

稳态瞬态荧光光谱仪测定核黄素荧光寿命 及其量子产率

备注：上课地点在理化实验楼·化学侧 1 楼 128 房间

1 讲解培训 PPT 及使用手册

1.1 稳态瞬态荧光光谱仪培训 PPT

1.2 中文操作手册讲解

2 实验部分

2.1 实验目的

- (1) 了解 HORIBA 稳态瞬态荧光光谱仪的工作原理及其使用方法；
- (2) 掌握核黄素发射、激发谱图的制作绘制方法；
- (3) 掌握核黄素荧光量子效率测定方法；
- (4) 掌握核黄素荧光寿命测试的测定方法。

2.2 实验原理

2.2.1 发射、激发谱图绘制

对同一种物质而言，稀溶液中，荧光强度 I_f 与该物质的绝对浓度 c 存在如下关系： $I_f=2.3\phi_f abc \cdot I_0$ 上式中， ϕ_f 为荧光量子效率； a 为荧光分子的吸光系数； b 为试样的吸光过程； I_0 为入射光强度。当 I_0 和 b 不变时，上式为 $I_f=K \cdot c$ ，其中 K 为常数（恒定不变）。低浓度时，荧光强度与物质绝对浓度呈正比例关系 ($I_f=K \cdot c$)。卤素离子中，F 元素不会荧光猝灭。

发射谱图：激发波长不变，给定波长的激发光照射样品后产生不同波长不同强度的荧光。通过发射单色器的转动，逐个测定不同波长荧光的强度。

激发谱图：发射波长不变，发射单色器中只能通过已设定波长的发射光。通过激发单色器转动产生不同波长的激发光逐个激发样品，不同波长的激发光激发效率有强有弱，需逐个测定不同激发波长的激发效率。

核黄素有荧光效应，本实验需在中性、稀溶液条件下绘制其发射和激发谱图。核黄素，又称作维生素 B₂，是 B 族维生素的一种，微溶于水，密度为 1.7 g/cm³，熔点为 290 °C，沸点为 715.6 °C，外观为黄色或橙黄色结晶性粉末，分子式 C₁₇H₂₀N₄O₆，在中性或酸性溶液中稳定。核黄素为体内黄酶类辅基的组成部分（黄酶在生物氧化还原中发挥递氢作用），当缺乏时，就影响机体的生物氧化，使代谢发生障碍。其病变多表现为口、眼和外生殖器部位的炎症，如口角炎、唇炎、舌炎、眼结膜炎等，故本品可用于上述疾病的防治。体内维生素 B₂ 的储存是很有限的，因此每天都要由饮食提供。



图 1 核黄素结构式、外观形态及其维生素 B₂ 商品

2.2.2 荧光量子产率测试

本实验中需测定荧光量子产率。荧光量子产率定义：荧光量子产率又称作荧光效率(quantum yield of fluorescence)，是指单位时间(秒)内，发射二次辐射荧光的光子数与吸收激发光初级辐射光子数之比值。根据上述定义，荧光量子产率只能在 0 和 1 之间。硫酸奎宁的硫酸溶液是荧光量子产率的标准物质。本实验拟测定核黄素的中性水溶液的量子

