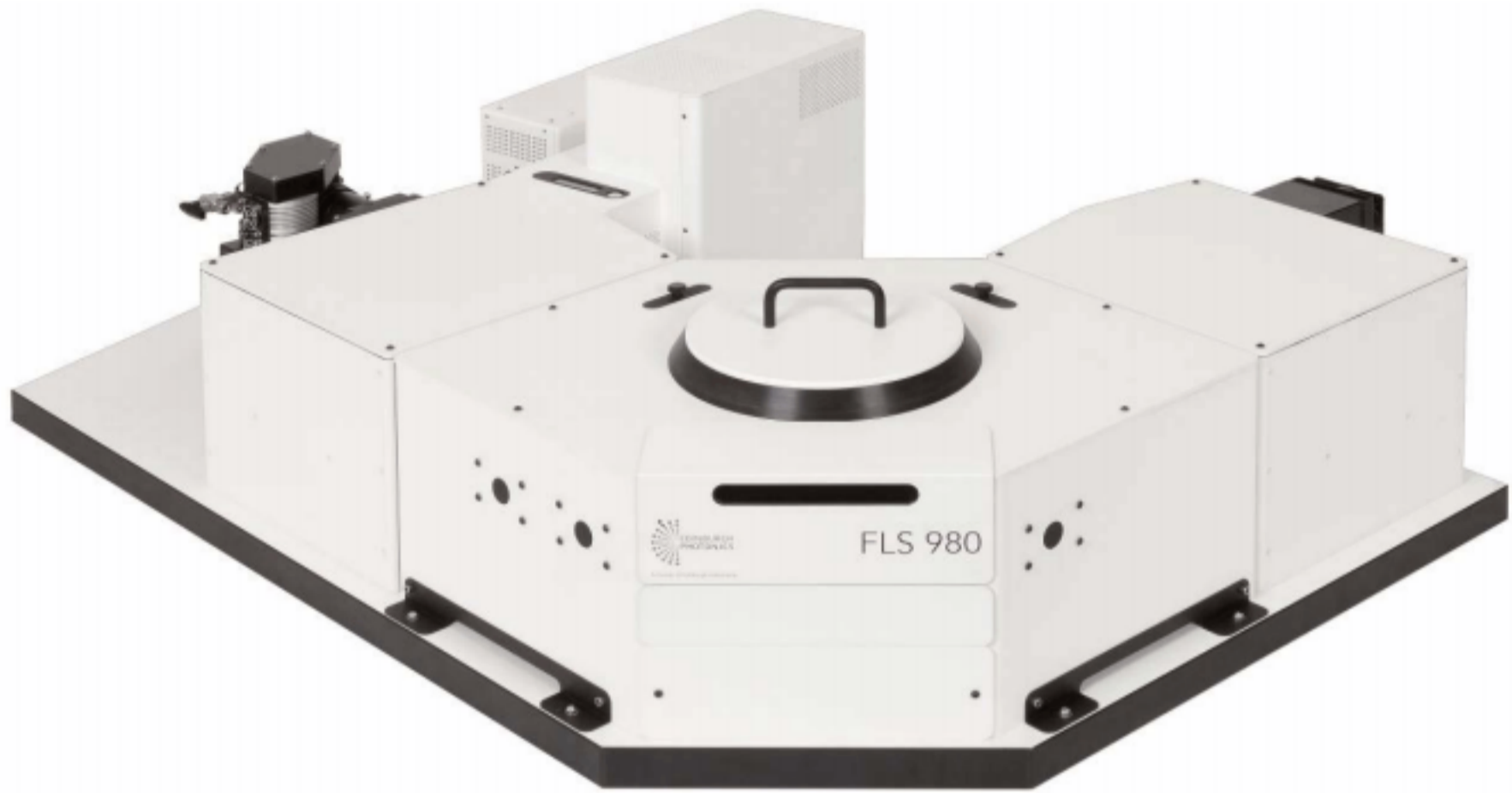
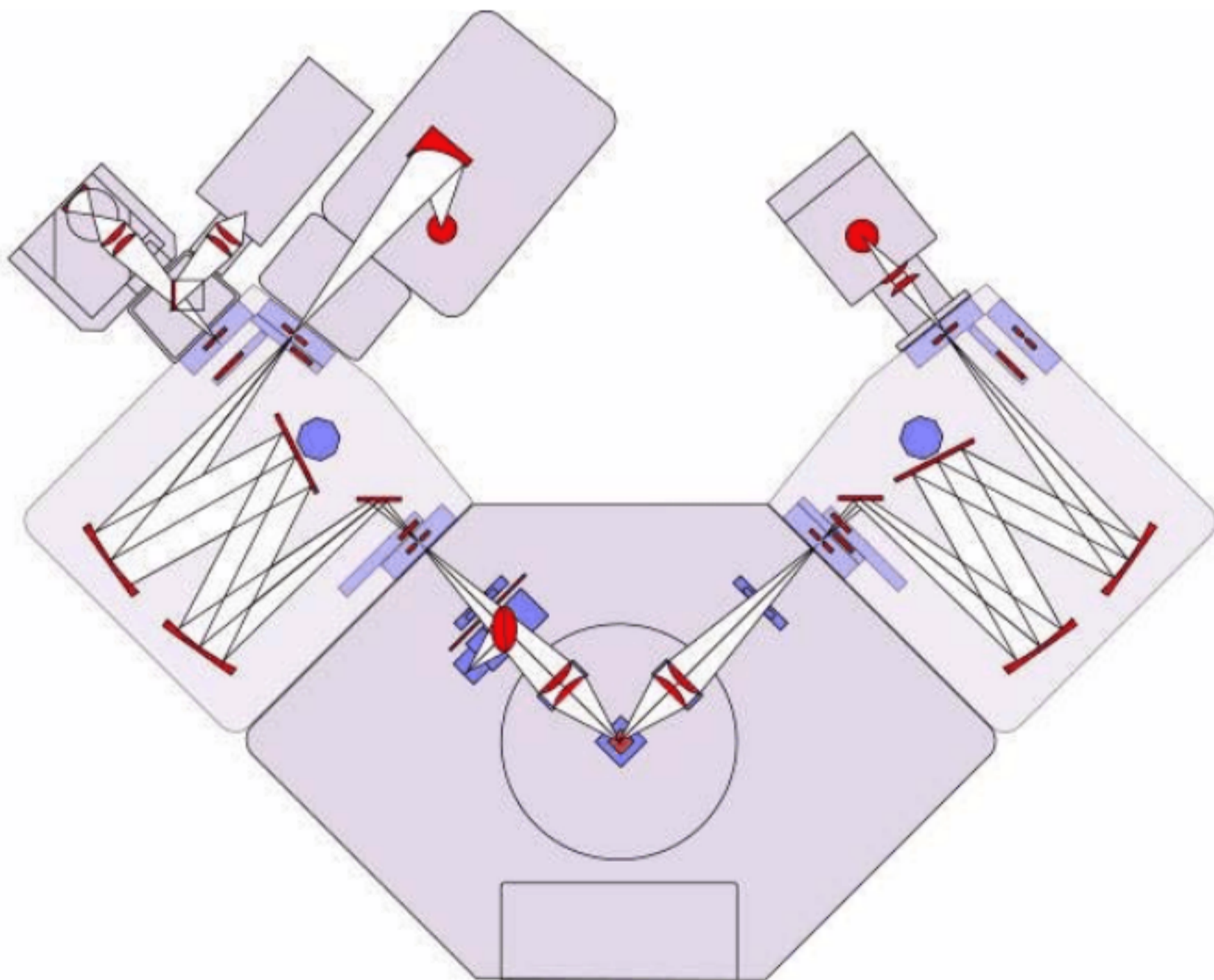


稳态/瞬态荧光光谱仪 (FLS 980-STM) 操作说明书



FLS980-STM 外观图



FLS980-STM 单-单光栅内部光路示意图

一、仪器介绍

1.FLS 980 稳态/瞬态荧光光谱仪具有两种功能

1.1 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）。

1.2 瞬态测量：磷光寿命（1us—10s）使用微秒闪光灯。

荧光寿命（100ps~50us）使用纳秒闪光灯，激发波长 200nm-400nm

1.3 量子产率测量：使用积分球

1.4 各向异性，选取偏振片

适合各类液体和固体样品的测试。

2.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

3.主要性能指标

光谱仪探测范围：光电倍增管， 200 - 870nm

荧光寿命测量范围： 100ps - 10s 光源 450w 氙灯， us 闪光灯， ns 闪光灯

二、仪器测试原理 (SPC)

时间相关单光子计数原理是 FLS980 测量荧光寿命的工作基础。

时间相关单光子计数法 (time - correlated single photon counting) 简称“单光子计数 (SPC)

法”，其基本原理是，脉冲光源激发样品后，样品发出荧光光子信号，每次脉冲后只记录

某特定波长单个光子出现的时间 t ，经过多次计数，测得荧光光子出现的几率分布 $P(t)$ ，此 $P(t)$ 曲线就相当于激发停止后荧光强度随时间衰减的 $I(t)$ 曲线。这好比一束光（许多光子）通过一个小孔形成的衍射图与单个光子一个一个地通过小孔长时间的累计可得完全相同的衍射图的原理是一样的。


