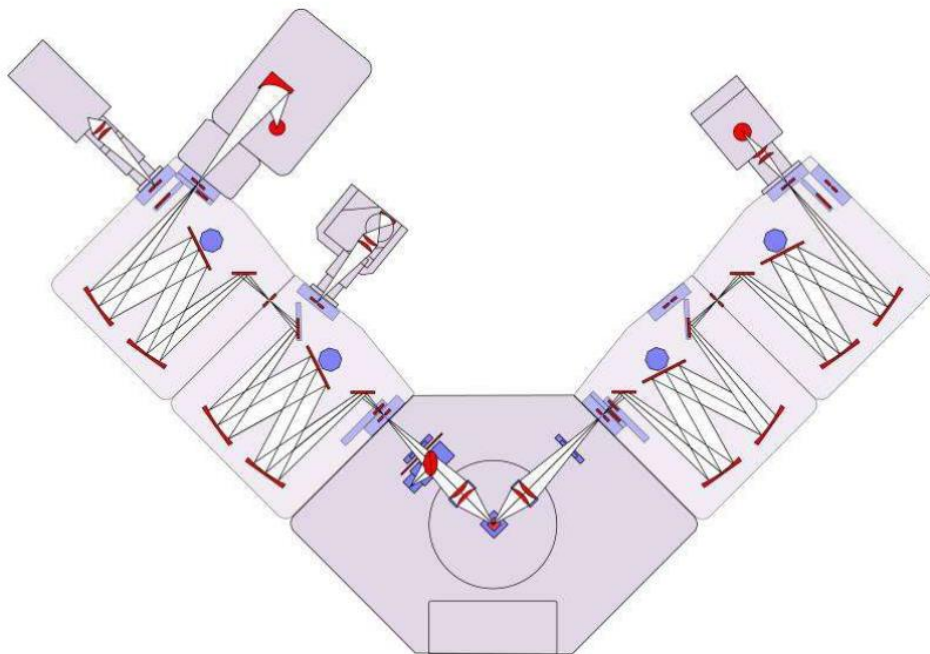


稳态/瞬态荧光光谱仪(FLS 1000)简易操作规程



FLS 1000 稳态/瞬态荧光光谱仪外观图



FLS1000-stm 双双光栅内部光路示意图

一、仪器介绍

1. FLS 1000 稳态/瞬态荧光光谱仪功能

1.1 稳态测量：激发光谱，发射光谱，同步扫描（固定波长差），三维扫描等。

1.2 瞬态测试：磷光寿命使用微秒闪光灯。

荧光寿命使用纳秒闪光灯，EPL/EPLED。

1.3 量子产率测试：使用积分球附件

1.4 各向异性偏振测试：偏振片

主要应用

高分子和天然高分子自然荧光的研究

溶液中大分子分子运动的研究

固体高分子取向的研究

高聚物光降解和光稳定的研究

光敏化过程的研究

以上测试均适合各种液体、粉末、薄膜等样品

2. 主要性能指标：

光谱仪探测光谱范围*：230-870nm（标准检测器）

荧光/磷光寿命测试范围*：皮秒到秒

(*与配置相关)

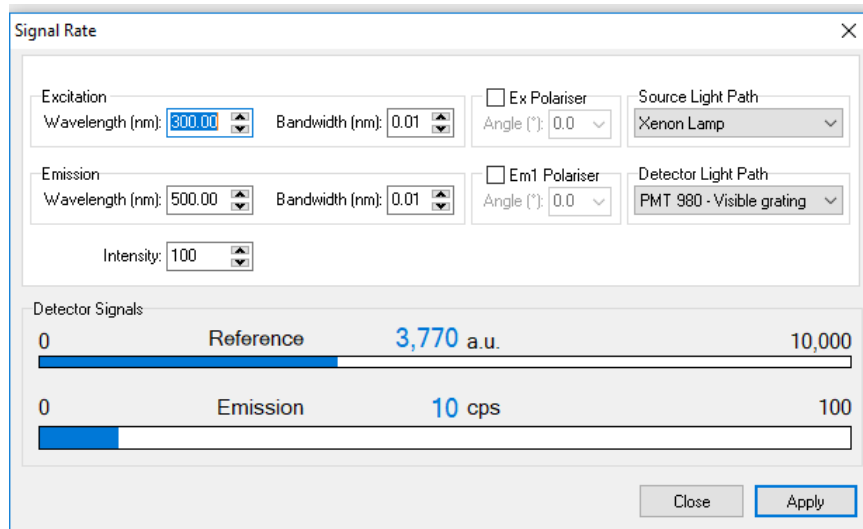
二、测试之前的特别注意事项


1. 在切换光源、修改设置或放置样品之前将狭缝 ($\Delta\lambda$) 关到最小 (0.01nm), 否则会损坏光电倍增管。当 Em1 的 Signal Rate 超过 10^6 时为防止光电倍增管饱和, 应快速将发射侧狭缝调至最小或快速打开样品室盖。如果打开样品室盖子后, Em1 的 Signal Rate 值增加, 请与工程师联系。
2. 测试样品的瞬态性质之前, 请用稳态测试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的激发波长和发射波长。
3. 使用标准 PMT 检测器时, 应等稳定电源 CO1 的温度示数在 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 以下, 暗噪声小于 50 cps 后在进行数据的采集
4. 狭缝可调范围为 0.01-18 nm, 调节时请注意不要超过其上限。实验结束后应将狭缝调至 0.01nm再关机

