白血球、血液中的各種細胞等等)。

(三) 實驗步驟：

1. 將 FND 與血液共 1 ml 裝入可透光的玻璃試管中。
2. 將溶液放入暗箱，並且開啟雷射及電腦。
3. 利用光束分析儀檢測，旋轉偏振片，將雷射的每秒平均輸出功率調整至 20 mW。
4. 利用高斯計檢測電磁鐵的磁場強度是否正確，確認無誤後，將電磁鐵放置於 FND 溶液旁。磁場強度約為 3 mG(毫高斯)。
5. 確認光線路徑上沒有障礙物並開始測定。
6. 將磁場關掉，進行無磁場情形下的測定。
7. 利用電腦分析螢光數據。

參、研究結果與討論

一、實驗一

(一) 預估測量結果

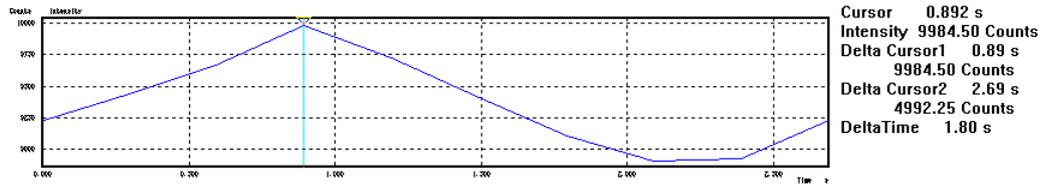
在一定濃度以上的 FND 水溶液，其螢光強度應與濃度呈現正相關，濃度越高線性關係越明確，濃度低時受背景輻射影響而關係不明確。

(二) 第一次實驗

1. 實驗準備過程

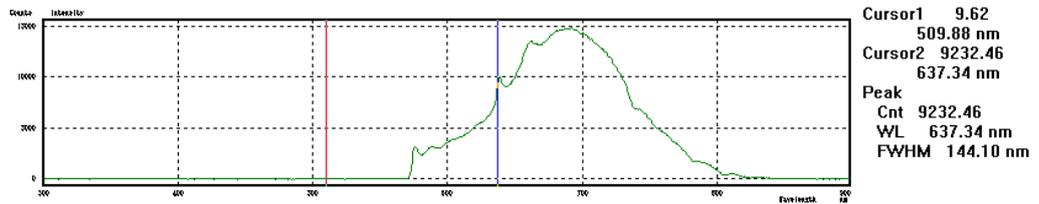
首先，將剛製作出總共 575.5 mg 的 FND 全數加入 100 ml 的水中，以免空氣中的灰塵與 FND 混和。接著將 5.755 mg/ml 的 FND 溶液稀釋為 1 mg/ml，並且再稀釋為 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9 mg/ml 的溶液，接著將 0.1 mg/ml 的 FND 溶液稀釋為 0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09 mg/ml 的溶液，最後再將 0.01 mg/ml 稀釋為 0.001 mg/ml，0.001 mg/ml 稀釋為 0.0001 mg/ml，0.0001 mg/ml 稀釋為 0.00001

mg/ml，0.00001 mg/ml 稀釋為 0.000001 mg/ml，並且取波長 637 nm 的輻射強度作為參照值，進行測量。



△ 圖七、X 軸為時間軸(s) Y 軸為輻射強度(mW)

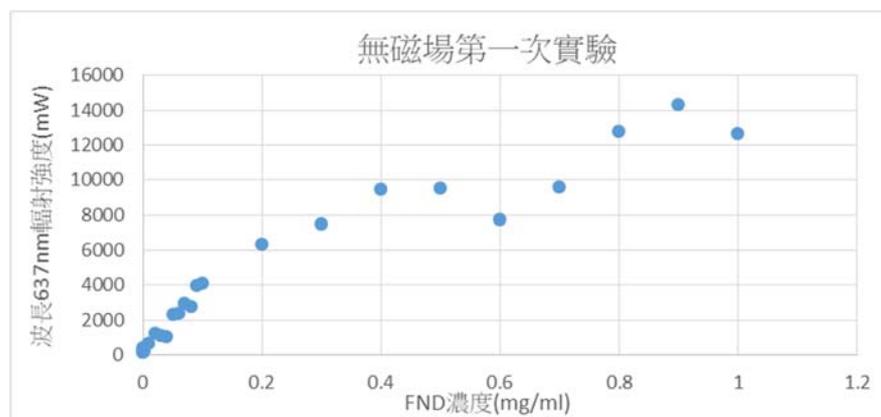
測量時以波長 532 nm 雷射光束進行激發，取的波長為 637 nm 的輻射強度為一段時間的螢光測量數據平均值。在測量時因為 FND 在溶液中進行運動，雷射路徑上所激發的 FND 數目在不同時間時皆有一些差異，因此所發出的螢光會隨時間有些微的不同(參考圖七)。



△ 圖八、X 軸為波長(nm) Y 軸為輻射強度(mW)

最後將固定時間間距內波長的平均值作圖，得出圖八的光譜，光譜中除了有 FND 的螢光以外還有背景雜訊。在圖中的 Cursor2 即為波長為 637.34 nm 的輻射強度。

2. 分析數據



△ 圖九、無磁場第一次實驗數據

呈現雜亂的關係，無法歸納解釋(參考圖九)。能看出 FND 濃度與波長 637 nm 輻射強度有正相關。

3. 結果討論

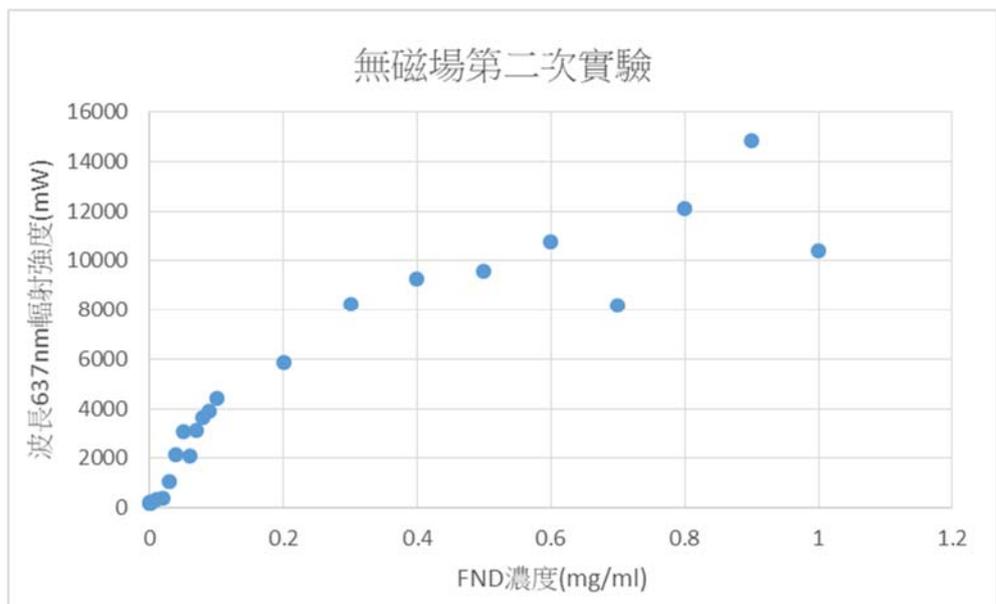
儀器可能有訊號方面的問題，有時會出現非常態的數值。

(三) 第二次實驗

1. 實驗準備過程

將第一次實驗的溶液重新進行測量，並且改為取三次波長 637 nm 的輻射強度數值，並且將數據中顯著偏差的數值剔除，將三次測量取平均再進行作圖。

2. 分析數據



△ 圖十、無磁場第二次實驗數據

在 FND 濃度介於 0~0.6 及 0.8 mg /ml 的數據有正相關，但 FND 濃度 0.7 及 0.9 mg /ml 溶液與趨勢大相逕庭(參考圖十)。

3. 結果討論

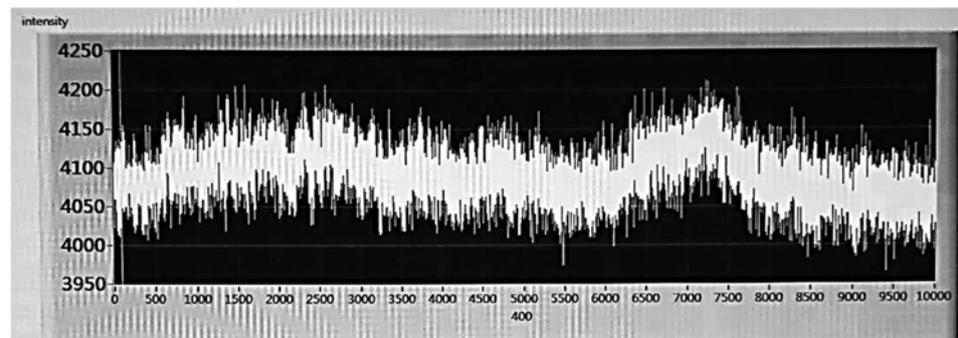
溶液配置方面可能有人為誤差以至於高濃度溶液有相當不合理的偏差。

(四) 第三次實驗

1. 實驗準備過程

將溶液烘乾為 FND 495.5 mg。溶液集中烘乾的過程在杯壁管緣以及移液器無法伸到的角落很可能附著無法回收的 FND。重新配置溶液。先配出 1 mg/ml 的溶液，再稀釋為 0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、

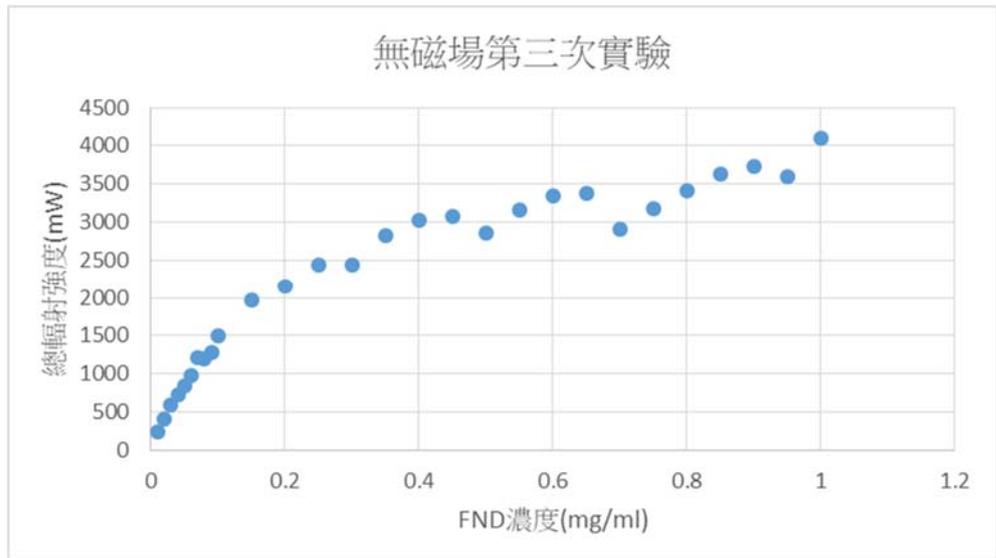
0.09、0.1、0.15、0.2、0.25、0.3、0.35、0.4、0.45、0.5、0.55、0.6、0.65、0.7、0.75、0.8、0.85、0.9、0.95 mg/ml，進行稀釋的次數越少人為誤差的影響愈小，將上次實驗的至多七次稀釋轉為只稀釋一次。其餘 FND 收納於體積 20 ml 的玻璃瓶內，避免與空氣灰塵接觸。使用最小單位 1-2 μm 的移液器，將溶液的體積精確度提升。在放入暗箱前擦拭玻璃管壁，避免水氣、指紋等等因素影響實驗結果。並且為了配合有磁場的實驗，改為偵測總輻射強度。改為採用總輻射強度能夠使波長 637 nm 以外的其他螢光也能夠納入採計，但雜訊會增加。以實驗設計而言，雜訊的增加有利於是否有磁場進行矯正的前後對比。



