

荧光光谱仪（FLS 980）稳态/瞬态操作说明书

一、仪器介绍

1.FLS 980 荧光光谱仪具有的功能

稳态测量：

激发光谱(荧/磷光强度~激发波长)、
发射光谱(荧/磷光强度~发射波长)、
同步扫描谱(固定波长差、固定能量差、可变角)、
三维荧光光谱 (荧/磷光强度~发射波长~激发波长(温度))。

瞬态测量：

荧光(磷光)寿命(~ns—长余辉),
三维瞬态光谱 (荧/磷光强度~发射波长~时间)

2.主要性能指标

光谱仪探测范围：(Red PMT: 200—870nm/ EXT Red PMT: 200-1010 nm/NIR PMT: 950-1700 nm;)

瞬态测量范围：~ns - +∞

信噪比：25000: 1(水峰 Raman)

配用冷阱系统：10—300K / 77-800K

激发光源： 450W 氙灯、微秒脉冲闪光灯、纳秒 OPO 激光器、皮秒超连续白光、飞秒激光器

激发光源输出波长范围： 稳态光源：200-2000 nm，脉冲光源：200-2600 nm

F980 系统软件：控制硬件，包括变温系统，数据采集、分析

3.仪器主要部分结构图

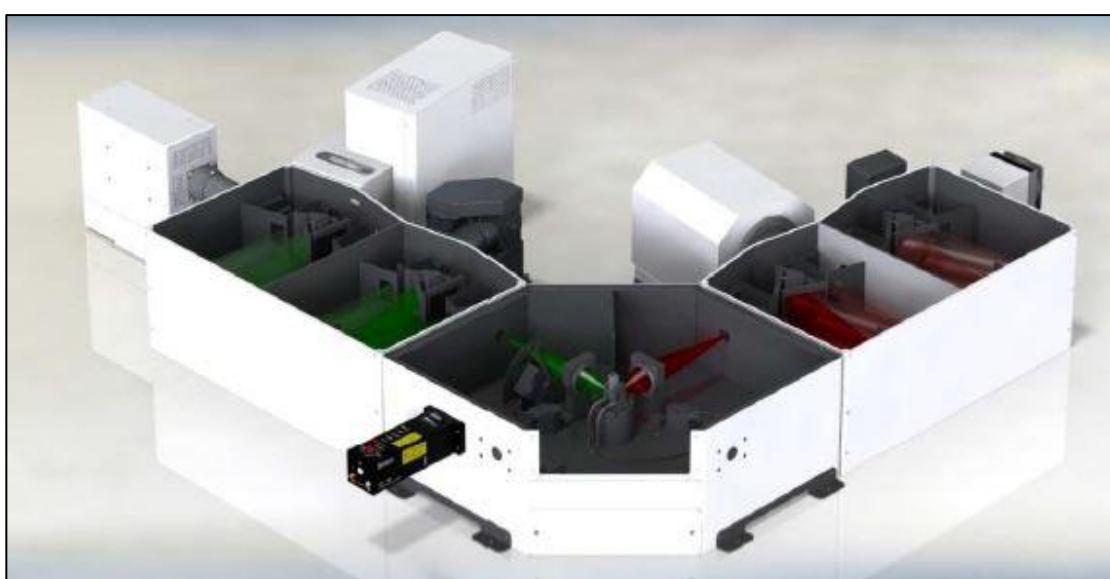


图. 1

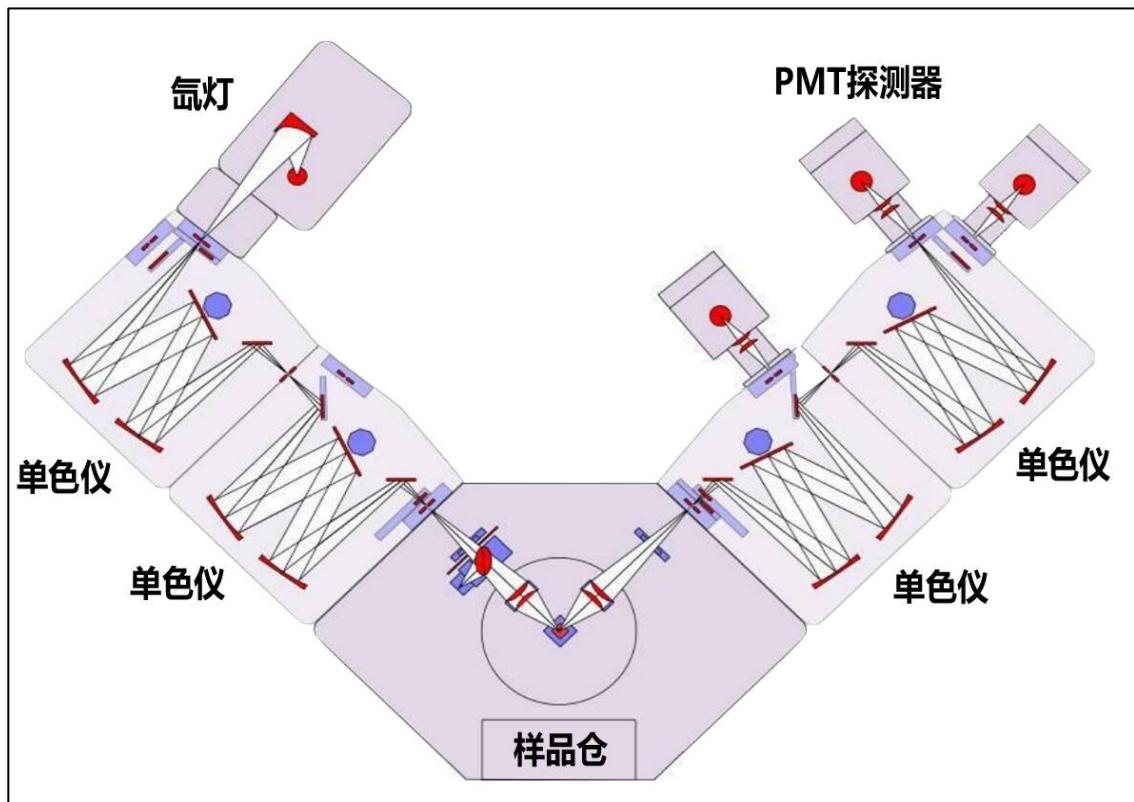


图. 2 仪器光路图

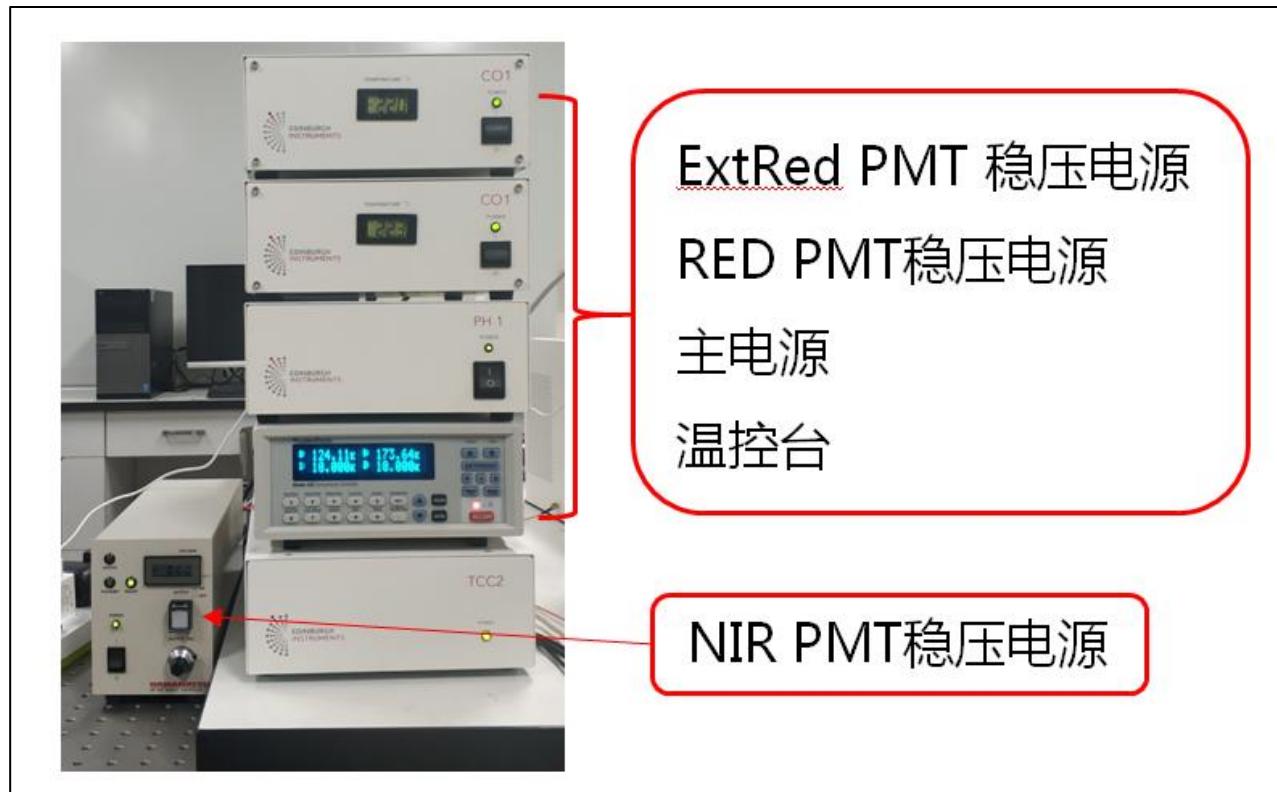


图 3. 仪器控制电源

二、仪器使用注意事项

1. 在切换光源、修改设置或放样品之前必须把狭缝 ($\Delta\lambda$) 关到最小 (0.01nm)，否则会损坏光电倍增管！如果打开样品室盖子之后，Em1 的 Signal Rate 增加，请停止实验并立即与仪器管理员联系！
2. 测量样品的瞬态性质之前，先用荧光光谱仪对样品的稳态性质进行表征，了解样品的激发光谱和发射光谱及最佳激发波长和发射波长；
3. 用 PMT 检测时，必须等稳压电源 CO1 (如图 3) 的温度示数在 -18°C 以下才可以开始采集数据；
4. NIR PMT (950-1700 nm) 探测器 (如图 3) 接通电源后，POWER 和 STANDBY 指示灯会亮起，要等 STANDBY 指示灯灭掉，READY 指示灯亮起之后，才能加高压，即按下 OUTPUT 按钮，该按钮会亮起橙色的灯，开机完毕。
5. 当开样品仓盖后，Signal Rate 窗口中 Em1 Signal Rates 显示的就是探测器的暗噪声。各探测器噪声水平：Red PMT 400nm: <50 cps; EXT Red 750nm: <200 cps; NIR PMT 1200nm: <3000 cps，如果探测器已经降温到最低温度，然而噪声高于以上标注的数值请联系仪器管理员。