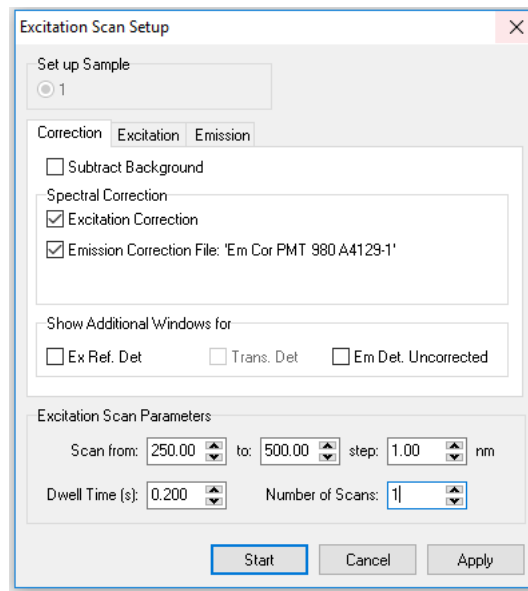
三、稳态荧光光谱的测定


(一) 紫外可见区稳态光谱的测试步骤：

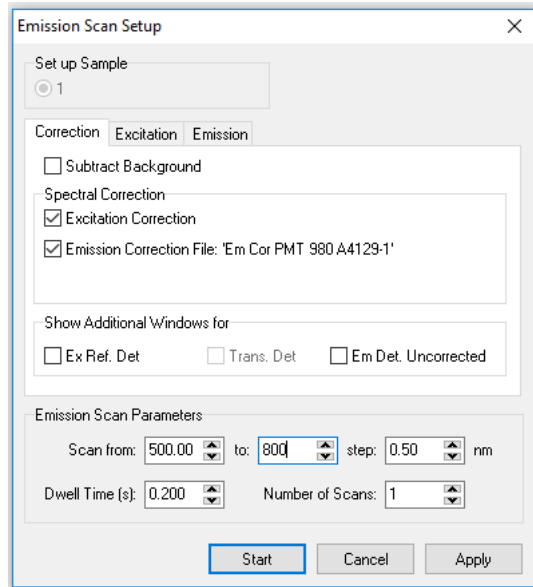
1. 打开 PH1 给主机及数据采集供电；
2. 打开 CO1 开关给检测器制冷到 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ ；
3. 打开氙灯电源开关，等到氙灯小屏幕显示 Ready to start 后再点灯；
4. 打开计算机，双击桌面上的 Fluoracle 软件图标 ，进入软件操作界面。
5. 点击软件窗口左上角的  按钮，进入 Signal Rate 设置界面（如下图所示），将激发和发射的狭缝 ($\Delta\lambda$) 均设置为 0.01nm，更改设置回车键 (Enter) 或者点击 Apply 进行确认。将 Source Light Path 设置为 Xenon Lamp，检测器设置为默认设置，然后点击 Apply；



6. 打开样品室的盖子，选择相应的样品支架（液体/前表面样品支架），放入待测样品，盖好样品室盖子。
7. 在 Signal Rate 设置窗口内输入相应的激发波长和发射波长。调整激发侧和发射侧狭缝，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，Em1 的 Signal Rate 千万不可超过 10^6 ）。
8. 激发光谱的扫描。点击  键，在下拉菜单中点击 Excitation Scan 后会出现设置对话框，如下图所示。在 Excitation Scan Setup 界面勾选校正文件。设置激发光谱的扫描范围，扫描间隔（step），停留时间（Dwell time），扫描次数（Number of Scans），设置完毕后点击 Start 即开始测试，得到激发光谱图。

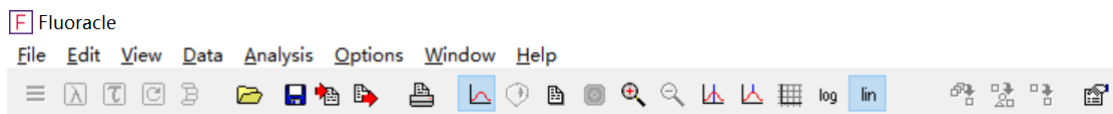


9. 发射光谱的扫描。点击  键，在下拉菜单中点击 Emission Scan 后会出现设置对话框，如下图所示。在 Emission Scan setup 界面勾选校正文件。设置激发光谱的扫描范围，扫描间隔（Step），停留时间（Dwell time），扫描次数（Number of Scans），设置完毕后点击 Start 即开始测试，得到发射光谱图。

