

9-2 荧光测量

——软件操作

当特定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。

【软件操作】

本部分介绍荧光测量的软件操作流程，具体操作步骤如下：

1. 从欢迎界面或者点击图标  创建新的光谱应用，在光谱应用向导中点击荧光测量向导 。



2. 出现“选择采集模式”窗口，请点击“活动采集”选项。
 - **活动采集：**在当前光谱仪的基础上建立该应用。
 - **新建采集：**为新建应用创建或选择光谱仪数据源。



3. 调整好硬件配置后，在软件中设置数据采集参数，包括积分时间(integration time)、平均次数(average)和滑动平均(boxcar)。用户可根据光源的强度，调节积分时间和平均次数等参数，勾选“暗噪声校准”和“非线性校准”功能。设置完成，光谱将显示在右侧谱图界面，点击“下一步”按钮。

各个参数的详细含义请参考软件手册或help菜单。或者打开下面链接：

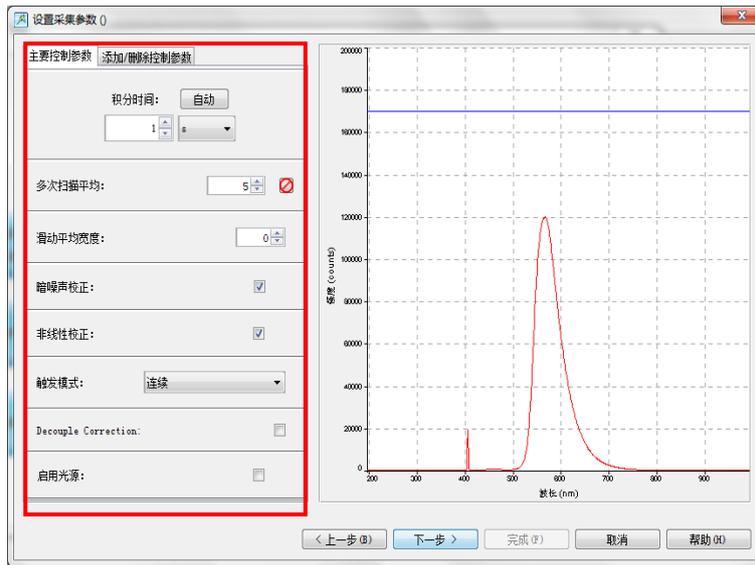
http://www.oceanoptics.cn/spectroscopy_glossary

以下对采集参数进行简单介绍：

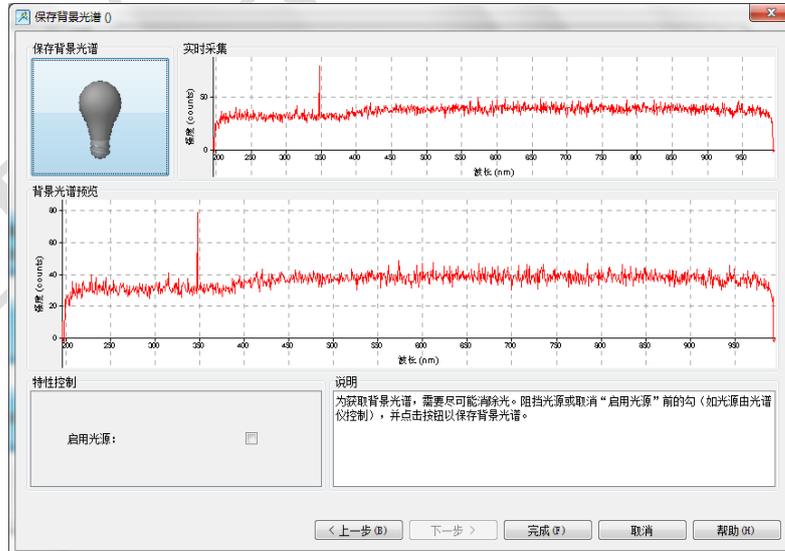
- **积分时间：**积分时间是检测器在将累积的电荷通过A/D转换器加工之前，被允许收集光子的时间长

