

文件编号：Q/WU FLHA19120048R026

版本号：V1.0

受控状态：

分发号：

# 理化公共实验平台

## 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

---

理化公共实验平台 发布

理化公共实验平台



理化公共实验平台

## 目 录

1. 目的 .....	1
2. 范围 .....	1
3. 职责 .....	1
4. 内容 .....	1
4.1 开机和预热仪器 .....	1
4.2 拉曼光谱测试 .....	2
4.3 数据处理 .....	15
4.4 结束前的检查 .....	21
5. 相关/支撑性文件 .....	21
6. 记录 .....	21
附录 1. 硅峰校准 .....	23

理化公共实验平台

## 1. 目的

建立快速成像显微拉曼光谱仪的标准使用操作规程, 使其被正确、规范地使用。

## 2. 范围

本规程适用于所有使用快速成像显微拉曼光谱仪的用户。

## 3. 职责

3.1 用户: 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, 并按本规程进行操作。

## 4. 内容

### 4.1 开机和预热仪器



图 4-1 快速变换显微拉曼光谱仪的各个部件

4.1.1 图 4-1 显示快速变换显微拉曼光谱仪的各个部件。本仪器功能齐全, 如图 4-1 所示, 包括三个激光器、一个光谱仪 (配置 EMCCD)、一套控制器及一套共聚焦显微镜。所有的硬件设备通过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。

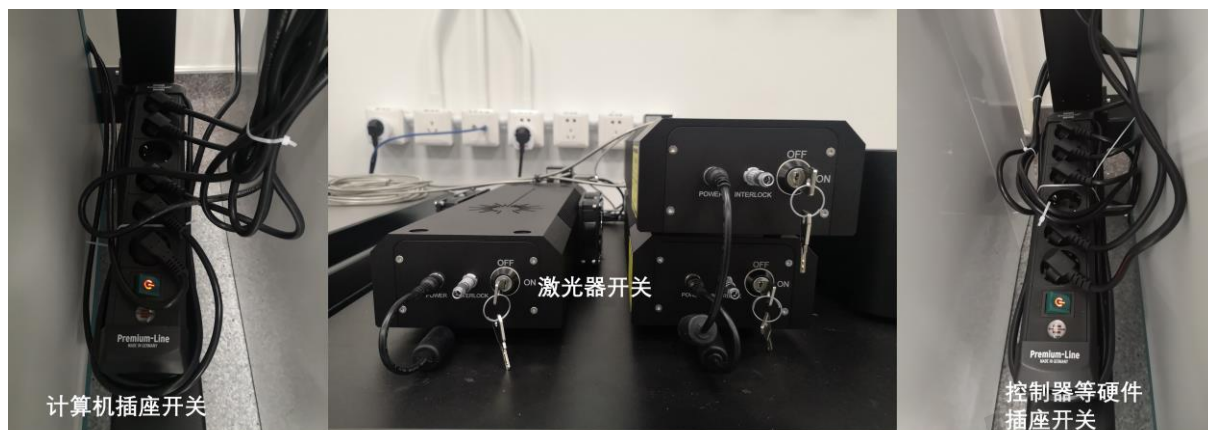


图 4-2 快速变换显微拉曼光谱仪的开关

4.1.2 开机步骤：打开控制器左右两侧的插座→开电脑→打开激光器预热→检查仪器的服务监控是否正常→点击桌面上的【Control FIVE】软件→观察到 EMCCD 自动降温→待温度降到-60°C→完成开机。

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，晚上走时仅需关闭激光器，其他部件都不用关闭。

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 4-2 所示的所有仪器开关。

## 4.2 拉曼光谱测试

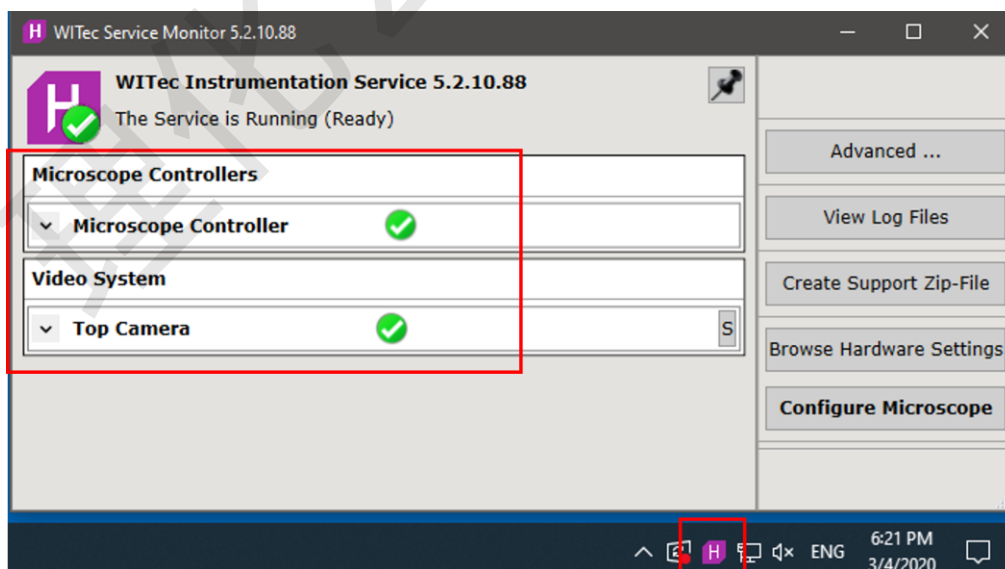


图 4-3 WITec Service Monitor 界面

4.2.1 打开控制软件之前,先点击桌面右下角的紫色  标图,如图 4-3,确认【Microscope controller】和【Top camera】状态正常。再打开【Control FIVE】软件,弹出软件对话框,如下图 4-4 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。

