

文件编号：WU-ISCMS-QM 20213809

版本号：V2.0

受控状态：

分发号：

# 分子科学公共实验平台

## 质量管理文件

---

### 快速成像显微拉曼光谱仪 WITec Alpha300R 标准操作规程

2020 年 03 月 10 日发布

年 月 日实施

---

分子科学公共实验平台 发布





# 目 录

1. 目的	1
2. 范围	1
3. 职责	1
4. 光谱实验室人员职责与安全管理规范	2
5. 光谱实验室仪器设备管理规范	3
5.1 拉曼光谱仪使用制度	3
5.2 拉曼光谱仪预约制度	3
6. 实验内容	4
6.1. 开机和预热仪器	4
6.1.1. 仪器主机	4
6.1.2. 开机步骤	4
6.2. 拉曼光谱测试	6
6.2.1 Control FIVE 软件界面介绍	6
6.2.2 样品装样和换样	7
6.2.3 如何在镜头下高效寻找样品	9
6.2.4 硅片校准	11
6.2.5 拉曼光谱测试	16
6.3. 数据处理	20
6.3.1 单谱处理	20
6.3.2 Mapping 图像处理	23
6.4. 原位拉曼光谱测试	27
6.4.1 电化学原位拉曼测试	27
6.4.2 低温原位拉曼测试	29
6.4.3 高温原位拉曼测试	30
6.5. 原子力显微镜操作 AFM	32
6.5.1 接触模式 AFM	32
6.5.2 轻敲模式 AFM	35
6.6. 透射模式拉曼光谱测试操作步骤	39
6.7. TrueSurface (TS)成像	44

6.8. 微塑料-颗粒分析.....	46
6.9. 荧光寿命曲线，荧光寿命成像的采集及数据拟合.....	51
7. 相关/支撑性文件.....	54
8. 记录.....	55

分子科学公共实验平台



## 1. 目的

建立快速成像显微拉曼光谱仪 WITec Alpha300R 标准操作规程, 使其被正确、规范地使用。

## 2. 范围

本规程适用于所有快速成像显微拉曼光谱仪 WITec Alpha300R 的用户。

## 3. 职责

3.1 操作人员: 严格按本程序操作, 发现异常情况及时汇报实验室技术员。

3.2 实验室技术员: 确保操作人员经过相关培训, 并按本文件执行操作。

### 3.3 文章致谢格式

根据学校指导意见, 使用各校级平台仪器设备表征产生的科研成果必须致谢平台。如果您在文章成果中使用了光谱、色质谱、磁共振波谱以及其他属于分子科学平台的仪器设备, 请务必在文末致谢分子科学公共实验平台。

英文文章致谢:

① Acknowledgement: The author thanks (Dr. XXX from) Instrumentation and Service Center for Molecular Sciences at Westlake University for (the assistance/discussion/supporting in) ... measurement/data interpretation.

② Coauthorship on the resulting publications would be appreciated if our staff make technical contributions (including but not limited to critical sample preparation, novel experiment designation and comprehensive data analyzation).

Affiliation address: "Key Laboratory of Precise Synthesis of Functional Molecules of Zhejiang Province, School of Science, Instrumentation and Service Center for Molecular Sciences, Westlake University, 18 Shilongshan Road, Hangzhou 310024, Zhejiang Province, China."

中文文章致谢:

① 致谢: 感谢西湖大学分子科学公共实验室平台 XXX 博士(或者 XXX 老师)在.....表征或数据分析上提供的帮助。

② 共同作者: 如果分子科学平台老师在您课题组样品表征或文章发表上有重要技术贡献(包括但不限于关键样品制备、新型实验设计和深度数据分析), 我们感谢您将相关

老师列为共同作者, 作者单位地址如下: 西湖大学, 分子科学公共实验平台, 功能分子与精准合成浙江省重点实验室, 杭州, 310030, 浙江。

#### 4. 光谱实验室人员职责与安全管理规范

- 4.1 相关人员进入实验室之前必须通过学校、中心和平台的安全考试或考核, 并严格遵守光谱实验室的各项安全注意警示标识。严禁无关人员进入实验室。
- 4.2 平台设备须经培训考核后方可操作, 严格遵守仪器操作规程并做好实验记录, 未经考核者严禁触碰和使用仪器。
- 4.3 请按制样要求进行测试或送样, 因样品不符合上机要求造成仪器损坏的, 无论独立上机或是委托测试, 都将由用户所在课题组承担责任。
- 4.4 实验室通道及消防紧急通道必须保持畅通, 所有实验人员应了解消防器具与紧急逃生通道位置, 并应掌握消防器材的正确操作。
- 4.5 使用化学试剂或药品前, 必须了解其物理化学性质、毒性及防护方法, 使用时必须进行个人防范措施。
- 4.6 使用液氮时应穿戴实验服、护目镜、防冻手套。
- 4.7 使用烘箱请先联系技术员, 烘箱用完请及时取走样品, 烘箱不可过夜操作。
- 4.8 使用实验室气瓶, 须经实验室技术员培训指导后方可操作。
- 4.9 严禁戴手套接触门把手。禁止随意丢弃实验废弃物。禁止将锐器、玻璃、枪头丢弃在常规垃圾箱中。
- 4.10 使用激光、射线设备及相关附件时, 应严格遵守设备操作规程, 在激光、射线设备附件未关闭之前, 禁止打开样品仓。使用射线设备时还需打开射线剂量报警器, 无关人员严禁进入控制区。
- 4.11 不可擅自做变温实验, 如有需求请务必联系技术员; 进行高温实验时需技术员在场方可进行。
- 4.12 实验室应保持整洁, 严禁摆放与实验无关的物品如食品和饮料。严禁在实验室进食与抽烟。严禁动物进入实验室。
- 4.13 个人 U 盘、移动硬盘等易带入病毒的存储设备不得与工作站电脑连接。
- 4.14 实验过程中如发现仪器设备及基础设施发生异常状况, 须及时向该仪器负责人或实验室负责人反馈。严禁擅自处理、调整仪器主要部件, 凡自行拆卸者一经发现将给予严重处罚。



- 4.15 保持实验室空气干燥，在潮湿的季节应进行除湿，至少每周检查一次除湿机是否有积水

## 5. 光谱实验室仪器设备管理规范

### 5.1 拉曼光谱仪使用制度

该仪器遵从学校“科研设施与公共仪器中心”对大型仪器设备实行的管理办法和“集中投入、统一管理、开放公用、资源共享”的建设原则，面向校内所有教学、科研单位开放使用；根据使用机时适当收取费用；并在保障校内用户使用的同时，面向社会开放。

委托测试：用户需通过“大型仪器管理系统”（以下简称大仪网）进行送样预约，并按照要求登记预约信息。送样预约要求如下：

1. 送样前与仪器负责老师沟通样品信息；
2. 测试结果请自行在大仪网送样记录中下载；
3. 样品如需回收请在测试后尽快取回，一周未取回平台将作化学废弃物处理。

### 5.2 拉曼光谱仪预约制度

为充分利用仪器效能、服务全校科研工作，根据测试内容与时间的不同，光谱实验室制定了 7\*24 小时预约制度。根据预约制度可登陆大仪共享网站即时预约机时，包括周末；寒暑假及国庆假期将另行通知。

请严格遵守预约时间使用仪器，以免浪费机时。如需调换时间段，在技术员同意下可与其他使用者协商。因故不能在预约时间内测试者，请提前 30 分钟取消预约并通知技术员。恶意预约机时或有多次无故不遵预约时间的用户，实验室将进行批评教育、通报批评或取消上机资格等处罚。

预约时段		预约时间/每人	测试内容
周一至周日	自主测试 送样测试 维护/开发测试	无限制	拉曼光谱测试

- (1) 校内使用者须经过技术员的实验操作培训，考核合格后方可上机使用；
- (2) 实验开始时务必在实验记录本上登记，结束时如实记录仪器状态；

- (3) 严禁擅自处理、拆卸、调整仪器主要部件。使用期间如仪器出现故障, 使用者须及时通知技术员, 以便尽快维修或报修, 隐瞒不报者将被追究责任, 加重处理;
- (4) 因人为原因造成仪器故障的 (如硬件损坏), 其导师课题组须承担维修费用;
- (5) 原始数据不允许在仪器工作站上删改, 尤其不允许用 U 盘与移动硬盘直接拷贝。使用者应根据要求通过科研仪器网/数据服务器传送下载原始数据至本地电脑, 以保存并做数据处理; 实验数据在本实验室电脑中保留两年。
- (6) 使用者应保持实验区域的卫生清洁, 测试完毕请及时带走样品, 技术员不负责保管。

使用者若违犯以上条例, 将酌情给予警告、通报批评、罚款及取消使用资格等惩罚措施。

## 6. 实验内容

### 6.1. 开机和预热仪器

#### 6.1.1. 仪器主机

快速变换显微拉曼光谱仪功能齐全。仪器实物图如图 6-1 所示, 包括四个激光器 (405/475/532/633)、一个光谱仪 (配置 EMCCD)、一套控制器及一套共聚焦显微镜。所有的硬件设备经控制器后再与计算机进行连接, 更好地保证仪器的稳定运行。

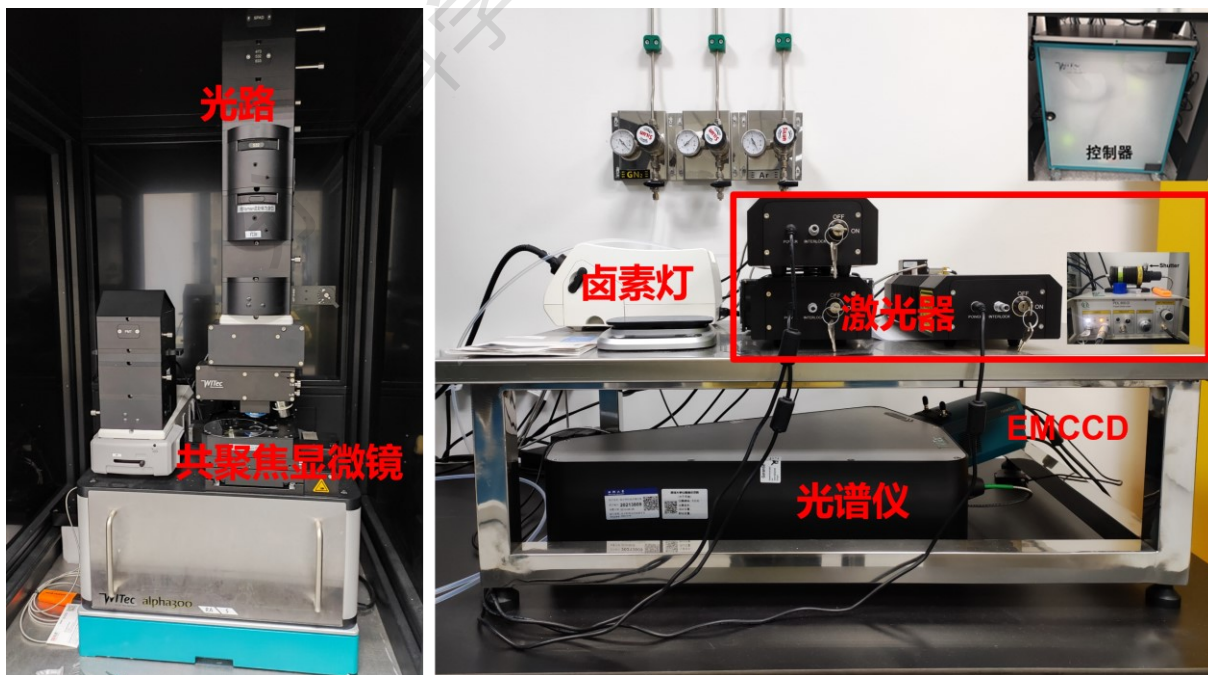


图 6-1 快速变换显微拉曼光谱仪的各个部件


#### 6.1.2. 开机步骤

1. 打开控制器左右两侧的插座→开电脑→打开激光器预热 10 分钟。
2. 基理系统登陆：接入大仪网的仪器操作电脑均需要登陆基理锁屏界面。
  - (1) 如下图 (a), 如界面显示“一卡通用户”, 请在 Account 输入预约者的一卡通账户, Password 栏输入相应账户密码, 点击 Submit;

**注意:** 如账号或密码输入错误, 请按键盘 Delete 键进行删除, 再重新输入; 禁止点击 Cancel, 否则仪器会自行关机。

- (2) 如下图 (b), 如界面显示“LIMS User”, Account 显示 Administrator, 请与相关老师联系。



3. 打开控制软件之前, 先点击桌面右下角的紫色标图 , 确认【Microscope Controller】, 【Spectral Camera】, 【Top Camera】和【Bottom Camera】状态正常✓, 且 Spectral Camera 温度降到-60 °C, 再打开【Control FIVE】软件。若状态不是全正常, 需点击 Initialize All Cameras, 等待到全正常状态, 再打开【Control FIVE】软件。

**注意:** (1) 平时使用时, 控制器、光谱仪和软件部分都未关闭, 只需打开激光器的钥匙, 等激光器预热 10 分钟就可直接使用。只要当天开过激光器, 白天时间激光器可以一直保持开启状态, 晚上实验结束离开实验室仅需关闭激光器, 其他部件都不用关闭。

- (2) 长时间不用时, 先关闭软件→看软件提示 EMCCD 升温至室温后→关闭图 6-2 所示的所有仪器开关。

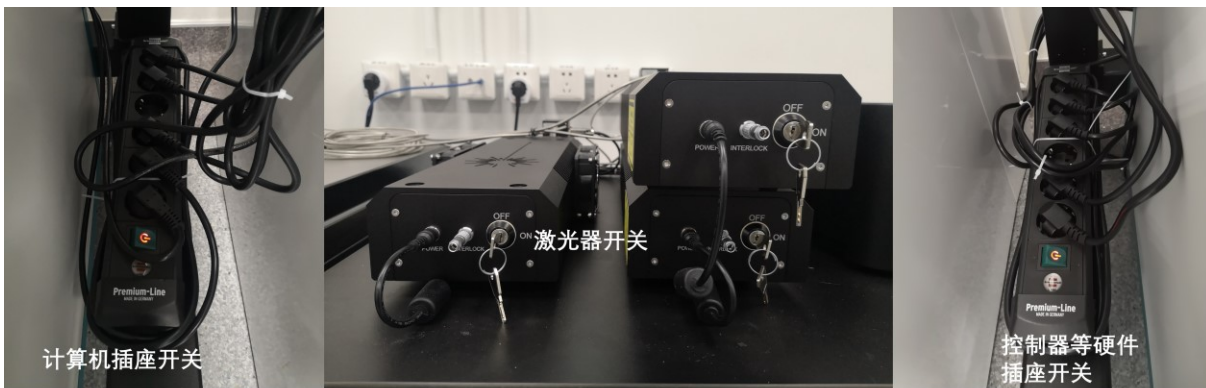



图 6-2 快速变换显微拉曼光谱仪的开关

## 6.2. 拉曼光谱测试

### 6.2.1 Control FIVE 软件界面介绍

打开控制软件之前，先点击桌面右下角的紫色标图，确认【Microscope Controller】，【Spectral Camera】，【Top Camera】和【Bottom Camera】状态正常✓。再打开【Control FIVE】软件，弹出软件对话框。如下图 6-3 所示。软件界面包括四个部分：【Control】控制栏、【Message】信息栏、【Project Manager】数据栏、【WITec Video Control】图像区域。

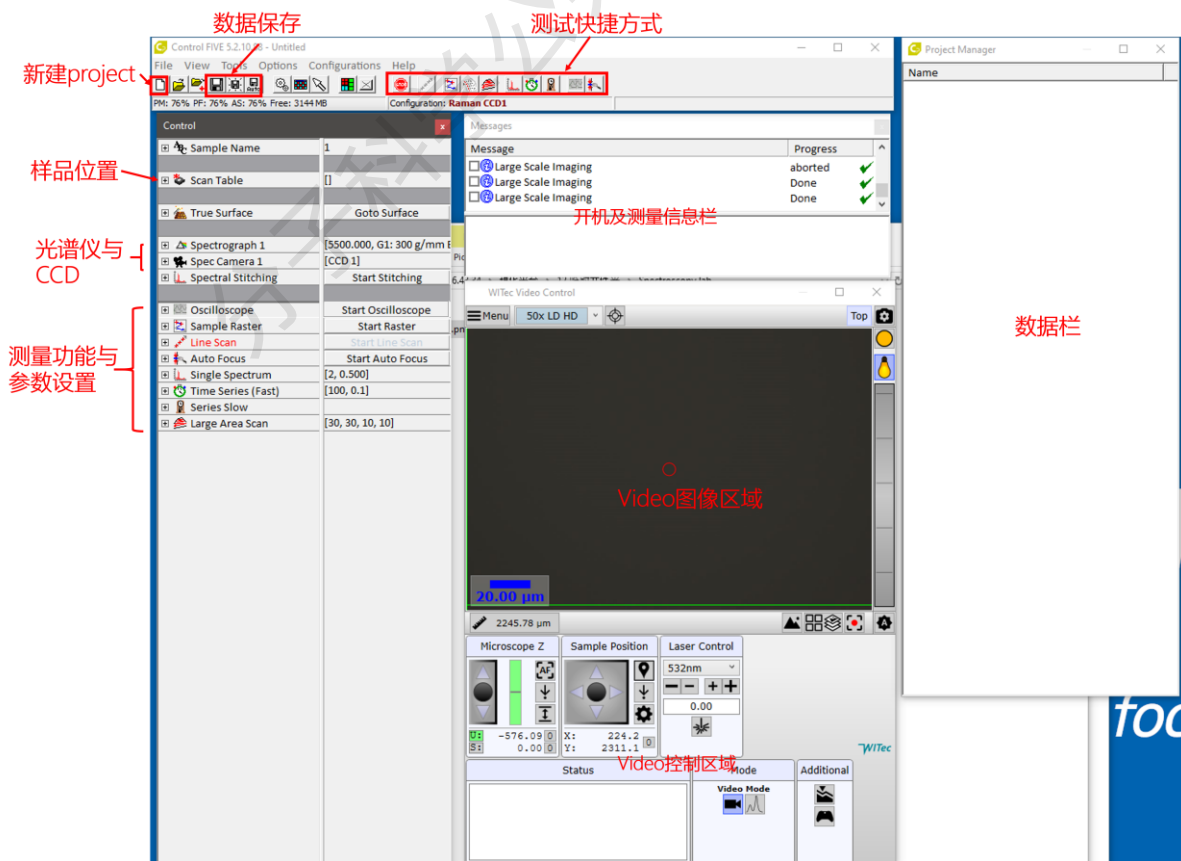


图 6-3 拉曼光谱测试【Control FIVE】软件操作界面

【Control】控制栏：控制栏包括单谱测试、线扫、Mapping 等各种功能，需要调节的参数很多，下面会重点描述每个功能的参数设置。

【Message】信息栏：记录了仪器开机后，每个步骤执行的状态，方便用户即时掌握自己所执行的每项操作的进程。

【Project Manager】数据栏：记录了每一条测试完成的数据及测试条件，数据处理也需要在这个模块中进行，后面数据处理部分将重点介绍这个模块的使用。

【WITec Video Control】图像区域：是进行样品定位、聚焦、激光功率及 True Surface 功能设置的区域，也是用户最先需要熟悉的界面，如图 6-4 所示，下面从此界面开始介绍仪器操作的整个流程。