6. 在测量未知样品之前，先测样品的吸收谱，再根据吸收峰位置选取激发波长，用小的狭缝条件粗扫样品的荧光发射，再精修测试条件，测出高信噪比的发射谱，再根据需求来确定激发谱的发射波长，扫一张激发谱。最后根据激发谱，决定是否再扫一张发射谱。
7. 一般情况下，扫发射谱时，发射的起始波长要比激发波长大 15nm；扫激发谱时，监测的发射波长要比激发终止波长大 15nm。
8. 在测试过程中，如果发现纵坐标光子计数超过 5×10^5 ，需即刻打开样品仓盖，重新设置狭缝宽度，调整至 Em1 读数不超过 25 万 CPS，视具体探测的波长适当调整。**特别注意探测器量子效率低的探测波段(如附图 11-13)，Em1 读数应不超过 5 万 CPS，例如 Red PMT(700-800 nm)、EXT Red (800-950 nm)、NIR PMT (1600-1650 nm)。越接近探测极限，探测效率越低，条件设置后，Em1 显示数值应越小。**
9. 狹缝范围 0.02~15nm，调节时注意不要超过其上限；
10. 每次设置完参数后都要点击 Apply 或者回车键确定；
11. 用 TCSPC 模式测寿命时，发射信号不能超过脉冲光源重频的 6%；用 MCS 模式测寿命时，发射信号不大于 3000。
12. 测瞬态的 Time Range 的选择需大于 10 倍的衰减寿命。
13. 文件保存路径为：H:\Data\XMIREM\导师\自己\日期文件夹；
14. **不得用优盘拷贝数据，只能把数据上传到 FTP 上；**
15. 如实填写仪器使用记录，爱护仪器；
16. **实验结束后，把激发跟发射端的狭缝都调整至 0.01，样品仓的盖子虚扣着即可（如图），需保证其平稳放置以防摔落变形；**
17. 实验进行中，不得离岗！
18. 未经考核，不得擅自操作实验室的仪器。

三、稳态荧光光谱的测定

(一) 稳态荧光光谱的测定步骤

1. 打开氘灯电源，待其稳定，稳定后电压约 14—17V，电流 25A；
 2. 依次打开 PH1 和 CO1 电源，如果测试发射波段在 950nm 以后的，需把 NIR PMT 的电源打开，具体操作参考注意事项说明；
 3. 打开计算机，双击桌面上 F980 图标，进入工作站
 4. 点击窗口左上角的 signal rate 按钮(如附图 1)，进入 Signal Rate 设置窗口，先将 Excitation Wavelength 和 Em1 Wavelength 处的 $\Delta\lambda$ 均设置为 0.01nm，按回车键(Enter)或者点击 Apply 确认，再将 Source 设置为 Xe1[400nm(输出波长范围：200-800nm) / 1200nm (输出波长范围：800-1700nm)]，Em1 Detector 依据探测范围进行选择合适的探测器（如附图 2-3），然后点击 Apply；