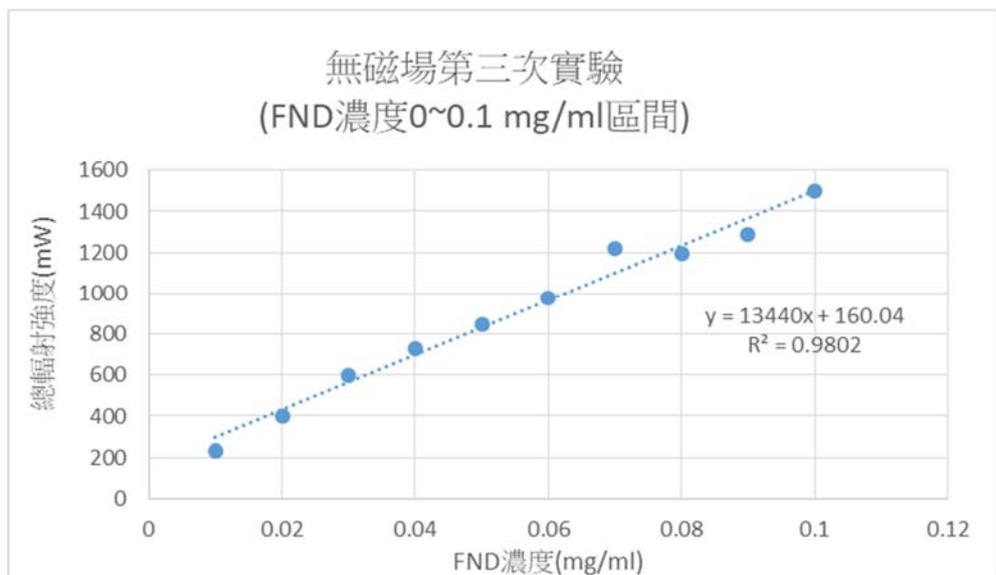
△ 圖十一、X 軸為時間軸(s) Y 軸為總輻射強度(mW)

在每次的測量，電腦會讀入 100000 個總輻射強度的數據，進行平均後作圖。圖十一為不同時間的總輻射強度波動，因為機器的測量接收也會有技術上的誤差，所以偶爾會出現偏差許多的數值。

2. 分析數據



△ 圖十二、無磁場第三次實驗數據



△ 圖十三、無磁場第三次實驗數據(FND 濃度 0~0.1 mg/ml 區間)

無法確定圖十二中週期性的升降原因為何。在濃度為 0~0.1 mg/ml 時的總輻射強度與 FND 濃度呈現正相關(參考圖十三)。濃度 0.1 mg/ml 以下的溶液與濃度 0.1 mg/ml 以上的溶液 FND 濃度與總輻射強度的斜率不同。

3. 結果討論

0.1~1 mg/ml 溶液的總螢光強度週期性升降，原因應並非人為因素，有可能是因為改為使用測量總螢光強度的偵測器而造成，可能為訊號方面的問題。濃度 0.1 mg/ml 以下的溶液與濃度 0.1 mg/ml 以上的溶液 FND 濃度與總輻射強

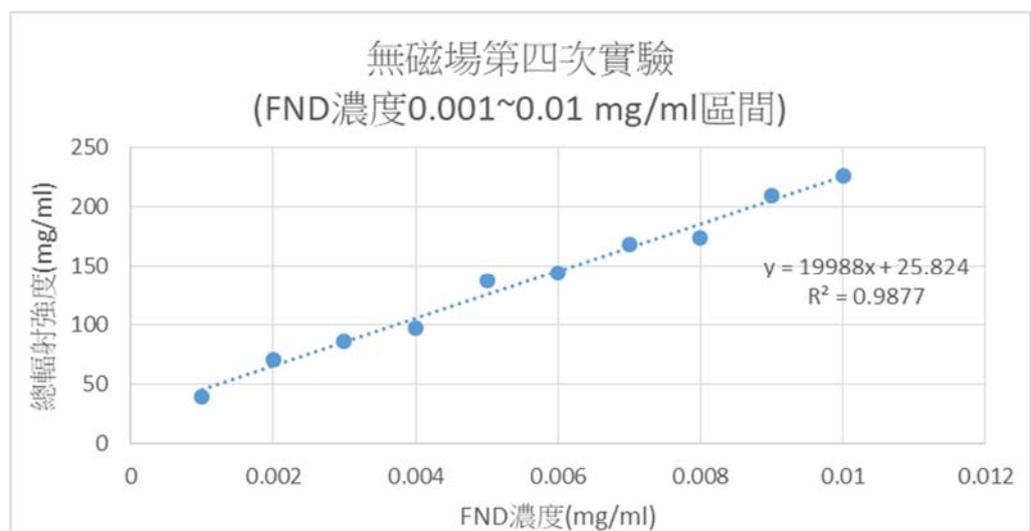
度的斜率不同，即為有其他因素影響總輻射強度。推測原因為：在溶液中的 FND 會使雷射光束穿透溶液時造成散射的現象，很有可能無法完全穿透。在 0.1 mg/ml 的濃度以下時，雷射光束能夠完全穿透液體，因此會激發雷射光路徑上所有的 FND，發出的螢光強度與光路徑上的 FND 顆粒數目呈正比；而在 0.1 mg/ml 的濃度以上時，光束僅有一部份完全穿過溶液，則螢光散射的越少或是 FND 的濃度越高，則 FND 在雷射光路徑上的 FND 顆粒數目越多。在 0.1 mg/ml 濃度以上時，FND 所激發出的螢光強度並不只與 FND 濃度相關，則總輻射強度與 FND 濃度的相關係數自然不同，其斜率也不同。

(五) 第四次實驗

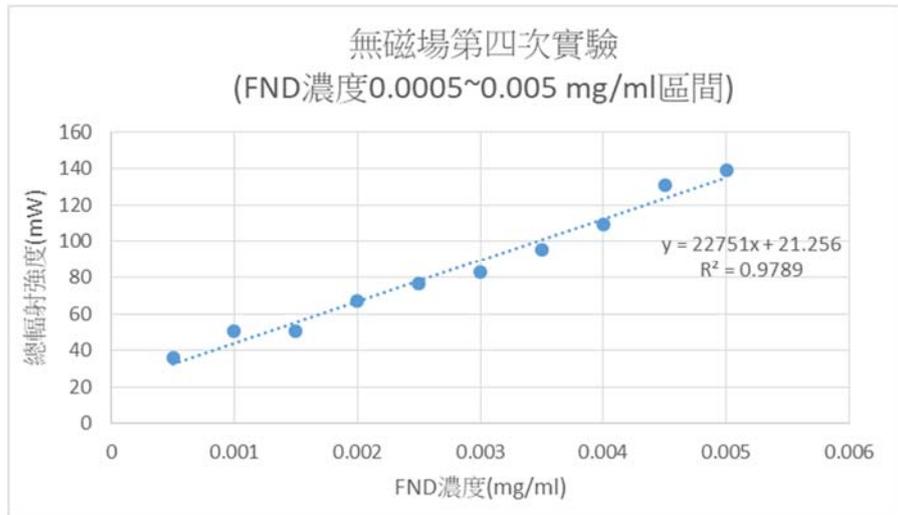
1. 實驗準備過程

由第三次實驗得出濃度 0.01~0.1 FND mg/ml 的溶液呈現正比，為了找出僅是測量總輻射強度無法測定的濃度，因此決定不斷稀釋溶液直至無法看出明顯正比為止。首先加入 13.6 ml 的水，將玻璃管中的濃度稀釋 10 倍，製成 0.001、0.002、0.003、0.004、0.005、0.006、0.007、0.008、0.009、0.01 mg/ml 的溶液。接著不斷測定總螢光輻射強度是否有與濃度呈現明顯正比，若呈現明顯正比便將溶液稀釋兩倍。

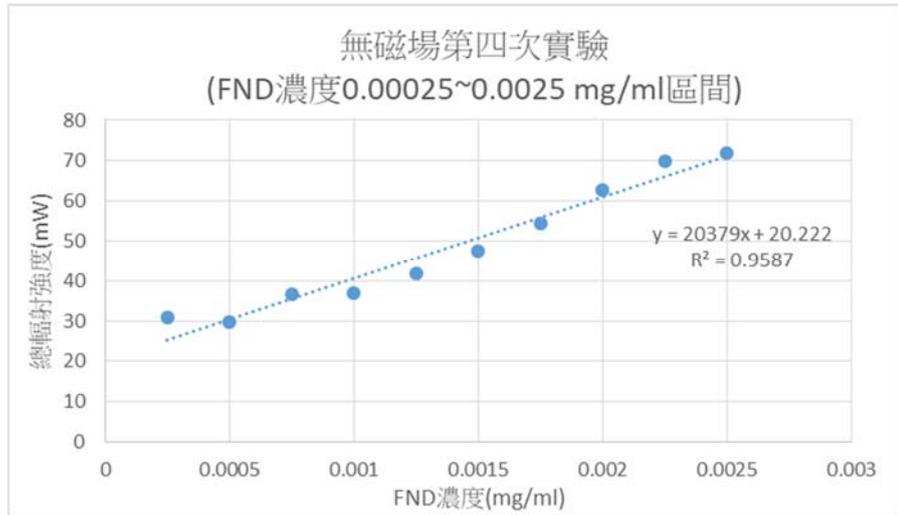
2. 分析數據



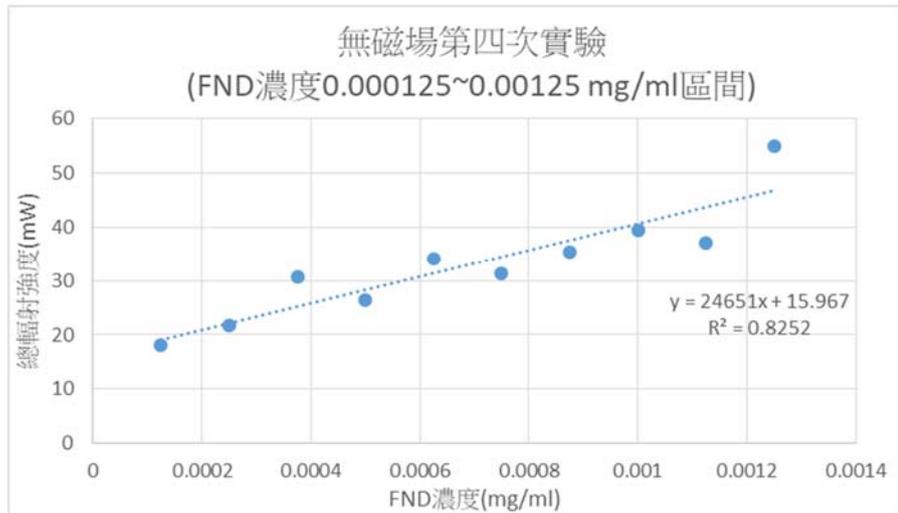
△ 圖十四、無磁場的四次實驗數據(FND 濃度 0.001~0.01 mg/ml 區間)



