

开放式上转换荧光测试系统的构建和教学应用

张尚青*, 唐荔明, 陈明丽*

东北大学理学院化学系, 辽宁省化学实验教学示范中心, 沈阳 110819

摘要: 介绍了开放式上转换荧光测试系统的设计、搭建与应用。上转换荧光测试系统由激光光源、光束转折镜、样品池、光纤光谱仪和计算机部分组成。模块化的设计理念有利于帮助学生自主搭建荧光平台并进行性能调试, 强化学生对荧光定量分析方法、荧光仪器原理和构造的认识, 激发学生学习好奇心, 培养创新精神, 锻炼动手实践能力。

关键词: 上转换荧光; 荧光测试系统; 组装调试; 实验设计

中图分类号: G64; O6

Construction of an Open Upconversion Fluorescence Test System and Its Application in Laboratory Teaching

Shangqing Zhang*, Liming Tang, Mingli Chen*

Provincial Demonstration Center for Experimental Chemistry Education, Department of Chemistry, College of Sciences, Northeastern University, Shenyang 110819, China.

Abstract: This paper introduces the design, construction, and application of an open upconversion fluorescence test system. The system consists of a laser light source, a beam turning mirror, a sample chamber, an optical fiber spectrometer, and a computer. The modular design concept allows students to independently construct and debug the instrument, thereby enhancing their understanding of fluorescence quantitative analysis methods, the principles and structure of fluorescence instruments, and stimulating their curiosity. This approach cultivates an innovative spirit and hones practical skills.

Key Words: Upconversion fluorescence; Fluorescence test system; Construction and debugging; Experimental design

荧光是一种常见的化学现象, 在日常生活和科学技术中都有着极为广泛的应用。然而高校中关于荧光的化学实验集中于对物质的定量分析, 着重向学生介绍一种检测方法——荧光分析法。实验中选用的通常是经典的荧光物质, 基于荧光光谱仪获取的数据, 实现对其的定量分析, 如分子荧光光谱法测定维生素B₂的含量、荧光测定水杨酸和乙酰水杨酸的含量等^[1]。随着科学的不断进步, 新型的荧光物质层出不穷, 科学家们将其应用于细胞成像、便携式荧光检测、发光器件的制备等多个方面^[2]。此外, 荧光分析仪器也在不断地更新迭代, 对仪器运行原理和内部构造的了解不足限制了学生对荧光理论的深入学习^[3]。对于荧光分析方法浅尝辄止的介绍已无法满足当今高校创新人才培养过程中前沿性和时代性的要求, 寻找新的切入点成为荧光实验教学项目创新的关键。

上转换纳米颗粒是一种独特的荧光材料。相比于传统的下转换发光材料(如有机染料、量子点和

收稿: 2024-08-30; 录用: 2024-09-19; 网络发表: 2024-12-11

*通讯作者, Emails: zhangsq@mail.neu.edu.cn (张尚青); chenml@mail.neu.edu.cn (陈明丽)

基金资助: 国家自然科学基金青年基金项目(22304022)

金属簇等),上转换纳米颗粒可以将低能量的长波长近红外光转化为高能量的短波长可见光或者紫外光。这种与众不同给上转换纳米颗粒的实际应用带来了很大优势,可以有效避免来自复杂环境基质的自体荧光,降低背景信号,提高信噪比^[4]。不仅如此,上转换纳米颗粒还具有光化学稳定性好、寿命长、生物毒性低和光穿透深度大等优势,这促使其广泛应用在食品安全、生物分析、指纹提取、防伪印刷等多种领域并得以迅速发展^[5,6]。在化学实验项目中引入上转换荧光材料可以有效激发学生的学习兴趣,引导学生主动了解学科相关科研进展,帮助学生拓宽科学视野。

