

什么是荧光

荧光是物质吸收光照或者其他电磁辐射后发出的光。光照射到某些原子时，光的能量使原子核周围的一些电子由原来的轨道跃迁到了能量更高的轨道，即从基态跃迁到第一激发单线态或第二激发单线态等。第一激发单线态或第二激发单线态等是不稳定的，所以会恢复基态，当电子由第一激发单线态恢复到基态时，能量会以光的形式释放，所以产生荧光。

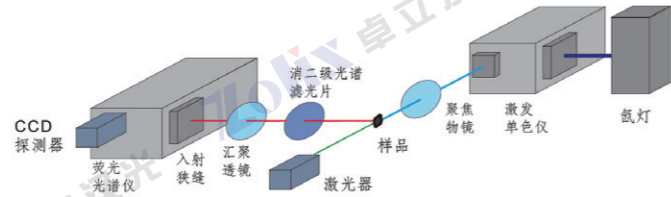
大多数情况下，发光波长比吸收波长较长，能量更低，而且一旦停止入射光，发光现象也随之立即消失。

荧光光谱包括激发谱和发射谱两种。激发谱是荧光物质在不同波长的激发光作用下测得的某一波长处的荧光强度的变化情况，也就是不同波长的激发光的相对效率；发射谱则是某一固定波长的激发光作用下荧光强度在不同波长处的分布情况，也就是荧光中不同波长的光成分的相对强度。一般来说，激发光谱与紫外-可见吸收光谱的形状是一致的，且与荧光光谱具有镜像关系。但是如果物质的三重态量子产率比较高，那么它被激发后系间穿越的几率很大，荧光激发谱的形状会受到影响，导致与紫外吸收光谱的形状不完全一致。

典型荧光光谱系统架构

典型拉曼光谱系统由如下几个部分构成：

- 激发光源。通常采用氙灯配合单色仪选择激发波长，或者采用激光器。
- 外光路。包含聚焦、汇聚、滤光等多个功能元件以及样品调节装置。
- 荧光光谱仪。通常采用高通光效率、高分辨率光谱仪，推荐采用影像校正光谱仪，可以进一步提升系统的检测性能。
- 探测器。通常采用CCD探测器或高灵敏度的PMT（配合光子计数器、锁相放大器等高灵敏电子学设备）。
- 数据处理单元。包括计算机和软件。



荧光光谱仪的信噪比

荧光光谱仪的探测性能通常采用纯水的拉曼信噪比来进行表征。因为纯水是一种非常容易获取的标准物质，所以测量纯水的拉曼信噪比是不同的荧光光谱仪之间灵敏度比较的一个很好的方式。测量的基本方法是，纯水的拉曼信号（信号最大值，397nm 处，激发波长 350nm）和系统噪声（该位置不存在信号，通常取值 450nm 处）同时获取，并取比值计算。

荧光光谱仪的信噪比通常有两种算法，：

算法一（Peak-Peak）：水拉曼峰信号和背景信号的差值和背景信号平方根的比值。计算公式为：

$$S/N = (S_{397nm} - S_{450nm}) / \sqrt{S_{450nm}}$$

算法二（RMS）：把峰信号和背景信号的差值除以在背景信号上噪音的有效值（该有效值的取值为该点处的动态扫描测量值除以 5）。计算公式为：

$$S/N = (S_{397nm} - S_{450nm}) / (S_{Noise}/5)$$

对于卓立汉光公司的荧光光谱仪相关产品的信噪比评价标准，采用的是第一种算法。我们认为第一种方法是更为科学的。这是因为第二种方法在算法中对于噪音的取值，仅仅只考虑了光电探测器本身的噪声和电路系统的噪声，却没有考虑实际使用时的系统的整体光学性能带来的噪声影响。而第一种方法中采用整个系统的背景强度来计算噪声，因此对于光谱系统性能的评估更为真实。