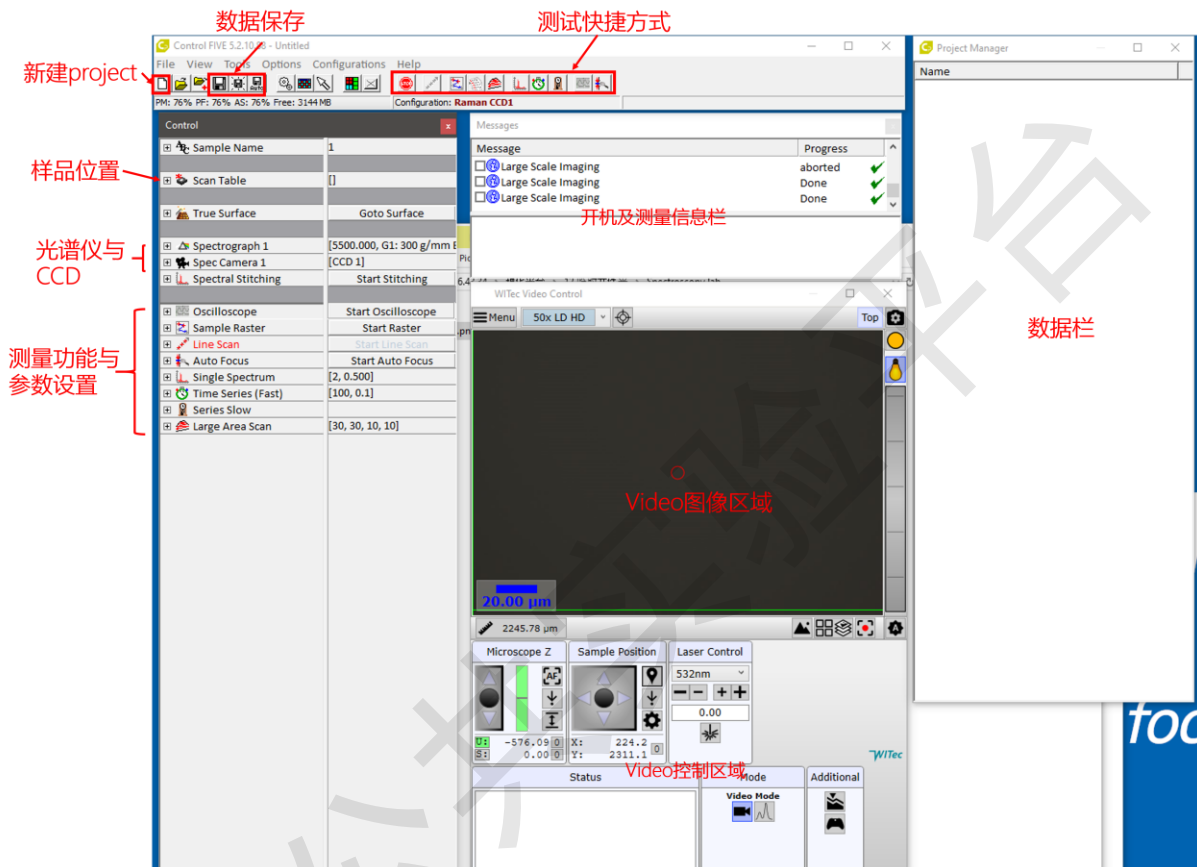


图 4-4 拉曼光谱测试【Control FIVE】软件操作界面

其中【Control】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,下面从此界面开始介绍仪器操作的整个流程。

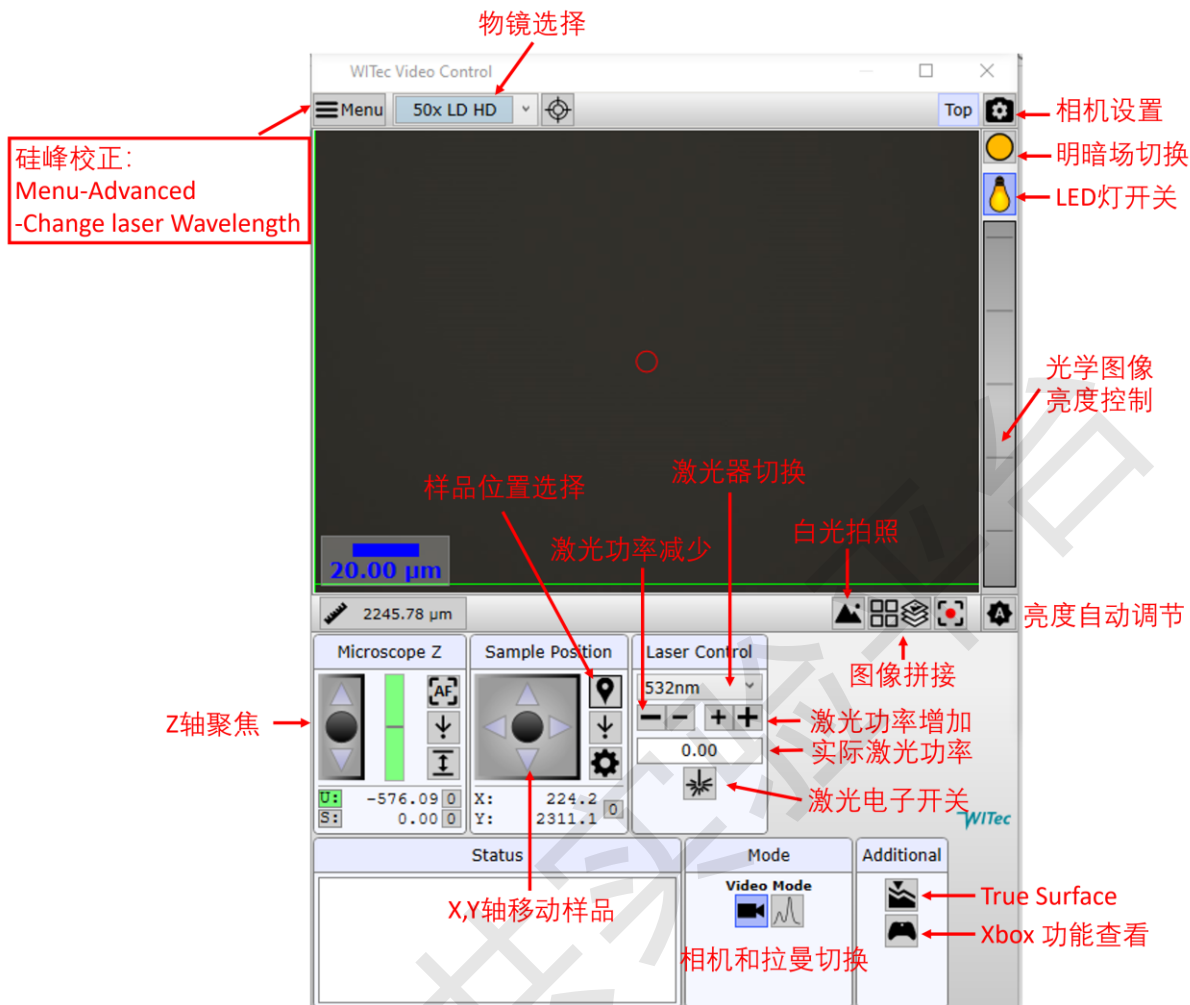


图 4-5 Video 控制窗口

#### 4.2.2 样品装样和换样

4.2.2.1 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. 粉末样品也可以成像, 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。