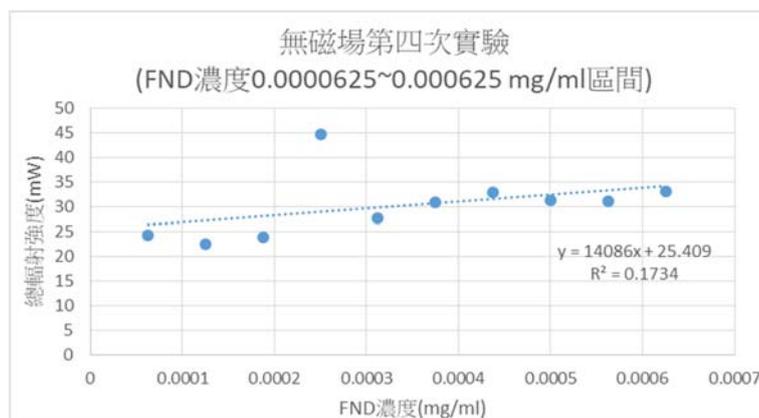
△ 圖十五、無磁場第四次實驗(FND 濃度 0.0005~0.005 mg/ml 區間)



△ 圖十六、無磁場第四次實驗(FND 濃度 0.00025~0.0025 mg/ml 區間)



△ 圖十七、無磁場第四次實驗(FND 濃度 0.000125~0.00125 mg/ml 區間)



△ 圖十八、無磁場第四次實驗(FND 濃度 0.0000625~0.000625 mg/ml 區間)

濃度 0.001~0.000125 mg/ml 的溶液皆與總輻射強度呈現明顯正比(參考圖十四、十五、十六、十七)，決定係數(R^2)介於 0.8~1。濃度 0.000625~0.0000625 mg/ml 的溶液與總輻射強度的決定係數僅有 0.1734，難以看出正比關係，因此決定採用稀釋 160 倍的溶液進行實驗二(參考圖十八)。

3. 結果討論

濃度為 0.0004375 mg/ml 的溶液總輻射強度偏高，有可能是因為儀器誤差，或是在多次的稀釋下出現的人工誤差。但與實驗二第二次實驗對照之下，可知實驗二第二次實驗中濃度為 0.0004375 mg/ml 的溶液符合趨勢走向，因此排除人為誤差使溶液濃度不正確的可能。若是人為誤差導致溶液濃度不正確，則應會影響使用同樣溶液的實驗二第二次實驗，使濃度為 0.0004375 mg/ml 溶液的數據點偏離。綜上所述，有較大可能性為儀器誤差或是其他原因。其他原因例如：雖為規格相同的玻璃管，但玻璃管上的刮痕不同，玻璃管上所附著的雜質量也不同。雖有在檢測前先以衛生紙擦拭外層管壁以減小誤差，但仍可能有個別的影響。

二、實驗二

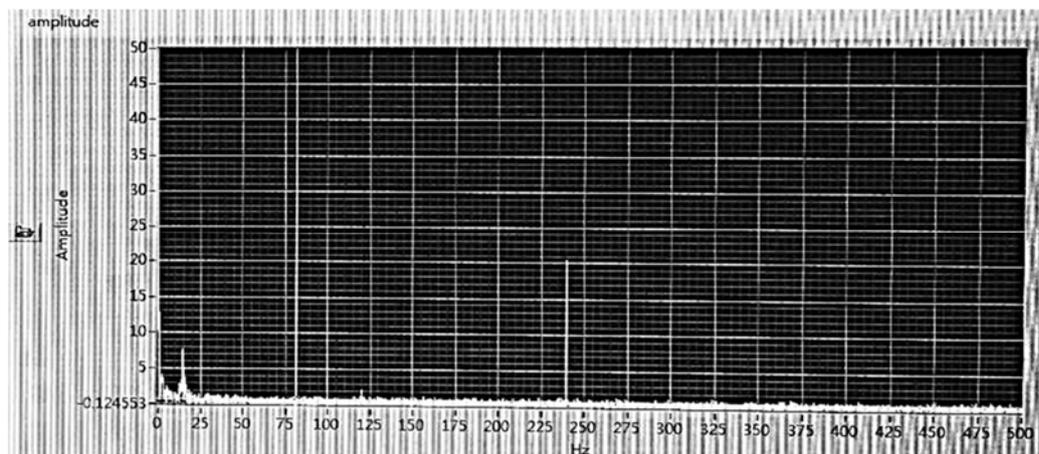
(一) 預估測量結果

由磁場的變動，會導致 FND 激發出的螢光強度出現改變。針對磁場變換後，螢光的波動進行快速傅立葉轉換(FFT)，FFT 後的數值能夠除去背景雜訊的影響，濃度越大，螢光強度增加，磁場影響越明顯，則螢光的波動也越明顯，FFT 數值越大，能夠與溶液的濃度展現出顯著的正相關。

(二) 第一次實驗

1. 實驗準備過程

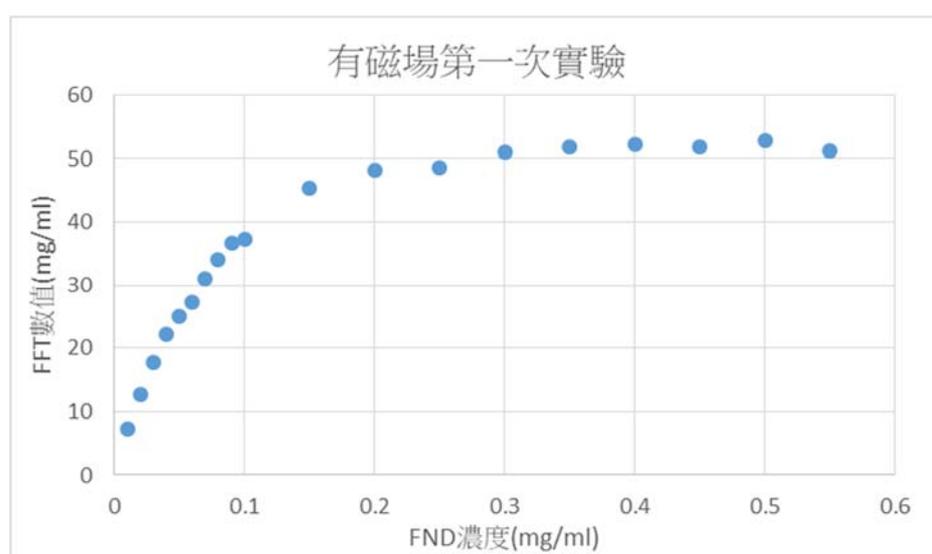
使用實驗一第三次實驗以更正方式配置的溶液，偵測總輻射強度。將磁場變換頻率設定為 240 Hz，針對以 240 Hz 變換的輻射進行快速傅立葉轉換。在總輻射強度與時間的變化圖中，因為增加磁場會使螢光強度變小，總輻射強度會減小且仍隨時間波動。