三、测量之前需要特别注意的事项

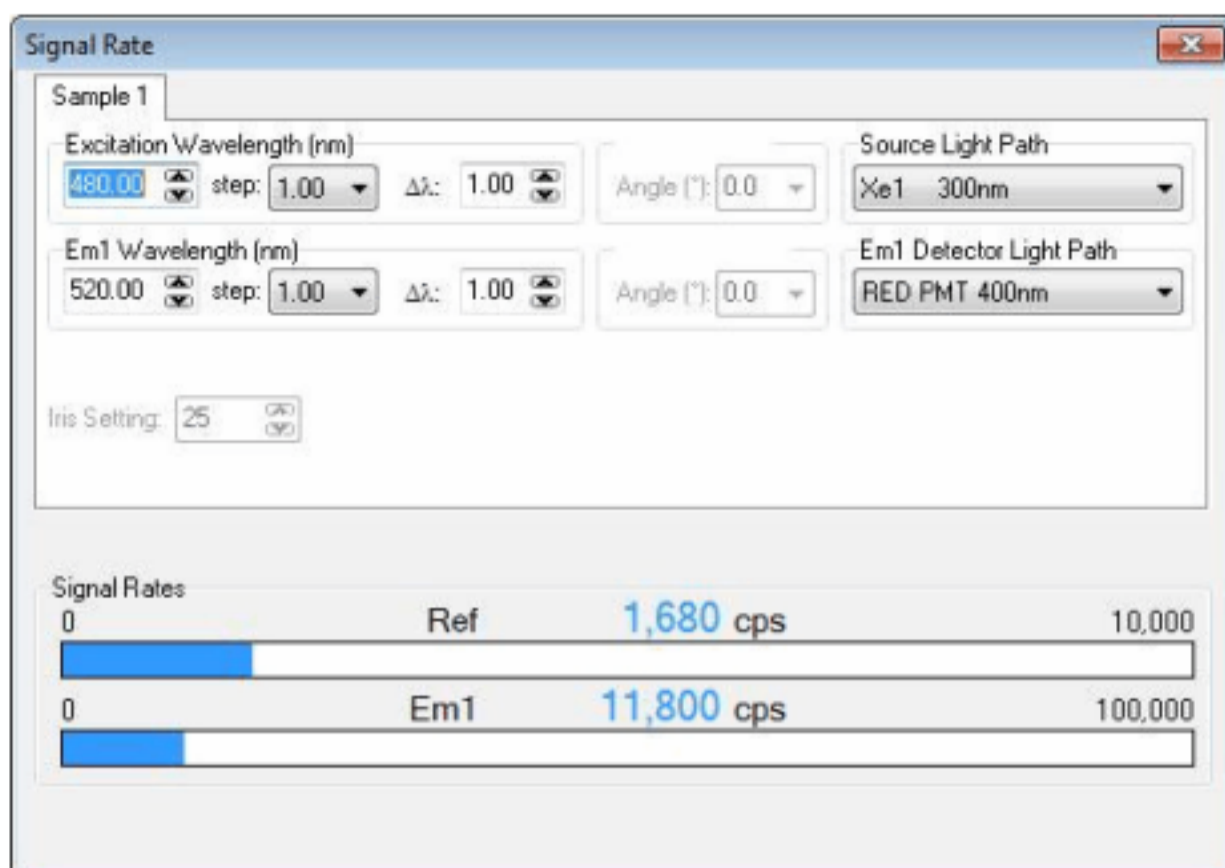
1. 在切换光源、修改设置或放样品之前必须把狭缝（ ）关到最小（ 0.01nm ），否则会损坏光电倍增管！如果打开样品室盖子之后， $Em1$ 的 Signal Rate 增加，请与工程师联系
2. 测量样品的瞬态性质之前，请用稳态测量对样品的稳态性质进行表征，了解样品的激发光谱和发射光谱及最佳激发波长和发射波长；
3. 用 PMT 检测时，必须等稳压电源 CO1 的温度示数在 - 20 以下才可以开始采集数据；
4. 狭缝范围 0.01 ~ 18nm，调节时注意不要超过其上限；

四、稳态荧光光谱的测定

(一)紫外可见区稳态荧光光谱的测定步骤

- 1、 打开 PH1 给主机及数据采集供电；
- 2、 CO1 开关给检测器制冷到 - 20 ；
- 3、 做稳态打开氙灯 xe1 电源开关，等到氙灯显示 ready to start ，
- 4、 做磷光打开 us 闪光灯此时不闪烁，闪烁靠软件控制，
- 5、 做荧光短寿命打开 ns 闪光灯 nf920 开关，要预热 10 分钟
6. 打开计算机，双击桌面上 F980 图标，进入工作站

7、 点击窗口左上角的  按钮，



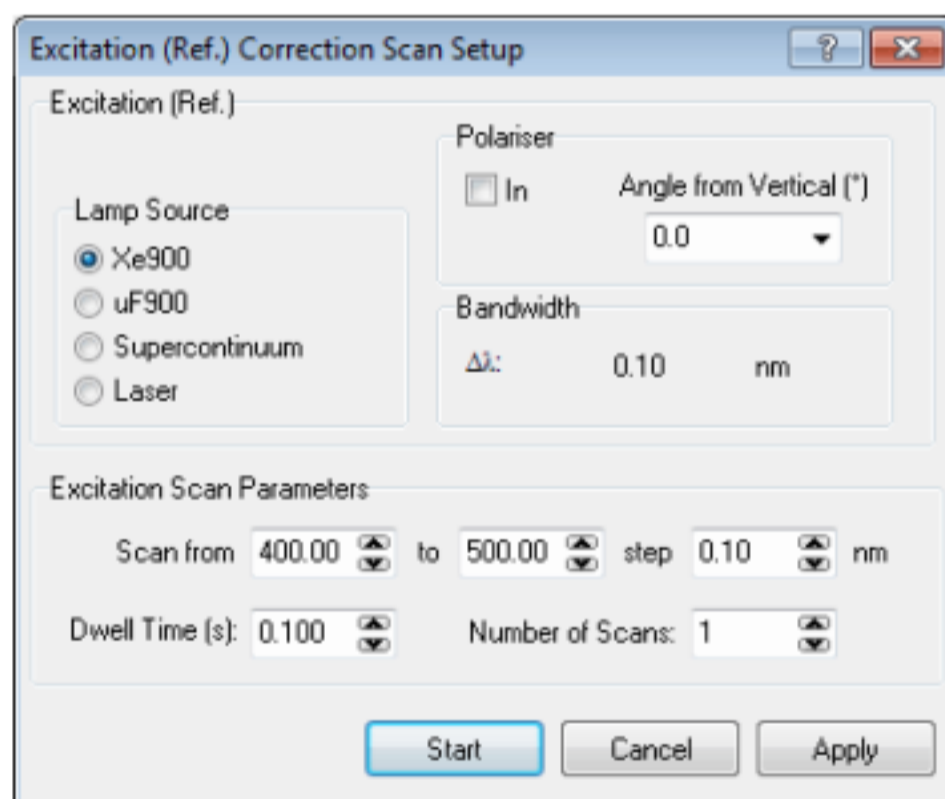
进入 Signal Rate 设置窗口，显示默认值，更改设置按回车键 (Enter) 或者点击 Apply 确认，再将 Source 设置为 Xe1，检测器默认设置，然后点击 Apply；

8. 打开样品室的盖子，放入待测样品，然后盖好；

9. 在 Signal Rate 设置窗口内输入相应的 Excitation Wavelength 和 Em1 Wavelength 值，逐渐加大，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 千万不要超过 20 的 6 次方）；