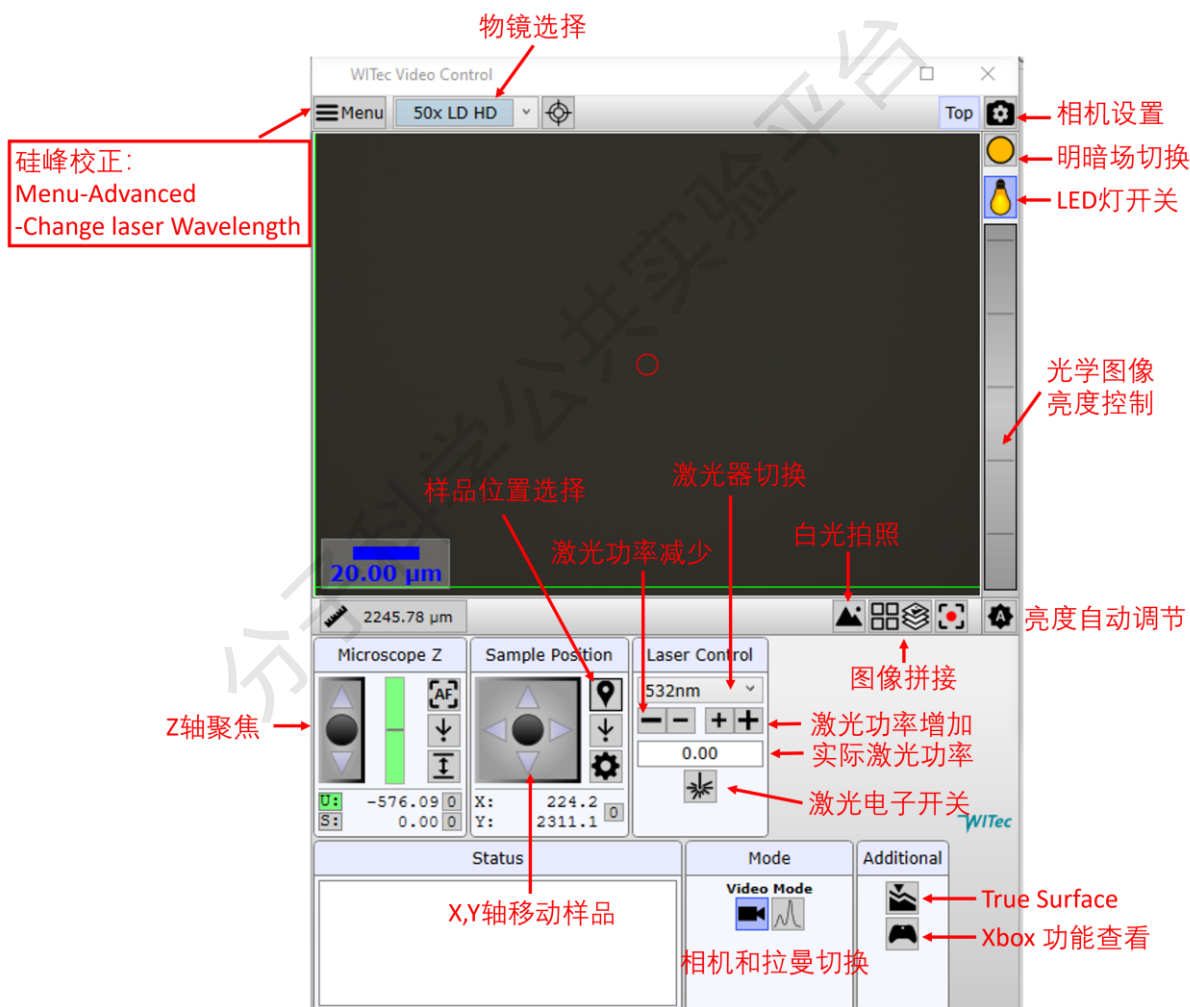


图 6-4 Video 控制窗口

## 6.2.2 样品装样和换样

### 1. 物镜及制样

本仪器配置五个物镜，分别是 10×(0.25,11 mm)、20×明暗场(0.5, 2.2 mm)、50×(0.75,

1 mm)、50×明暗场长焦(0.55, 9.1 mm)、100×明暗场(0.9, 0.28 mm), **粉末样品和液体样品禁止使用 100×的镜头**, 因为工作距离 (0.28 mm) 太短会导致污染镜头。

### (1) 粉末样品制样:

- ① 只测试单谱, 可取少量样品于载玻片表面, 倾斜载玻片并不断轻微敲击, 使粉末平面分布 (肉眼可见些许颗粒即可);
- ② 粉末样品成像, 用于表征样品的均一性、组分分布密度等的表征: 取适量样品于载玻片表面, 用盖玻片等用手指力进行按压, 压平、压实粉末后使表面平整后, 即可进行水平方向成像或者截面方向成像。

### (2) 液体样品制样

如图 6-5 所示, 对于大体积液体样品 (比如毫升级) 的测试, 可用合适体积的玻璃/石英比色皿装满, 用封口膜封口置于物镜下即可进行测试。对于小体积液体样品 (比如几十微升) 的测试, 如果液滴在载玻片表面不扩散, 可以利用载玻片和盖玻片搭建一个简易的测试池, 如图 6-5 所示, 使液滴与上盖玻片下表面接触浸润即可。对于小体积易挥发或者在玻璃表面易扩散的液体, 可采用毛细管法进行测试, 只需吸取少量样品于毛细管中即可进行聚焦检测。

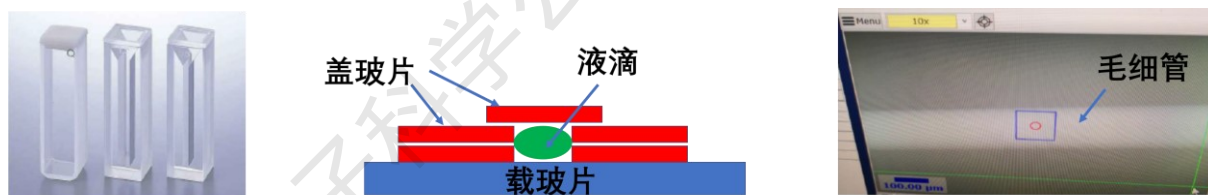


图 6-5 液体样品的制样方式

## 2. 放样操作

放置样品前, 转动镜头的转换盘 (不能直接接触物镜), 如图 6-6, 只有处在空镜头位置和 10×镜头的位置才能将样品放进去或者取出来, **其他位置镜头和样品之间距离太近, 禁止换样操作, 以防误伤镜头**。当镜头处于合适的两个位置时, 将样品放在玻璃片上, 并将玻璃片放于仪器的样品位置, 然后将旁边两块小铁片压住玻璃片固定衬底。

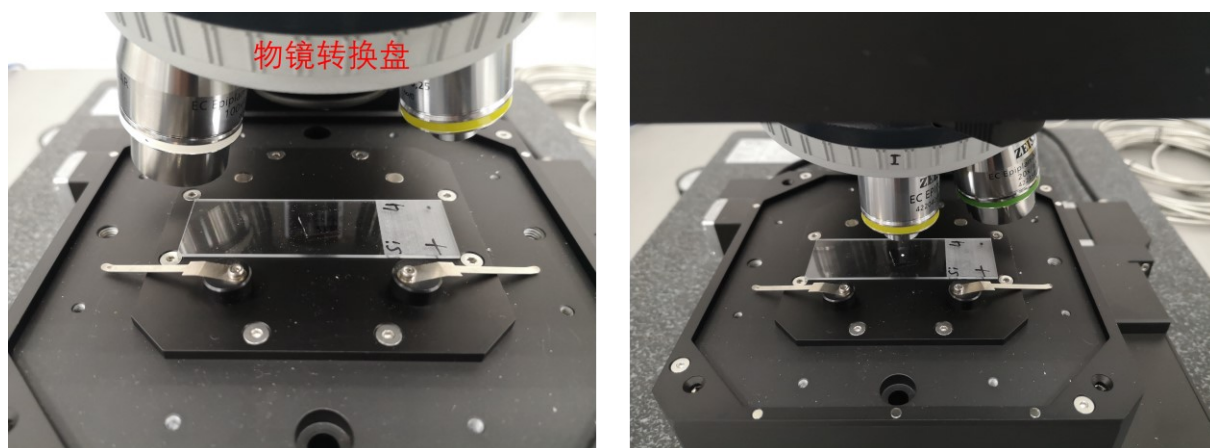


图 6-6 样品装样时调整镜头的位置

### 6.2.3 如何在镜头下高效寻找样品

#### 1. 样品图像拼接 (XY 平面合成和景深合成)

本仪器不仅能实现对可见视野区域的直接拍照, 还能通过移动样品台对更大范围的区域进行图像合成。如图 6-7 所示, 左图是最简单的图像拼接方式, 在【Number of Images】直接输入  $n$  值, 自动生成  $n \times n$  的 XY 拼接图像。右图是自定义一个确定的面积, 手动输入图像拼接的范围和中心坐标。也可以通过 Xbox 控制器来选择范围: 点击 Initialize Area (Xbox 摇杆: Y) → 移动样品到想要拍照的部分的边界 → 点击 Extend Area (Xbox 摇杆: X) → 沿着边界移动样品, 同时观察 Preview Area, 如果边界区域不在拍照区域内, 则点击 Extend Area (Xbox 摇杆: X), 直到所有边界都被包括在拍摄区域内 → 点击 Start。

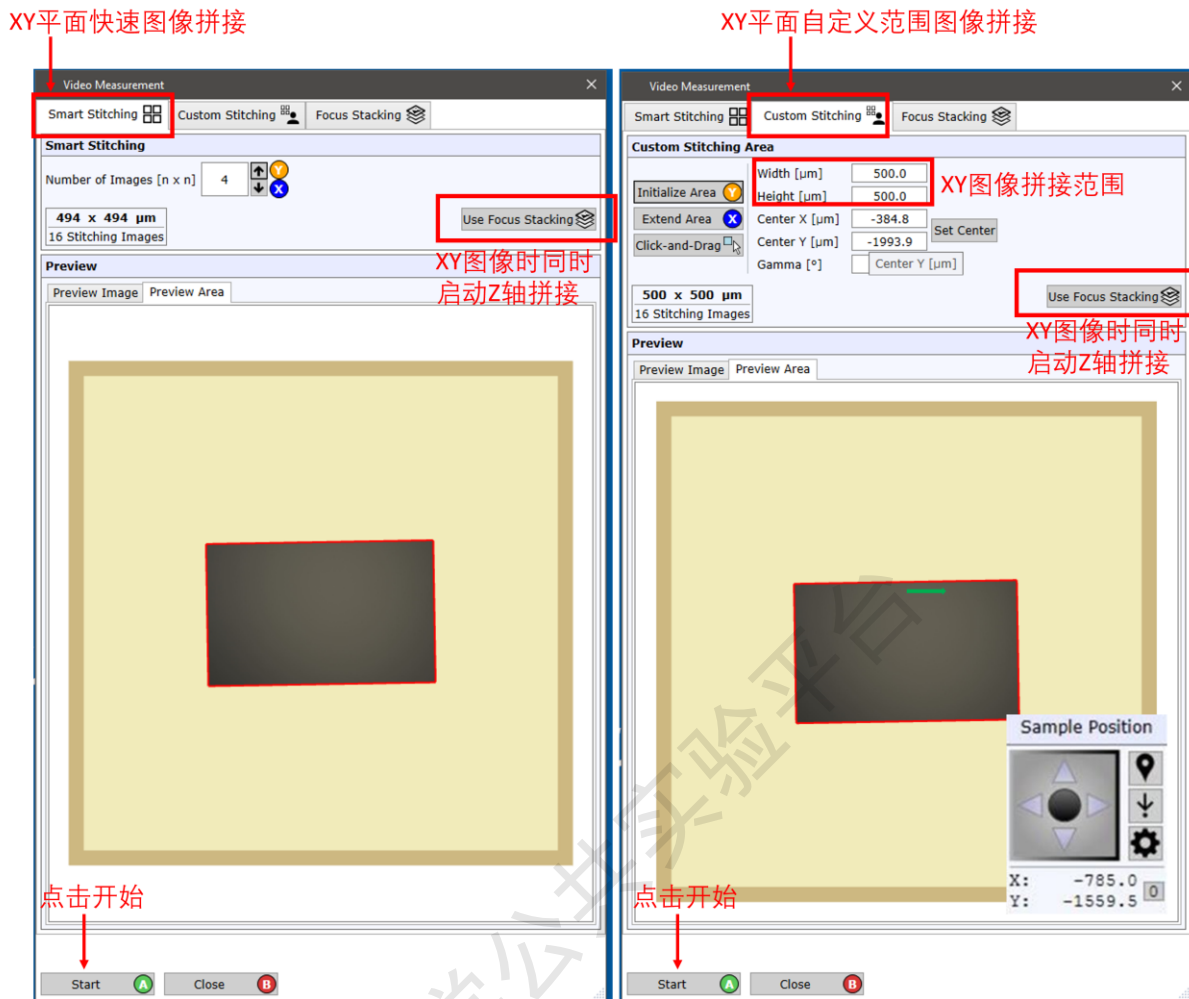


图 6-7 样品图像 XY 轴拼接

## 2. Z 轴拼接（景深合成）

当样品厚度较大时，可以对样品进行逐层扫描，景深合成出各层的图像。操作如下：如图 6-8，向下聚焦，找到最低光学焦平面，点击 **【Current as Lower Limit】** → 向上聚焦，找到最高光学焦平面，点击 **【Current as Upper Limit】** → 点击 Start。（注意：如上下焦平面高度超 200 μm (系统默认参数)，请选用 50×长焦物镜，并在 **【Microscope Z】** 中设置 Z 轴变化范围。）

当样品的表面轮廓起伏较大时，直接进行 XY 轴拼接会导致焦平面不一致而成像不清晰，此时需要同时启动 Z 轴拼接，操作步骤如下：先按上面的步骤设置好 Z 轴拼接的参数，然后在 XY 平面拼接界面，如图 6-7，点击 **【Use Focus Stacking】**，实现粗糙表面的大面积景深合成。



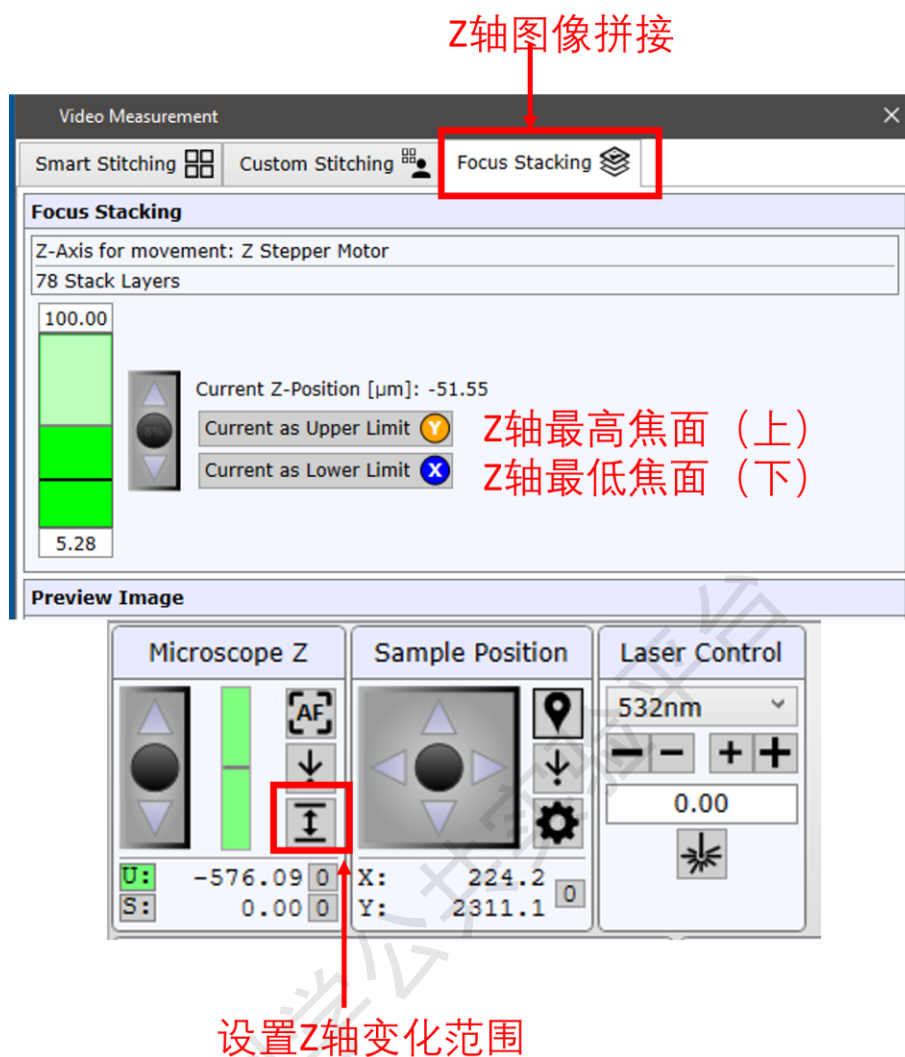


图 6-8 样品图像景深合成

### 6.2.4 硅片校准

1. 对硅片聚焦后，在标准条件下采集单谱

标准条件:

积分时间: 0.5 s

积分次数: 10 次

激光功率: 10mW

检测器  
实时光谱

采集  
到的光谱

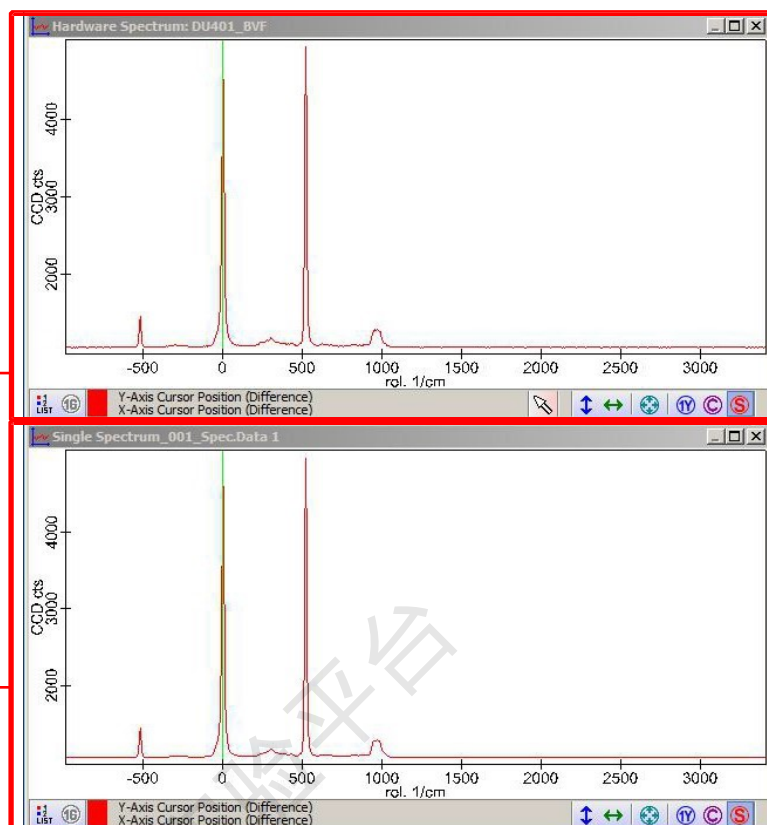


图 6-9 硅片校准条件与谱图

2. 寻峰 (在采集到的光谱窗口上操作)

a. 右键-选择【MiscVisuals】模块

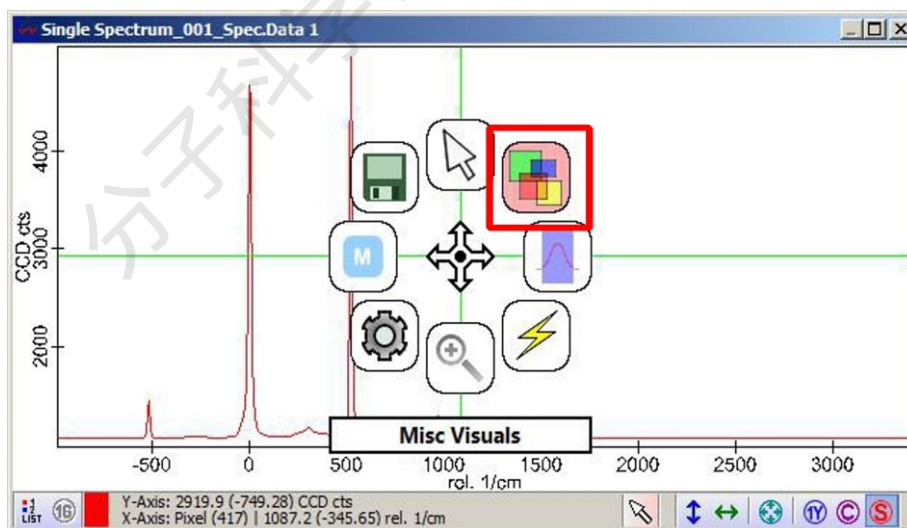


图 6-10 寻峰位置

b. 在【Misc Visuals】中选择【Peaks】

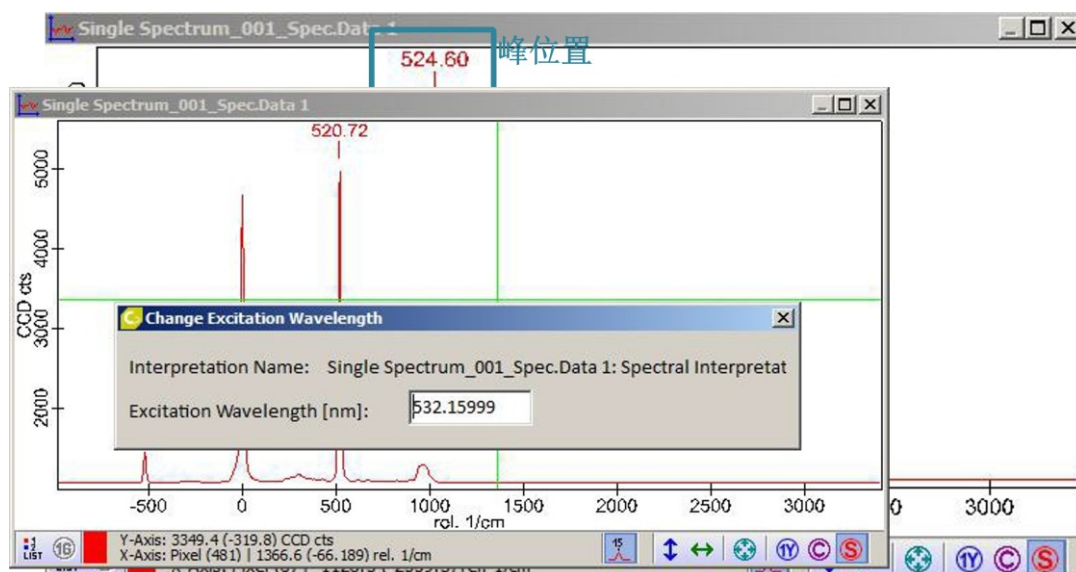


图 6-11 峰位校准

## c. 调整峰位置

在寻峰后的光谱中单击右键，选择【Change Excitation Wavelength】。

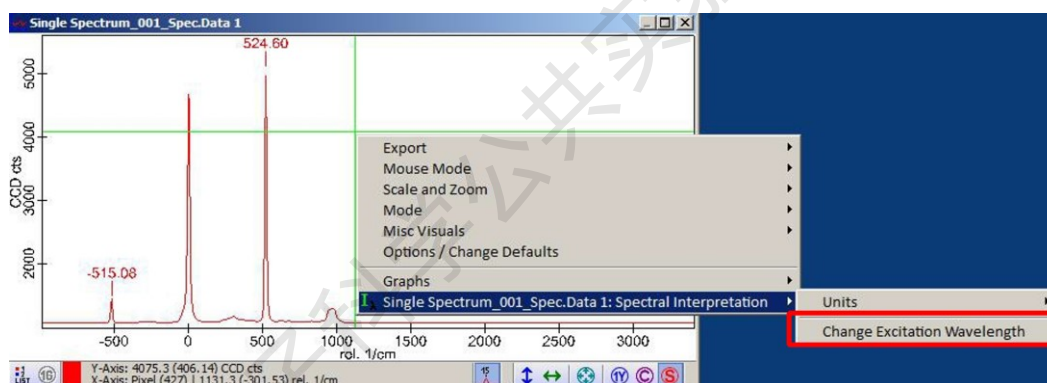


图 6-12 调整峰位置

点击“OK”，以调整 Si 峰位置。



图 6-13 校准完成

利用键盘上下键调整【Excitation Wavelength】数值，至 Si 的峰位变为  $520.7 \text{ cm}^{-1}$  左右，硅峰偏大往大调，硅峰偏小往小调。

