

## 9-1 螢光測量

### ——典型配置與硬體說明

當某些波長的紫外光或波長較短的可見光照射到某些物質時，其分子吸收特定頻率的光子後被激發，激發態分子返回基態時會發出波長更長的螢光。螢光測量是海洋光學光譜儀的一項重要應用。

#### 【典型系統組態】

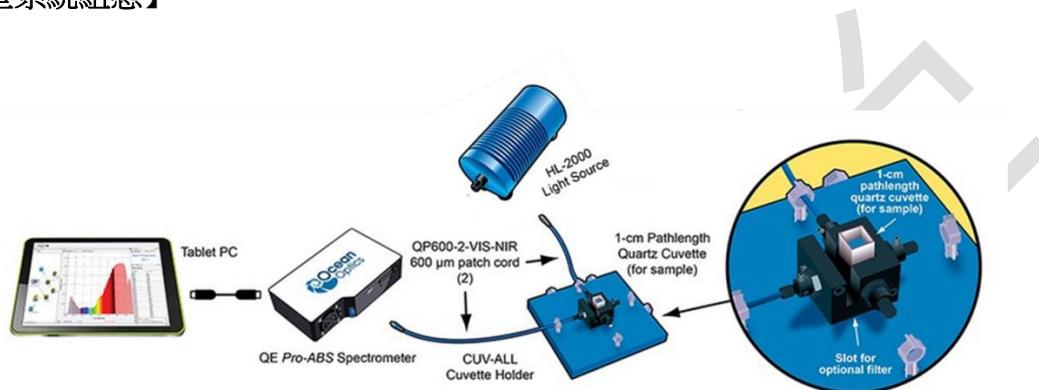


圖 1 螢光測量系統組態圖

上圖為典型的螢光測量系統組態，包括：光譜儀操作軟體、光譜儀、電腦、光源、光纖、比色皿和支架。比色皿支架採用四通道的 CUV-ALL-UV 型，該支架既可以用來測吸光度，又可以用來測量螢光。為客戶只需要將光纖和比色皿支架的連接位置進行更改，即可實現兩種不同的測量。吸光度測量時，在 180°位置的兩個通道中使用 74-UV 准直鏡，通過 SMA 905 介面連接兩根光纖；而螢光測量時，在 90°位置的兩個通道中使用 74-UV 准直鏡，此外，螢光的光纖接收端的對面位置還可以添加 74-MSP 反射鏡，從而增強接收到的螢光信號。

表 1 典型配置清單

		紫外/可見光波段	近紅外波段
光譜儀		Flame 系列，HR/Maya 系列，QE Pro.	NIRQUEST，Flame-S-VIS-NIR
軟體		Oceanview 1.6.3	
光源		LLS 系列，雷射器	
採樣附件	比色皿	CFV 系列螢光比色皿，石英比色皿（請勿選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 反射鏡，74-UV 准直鏡，INTSMA-200 可更換狹縫，LVF-KIT 濾光片套件	
光纖		QP400-2-VIS-NIR 或 QP600-2-VIS-NIR（兩根）	

### 【LLS 系列光源介紹】

對於螢光光譜檢測應用來說，LLS 系列光源堪稱理想之選，該系列具有創新性的光學設計，能實現光纖的高效耦合。LED 控制模組內含一個三向開關，用於光源調節（分別為連續、關閉及觸發模式），可提供連續和脈衝兩種模式。LLS LED 提供近 50 種波長選項。下面是部分型號清單。LLS LED 的模組化設計非常適用於 OEM 集成。螢光測量時，若您已知樣本的激發波長範圍和所需激發功率，可直接選擇對應 LLS LED 使用。



圖 3 LLS 系列光源

表 2 LLS 系列光源規格

型號	CWL	FWHM	耦合到 600 微米、0.22NA 光纖中的最小功率	最大驅動電流（連續模式）	最大驅動電流（脈衝模式）	最大占空比（脈衝模式）
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 $\mu$ W	500 mA	1000 mA	50%
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 $\mu$ W	1500 mA	3000 mA	50%
LLS-590	590 nm	14 nm	750 $\mu$ W	700 mA	1400 mA	50%
LLS-617	617 nm	20 nm	750 $\mu$ W	700 mA	1400 mA	50%
LLS-627	627 nm	20 nm	750 $\mu$ 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%