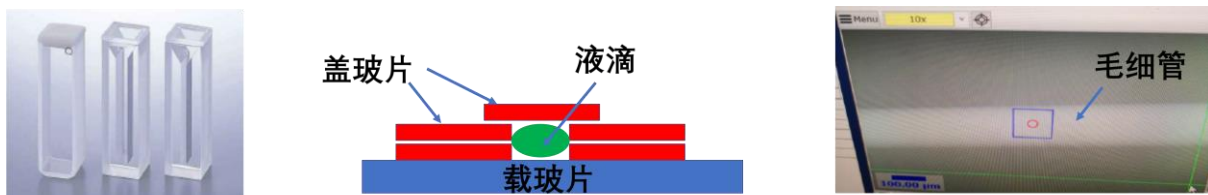


图 4-6 液体样品的制样方式

2) 液体样品制样：如图 4-6 所示，对于大体积（比如毫升级）液体样品的测试，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（比如几十微升）液体样品的测试，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，只需吸取少量于毛细管中即可进行聚焦检测。

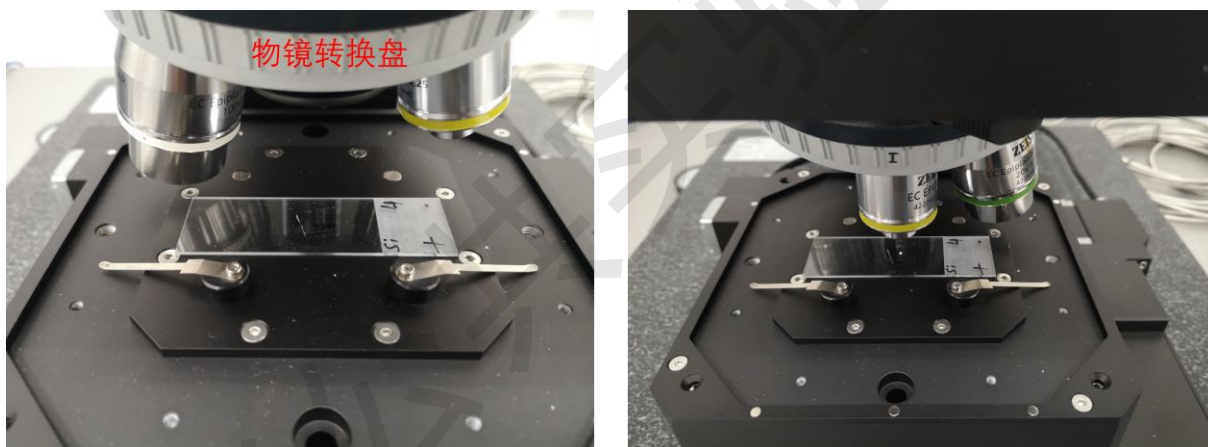


图 4-7 样品装样时调整镜头的位置

4.2.2.2 放置样品前，转动镜头的转换盘（不能直接接触物镜），如图 4-7，只有在空镜头位置和 10×镜头的位置才能将样品放进去和取出来，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。