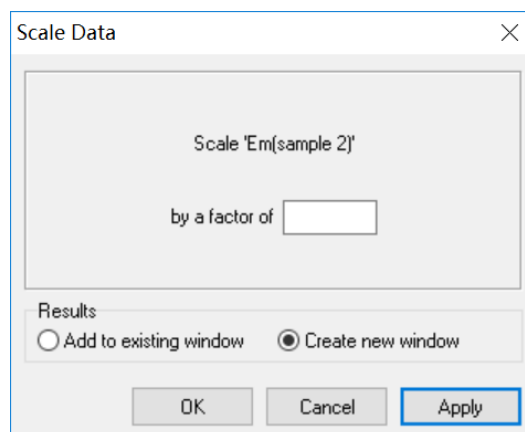


(二) 数据处理

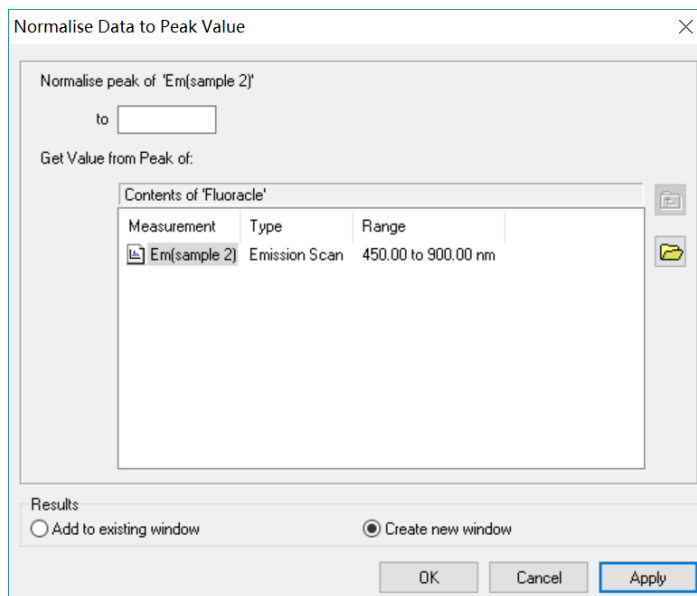
1. 测量完成后，直接点击保存图标保存原始文件；
2. 测量数据出的功能都在 Data 菜单下；