注：根据拉曼位移公式：

$$R_{shift} = \left( \frac{1}{\lambda_{laser}} - \frac{1}{\lambda_{CCD}} \right) \times 10^7$$

通过 Si 的标准峰位及调整入射光位置，间接调整出射光位置。

d. 将调整后的【Excitation Wavelength】数值复制



图 6-14 复制调整后的数值

3. 更改参数，【Menu】-【Advanced】-【Change Laser Wavelength】，点击【Yes】，以更改参数

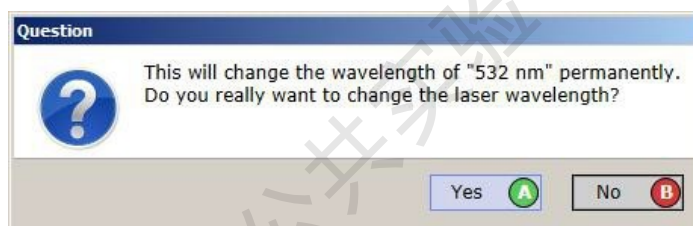


图 6-15 确认校准峰位置

4. 将复制的【Excitation Wavelength】数值粘贴到【Laser Wavelength】中，完成硅片校准。

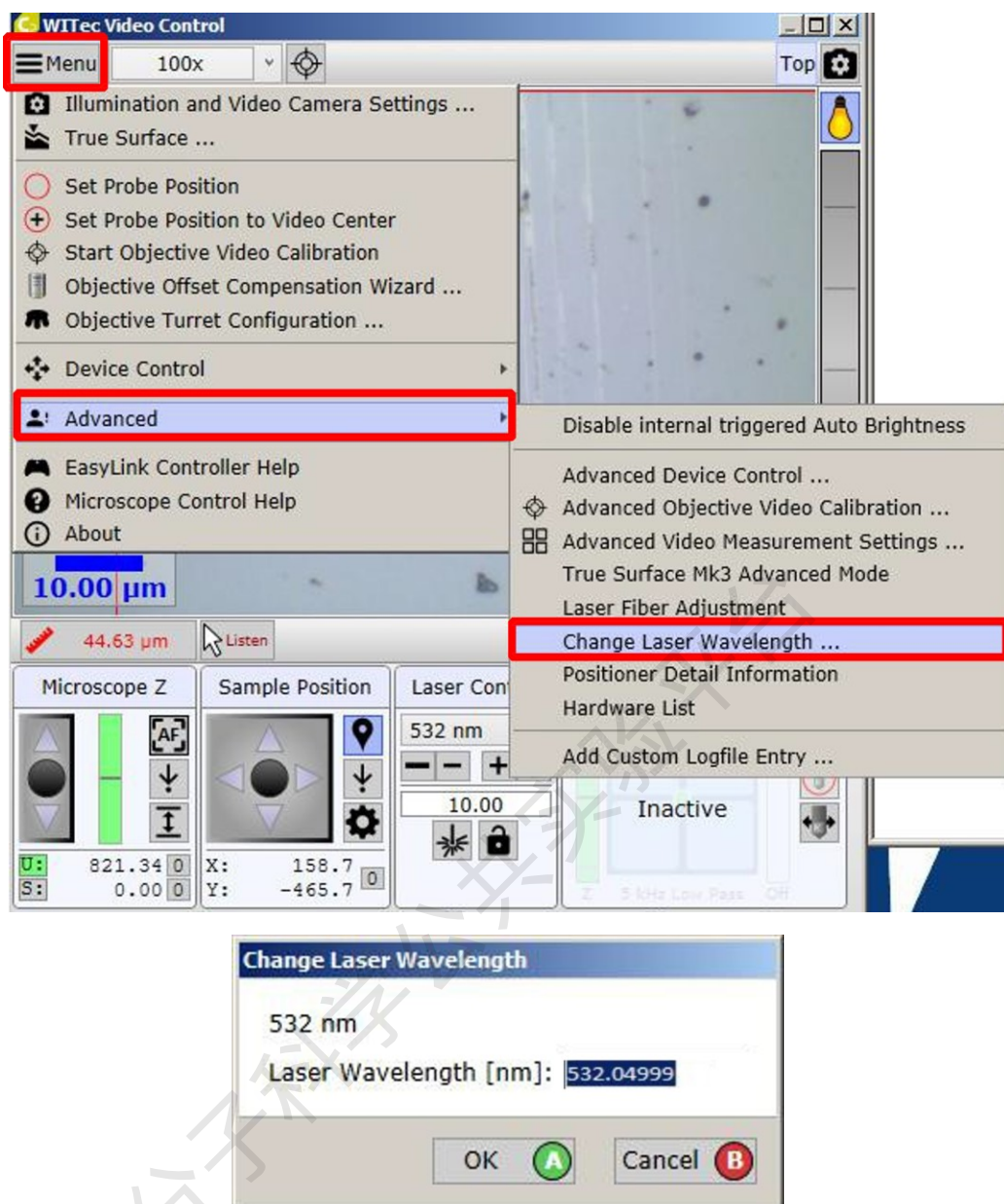


图 6-16 完成校准

5. 重新采集光谱, 可以看到硅片校准已经完成

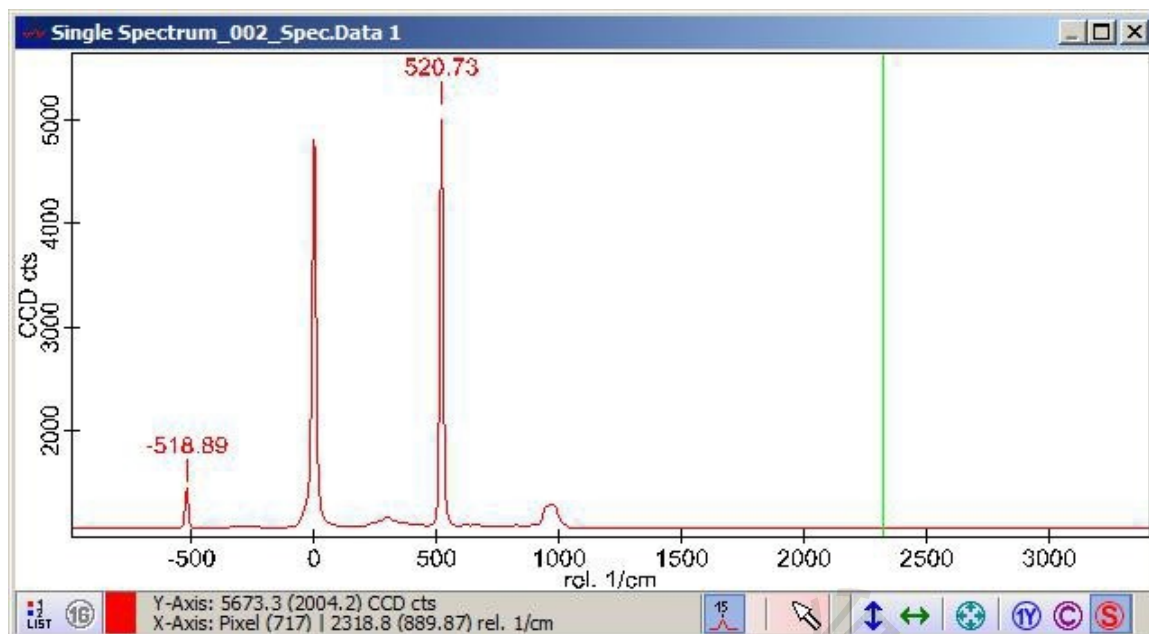


图 6-17 校准后的硅片谱图

## 6.2.5 拉曼光谱测试

采集光谱过程，一般遵循该测试规则：点光谱（优化积分时间、积分次数和激光功率）→线扫（位置和形状大小）→面扫及 3D 成像。

1. 高效寻找样品：白光聚焦好样品，用上述的方法拍白光照片/图像拼接/景深合成。
2. 采谱参数优化：
  - 1) 样品信号强：如下图所示，利用【Oscilloscope】实时采集拉曼信号来优化信号的参数，包括激光功率、积分时间以及聚焦；

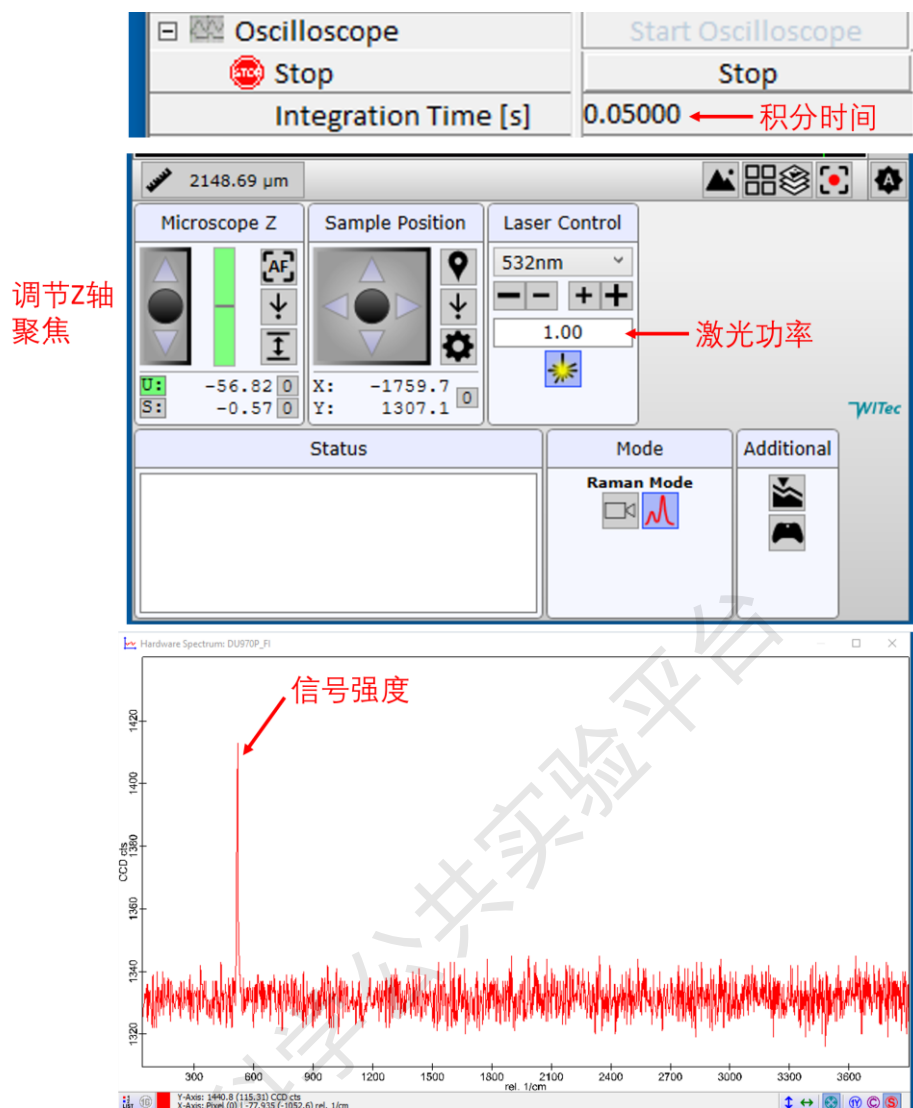


图 6-18 强信号样品参数优化

2) 样品信号弱: 将激光功率设置到较小(先输入 0.1, 再按“-”进一步降低, 直到显示为 0.00), 调节聚焦使得激光光斑最小, 如图 6-19 所示, 图像会变得清晰。然后在单谱采集对话框中优化最佳积分时间和累积次数, 后面会具体介绍每一种采集模式。

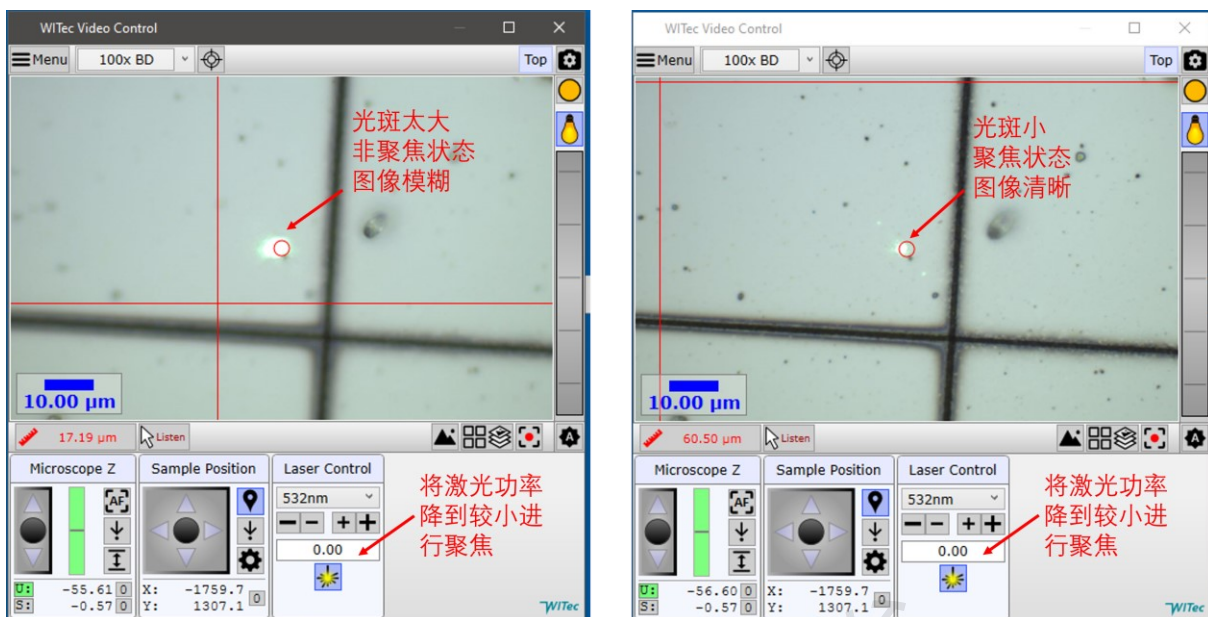


图 6-19 弱信号样品光斑聚焦

### 3. 点光谱采集:

在采集光谱之前, 必须先设置好光谱仪的参数, 包括光栅刻线数、光谱单位、光谱中心波数等。光栅刻线数越高, 光谱分辨率越高, 但测试范围会变小, 信号强度也会弱一些。图 6-20 总结了刻数线与采集范围的关系以及避免瑞利散射出现的中心波数设置, 用户也可以根据实际需求自行调节。

Spectrograph 1		[2200.001, G1: 300 g/mm E
Grating		G1: 300 g/mm BLZ=500nm
Listen		Never
Center Wavelength [nr		602.638
Laser Wavelength [nm]		532.093
Spectral Unit		rel. 1/cm
Spectral Center		2200.001
Exit Mirror		Front
Options		Options
Spec Camera 1		[CCD 1]
Spectral Stitching		Start Stitching

更换光栅 (300/600/1800 刻线)

更换光谱单位

更换光谱中心

刻线数	范围	中心波数	能量
300	~4000cm-1	2200cm-1	高
600	~2200	1125cm-1	中
1800	~600cm-1	330cm-1	低

图 6-20 光谱仪参数

单谱采集的参数主要包括积分时间和积分次数, 其中增加积分时间, 能提高拉曼信号强度; 增加累积次数, 提高光谱信噪比。



Single Spectrum	[10, 0.015]
Acc. Single Spectrum	Acc. Single Spectrum
Stop	Stop
Integration Time [s]	0.015 积分时间
Accumulations	10 积分次数
Infinite Accumulation	No

图 6-21 点光谱采集参数设置

4. 线扫和 Mapping 成像:

线扫参数设置如图 6-22 所示, 分辨率由其组成点数的多少决定, 选择【Once】或者【Multiple】在 Video 图像上单次画线或者多次画线, 单次画线画完后, 下拉菜单自动变为【Never】, 采用多次画线扫之前要手动将下拉菜单改为【Never】以确定画线区域。线扫的积分时间和积分次数的参数设置同图 6-21 的单谱扫描进行类似设置。

Line Scan	Start Line Scan	← 点击开始线扫
Stop	Stop	
Line Scan Mode	Sample Positioner	
Nr. of Points	200	← 线的点数
Listen Line	Never	
Start Point	Never	← 单次画线
Start X [μm]	Once	← 多次画线
Start Y [μm]	Multiple	
Start Z [μm]	-2543.8999	
End Point	[-458.20001, -2574.7, -51.5]	
End X [μm]	-458.20001	
End Y [μm]	-2574.7	
End Z [μm]	-51.549999	

起点坐标 { Start X, Start Y, Start Z }  
 终点坐标 { End X, End Y, End Z }

图 6-22 线扫的参数设置

本仪器可以对样品进行 XY 平面成像, XZ 平面成像和 3D 成像。成像模式的所有参数都需在【Large Area Scan】栏中进行设置。如图 6-23 所示, 首先在【Scan Method】选择成像的模式, 然后在【Listen Position】的下拉菜单在 Video 图像上进行区域选择, 确定区域后, 再确定每个维度上的扫描点数, 100×物镜下, XY 平面的最高分辨率为 300 nm 左右 (确切说来, 532 nm 激光分辨率为 300~350 nm, 473 nm 激光分辨率为 280~300 nm, 633 nm 激光分辨率为 350~370 nm), 要达到成像的最高分辨率, 可以设置 X, Y 的点数为 X 轴, Y 轴尺寸的三倍左右。比如 X 轴长为 100 μm, X 轴上共设置 300 个点, 则每个点的大小为 300 nm 左右。Z 轴的分辨率为 900 nm 左右, 所以 Z 轴的点数为 Z 轴