 5. 打开样品室的盖子，放入待测样品，然后盖好；
 6. 在 Signal Rate 设置窗口内输入相应的 Excitation Wavelength 和 Em1 Wavelength 值，逐渐加大 $\Delta\lambda$ ，使 Em1 获得一个合适的 Signal Rate（注意：在设置后需要按下回车或者 Apply 按钮设置才真正生效，Ref 的 Signal Rate 不要超过 2×10^6 ，Em1 的 Signal Rate 千万不要超过 2.5×10^5 ）；
 7. 激发谱测试设置：单击工具栏中稳态测试按钮，选择 Excitation Scan，进入设置窗口，在 Emission1 栏内，将 Monochromator Wavelength 设置为待监测波长，然后在 Excitation Scan Parameters 内设置波长扫描范围、扫描间隔（step）、停留时间（Dwell Time）和扫描次数（Number of Scans）（如附图 3、5），设置完毕后点击 Start 即开始测量，得到激发光谱；
 8. 发射谱测试设置：单击工具栏中稳态测试按钮，选择 Emission Scan，进入设置窗口，在 Excitation 标签内，将 Monochromator Wavelength 设置为合适的激发波长，然后在 Emission Scan Parameters 内设置波长扫描范围、扫描间隔（step）、停留时间（Dwell Time）和扫描次数（Number of Scans）（如附图 4-5），设置完毕后点击 Start 即开始测量，得到发射光谱(荧光光谱)；
- (二) 数据处理
1. 测量完成后，直接点击保存图标保存原始文件；
 2. 数据处理的功能都在 Data 菜单下：
- Scale: 将当前的谱图坐标乘以输入的数值显示出来
- Normalise: 归一化，用此功能可以比较峰位是否相同
- Subtract Baseline: 扣基线
- Crop Range: 设置横坐标显示范围
- Differentiate: 显示微分曲线
- Integrate: 积分
- Reverse: 将横坐标刻度倒过来显示
- Correction: 谱图校正
3. 谱图处理完了以后点击 File，选择 Export ASCII 即可以转换成文本文件。

五、荧光寿命的测量

备注：目前实验室的配置脉冲光源有微秒脉冲闪光灯、纳秒 OPO 激光器、皮秒超连续白光、飞秒激光器。

一般情况下衰减寿命在小于 $2\mu\text{s}$, 选用激光器, 衰减寿命大于 $2\mu\text{s}$, 则选用微秒闪光灯, 具体设置和步骤如下:

1. 打开 CO1, 主机和脉冲光源的电源;
2. 把脉冲光源的同步信号线连接 TCC 模块电路板上的同步信号输入端口, 用 MCS 模式测寿命时, 同步信号线接 Trigger, 用 TCSPC 模式测寿命时, 同步信号线接 Sync 1。
3. 打开计算机, 双击桌面上 F980 图标进入工作站;
4. 点击软件窗口左上角的 Signal Rate 按钮, 进入 Signal Rate 设置窗口 (如附图 6), 先将 Excitation Wavelength 和 Em1 Wavelength 处的 $\Delta\lambda$ 均设置为 0.01, 按回车键(Enter)或者点击 Apply, 再根据测试寿命的长短在 Source 选择合适的光源模式, 探测器根据探测波段进行选择, 然后点击 Apply;
5. 打开样品室, 放入样品, 盖好盖子, 输入样品的 Excitation Wavelength 和 Em1 Wavelength 值, 逐渐加大 $\Delta\lambda$, 使 Em1 获得一个合适的 Signal Rate(具体参考注意事项的说明);
6. 点击瞬态测试按钮 (如附图 7), 选择 Manual Lifetime, 进入设置菜单, 在 Excitation 栏内设置好激发波长和 Light Source, 在 Emission 1 栏内设置好发射波长和 Detector, 将 Live 选择框勾上, 然后开始设置下部的 Lifetime Sample 1 菜单, 在 Rates 标签内一边观察 Stop Rate 一边调节 Iris Setting, 再在 Time Range 标签内选择一个合适的 Time Range 和 Channels, 在 Stop Condition 标签内根据样品情况选择一个合适的条件 (如附图 8-9), 设置好之后, 点击 New 开始测试;

(二) 数据处理

1. 测量完成后, 点击保存将原始文件保存到 H:\Data\XMIREM\导师\自己\日期文件夹;
2. 点击“Zoom In”按钮, 然后在图上选取一个需要进行拟合的范围, 在 Data 菜单下选择 “Exponential Fit 中的 Tail Fit, 在弹出的窗口内输入数值进行拟合, 得到衰减寿命;
3. 对于寿命很短的样品, 在样品测量完成后, 要做仪器的衰减 (即 IRF), 液体样品用 30% 硅胶水溶液作散射体, 固体样品用固体本身作散射体, 在 Signal Rate 设置窗口中将 Excitation Wavelength 和 Em1 Wavelength 值都设置为 Excitation Wavelength 值, 然后调整 $\Delta\lambda$ 获得合适的 Em1 值, 完成后关闭窗口。
4. 点击 按钮, 选择 Manual Lifetime, 进入设置菜单, 将 Live、IRF 和 Add 选择框勾上, 别的设置与样品一致, 设置好之后, 点击 New 开始测试;
5. 测量完成后, 选择拟合范围, 点击 Data 菜单, 选择 Exponential Fit 中的 Rconvolution Fit 进行拟合;
6. 拟合完成后, 保存拟合的文件, 共三种类型的文件, 原始文件, ASCII 文件和图片文件: 直接点击保存可以保存原始文件, 点击 File 选择 Export ASCII 即可以保存成文本文件; 选择 save as, 保存文件类型选择为 Windows MetaFile 可以保存成图片格式。

六、关机程序

1. 关闭 F980 程序和计算机；
2. 依次关闭 CO1 稳压电源，PH1 稳压电源；
3. 关闭氙灯电源（只需按银色电源按钮，由于氙灯关闭后还需散热，所以总电源无需关闭，让其给散热扇供电散热）以及其他使用过的仪器；
4. 在仪器使用记录本上做好使用记录。