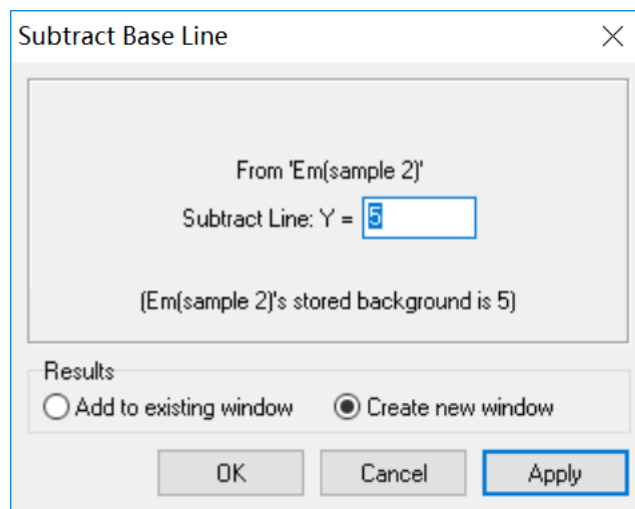
Scale: 将当前的谱图坐标乘以输入的值显示出来



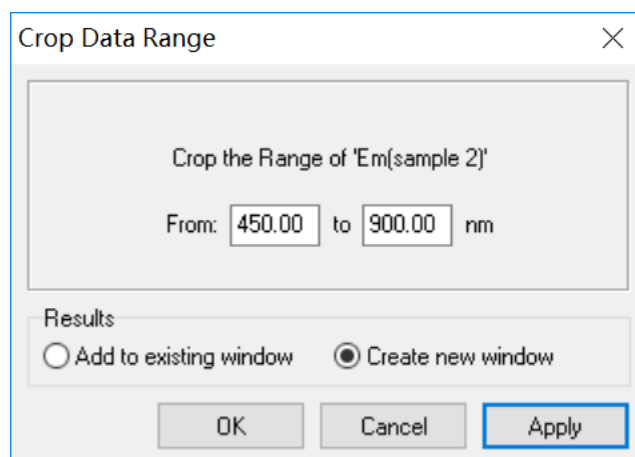
Normalize: 归一化, 用此功能可以比较峰位是否相同。



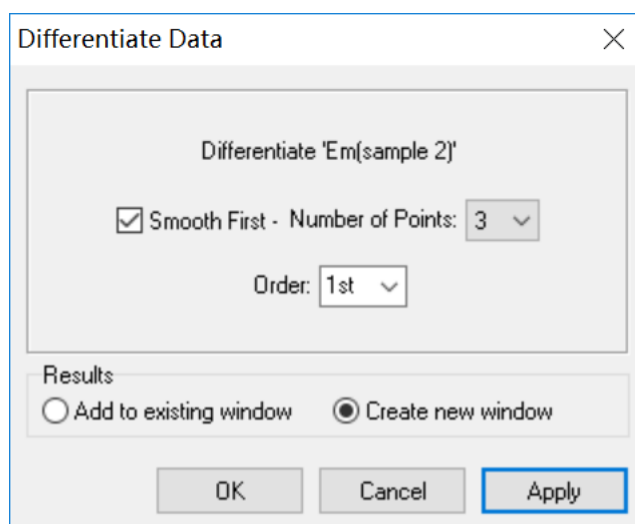
Subtract Baseline: 扣基线, 此功能可用于比较峰位是否相同



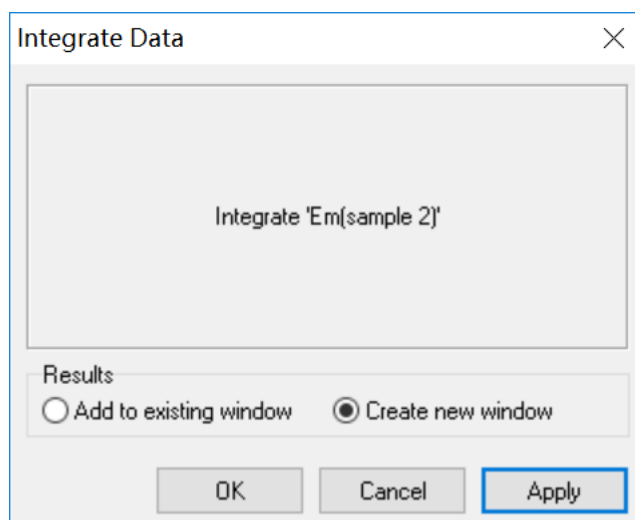
Crop Range: 设置横坐标显示范围



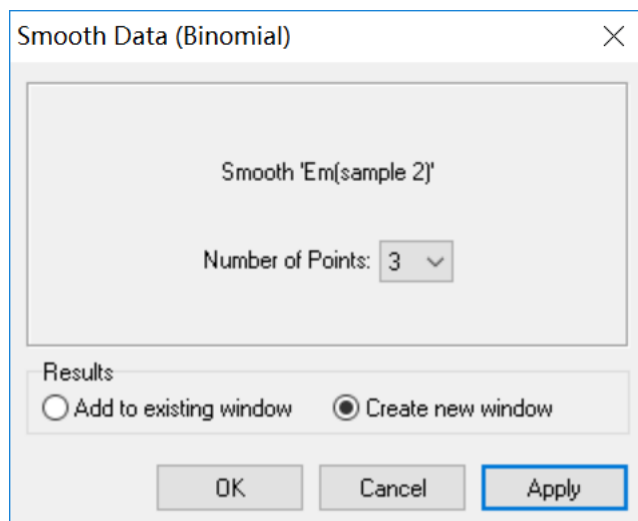
Differentiate: 显示微分曲线




Integrate: 积分




Smooth: 平滑曲线

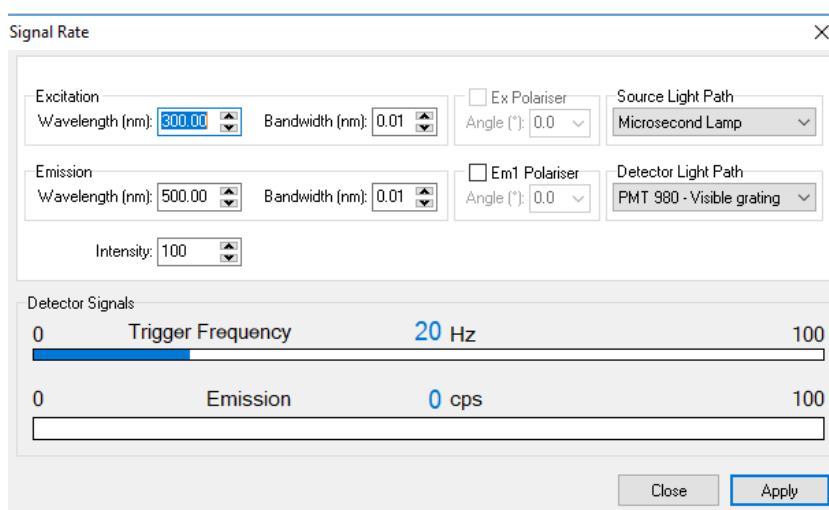


3. 谱图处理完成后点击“File-save as”对数据进行保存，选择 Export ASC II 即可转换成文本格式的文件。或者点击快捷菜单中的  按钮导出数据。

四、荧光寿命（瞬态）的测定


(一) 使用微秒灯闪光灯 $\mu F2$ 的测试方法

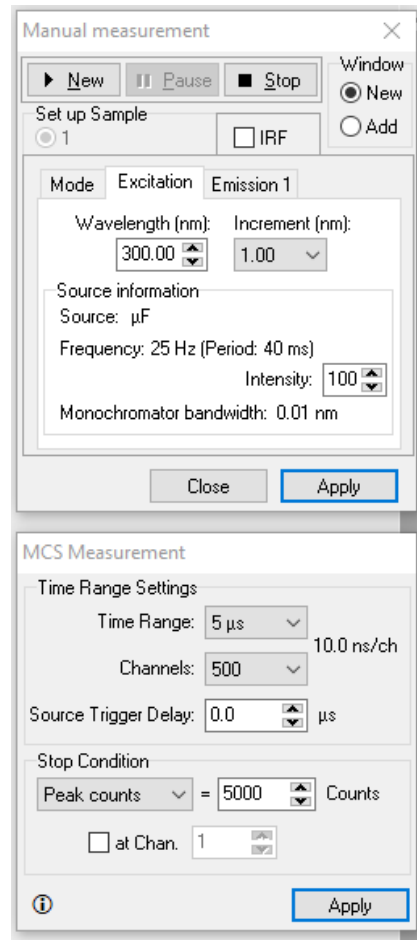
1. 打开 PH1, CO1, $\mu F2$ 灯电源;
2. 打开电脑主机，双击桌面 Flouracle 图标进入仪器操作界面
3. 点击软件窗口左上角的  按钮，进入 Signal Rate 设置界面（如下图所示），将激发和发射的狭缝 ($\Delta\lambda$) 均设置为 0.01 nm，更改设置回车键 (Enter) 或者点击 Apply 进行确认。将 Source Light Path 设置为微秒灯，检测器设置为默认设置，然后点击 Apply;