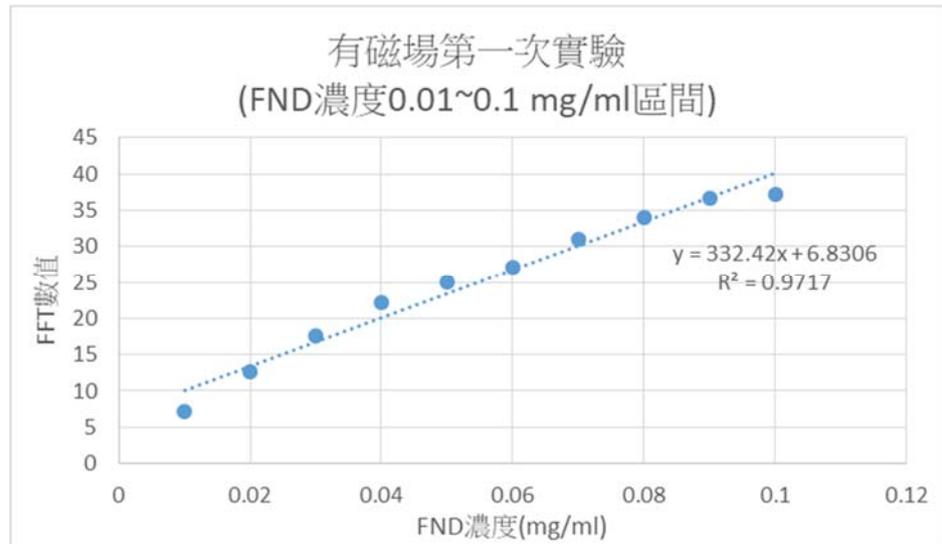
△ 圖十九、FFT 數值顯示表 X 軸為波長(nm) Y 軸為 FFT 數值

在圖十九中，能夠看到在 240 Hz 之處有一條白線，向 y 軸對到的即為進行過快速傅立葉變換(FFT)後的數值。

2. 分析數據



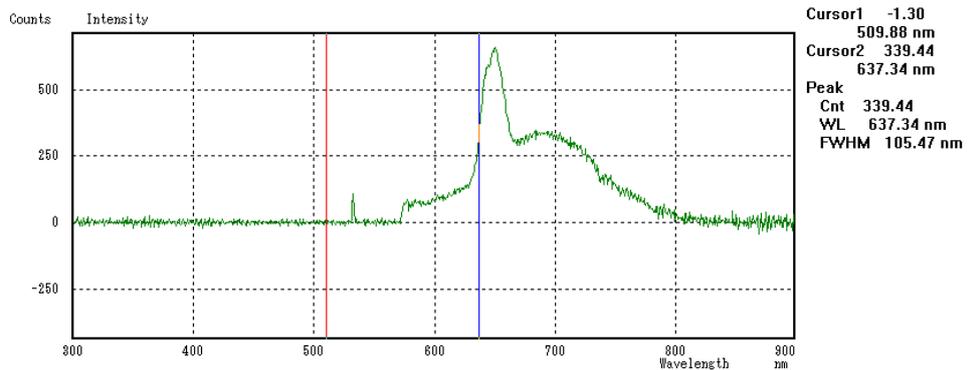
△ 圖二十、有磁場第一次實驗



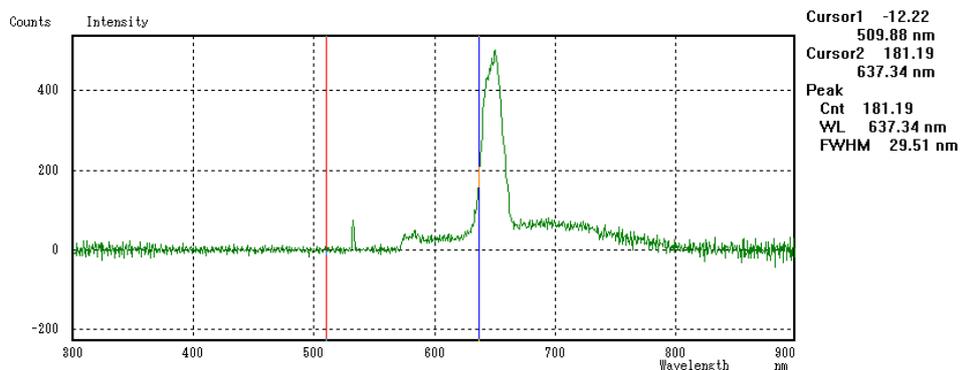
△ 圖二十一、有磁場第一次實驗(FND 濃度 0.01~0.1 mg/ml 區間)

濃度為 0~0.1 FND mg/ml 時的 FFT 數值與 FND 濃度呈現正相關(參考圖二十一)，由決定係數可看出其高度相關。

3. 結果討論



△ 圖二十二、0.01 mg/ml 的 FND 溶液輻射 X 軸為波長(nm) Y 軸為輻射強度(mW)



△ 圖二十三、水的輻射 X 軸為波長(nm) Y 軸為輻射強度(mW)

在 0.1 mg/ml 濃度以上時，由於散射的緣故，使雷射光路徑上被激發的 FND 顆粒數目相差不多，使用磁場進行轉換的效用在觀測中不顯著。隨著溶

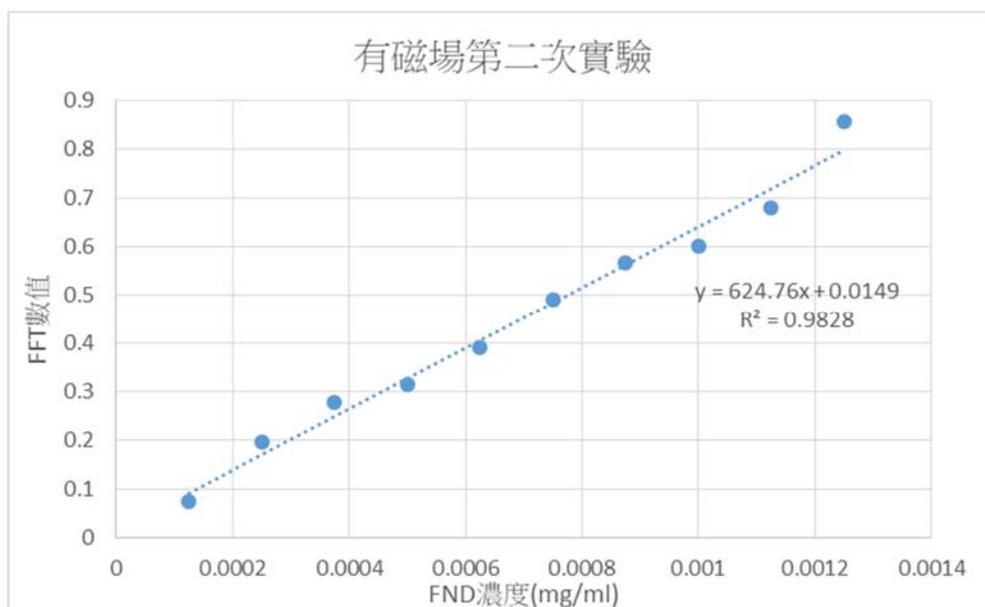
液的濃度增加，散射的效果越明顯，雷射光束無法穿透溶液，使雷射只能夠激發玻璃管內被雷射直射的部分 FND，則受到激發的 FND 數目相差便越稀少，理論上 FFT 數值會趨於定值，與實驗數據相符。但與沒有磁場的第三次實驗相比，決定係數相差不大，甚至稍低。因為溶液與沒有磁場的第三次實驗所使用的溶液相同，且溶液皆裝於玻璃試管中，空氣中的雜質不易進入汙染，且此實驗是在沒有磁場的第三次實驗測量完之後立刻進行，排除為外來物質的影響。而使用設施與程式皆與沒有磁場的實驗三相同，在排除以上原因後推測為實驗設計的問題。在觀察數據後，得知純水的總輻射強度為 54.3466 mW(參考圖二十三)，而在本實驗設計所配置的最低濃度溶液，也就是 0.01 mg/ml 的溶液，其總輻射強度為 232.0951 mW(參考圖二十二)。純水總輻射強度在此實驗中為主要雜訊，訊噪比高，除去雜訊的效用並不明顯，雜訊只是使總輻射強度與溶液濃度的 y 截距提高，而沒有顯著的掩蓋主要訊息。且 FND 濃度與螢光強度有較為直接的正相關，進行快速傅立葉轉換後，FND 濃度與 FFT 數值的關係較為間接，有可能就是使此實驗的決定係數比實驗一第三次實驗略低的原因。

(三) 第二次實驗

1. 實驗準備過程

對實驗一的第四次實驗所測不出線性關係的溶液進行檢測，共有濃度 0.0000625、0.000125、0.0001875、0.00025、0.0003125、0.000375、0.0004375、0.0005、0.0005625、0.000625 mg/ml 的溶液。偵測總輻射強度並且進行快速傅立葉轉換。

2. 分析數據



△ 圖二十四、有磁場第二次實驗

FND 濃度與 FFT 數值呈現明顯正相關，決定係數高達 0.9828。(參考圖二十四)與實驗一第四次實驗對照之下可得出加入磁場並且以快速傅立葉轉換能夠成功的將水的背景雜質剔除。

3. 結果討論

此實驗數據符合預期，與實驗一第四次實驗對照之下可得出加入磁場並且以快速傅立葉轉換能夠成功的將水的背景雜質剔除。

三、實驗三

(一) 預估測量結果

沒有磁場的情況下，因為受到 PI 的輻射干擾，產生雜訊，總輻射強度應會與溶液的 FND 濃度相關性低。加入磁場並且進行快速傅立葉轉換後，FFT 數值應會與 FND 濃度呈現正相關，屏除 PI 所造成的背景雜訊。

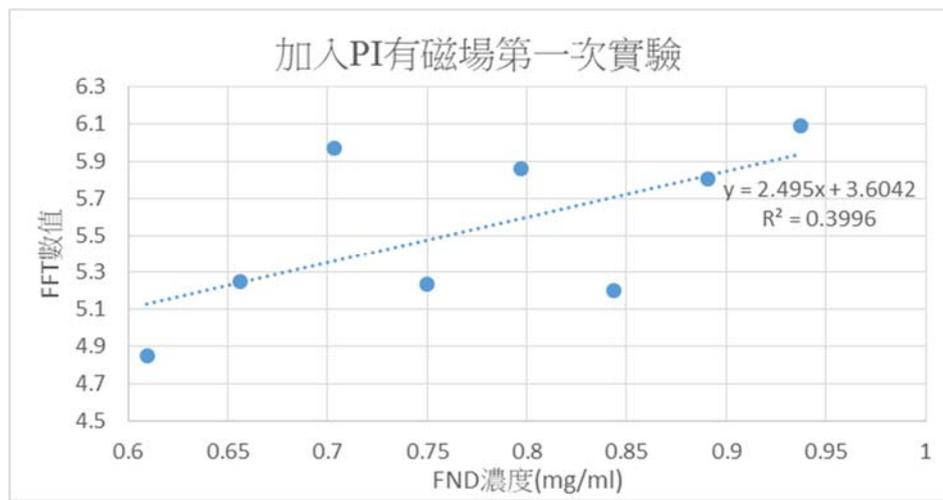
(二) 第一次實驗

1. 實驗準備過程

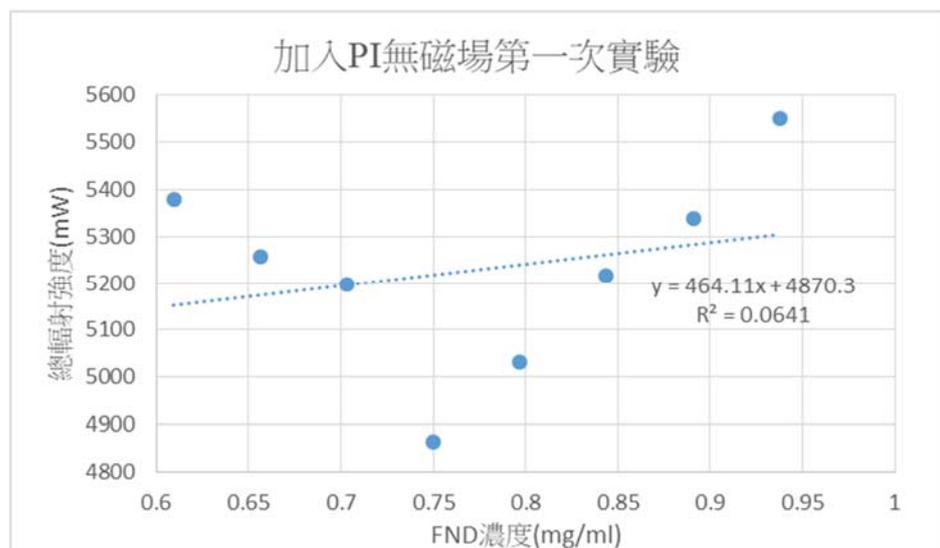
將 1 mg/ml 的 PI 0.1 ml 加入 1.5 ml，濃度為 0.65、0.7、0.75、0.8、0.85、0.9、0.95 mg/ml 的 FND 溶液中，製備出 FND 濃度分別為 0.609375、0.65625、0.703125、0.75、0.796875、0.84375、0.890625、0.9375 mg/ml 且 PI