附图：

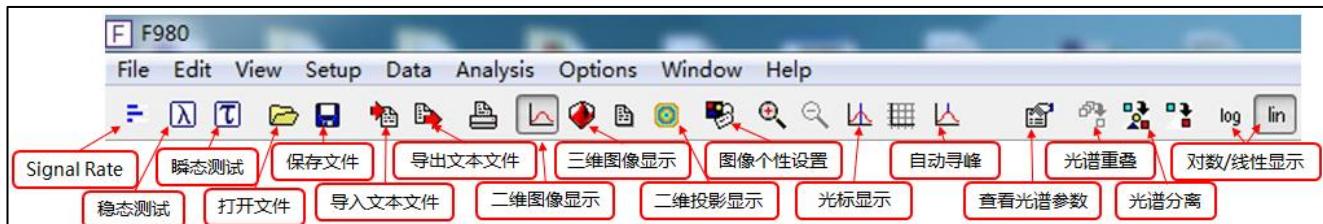


图. 1 工具栏功能介绍

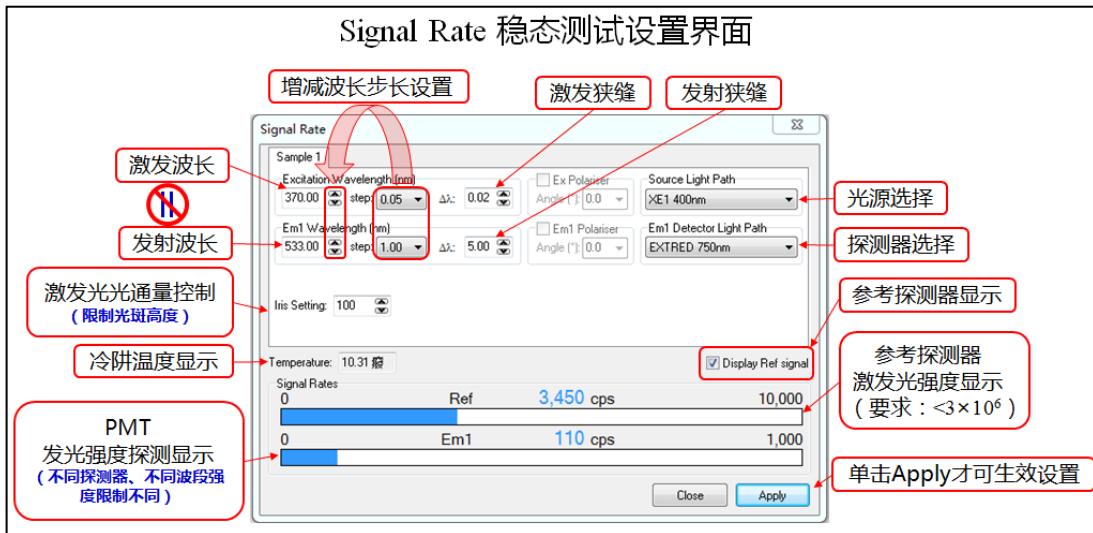


图. 2 Signal Rate 稳态测试设置界面

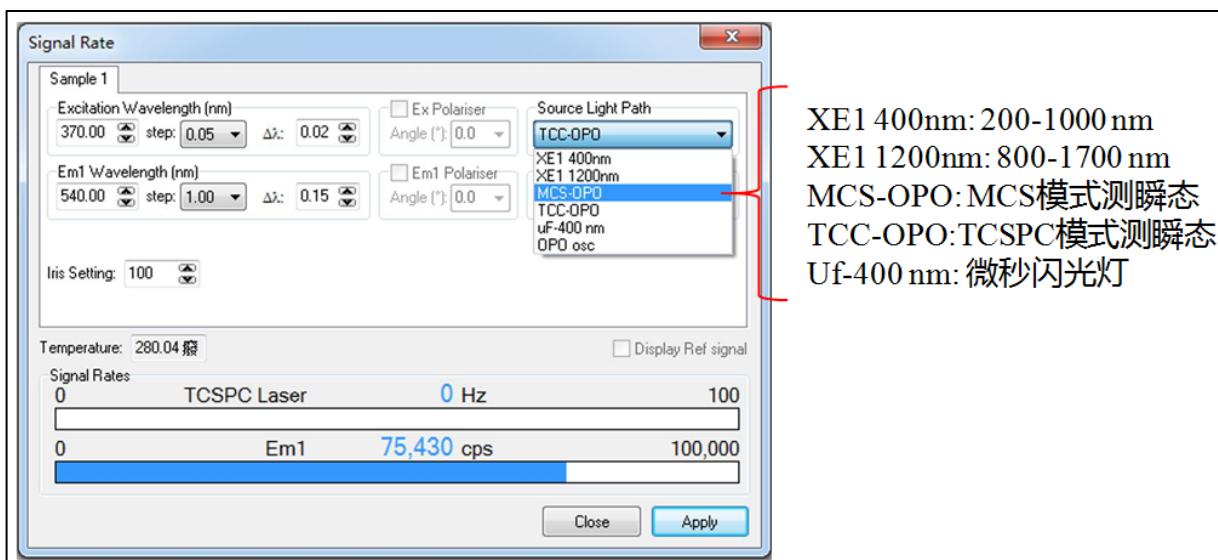


图. 3 光源选择

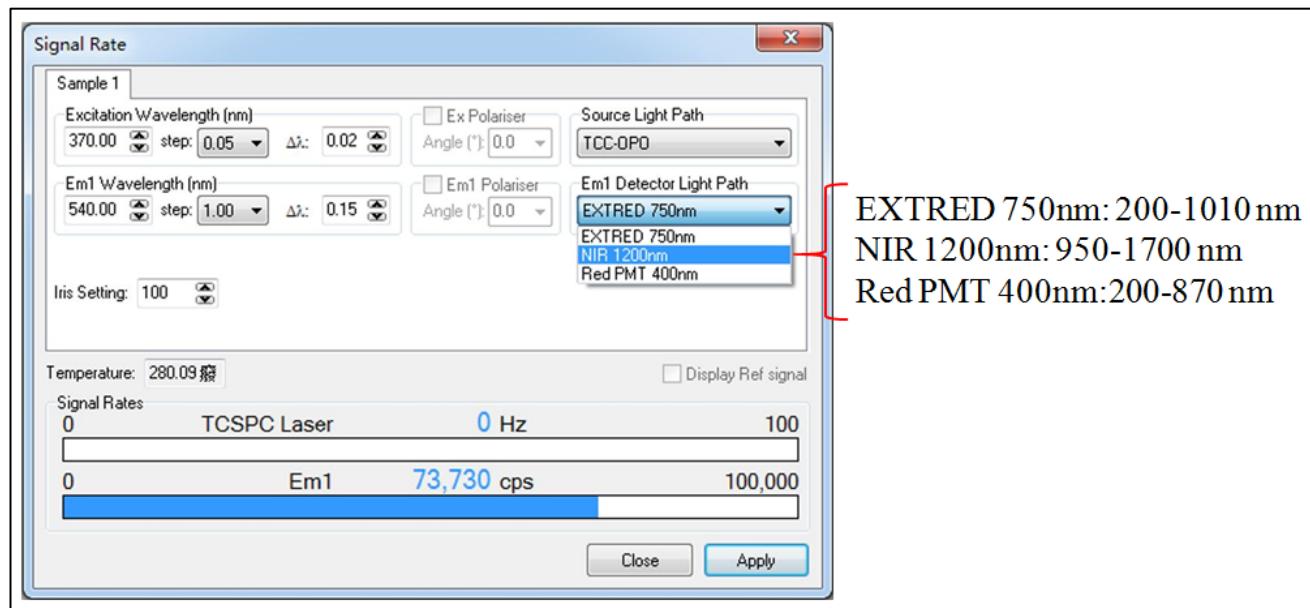