#### 4.2.3 如何在镜头下高效寻找样品

##### 4.2.3.1 样品图像拼接（XY 平面合成和景深合成）

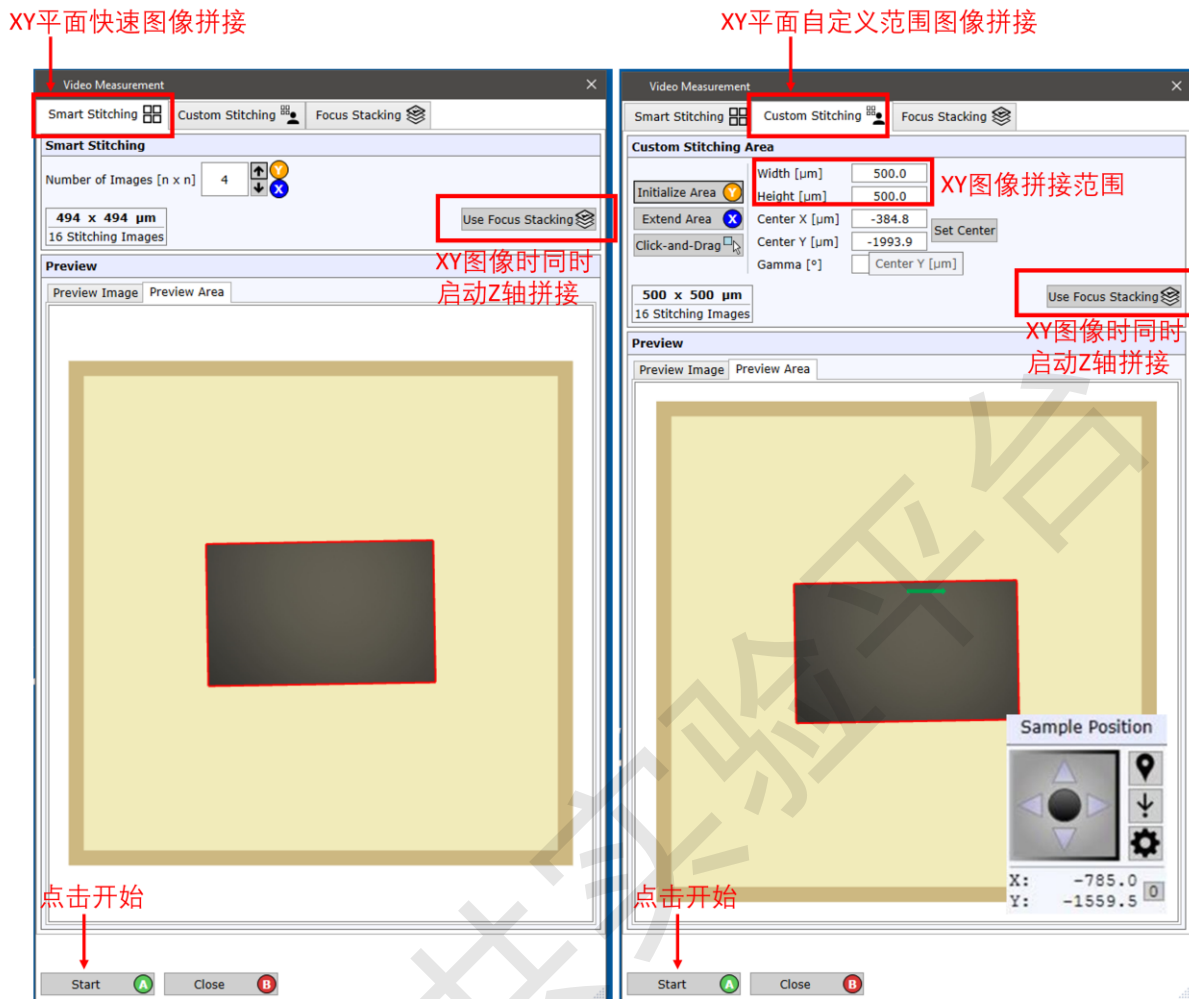


图 4-8 样品图像 XY 轴拼接

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 4-8 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×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 Review 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。

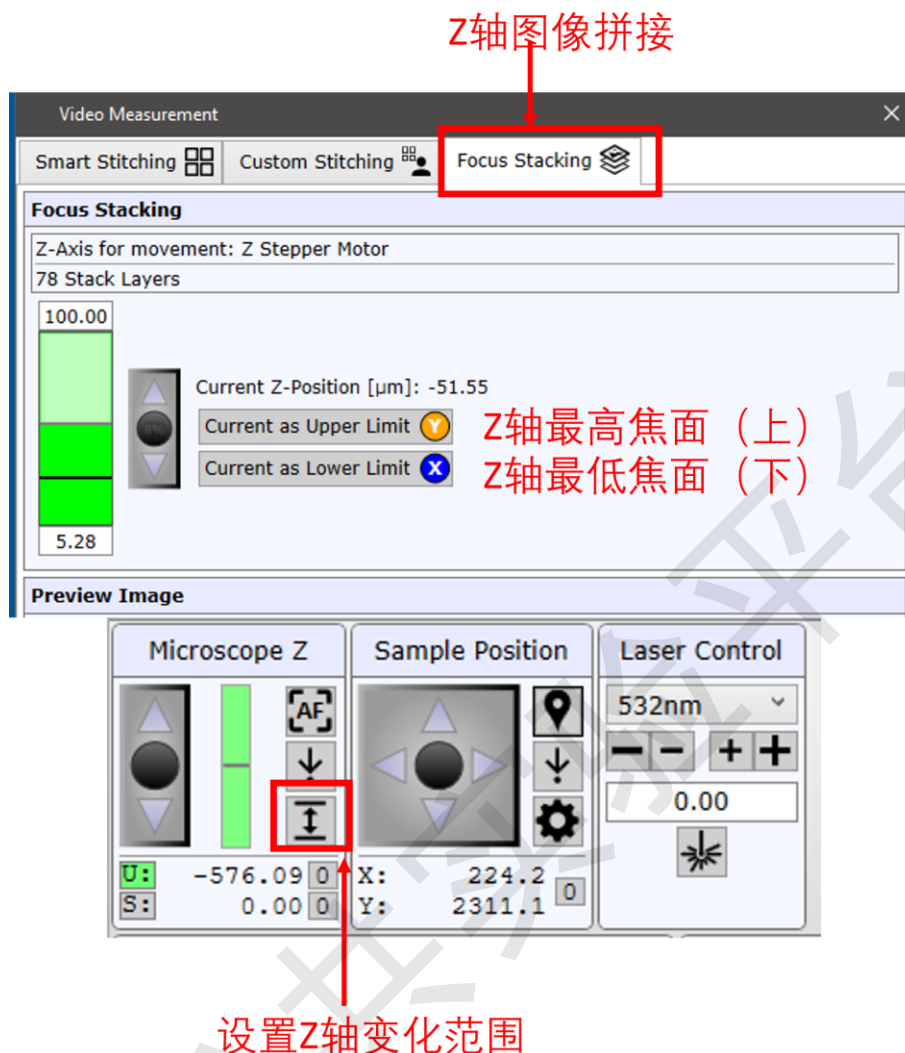


图 4-9 样品图像景深合成

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 4-9，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 4-8，点击【Use Focus Stacking】，实现粗糙表面的大面积景深合成。