濃度 0.0625 mg/ml 的溶液。配置 FND 濃度必須於 0.000625 mg/ml 以上，以確保總輻射強度與 FND 濃度呈正向關係，使加入 PI 之後擾亂正向關係的效應特別明顯，且能夠確定總輻射強度與濃度不成正比的原因為 PI 的背景輻射干擾而不是 FND 溶液本身的誤差所造成。觀察發現加入 PI 後的溶液 FND 容易沉澱，因此在放入暗箱中進行測量前都放進超音波震盪機，使溶液中的 FND 均勻分布，並且迅速測完。在拿出超音波震盪機後以拭鏡紙擦拭管壁上的水，以避免誤差。

2. 分析數據



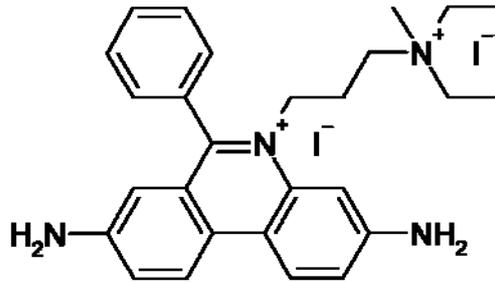
△ 圖二十五、加入 PI 有磁場第一次實驗



△ 圖二十六、加入 PI 無磁場第一次實驗

由圖二十五及二十六能夠看出，有磁場的情況(參考圖二十五)比沒有磁場的情況(參考圖二十六)還要更為明顯的看得出 FND 濃度的變化趨勢，決定係數相差 0.3355。但與實驗二比較，FFT 數值與 FND 濃度並沒有非常顯著的相關性。

3. 結果討論



△ 圖二十七、PI 化學結構式

實驗數據與預想測量結果不符的原因可能為 PI 的性質所造成的問題。針對此，有對於 PI 進行檢測，確認其是否會被磁場影響。在有磁場的情形下，PI 的 FFT 數值為 0.229923，並沒有顯著到會影響 FND 的 FFT 數值。因此改為針對 FND 的性質進行研究，進而發現 FND 帶有負電的特性使之在具有大量電解質的溶液中被帶正電的離子包圍，而在正離子的包圍之外還有負離子受到正離子吸引而形成另一層殼層，再被眾多的正負離子包圍之下，FND 本身所帶有的負電被削弱。原先在水溶液中因為各個 FND 都帶有約 30 eV 的負電荷而互相排斥，進而使 FND 能夠均勻擴散於水溶液之中。被大量離子包圍之下，FND 帶的負電被削弱，於是 FND 因為凡德瓦力而聚集沉澱，在溶液中無法均勻分布。加入離子化合物 PI(參考圖二十七)使 FND 溶液中離子數量大幅提升，使 FND 沉澱現象非常明顯。在實驗中觀察到的 FND 沉澱快速能夠支持此假說。

四、實驗三修正

(一) 預估測量結果

加入 BSA 後成功改善 FND 的沉澱情形，並且在加入磁場並進行快速傅立葉轉換後，FFT 數值應會與 FND 濃度呈現正相關，屏除 PI 和 BSA 所造成的背景雜

訊。

(二) 第一次實驗

1. 實驗準備過程

將在實驗三第一次實驗配置出的濃度分別為 0.609375、0.65625、0.703125、0.75、0.796875、0.84375、0.890625、0.9375 mg/ml 且 PI 濃度 0.0625 mg/ml 的溶液，於每個試管中加入濃度 5 mg/ml 的 BSA 各 0.2 ml。將 FND 溶液放進超音波震盪機，一邊加入 BSA 溶液，接著鎖上蓋子放置於超音波震盪機中約五分鐘使溶液中的 FND 與 BSA 均勻混和。

2. 實驗結果



△ 圖二十八、FND 沉澱實際照片

將 FND 溶液於超音波震盪機取出後，仍然能夠明顯的觀察到 FND 於底部的沉澱。加入 BSA 以增加在離子溶液中的 FND 的溶解度效果並不明顯。(參考圖二十八)

3. 結果討論

加入 BSA 欲使 FND 在電解質濃度高的水溶液中的溶解度提高，但是效果不是非常顯著。有可能是因為在超音波震盪機中均勻混和的時間不夠久，FND 表面尚未完全和 BSA 形成氫鍵，仍然有大量正離子附著於其表面。若先將 FND 先與 BSA 溶液混和均勻再放入電解質濃度高的水溶液，則在一開始 BSA 不用排開附著於 FND 表面的離子，FND 和 BSA 形成氫鍵的反應應會較為有效。

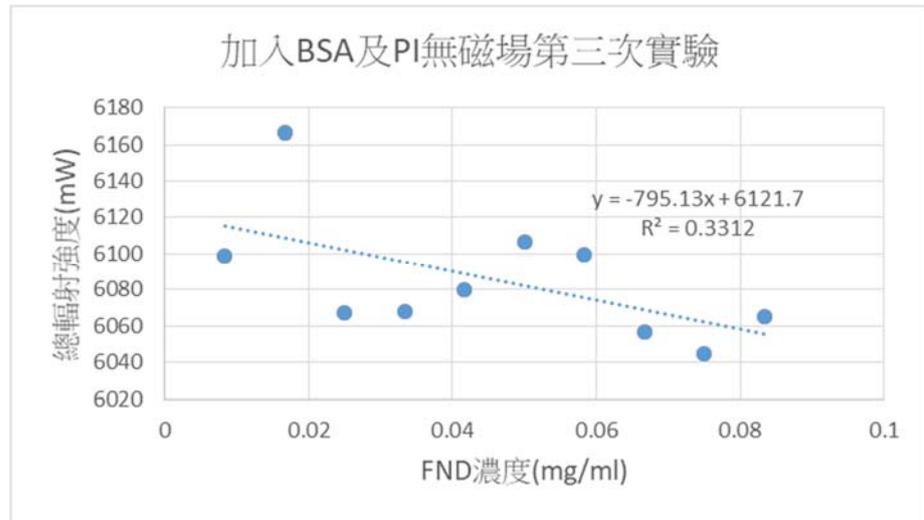
(三) 第二次實驗

1. 實驗準備過程

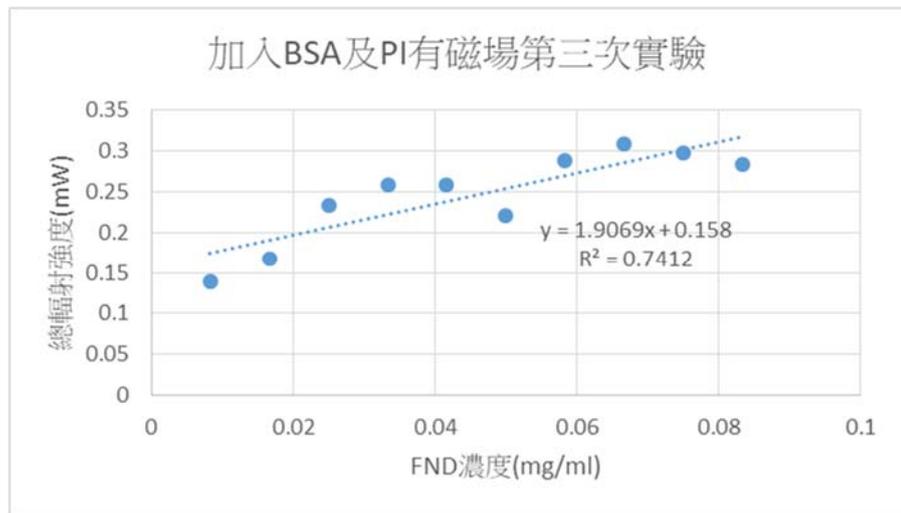
重新配置濃度為 0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、

0.1 mg/ml 的 FND 溶液各 2 ml，加入濃度為 1mg/ml 的 BSA 200 μ l，接著再加入濃度為 5 mg/ml 的 PI 200 μ l，使每管溶液體積為 2400 μ l，且 BSA 濃度皆為 0.83333 mg/ml，PI 濃度皆為 0.41667 mg/ml。以上所有溶液配置都在超音波震盪機中進行，使溶液均勻混和。

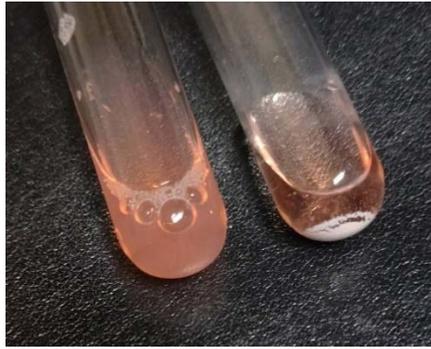
2. 實驗結果



△ 圖二十九、加入 BSA 及 PI 無磁場第三次實驗



△ 圖三十、加入 BSA 及 PI 有磁場第三次實驗



△ 圖三十一、FND 沉澱實際照片

(左方為第三次實驗以 FND 濃度 0.1 mg/ml 所配置的溶液，右方為第二次實驗以相同濃度的 FND 溶液所配置出的溶液。兩者之間唯一的變因為加入 BSA 及 PI 的先後順序)

由圖二十九及圖三十的比較能夠得出有磁場的情況比沒有磁場的情況還要更為明顯的看得出 FND 濃度的變化趨勢，決定係數相差 0.41，而由圖三十一能夠觀察到 FND 先加入 BSA 再加入 PI 能夠避免 FND 沉澱。

3. 結果討論

在實驗中得出的總輻射強度實驗數據約介於 6040~6180 mW，而在先前的實驗一第三次實驗數據中，FND 濃度為 0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.1 mg/ml 的 FND 溶液總輻射強度約介於 200 ~ 1600 mW。推測 PI 本身即為輻射強度極大的溶質，才會將總輻射強度的數據顯著提高，而本實驗所使用的螢光接收器對於高強度的輻射訊號較不敏感，而輻射強度超過 6000 mW 很有可能過於接近螢光接收器強度上限，因此實驗效果不彰。