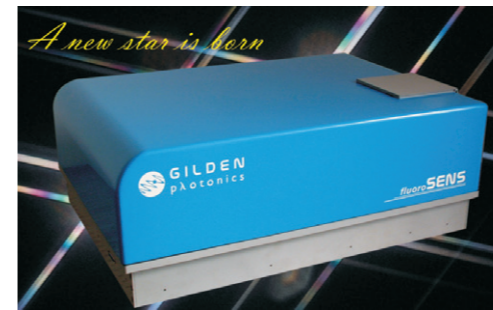
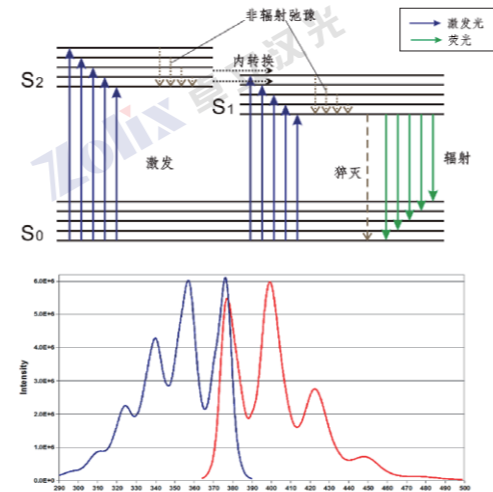
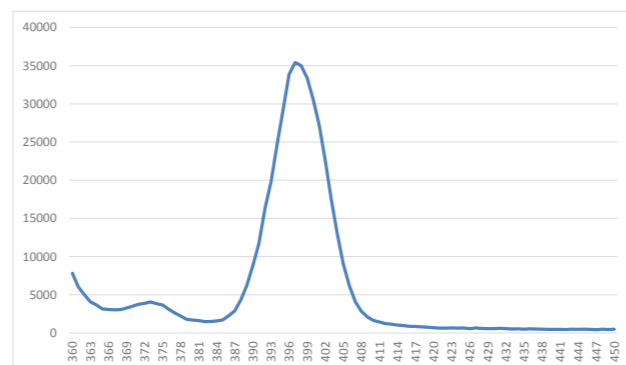
这里我们分别选用卓立汉光的 OmniFluo 组合式荧光光谱系统的实测数据来比较这两种算法的差异性。

测试条件如下（测试样品为某品牌纯净水）：

- 激发波长350nm，带宽：5nm
- 发射波长360-450nm，带宽：5nm
- 扫描步距：1nm
- 积分时间：1s
- 数据点没有经过平滑处理
- 标准室温敏PMT（200-870nm）
- 数据采集器为公司自行研制生产的单光子计数器

OmniFluo组合式荧光测试结果可提供以下数据：

- 纯水拉曼峰值信号（397nm）=35,403
- 算法一的背景值（@450nm）=487，则噪声为(487)/1/2=22.07
- 算法二采用动态扫描测得的背景值（@450nm）为65.38，则RMS噪声56.65/5=11.33。
- 第一种算法得到水的拉曼S/N 值为：(35,403-487)/ 22.07= 1582；
- 第二种算法给出的水拉曼S/N 值为：(35,403-487)/ 11.33= 3081。



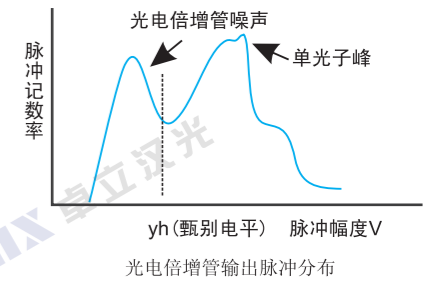
模块化设计，计算机自动控制的高灵敏度稳态荧光光谱仪，通过采用专门设计优化的“单光子计数技术”，fluoroSENS 具备了对“单光子级”极微弱荧光信号的捕捉和分析；水拉曼测试达到 3000:1。fluoroSENS 更可以实现从紫外光至近红外波段的光谱覆盖范围，能够满足包括物理，化学，生物学，医学，半导体，环境学等各种科研及工业应用要求。

应用领域举例：

- 生物化学:细胞毒性，离子浓度定量分析，细胞增殖，DNA定量，化学定量分析等。
- 环境监测:各种微量药物残留检测，水质评测，食品安全监管，污染物分析等。
- 药物开发及药理学:常规药物分析，蛋白质新药研发，生物体系中的药物作用机理，喹诺酮类药物，毒品检测，高通量筛选等。
- 食品科学与农业:食品保质期评估，细菌生长测量，杀虫剂分析，食品质量控制等。

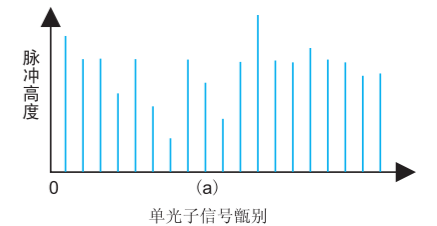
挑战灵敏度极限--“单光子计数技术”