产率。

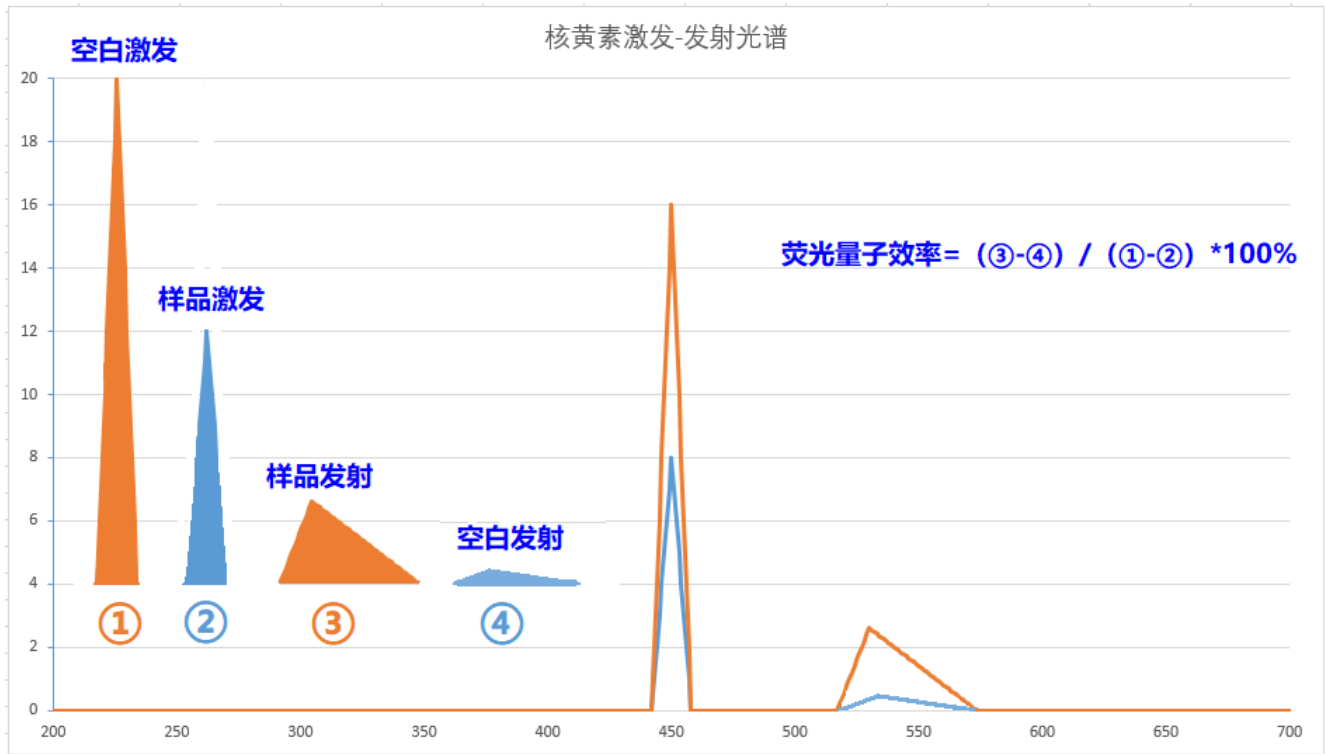


图2 量子产率计算示意图（横坐标是光波长，单位是纳米；纵坐标为仪器的荧光强度，无单位）

表1 其他文献中部分荧光物质量子产率汇总表

化合物	溶剂	量子产率
吖啶黄	水	0.54
蒽	苯	0.29
	正己烷	0.33
	乙醇	0.29
9,10-二氧蒽	正己烷	0.54
	乙醇	0.58
叶绿素 a	苯、乙醚、二噁烷	0.32
	丙酮, 环己烷	0.30
	苯	0.18
叶绿素 b	苯	0.11
	乙醚	0.12
	丙酮	0.09
	甲醇	0.10
曙红(四溴荧光素)	0.1N NaOH	0.19
芴	乙醇	0.53
	正己烷	0.54
荧光素	0.1N NaOH	0.92
吖啶	水 pH7	0.65
	水	0.45
萘	乙醇	0.12
	正己烷	0.10
1-氨基萘-3,6,8-磺酸盐	水	0.15
1-二甲氨基萘-4-磺酸盐	水	0.48
1-二甲氨基萘-7-磺酸盐	水	0.75
2-萘酚	0.05M 磷酸盐 pH10	0.21
菲	乙醇	0.10
酚	水	0.22
脱镁叶绿素 a	苯	0.18
吡哆醛	0.05M 磷酸盐 pH7	0.048
吡哆胺	0.05M 磷酸盐 pH7	0.11
硫酸奎宁	1N H ₂ SO ₄	0.55
核黄素	水 pH7	0.26
3-甲基吖啶	水	0.42