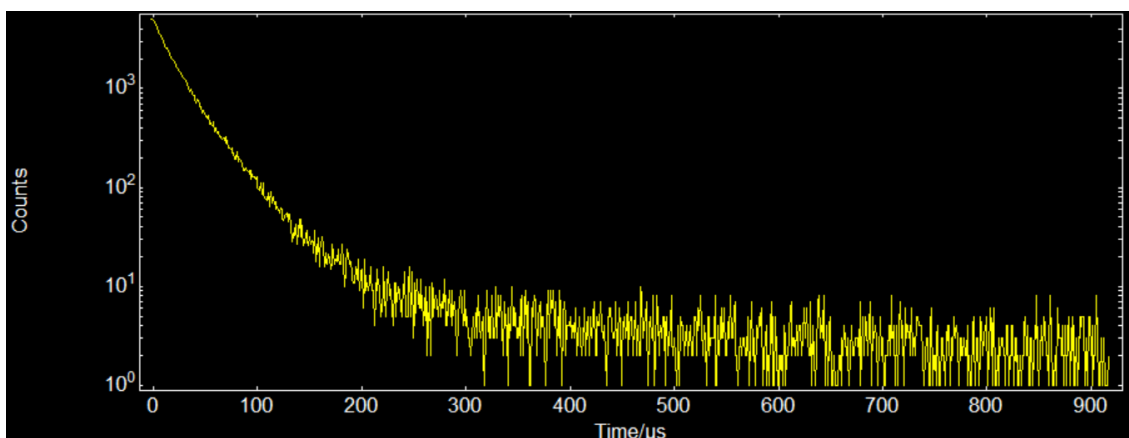
4. 打开样品室的盖子，选择相应的样品支架（液体/前表面样品支架），放入待测样品，盖好样品室盖子。
5. 在 Signal Rate 设置窗口内输入相应的激发波长和发射波长。调整激发侧和发射侧狭缝，

一般使 Em1 的值小于 3000，在设置后按回车或点击 Apply。

6. 点击  进入，选择 Manual Lifetime，进入设置菜单，如下图所示。

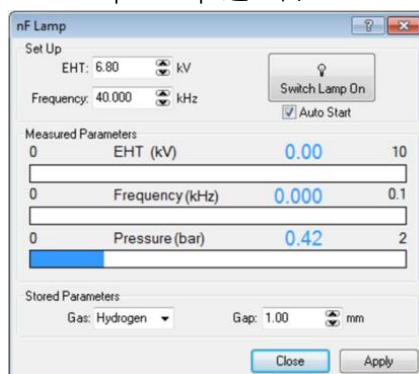


7. 在 Time Range 标签内选择一个合适的时间窗口(通常为 10 倍的寿命值)和 Channels 值。在 Stop Condition 标签内可根据样品的实际情况选择合适的条件，设置好后，点击 New 开始测试。得到的寿命衰退曲线如下图。(数据处理见 (五))

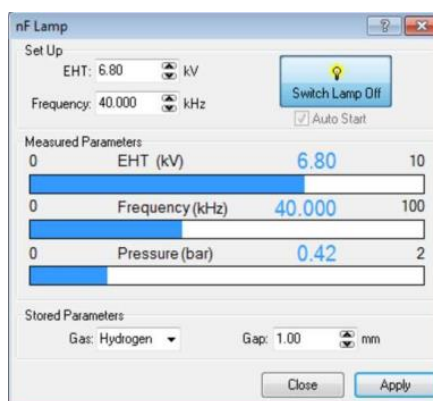



(三) 使用纳秒闪光灯 nF920 的测试方法

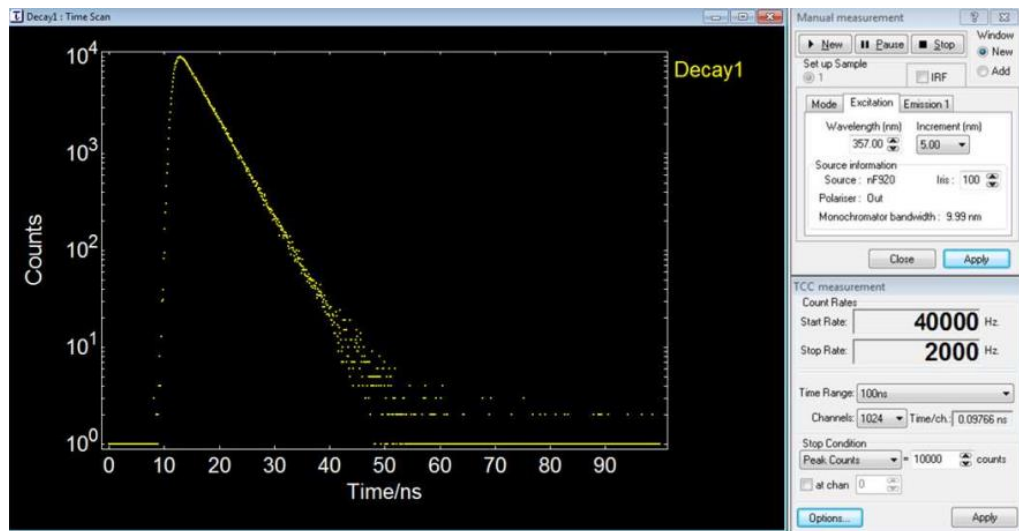
1. 打开 PH1, CO1, nF920 开关;
2. 打开计算机, 双击桌面上的 Flouracle 图标进入仪器操作界面;
3. 点击 Set up 菜单, 选择 nF920 Lamp Set up 进入窗口