4.2.4 光谱采集过程：一般遵循该测试规则：点光谱（优化积分时间和激光功率）→线扫（位置和形状大小）→面扫及 3D 成像

4.2.4.1 硅片校准（单晶硅  $520.7\text{ cm}^{-1}$ ）。具体流程见附录 1。

4.2.4.2 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。

4.2.4.3 采谱参数优化：

a) 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参数，包括激光功率、积分时间以及聚焦；

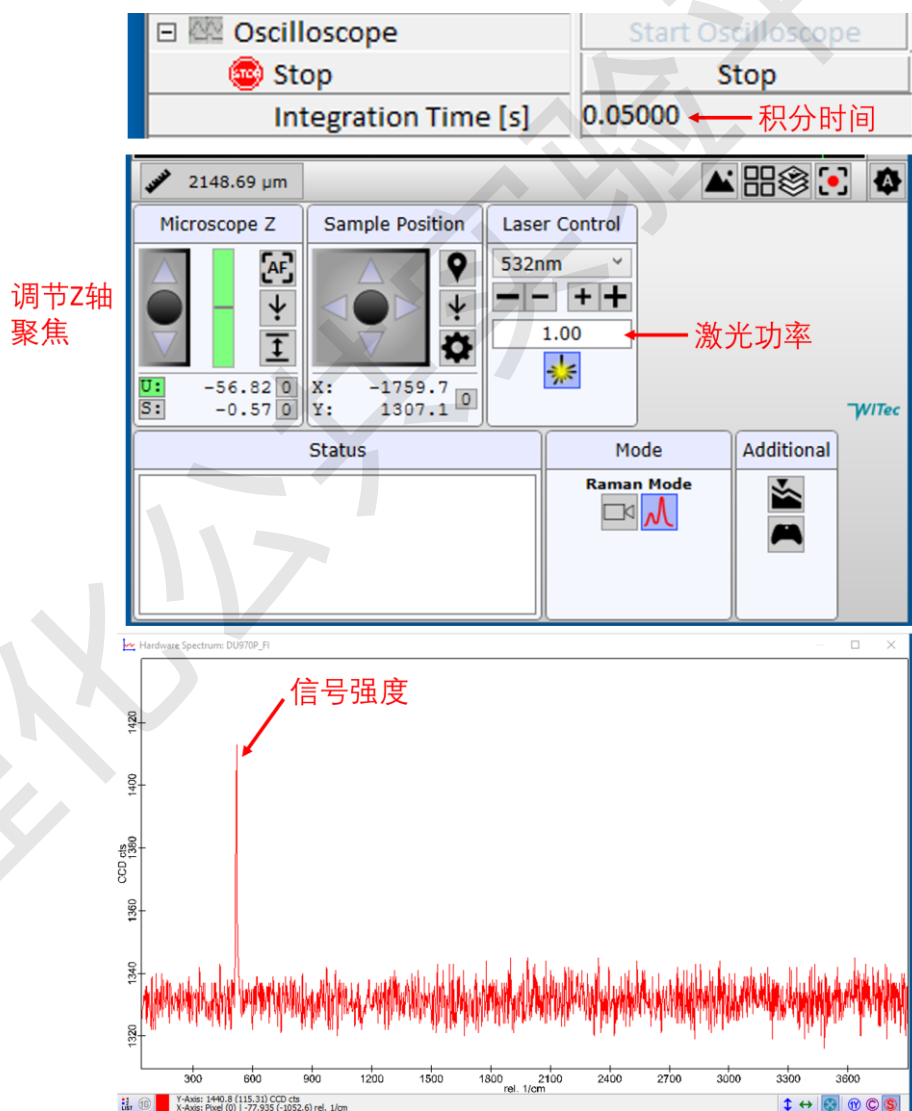


图 4-10 强信号样品参数优化

b) 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 4-11 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。

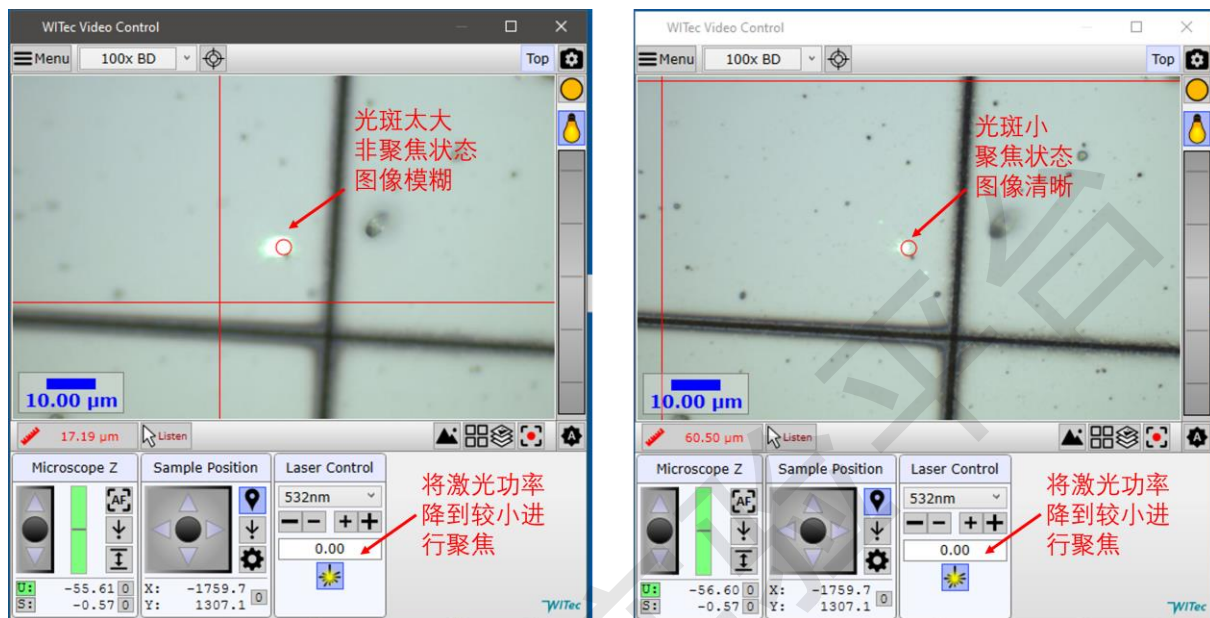


图 4-11 弱信号样品光斑聚焦

#### 4.2.4.4 点光谱采集



图 4-12 光谱仪参数

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。上图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。

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 4-13 点光谱采集参数设置

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。

#### 4.2.4.5 线扫和 Mapping 成像

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]		
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 4-14 线扫的参数设置

线扫参数设置如上图所示，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在图 4-13 的单谱里进行设置。