上转换纳米颗粒的荧光检测技术主要依赖于荧光光谱仪的分析。目前教学实验室中的荧光光谱仪一般购置商业荧光光谱仪,如普析通用、上海仪电等国产品牌和日立(Hitachi)、岛津(SHIMADZU)、爱丁堡(Edinburgh)等进口品牌。一方面,商业的荧光光谱仪价格昂贵,增加实验成本。且受光学元件限制,其体积较大,不符合未来实验室仪器小型化的发展趋势。另一方面,商业荧光光谱仪一般会将光源、单色器、样品池和检测系统都集合在一起,并进行光路封闭处理,不方便实验人员根据学生实验需求对荧光光谱仪进行光路的改进或者对应模块的改造及增减^[7]。此外,在实验教学过程中,光路封闭式的荧光光谱仪仅能帮助学生对其有概念上的认识以及提供检测操作练习,无法向学生展示仪器的内部构造及原理,并给学生带来实物层面上对荧光光谱仪主要模块的认知^[8]。发现现象、产生问题是科学的开始,全封闭的设计很大程度地限制了学生对专业知识的理解以及创新思路的开发。

为了全面贯彻落实“以学生发展为中心”的教育理念,本文以新型荧光纳米材料和仪器小型化为切入点,将具备科学前沿性的上转换荧光检测技术与小型开放式光学系统组装结合引入化学实验项目中,基于光学基本理论设计组装了开放式上转换荧光测试系统,并用于学生的研究型综合实验。学生可以通过学习预先了解荧光光谱系统的结构,自行设计与实验教师讨论设计的合理性,理论学习结束后学生自身体验开放式上转换荧光测试系统的搭建和基础功能的测试。这种“设计-讨论-实操”的实验环节既能加深学生对基础光学理论知识的理解,同时还可满足学生化学实验中分析测试的实操需求,有助于帮助学生在交叉科学领域开展更深一步的科学探究。

1 上转换荧光测试系统的设计思路

一般荧光光谱仪的组成结构和外观如图1所示,主要包括光源、单色器、样品池和检测系统四大组成部分。连续光源发出复合光,经过激发单色器分光得到特定波长的单色激发光,激发光照射在样品池中待测的荧光材料上发射出荧光,再经过发射单色器分光,通过检测系统传输信号,最终被读出获得待测荧光材料的荧光光谱^[9]。

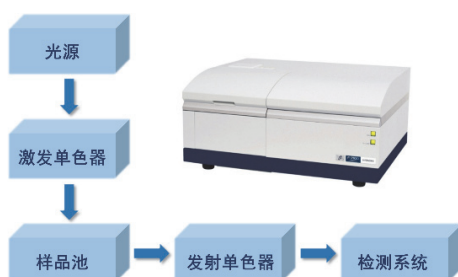


图1 常见的荧光光谱系统及其主要组成部分

上转换荧光测试系统的构建主要是在传统荧光光谱系统的组成基础上进行光源的变更和小型化的改进。我们围绕上海如海光电科技有限公司的XS7031型光线光谱仪设计小型化的上转换荧光检测系统,如图2所示,主要包括光学底板、激光及激光底座、光束转折支架及光束转折镜、样品池(比色皿及比色皿支架等)、光纤及接口和光谱仪及其底座等模块。在激光和样品池中间添加光束转折镜,缩小空间体积占比,增强系统空间紧凑性。

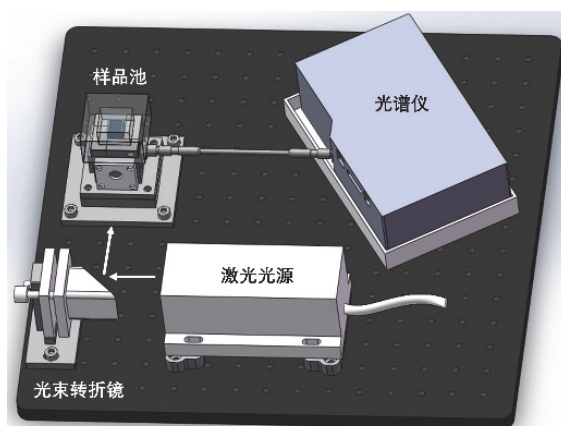


图2 上转换荧光测试系统的设计模型示意图

2 开放式上转换荧光测试系统的组成与光路搭建

2.1 上转换荧光测试系统的组成

2.1.1 激发光源

上转换发光是指连续吸收两个或两个以上长波长光子，发射出较短波长的光，是反斯托克斯荧光^[10]。因此，上转换材料的荧光一般需要近红外光的激发，而常见的荧光光谱系统通常使用汞灯和氙灯等广谱光源，它们的激发光波长范围均在紫外及可见光区域，无法满足检测上转换材料荧光的需求。为了激发上转换材料的荧光，选择单色性好的980 nm近红外激光器作为激发光源用于上转换荧光测试系统。图3为激光器实物图，由电源和激光器主体组成，功率在0–5070 mW范围内连续可调，可通过功率的调节控制激光的强度。开机步骤：打开1号开关，Power绿灯亮起，随后转动2号钥匙至ON，Laser绿灯亮起，证明激光器正常工作，最后调节3号旋钮至显示屏显示目标电流，激光会从4号位置射出照射到样品池的中心位置。