度。最小积分时间是设备支持的最短积分时间，它取决于检测器读出所有像素信息的快慢，积分时间与数据传输速度是不同的概念。

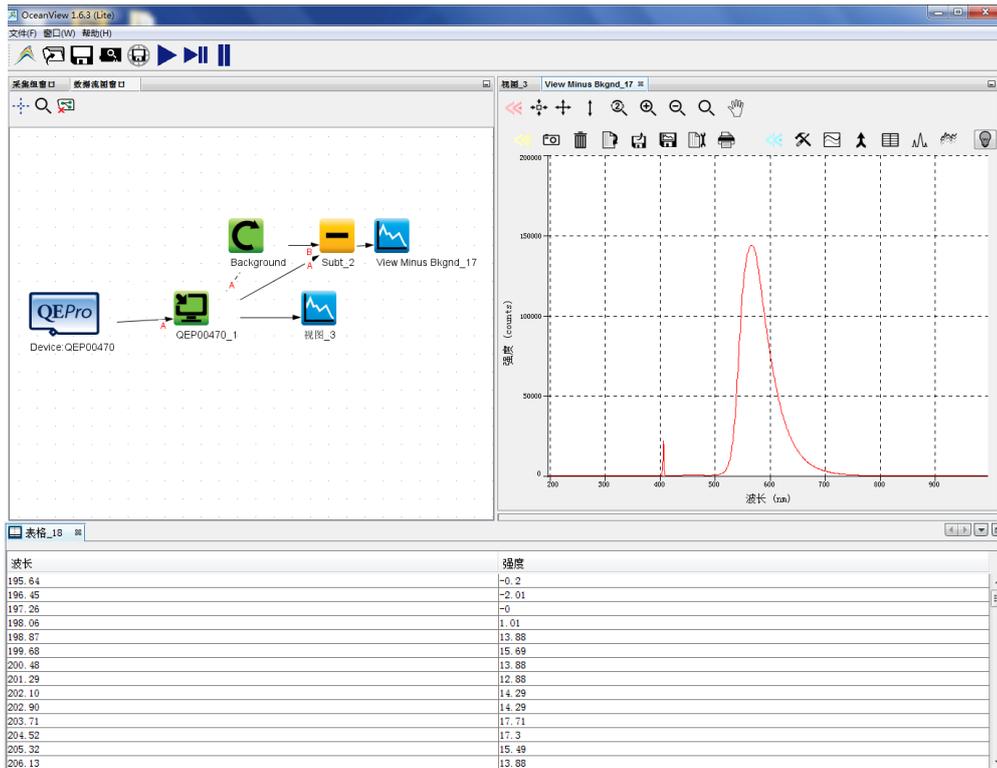
- **平均次数：**光谱被显示到软件里之前会采集多次，然后取平均。
- **滑动平均：**平滑是一种可以应用于光谱的空间平均。该过程通过平均相邻像素点的值来消除噪声，因此它会以牺牲光学分辨率为代价来提高信噪比。空间平均在光谱相对平坦以及相近像元变化较小的情况下使用是非常有效的，但由此产生是分辨率的损失会使尖锐的光谱特征峰难以分辨。当应用空间平均时，信噪比会以像元平均的平方根为基数进行提高。请注意，在海洋光学软件中，平滑宽度的值是指所有像元以中间为基准靠左或靠右的像元和的平均数。平滑值是4实际上是将9个像元一起平均（4个靠左像元+1个中心像元+4个靠右像元），信噪比将以3为倍数增加。同样的，平滑值是2（5个像元）将使信噪比以2.2为倍数增加，平滑值是0（1个像元），信噪比以1为倍数增加（因此光谱不改变）。
- **暗噪声校准：**海洋光学的大部分光谱仪都有自带的遮光像元。暗噪声校准会用当前光谱读数减去遮光像元的读数，以排除温漂等系统性影响。
- **非线性校准：**光谱仪出厂前已完成。如无特殊需求，请默认勾选。
- **触发模式：**请参考海洋网站的相关文档。如无特殊需求，可保持默认设置不变。