物质	溶剂	浓度 μg/ml.	λ _{ex} nm	Φ _测	Φ ^[3] 文献
9,10-二苯蒽	乙醇	1	366	0.96	0.95
蒽	乙醇	1	354, 359, 380	0.31	0.29
蒽	苯	1	354, 345	0.30	0.29
蒽	正己烷	1	361, 368	0.35	0.33
萘	乙醇	1	291	0.11	0.12
萘	正己烷	1	328	0.12	0.10
苯酚	水	4	282	0.21	0.22
苯	环己烷	1	295	0.07	0.07
荧光黄	水	1	291	0.66	0.65
荧光黄	0.1N NaOH	1	333	0.90	0.92

本文的测试结果均未计入折射率校正。

2.2.3 荧光寿命测试

当某种物质被一束激光激发后，该物质的分子吸收能量后从基态跃迁到某一激发态上，再以辐射跃迁的形式发出荧光回到基态。当去掉激发光后，分子的荧光强度降到激发时的荧光最大强度 I_0 的 $1/e$ 所需要的时间，称为荧光寿命，常用 τ 表示。一般情况下，荧光寿命范围为 100ps-10us (NanoLED)，磷光寿命范围为 1us-1s (SpectralLED)。

假定一个无限窄的脉冲光(δ 函数) 激发 n_0 个原子到其激发态,处于激发态的原子将通过辐射或非辐射跃迁返回基态。假定两种衰减跃迁速率分别为 Γ 和 knr ,则激发态衰减速率可表示为: $dn(t)/dt = -(\Gamma + knr)n(t)$ 其中 $n(t)$ 表示时间 t 时激发态原子的数目,由此可得到激发态物质的单指数衰减方程。 $n(t) = n_0 \exp(-t/\tau)$ 式中 τ 为荧光寿命。荧光强度正比于衰减的激发态分子数,因此可将上式改写为: $I(t) = I_0 \exp(-t/\tau)$ 其中 I_0 是时间为零时的荧光强度。于是,荧光寿命定义为衰减总速率的倒数: $\tau = (\Gamma + knr)^{-1}$ 也就是说荧光强度衰减到初始强度的 $1/e$ 时所需要的时间就是该荧光物质在测定条件下的荧光寿命 τ 数值。

$$I_t = I_0 e^{-kt} \quad (1-1)$$

其中 I_t 、 I_0 分别为激发态时 $t=0$ 和 t 时刻的荧光强度, k 为衰减系数, 荧光常在 $10^{-10} \sim 10^{-8}$ s。

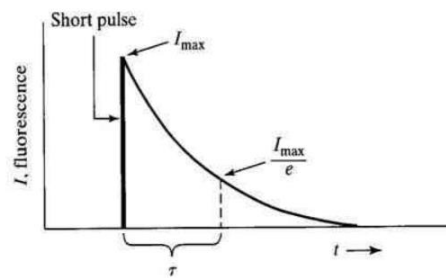


图 3 荧光强度衰减曲线

2.3 仪器与试剂

2.3.1 仪器

仪器名称:稳态瞬态荧光光谱仪

仪器型号: QM8000; 厂家: HORIBA (日本堀场集团)

说明: 操作界面右上角为检测器

分别是:

- (1) QM400PMT 检测器用于检测紫外可见光 (大约从 200nm 到 850nm 不需要液氮冷却);
- (2) QMInGaAs 为铟镓砷检测器用于检测红外光 (红外部分约到 1700nm 需要用液氮冷却);
- (3) Nano LED 测定荧光寿命 (短寿命)。不需要液氮冷却;
- (4) Spectral LED Hub 测定磷光寿命 (长寿命)。不需要液氮冷却。

2.3.2 试剂

核黄素 (固体)、高纯水。本实验核黄素水溶液浓度为 (10 μ g/ml), 水溶液 pH=7

2.4 实验步骤

2.4.1 发射光谱

(1) 样品仓中选择液体样品支架。将一定浓度的核黄素溶液倒入 1cm 比色皿中, 盖好盖子放入样品仓中, 盖好盖子; 检查狭缝, 狭缝需要保持打开 open 状态, 保证光路通畅;