10. 激发扫描 Ex

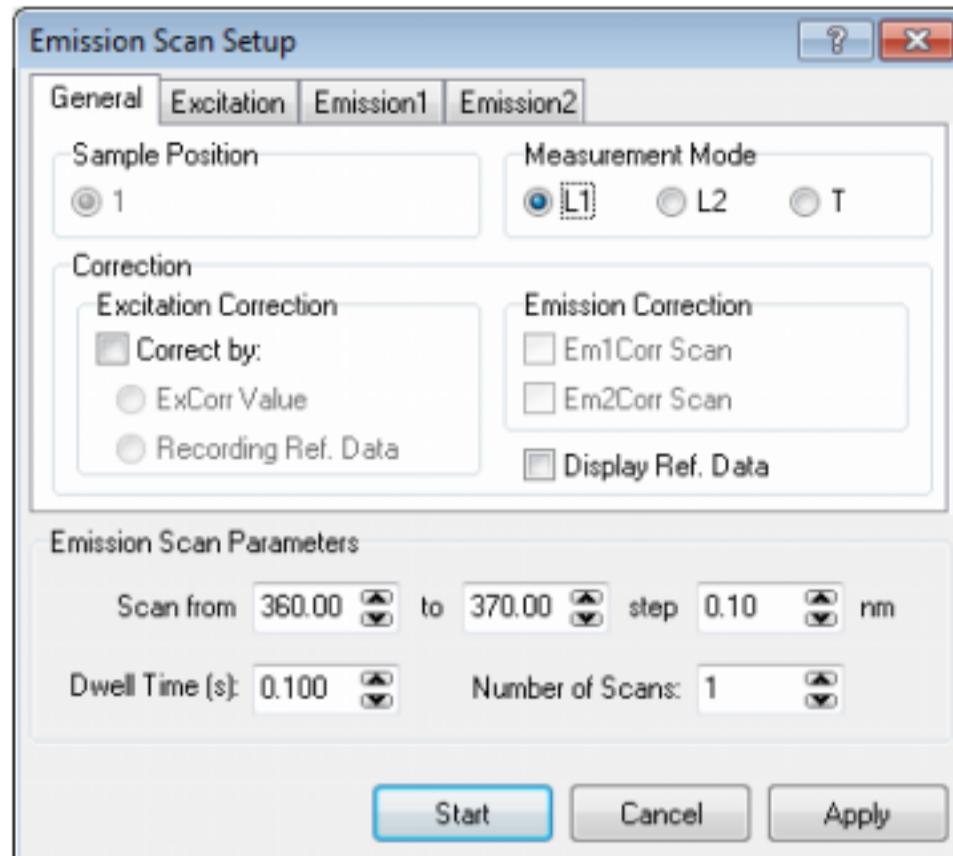
单击  按钮，



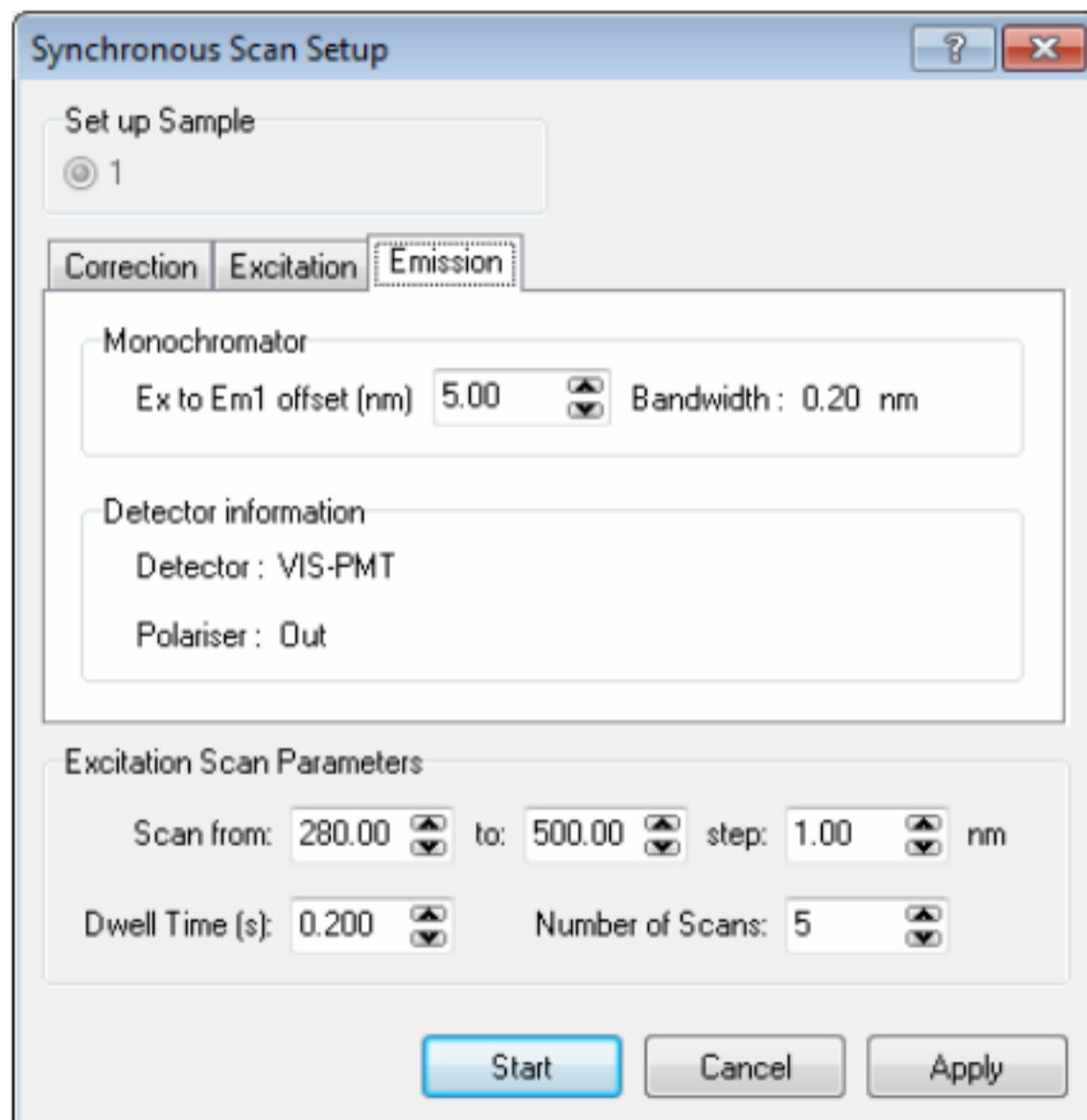
选择 Excitation Scan，进入设置窗口，在 Emission1 栏内，将 Monochromator Wavelength 设置为待检测波长，Detector 默认设置，然后在 Excitation Scan Parameters 内设置波长扫描范围、扫描间隔 (step)、停留时间 (Dwell Time) 和扫描次数 (Number of Scans)，设置完毕后点击 Start 即开始测量，得到激发光谱

11. 发射扫描 Em

点击  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），设置完毕后点击 Start 即开始测量，得到发射光谱（荧光光谱）；
12 同步扫描 Synchronous 设置界面



(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

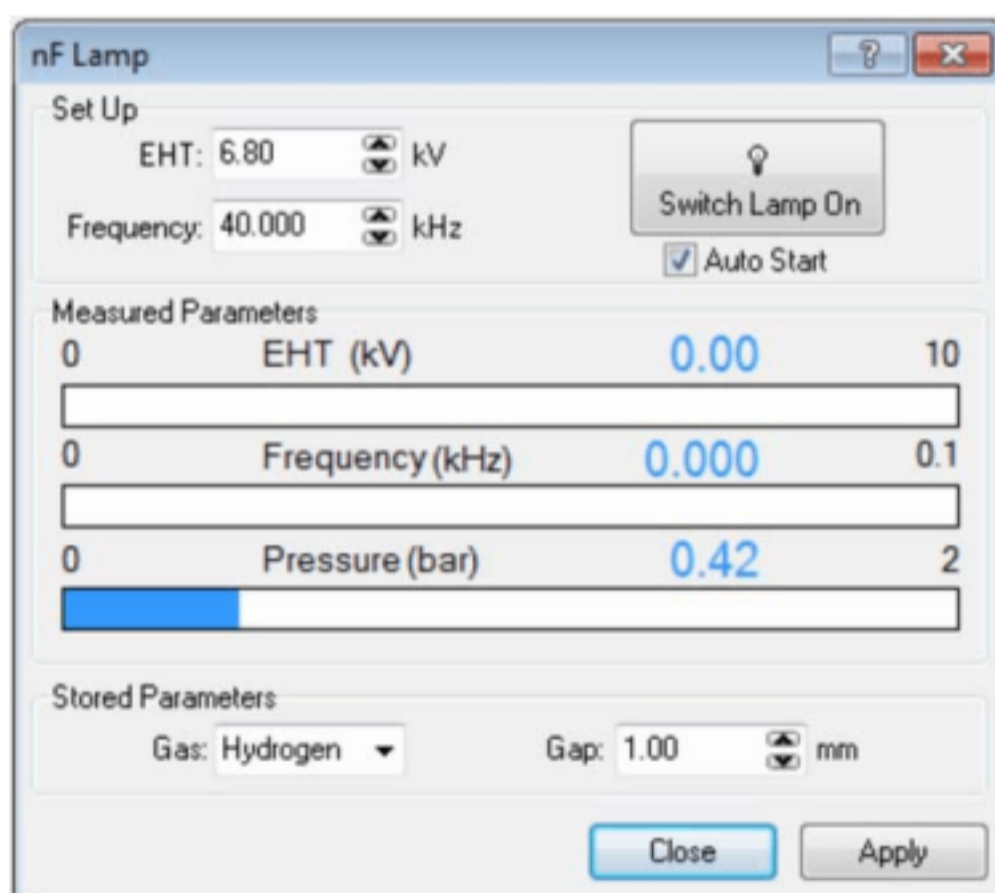
3. 谱图处理完了以后点击 File , 选择 Export ASCII 即可以转换成文本文件。

五、荧光寿命 (瞬态) 的测量


注 : 目前仪器的配置只能测量紫外可见区的荧光寿命 , FLS980 配有两个脉冲灯 (纳秒和微秒灯) , 一般情况下荧光强度在 50 微秒内衰减到零用纳秒灯 , 荧光寿命大于 50 微秒衰减到零用微秒灯 , 具体设置和步骤如下 :

(一) 紫外可见荧光寿命 (荧光强度在 50-100ps 微秒内衰减到零) 测量步骤

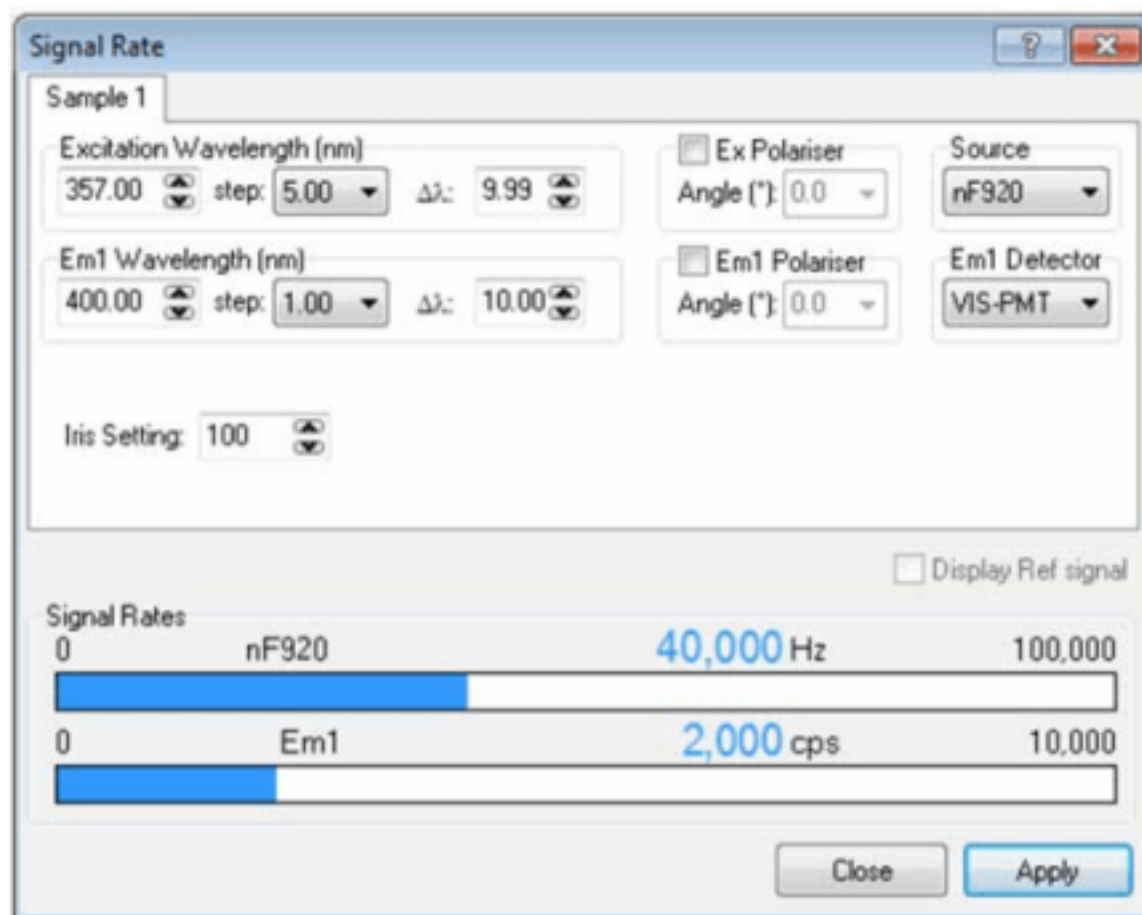
1. 打开 PH1 , CO1 , nF920 开关预热 10 分钟 ;
2. 打开计算机 , 双击桌面上 F980 图标进入工作站 ;
3. 点击 View 菜单 , 选择 nF Lamp Setup 进入窗口