尺寸的 1.1 倍即可。设置完以上的所有参数, 点击 **【Start Large Area Scan】** 进行 Mapping 成像。

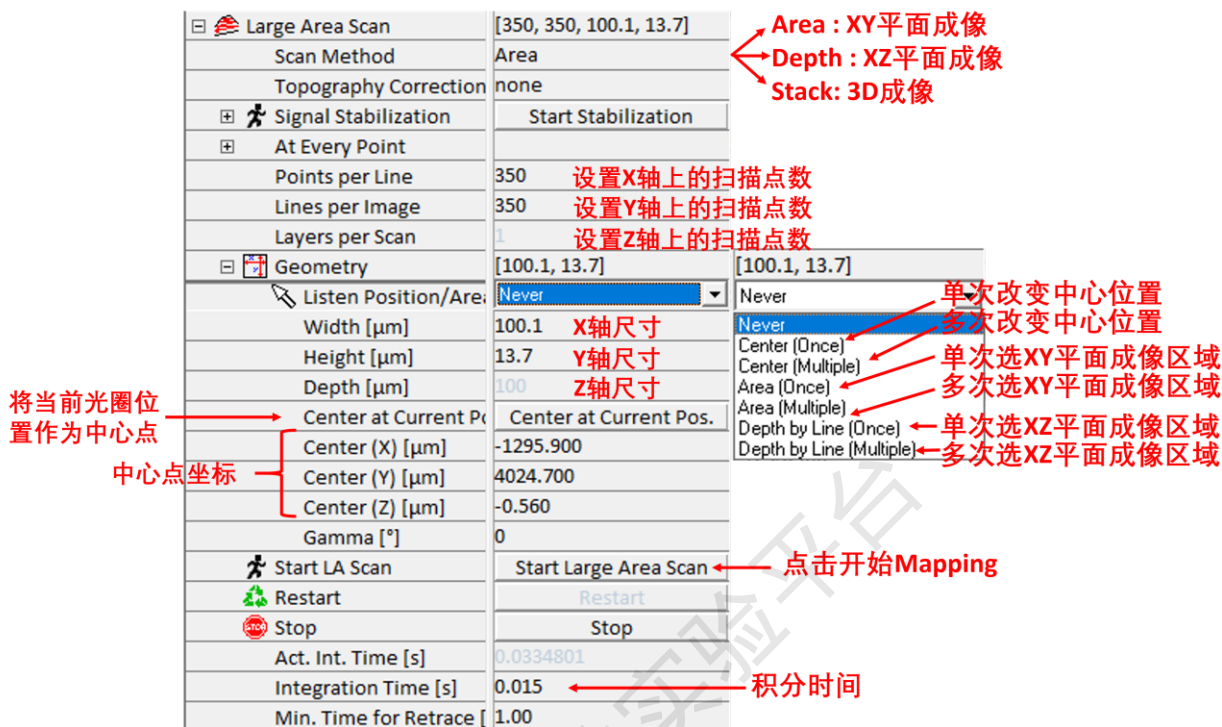


图 6-23 Mapping 成像的参数设置

### 6.3. 数据处理

**【Project Manger】** 里的各个图标代表了不同的数据, 每类数据所处理的方式也不一样, 下面我们逐个进行展开说明。

#### 认识数据图标

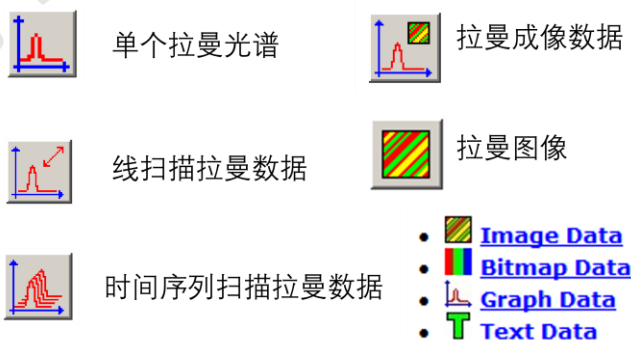


图 6-24 **【Project Manager】** 各图标所代表的的数据

#### 6.3.1 单谱处理

图 6-25 标注了单谱数据上每个图标的内容, 对图标单击就能完成所需要的操作。不必展开每项操作演示, 下面重点介绍单谱处理过程中最常用的几个流程。

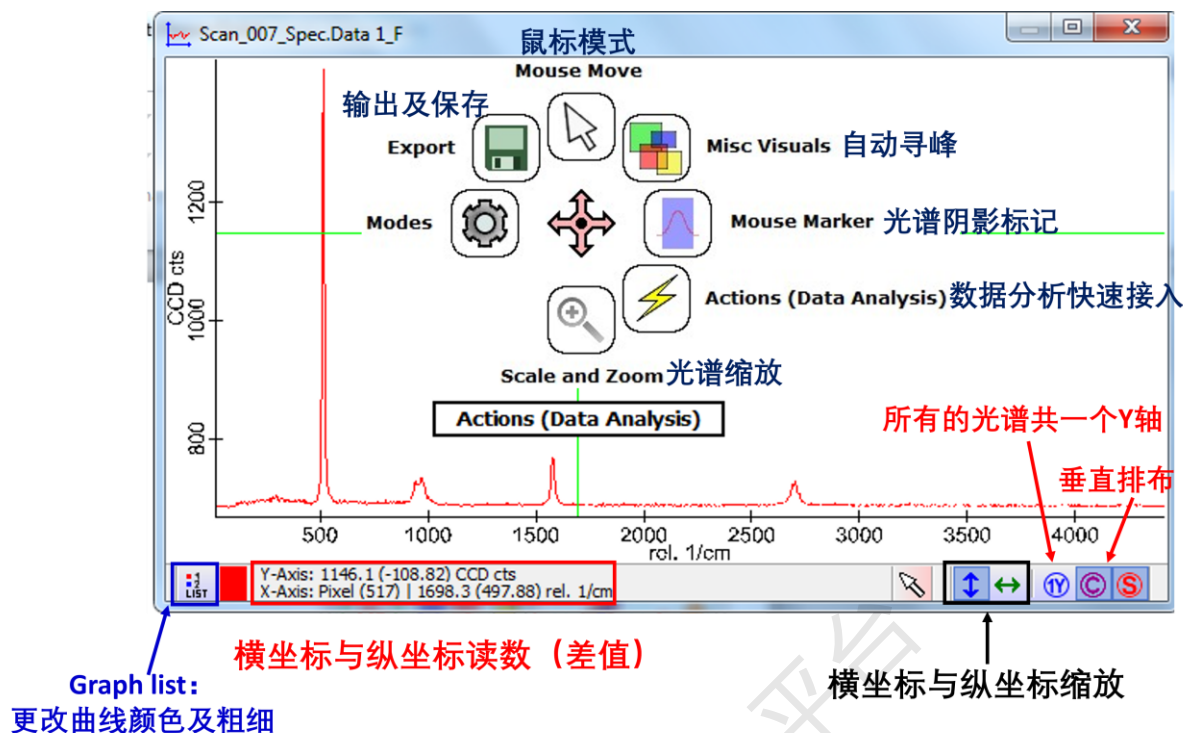


图 6-25 单谱数据窗口各个图标的含义

1. 去除宇宙射线:

单谱测试过程中的宇宙射线是常见的一种干扰，通常是非常细的一个信号，可能出现在任意波数。在软件中专门提供了去除宇宙射线的操作。如图 6-26 所示，将单谱拖拽会弹出多种操作窗口，选择【CRR+Smooth】，则在再次弹出的窗口中选择【CRR】，调整【Filter Size】和【Dynamic Factor】的参数同时观察谱线的变化，如图所示，原则是既去除了宇宙射线，又保证样品的信号不受影响，然后点击【Extract】完成。

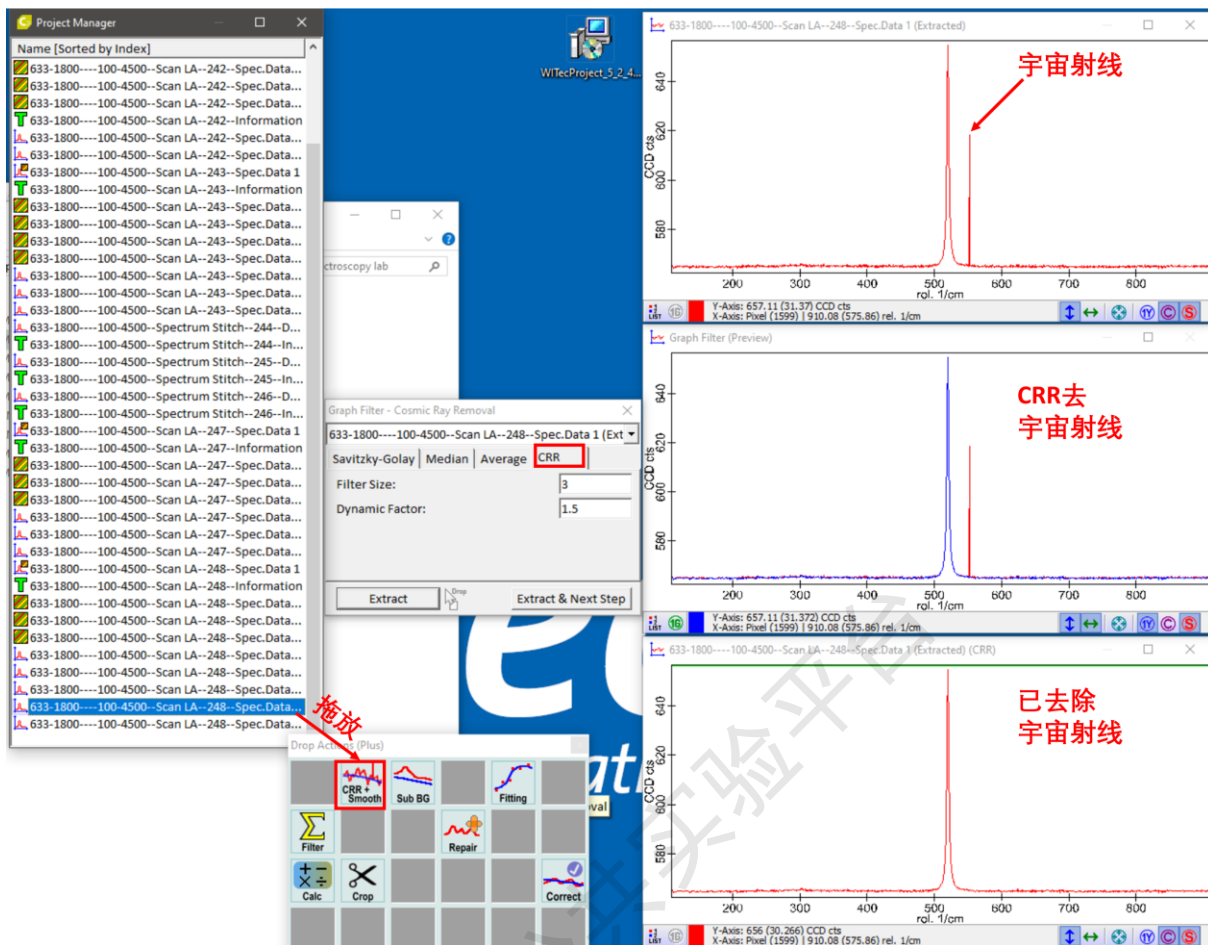


图 6-26 单谱去除宇宙射线

## 2. 去除荧光背景:

单谱测试过程中的有些样品会出现荧光背景干扰，通常是非常宽的信号，WITec 软件中专门设计了【Shape】算法，即用不同直径的小球去与曲线相切（因为荧光是宽峰而拉曼是窄峰，它们曲率不一样）。操作方法和去除宇宙射线基本一致。先拖拽出【Sub BG】窗口，选择【Shape】对话框，不断调整里数值，直到较好地去除荧光而不影响拉曼信号，然后点击【Extract】完成，如图 6-27。

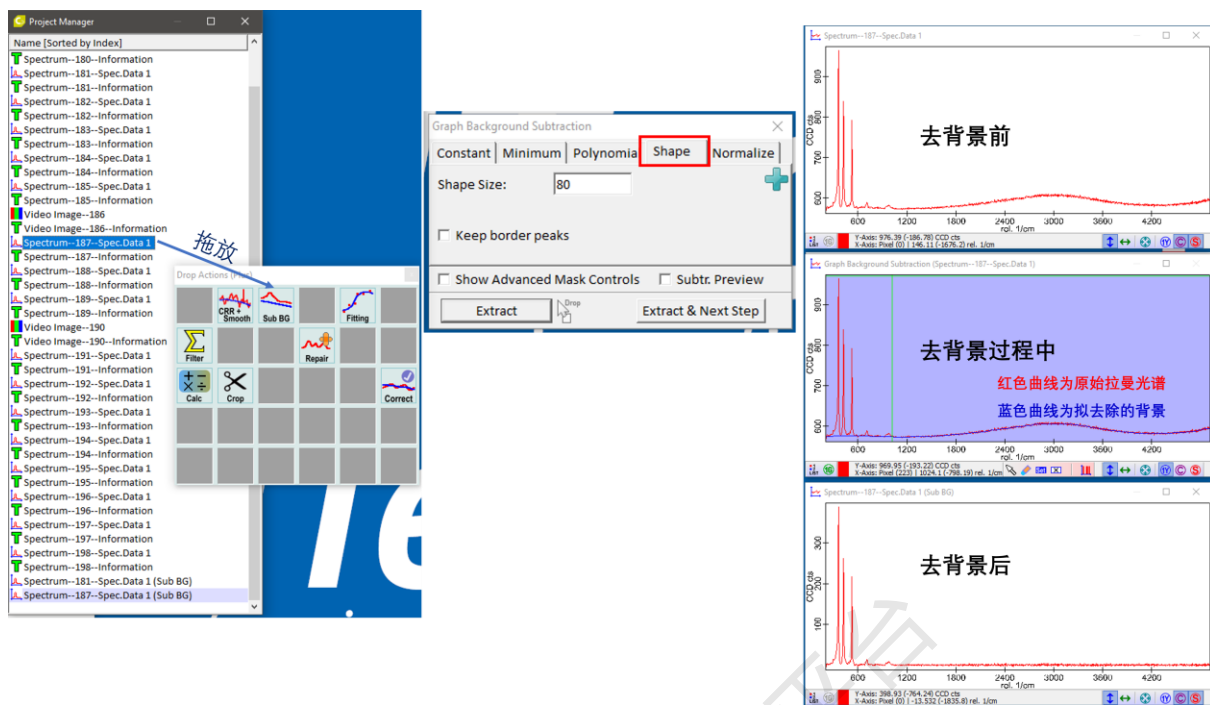



图 6-27 单谱去除荧光背景

### 3. 批量导出光谱数据:

在测得了大量单谱后, 有时候需要导出大量的有效数据用 origin 软件重新做图, 软件上可以批量导出数据, 具体操作如下: 在【Project Manager】选中需要导出的所有数据→右键放掉→选中【Export】→【Table】→【Export Into Several Files】→【Use Data Object Name】, 点【OK】完成。(注意, 如果导出的数据需要更改单位, 比如荧光信号用 nm 作单位, 在【Export Filter Options】点击【XUnits】→【Spectral Unit】在右边的下拉菜单选择相应的单位, 点击【OK】)

## 6.3.2 Mapping 图像处理

1. 在【Project Manager】窗口上, 单击按住鼠标左键拖拽移动任意方向; 【Drop Actions】

会自动弹出, 拖放到  图标上, 弹出【Filters】对话框。在【Create Filters】中可以根据需要, 选择峰面积、峰位、峰宽等。每建一种 Filters 方式, 都马上会生成相应的图像, 如上图 6-28 所示, 建立了三种 Filter 模式, 即有相应的三个图像与之对应。在【Filters】窗口右边的【Width】上, 鼠标左键双击, 由绿色变成红色在光谱窗口上鼠标左键划动选择区域 (Shift+鼠标左键为擦除已选择的区域)。在【Background Subtraction】中选择去除光谱的荧光背景, 拉曼成像一般选【4, 4】, 荧光成像改为【0, 0】。【Quick Filter】保存/调用 Filter 参数。【Extract/All】输出单个/全部图像。【Spatial Average Size】平均光谱的空间范围。

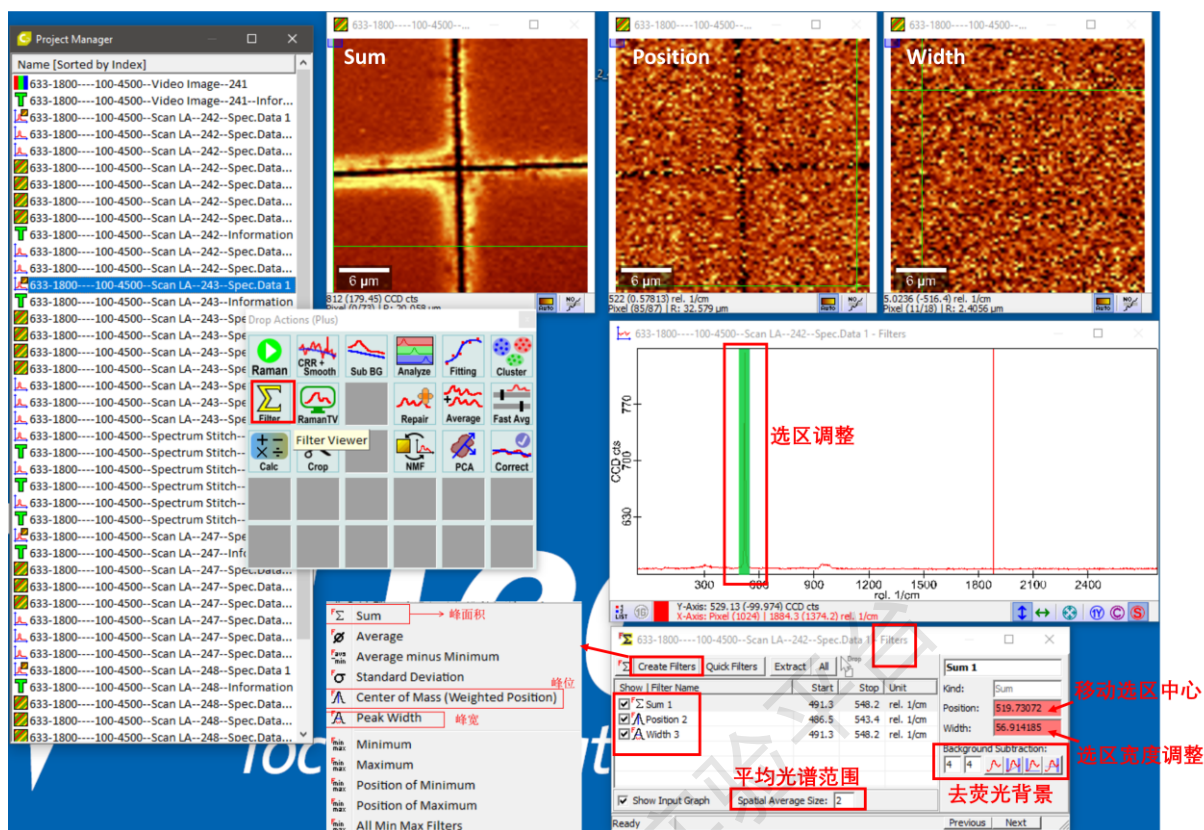


图 6-28 Mapping 图像处理


2. 【Filters】窗口中可以【Extract/All】输出单个/全部图像后，可以像前面的单谱一样对图像进行各种处理。打开图像，按住右键不放，可以显示图 6-29 所示的窗口。其中窗口能对图像做很多数学上的处理。下面重点介绍两个常用的运算处理及如何导出拉曼图像数据。



图 6-29 图像窗口中各个图标的含义

3. 图像运算【Calc】处理需要同时拖放两幅图像，如图 6-30 所示，然后在弹出的窗口进行两幅图之间的运算。可以实现的运算包括：1) 计算拉曼图像强度比 (石墨烯的 I2D/IG)，材料内部应力-拉曼峰位图像运算。2) 拉曼成像光谱数据与拉曼单谱/多个谱之间的运算，也包括线扫描与时间序列数据。3) 同一次及同像素拉曼成像的图像之间运算。

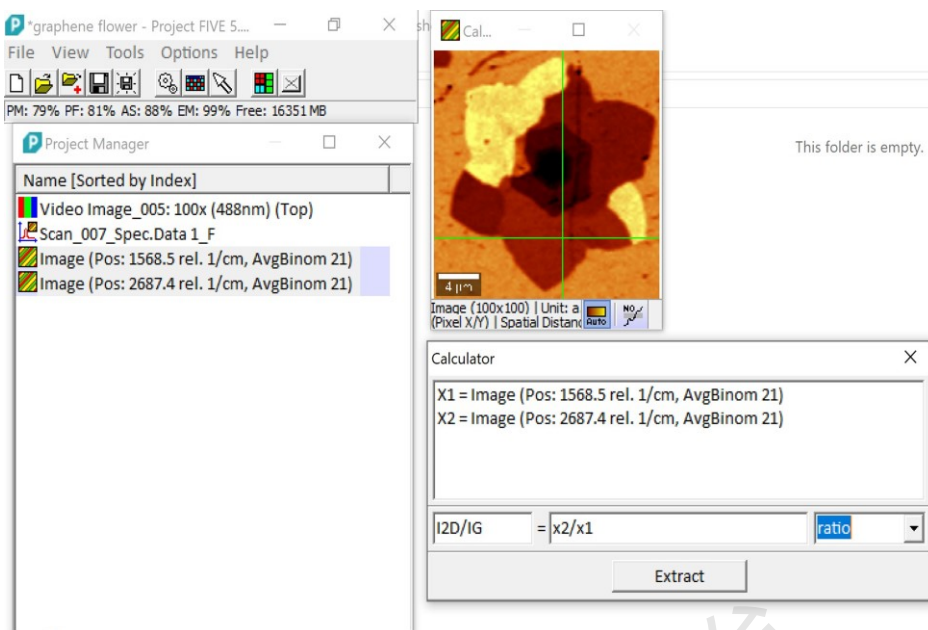


图 6-30 图像运算【Calc】处理

4. 通过拉曼图像截面【Section】来分析沿线材料性质：如种类、晶体结构、缺陷等分布。操作步骤：1) 将拉曼图像拖拽放到【Section】。2) 在图像上，直接用鼠标划线，在谱线窗口获得统计分布。3) 在【Advanced Options】中，调节划线宽度、起始点坐标及划线方向。