(2) 选择操作界面右上角 QM400PMT 检测器; 单击左下角 setup 按钮, 选择 Acquisition Type 中的 Emission Scan 选项;

(3) 在 Setup 按钮选项卡中将“Real time Corrections”的 Signal 参数调整在 1.000V 附近;

(4) 选择激发波长为 400nm, 发射波长区间为 450nm-700nm, 设定 4 个狭缝宽度均为 2.5, 扫描步进为 1nm, 扫描

时间为 0.1s;

(狭缝宽度为 0.1-15.6, 不建议狭缝选择 0.5 以下, 会产生较大的系统误差; 荧光强度原始数据要适合, 比较理想的数值是在 $10E6$ 到 $10E7$ 之间);

(5) 单击 start 开始测试。如荧光强度不适合或者参数设置错误, 随时单击 stop 停止测试, 重新设置参数。

备注: 1. 发射 Emission 测试过程中出现两个文件, 只保留 Dector1 里面的文件 (及时重命名), RCQCSignal 文件关闭。2. 核黄素最大发射在 530nm 附近。3. 发射测试过程中 (不勾选 enable), 点击 Start 后出现 2 个文件, 只保留 Detector 下面的文件。RCQCSignal 文件为原始数据, 关闭或删除即可。

2.4.2 激发光谱

(1) 样品仓中选择液体样品支架。将一定浓度的核黄素溶液溶液倒入 1cm 比色皿中, 盖好比色皿聚四氟乙烯盖, 放入样品仓中, 盖好样品仓盖; 检查狭缝, 狭缝需要保持打开 open 状态, 保证光路通畅;

(2) 选择操作界面右上角 QM400 探测器; 单击左下角 Setup 按钮, 选择 Acquisition Type 中的 Excitation Scan 选项;

(3) 在 Setup 按钮选项卡中将“Real time Corrections”的 Signal 参数调整在 1.000V 附近;

(4) 选择激发波长范围为 200nm-500nm, 发射波长为 530nm, 设定 4 个狭缝宽度均为 2.5, 扫描步进为 1nm, 扫描时间为 0.1s;

(狭缝宽度范围是 0.1-15.6, 不建议狭缝选择 0.5 以下, 会产生较大的误差; 荧光强度原始数据要适合, 比较理想的数值是在 $10E6$ 到 $10E7$ 之间);

(5) 单击 start 开始测试。如荧光强度不适合或者参数设置错误, 随时单击 stop 停止测试, 重新设置参数。

备注: 1. 激发 Excitation 测试过程中出现两个文件, 只保留 Dector1 里面的文件 (及时重命名), RCQCSignal 文件关闭。2. 核黄素最大激发在 275nm、370nm、450nm 附近。

2.4.3 核黄素荧光寿命测定

(1) 样品仓中选择液体样品支架。关闭连续氙灯的 shutter (挡板), 为节约氙灯寿命可关闭氙灯电源。将闪烁纳秒 LED 灯 (454nm 款) 接通 NanoLED 电源并插入灯座中, 拧紧螺丝; 在仪器背部, 按下电源开关, 正面光源钥匙从 standby 转到 ON。打开光源后预热一段时间; 检查狭缝, 狭缝需要保持打开 open 状态, 保证光路通畅;

检查软件正下方“914 Control”模块中 PMT voltage 为 850V。

(2) 空白寿命测试: 将磨砂散射体作为空白样品放入样品仓中, 在发射端放入“1.0 衰减片 (1.0 的意思是指 10 的负 1.0 次方, 即衰减到原始光强度的十分之一)”, 盖好样品仓盖; (衰减片在样品和光源之间)

(3) 单击操作界面右上角 NanoLED 按钮, 点击“Setup”进入选择界面, 点击“Decay”;

(4) 选择好对应模块后, 点击菜单栏上方“Acquisition Settings”, 发射波长定为 454nm, 狭缝数值为 12; 选择结束条件 stop method 为“peak channel count”, 结束的强度 (peak) 数值选为 3000, 单击 Accept 返回主界面, 点击“Start”开始寿命测试扫描, 测定寿命空白数值, 将此文件命名为“空白寿命”;