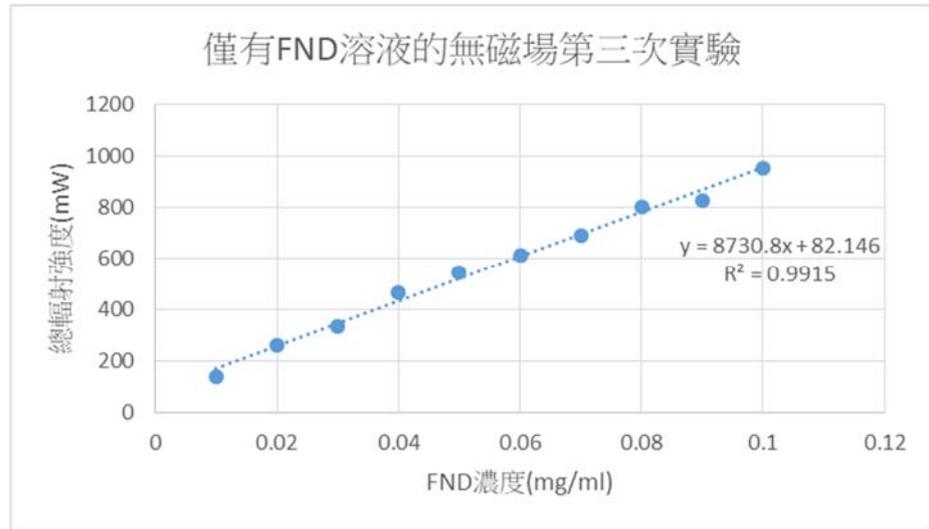
(四) 第三次實驗

1. 實驗準備過程

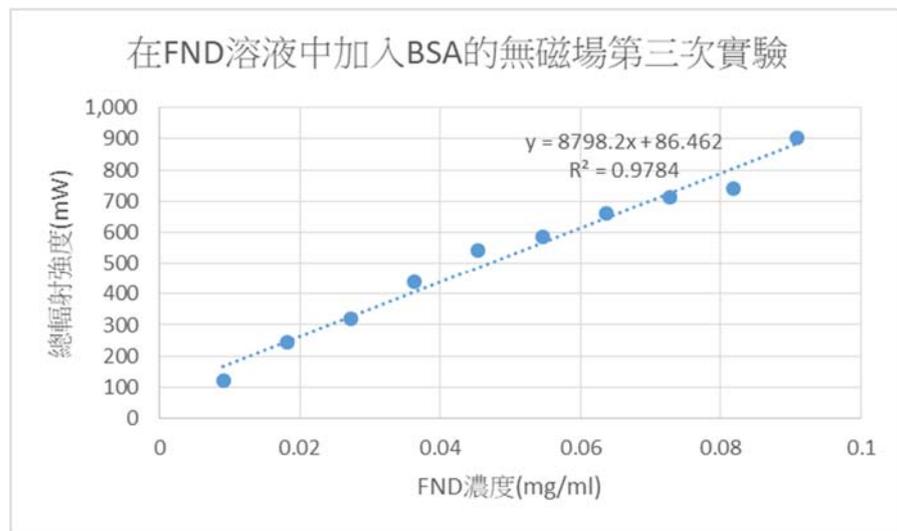
重新配置 0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.1 mg/ml 的 FND 溶液，加入濃度為 1mg/ml 的 BSA 200 μ l，接著再加入濃度為 5 mg/ml 的 PI 10 μ l，使每管溶液體積為 2210 μ l，且 BSA 濃度皆為 0.09050 mg/ml，PI 濃度皆為 0.02262 mg/ml。以上所有溶液配置都在超音波震盪機中進行，每進行一個步驟就放置於超音波震盪機中兩分鐘，使溶液均勻混和。為了使每個步驟對於螢光測量的影響都清楚觀測，因此針對每一步驟都有進行測

量。

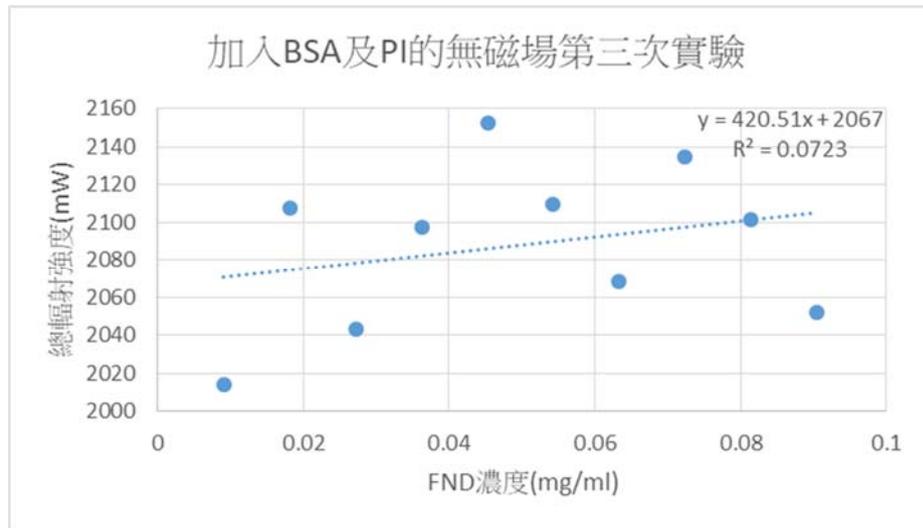
2. 實驗結果



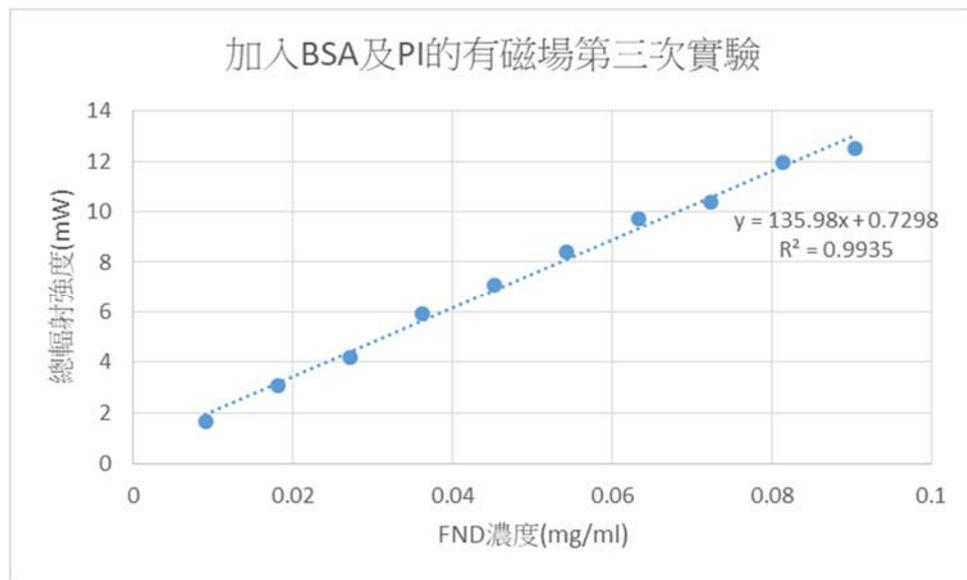
△ 圖三十二、僅有 FND 溶液的無磁場第三次實驗



△ 圖三十三、在 FND 溶液中加入 BSA 的無磁場第三次實驗



△ 圖三十四、在 FND 溶液中加入 BSA 及 PI 的無磁場第三次實驗



△ 圖三十五、加入 BSA 及 PI 的有磁場第三次實驗

重新配置的 FND 溶液總輻射強度與 FND 濃度呈正比，決定係數為 0.9915，水的背景輻射影響不大(參考圖三十二)；加入 BSA 後的 FND 溶液總輻射強度仍與 FND 濃度呈正比，相關係數為 0.9784，加入 BSA 增加了背景雜訊但是影響也不大(參考圖三十三)；再加入 PI 後，此溶液的總輻射強度顯然與 FND 濃度不呈正比，決定係數僅有 0.0723(參考圖三十四)；最後加入磁場，能夠看出磁場排除了 PI、BSA、水的背景輻射，決定係數高達 0.9935(參考圖三十五)。由以上的數據得出，加入磁場能夠顯著排除背景輻射。

3. 結果討論

實驗數據符合預期，加入磁場後以快速傅立葉轉換能夠成功將背景雜訊剔除。

五、實驗四

(一) 預估測量結果

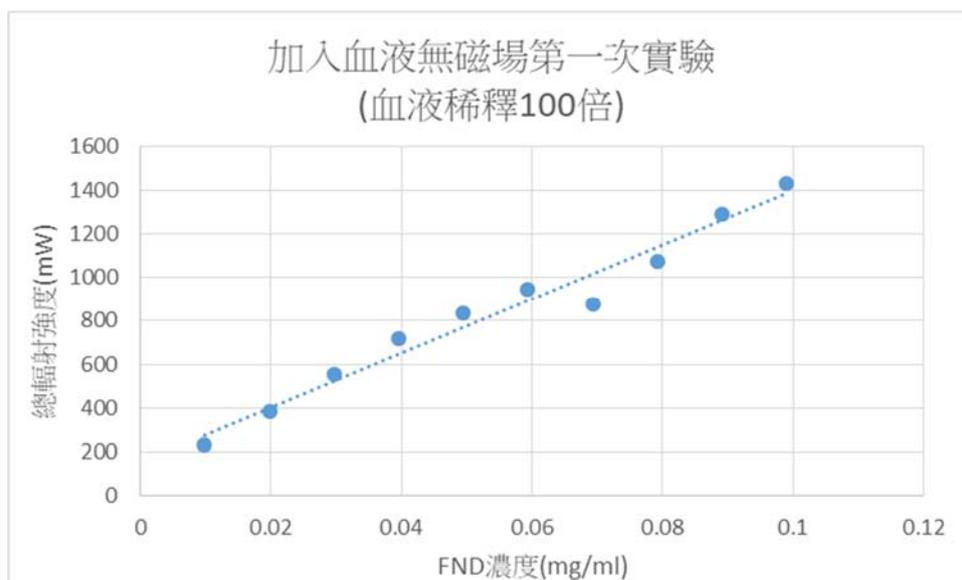
沒有磁場的情況下，因為受到血液的輻射干擾，產生雜訊，總輻射強度應會與溶液的 FND 濃度相關性低。加入磁場並且進行快速傅立葉轉換後，FFT 數值應會與 FND 濃度呈現正相關，屏除血液所造成的背景雜訊。

