

9-1 荧光测量

——典型配置与硬件说明

当某些波长的紫外光或波长较短的可见光照射到某些物质时，其分子吸收特定频率的光子后被激发，激发态分子返回基态时会发出波长更长的荧光。荧光测量是海洋光学光谱仪的一项重要应用。

【典型系统配置】

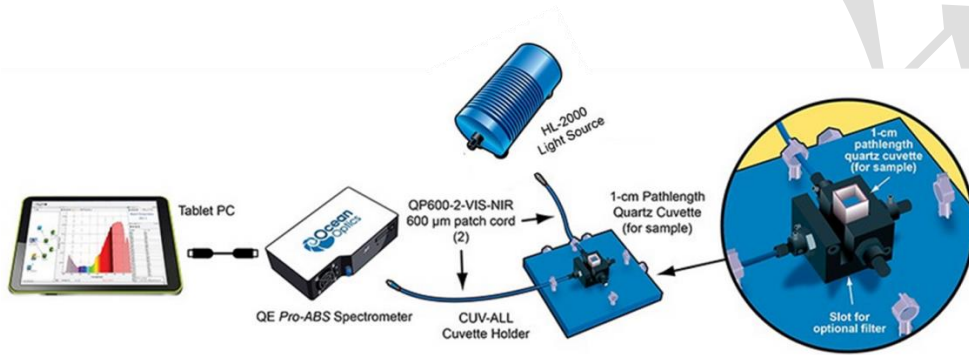


图 1 荧光测量系统配置图

上图为典型的荧光测量系统配置，包括：光谱仪操作软件、光谱仪、计算机、光源、光纤、比色皿和支架。比色皿支架采用四通道的 CUV-ALL-UV 型，该支架既可以用来测吸光度，又可以用来测量荧光。为客户只需要将光纤和比色皿支架的连接位置进行更改，即可实现两种不同的测量。吸光度测量时，在 180°位置的两个通道中使用 74-UV 准直镜，通过 SMA 905 接口连接两根光纤；而荧光测量时，在 90°位置的两个通道中使用 74-UV 准直镜，此外，荧光的光纤接收端的对面位置还可以添加 74-MSP 反射镜，从而增强接收到的荧光信号。

表 1 典型配置清单

		紫外/可见光波段	近红外波段
光谱仪		Flame 系列, HR/Maya 系列, QE Pro,	NIRQUEST, Flame-S-VIS-NIR
软件		Oceanview 1.6.3	
光源		HL -2000 系列, LLS 系列, 激光器	
采样附件	比色皿	CFV 系列荧光比色皿, 石英比色皿（请勿选用有毛玻璃面的石英比色皿），一次性比色皿 CVD-UV 或 CVD-VIS	
	比色皿支架	CUV-ALL-UV 4-WAY, CUV-FL-DA, CUV-QPOD	
	其他	74-MSP 反射镜, 74-UV 准直镜, INTSMA-200 可更换狭缝, LVF-KIT 滤光片套件	
光纤		QP400-2-VIS-NIR 或 QP600-2-VIS-NIR（两根）	

【HL -2000 光源介绍】

HL-2000 卤钨光源是一种多用途光源，使用范围 VIS-NIR (360 nm-2000 nm)。该光源内置致冷风扇，可以保证光源的稳定性。HL-2000 卤钨光源配有内嵌滤光片凹槽，凹槽的尺寸为 25.4 mm² 或 50.8 mm²，厚度为 3mm。其中，HL-2000-FHSA 型号有手动和 TTL 快门，可用于控制光源的强弱。

光源的基本操作步骤：

- 启动光源，预热 10 分钟，以达到稳定状态；
- 光纤与光源连接后，可通过转动调节光阑旋钮控制光强；
- 如果用户在实验操作中对光源的输出光谱有特殊要求，可在插片凹槽处放置滤光