图3 上转换荧光测试系统的激光光源实物照片

2.1.2 光束转折镜

光束转折镜(图4)的主要作用是改变光束方向，调整系统空间分布，为仪器小型化做铺垫。其主要由反射镜和光束转折支架组成。调节光束转折架上的旋钮可以使激光照射在样品溶液的不同位置，从而产生不同的荧光信号。调节旋钮使激光恰好在样品池的正中央，在荧光信号最大时停止调节，获得最佳的测试谱图。

2.1.3 样品池

荧光光谱仪的样品池应采用低荧光材料制作，避免样品池对检测结果的影响。我们选择四通的石英比色皿作为盛放样品溶液的容器，并根据比色皿的尺寸设计组装样品池。如图5所示，由4块黑色金属块和黑色喷漆处理的底座零件组装而成，最终使样品池完全封闭且不吸光。在比色皿与金属块接触的地方粘贴透明胶带防止接触时对比色皿造成的磨损。

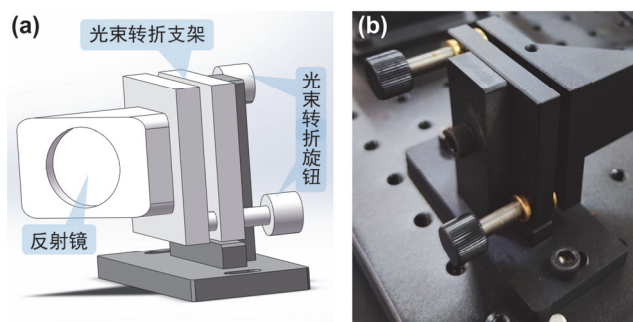


图4 上转换荧光光谱的光束转折镜数字模型(a)和实物图(b)

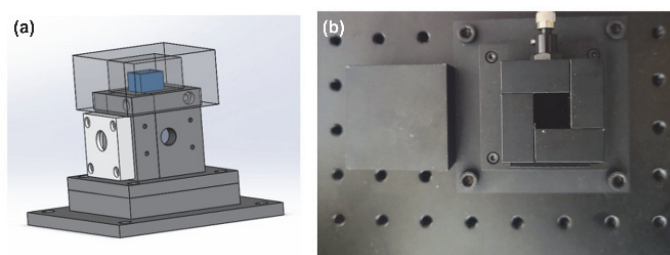


图5 上转换荧光测试系统的样品池数字模型(a)和实物图(b)

2.1.4 光纤光谱仪

光纤光谱仪涵盖了传统荧光分光光度计的单色器和检测器两部分元件，可将发射的连续光谱分解成单色光输出，通过检测器将检测到的辐射信号转换为电信号。本套系统中的XS7031型光谱仪选用的是光栅单色器，光路结构采用交叉式CT (Czerny-Turner)光路结构(图6)，入射荧光通过光纤从狭缝进入光谱仪中，经过交叉式光路结构照射到检测器上，从而获得荧光光谱。交叉式CT光路结构由于其在仪器整体尺寸和空间利用方面的优势，促使其在仪器中的体积占比较小，广泛应用于小型光谱仪的搭建。