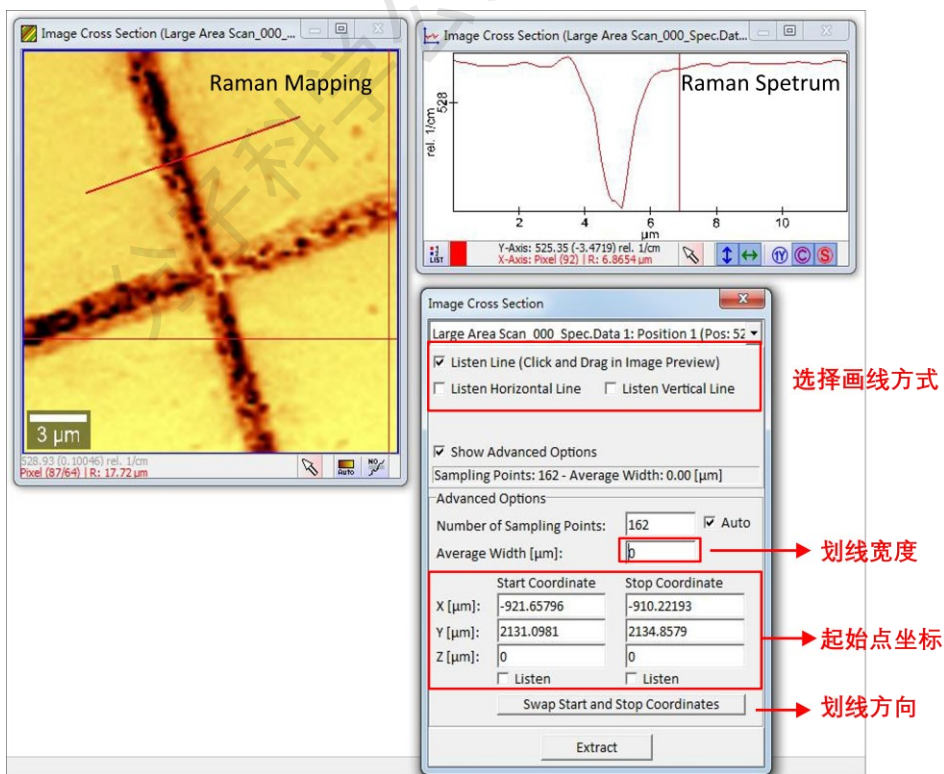


图 6-31 拉曼图像截面【Section】

5. 通过对图片的一系列处理后, 有时候需要导出图片格式的文件, 在图片在右击【Export】  
内部文件, 请勿随意转发、打印、复印



后对出现图片导出窗口, 具体参数设置如图 6-32 所示, 导出的图片可以添加颜色标尺, 用以区分各个像素点上信号的强度。

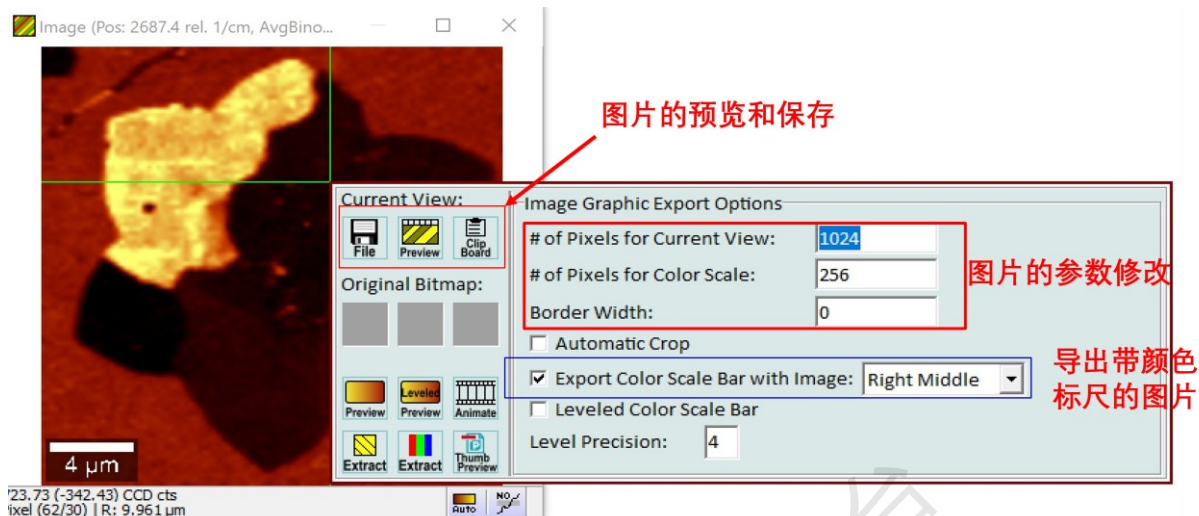


图 6-32 拉曼图像的导出

## 6.4. 原位拉曼光谱测试

### 6.4.1 电化学原位拉曼测试

#### 6.4.1.1 粉末材料电化学原位拉曼测试

##### 1. 制样:

- (1) 每次用完后即时倒掉电解液, 拧开螺丝, 冲洗干净, 擦干备用。
- (2) 取下工作电极 (铂碳电极), 用氧化铝粉末打磨干净, “8”字形来回摩擦几圈即可, 然后冲洗干净, 擦干备用。
- (3) 浆料配置: 将粉末电极材料与水、乙醇、粘结剂按一定比例搅拌混合。
- (4) 每次取 10  $\mu\text{L}$ , 滴在铂碳电极中心, 60  $^{\circ}\text{C}$  烘干约 3 分钟, 重复滴 4 次烘干。
- (5) 安装工作电极, 插入参比电极、对电极, 拧紧整个电化学工作台, 注入电解液, 观察一段时间, 确保不能漏液。

##### 2. 搭电化学台:

将电化学台放在拉曼样品台上方中间位置。参比电极, 对电极, 工作电极分别与电化学工作站相连接。电解液循环进出口与蠕动泵相连接。

##### 3. 测试:

在电化学工作站设置参数进行电化学测试, 在拉曼软件上根据测试需求进行拉曼测试, 记录材料在通电过程中拉曼数据。

**注:** 测试过程中, 避免电解液漏液, 聚焦时减少气泡的干扰。

#### 4. 拆电化学台：

- (1) 抬高物镜，取下电化样品台。
- (2) 取出样品，清洁样品台，归位。

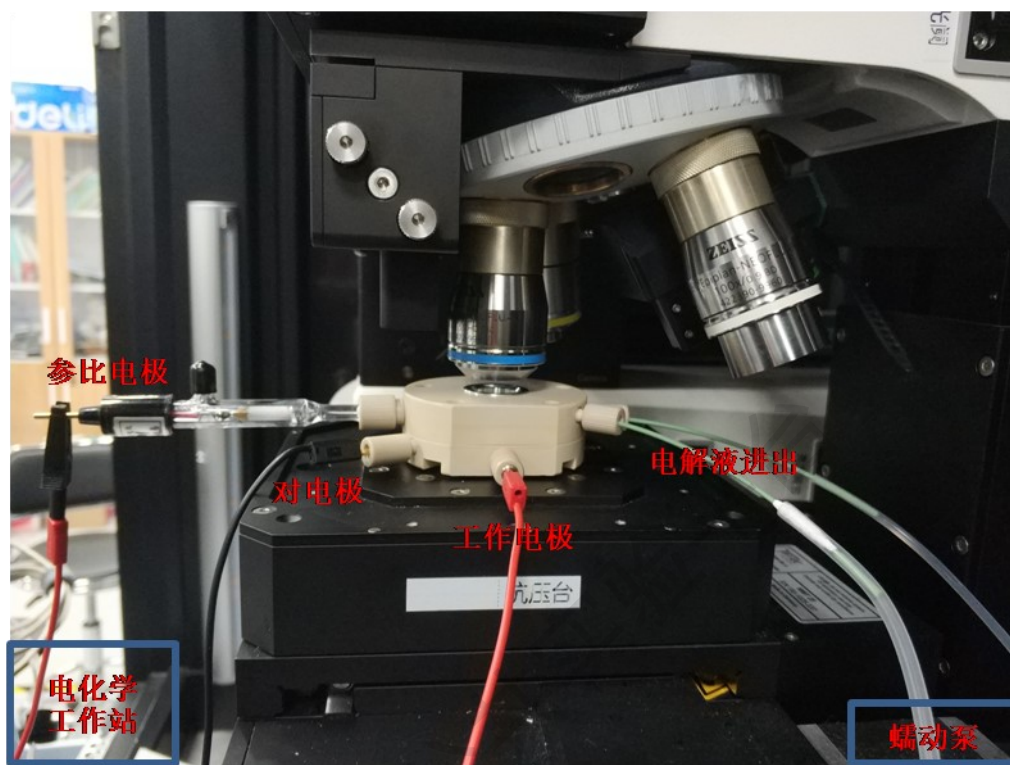


图 6-33 粉末材料电化学原位台搭建

#### 6.4.1.2 块状材料电化学原位拉曼测试

##### 1. 制样：

- (1) 取样：每次用完后即时倒掉电解液，拧开螺丝，取出工作电极，电化学台冲洗干净，擦干备用。
- (2) 工作电极面积必须大于圆窗口，一端用铜胶带粘连，引出工作电极接线与电化学工作站相连接。
- (3) 工作电极待测面紧贴圆窗口，并用胶带固定与电化学台固定，放上垫片、后盖，螺丝拧紧。
- (4) 插入参比电极、对电极，拧紧整个电化学工作台，注入电解液，观察一段时间，确保不能漏液。

##### 2. 搭电化学台：

将电化学台放在拉曼样品台上方中间位置。参比电极，对电极，工作电极分别与电化学工作站相连接。电解液循环进出口与蠕动泵相连接。

### 3. 测试:

在电化学工作站设置参数进行电化学测试, 在拉曼软件上根据测试需求进行拉曼测试, 记录材料在通电过程中拉曼数据。

**注: 测试过程中, 避免电解液漏液, 聚焦时减少气泡的干扰。**

### 4. 拆电化学台:

- (1) 抬高物镜, 取下电化学样品台。
- (2) 取出样品, 清洁样品台, 归位。

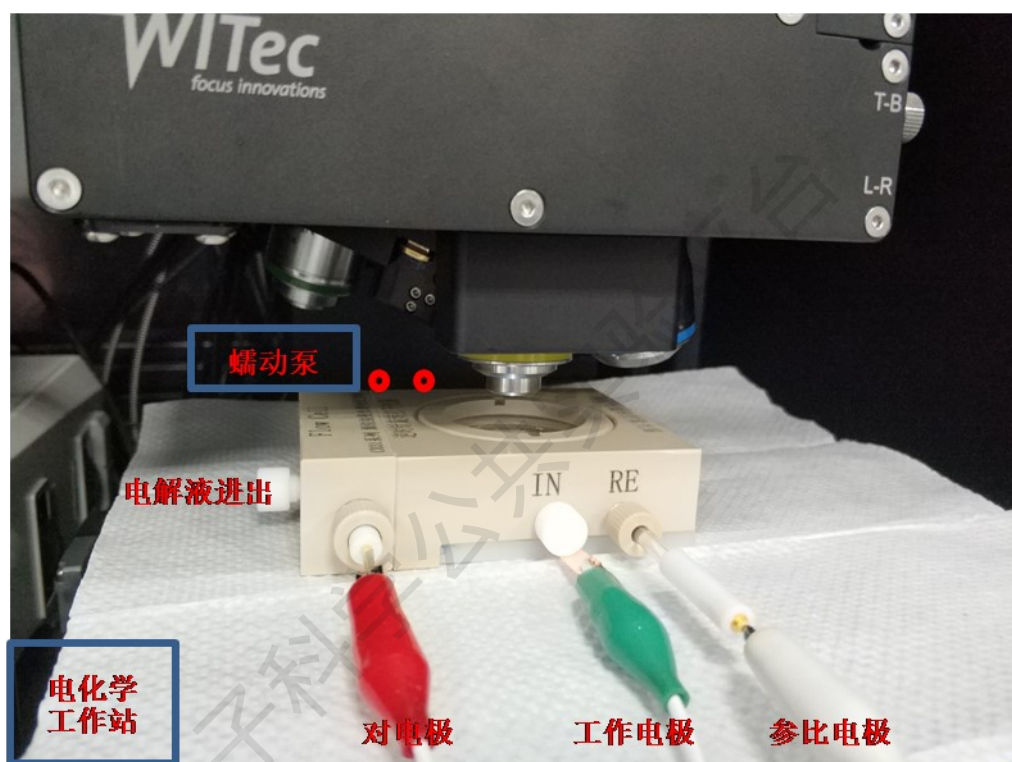


图 6-34 块体材料电化学原位台搭建

### 6.4.2 低温原位拉曼测试

1. 装样: 将低温台上面盖旋开, 样品放入圆窗口下, 再旋紧盖子。
2. 搭低温台:
  - (1) 取下普通样品台, 放上低温台, 螺丝固定。
  - (2) 通氮气: 进气口与气路相连, 出气口与水瓶相连, 观察出气量, 若实验到液氮温度, 插上氮气吹气口, 吹扫样品仓表面水气。
  - (3) 低温台右侧接口分别连液氮、控制器和泵。
  - (4) 泵与控制器、低温台、电源相连。
  - (5) 控制器与泵低温台, 电源, 电脑相连。

### 3. 测试:

- (1) 打开软件【LINK】，点击【Controller】 - 【Connect USB】。
- (2) 设置参数:【Rate】: 升降温速度，一般 10-40 °C;【Limit】: 实验温度;【Time】: 测试时间，尽量大。
- (3) 点击▲（结束）转换为■（运行），即开始升降温到目标设定温度。
- (4) 根据实验需要进行拉曼测试。
- (5) 更换不同温度，需稳定 10 分钟后再继续测试，测试温度范围-196 °C到 600 °C。

### 4. 拆低温台:

- (1) 确定降到室温后，关闭气路，拆除液氮。
- (2) 抬高物镜，拆下低温台，关闭控制仪，安装常用样品台。
- (3) 取出样品，清洁样品台，归位。

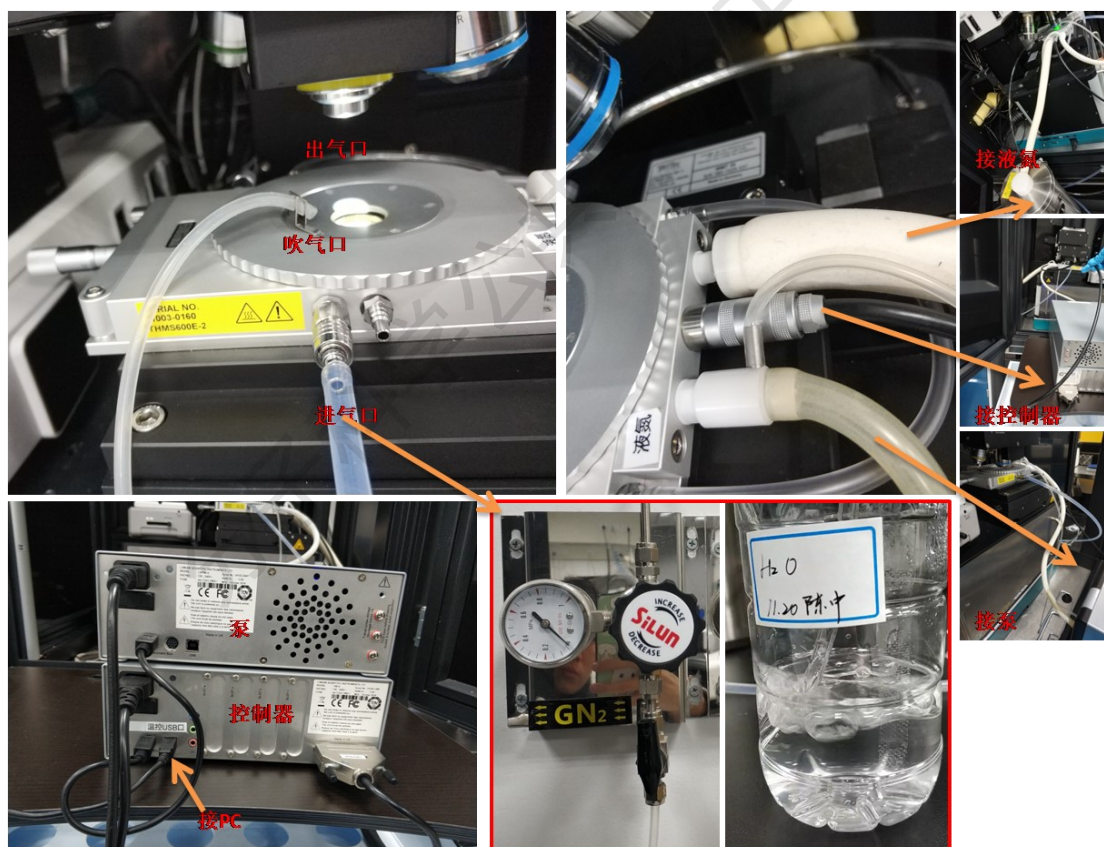


图 6-35 低温原位台搭建

## 6.4.3 高温原位拉曼测试

### 1. 装样:

- (1) 将样品放进小坩埚，尽量压平，若易蒸发的样品盖上石英玻璃盖。
- (2) 将高温台上面盖旋开，样品放入圆窗口下，再旋紧盖子。

## 2. 搭高温台:

- (1) 取下普通样品台, 放上高温台, 螺丝固定。
- (2) 通气路: 腔室内通高纯氩气, 进气端接气路, 出气端接水瓶, 方便查看气泡, 判断气流大小以及是否出气。
- (3) 循环水: 水从泵打出, 进入样品台上盖, 再引到样品台下托, 最后出来到泵, 如此循环。实验前先开循环水, 实验结束降温后先关循环水, 实验中关注水保持循环状态。
- (4) 接控温仪: 右端黑线接 VAC, 左端粗线接 T965TAGE, 细线接 TCC。
- (5) 控温仪显示屏调节实验参数: **【Rate】**: 升降温速度, 一般 10-50°C; **【Limit】**: 实验温度; **【Time】**: 测试时间, 尽量大。点击 ▲ (结束) 转换为 ■ (运行), 即开始升降温到目标设定温度。
- (6) 高温测试过程中, 吹风机对准显微镜, 防止显微镜过热。

## 3. 测试:

- (1) 打开拉曼软件, 根据需要进行选择测试方法。
- (2) 更换不同温度, 需稳定 10 分钟后再继续测试, 测试温度范围室温到 1500 °C。

## 4. 拆高温台:

- (1) 确定降到室温后, 关闭循环水, 再关闭气路。
- (2) 抬高物镜, 拆下高温台, 关闭高温控制仪, 安装常用样品台。
- (3) 取出样品, 清洁样品台, 归位。

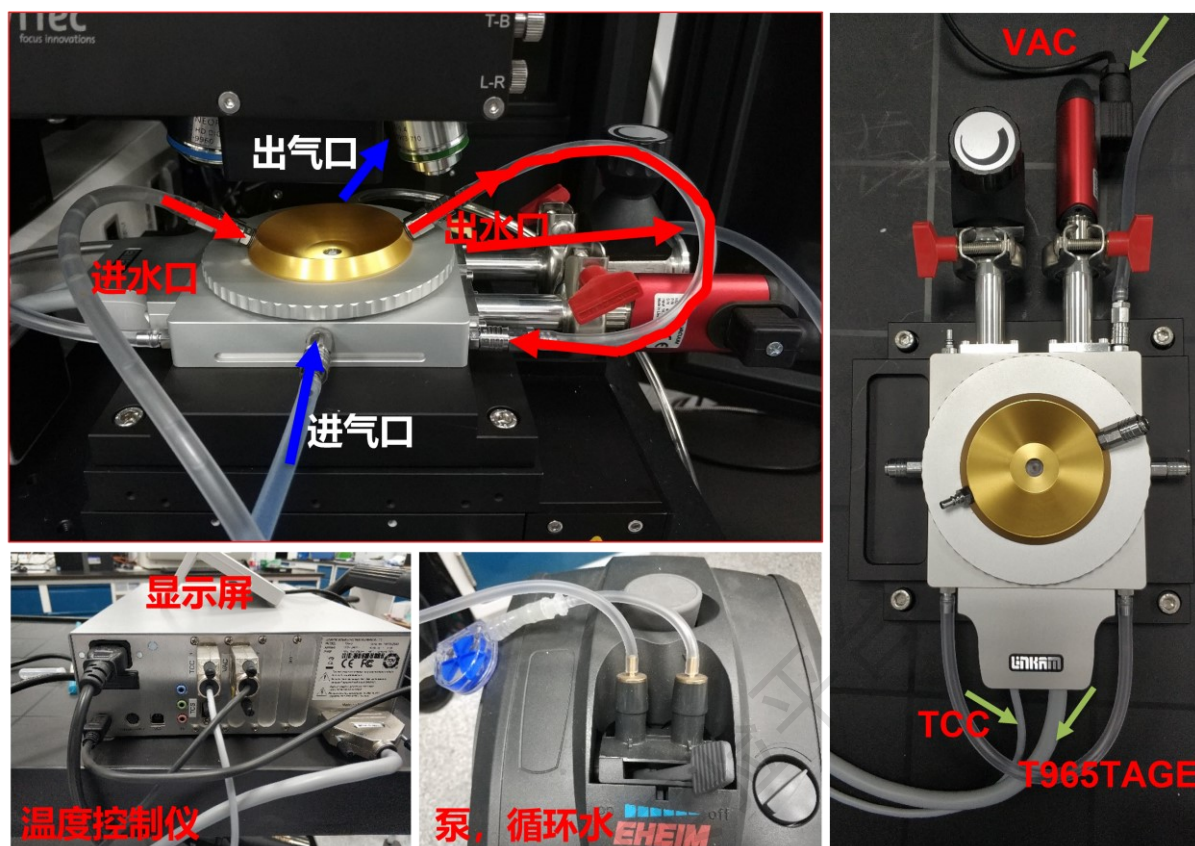



图 6-36 高温原位台搭建

## 6.5. 原子力显微镜操作 AFM

### 6.5.1 接触模式 AFM

1. 关闭软件再全断电, 把原测试台卸下来, 再把 AFM 测试台安装上, 注意线短不能拉。安针, 并插在 20 倍物镜后面卡槽内。
2. 打开控制器左右两侧的插座, 开电脑。打开控制软件之前, 先点击桌面右下角的紫色标图 , 确认【Microscope controller】, 【Spectral Cameral】, 【Top camera】, 【Bottom camera】状态正常✓, 且 Spectral Cameral 温度降到-60 °C, 再打开 【Control FIVE】软件。若状态不是全正常, 需点击 Initialize All Cameras, 等待到全正常状态, 再打开【Control FIVE】软件。【Configuration】下拉选择【AFM Contact】。
3. 先在其他倍率物镜聚焦, 对样品进行拍照, 纵坐标清零, 将样品向上抬 3000 μm 左右, 再轻轻旋转到带 AFM 针尖的 20 倍物镜。
4. 通过 【Control】栏中的【Adjustment】, 逐步手动操作实现 AFM 下针前的准备工作:

- (1) 探针以及针尖位置调整先手动探针到激光位置（即出现在显示屏上），再控制手柄，选 X 符号辅助，调整针尖到激光位置。确认激光已经打在探针上，点击 Next step，进入下一步操作，如下图。

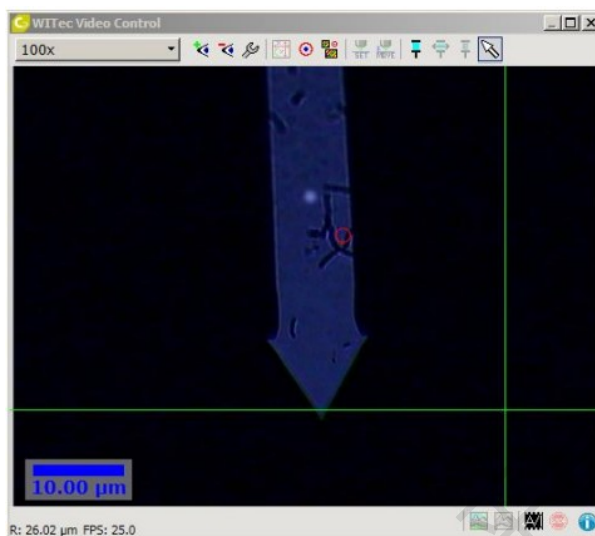


图 6-37 激光找探针位置

- (2) 调整反馈激光打在四象限二极管上的位置。（Adjust laser beam on segmented Photo diode），通过旋转设备 T-B 及 L-R 钮，确保 T-B 及 L-R 值接近 0。调整后，如下图，即圆点到最中心位置。点击 Next step，进入下一步操作。

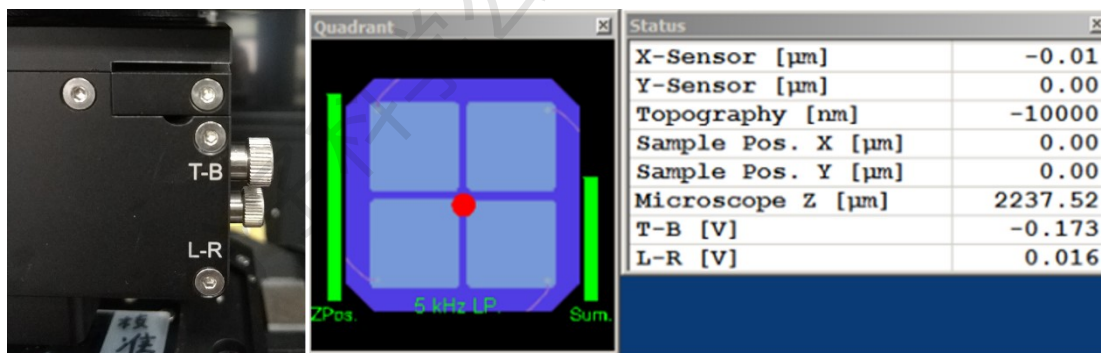


图 6-38 调整四象限位置


- (3) 反馈参数设置：【Feedback Settings】设置 Setpoint [V]: 0.7; P-Gain [%]: 8; I-Gain [%]: 8，每设置一个需到【Adjustment】点击【Next step】。调整参数直到红色蓝色线重合。

Feedback Settings	
Setpoint [V]	1.5
P-Gain [%]	5
I-Gain [%]	5
PI Controlled Channel	LockIn R

图 6-39 反馈参数设置

注：接触模式中，Setpoint 值代表探针与样品的力大小，Setpoint 越高，力越大。P-Gain [%] 正比例增益；I-Gain [%] 积分增益，P 或 I 过大会产生高频噪音（毛刺）(Ctrl +↑/↓可调节 Setpoint/P-与 I-gain 大小)。

#### 5. 进针 Approach:

- (1) 通过手柄下调 Microscope Z ( $\mu\text{m}$ )，下降到距离样品表面 2000  $\mu\text{m}$  左右。
- (2) 点击，自动进针。

#### 6. 扫描范围选择:

- (1) **【Image Scan】 【Points per Line/ Lines per Image】** 设置采点数目 (最大像素为 512x512)对于大面积的采点数目减小。
- (2) **【Geometry】【Width】【Height】** 设置扫描范围，不可超过蓝色框区域选择测试范围。
- (3) **【Center at Current Pos.】** 在蓝筐范围内设置采图位置，设置完点 never。
- (4) **【Time/Line (Trace) [s]】【Min.Time Retrace [s]】** 针尖返回的时间。
- (5) **【Start Scan】** 开始测试。

注：(1) 大范围移动位置需要先抬针，再移动。

- (2) 可以快速测大面积扫图，再在重新设置扫描面积，在图上选理想区域测试。
- (3) 测试过程中，不要动设备，保持稳定。

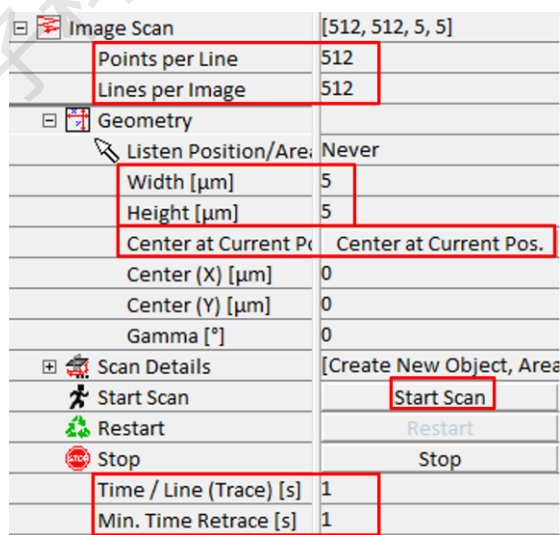



图 6-40 扫描范围选择

7. 测试结束后点击退针，再通过手柄向上调 Microscope Z ( $\mu\text{m}$ )，上升到距离样品表面 3000  $\mu\text{m}$  左右。



8. **关闭软件再全断电**, 把 AFM 测试台卸下来, 再把普通测试台安装上, 注意线短不能拉。轻轻取下针, 放置干燥箱保存。

9. 打开控制器左右两侧的插座, 开电脑。打开控制软件之前, 先点击桌面右下角的紫色标图  , 确认【Microscope Controller】, 【Spectral Cameral】, 【Top camera】, 【Bottom Camera】状态正常✓, 且 Spectral Cameral 温度降到-60 °C, 再打开【Control FIVE】软件。若状态不是全正常, 需点击 Initialize All Cameras, 等待到全正常状态, 再打开【Control FIVE】软件。

### 6.5.2 轻敲模式 AFM

1. **关闭软件再全断电**, 把原测试台卸下来, 再把 AFM 测试台安装上, **注意线短不能拉**。安探针, 并插在 20 倍物镜后面卡槽内, 如下图所示。

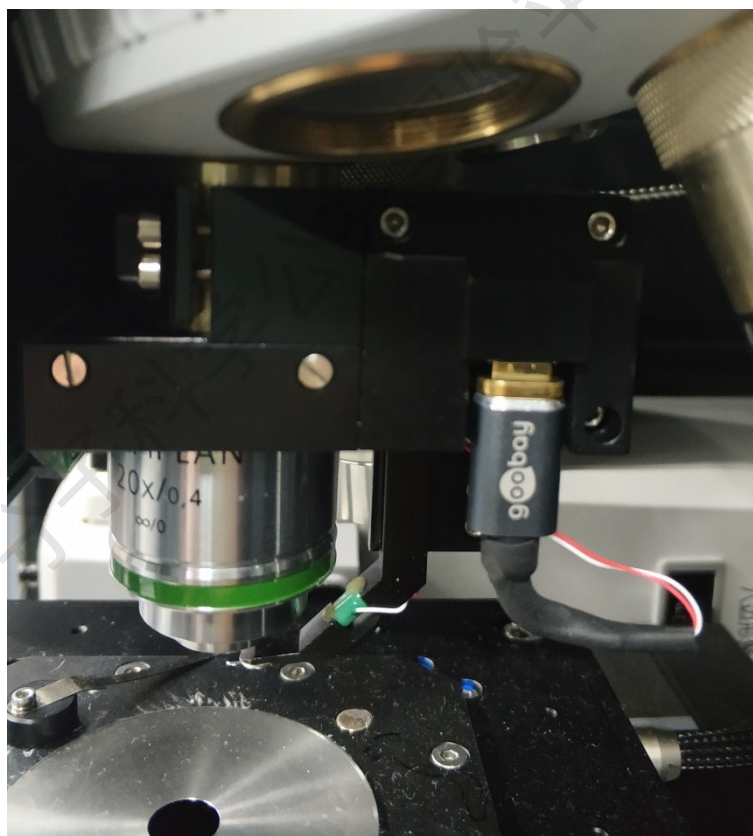


图 6-41 搭台子装探针

2. 打开控制器左右两侧的插座, 开电脑。打开控制软件之前, 先点击桌面右下角的紫色标图  , 确认【Microscope Controller】, 【Spectral Cameral】, 【Top Camera】, 【Bottom Camera】状态正常✓, 且 Spectral Cameral 温度降到-60 °C, 再打开【Control FIVE】软件。若状态不是全正常, 需点击 Initialize All Cameras, 等待到全正常状态,

内部文件, 请勿随意转发、打印、复印

再打开【Control FIVE】软件。【Configurations】下拉选择【AFM AC】。

3. 先在其他倍率物镜聚焦，再轻轻旋转到带探针的 20 倍物镜，坐标清零，将样品向上抬 3000  $\mu\text{m}$  左右，再轻轻旋转到带 AFM 针尖的 20 倍物镜。

4. 通过【Control】栏中的【Adjustment】，逐步手动操作实现 AFM 下针前的准备工作：

- (1) 探针以及针尖位置调整先手动探针到激光位置（即出现在显示屏上），再控制手柄，选 X 符号辅助，调整针尖到激光位置。激光已经打在探针上，点击 Next step，进入下一步操作，如下图。

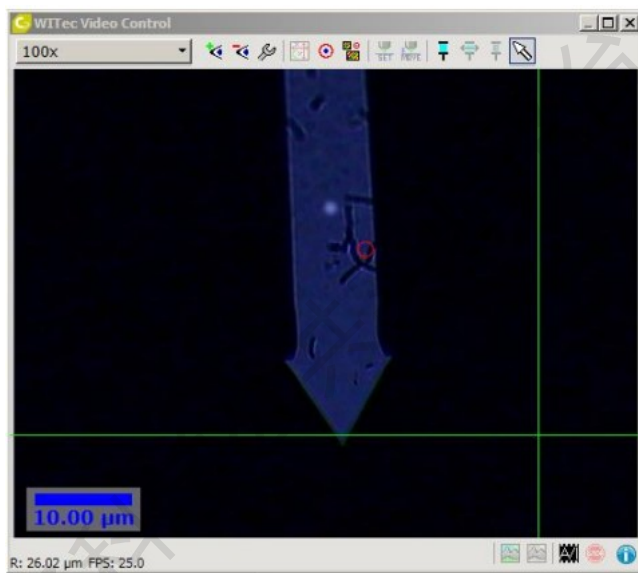


图 6-42 激光找探针位置

- (2) 调整反馈激光打在四象限二极管上的位置，通过旋转设备 T-B 及 L-R 钮，确保 T-B 及 L-R 值接近 0。调整后，如下图，即圆点到最中心位置。点击 Next step，进入下一步操作。

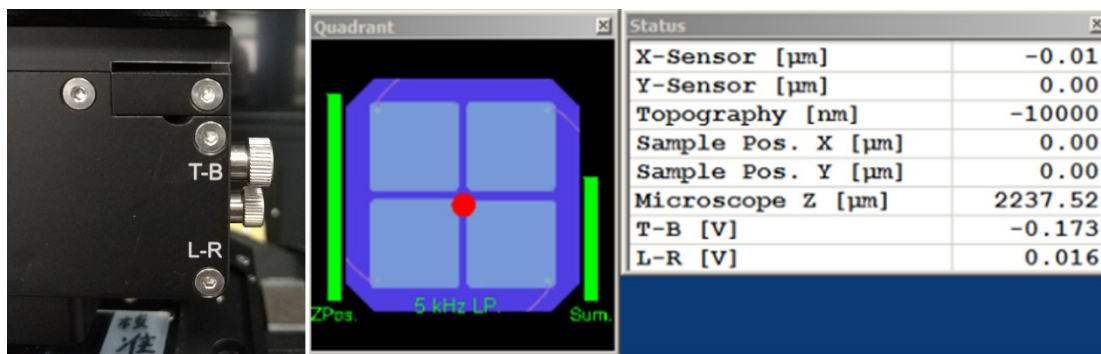
ZPos.5 kHz LP.Sum.

图 6-43 调整四象限位置

(3) 寻找共振频率, 设置【Driving Amp.pk-pk [V]】: 0.02~0.5 V 范围内任一值, 确保振幅 Amplitude ~ 1 V 左右。

1) 【Frequency Sweep】设置【Driving Amp.pk-pk [V]】如 0.1, 点击【Start Sweep】, 再到【Adjustment】点击【Next Step】, 【Status】观察是否 Amplitude ~ 1 V 左右。

Adjustment	[Laser on]
Frequency Sweep	[9765.625, 0]
Driving Amp. pk-pk [V]	0
Listen Range	Never
Initial Frequency [Hz]	50000
Final Frequency [Hz]	90000
Create Data	View Only
Start Sweep	Start Sweep
Stop	Stop
Auto Resonance	Auto Resonance
Listen Frequency	Never
Driving Frequency [Hz]	9765.625
Auto Phase	Auto Phase
Phase Offset [°]	0

图 6-44 扫频设置

2) 得到下图的 Amplitude/Phase~Frequency 图, 控制振幅在~1 V; 频率选定, Listen Frequency, 在 Amplitude Frequency 图上选择峰左边一点。

The screenshot displays the software interface during a frequency sweep. On the left, the 'Adjustment' and 'Frequency Sweep' panels are visible. The 'Listen Frequency' is set to 75029.102 Hz. The 'Status' window on the right shows the following parameters:

Status	
X-Sensor [μm]	0.00
Y-Sensor [μm]	0.00
Topography [nm]	-10000
Sample Pos. X [μm]	0.00
Sample Pos. Y [μm]	0.00
Microscope Z [μm]	2234.92
Amplitude [V]	3.349
Phase [°]	27.6

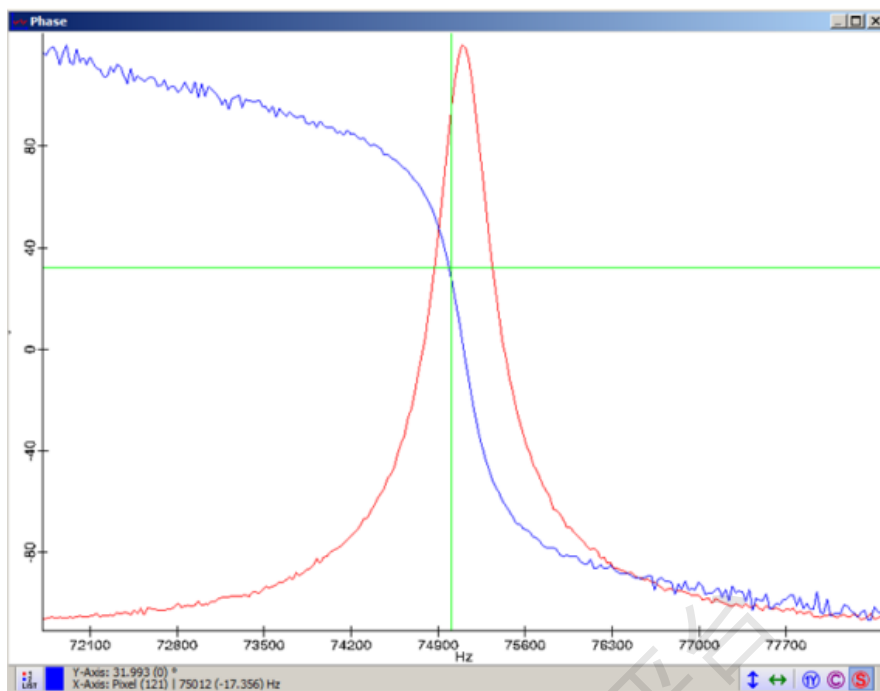


图 6-45 频率选定

- (4) 反馈参数设置: 【Feedback Settings】设置 Setpoint [V]: 0.7; P-Gain [%]: 8; I-Gain [%]: 8, 每设置一个需到【Adjustment】点击【Next Step】。调整参数直到红色蓝色线重合。


Feedback Settings	[1.5, 5, 5]
Setpoint [V]	1.5
P-Gain [%]	5
I-Gain [%]	5
PI Controlled Channel	LockIn R

图 6-46 反馈参数设置

注: 轻敲模式中, Setpoint [V] 值代表探针振动的振幅大小, Setpoint [V] 越小, 振幅越小, 力越大 (与接触模式相反)。

P-Gain [%] 正比例增益; I-Gain [%] 积分增益, P 或 I 过大会产生高频噪音 (毛刺) (Ctrl+↑/↓可调节 Setpoint/P-与 I-Gain 大小)。

#### 5. 进针 Approach:

- (1) 通过手柄下调 Microscope Z ( $\mu\text{m}$ ), 下降到距离样品表面 2000  $\mu\text{m}$  左右。
- (2) 点击 , 自动进针。

#### 6. 扫描范围选择:

- (1) 【Image Scan】 【Points per Line/ Lines per Image】设置采点数目 (最大像素为

512x512)对于大面积的采点数目减小。

- (2) **【Geometry】【Width】【Height】** 设置扫描范围，不可超过蓝色框区域选择测试范围。
- (3) **【Center at Current Pos.】** 在蓝筐范围内设置采图位置，设置完点 never。
- (4) **【Time/Line (Trace) [s】【Min.Time Retrace [s】** 针尖返回的时间。
- (5) **【Start Scan】** 开始测试。

注：(1) 大范围移动位置需要先抬针，再移动。

(2) 可以快速测大面积扫图，再在重新设置扫描面积，在图上选理想区域测试。

(3) 测试过程中，不要动设备，保持稳定。

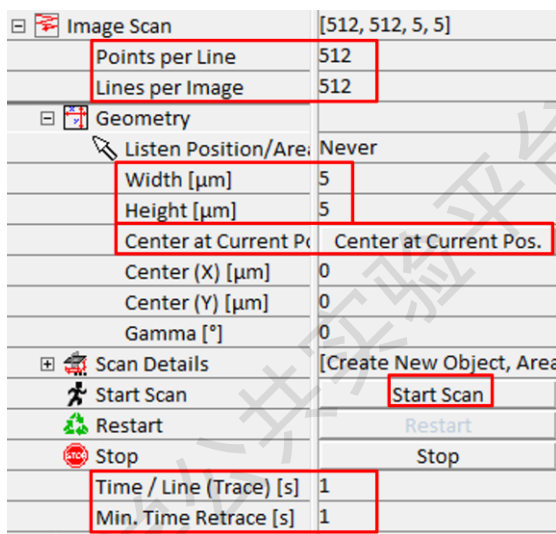




图 6-47 AFM 扫描参数设置

7. 测试结束后点击退针，再通过手柄上调 Microscope Z (μm)，上升到距离样品表面 3000 μm 左右。
8. 关闭软件再全断电，把 AFM 测试台卸下来，再把普通测试台安装上，注意线短不能拉。轻轻取下针，放置干燥箱保存。
9. 打开控制器左右两侧的插座，开电脑。打开控制软件之前，先点击桌面右下角的紫色标图，确认 **【Microscope Controller】**、**【Spectral Cameral】**、**【Top camera】**、**【Bottom Camera】** 状态正常✓，且 Spectral Cameral 温度降到-60°C，再打开 **【Control FIVE】** 软件。若状态不是全正常，需点击 Initialize All Cameras，等待到全正常状态，再打开 **【Control FIVE】** 软件。