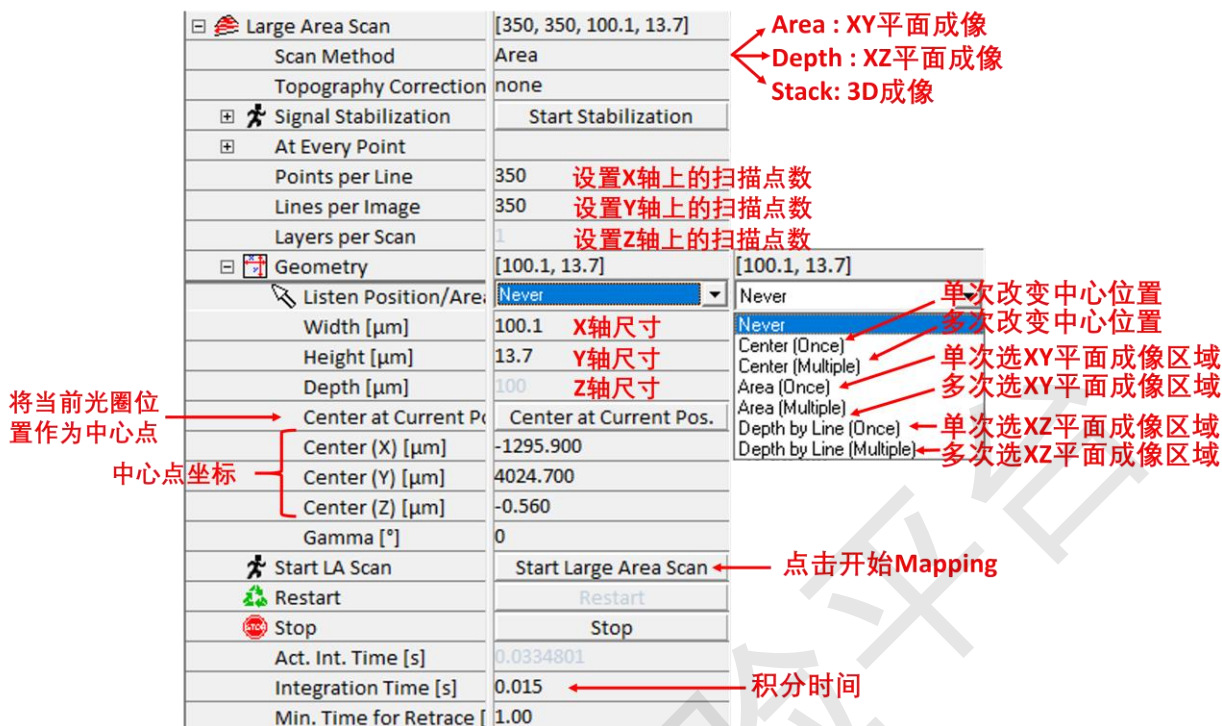


图 4-15 Mapping 成像的参数设置

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 4-15 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。

#### 4.2.4.6 TrueSurface 功能

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。这种方式使用了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。

图 4-16 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。

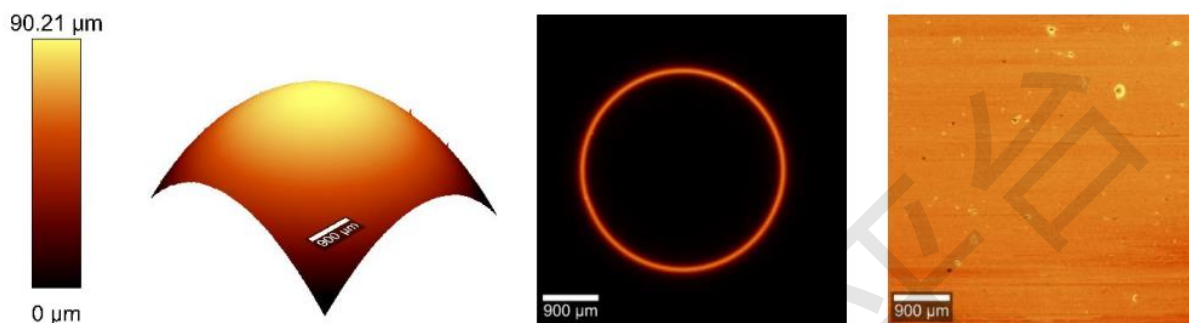


图 4-16 Si 透镜成像。左:透镜的表面形貌。中间:普通的共焦拉曼显微镜只能聚焦一个深度。右图:与中间的图像相同, 但 TrueSurface 激活后, Si 信号从各个深度都是恒定的, 因为样本表面实时聚焦。



图 4-17 TrueSurface 成像的参数设置

(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: + / 4μm

50 × objective: + / -16μm

20 × objective: + / -100μm

(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。200μm 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 500μm, 50×常规物镜设置为 1000μm, 20×常规物镜设置为 1-2mm。

(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 gain 越高, 效果越好(一般为 0.2-1)。I gain 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 gain 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)。Note: 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。