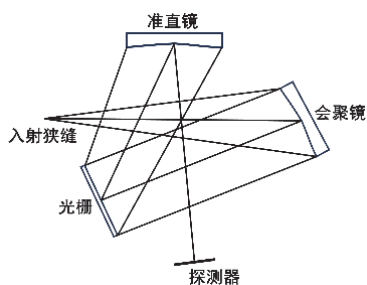


图6 交叉式CT光路结构示意图

2.2 开放式上转换荧光测试系统的光路搭建

上转换荧光测试系统由激光器、光束转折模块、样品池、光纤及光谱仪组成，每一个模块都有相应的底板或支架。依照前文提出的设计思路，对各类零件进行装配。首先将激光垫板与光束转折镜的支架固定在光学底板上，随后将激光器固定在激光垫板上，将光束转折镜用螺钉固定在光束转折支架上。紧接着将组装好的样品池沿光束转折镜反射后的光路方向固定在光学底板上，确保激光器出光口、光束转折镜、样品池和光谱仪的光纤口均处于同一水平线。激光从激光器射出经由光束转折镜反射到样品池中，样品溶液发射荧光经过光纤被光谱仪接收获得信号。光路的通畅证明了开放式上转换荧光测试系统的搭建完成，实物图如图7所示。

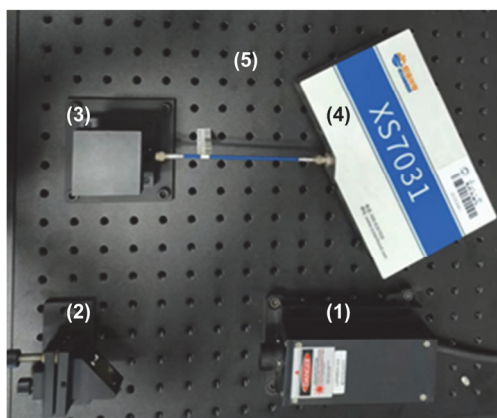


图7 开放式上转换荧光测试系统的搭建实物图
(1) 激光光源模块; (2) 光束转折镜模块; (3) 样品池模块;
(4) 光纤光谱仪模块; (5) 光学底板(440 mm × 440 mm)

3 上转换荧光测试系统的调试

针对设计出的开放式上转换荧光系统,影响荧光强度的因素主要包括激光落在样品池的位置、激光的功率和光谱仪的积分时间参数设置。荧光信号可以通过XS7031型光纤光谱仪配套软件Uspectral-PLUS-6.5.0(光谱软件界面如图8所示)确认。