图 4. 探测器选择

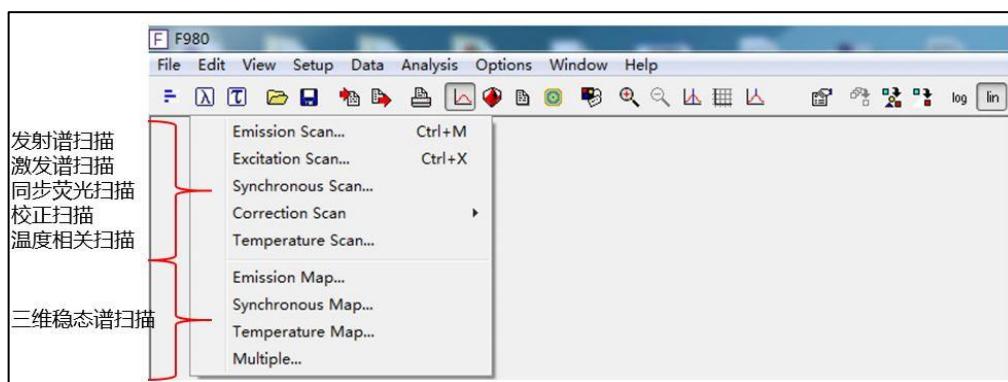


图. 3 稳态谱扫描功能界面介绍

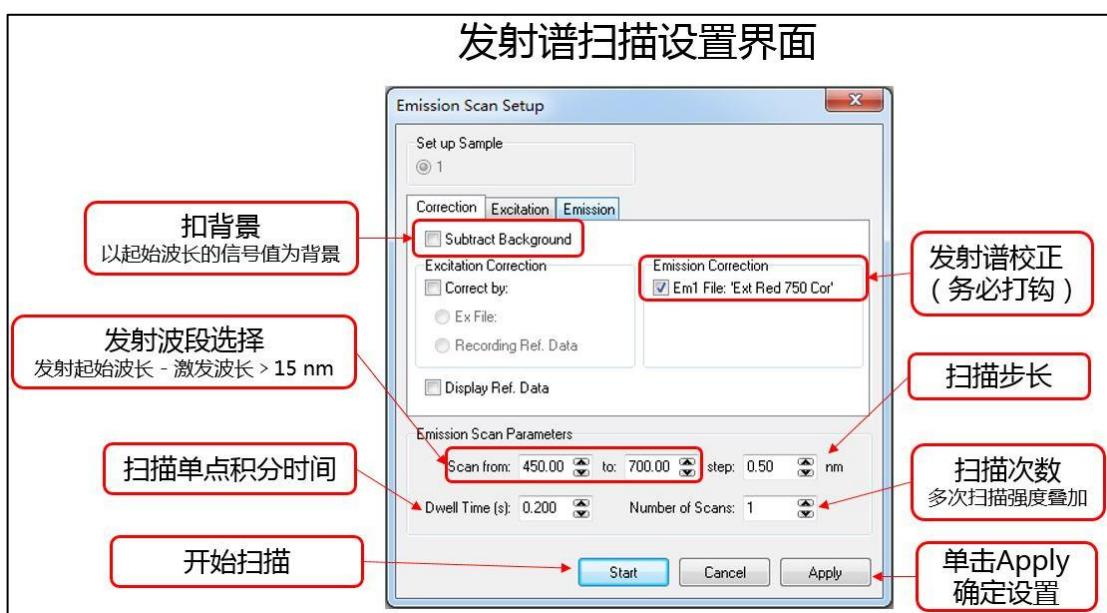


图. 4 发射谱扫描设置界面

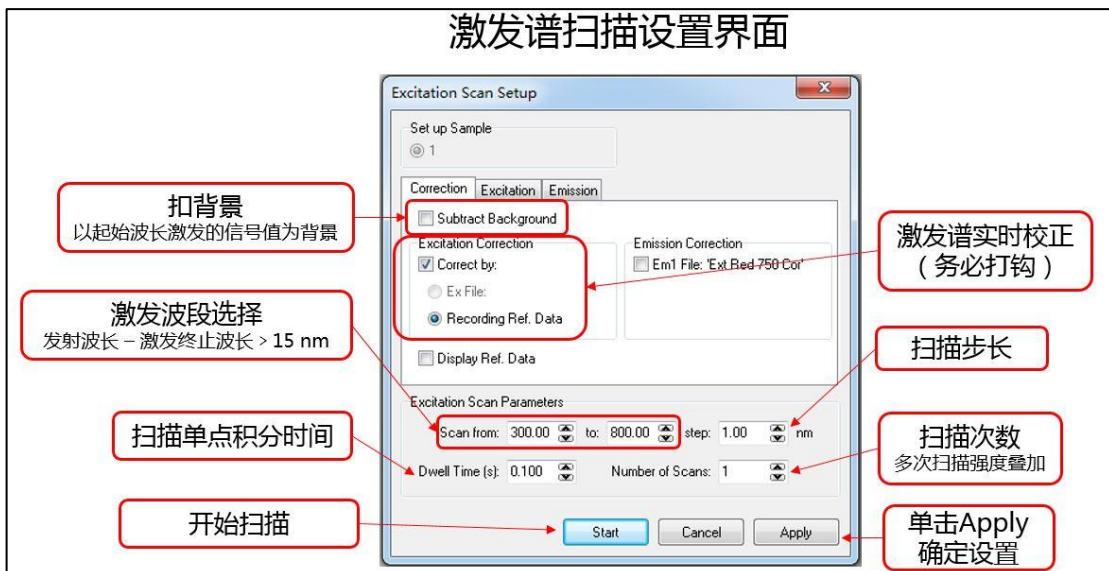


图. 5 激发谱扫描设置界面