## 6.6. 透射模式拉曼光谱测试操作步骤



1. 安装透射物镜：取下样品台，将透射物镜安装在样品台下面，再装上样品台。
2. 选择透射模式：在软件中的主菜单最上面一栏【Configurations】中下拉至【Raman】选【HAL Transmission CCD1】。
3. 激光穿小孔：显微镜光路上旋转滤光器至激光位置，软件上【Laser Control】选择对应激光，点击【Top】，打开激光，点击，选【Go to Calibration Position】，样品台移动到最边缘位置，再点击，点击【Move Sample to Absolute Position】，样品台移动到中心位置，激光从小孔中心穿过。



图 6-48 激光光路选择

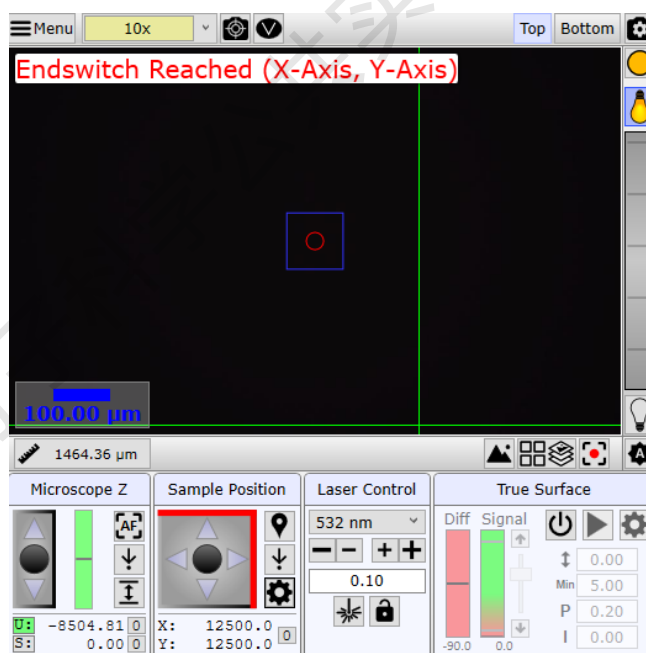


图 6-49 样品台中心位置校准

4. 【TOP】反射物镜聚焦：放上样品，将激光聚焦成最小最亮的点，且在圆圈位置，聚焦好后关闭激光。

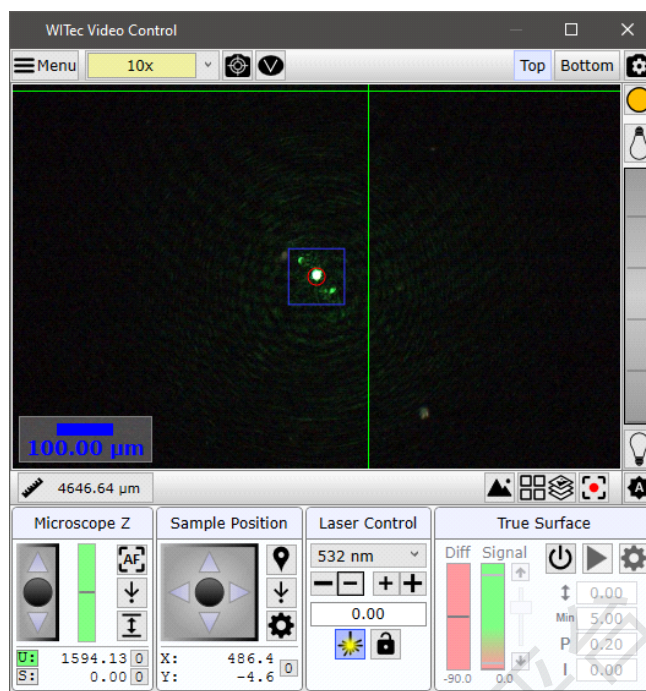


图 6-50 反射物镜聚焦

5. 【Bottom】透射镜头聚焦：打开激光，先用一张白纸放在透射光路中，手动调节透射物镜的高度，使激光的光斑最小。然后，软件中点击【Bottom】，点击【Additional】，此时手柄控制透射物镜 (Inverted Objective) 的移动，保持激光打开，将激光聚焦成最小最亮的点，且在圆圈位置（若位置偏移太大需要重新移到小孔中心）。聚焦好后关闭激光，【Laser Control】选择【NO Laser】关闭激光，对应设备上滤光器位置旋转至空白关闭激光。

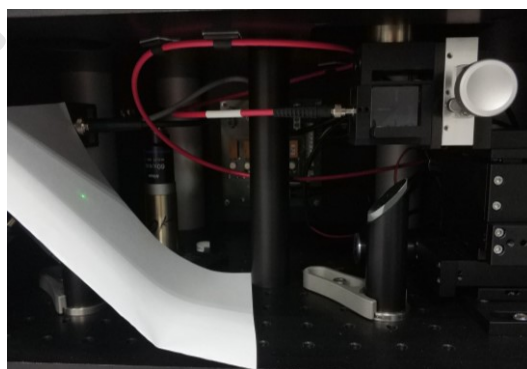


图 6-51 透射物镜粗聚焦

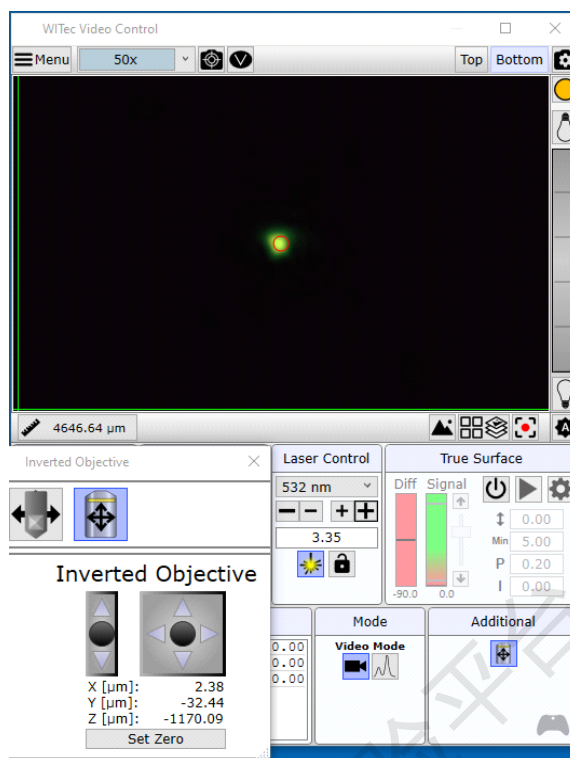



图 6-52 透射物镜细聚焦



图 6-53 白光光路选择

6. 打开白光光源到最大，调节至3400 K，手动打开白光光路，移到BF处，点击 设置透射物镜(Inverted Objective) 处光强便于观察和拍照就可以，不影响采数据。下置物镜光斑若不在屏幕中间，可直接移到物镜或者在软件中点击【Bottom】，点击【Additional】，此时手柄控制透射物镜 (Inverted Objective) 的移动。



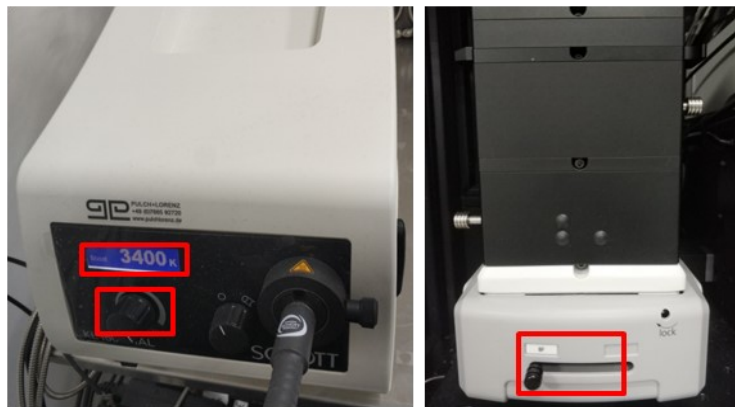


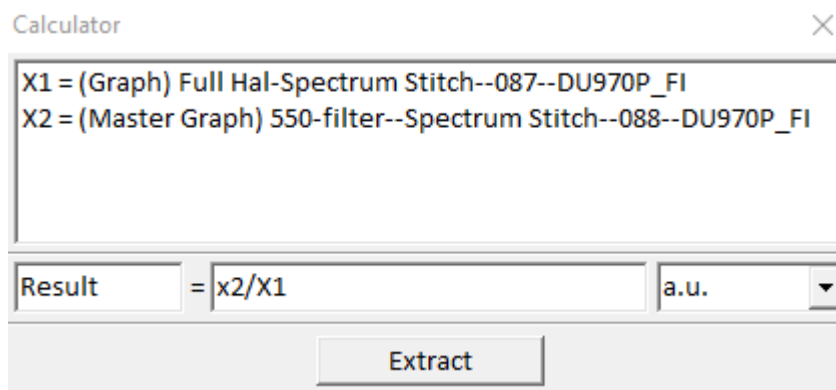
图 6-54 开白光

7. 设置测试条件：透射测试需要在光谱拼接模式下测试，首先，在【Spectrograph1】的【Grating】选择300 g/mm，【Spectral unit】改为nm。然后【Spectral Stitching】设置测试条件：【Integration Time】和【Number of Accumulation】根据测试设置，【Start/Stop Position】设置为白光全波长【400-850 nm，有效区域为500-760nm】，点击【Start Stitching】开始测试，先测试空白基底，计为X1，然后进行样品测试。

Spectral Stitching		Start Stitching
Integration Time		0.100
Number of Accumulation		1
Start Position		400.000
Stop Position		850.000

图 6-55 光谱拼接模式条件设置

8. 如果空白和样品厚度不一样，样品测试需要重复上述的聚焦过程，其他测试条件保持与空白一样，数据计为X2。
9. 同时选中X1，X2数据，下拉选择【Calc】，Result=X2/X1，点击Extract得透过率数据。



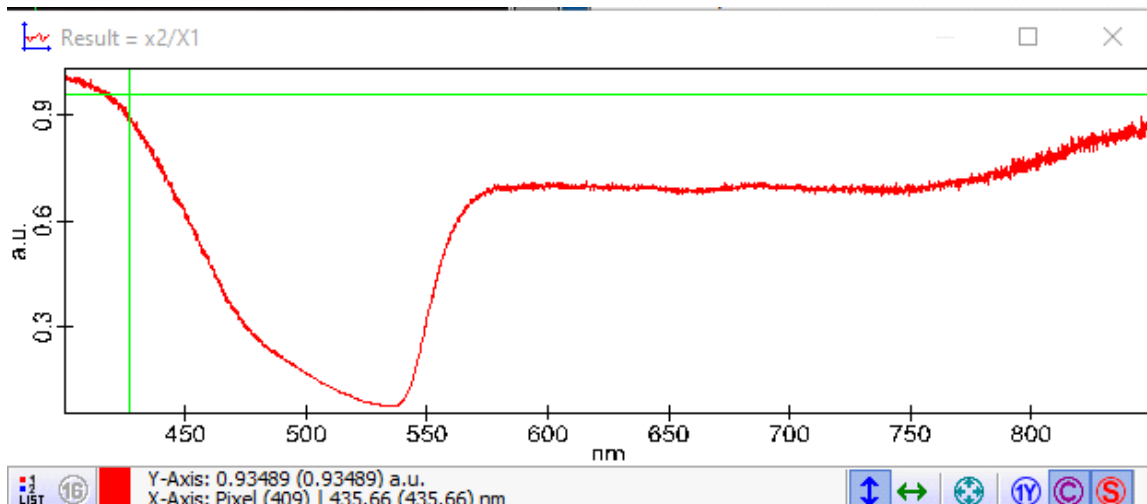


图 6-56 透过率数据处理

### 6.7. TrueSurface (TS)成像

1. TrueSurface (TS)显微选项能确保拉曼成像时根据表面的形貌进行调整。这种方式使用的先进的光学轮廓仪集成在仪器内, 实现同步操作。TS 能够在扫描范围内实现实时的大面积轮廓和拉曼成像, 即使是对于粗糙或倾斜的样品, 也可以帮助解决长时间拉曼成像时周围环境造成的脱焦效应。
2. 图 6-57 在硅透镜上演示了这种功能。左边的图像显示了样品表面的形貌。如果没有 TS, 在测量过程中只有一个平面是聚焦的, 从而产生一个强拉曼信号环(中间)。右边的图像显示了 TS 激活后测量的相同区域, 获得了整个区域上的强拉曼成像。

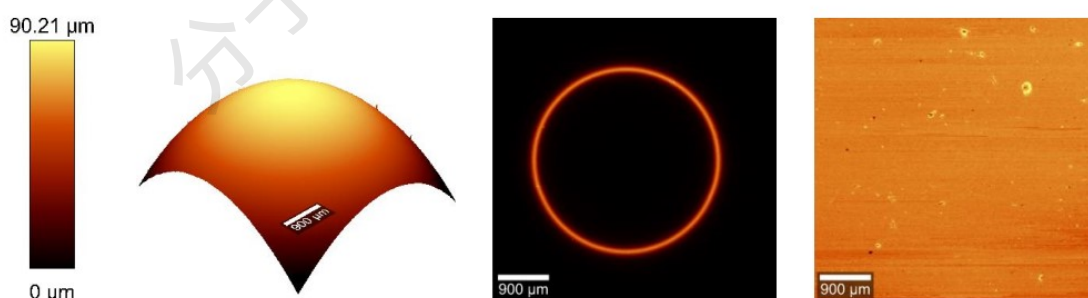


图 6-57 普通成像与 TS 成像

3. 图 6-57 Si 透镜成像。左: 透镜的表面形貌。中间: 普通的共焦拉曼显微镜只能聚焦一个深度。右图: 与中间的图像相同, 但 TrueSurface 激活后, Si 信号从各个深度都是恒定的, 因为样本表面实时聚焦。

(1) 先在仪器上将两个有 TrueSurface 标记的杆向外拔出, 开启 TrueSurface 光路。

(2) 选择合适的物镜，聚焦样品。TS 测量中，很多物镜都是可以选用的，但物镜的性能各不相同，并不是所有的物镜都适合。经测试，放大率小于 20×的镜头是不适用的。此外，样品表面的粗糙度是很重要的，以下为根据样品粗糙度所推荐的标准物镜：

100 × objective: + / 4 μm

50 × objective: + / -16 μm

20 × objective: + / -100 μm

(3) 点击 Video 上的【TrueSurface】图标，【U】会直接跳转到【S】（保护镜头不撞到样品），通常将两个值设置为 0。在单击开始之前，首先将 TS 的 Z 轴范围设置为所使用的物镜相对应的范围。200 μm 是默认值（通常用于 100 ×物镜）。如果选择 50 ×或其他目标，请将数值设置按以下方案设置：50×长焦物镜设置为 500 μm，50×常规物镜设置为 1000 μm，20×常规物镜设置为 1-2 mm。

(4) 优化 TrueSurface 参数：

- ① 将信号值调到大约 50（绿色条的中间）或尽可能接近。按下开始按钮启动 TS。使用 Xbox/Listen 功能在样品上移动来测试系统是否可以追踪表面。
- ② Gains 设置：一般情况下，对于粗糙的形貌，P-Gains 越高，效果越好（一般为 0.2-1）。I-Gains 可能对倾斜或者弯曲的平面样品有用，一般设置为 0。如果 P-Gains 设得太高，你能听到显微镜发出尖锐的声音；需要降低 P-gains 值或者改变样品的位置（比如从斜坡移动到水平位置）来解决设置不当的反馈问题。
- ③ 启动【Oscilloscope】mode。当 TS 处于激活状态时，Z 轴开始被反馈控制（此时，无法通过 Xbox 或者直接在操作界面上调整焦距，除非先停止 TS 功能）；通过调节【Focus Shift】来获得拉曼信号的最大值（通过键盘上的上下按钮直接调节 Focus Shift 值）。注：减少【Focus Shift】的值对应的距离越小，样品会向上移动。
- ④ 如果样品的信号太弱，可以使用激光的光斑来帮助聚焦或者优化【Focus Shift】（最佳的 Focus Shift 值可以使光斑最小）
- ⑤ 再次检查 TS 的信号值，必要时进行再次调整。如果信号值过低但是很稳定，降低【Min Signal %】的值。如果测量过程中，信号值降到该值以下，则 TS 反馈将会自动关闭直到信号再次返回。这个限制会保证显微镜的 Z 轴位置，即使在扫描

过程中出现一个孔或者到了样品边缘，系统也能再次找回样品表面并继续扫描。

- ⑥ 继续进行拉曼测试。在 TS 处于激活状态进行图像扫描时，有一点需要考虑：“Min.Time for Retrace [S]”中的时间应设置足够长，使反馈能够在样品返回时可以及时追踪到样品的表面。

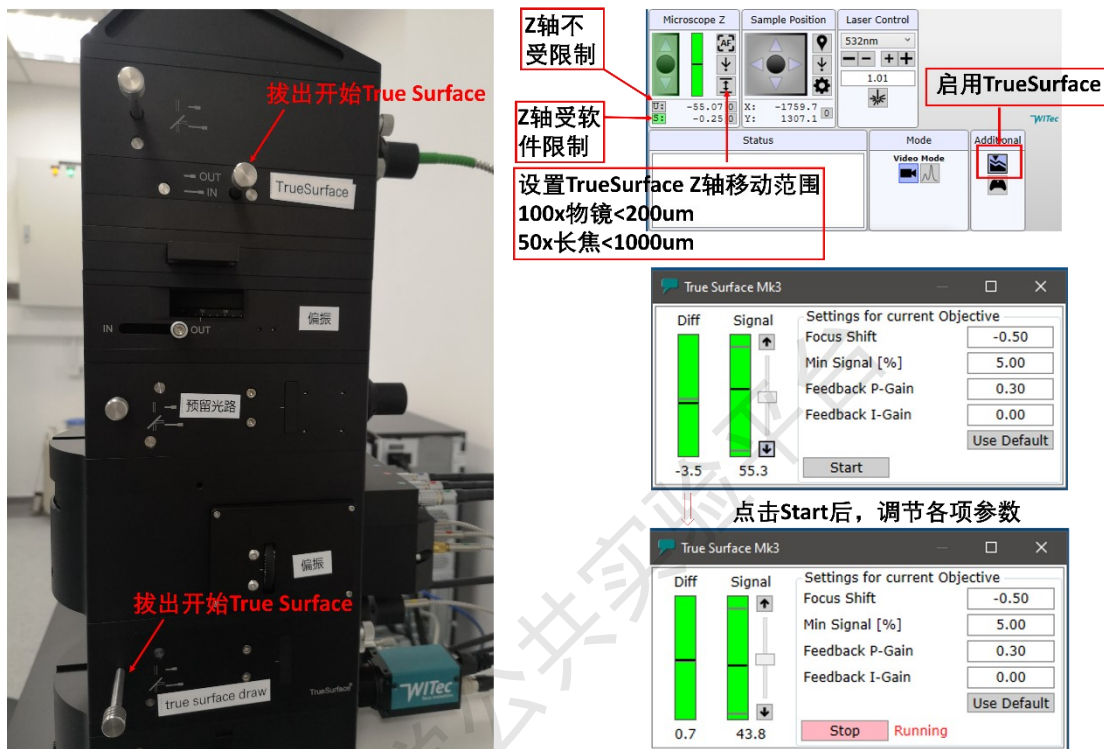


图 6-58 TrueSurface 成像的参数设置

### 6.8. 微塑料-颗粒分析

1. 模拟拼接：去除拼接痕迹，避免痕迹当作颗粒影响分析。
2. 拍照导入数据：


- (1) 在【Control】软件的“Video Measurement”中进行图片拼接操作后，会自动出现【Export to Particle Scout】选项，点击该选项就可以将拼接图片导入到软件中，如下图所示：



图 6-59 拍照导入数据

(2) 在 Project 中右击目标图片，在下拉菜单中选中【Export to Particle Scout】如下图：

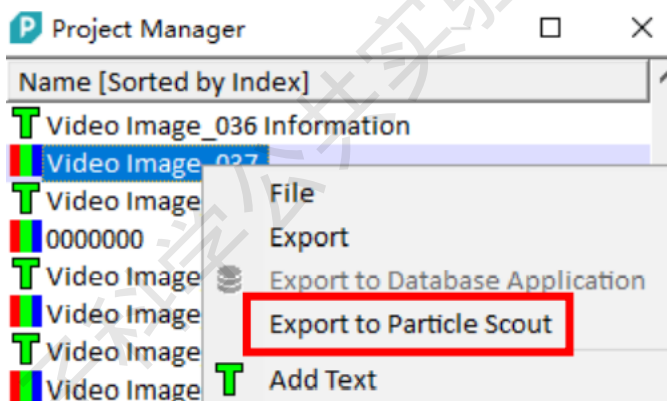


图 6-60 文件夹导入数据

(3) 在 Particle Scout 软件的菜单栏【File】—【Load Particle Image...】，然后选中需要进行分析的图片即可；这种方式一般适用于只通过 Particle Scout 来分析图片中的颗粒形貌等信息。