#### 4.2.4.7 光电流成像测试

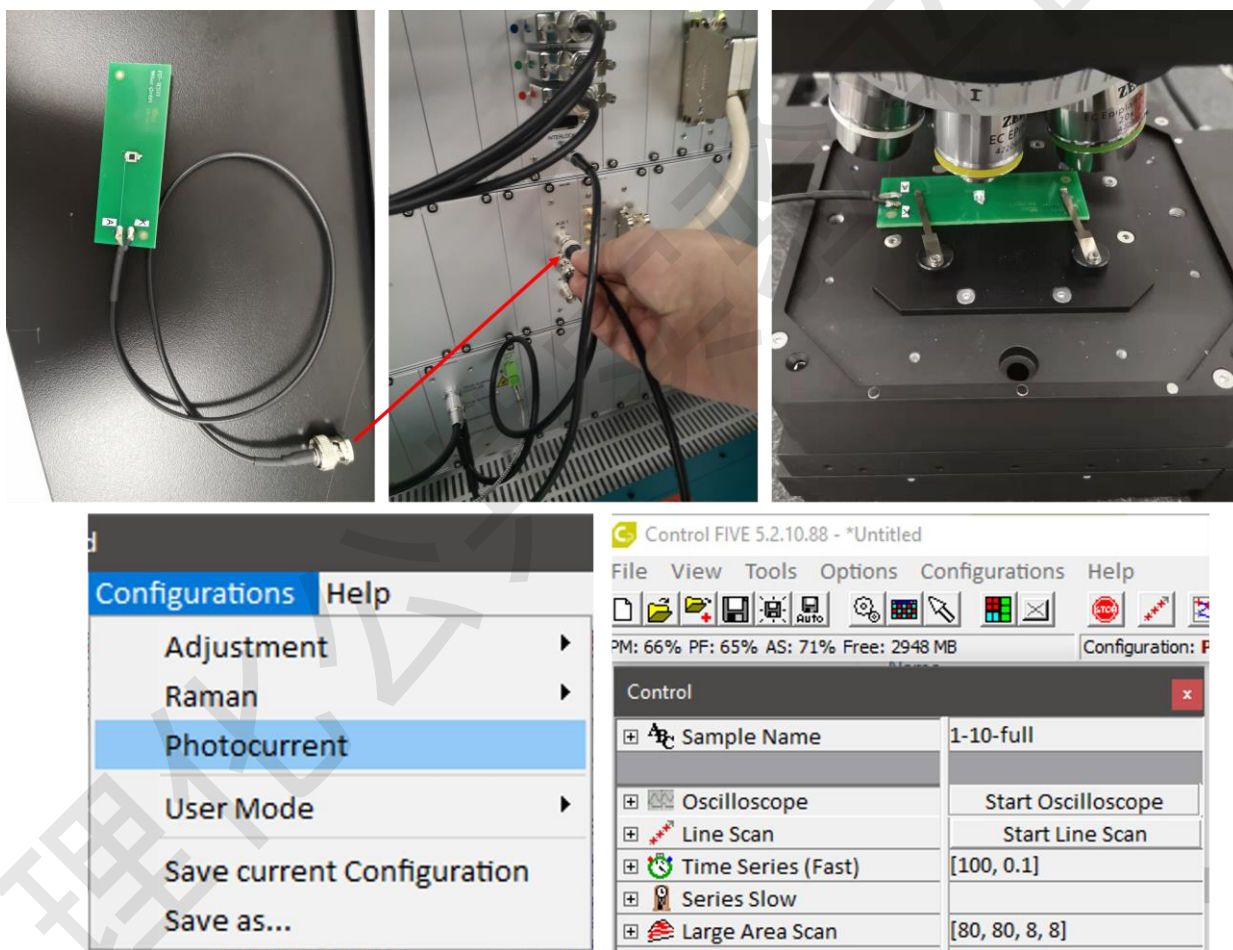


图 4-18 光电流成像测试

本仪器配备光电流附件可用于光电流成像测试。光电流成像的样品需在加工平台进行加工，如图 4-18 所示，接口与仪器的控制器连接，然后将样品放至显微镜下。软件中【Configuration】的下单菜单将【Raman】修改为【Photocurrent】，则【Control】面板自动转换为光电流成像的参数设置，所有的设置方法同前面拉曼成像的方法一致。