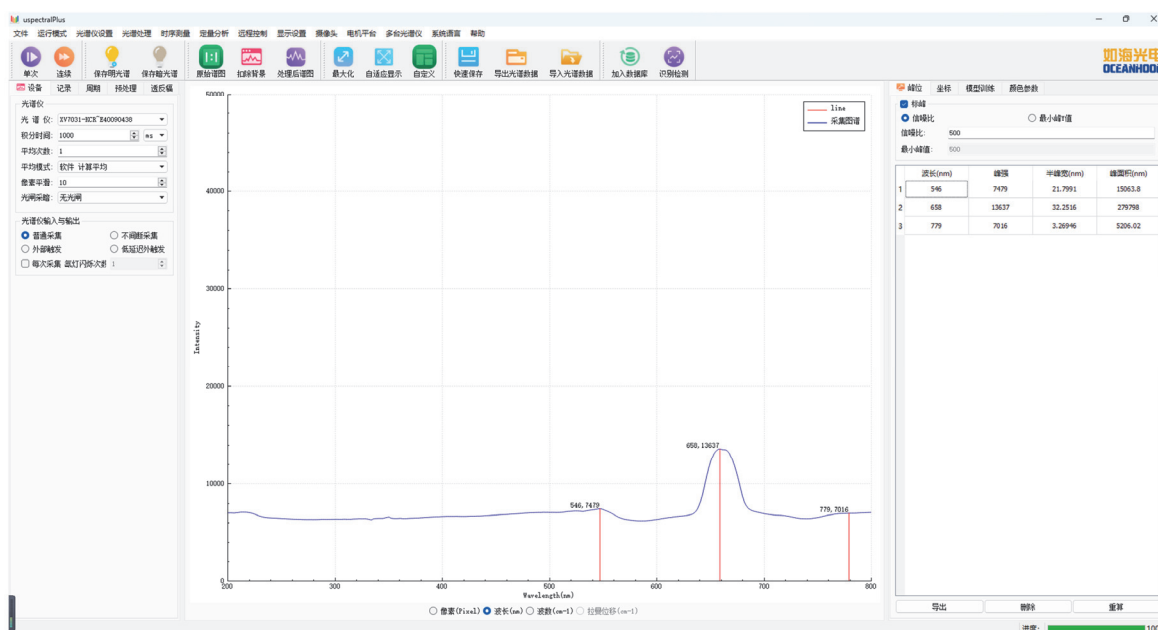


图8 光谱软件Uspectral-PLUS-6.5.0初始界面

NaYF₄:Yb,Er是一种经典的上转换荧光纳米材料,在980 nm激光激发下,肉眼可见明显的红色荧光^[11]。在如图9所示的荧光光谱上,可以看到NaYF₄:Yb,Er在659 nm处存在明显的特征荧光峰。选择其分散液作为待测样品进行测试。激光落在样品池的位置可以通过旋转光束转折架的旋钮来调节。激光位置不同,荧光强度也会产生差异。在一定范围内,激发光强度与荧光强度呈现正相关,即激光的功率越大,激光强度越大,对应的上转换材料的荧光也就越强,但当激光强度达到一定值时,上转换荧光会趋于饱和,增加激光功率并不会增强上转换荧光强度甚至还会缩短激光器的寿命。而

积分时间与荧光强度呈现非线性相关, 光谱仪的积分时间越大, 荧光强度越大。但当积分时间超过一定阈值时, 荧光强度的增幅会变小, 此外增加积分时间也会增强背景噪音信号, 可能掩盖较弱的荧光峰, 从而影响分析性能。为获得最佳的荧光信号, 遂固定激光器电源功率为3 mW, 光谱仪的积分时间为1000 ms。通过调节光束转折架, 对激光光路进行调整, 改变样品池的激光位置落点, 最终获得最佳测试谱图, 如图9所示, 在659 nm处呈现出一个明显的强荧光信号。

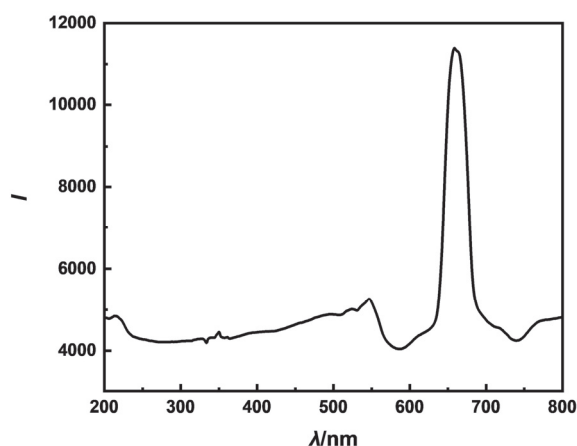


图9 系统调试后所得荧光光谱图(扣除背景)

4 上转换荧光测试系统的性能测试

检出限是小型化开放式荧光光谱系统需要考虑的一个重要参数。若系统针对荧光材料的检出限过低, 也会严重影响后续灵敏分析方法的开发。我们以 $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}$ 为研究对象, 配制了一系列浓度梯度的样品溶液(0.1、0.2、0.5、1.0、1.5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), 并利用开发的上转换荧光测试系统进行检测。正如图10a所示, 荧光强度与样品溶液浓度在0.1–1.5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度范围内呈现正相关, 即随着样品溶液浓度的增大, 荧光强度也随之变大, 但荧光的峰型保持不变。我们以659 nm处的特征荧光峰的峰值作为响应信号, 研究其与样品浓度之间的关系并绘制标准曲线。如图10b所示, 荧光强度 I 与 $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}$ 浓度在0.1–1.5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的范围内呈线性相关。线性拟合方程为: $I = 7561.5c - 156.8$ ($R^2 = 0.9997$), 检出限为47 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 证明了所开发的上转换荧光测试系统的良好灵敏度。此外, 测试数据的相对标准偏差不超过5%, 说明所开发系统具有良好的稳定性, 为之后均一化的本科教学实验奠定基础。