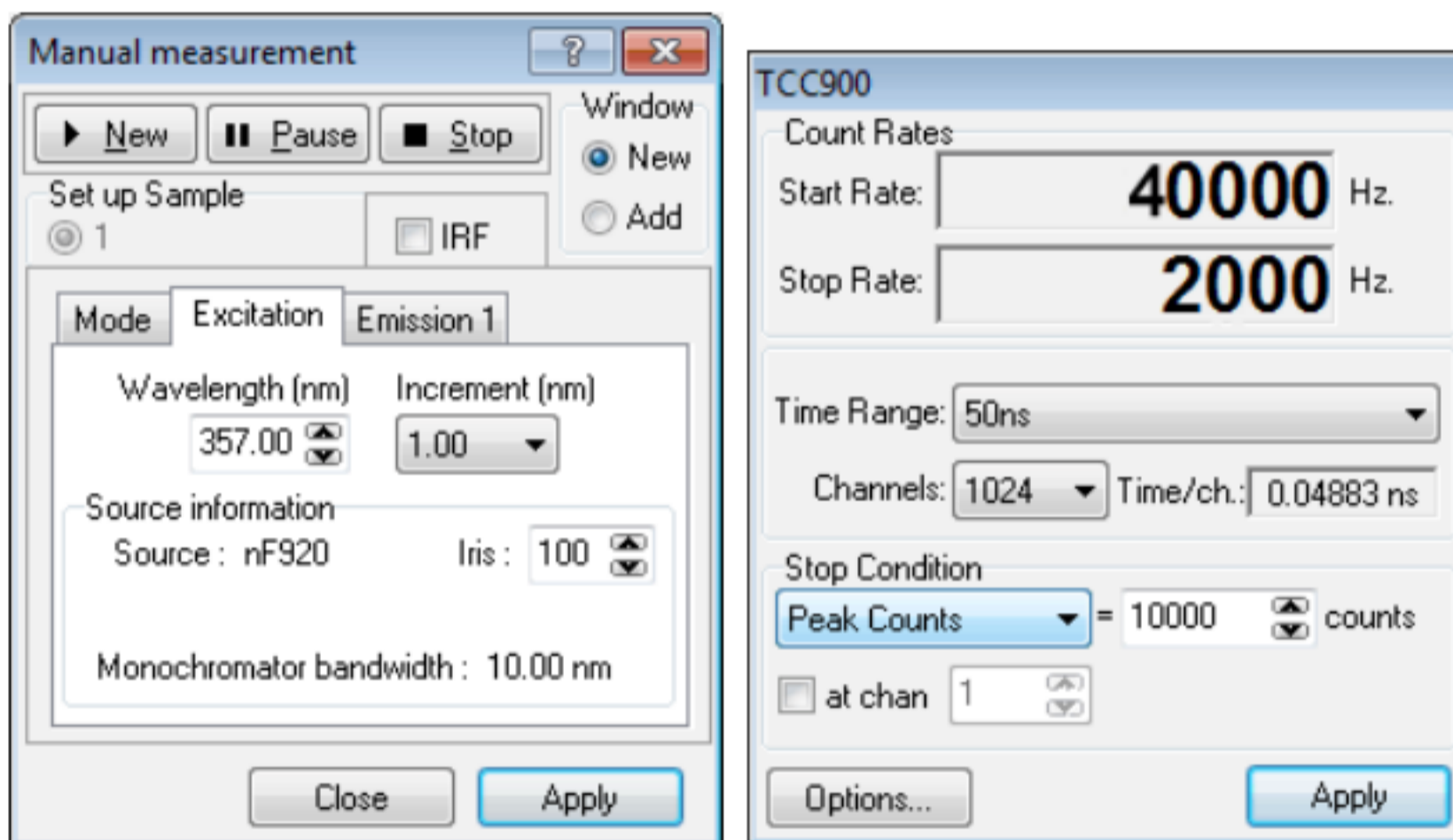
点击 Switch Lamp On , 观察纳秒灯的频率 , 注意在此窗口不要更改设置 , 观察正常后关闭窗口。注意压力为 0.42bar, 如果发现频率不能稳定在 40kHz , 请清洗氢灯 , 如果压力不正确请检查气密性重新置换充入氢气 , (置换氢气要反复 15 次吸气 , 充气充气压力不能大于 1.5Bar , 最后保持在 0.42Bar);

4. 点击软件窗口左上角的  按钮 , 进入 Signal Rate 设置窗口 , 先将 Excitation Wavelength 和 Em1 Wavelength 处的 均设置为 0.01 , 按回车键 (Enter) 或者点击 Apply , 再将 Source 设置为 nF Lamp , Em1 Detector 为默认 , 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 , 使 Em1 获得一个合适的 Signal Rate(一般不超过 2000) ; stop rate 是 star rate 的 5%




6. 点击  按钮，选择 Manual Lifetime，进入设置菜单，



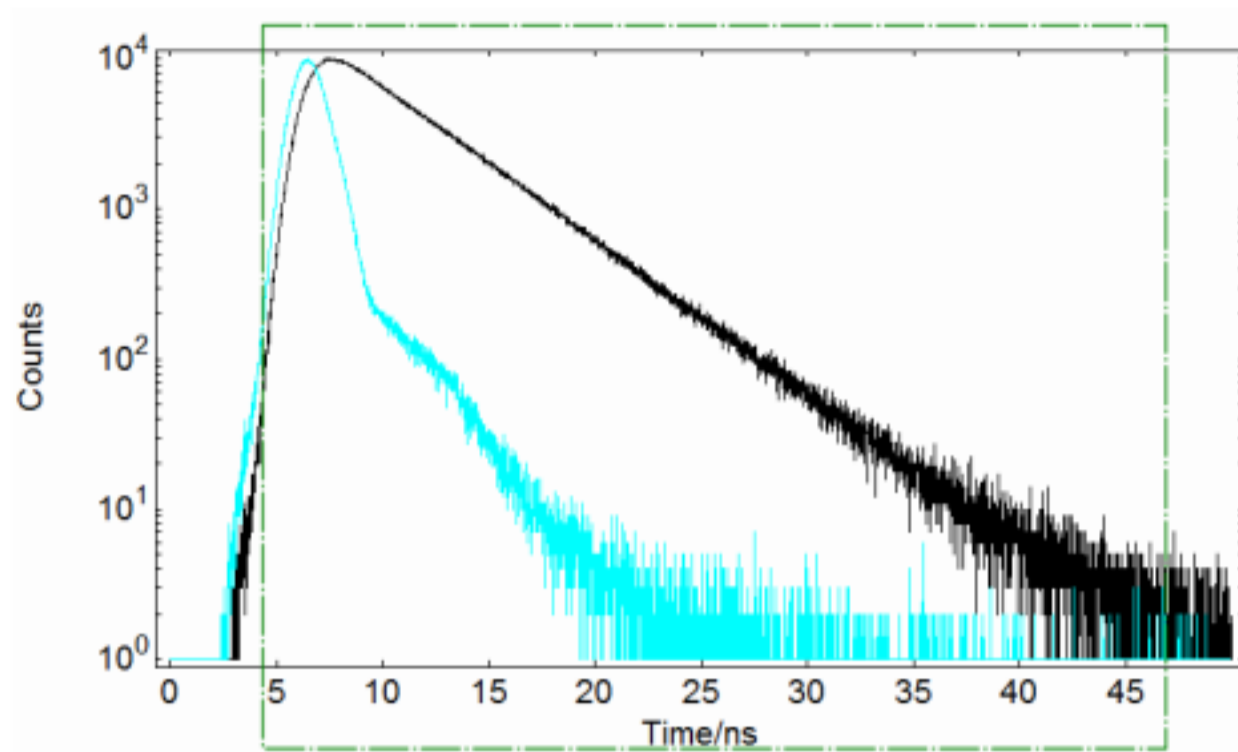
在 Excitation 栏内设置好激发波长和 Light Source，在 Emission 1 栏内设置好发射波长和 Detector 然后开始设置下部的 Lifetime Sample 1 菜单，在 Rates 标签内一边观察 Stop Rate 务必在 2000 以下，再在 Time Range 标签内选择一个合适的 Time Range 设置通常是实际寿命 10 倍 Channels (1024) 在 Stop Condition Peak count 设置 10000 根据样品情况选择一个合适的条件，设置好之后，点击 New 开始测试；