“单光子计数技术”是利用在弱光下光电倍增管输出信号自然离散化的特点，采用精密的脉冲幅度甄别技术和数字计数技术，可把淹没在背景噪声中的弱光信号提取出来。当弱光照射到光电倍增管阴极时，每个入射光子以一定的概率（即量子效率）使光阴极发射一个电子。这个光电子经倍增系统的倍增最后在阳极回路中形成一个电流脉冲，通过负载电阻形成一个电压脉冲，这个脉冲称为单光子脉冲，而“单光子计数技术”可测得低至单个不重叠的光子能量脉冲，通过精密的鉴别手段进行工作，从而实现探测“单光子”级别微弱信号的目的。



系统灵敏度

“单光子计数”技术是应用于超低光辐射条件下测量的特有技术，提供了峰值计数速率超过 100M cps，标准条件下水拉曼信噪比达到 3000: 1 的测试结果。相对常规荧光光谱仪，灵敏度提高了 10-100 倍，更有利于微量样品的检测，可以检出低至 1×10^{-15} mol/L 浓度的荧光素。仪器的高灵敏度为各种普通荧光及微弱荧光信号检测提供了可靠保障。



光谱范围

激发光源采用 150W 大功率氙灯，提供紫外至近红外的高效激发能量。

荧光检测采用高灵敏度的“单光子计数”技术，检测范围 185nm-900nm。

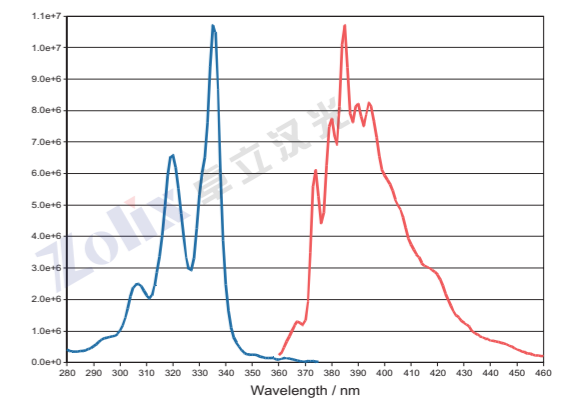
杂散光

对于实验样品尤其是微量样品测试，杂散光抑制是影响信噪比的至关重要的因素。fluoroSENS 的光路及结构设计，极大的降低了杂散光对信号的干扰，可达到 10^{-5} 杂散光抑制比。

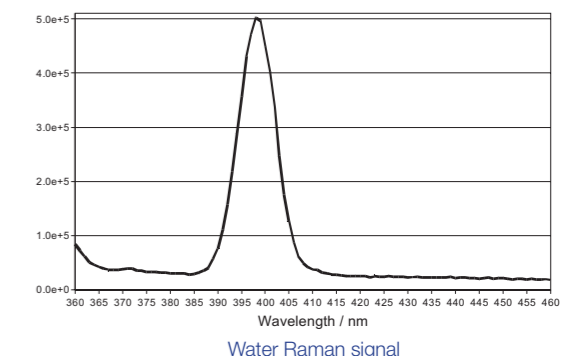
光谱校正

未经校正的光谱图由于光源及光路系统等各项因素干扰，会造成难以预测的谱线失真，进而影响最终的光谱结论。fluoroSENS 使用内置标准探测器模块以及出厂测试的校正数据，为整个系统提供光谱校正支持。

fluoroSENS 激发谱仪 (Ex) 包含了标准参考探测器，在每次测量时均经过标准参考探测器校正，保证 150 瓦氙灯在各个波长激发能量的一致性；fluoroSENS 中发射谱仪 (Em) 在出厂时都经过标准光源修正光谱响应度，将发射谱的光学部件与探测器的光谱响应度借由标准光源作修正得到绝对的系统光谱响应度曲线，荧光谱在各波长的强度具有可比性，提供更详实的图谱数据，作正确的分析。右图是去除了氙灯所造成的光谱信号影响，经过 fluoroSENS 稳态荧光光谱仪测得的荧光谱线。



Pyrene in Cyclohexane, 10^{-5} M, degassed



Water Raman signal

强化的软件功能

专门设计的高级软件包配合 fluoroSENS 使用，为用户提供对硬件的完整控制、多种测量方案选择、数学算法处理等多项强大功能。

光谱解析度与激发能量控制

fluoroSENS 激发光源与荧光检测各采用一套 300mm 焦长的高分辨率单色仪。激发光源可通过自动光阑灵活调整 5%-100% 的光通量，激发波长最小带宽可达 0.1nm；荧光检测可分辨 0.1nm 荧光峰的精细结构。