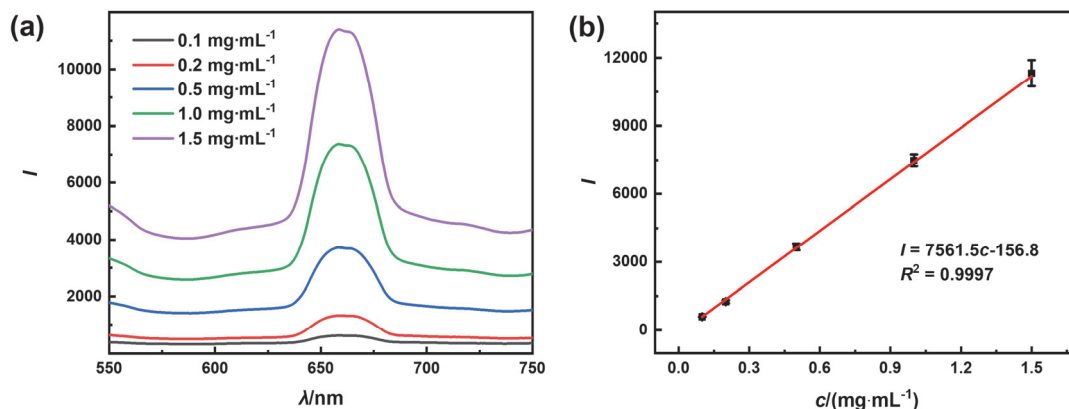


图10 (a) 不同浓度的 $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}$ 在550–750 nm的荧光光谱图;

(b) $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}$ 浓度与荧光强度的标准曲线

5 开放式上转换荧光测试系统的教学应用

以东北大学化学实验教学中心开发的专门化实验项目“开放式小型上转换荧光系统的搭建、调试与应用”为例，介绍实验项目的设计与应用。

5.1 实验目的

了解上转换荧光的发光机理；掌握荧光分析系统各模块的作用与工作原理，并自行搭建开放式上转换荧光系统；掌握系统信号调试方法，熟悉各类参数对系统信号的影响。

5.2 实验原理

上转换发光，也被称为反斯托克斯荧光，是指连续吸收两个或两个以上长波光光子，发射出较短波长的光。开放式小型上转换荧光系统主要由激光光源、光束转折镜、样品池、光纤光谱仪和计算机组成。各模块的作用详见2.1小节。

样品经激光辐射发射荧光，经过光纤光谱仪将光信号转变为电信号，通过计算机上的数据采集软件获得样品的荧光光谱图。光谱图横坐标为发射波长，纵坐标为荧光强度。

通过荧光光谱分析，可以得到样品的荧光发射峰位置以及最大荧光发射波长等信息，可用于后续分析方法的构建。

5.3 实验内容

5.3.1 上转换荧光材料溶液的配制

在分析天平上称取上转换荧光材料，以水为溶剂配制一定浓度梯度的上转换荧光材料溶液并超声分散，以供后续荧光系统测试需求。

5.3.2 模块组装

在熟悉开放式荧光系统的基本构造和工作原理的情况下，用内六角扳手将各模块零件(图11a)组装在光学底板上，随后连接好光纤光谱仪与计算机系统之间的连接线，完成系统的组装并检查光学通光路径是否正确无误。

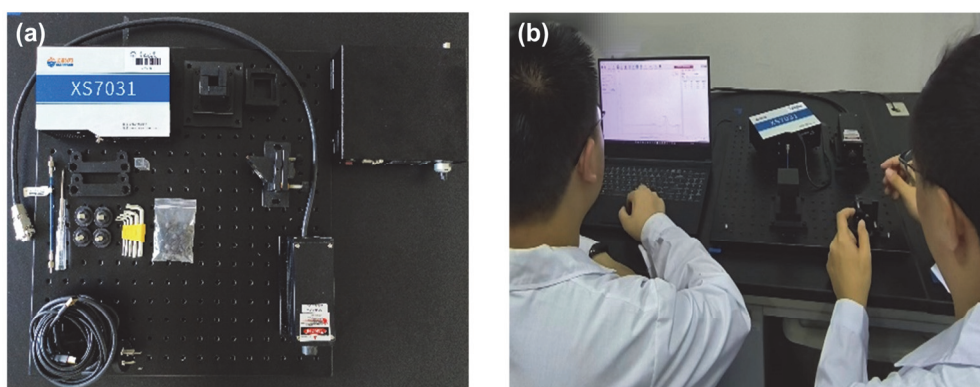


图11 (a) 上转换荧光测试系统组装模块零件实物图；(b) 学生正在进行仪器调试

5.3.3 系统性能的测试

组装成功后，依次打开激光电源、电脑、计算机软件。以配制好的上转换荧光材料分散液作为样品进行测试，在980 nm的激光辐射下，在200–800 nm范围内进行扫描获得数据。记录调节激光位置、功率及光谱仪积分时间等参数，直至在软件上观察到强度大、分辨率高并且稳定的荧光信号，视为参数调整完成。