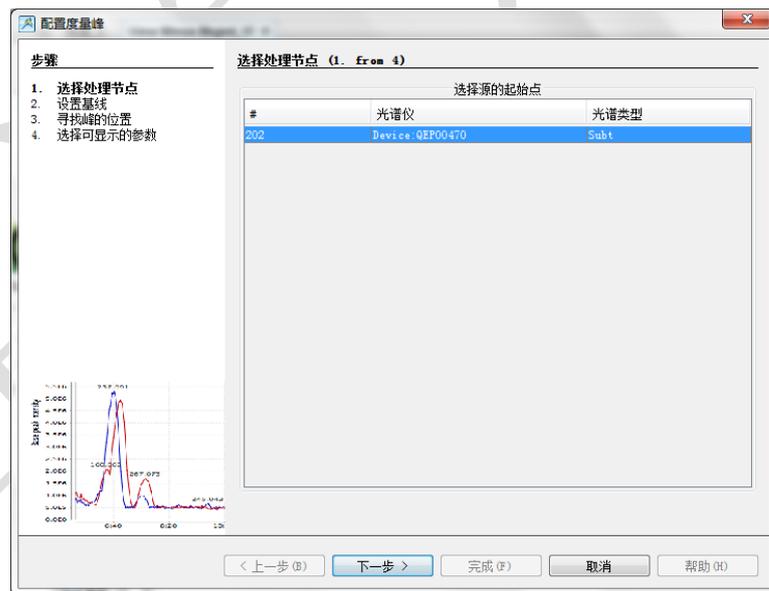
4. 出现“保存背景光谱”窗口，点击图标保存背景光谱，再点击“完成”。



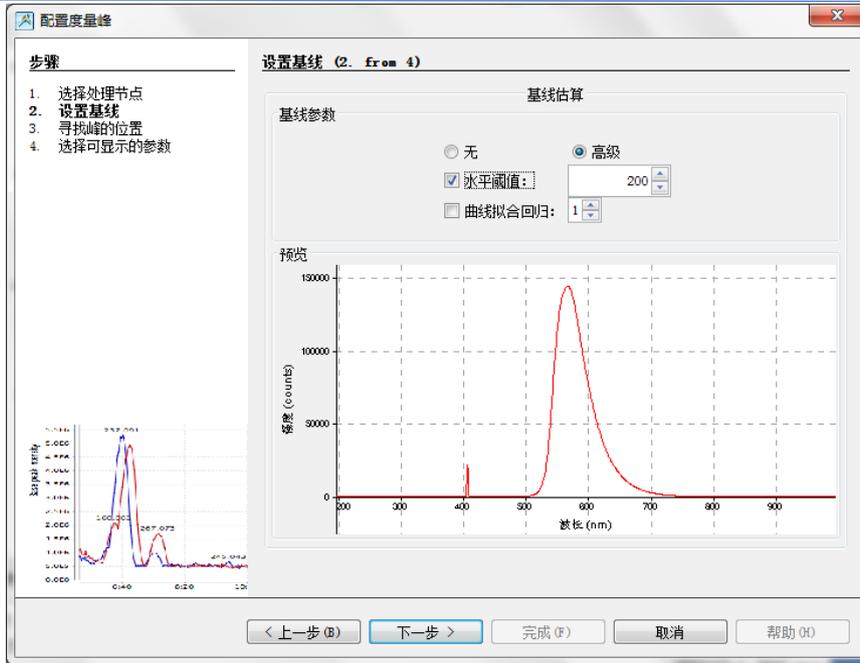
5. 在视图窗口中，荧光测量结果如下图所示。左侧为数据流图窗口，右侧为光谱全谱，图谱结果实时更新。谱图中，激发光谱和荧光光谱同时显示，一般而言，荧光光谱在波长较长处。点击“以表格形式查看结果”，即可查看图谱的数据表，表中的数据可复制后粘贴到 Excel 或 txt。



6. 点击“查看光谱的峰” ，可对光谱进行寻峰。在选择处理节点选项框中，选择光谱仪测量的数据，点击“下一步”。



7. 在设置基线选项框中，为了减小噪声等背景的影响，可以根据您的需求，勾选下列选项：
- 选择“无”选项，软件会寻找的所有峰值。
 - 选择“高级”选项，可以通过设置水平阈值，移除不相关的峰。
 - 勾选“曲线拟合回归”选项，会显示出在光谱中校正变化平缓的宽带背景影响。