定量测量应用

fluoroSENS 内置标准探测器，可以自动同步完成对激发光源能量的归一化测量，实现样品的定量化测量。

软件界面

SENScan 软件以数据为中心设计，用户只需关注实验操作，软件将协助完成大部分数据采集与分析工作。

控制特性

- 激发及发射波长自由选择
- 动力学测量
- 最多可安装3块光栅
- 自定义光谱扫描范围
- 不同谱图的连接、分割、选取等
- 探测器积分时间可控
- 实时光谱校正
- 自动样品台控制
- 连续可调激发光阑
- 可加装内置式快门，减少样品荧光损害
- 吸收光谱测量(需购另外硬件)
- 磷光寿命测量50ms-10s(需购另外硬件)

数据处理及显示

- 数学算法 (+、-、×、/)
- 标准化处理
- 基线扣除
- 曲线微分计算
- 光谱积分运算
- 多种滤波运算方法
- 单点及多点峰值搜索
- 2D、3D、轮廓线等显示方式
- 定义扩展扫描方式

测量模式

- 信号比率
- 激发光谱扫描
- 发射光谱扫描
- 同步光谱扫描
- 偏振激发谱扫描

激发及发射光谱扫描

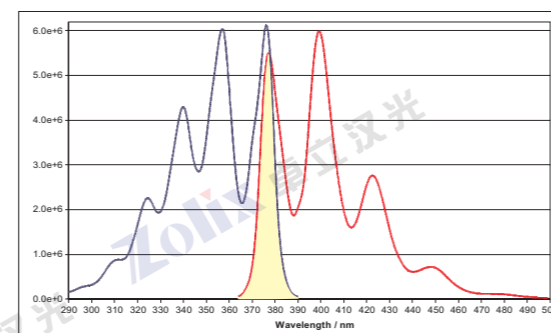
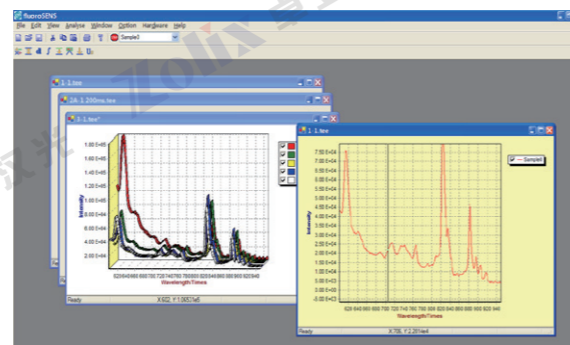
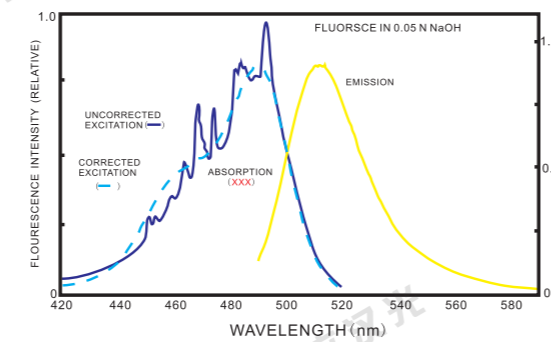
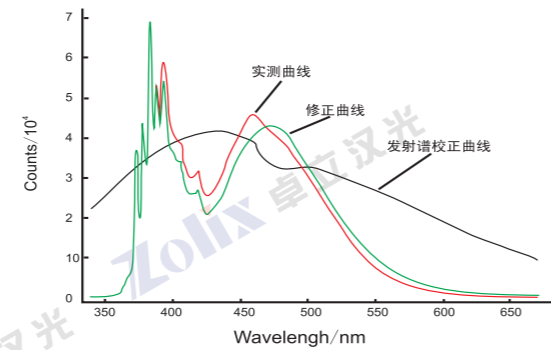
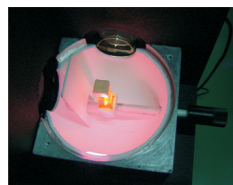
只需给出激发光或发射光扫描范围，fluoroSENS 就可以自动采集荧光激发或发射光谱图。

同步光谱测量 (Synchronous Scan) (图一)

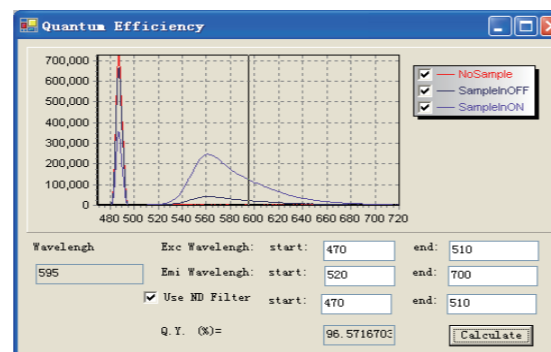
在同步光谱测量中，激发单色仪及发射单色仪以用户预先设定的偏移量做同步扫描。同步光谱测量可以应用于区分和识别混合物物质样品中的荧光组分。