片、衰减片等光学器件。

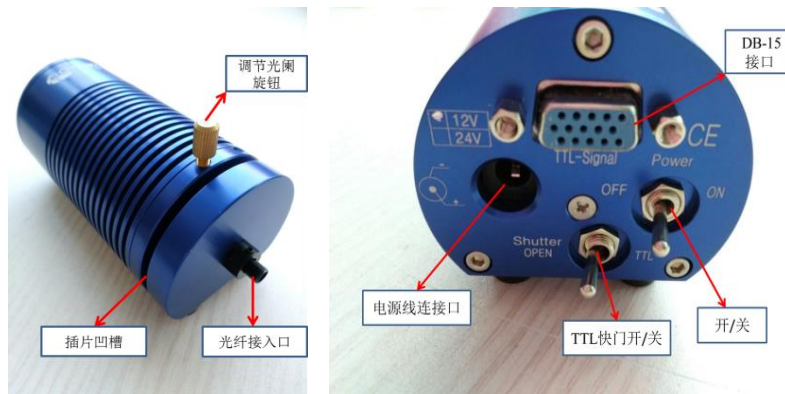


图 2 HL-2000-FHSA 光源实物图

【LLS 系列光源介绍】

对于荧光光谱检测应用来说，LLS 系列光源堪称理想之选，该系列具有创新性的光学设计，能实现光纤的高效耦合。LED 控制模块内含一个三向开关，用于光源调节（分别为连续、关闭及触发模式），可提供连续和脉冲两种模式。LLS LED 提供近 50 种波长选项。下面是部分型号列表。LLS LED 的模块化设计非常适用于 OEM 集成。荧光测量时，若您已知样本的激发波长范围和所需激发功率，可直接选择对应 LLS LED 使用。

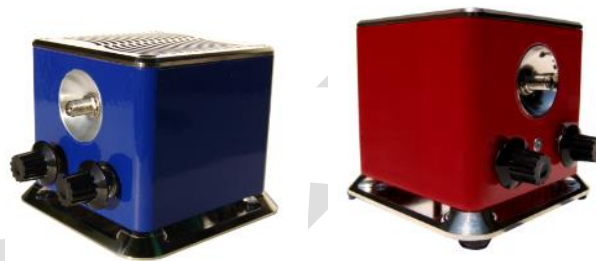


图 3 LLS 系列光源

型号	CWL	FWHM	耦合到 600 微米、0.22NA 光纤中的最小功率	最大驱动电流（连续模式）	最大驱动电流（脉冲模式）	最大占空比（脉冲模式）
LLS-365	365 nm	9 nm	1 mW	500 mA	1000 mA	50%
LLS-385	385 nm	10 nm	1 mW	500 mA	1000 mA	50%
LLS-405	405 nm	14 nm	750 μ W	500 mA	1000 mA	50%

表 2
系光
规

LLS-455	455 nm	20 nm	1 mW	1500 mA	3000 mA	50%
LLS-470	470 nm	25 nm	1 mW	1500 mA	3000 mA	50%
LLS-505	505 nm	30 nm	1 mW	1500 mA	3000 mA	50%
LLS-530	530 nm	35 nm	750 μ W	1500 mA	3000 mA	50%
LLS-590	590 nm	14 nm	750 μ W	700 mA	1400 mA	50%
LLS-617	617 nm	20 nm	750 μ W	700 mA	1400 mA	50%
LLS-627	627 nm	20 nm	750 μ W	700 mA	1400 mA	50%
LLS-暖白	VIS 3000K CCT	NA	1 mW	1500 mA	3000 mA	50%
LLS-中性白	VIS 4100K CCT	NA	1 mW	1500 mA	3000 mA	50%
LLS-冷白	VIS 6500K CCT	NA	1 mW	1500 mA	3000 mA	50%

LLS
列源
格

【比色皿介绍】

海洋光学提供用于吸光度、透射率和荧光测量的各类比色皿。其中，石英比色皿适用于 170-2700nm 的范围，与酸性溶液的兼容性好，并且可以牢固的固定在支架上。经过适当的护理和保养，石英比色皿在无划痕、裂纹和类似缺陷的情况下，可进行有效再利用。同时，海洋光学也提供一次性比色皿，例如塑料材质的 CVD-UV 和 CVD-VIS。CVD-UV 比色皿的适用范围为 220-900nm，而 CVD-VIS 比色皿的适用范围为 350-900nm。这两种型号的比色皿光程长 1cm。一次性比色皿不能二次使用，可避免交叉污染的风险。一次性比色皿具有较高的化学稳定性，它既能应用在强酸环境也能用在强碱环境中。