7. 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 iris 使 stop rate 小于 2000

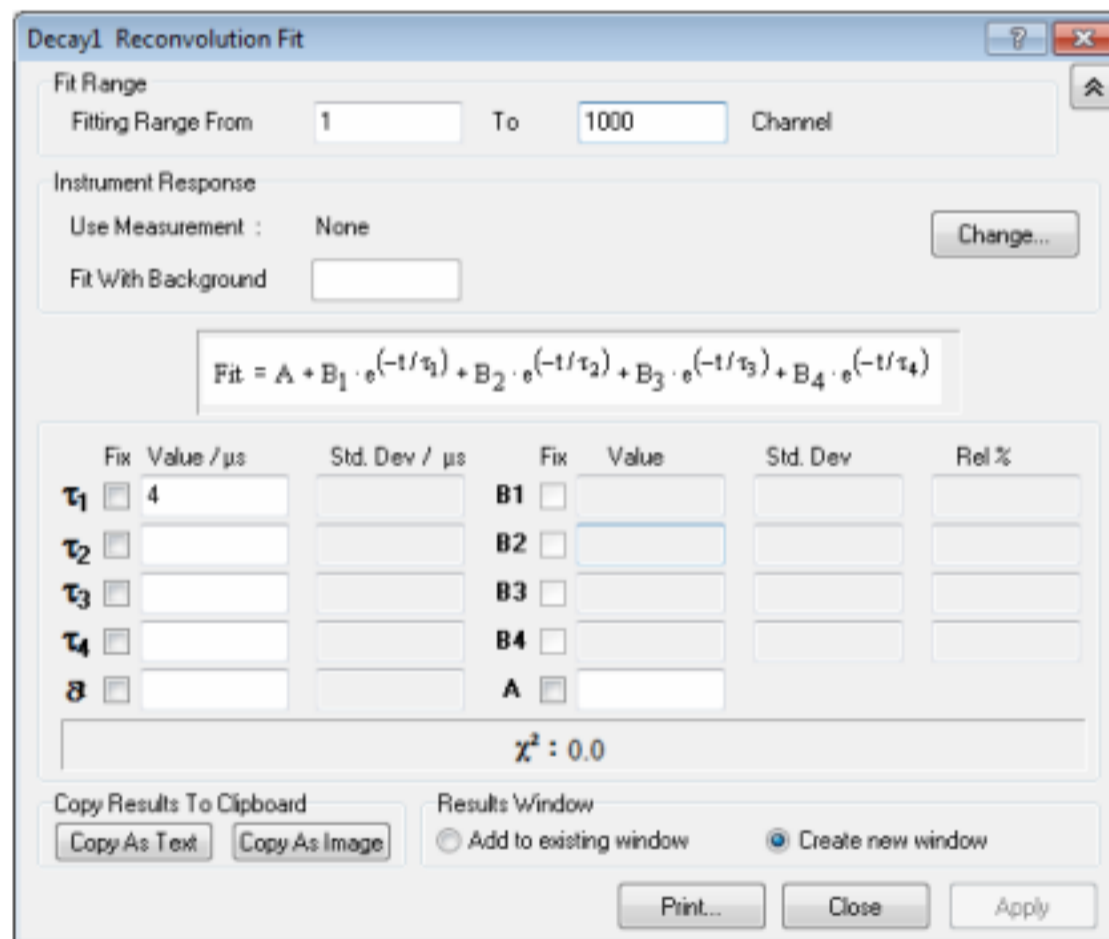
8. 点击  按钮，选择 Manual Lifetime，进入设置菜单，将 Live、IRF 和 Add 选择框勾上，别的设置与样品一致，设置好之后，点击 New 开始测试；

9. 测量完成后，选择拟合范围，

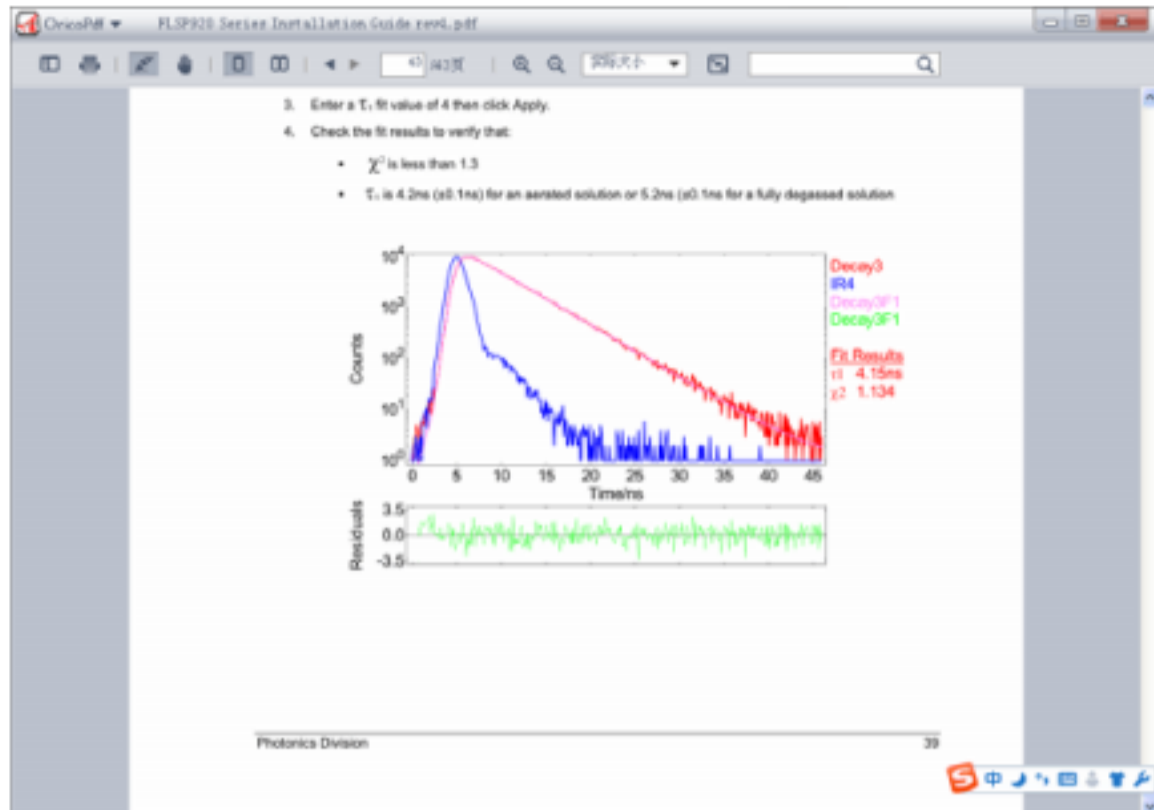
10 先点击  图标选择拟合范围



11、点击 Data 菜单，选择 Exponential Fit 中的 Rconvolution Fit



12、X2 平方要小于 1.3




13、T1 就是寿命如图寿命 4.15ns

14.拟合完成后，保存拟合的文件，共三种类型的文件，原始文件，ASC 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

(二)紫外可见荧光寿命（荧光强度大于 50 微秒才能衰减到零）测量步骤

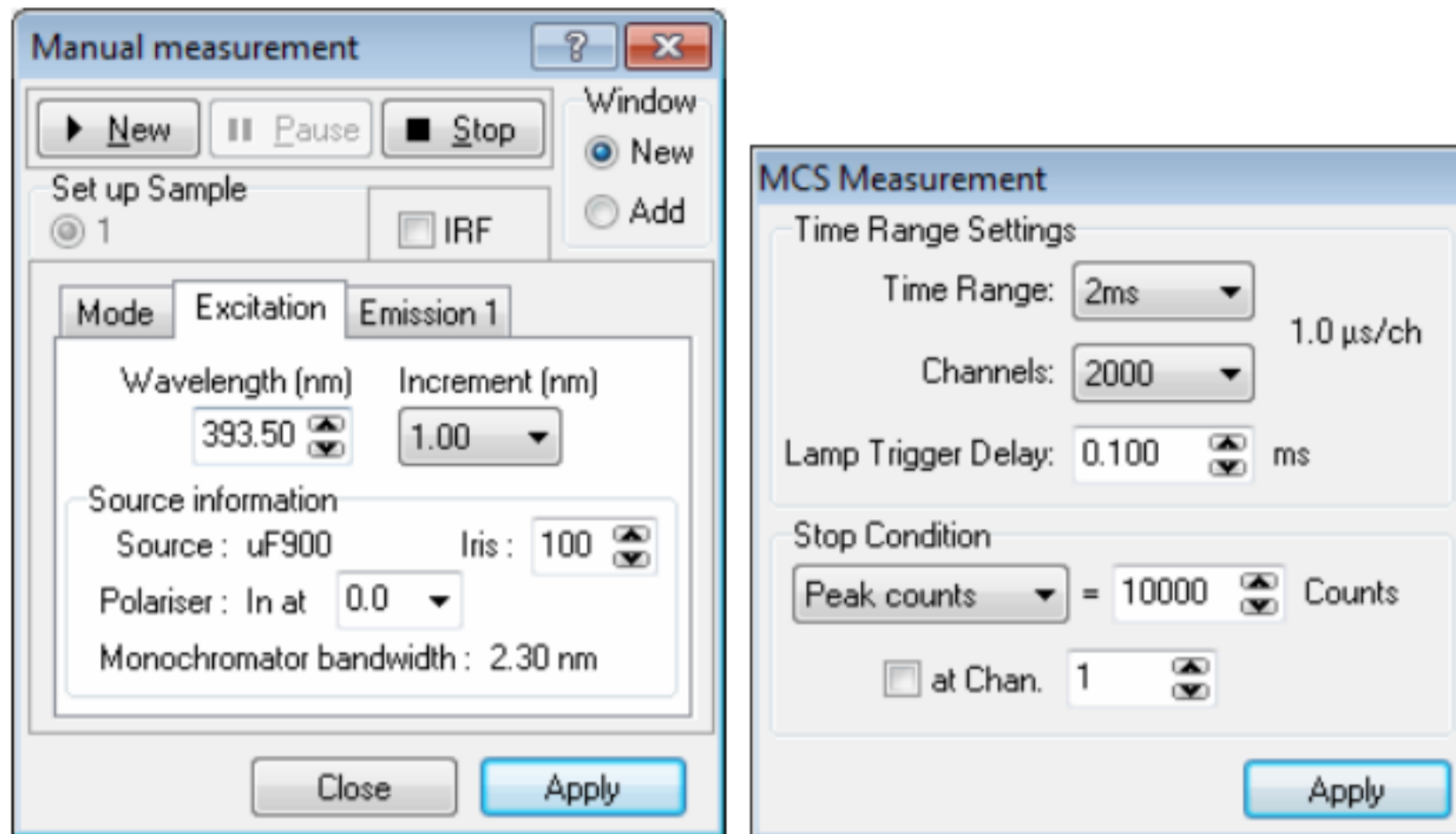
对于荧光强度大于 50 微秒才能衰减到零的样品，需要用到微秒灯，其设置和步骤如下：