### 【比色皿介紹】

海洋光學提供用於吸光度、透射率和螢光測量的各類比色皿。其中，石英比色皿適用於 170-2700nm 的範圍，與酸性溶液的相容性好，並且可以牢固的固定在支架上。經過適當的護理和保養，石英比色皿在無劃痕、裂紋和類似缺陷的情況下，可進行有效再利用。同時，海洋光學也提供一次性比色皿，例如塑膠材質的 CVD-UV 和 CVD-VIS。CVD-UV 比色皿的適用範圍為 220-900nm，而 CVD-VIS 比色皿的適用範圍為 350-900nm。這兩種型號的比色皿光程長 1cm。一次性比色皿不能二次使用，可避免交叉污染的風險。一次性比色皿具有較高的化學穩定性，它既能應用在強酸環境也能用在強鹼環境中。

CFV 系列是對微量樣品進行螢光分析、紫外透光的一次性微型螢光比色皿，容積為 50 $\mu$ L，能透過 220nm 的紫外線。CFV 系列適合多種螢光應用，比如對化學與生物製劑即時監測，高靈敏的雙鏈 DNA 定量（dsDNA）分析和酶聯免疫吸附測定（ELISA）化驗研究。



圖 4 一次性比色皿

圖 5 石英比色皿

圖 6 CFV 系列螢光比色皿

### 【比色皿支架介紹】

CUV-ALL-UV 4-WAY 比色皿支架適用於 1cm 光程的比色皿，配有四個石英准直透鏡，每個准直透鏡上配備 SMA 光纖連接器；支架內置濾光片插槽，可在螢光測量中使用濾光片；此外，比色皿支架的底部有連通恒溫水源的內置管道。當與海洋光學的光譜儀和光源配套使用時，CUV-ALL-UV 4-WAY 能夠用於吸光度、螢光、散射等光學性能的測量。此外，海洋光學還提供可直連光源型 CUV-FL-DA 和可控溫型 CUV-QPOD 等特殊比色皿支架。



圖 7 CUV-ALL-UV 4-WAY 比色皿支架



圖 8 CUV-FL-DA 直連比色皿支架



圖 9 CUV-QPOD 可控溫比色皿支架

下面我們以常用的 CUV-ALL-UV 4-WAY 比色皿支架為例，介紹比色皿支架的使用方法。

- 將比色皿放置在 CUV-ALL-UV 4-WAY 比色皿支架的夾具中，支架內配有可調彈簧活塞，用來固定比色皿。比色皿支架有一個內置的濾光片插槽，我們將連接光源的光纖引入靠近插槽一側的連介面。可將濾光片放置於插槽中，進行螢光測量。
- 兩根光纖連接比色皿支架時，若兩端呈現 90°，則用於測量樣品的螢光；若兩端呈 180°，則用於測量樣品的吸光度。可根據具體要求連接光纖與比色皿支架。
- 比色皿支架的底部有隱藏管道，可連接外部水源，以控制比色皿內樣品溫度。如下圖

實物圖所示，支架底座可見 3 個出/入水口，出/入水口前的白色旋鈕可拆卸，使用時請根據需求卸下。將通道口連接附件，附件的另一側連接水管，用戶可選擇兩進一出或兩出一進模式。需要注意的是，使用者需要將將出水口管道一側接入水泵。