(二) 第一次實驗

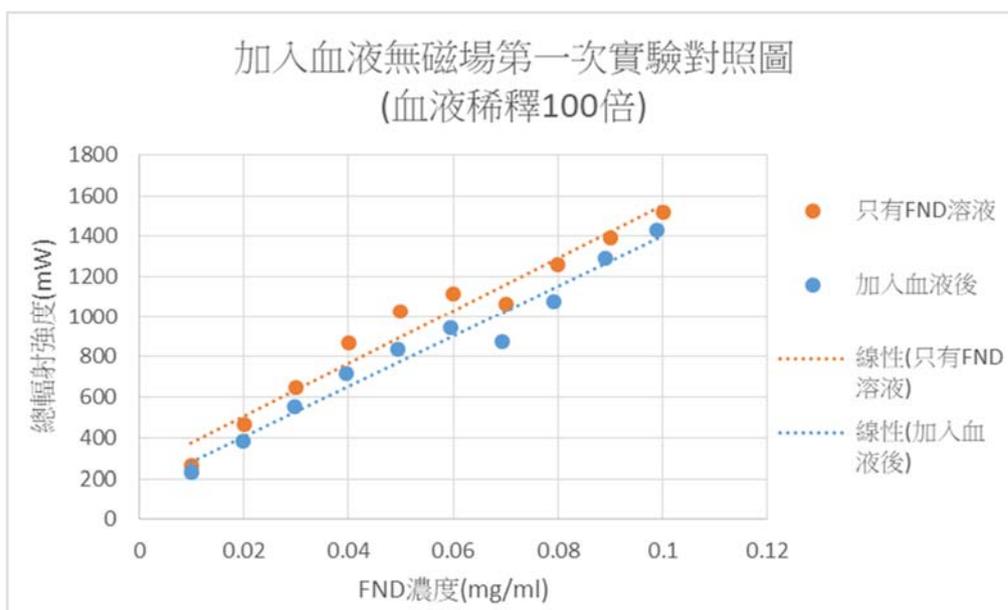
1. 實驗準備過程

配置 FND 濃度為 0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.1 mg/ml 的 FND 溶液各 2 ml。配置 FND 濃度必須於 0.000625 mg/ml 以上，以確保總輻射強度與 FND 濃度呈正向關係，使加入血液之後擾亂正向關係的效應特別明顯，且能夠確定總輻射強度與濃度不成正比的原因為血液的背景輻射干擾而不是 FND 溶液本身的誤差所造成。各加入血液 0.02 ml。加入血液後各試管中溶液的 FND 濃度分別約為 0.00990099、0.01980198、0.02970297、0.03960396、0.04950495、0.059405941、0.069306931、0.079207921、0.089108911、0.099009901 mg/ml 且血液稀釋 100 倍(血球濃度 3.576×10^8 個/ml)的溶液。

2. 分析數據



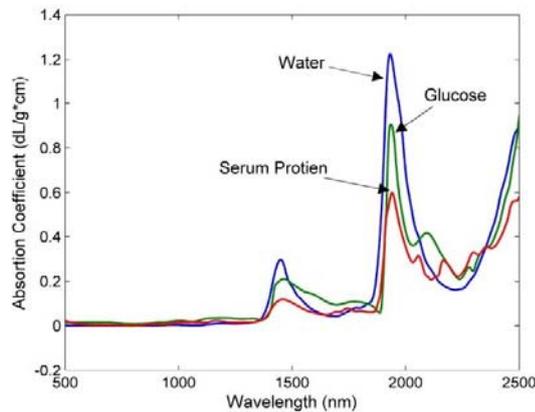
△ 圖三十六、加入血液無磁場第一次實驗(血液稀釋 100 倍)



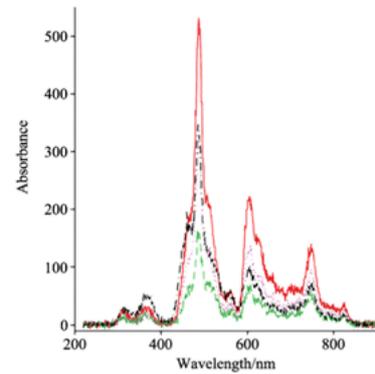
△ 圖三十七、加入血液無磁場第一次實驗對照圖(血液稀釋 100 倍)

由圖三十六及圖三十七能夠看出，加入血液對於螢光訊號測量並無明顯干擾，且加入血液後整體的所測得的總輻射強度往下移。

3. 結果討論



△ 圖三十八、血液的吸收光譜



△ 圖三十九、血液放射光譜曲線

加入血液後導致數據整體下移的原因推測為：血液中的血球及各種大分子物質將 FND 所發出的螢光散射或吸收，使其進入偵測計之總輻射減少，故總輻射強度減小。或者是由於血液濃度提高導致溶液中的離子濃度提高，使 FND 容易聚合沉澱，故受到螢光激發的 FND 顆粒數減少，則總輻射強度下降。實驗結果為血液並沒有明顯的干涉 FND 的螢光訊號接收，使總輻射強度與 FND 濃度不成正比，與實驗假說不符。血液之所以對 FND 螢光訊號干擾甚微，推測原因為血液的吸收光譜(參考圖三十八)對於波長 500~700 nm 的波段幾乎不吸收，則 FND 的螢光幾乎不會受到血液吸收的影響，且血液的發射光譜(參考圖三十九)在波長 637 nm 左右的輻射強度不到 100 mW，而本實驗中所使用最低 FND 濃度 0.01 mg/ml 的溶液在未加血液之前的總輻射強度即高達 232.0951 mW，則 FND 的螢光訊號強度不會被血液的背景輻射蓋過。

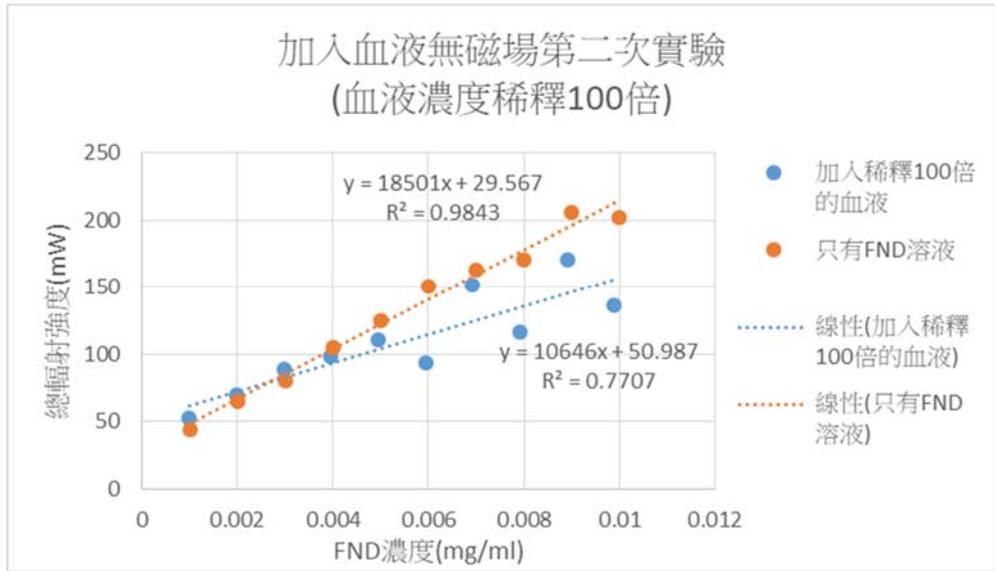
(三) 第二次實驗

1. 實驗準備過程

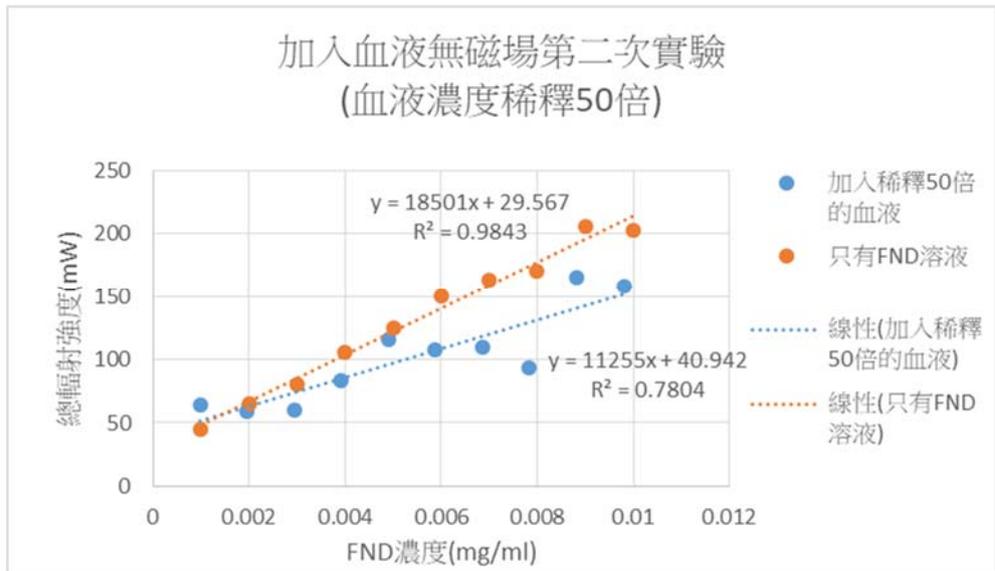
重新配置 FND 濃度為 0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.1 mg/ml 的 FND 溶液各 0.99 ml。各加入血液 0.01 ml，則配置好的溶液中各試管內的血液皆稀釋 100 倍(血球濃度 3.576×10^7 個/ml)。接續加入血液 0.0102 ml，則配置好的溶液中各試管內血液皆稀釋 50 倍(血球濃度 7.152×10^7 個/ml)。再加入血液 0.0052 ml，則配置好的溶液中各試管內血液皆稀釋 40 倍(血球濃度 8.94×10^7 個/ml)。再加入血液 0.0087 ml，則配置好的溶液中各試管