1. 打开 CO1，主机和 nF900 电源；
2. 打开计算机，双击桌面上 F980 图标进入工作站；
3. 点击 Options 菜单，选择 Hardware Configuration 在 Lamps 栏中将 Steady State Lamp 勾掉，再将 Microsecond Flashlamp 勾上

4. 点击软件窗口左上角的  按钮，进入 Signal Rate 设置窗口，先将 Excitation Wavelength 和 Em1 Wavelength 处的均设置为 0.01，按回车键 (Enter) 或者点击 Apply，再将 Source 设置为 μ Flamp，Em1 Detector 默认设置，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，使 Em1 获得一个合适的 Signal Rate 2000-3000cps；


6. 点击  按钮，选择 Manual Lifetime，进入设置菜单

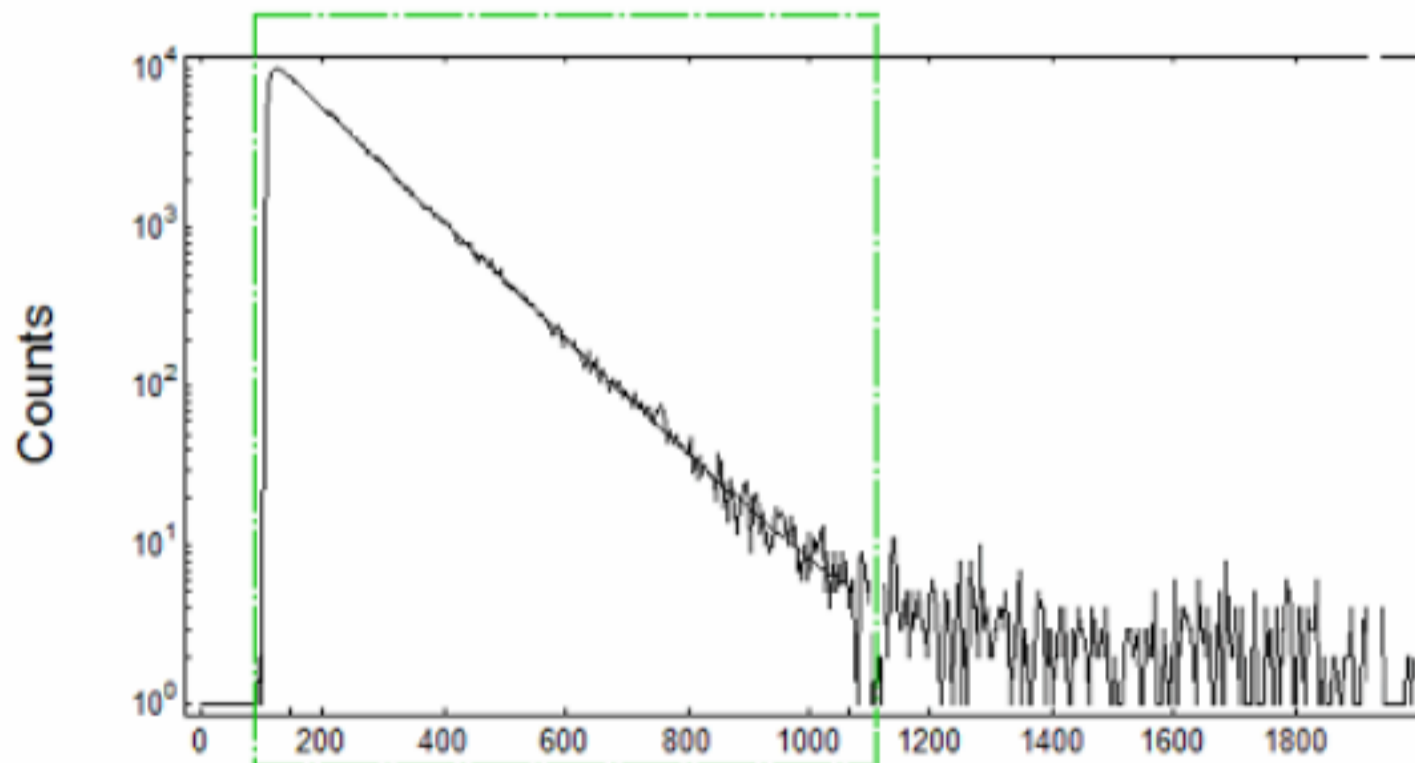


在 Excitation 栏内设置好激发波长和 Light Source ，在 Emission 1 栏内设置好发射波长和 Detector ，再在 Time Range 标签内选择一个合适的 Time Range 10 倍寿命值 和 Channels 例如 1024 ，在 Stop Condition 10000 根据样品情况选择一个合适的条件，设置好之后，点击 New 开始测试；