CFV 系列是对微量样品进行荧光分析、紫外透光的一次性微型荧光比色皿，容积为 50 μ L，能透过 220nm 的紫外线。CFV 系列适合多种荧光应用，比如对化学与生物制剂实时监测，高灵敏的双链 DNA 定量（dsDNA）分析和酶联免疫吸附测定（ELISA）化验研究。



图 4 一次性比色皿

图 5 石英比色皿

图 6 CFV 系列荧光比色皿

【比色皿支架介绍】

CUV-ALL-UV 4-WAY 比色皿支架适用于 1cm 光程的比色皿，配有四个石英准直透镜，每个准直透镜上配备 SMA 光纤连接器；支架内置滤光片插槽，可在荧光测量中使用滤光片；此外，比色皿支架的底部有连通恒温水源的内置管道。当与海洋光学的光谱仪和光源配套使用时，CUV-ALL-UV 4-WAY 能够用于吸光度、荧光、散射等光学性能的测量。此外，海洋光学还提供可直连光源型 CUV-FL-DA 和可控温型 CUV-QPOD 等特殊比色皿支架。

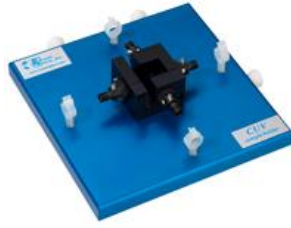


图 7 CUV-ALL-UV 4-WAY 比色皿支架 图 8 CUV-FL-DA 直连比色皿支架



图 9 CUV-QPOD 可控温比色皿支架

下面我们以常用的 CUV-ALL-UV 4-WAY 比色皿支架为例，介绍比色皿支架的使用方法。

- 将比色皿放置在 CUV-ALL-UV 4-WAY 比色皿支架的夹具中，支架内配有可调弹簧活塞，用来固定比色皿。比色皿支架有一个内置的滤光片插槽，我们将连接光源的光纤引入靠近插槽一侧的连接口。可将滤光片放置于插槽中，进行荧光测量。
- 两根光纤连接比色皿支架时，若两端呈现 90°，则用于测量样品的荧光；若两端呈 180°，则用于测量样品的吸光度。可根据具体要求连接光纤与比色皿支架。
- 比色皿支架的底部有隐藏管道，可连接外部水源，以控制比色皿内样品温度。如下面实物图所示，支架底座可见 3 个出/入水口，出/入水口前的白色旋钮可拆卸，使用时请根据需求卸下。将通道口连接附件，附件的另一侧连接水管，用户可选择两进一出或两出一进模式。需要注意的是，用户需要将出水口管道一侧接入水泵。