点击 Switch Lamp On, 观察纳秒灯的频率, 注意在此窗口不要更改设置, 观察正常后关闭窗口。注意压力为 0.42 bar, 如果发现频率不能稳定在 40 kHz, 请清洗氢灯, 如果压力不正确请检查气密性重新置换冲入的氢气。(置换氢气要反复 15 次吸气, 充气压力不能大于 1.5Bar, 最后保持在 0.42 bar)

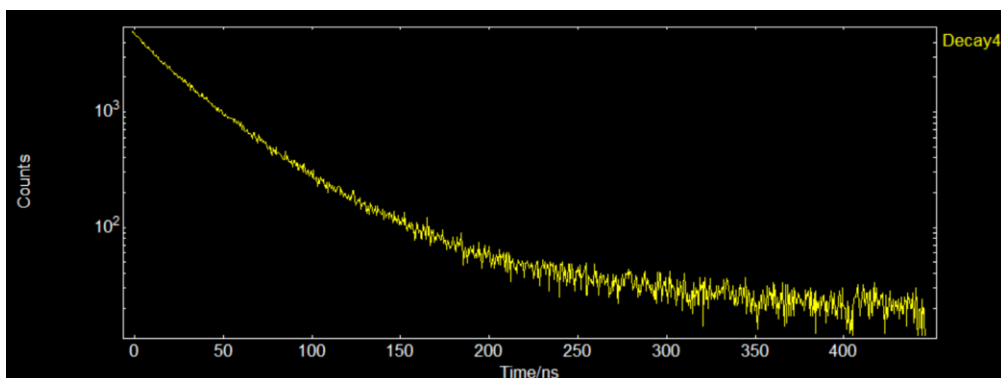


4. 点击软件窗口左上角的  按钮, 进入 Signal Rate 设置窗口, 将激发和发射的狭缝 ($\Delta\lambda$) 均设置为 0.01 nm, 更改设置后按回车键 (Enter) 或者点击 Apply 进行确认。将 Source Light Path 设置为 nF920 Lamp, 检测器选择默认设置, 然后点击 Apply;
5. 打开样品室的盖子, 选择相应的样品支架 (液体/前表面样品支架), 放入待测样品, 盖好样品室盖子。
6. 在 Signal Rate 设置窗口内输入相应的激发波长和发射波长。调整激发侧和发射侧狭缝, 使 Em1 获得一个合适的信号值 (一般不超过 2000 cps), stop rate 是 star rate 的 5%。在设置后按回车或 Apply。
7. 点击  进入, Manual Lifetime, 进入设置菜单。在 Time Range 标签内选择一个合适的时间窗口和 Channels 值。设置好后, 点击 New 开始测试。可得到如下寿命衰退曲线。(数据处理见 (五))




(四) 使用 EPL/EPLED 的测试方法

1. 打开 PH1, CO1, EPL/EPLED 电源(打开钥匙, 待激光器稳定后打开 laser on);
2. 打开电脑主机, 双击桌面 Flouracle 图标进入仪器操作界面
3. 点击软件窗口左上角的  按钮, 进入 Signal Rate 设置界面, 将发射侧的狭缝 ($\Delta\lambda$) 设置为 0.01 nm, 更改设置回车键 (Enter) 或者点击 Apply 进行确认。将 source 设置为 TCSPC laser, 检测器设置为默认设置, 然后点击 Apply;
4. 打开样品室的盖子, 选择相应的样品支架 (液体/前表面样品支架), 放入待测样品, 盖好样品室盖子。
5. 在 Signal Rate 设置窗口内输入相应发射波长。在 EPL/EPLED 激光器上选择合适的脉冲周期 (频率=1/周期)。调整发射侧狭缝, 使 Em1 获得一个合适的信号值(不超过 Reference 的 5%), 在设置完成后点击回车或 Apply。
6. 点击  进入, 选择 Manual Lifetime, 进入设置菜单。在 Time Range 标签内选择一个合适的时间窗口, 时间窗口应与所用激光器的脉冲周期相对应 (使得样品的衰退寿命 \leq 时间窗口 \leq 脉冲周期)。设置好后, 点击 New 开始测试。可得到如下寿命衰退曲线。(数据处理见 (五))



(五) 数据处理

1. 点击“Zoom In”  按钮，然后在衰退曲线上选取需要进行拟合的范围。点击 Analysis 菜单中的“Exp.Tail Fit”，在弹出的窗口内输入数值进行拟合，从而得到衰减寿命。使方差 (χ^2) 小于 1.3 且越接近于 1，残差 (Residuals) 均匀分布在 0 线两侧表示拟合的越好。

Decay4 Fit

Fit Range: Fitting Range 110 to 1023 chans Override low limit

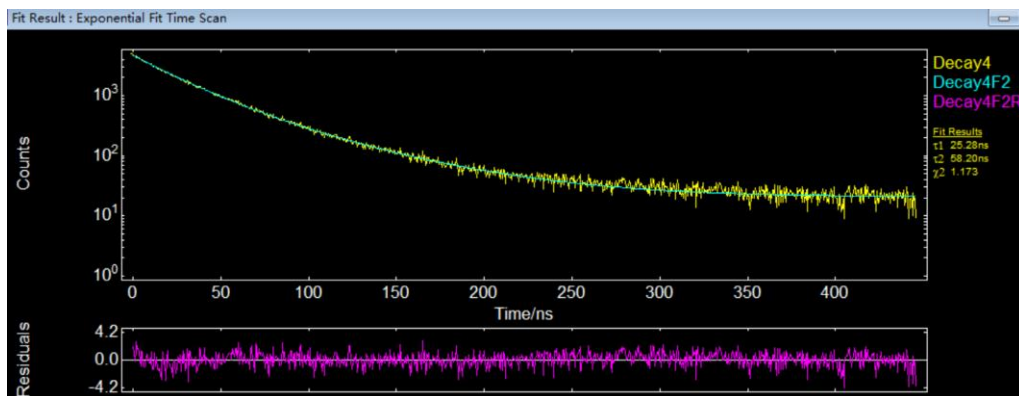
$$R(t) = B_1 e^{-t/\tau_1} + B_2 e^{-t/\tau_2} + B_3 e^{-t/\tau_3} + B_4 e^{-t/\tau_4}$$