5.3.4 开放式小型荧光系统的应用及谱图分析

利用搭建好的开放式小型荧光系统对上述系列的上转换荧光材料溶液进行测试，记录最大荧光发射波长所在位置的荧光强度。以上转换纳米材料溶液的荧光强度为纵坐标，以其浓度为纵坐标，绘制标准曲线。

实验结束后，依次关闭软件、电脑、激光光源。

5.4 实验注意事项

- (1) 切勿直接观察激光光源所发射出的光束，可能对人眼造成伤害；
- (2) 不要对光纤进行弯曲或拉扯以保证光纤使用寿命；
- (3) 系统搭建完成后应检查系统光路通行正确无误才可运行。

5.5 思考题

- (1) 荧光仪器小型化可以从哪些方面做起？
- (2) 如何提高仪器的灵敏度？
- (3) 上转换荧光材料的优势在哪？

5.6 教学反馈

该实验项目(4学时)要求学生在了解荧光光谱仪构造的前提下，自主搭建上转换荧光测试系统，并进行仪器参数调试和应用研究。整个实验过程简单安全，可由2-3名学生合作进行，如图11b所示。该实验项目通过开放式荧光光谱系统的搭建，实现荧光光谱系统的模块可视化，为学生打开了科学仪器的“黑盒子”，可以有效激发学生的学习兴趣 and 好奇心，加深其对荧光定量分析方法、荧光仪器原理及构造功能等理论知识的学习，同时也提高了学生的动手实践能力和小组合作能力。此外，上转换荧光纳米材料的引入对学生拓展视野、启迪创新意识也具有重要意义。基于上述教学特点，该实验开设后广受学生欢迎，对其进行匿名问卷调查，结果如图12所示。学生们普遍认为：该实验相比传统实验项目更加新颖，在通过小组合作的形式自主动手搭建仪器的同时，也对仪器相关理论知识有了更好的理解，能够激起自身对仪器的学习兴趣。