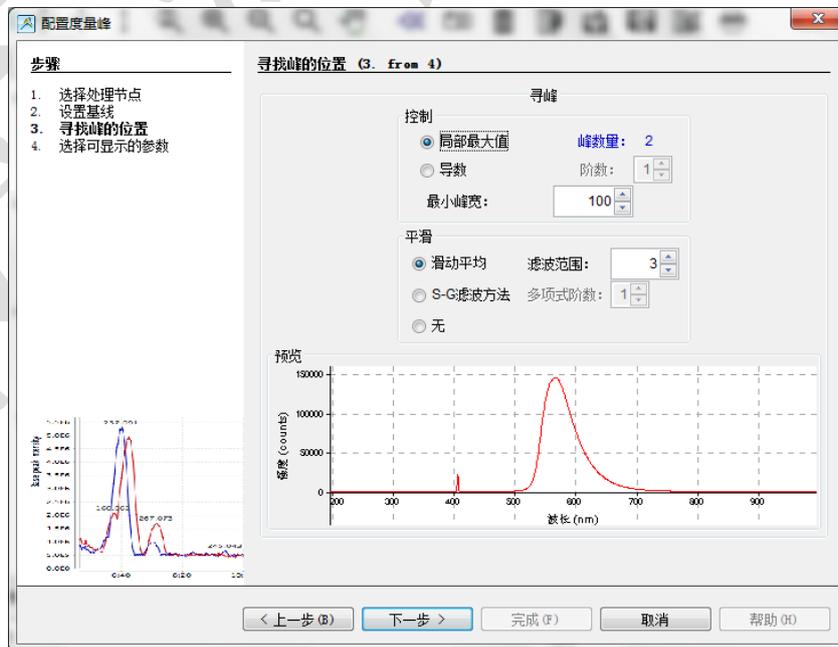


8. 寻找峰的位置:

根据您的峰值的要求，可以设定局部最大值、导数、最小峰宽等条件，在寻峰时排除不想要的峰。您可以根据需要勾选以下选项：

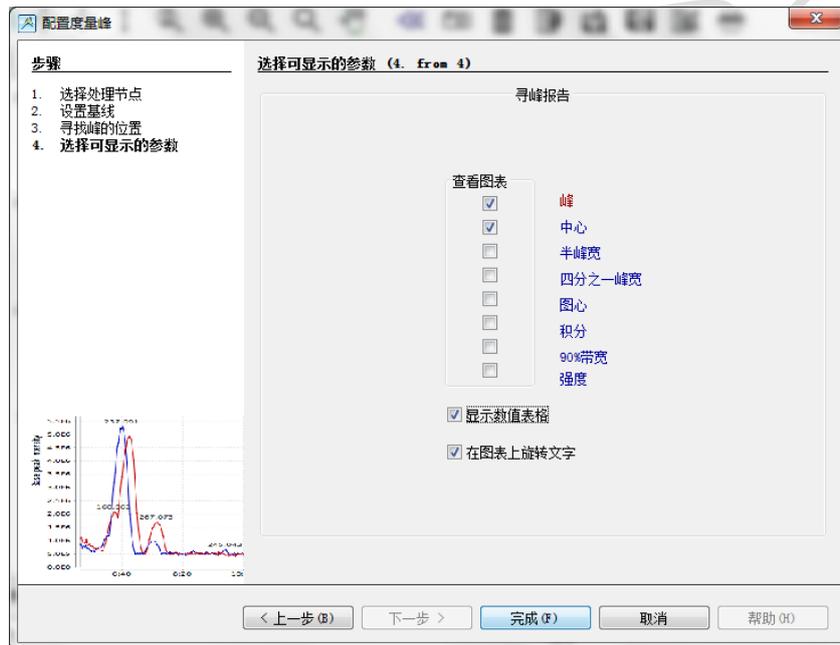
- “滑动平均”选项，是对光谱使用空间滤波，从而减小相邻的像素差异和噪声的影响。可选择滑动平均的滤波范围，滑动平均若使用不当，会造成一定波形失真。
- “S-G 滤波方法”选项，该选项要求同时设置滤波范围和多项式阶数，并且多项式阶数最大值不会超过滤波范围的 0.5 倍，比如滤波范围设置为 4，多项式阶数允许设置的最大值不超过 2。

Savitzky-Golay 滤波器（通常简称为 **S-G 滤波器**）是一种在时域内基于局域多项式最小二乘法拟合的滤波方法。这种滤波器如果设置得当，可以在滤除噪声的同时可以确保信号的形状、宽度不变。