	Fix	Value / ns	Std. Dev / ns	Fix	Value	Std. Dev	Rel %
τ_1	<input type="checkbox"/>	25.2787	0.42027	B_1	3598.356	73.4709	58.72
τ_2	<input type="checkbox"/>	58.2023	1.40884	B_2	1098.667	80.3171	41.28
τ_3	<input type="checkbox"/>			B_3			
τ_4	<input type="checkbox"/>			B_4			
		A	20.576				

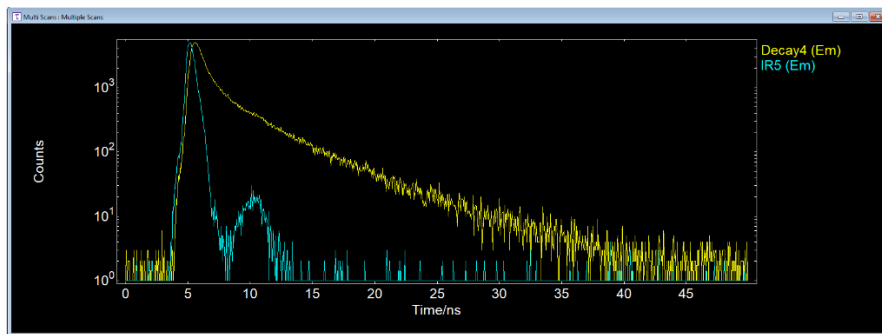
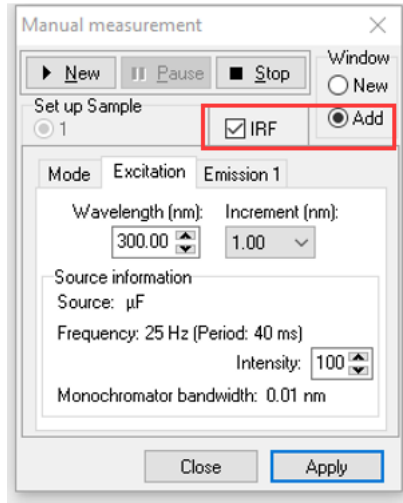
χ^2 : 1.173

Copy Results To Clipboard:

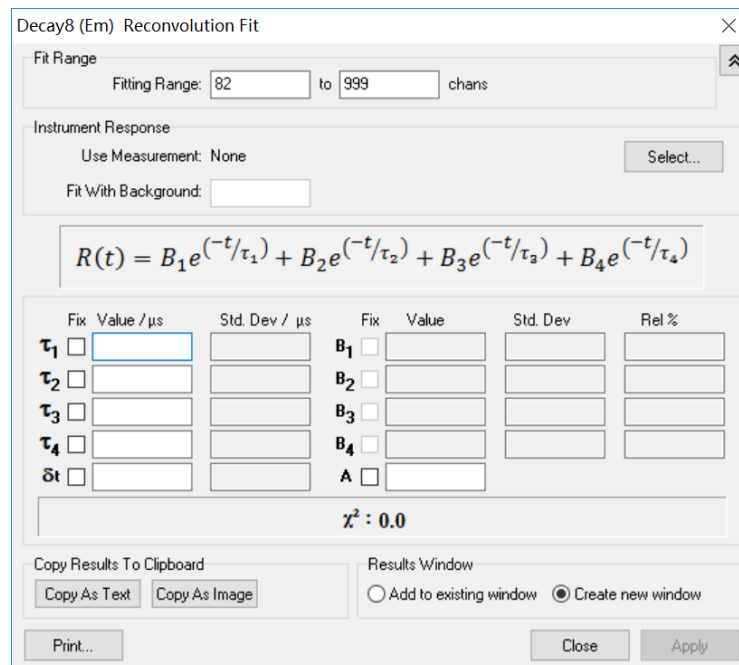
Results Window: Add to existing window Create new window






2. 对于寿命很短的样品，在测试完样品的寿命后，需要测试仪器响应因子 IRF 来扣除仪器本身对于短寿命样品的影响。液体样品使用 30%的硅胶水溶液 (Ludox) 作为散射体，固体样品用固体本身作为散射体。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 Intensity，降低 Intensity 的值，使 Em1 的值小于等于测试样品时的信号值。
3. 点击  按钮，选择 Manual Lifetime，进入设置菜单，将 IRF 和 add 勾上，其他条件不变，设置好后，点击 New 开始测试。得到样品与仪器响应的衰退曲线 (如下图)