(三) 数据处理

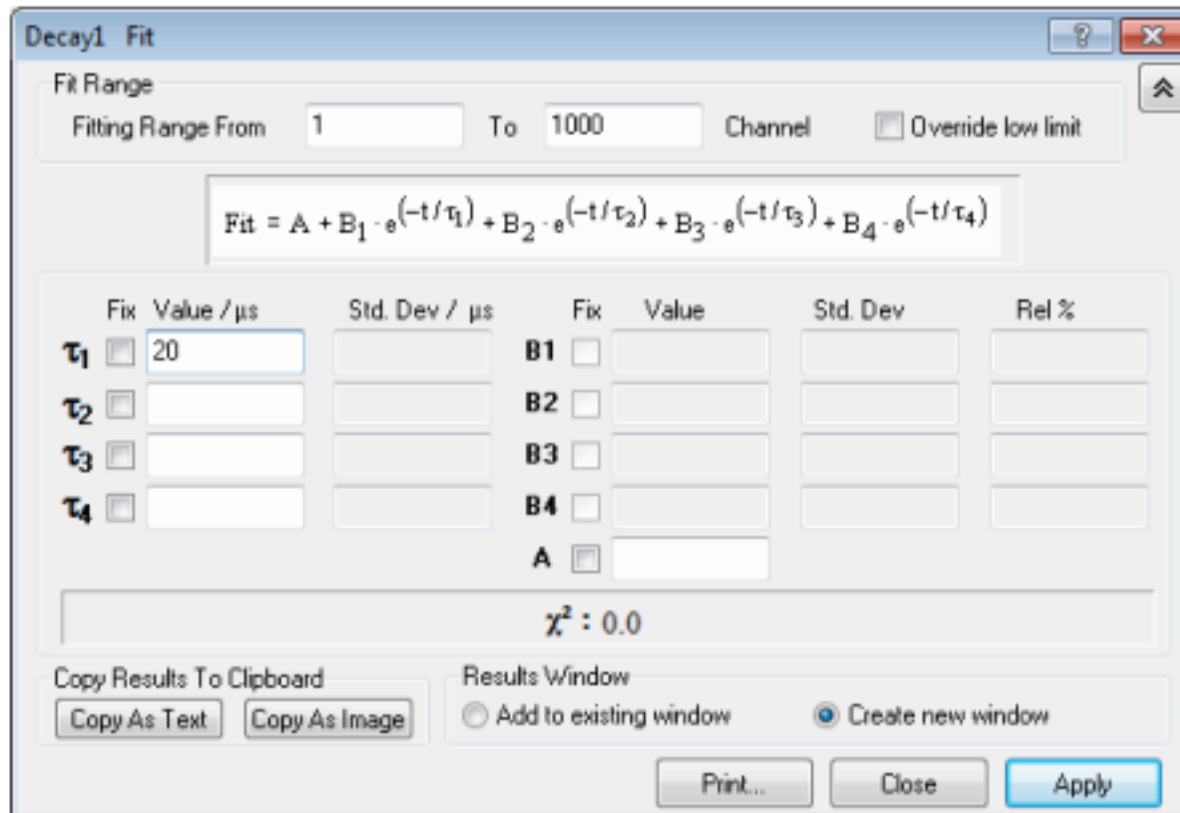
1. 测量完成后，点击保存将原始文件保存；

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，

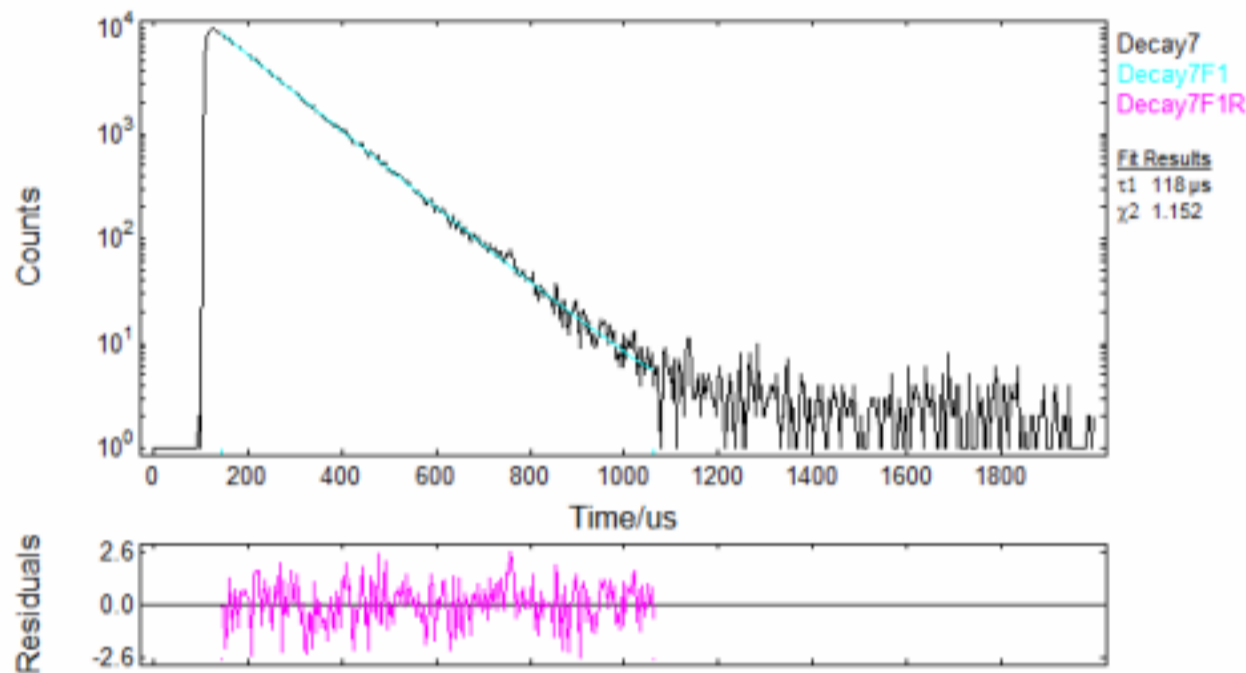


在 Data 菜单下选择

“ 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；



χ^2 平方要小于 1.3




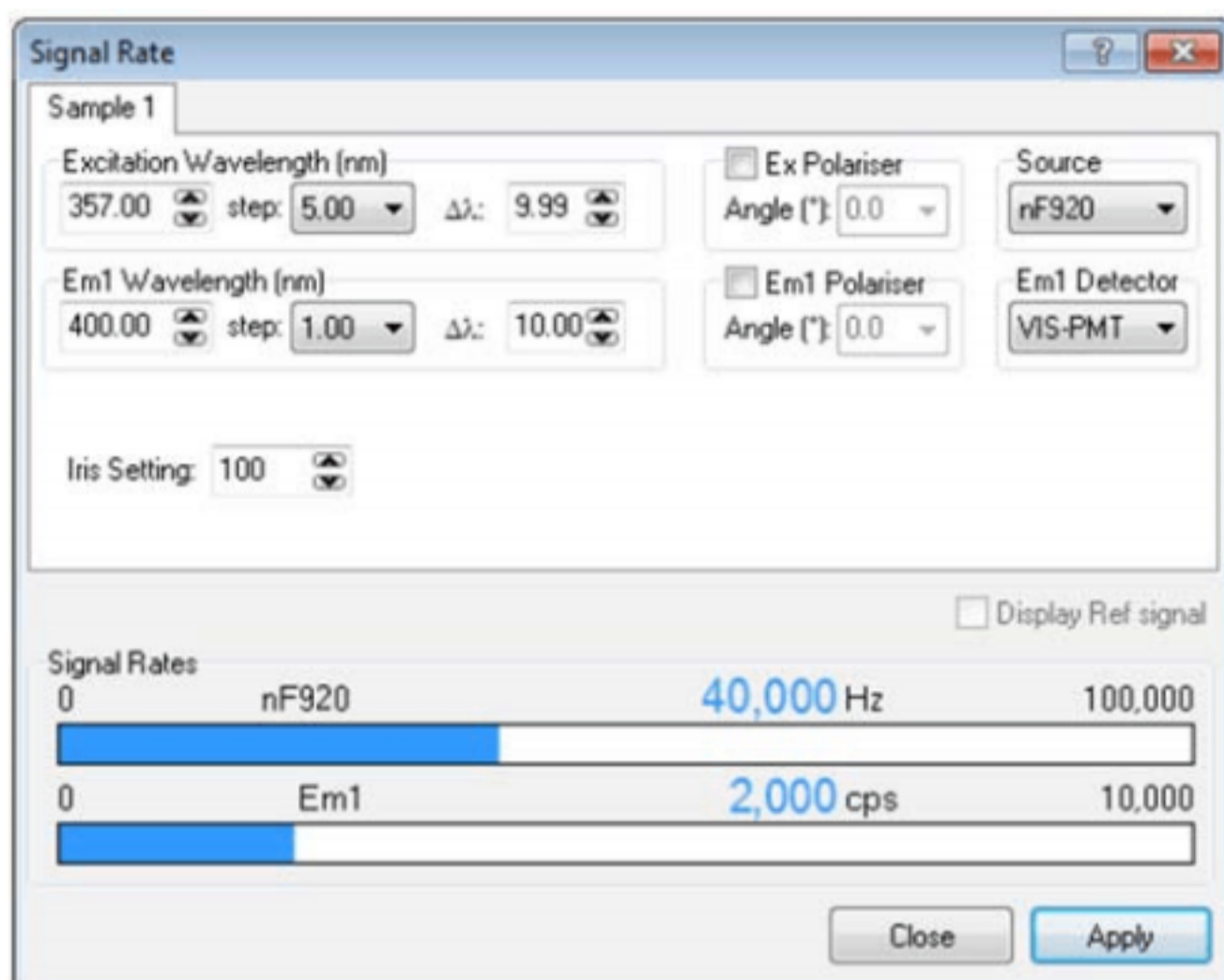
τ_1 就是寿命如图 118us

六、量子产率的测量

1 量子产率测量使用积分球，首先将积分球更换到样品室，积分球放到样品室需要卸掉两个透镜，样品有固体液体之分，

以液体为例，首先确定已知样品激发发射波长， 样品浓度要合适 0.15—0.4ABS 常用 0.1ABS 的浓度

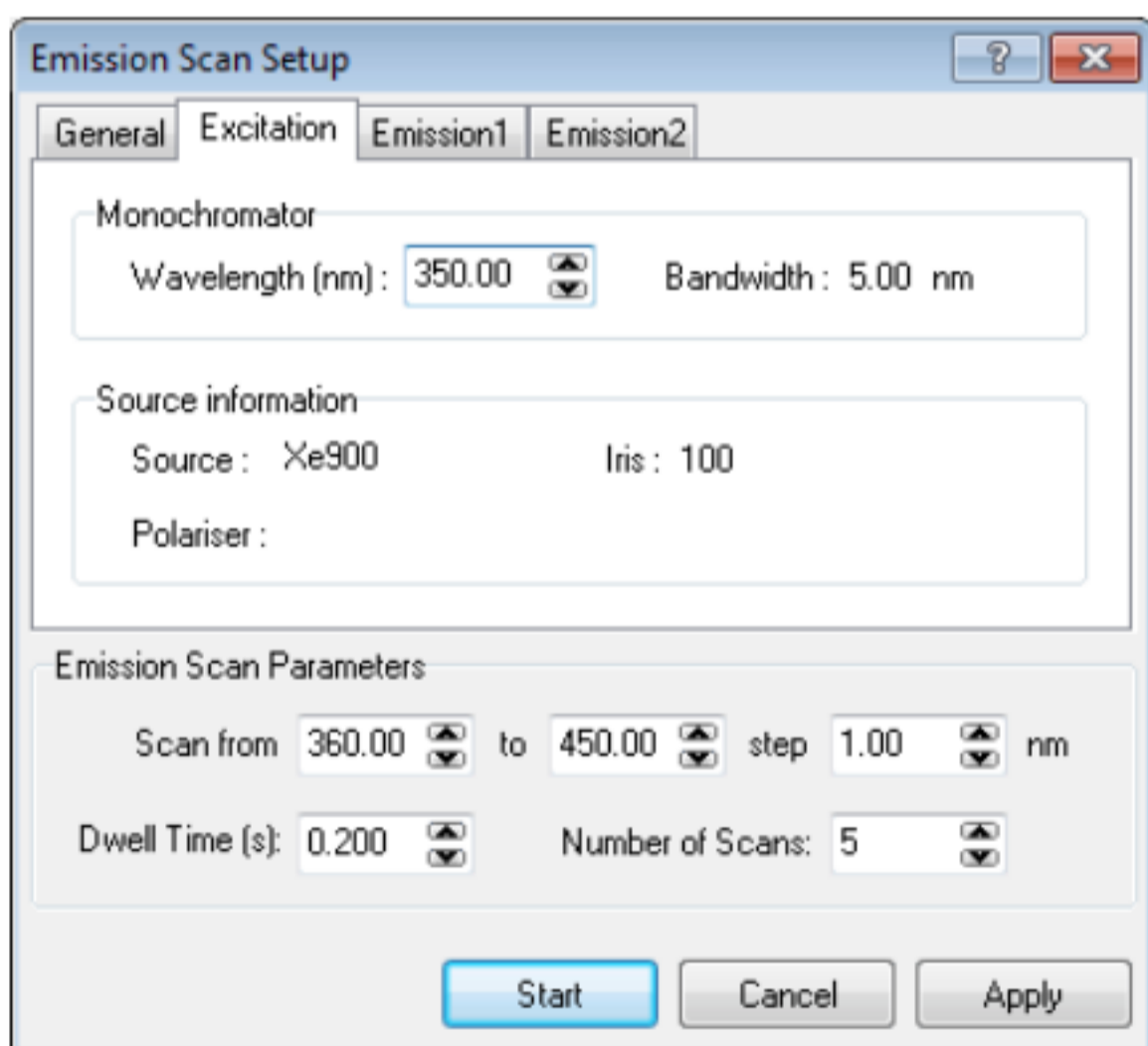
2 点击软件窗口左上角的  按钮，