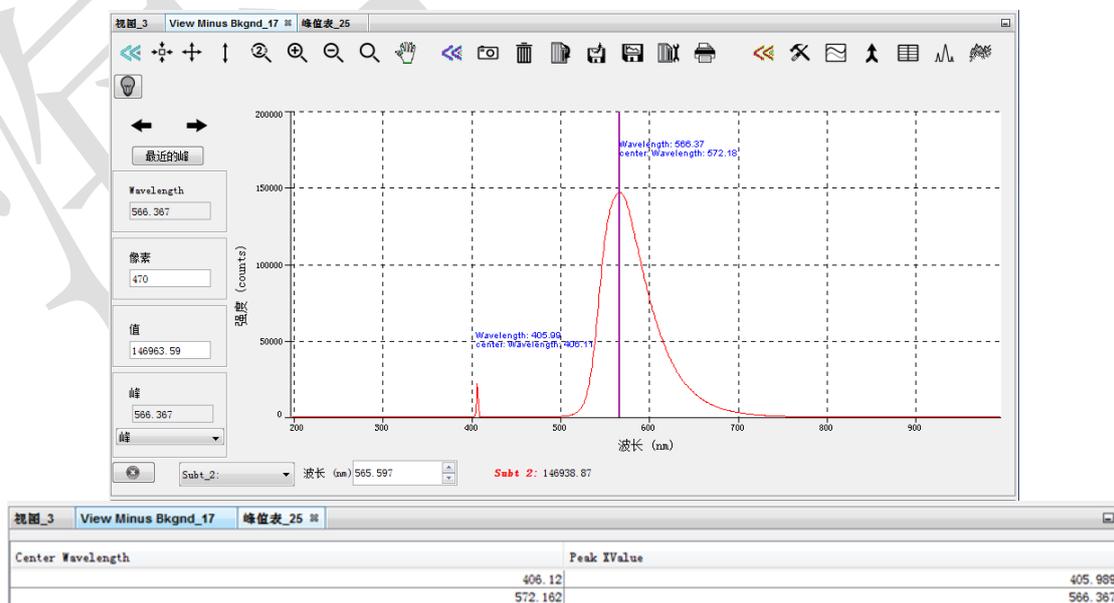


9. 根据您需要的参数，勾选想要在光谱上显示的数据。可选光谱寻峰，半高宽和中心波长等参数。注意，为了方便观察参数，请勾选“在图表上旋转文字”。点击“完成”。

- **峰**：指峰值波长，光谱图中强度最大值对应的光波长。
- **中心**：指中心波长，对光谱进行高斯拟合后，高斯曲线的最大值对应的波长。
- **半峰宽**：光谱内峰值强度一半处的峰宽度，即通过峰高的中点作平行于峰底的直线，此直线与峰两侧相交两点之间的距离。
- **四分之一峰宽**：光谱内峰值强度四分之一处的峰宽度，即通过峰高的四分之一处作平行于峰底的直线，此直线与峰两侧相交两点之间的距离。
- **图心**：指质心波长，是LED光谱分布的几何对称波长。
- **积分**：指对峰的积分面积。
- **90%带宽**：光谱带宽的定义是指谱线的空间宽度所对应的光谱宽度，这里指单峰起始波长之间90%的光谱宽度。
- **强度**：光谱图中，峰值的强度大小。



10. 此时，在光谱显示窗口，出现您需要的数据。从窗口中，可以快速读出峰位和峰值强度的数据。



11. 数据保存

- (1) 暂停采谱，保存此时的光谱数据。OceanView 界面左上方工具栏中有运行、单步采集以及暂停采集的快捷键。



: 开始连续采集光谱数据。



: 单步采集光谱数据，单次采集后停止，点击运行，可继续采集。



: 暂停采集光谱数据，终结采集过程。

- (2) 点击  图标进行数据保存的设置，包括数据保存格式、路径、保存方式等。点击“应用”按钮确认配置，之后点击“退出”按钮关闭对话框。



- (3) 点击  启动数据保存，该按钮变红，表明保存工作正在进行。如果需要停止保存，请再次点击该按钮。
- (4) 也可以点击  按钮，将全谱数据保存到电脑剪贴板，然后将数据直接粘贴到 Excel 或 txt。