內血液皆稀釋 30 倍(血球濃度 1.192×10^8 個/ml)。

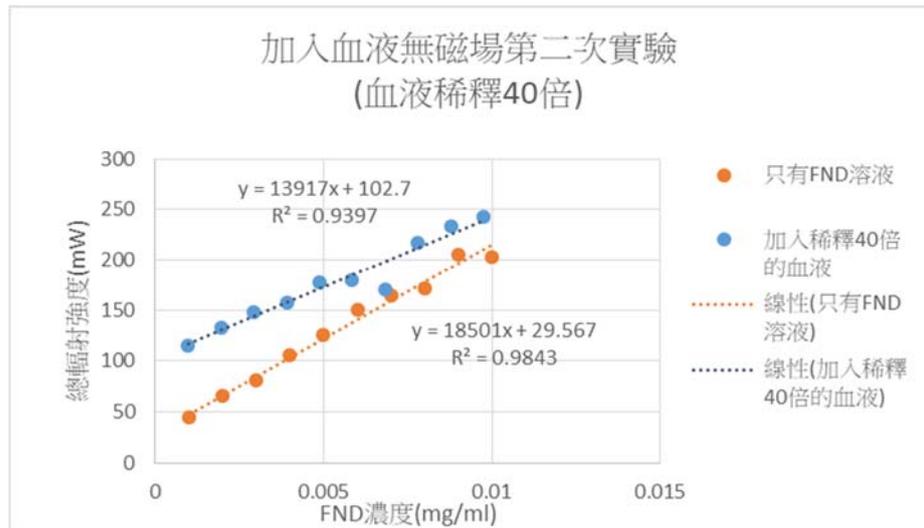
2. 分析數據



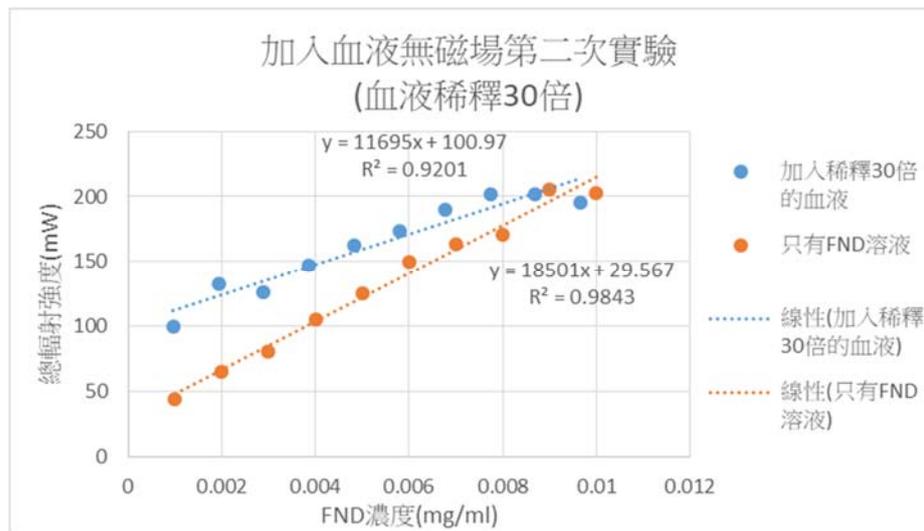
△ 圖四十、加入血液無磁場第二次實驗(血液濃度稀釋 100 倍)



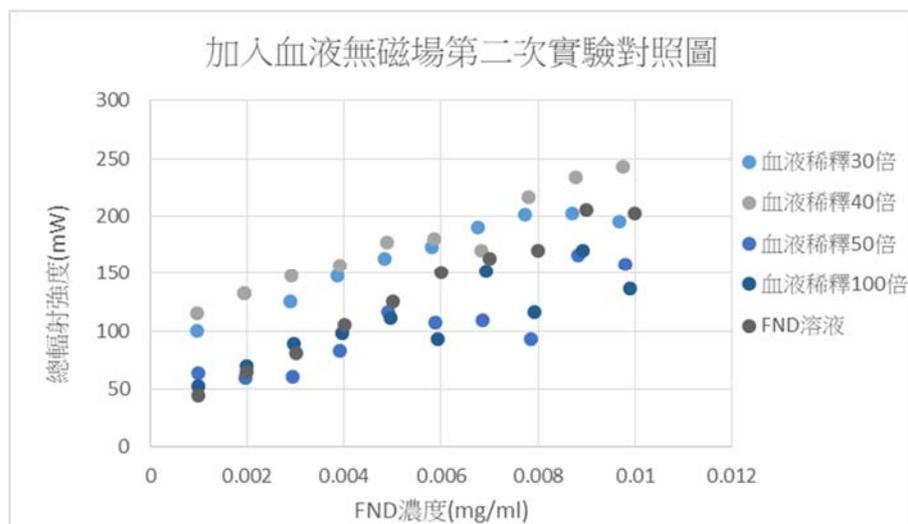
△ 圖四十一、加入血液無磁場第二次實驗(血液濃度稀釋 50 倍)



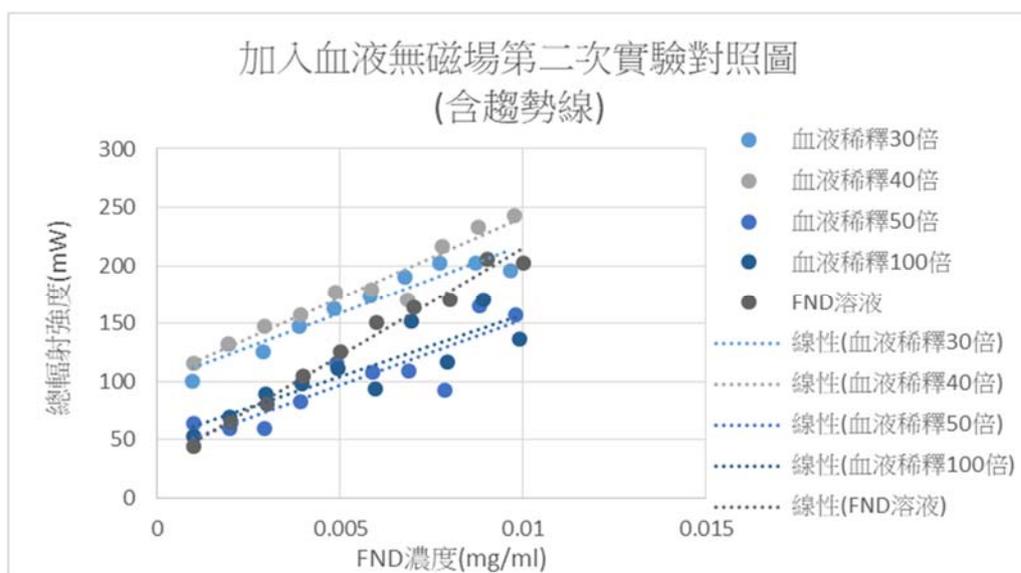
△ 圖四十二、加入血液無磁場第二次實驗(血液稀釋 40 倍)



△ 圖四十三、加入血液無磁場第二次實驗(血液稀釋 30 倍)



△ 圖四十四、加入血液無磁場第二次實驗對照圖



△ 圖四十五、加入血液無磁場第二次實驗對照圖(含趨勢線)

加入血液後更正的 FND 濃度有重新計算後才作圖。血液稀釋 100 倍及 50 倍的數據點絕對係數較大，偏差較多。(參考圖四十、四十一)血液稀釋 40 倍及 30 倍的數據點絕對係數較小，偏差較少。(參考圖四十二、四十三)稀釋 100 倍及 50 倍的數據點比僅有 FND 溶液的總輻射強度略小，稀釋 40 倍及 30 倍的數據點比僅有 FND 溶液的總輻射強度略大。以上數據的 FND 濃度皆和總輻射強度呈現明顯正向關係。(參考圖四十四、四十五)

3. 結果討論

人為及機械誤差造成數據點上下偏移不定，無法進行分析。但仍然能夠顯然看出血液濃度並不會大幅干擾 FND 螢光訊號。血液為由生物體中直接取出的溶液，很有可能會隨著放置時間久而有些許性質改變。第二次實驗的血已被擱置三四天，不如第一次實驗直接用當天的血來的準確。雖說第二次實驗的參考數據較多但是無法釐清關係，不如第一次實驗具有參考價值。且抗凝血劑在時間的推移下作用減小，在血液的底部出現些許小血塊，可能造成實驗誤差及數據不精確等等問題。

六、為了消弭實驗誤差，進行了以下操作：

- (一) 於暗箱中進行操作，且固定波長 532 nm 雷射強度為 20 mW。
- (二) 減少稀釋次數，降低人為誤差。
- (三) 採集更多次數的樣本，降低機械誤差。

- (四) 擦拭玻璃管壁，避免水氣、指紋等等因素影響實驗結果。
- (五) 加入抗凝血劑及多聚甲醛(paraformaldehyde)以阻止凝血及固定血液中的細胞以減少血液中的不安定因素。

肆、結論與應用

- 一、 FND 發出螢光的原理為能階躍遷，螢光強度隨磁場增加而減小。
- 二、 濃度在 0.1 mg/ml 以上的溶液受到光散射的影響，使濃度與螢光強度正相關情形不明顯。
- 三、 使用週期性磁場變換改變螢光強度，之後針對磁場變換的頻率使用快速傅立葉轉換所得出的數值與溶液濃度呈現明顯正比，並且能夠非常有效的排除水的背景輻射。
- 四、 濃度在 0.000625 mg/ml 以下的溶液無法由總輻射強度看出與溶液濃度的正相關，使用磁場變換並且利用快速傅立葉轉換後的數值才能看出與溶液濃度的正相關關係。
- 五、 FND 本身所帶的負電荷使之在高離子濃度的溶液中會被正離子圍繞，減低其所帶的負電的影響力。原先因為彼此帶負電相斥而均勻分散於溶液中，在高離子濃度的溶液中則會因為負電影響力減低而受凡德瓦力影響凝聚沉澱。
- 六、 以 BSA 包裹 FND 能夠有效的避免 FND 在高離子濃度溶液中沉澱。
- 七、 血液對於 FND 的螢光測定影響甚微。
- 八、 未來將使用不同物質包裹 FND 使 FND 在電解質濃度高的溶液中仍能夠維持其高溶解度且計畫再次使用新鮮血液進行實驗四的操作，且一氣呵成配成所有溶液，以減少溶液之間可能因時間造成性質上的誤差，在相似的時間進行實驗能使機器或人為的誤差相似，且血液的性質尚未隨時間改變。
- 九、 利用螢光強度測量溶液濃度不會破壞實驗樣本，是值得發展的方向，未來 FND 應用於生物體時測定即可使用此方法。FND 表面的碳可以藥物進行鍵結，以 FND 的濃度推算藥物濃度。也可使用 FND 進行生物標記，追蹤特定細胞於身體內部的活動情形。此外，溫度也會影響到 FND 的螢光，也可使用此特性讓 FND 成為奈米溫度計。在 FND 外包裹金原子，則可在利用 FND 確認位置後，照射電磁波使金原子溫度上升，達到殺死目標細胞的效果。目前已在白老鼠以及迷你豬中注射 FND 溶液進行生物體的實驗。

伍、參考文獻

- 一、張煥正（2015）。奈米螢光鑽石研究成果報導。自然科學簡訊，27（4），150-153。
- 二、艾培仁（2016）。螢光奈米鑽石對於細胞膜通道結構之追蹤與奈米溫度量測。國立清華大學化學系所學位論文。全國博碩士論文資訊網，105NTHU5065027。
- 三、Su, L., Wu, M., Hui, Y. et al. Fluorescent nanodiamonds enable quantitative tracking of human mesenchymal stem cells in miniature pigs. *Sci Rep* 7, 45607 (2017).
<https://doi.org/10.1038/srep45607>
- 四、Sotoma, Shingo & Epperla, Chandra & Chang, Huan-Cheng. (2017). Diamond Nanothermometry. *ChemNanoMat*. 4. 10.1002/cnma.201700257.

【評語】 160012

本作品利用發光氮植入奈米鑽石放大偵測訊號，值得探討。尤其是運用變動磁場經由傅立葉轉換在頻率空間裡來偵測訊號，有效降低背景噪聲，內容豐富，分析合宜。建議可再變換參數延伸實驗並加強釐清物理圖像。