打开样品仓盖子和积分球盖子将空白液放到积分球里，积分球选择选择激发波长跟发射波长一样值，为样品的激发波长，调整狭缝使的 6 次方

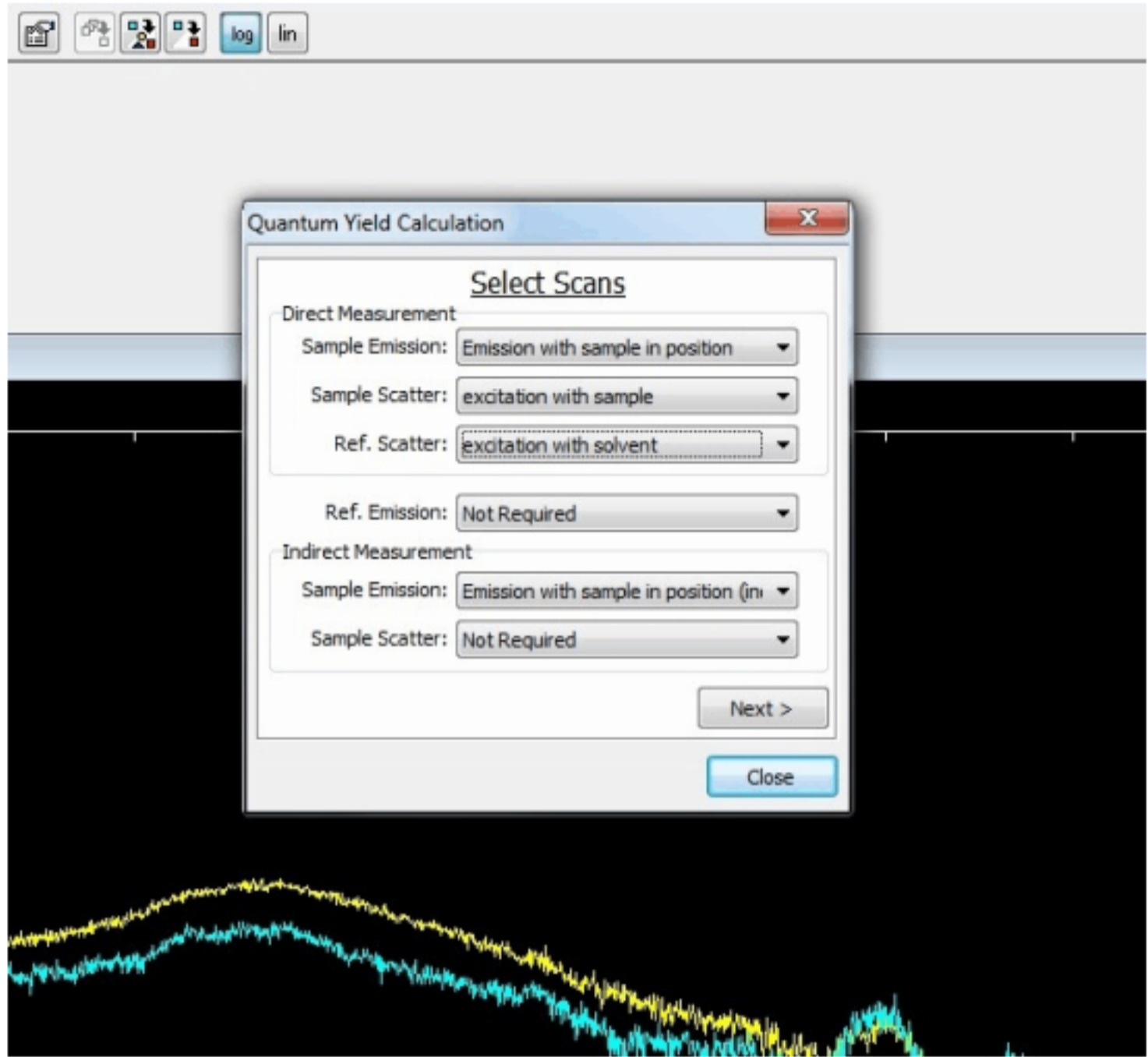
CUVETTE 盖上盖子，EM1 的值不要超过 10

3 点击  按钮

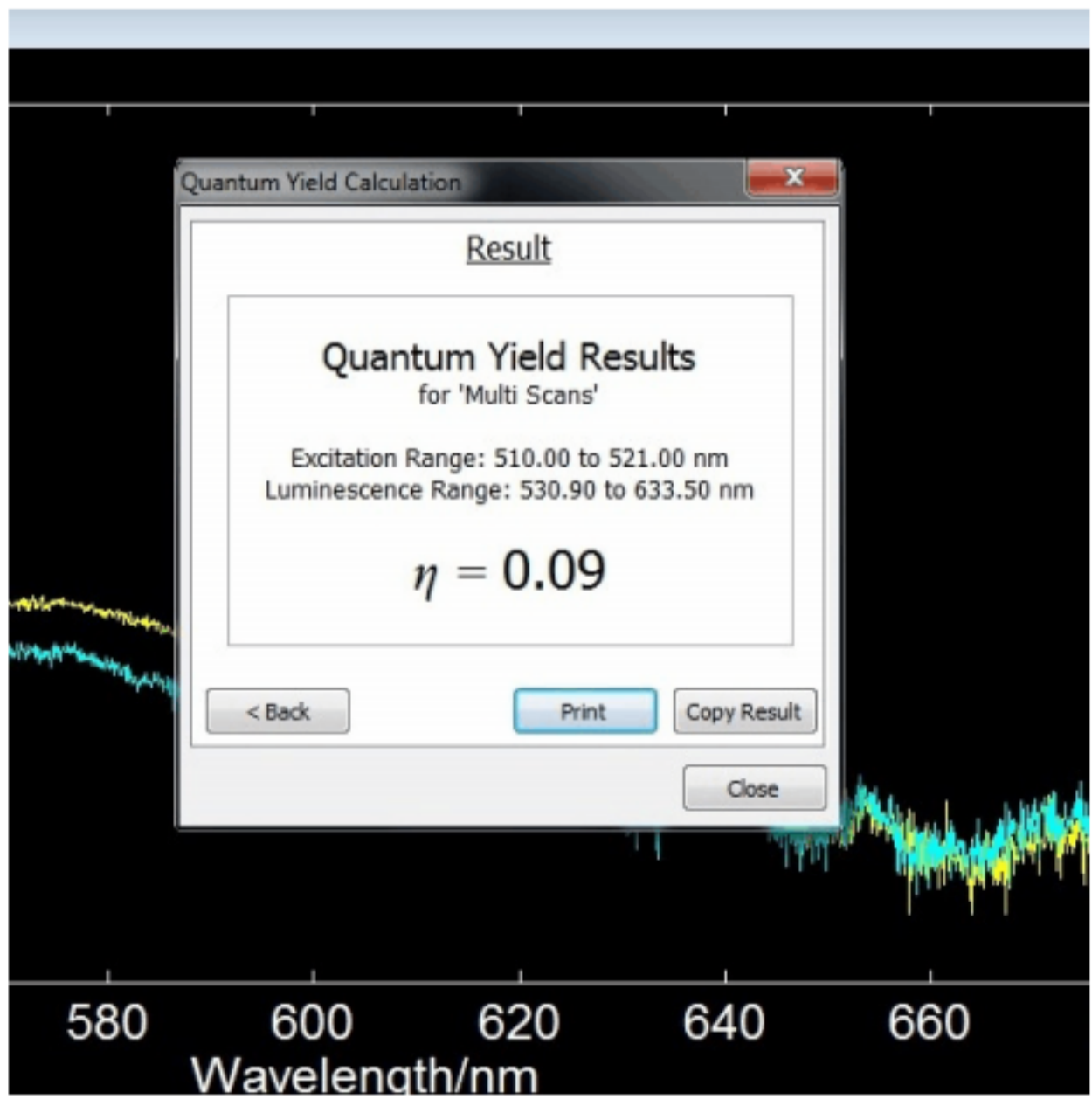


设置发射波长扫描范围，注意发射波长起始值要小于激发波长发射峰波长，测量空白液的发射光谱保存为 BLANK
3 取走空白液放入样品其他条件不变测量样品的发射光谱保存为
4 在软件菜单中选择 Quantum Yield 如下图

10-20nm，终止值大于样品的
SAMPLE



Sample Emission 选择保存的 sample , sample scatter 选择保存的文件 sample , ref.scatter 选择保存的文件 Blank , ref.emission 选择保存的文件 blank 接着按 NEXT 选择散射和发射光范围, 计算出量子产率



七关机程序

1. 退出 F980 程序和关闭计算机；
2. 关闭所有硬件电源开关及相关设备电源。

天美（中国）科学仪器有限公司

王贵平