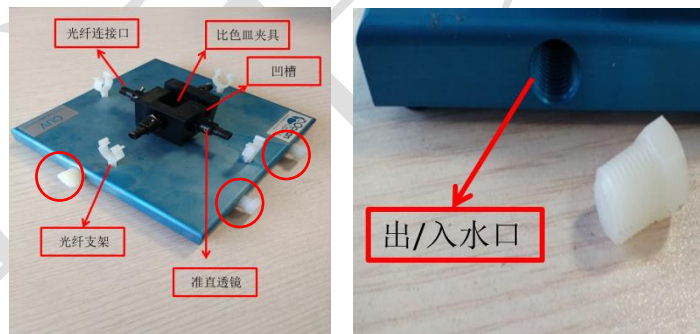


图 10 CUV-ALL-UV 4-WAY 比色皿支架实物图



图 11 连接附件

【LVF 系列滤光片介绍】

在荧光测量中，LVF 系列线性可调滤光片可用于从宽频激发光源中过滤出窄频光。相

比于传统荧光滤光方法，LVF 系列产品降低了实验成本。

LVF 系列包括 LVF-H（高通）和 LVF-L（低通）单滤光片，以及 LVF-HH（高通）、LVF-LL（低通）和 LVF-HL（可调带通）双滤光片。双高通、双低通滤光片是由相同尺寸的 LVF-H 或者 LVF-L 滤光片组成，滤波波长完全对齐，然后用环氧树脂粘合在滑动载体上。与单滤光片相比，双滤光片具有优秀的滤波功能，阻光率达到 99.96%。可调带通滤光片，是将一个高通滤光片和一个低通滤光片组合在一起的滤光片，您可调节中心波长和带宽。预置的通光带宽为 25nm（FWHM），使用时，首先拧松 4 个固定螺丝，即可滑动滤光片，通过观察 Oceanview 软件中光谱的变化，调节到合适的荧光激发波长。



图 12 LVF 系列滤光片



图 13 LVF-UV-HL 滤光片

表 3 LVF 系列滤光片规格

工程规格	线性可变滤光片
滤光片尺寸	57mm x 10mm
滤光片材料	石英芯片上的干涉膜
滤光片类型	高通，低通和可变带通
滤光范围	300-750nm（LVF 系列），230-500nm（LVF-UV 系列）
单滤光片透过率	~90%
单滤光片阻光率	~98.8%
双滤光片透过率	~80%
通光带宽（可调带通滤光片）	预置为 25nm；可通过滑动滤光片进行调节

【荧光测量硬件操作】

搭建荧光测量系统，具体操作步骤如下：

1. 使用一根光纤连接比色皿支架与光谱仪，另一根光纤连接比色皿支架与光源，注意两端光纤呈 90°（如下图所示）。
2. 连接光谱仪的电源，并通过数据线与 PC 端相连；
3. 用电源线连接光源和市电插座（注意选择带地线的国标电源线和市电插座）；
4. 打开光源，预热一段时间后，在空比色皿中装入样品；
5. 切断光路（此处不建议直接关闭光源，可通过遮挡光源来切断光路），测量背景光谱；
6. 恢复光路，进行样品的荧光测量。

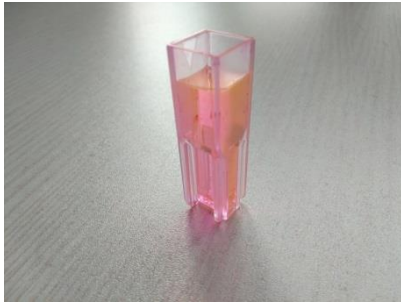


图 14 装有样品的比色皿



图 15 CUV-ALL-UV 4-WAY 比色皿支架

说明：为了确定样品的激发波长，我们可以先对样品进行吸光度测量。如果获得了未知荧光样品的吸光度光谱，我们就能判断该物质的激发波长的大概范围，通过实验可判断该物质产生荧光最有效的激发波长，再去选择合适的激发波长。推荐使用 HL-2000 光源与可带通滤光片 LVF-HL 或 LVF-UV-HL 来确定激发波长。

注意：荧光测量时，遮光罩应始终放置在样品上方，排除环境光的干扰。

【荧光测量光谱仪的选择】

客户进行荧光测量实验时，可以根据自身的需求选择不同的光谱仪。在海洋光学提供的多种光谱仪中，高灵敏度的 QE Pro 和 Maya2000 Pro 都是不错的选择，也可以选用 Flame 系列光谱仪。这三种光谱仪均可更换狭缝，由于荧光是比较弱的发射光，可根据实际样品，选择使用更大的狭缝。需要注意的是，较大的狭缝可提高荧光测量的灵敏度，但会降低荧光光谱的分辨率。

QE Pro 采用了低噪音的电子部分与 18 位 A/D 转换器，QE Pro 的动态范围是常见的薄型背照式 CCD 阵列微型光谱仪的 2 倍，同时其灵敏度也提高了 2 倍。这些优势使得吸光度或荧光检测的检出限更低，并可以在更宽的浓度范围内进行检测。Maya2000 Pro 光谱仪也配置有薄型背照式 CCD 阵列探测器，具有较高的灵敏度，支持宽量程，且具有低噪声电路、低抖动触发等优势。



图 16 QE Pro 光谱仪



图 17 Maya2000Pro 光谱仪



图 18 Flame 光谱仪

蔚海光学