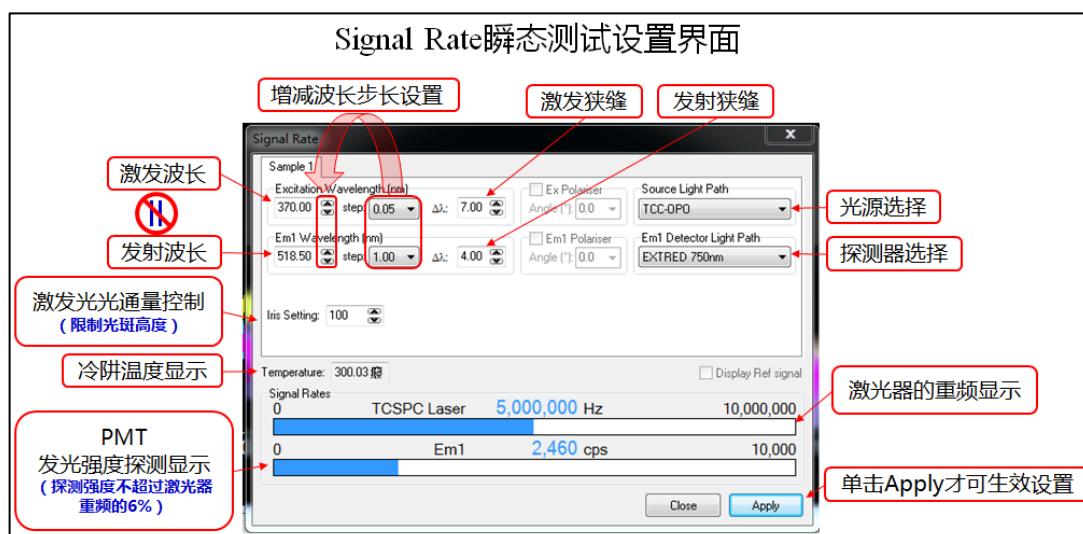


图. 6 Signal Rate 瞬态测试设置界面

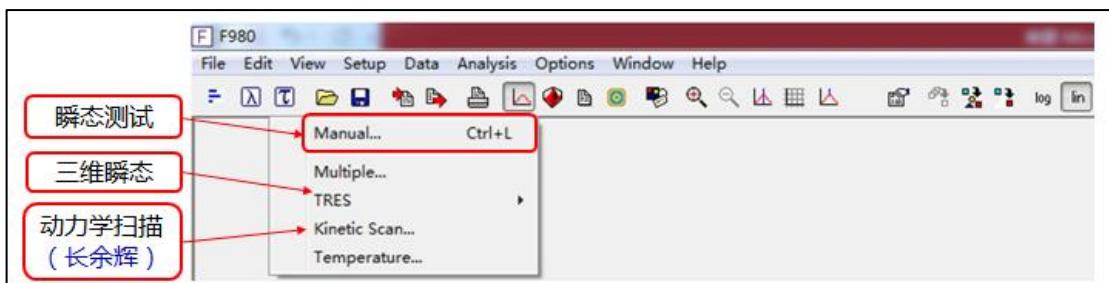


图. 7 瞬态功能界面介绍

荧光寿命 (TCSPC) 扫描设置界面



图. 8 TCSPC (寿命<2 μs) 扫描模式设置界面

荧光寿命 (MCS) 扫描设置界面