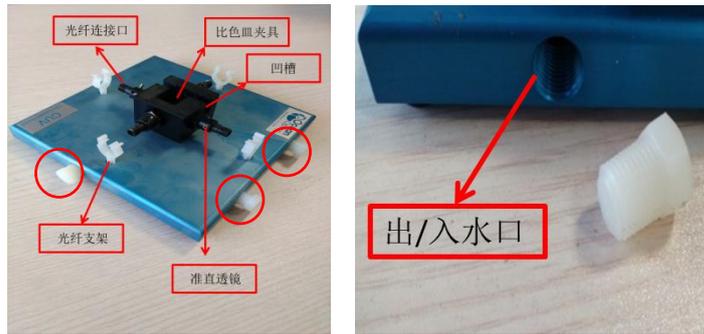


圖 10 CUV-ALL-UV 4-WAY 比色皿支架實物圖



圖 11 連接附件

### 【LVF 系列濾光片介紹】

在螢光測量中，LVF 系列線性可調濾光片可用於從寬頻激發光源中過濾出窄頻光。相比于傳統螢光濾光方法，LVF 系列產品降低了實驗成本。

LVF 系列包括 LVF-H（高通）和 LVF-L（低通）單濾光片，以及 LVF-HH（高通）、LVF-LL（低通）和 LVF-HL（可調帶通）雙濾光片。雙高通、雙低通濾光片是由相同尺寸的 LVF-H 或者 LVF-L 濾光片組成，濾波波長完全對齊，然後用環氧樹脂粘合在滑動載體上。與單濾光片相比，雙濾光片具有優秀的濾波功能，阻光率達到 99.96%。可調帶通濾光片，是將一個高通濾光片和一個低通濾光片組合在一起的濾光片，您可調節中心波長和頻寬。預置的通光頻寬為 25nm（FWHM），使用時，首先擰松 4 個固定螺絲，即可滑動濾光片，通過觀察 Oceanview 軟體中光譜的變化，調節到合適的螢光激發波長。



圖 12 LVF 系列濾光片



圖 13 LVF-UV-HL 濾光片

表 3 LVF 系列濾光片規格

工程規格	線性可變濾光片
濾光片尺寸	57mm x 10mm
濾光片材料	石英晶片上的干涉膜
濾光片類型	高通，低通和可變帶通
濾光範圍	300-750nm (LVF 系列)，230-500nm (LVF-UV 系列)
單濾光片透過率	~90%
單濾光片阻光率	~98.8%
雙濾光片透過率	~80%
通光頻寬（可調帶通濾光片）	預置為 25nm；可通過滑動濾光片進行調節

### 【螢光測量硬體操作】

搭建螢光測量系統，具體操作步驟如下：

1. 使用一根光纖連接比色皿支架與光譜儀，另一根光纖連接比色皿支架與光源，注意兩端光纖呈 90°（如下圖所示）。
2. 連接光譜儀的電源，並通過資料線與 PC 端相連；
3. 用電源線連接光源和市電插座（注意選擇帶地線的國標電源線和市電插座）；
4. 打開光源，預熱一段時間後，在空比色皿中裝入樣品；
5. 切斷光路（此處不建議直接關閉光源，可通過遮擋光源來切斷光路），測量背景光譜；
6. 恢復光路，進行樣品的螢光測量。



圖 14 裝有樣品的比色皿



圖 15 CUV-ALL-UV 4-WAY 比色皿支架

說明：為了確定樣品的激發波長，我們可以先對樣品進行吸光度測量。如果獲得了未知螢光樣品的吸光度光譜，我們就能判斷該物質的激發波長的大概範圍，通過實驗可判斷該物質產生螢光最有效的激發波長，再去選擇合適的激發波長。推薦使用 HL-2000 光源與可調帶通濾光片 LVF-HL 或 LVF-UV-HL 來確定激發波長。

注意：螢光測量時，遮光罩應始終放置在樣品上方，排除環境光的干擾。

### 【螢光測量光譜儀的選擇】

客戶進行螢光測量實驗時，可以根據自身的需求選擇不同的光譜儀。在海洋光學提供的多種光譜儀中，高靈敏度的 QE Pro 和 Maya2000 Pro 都是不錯的選擇，也可以選用 Flame 系列光譜儀。這三種光譜儀均可更換狹縫，由於螢光是比較弱的發射光，可根據實際樣品，選擇使用更大的狹縫。需要注意的是，較大的狹縫可提高螢光測量的靈敏度，但會降低螢光光譜的解析度。

QE Pro 採用了低噪音的電子部分與 18 位 A/D 轉換器，QE Pro 的動態範圍是常見的薄型背照式 CCD 陣列微型光譜儀的 2 倍，同時其靈敏度也提高了 2 倍。這些優勢使得吸光度或螢光檢測的檢出限更低，並可以在更寬的濃度範圍內進行檢測。Maya2000 Pro 光譜儀也

配置有薄型背照式 CCD 陣列探測器，具有較高的靈敏度，支援寬量程，且具有低雜訊電路、低抖動觸發等優勢。



圖 16 QE Pro 光譜儀



圖 17 Maya2000Pro 光譜儀



圖 18 Flame 光譜儀