(5) 样品寿命测试: 取出散射体, 将核黄素水溶液作为样品, 注意此次不加衰减片, 点击“Setup”进入选择界面, 点击菜单栏上方“Acquisition Settings”, 将发射波长改为 530nm, 狭缝数值为 12; 选择结束条件 (stop method) 为“peak channel count”, 结束的强度 (peak) 数值选为 3000, 单击 Accept 返回主界面, 点击“Start”开始寿命测试扫描, 测定样品寿命数值, 将此文件命名为“样品寿命”;

(6) 寿命计算: 寿命数据扫描完成后, 激活寿命测试结果图谱, 点击菜单栏中的“Math”-“PowerFit-10”-“One-To-Four-Exponentials”, 单击左边将光谱文件激活, IRF 空白选择“空白”, Decay 样品选择“样品”, 拟合指数选择 1 阶或 2 阶拟合, 点击计算, 在弹出的 txt 文件中可得出 χ^2 值、 τ 荧光寿命值、 τ 平均值、a 值等。

备注: 1. Decay 寿命测试过程中出现 1 个文件, 保留 Dector1 里面的文件, 及时重命名。

2.4.4 核黄素荧光量子产率测定

(1) **空白激发发射**：样品仓中选择量子产率测定支架；将高纯水作为空白倒入 1cm 比色皿中，盖好比色皿盖子，放好积分球，盖上样品仓；检查狭缝，狭缝需要保持打开 open 状态，保证光路通畅。

备注：高纯水与核黄素液面高度尽量保持一致，减小系统误差。

(2) 选择操作界面右上角 QM400 检测器；单击左下角 setup 按钮，选择 Acquisition Type 中的 Emission Scan 选项；发射界面 (Emission) 中激发波长选为 450nm，发射波长选为 400nm~480nm，**4 个狭缝均为 1.5nm** (量子产率测试中一旦选定不可更改)，**步进为 0.5nm，扫描间隔为 0.1sec**，不勾选 enable，看下原始数据 (未经校准的) 信号强度是否在 10E6 以上。

(3) 原始数据信号强度达到 10E6 以上后，**在 setup-real-time corrections 勾选 enabled 复选框，选择 400PMT 校准曲线 (倒数第 4-5 个? 选择: 400 couvette slide pmt quanta)**。参数设置完毕后，单击 start 开始测试。

空白激发：样品仓放入高纯水空白，激发波长选为 450nm，发射波长选为 400nm~480nm，单击 accept, start。

空白发射：样品仓放入高纯水空白，激发波长选为 450nm，发射波长改为 480nm~700nm，单击 accept, start。

分别将两个文件分别命名为“空白激发”和“空白发射”；

量子产率测试中，点击 Start 后出现三个文件，只保留 Detector 下面的 [COR] 文件，其余关闭或删除。

(4) **样品激发发射**：取下比色皿，倒出高纯水。将核黄素水溶液倒入 1cm 比色皿中，盖好盖子放入样品仓中，放好积分球；

(5) 依然选择 Acquisition Type 中的 Emission Scan 选项；在发射界面 (Emission) 中**激发波长选为 450nm，发射波长选为 400nm~480nm**，不可更改狭缝，步进和扫描间隔不变，勾选 enabled 复选框 (同上)。

样品激发：以核黄素水溶液为样品，激发波长选为 450nm，发射波长选为 400nm~480nm，单击 accept, start。

样品发射：以核黄素水溶液为样品，激发波长选为 450nm，发射波长改为 480nm~700nm，单击 accept, start。

分别将两个文件分别命名为“样品激发”和“样品发射”；

(6) 计算：点击工具栏 Math-Quantum Yield Calculator for Integrating Sphere 跳弹出如下对话框。用鼠标单击左边文件激活对应要导入的数据，先点击左下侧红框中的 Emission，在 Emission Traces 中分别导入“样品发射”和“空白发射”光谱。后点击工具栏中的图标，积分范围为 **480nm~700nm**。用鼠标单击左边文件激活对应要导入的数据，点击 Excitation，在 Excitation Traces 中分别导入“样品激发”和“空白激发”光谱，积分范围为 **400nm~480nm**。单击 calculate 计算量子效率。