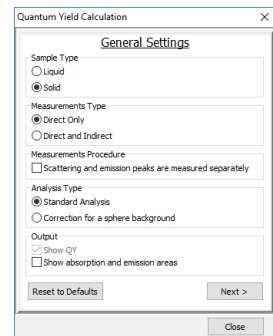
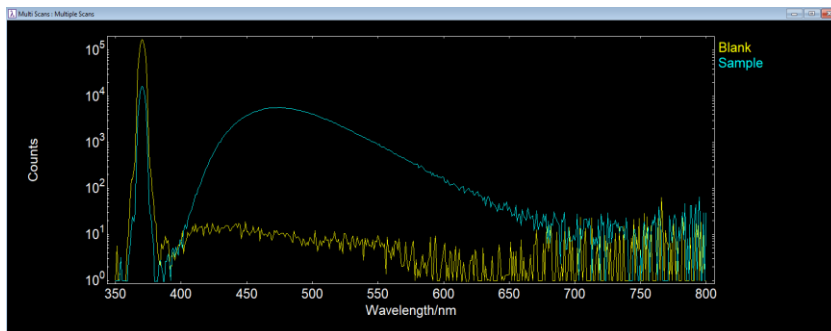


4. 测试完成后，同样选择合适范围，点击 Analysis 菜单，选择"Exp. Reconvolution Fit"进行拟合；在弹出的窗口内输入数值进行拟合，得到样品扣除仪器响应后的寿命值。

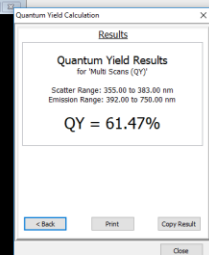
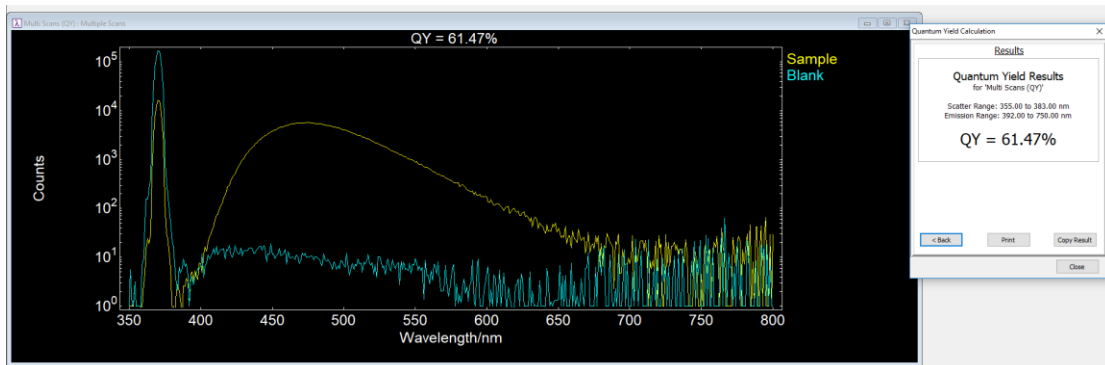


五、量子产率的测试

1. 量子产率的测试需要使用到积分球附件。首先取掉样品室内的两个透镜。然后将积分球附件更换至样品室。样品有固液体之分，以固体样品为例，测试时积分球内部需要使用固体支架和空白白板。测试前将积分球反转镜旋至“powder”档。首先将空白白板放置积分球内部进行测试。（若测试液体样品，请将反转镜旋至“cuvette”档，并使用溶剂作为测试空白，液体样品的 OD 值一般小于等于 0.1 以避免内滤效应的影响）。
2. 点击软件窗口左上角的  按钮，将 Excitation Wavelength 和 Em1 Wavelength 均设置成样品的激发波长，调节激发和发射狭缝，发射狭缝尽量开小，增加激发侧狭缝，使 Em1 的 Signal Rate 接近 10^6 ，但不要超过 10^6 。光源选择 Xe 灯，检测器部分选择带有积分球校正文件的检测器，设置好后点击回车或者 Apply 进行确认。
3. 点击  按钮，点击下拉菜单中的 Emission Scan，弹出设置窗口。在设置窗口中选择扫描范围，起始设置为短于激发波长 20nm 的位置，终止值大于样品的发射峰波长。测试空白白板的发射光谱命名为 Blank；
4. 取出白板放入样品。不改变其他任何设置。再次点击 ，以及 Emission Scan, 仍然不改变任何参数，点击 Start。得到光谱后命名为 Sample。
5. 将 Blank 和 Sample 两个谱图叠加，选择 log 坐标，如下图所示。点击 Analysis – Quantum Yield，如图。勾选相应的选项后，点击 Next。



6. Sample 和 Ref 的下拉选项中分别选择对应的 Sample 和 Blank 后，点击 Next。依次选择散射和发射光范围，计算样品的量子产率，可平行进行 3 次测试，得到样品的量子产率值。



七关机程序

1. 退出 Flouracle 程序和关闭计算机;
2. 关闭常规检测器控制器CO1的 POWER 开关;
3. 关闭Xe灯。按下Xe灯前面板的**银色按钮**，将Xe灯熄灭，等待Xe灯显示屏上显示的**冷却倒计时结束**，显示Ready to start 后，才能关闭Xe灯背后的 POWER电源开关;
4. 如有使用近红外PMT检测器，需关闭近红外PMT检测器。先依次关闭HV控制器上的H.V. ON开关和 POWER开关，然后关闭液氮冷却泵的POWER电源开关，再将通氮气金属管从液氮罐中取出，装入**塑料膜保护套**中。
5. 关闭设备供电电源控制器PH1上的POWER电源开关。