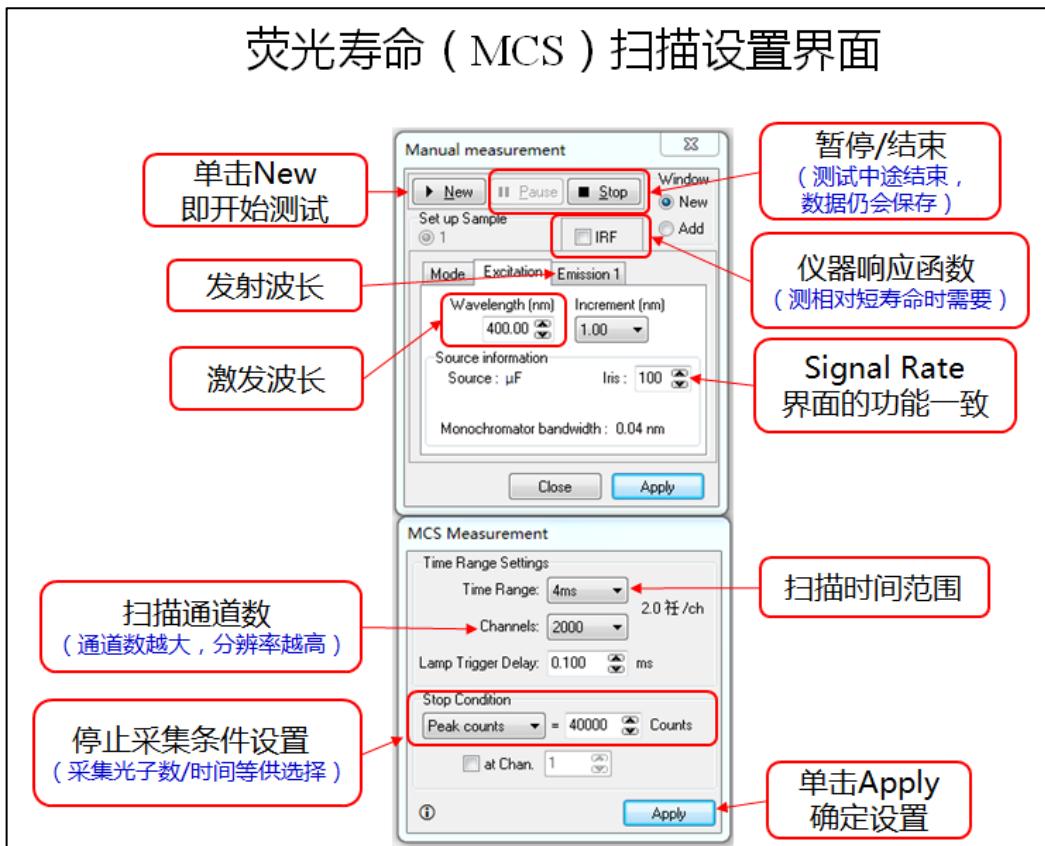


图. 9 MCS (寿命>2 μs) 扫描模式设置界面

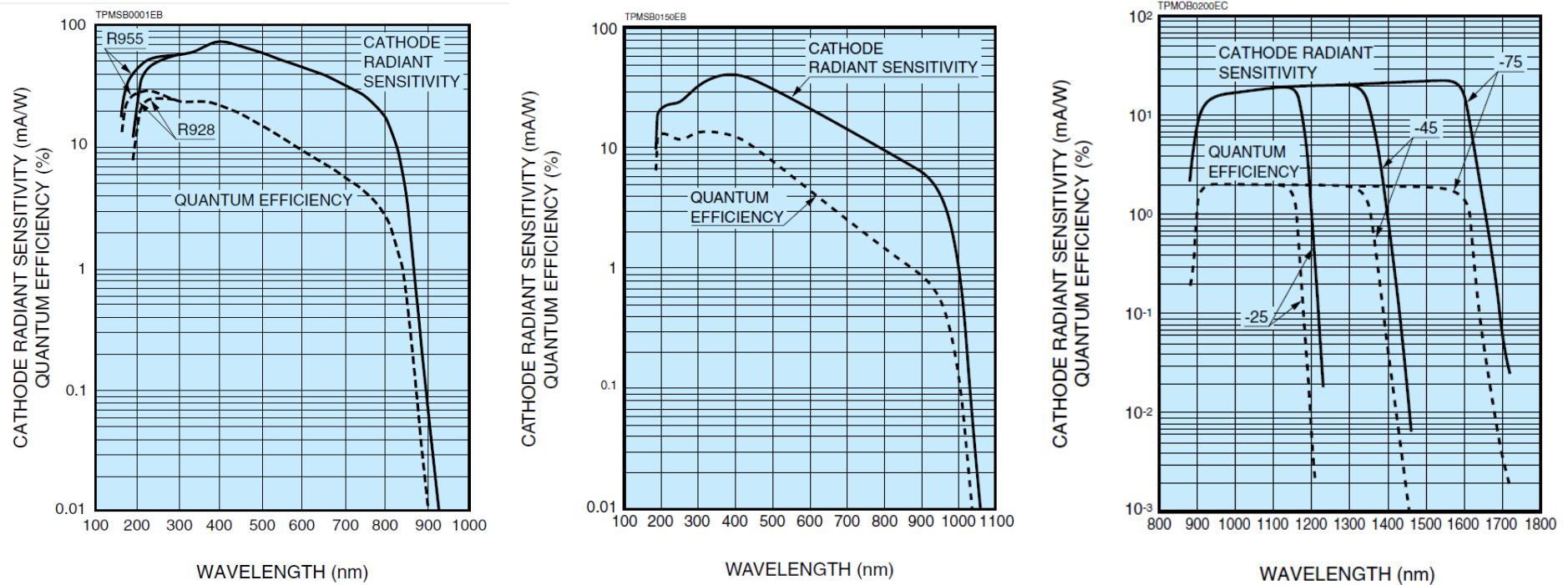


图. 10 探测器的不同波长的量子效率 (从左往右 : Red/EXT Red/NIR PMT)

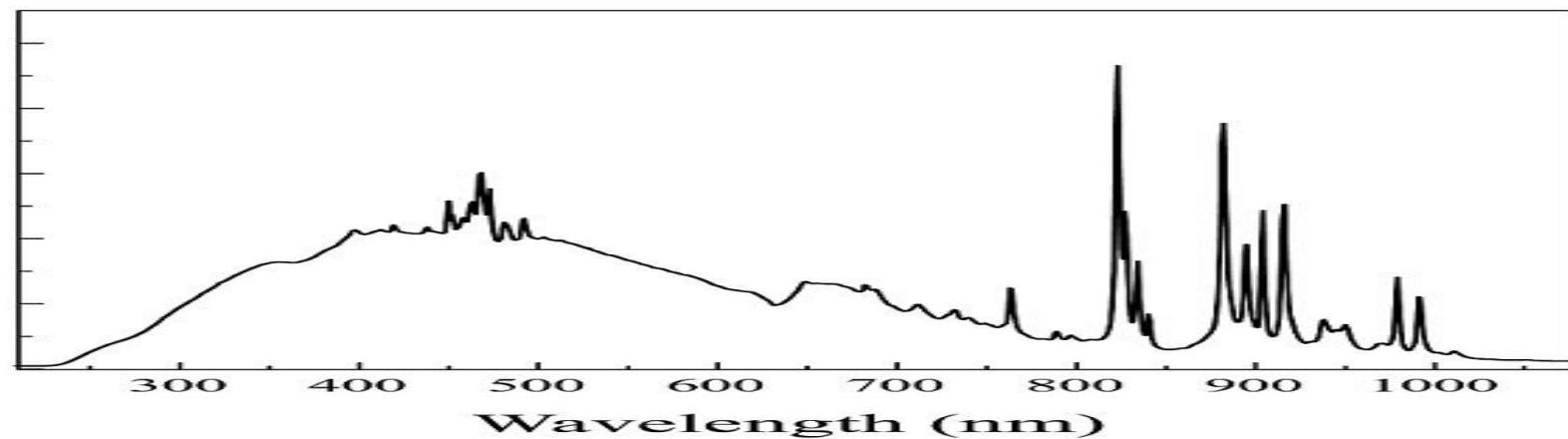


图. 11 氖灯不同波长光强输出分布