备注：1.量子产率测试 Emission 过程中出现 3 个文件，只保留 Dector1 里面 [COR] (校正后) 文件，及时重命名，RCQCSignal 文件关闭或删除。

2.5 注意事项

(1) 积分球务必保持干燥洁净，切忌磕碰，请戴手套操作。积分球下的挡板朝向右方，防止光不经过积分球直接进入检测器。

(2) 纳秒级 (nanoLED) 灯具只能与纳秒级 (短寿命) 电线连接；微秒级 (specLED) 灯具只能与微秒级 (长寿命) 电线连接；电线切勿混插，否则会烧坏灯具。

(3) 样品仓尽量保持关闭状态，以免进灰。注意挡板 (shutter)、灯、狭缝的开闭状态。

(4) 量子产率测定时，必须不可以中途更改 slit 狭缝数值；未校准的空白荧光强度需在 10E6~10E7 之间；寿命测定时，尽量使 2 次测试的狭缝宽度保持一致。

(5) 荧光寿命测定时， α (阿尔法) 值应在 0.1~1 之间 (绿色区间)，狭缝选择需参考 α (阿尔法) 值。

(6) 左边菜单栏中 detector (检测器) 的文件是实验结果，RCQCSignal 为原始数据文件 (可以关闭)。当进行量子效率实验时，测定一次会生产三个文件 (detector 2 个，RCQCSignal 1 个) 只看 detector (检测器) 中标注 [COR] (校正后的数据) 即可，其他两个数据可关闭。

(7) 稳态光源是指连续发光；瞬态光源是指间断发光。

此仪器稳态光源包括：连续氙灯 (在仪器内部)；

此仪器瞬态光源包括：纳秒级光源 (圆柱形灯头)、微秒级光源 (圆柱形灯头)。

另外 980 纳米激光器既包括稳态光源，也包括瞬态光源。

测定某荧光物质的激发光谱、发射光谱、量子效率时，必须用稳态光源，瞬态光源无法完成实验。

测定某荧光物质的荧光寿命时，必须用瞬态光源，稳态光源无法完成实验。

荧光法具备非破坏性测量、性价比高、制样方便优点，但无法测量非荧光物质。

2.6 思考题

- (1) 哪些因素可能对核黄素荧光产生影响？
- (2) 量子产率测定过程中为什么必须禁止更改狭缝参数？
- (3) 荧光寿命测定过程中，测定空白值时为什么要加衰减片？
- (4) 积分球使用的注意事项有哪些？为什么测定量子效率的固体支架在光出口方向(进入检测器的方向)设置挡板？
- (5) 荧光寿命测定的基准物质是什么？其荧光效率标准值是多少？
- (6) 如测定奎宁的量子产率可否用稀盐酸溶解奎宁固体？为什么？

感兴趣的同学可以网上搜索相关文献进行深入探究。

如：基于奎宁荧光猝灭的卤素阴离子传感器研究[J]；

溶液荧光量子产率的相对测量[J]；

荧光量子效率测定的综合实验设计[J]等。

可能涉及到部分考试题。

2.7 注意事项：

- (1) 实验报告包含内容：实验目的、实验原理、所用仪器设备及参数、仪器结构简图、实验步骤（包括测定激发、发射、产率、寿命四部分内容）、数据详细记录、数据处理过程、思考及讨论部分要写本课件全部的思考题（2.6 部分）。每一部分都有相应分值，报告应填写完全、字迹工整。
- (2) 请同学们按时来实验室。全部同学必须穿实验服，女生长发需要束发。不能在实验室吃东西及喝水。
- (3) 光谱仪属于精密仪器，怕油怕灰，注意戴手套实验。