### 3. 找颗粒：【Find Particles】

(1) 在【Mask Settings】选择表征目前颗粒：

【Bright / Dark Particles】：从暗场图片中搜索亮度比背景大的颗粒/从明场图片中搜索亮度比背景小的颗粒；

【Exclude Edge Particles】：如选中，将所有图片边缘不完整的颗粒忽略掉，不参与搜索。

(2) 【Mask Threshold】：定义了用于搜索特定颗粒的亮度阈值，可以通过拖动进度条调

节该阈值。

- (3) **【Enhance Particle Contrast】**: 自动增强选中颗粒的对比度, 点击“Enhance”按钮选中。
- (4) **【Filter Expression / Quick Filters】**: 可以输入筛选公式将不符合的颗粒排除。可以在 **【Filter Expression】** 框中直接手动输入筛选公式; 还可以通过 **【Quick Filters】** 直接导入之前使用/保存过的筛选公式: **【Configure...】** 下方的即为各筛选公式, 直接点击即可引用; 另外, 点击 **【Configure...】** 可以添加新的筛选公式, 对筛选公式进行编辑和保存, 方便后续的直接调用。

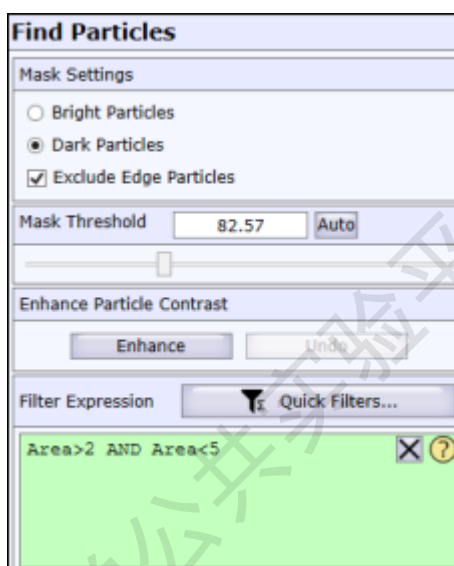




图 6-61 筛选颗粒

- (5) **Particle Found** 搜索结果: 根据上述搜索条件, 软件自动搜索到的颗粒数目, 如下图所示:

: 将上述搜索到的颗粒 Mask (e.g. 红色 mask) 作为结果, 生成颗粒列表并进入后续分析窗口;

: 返回上一级操作。

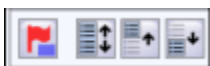


- (6) **【Show Mask】**: 显示符合搜索条件的颗粒 Mask;
- 【Opacity】**: 透明度进度条;
- 【Red】**: 修改 Mask 的颜色。



#### 4. 颗粒分析: **【Particle Manager】**

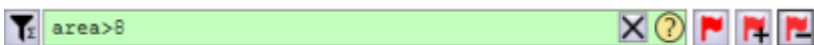
## (1) 【Selection for Analysis】:



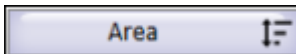
: 从左到右依次为: 将当前选中的颗粒全部红旗标记/全选/将当前所选颗粒以上的颗粒都选中/将当前所选颗粒以下的颗粒都选中;



: 从左到右依次为: 红旗标定的颗粒数目/选中的颗粒数目/通过【Find Particles】搜索出的符合条件的颗粒总数/颗粒列表中的颗粒数目;



: 输入筛选公式来筛选符合特定属性的颗粒并显示在下方的颗粒列表中; 右侧的三个红旗标志依次表示: 红旗标定当前列表中的所有颗粒/将当前列表中的所有颗粒添加到已标记红旗的颗粒组中/将当前列表中的所有颗粒从已标记红旗的颗粒组中排除 (选中此选项的颗粒的 mask 会以不同的颜色在搜索预览窗口中显示);



: 选择颗粒的属性, 在其下拉菜单中选择不同的颗粒属性即可重排颗粒顺序;



: 颗粒列表和图像列表两种形式的切换, 大小可调节。

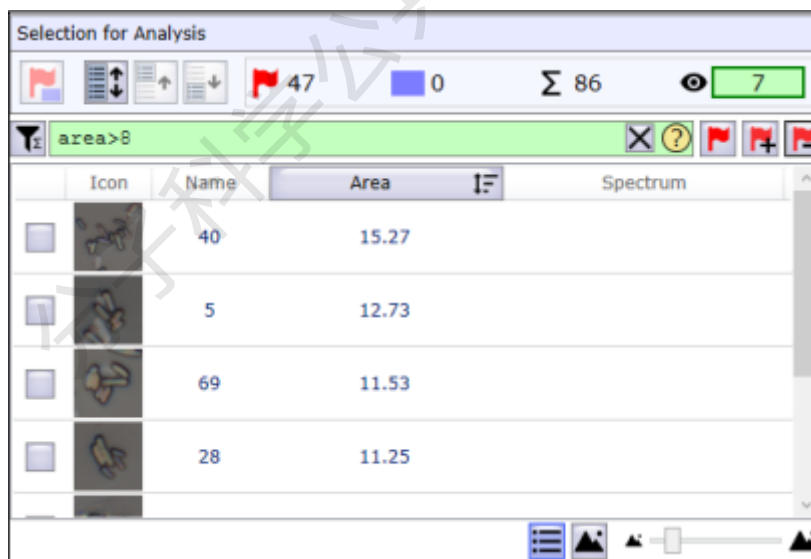


图 6-62 选择分析对象

## (2) 所选颗粒的详细形貌和光谱信息:



: 将样品台移动到当前的颗粒位置;



: 单颗粒的图像与特征拉曼光谱, 该窗口最下方的列表即该颗粒的所有具体形貌信息。

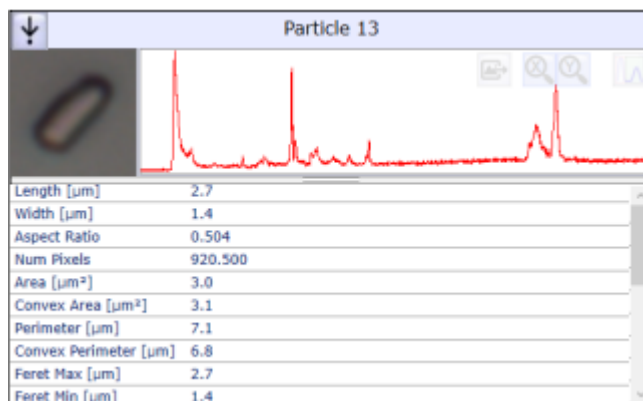


图 6-63 所选颗粒的详细形貌和光谱分析

图像预览显示了整个图像，当前颗粒列表中的所有颗粒的 Mask 为绿色，蓝色的 Mask 为当前选中的颗粒，红色的为在所有通过搜索出的符合条件的颗粒中红旗标记的颗粒。

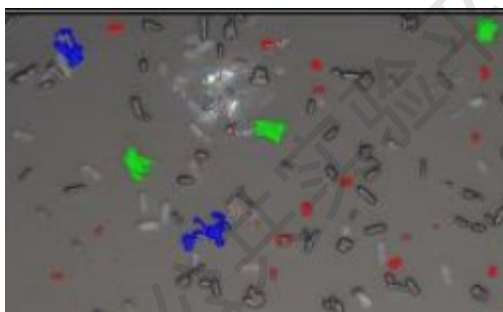
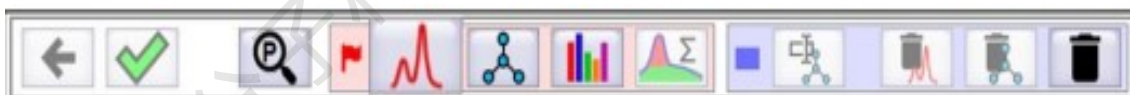


图 6-64 所选颗粒的标记

### (3) 主要功能和操作：



：返回“Find Particles”重新进行颗粒搜索，比如修改 Mask 阈值后重新搜索；

：只有红旗标记的颗粒，才可以进行的操作；

：点击则打开“Raman Measurement”，在该窗口中进行拉曼光谱获取的参数设置；

：对获取的特征拉曼光谱进行 True Match 光谱定性并归属各颗粒名称，一般分析一种准确度高 ；

：对所有颗粒进行统计分析；

：对每个颗粒的特征光谱进行拉曼、荧光信号大小的计算以及光谱是否过饱和的判断；





: 选中的颗粒 (蓝色, 按住 Shift 可多选), 才可以进行的操作: 用于输入或者修改颗粒的物质名称/删除选中颗粒的光谱信息/删除选中的颗粒物质名称信息/删除选中的颗粒。

5. 数据保存: 可单独存某个数据, 可保存 Project, 保存所有数据。

## 6.9. 荧光寿命曲线, 荧光寿命成像的采集及数据拟合

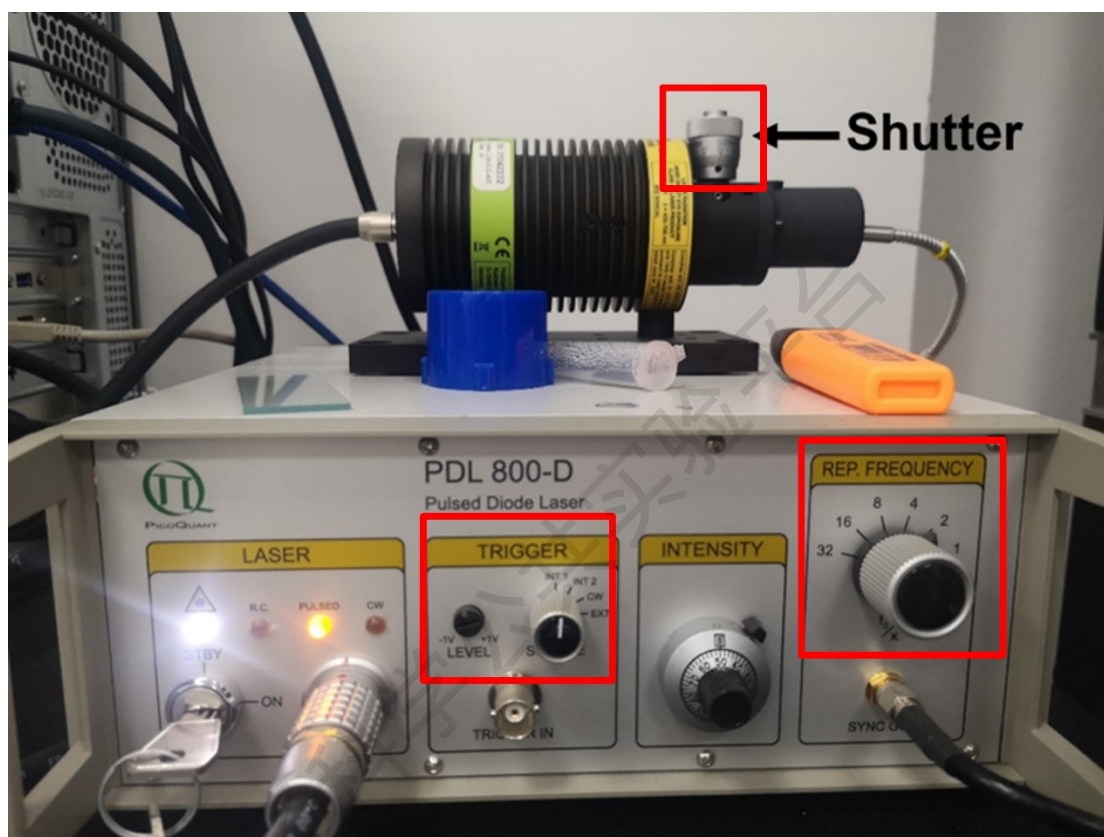


图 6-65 荧光寿命曲线/成像专用激光器

1. 开机关器: 如上图所示, 打开荧光寿命测试专用的 405 nm 激光器电源按钮, 打开钥匙【ON】, 预热 5-10 分钟, 根据下表, 在激光器上【TRIGGER】和【REP.FREQUENCY】的组合中选中所需的激光器的重频, 将重频的对应值输入至软件中 【Laser Repetition Rate [MHz】】的框内。

Oscillator	INT1	INT2
1	80MHz	1MHz
2	40MHz	500kHz
4	20MHz	250kHz
8	10MHz	125kHz
16	5MHz	62.5kHz
32	2.5MHz	31.25kHz

图 6-66 激光器的重频

注：不同频率对应不同荧光寿命测试范围，如常用频率 40 MHz 可以测到 25 ns，依次类推。1 MHz=1.0\*10<sup>3</sup> KHz=1.0\*10<sup>6</sup> KHz。

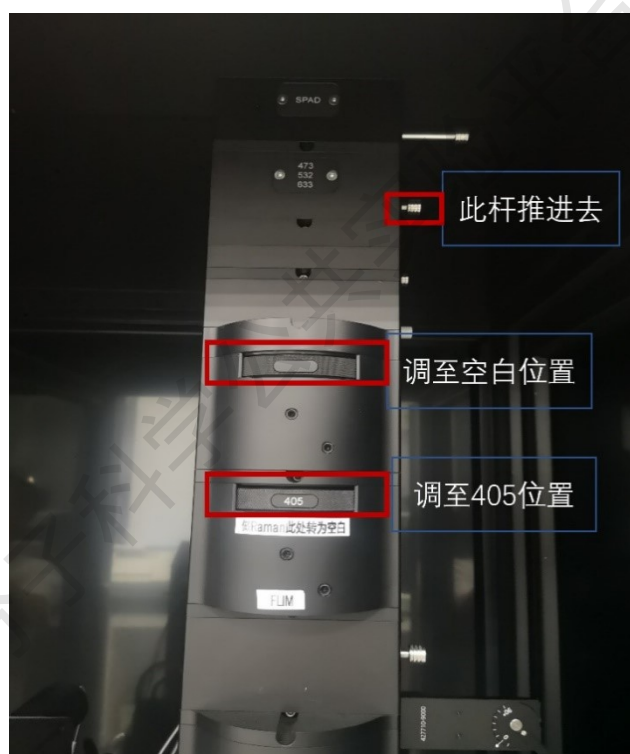


图 6-67 拉曼显微镜的光路图

2. 调节拉曼显微镜的光路：如上图所示，关闭 473/532/633 激光光路，打开 405 激光光路。
3. 选测试模式：在软件中的主菜单最上面一栏【Configurations】中下拉至【Time Resolved Microscopy】。
4. 设置参数：在软件中【Time Spectrograph】,其中【Start Time】根据需要设置，一般设为 3 ns;【Time Bins】越高，采点数越密，可选 512/256/1024，一般设为 512;【Time Binning】与时间窗口有关，设置为 1 时，时间窗口为 15 ns，设置为 N 时，窗口为(15\*N)

ns, 根据材料荧光寿命设置, 且不超过测试范围。

#### 5. 【Calibrate】校准步骤:

- (1) 先将激光器的【Shutter】旋扭顺时针旋至最小, 同时在软件上将 LED 灯打开, 亮度调到最低。【Calibrate】是利用 LED 灯的光源做的, 所以执行过程中一定要保证 LED 灯打开。
- (2) 打开【Oscilloscope】, 【Integration Time】设为【0.1s】, 点击 Start, 逆时针慢慢调节【Shutter】旋扭, 观察窗口频率不能超过激光重频的 1%, 否则有可能饱和, 如果不小心将信号调节过强, 则探测器饱和, 此时信号消失, 需在【Detection】处点击【Reset on】复位。但是弱荧光样品 Shutter 全开也不会超过 1%, 只要出现荧光寿命谱图即可, 点击 Stop 结束。在【Oscilloscope】预扫过程中, 可以修改【Time Spectrograph】内各项参数, 直至合理。
- (3) 点击【Time Spectrograph】, 【Calibrate】, 稳定 2 分钟左右, 点击【SAVE】可保存此参数文件。测试后若再修改参数, 需重新校准。

#### 6. 荧光寿命单谱采谱和拟合:

- (1) 在【Single Spectrum】设置好积分时间和积分次数后直接采谱, 采集到寿命曲线如下图所示。

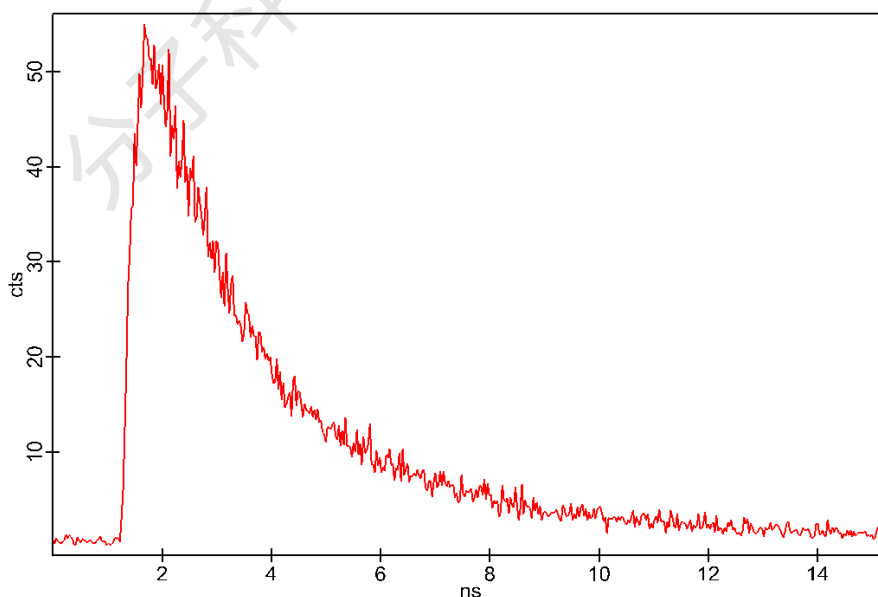


图 6-68 荧光寿命曲线

- (2) 将采集的单谱直接拖拽至【Fittings】处, 依次选择【Exponential】, 【ExDecay】, 然后在曲线上按住【Shift】键将上升沿部分去掉, 只拟合从最高点衰减的曲线。

内部文件, 请勿随意转发、打印、复印

【Advanced Mode】可以显示更多参数, 在 【Fit Parameters】处观察是否有【Fit Successful】出现, 此时的 t 值即为寿命值, 点击【Fit and Extract All】, 提取所有曲线和寿命信息。

#### 7. FLIM 荧光寿命成像:

- (1) 在【Oscilloscope】预扫时确定好【Integration Time】的数值, 保证在此数值下能看到衰减曲线。
- (2) 在【Image Scan】(区域<30 um) 或者【Large Area Scan】的菜单下点开【Geometry】, 确定扫描面积。在【Listen Position】的下拉菜单在 Video 图像上选择成像区域, 确实扫描位置。然后在【Points per Line】和【Lines per Image】确定扫描点数, 点击【Start Scan】或者【Start Large Area Scan】进行荧光寿命成像扫描, 扫描的过程中会自动生成【Time Spectrograph】和【Time Spectrograph Count Rate】后缀的图像文件。
- (3) 成像拟合: 扫完后生成【Time Spec.Ch 0】为后缀的文件, 将此文件直接拖拽至【fittings】处, 在曲线上按住【Shift】键将上升沿部分去掉, 只拟合从最高点衰减的曲线。用鼠标在【Time Spectrograph】和【Time Spectrograph Count Rate】的图像内移动, 观察是否每个位置都是【Fit Successful】, 然后点击【Fit and Extract All】导出四幅图像【Fit ExpDecay: y0】;【Fit ExpDecay: x0】;【Fit ExpDecay:Amp】;【Fit ExpDecay: t】, 其中【Fit ExpDecay: t】为 FLIM 成像图, 如下图所标, 荧光寿命成像所受测试条件变化的影响小, 容易反映出样品的性质。

#### 8. 实验结束后, 关闭 405 nm 激光器, 恢复拉曼模式。

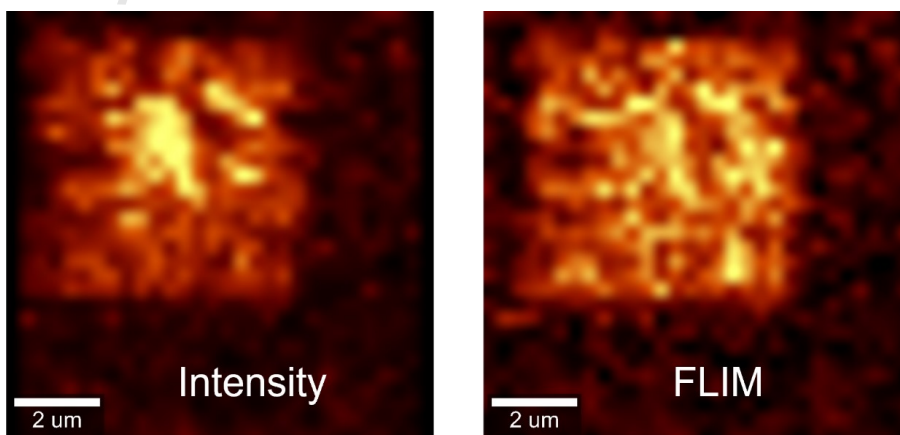


图 6-69 荧光光谱成像(左)和荧光寿命成像 (右)

#### 7. 相关/支撑性文件

Q/WU FLHR001 文件编写规范

## 8. 记录

快速成像显微拉曼光谱仪使用记录表

分子科学公共实验平台