荧光量子产率测量

荧光量子产率 (Quantum Yields) 是荧光物质的重要发光参数，定义为荧光物质吸光后所发射的光子数与所吸收的激发光的光子数之比值。与传统的对比测试法不同，fluoroSENS 采用积分球对样品进行绝对量子产率的测量，测量结果更准确可靠。采用三步测量方法，可消除激发光二次吸收对测量结果的影响，进一步提高了测量结果的准确性。



图一



附件:

- **荧光偏振附件**
用于测量荧光偏振角度 (0-90°) 和荧光各向异性，使用波长范围: 380-780nm。可有效用于医学与生化领域的抗原-抗体、生物细胞、蛋白质、酶等的测定。
- **滤光片附件**
提供手动更换滤光片的选项，可安装 50mm × 50mm 规格的高通滤光片，可选截止波长波长有: 280, 300, 320, 340, 360, 380, 400, 420, 450, 470, 490, 510, 550, 580, 600, 610, 630, 640, 650, 670, 685, 700, 720, 780nm 等。
- **吸收光谱测量附件**
用于样品的吸收光谱测量，采用单光束比例法测量方式，内置于主机内。
- **多维调节样品架**
用于液体样品测量，带有一维水平调节和 Z 轴旋转调节，水平调节范围: ±6.5mm，旋转调节范围: 360°，可安装比色皿尺寸: 45mm(H) × 12.4mm × 12.4mm
- **电动水浴恒温四样品架转换支架**
用于液体样品恒温测量，通过外置水浴控制器控制水流和水温，使样品支架内保持恒定温度，可安装比色皿尺寸: 45mm(H) × 12.4mm × 12.4mm，最多可同时安装四只比色皿进行四个不同样品的测量，测量通过计算机软件控制。
- **固体、粉末样品支架**
用于固体、粉末样品的测量，也可安装比色皿用于液体样品测量，样品架特别设计，确保激发光不直接进入荧光接收单色仪，可以有效减少杂散光，提高宽光谱扫描时的信噪比，带有一维水平调节和 Z 轴旋转调节，水平调节范围: ±6.5mm，旋转调节范围: 360°，可安装比色皿尺寸: 45mm(H) × 12.4mm × 12.4mm
- **水浴恒温样品支架**
用于液体样品恒温测量，通过外置控制器控制水流和水温，使样品支架内保持恒定温度，带有一维水平调节和 Z 轴旋转调节，水平调节范围: ±6.5mm，旋转调节范围: 360°，可安装比色皿尺寸: 45mm(H) × 12.4mm × 12.4mm。
- **77K液氮制冷样品室**
开放式 77K 液氮制冷样品室，试样管直径 5 和 8mm，用于低温荧光或磷光测量。
- **荧光量子产率测量用积分球附件**
用于荧光量子产率测量，内置于主机样品室内，不额外占用空间。可用于液体、固体、粉末等各种样品测量。
- **96孔板测量附件**
用于生物、化学等领域荧光样品批量检测试验。



fluoroSENS主要技术参数

		SENS-9000	SENS-9003
灵敏度	水拉曼信噪比	1500:1	3000:1
激发光源	光源/光谱范围	150W连续氙灯/200-2000nm	
	类型	C-T光路设计 (Czerny-Turner)	
	焦距	300mm	
	狭缝	10μm-3mm (自动连续可调)	
	光栅	激发单色仪: 1200g/mm, 300nm闪耀波长; 发射单色仪: 1200g/mm, 500nm闪耀波长	
单色仪	倒线色散	2.7nm/mm	
	光谱分辨率	0.1nm (光谱带宽连续可调)	
	波长准确度	0.2nm	
	波长重复性	0.1nm	
	最小步距	0.005nm	
	杂散光	1 × 10 ⁻⁵	
	扩展选项	其它规格光栅可选，可选装三块光栅	
探测器	光电倍增管	红敏	蓝敏
	光谱范围	185-900nm	185-670nm
数据采集	探测器类型	常规PMT	制冷PMT
	光子计数模式	单光子计数器，计数速率: 100Mcps	
软件	操作系统	Windows®	
	数据处理模式	激发光谱, 荧光光谱, 同步扫描, 2D, 3D显示; 光谱计算, 归一化, 平滑等多种数学处理	
其它	系统接口	USB2.0	
水拉曼测试标准	激发波长: 350nm; 激发带宽: 5nm; 积分时间: 1秒		