。

仪器分析实验报告高分样例：

第一部分 实验预习

一、实验目的

- 了解HORIBA荧光光谱仪的工作原理及使用方法。
- 掌握核黄素发射、激发谱图的制作方法。
- 掌握核黄素荧光量子效率的测定方法。
- 掌握核黄素荧光寿命测试的测定方法。

二、实验原理

- 发射光谱(谱图绘制) 对同一种物质而言,稀溶液 $I = abc \cdot I_0$ 中,荧光强度 I 与溶液浓度成正比(存在下关系 $I_f \propto I_0$)。当 a 和 b 不变时 $I \propto I_0$ (其中 k 为常数)。低浓度时,荧光强度与物质绝对浓度成正比 $I_f = k \cdot I_0$ 。
- 荧光量子产率测试: 荧光量子产率又称量子效率(指单位时间内发射一次辐射荧光的分子数与吸收光子数之比)。荧光量子产率只能在0-1之间。磷酸二氢钾的磷酸二氢钾是荧光量子产率的标准物质。
- 荧光寿命测试: 当某物质吸收一定能量激发后,该物质的分子吸收能量从基态跃迁到某一激发态上,再以辐射跃迁的形式发出荧光回到基态。当去掉激发光源后,分子的荧光强度按指数衰减的荧光最大强度 I_0 的 $1/e$ 所需的时间,称为荧光寿命 τ 。一般情况下,荧光寿命范围为100ps-10ns,磷光寿命范围1 μ s-1s。

三、实验仪器及主要参数

仪器名称 荧光光谱仪

仪器型号 QM8000

仪器厂家 HORIBA (日本堀场集团)

仪器流程图

仪器主要参数 75W 汞灯 (无汞单灯管,无汞灯,无汞灯通风量)
S/N > 30000:1

第二部分 实验操作及记录

四、实验步骤

- 发射光谱: 小样品池中选择液体样品支架,将一定浓度的核黄素溶液倒入1cm比色皿中,盖好盖子。①选择操作界面上角QM8000检测器;单击右下角setup按钮选择Acquisition中的Emission Scan。②调整"Real-time Generation"参数在1.00左右(调节激发波长为360nm,发射波长为380nm-700nm,设定4个分辨率均为2.5,扫描步长为1nm,扫描时间为0.1s)。③单击start开始测试,核黄素发射光谱在30nm附近。
- 激发光谱: ①样品池中选择液体样品支架,将一定浓度的核黄素溶液倒入1cm比色皿中,盖好比色皿盖。②选择操作界面上角QM8000检测器;单击右下角setup按钮选择Acquisition Type中的Excitation Scan选项。③选择激发波长范围为200nm-500nm,发射波长380nm,设定分辨率均为2.5,扫描步长为1nm,扫描时间为0.1s。④Signal(电压)1.000V附近,分辨率宽度为2.5,扫描步长为2nm,扫描时间为0.1s,发射波长为380nm。⑤单击start开始测试。
- 核黄素荧光寿命: ①样品池中选择液体样品支架。②将空白样品放入样品池中,盖好样品池盖。③单击Name打印按钮,单击"Setup"进入选择,单击"Delay"。④选择好左右参数后进行设定。⑤单击发射按钮,将核黄素水溶液作为样品,此时不加聚光片进行测定。⑥单击发射按钮扫描完成后,单击寿命测试结束按钮。
- 核黄素荧光量子产率测定: ①样品池中选择液体样品支架,将空白样品放入比色皿中,盖好比色皿盖,做好标记。②将核黄素水溶液倒入1cm比色皿中,盖好盖子放入样品池中,放好聚光片。③设定。④计算。

五、数据记录 (Chi 2: [redacted])

核黄素荧光寿命为 $\lambda_{\text{em}} \text{ aver } \tau$: [redacted] ns

核黄素荧光量子产率: [redacted]

20110119
教师签字: [redacted]

六、数据处理

- 对核黄素荧光的影响因素: [redacted]
- [redacted]
- [redacted]
- 积分球法 [redacted]
- [redacted]
- [redacted]

八、教师评分

项目	实验预习 (25分)	实验操作及记录 (50分)	实验结果与讨论 (25分)	合计 (100分)