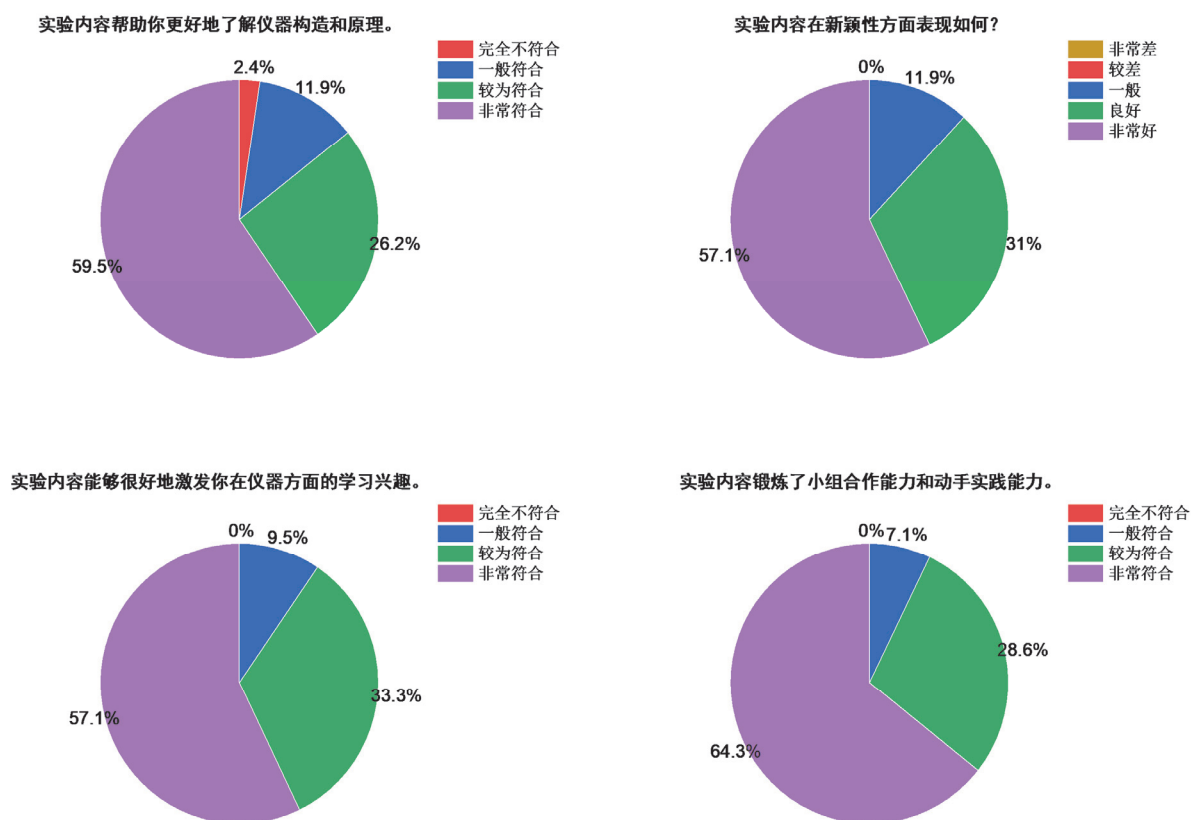


图12 针对本实验项目学生评价反馈的匿名问卷调查结果

除本文所列实验内容外, 该实验项目还可对上转换荧光测试系统的应用进行灵活拓展, 例如利用上转换荧光实现对具体有机染料的定量分析、通过更换激光光源的形式实现对多种上转换荧光材料的检测等。

6 结语

为满足“高阶性、创新性和挑战度”的人才培养要求, 我们利用本系的科研优势开设了专门化实验项目“开放式小型上转换荧光系统的搭建、调试与应用”, 让学生自主搭建荧光仪器并对其行调试应用, 极大激发了学生的学习热情, 深化了对荧光的认知, 扩展了科研视野, 培养了科学创新精神, 实现了人才教育中知识、能力、素质三者的有机融合。与此同时, 开放式小型化仪器的搭建也为高校设计顺应时代的实验教学内容、实现实验教学改革提供了思路。

参 考 文 献

- [1] 贾琼, 马玖彤. 仪器分析实验. 第2版. 北京: 科学出版社, 2023: 90–93.
- [2] 邓丽丽, 孟祥莹, 刘秀红, 何海峰, 林聪, 夏红英. 化学教育(中英文), **2023**, *44* (4), 48.
- [3] 苏海峰, 邓顺柳, 李云凯, 吴迪, 林志敏, 黄晓圳, 梁曼玉, 卢文和, 邱源, 郑兰荪. 大学化学, **2023**, *38* (10), 225.
- [4] 李琰, 刘欣欣. 分析科学学报, **2024**, *40* (3), 255.
- [5] Li, Z. H.; Yuan, H.; Yuan, W.; Su, Q. Q.; Li, F. Y. *Coord. Chem. Rev.* **2018**, *354*, 155.
- [6] Yang, X. R.; Sheng, Y. H.; Zhang, L. L.; Yang, L.; Xing, F. J.; Di, Y. S.; Liu, C. H.; Hu, F. R.; Yang, X. F.; Yang, G. F.; *et al. Nano Res.* **2024**, *17*, 9971.
- [7] 潘建章, 张梦婷, 张箫扬, 廖育城, 徐欣然, 方群. 大学化学, **2023**, *38* (4), 291.
- [8] Diawati, C.; Liliyasi; Setiabudi, A.; Buchari. *J. Chem. Educ.* **2018**, *95* (3), 468.
- [9] 梁向晖, 毛秋平, 钟伟强. 分析仪器, **2018**, No. 4, 164.
- [10] 关桦楠, 李明, 邢珂, 刘晓飞. 分析科学学报, **2023**, *39* (5), 604.
- [11] Yin, X.; Xu, W.; Zhu, G.; Ji, Y. N.; Xiao, Q.; Dong X. Y.; He, M.; Cao, B. S.; Zhou, N.; Luo, X. X.; *et al. Nat. Commun.* **2022**, *13*, 6549.