### 4.3 数据处理

#### 认识数据图标

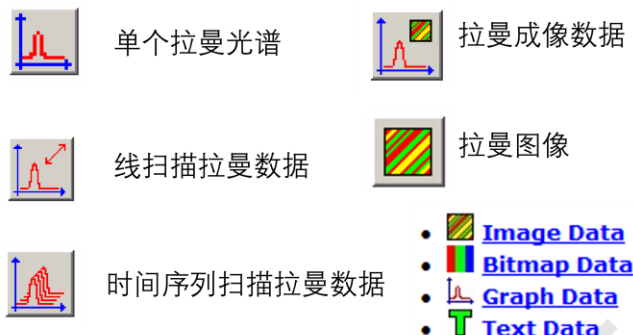


图 4-19 【Project Manager】各图标所代表的的数据

【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，下面我们将进行逐个展开说明。

#### 4.3.1 单谱处理

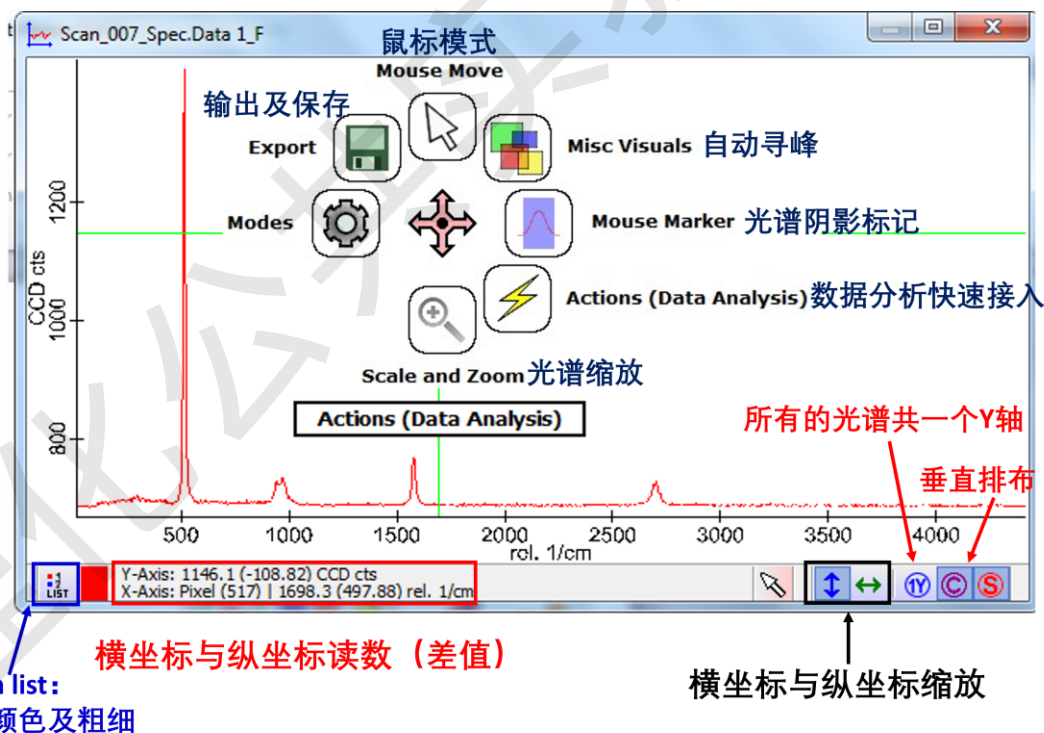


图 4-20 单谱数据窗口各个图标的含义

图 4-20 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。

#### 4.3.1.1 去除宇宙射线

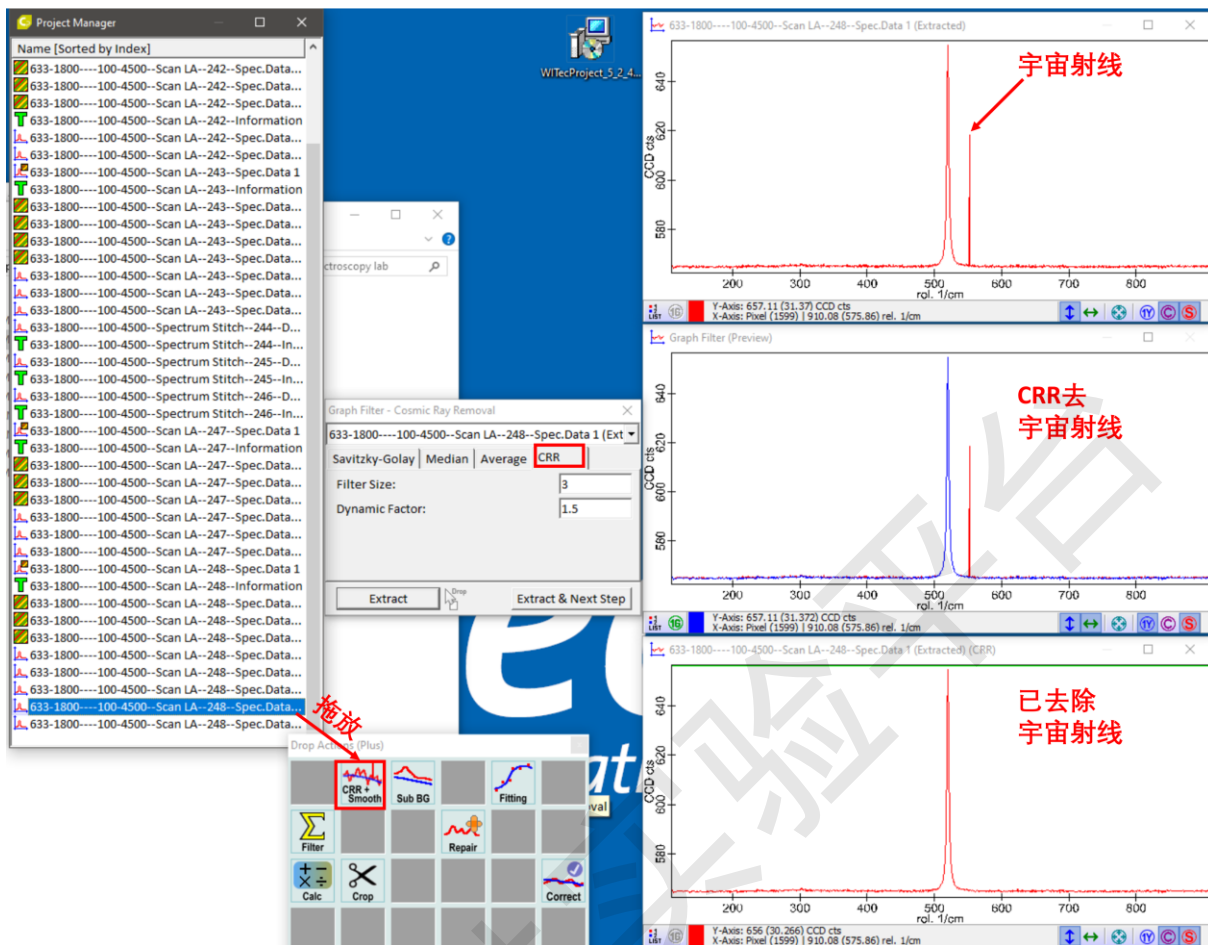


图 4-21 单谱去除宇宙射线

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 4-21 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，如上图所示，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。

#### 4.3.1.2 去除荧光背景

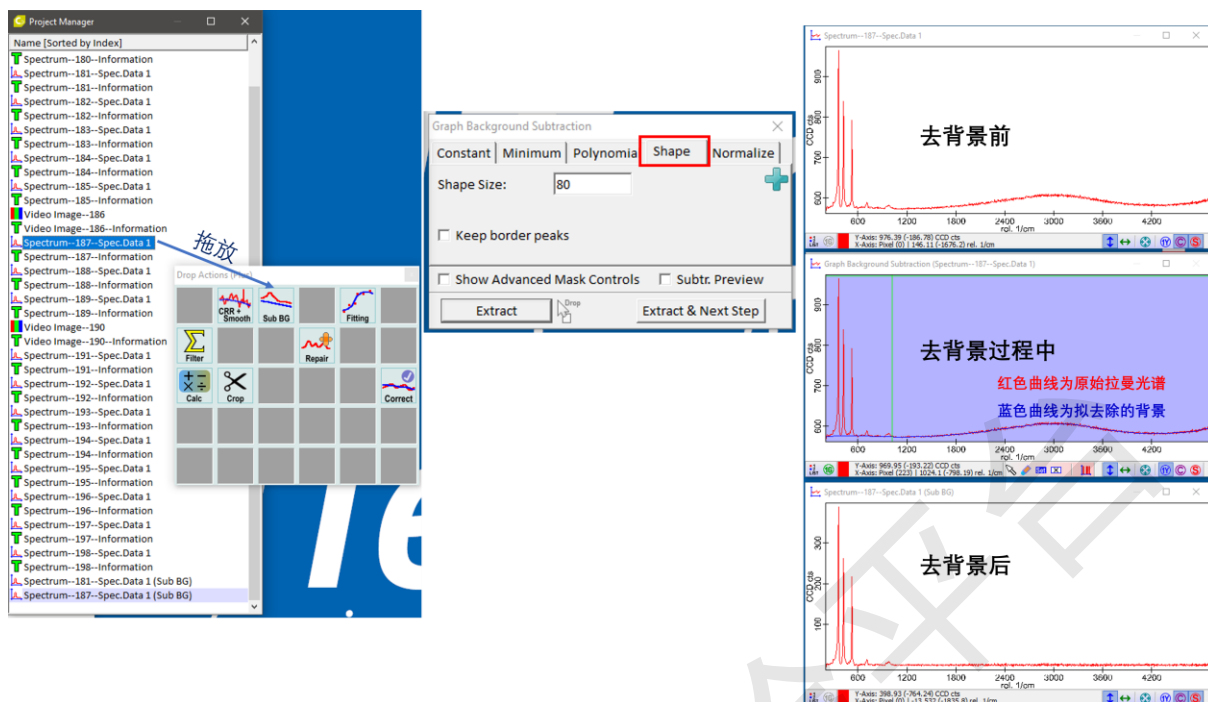


图 4-22 单谱去除荧光背景

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（因为荧光的宽峰而拉曼是窄峰，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。

#### 4.3.1.3 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去 origin 里重新做图，软件上可以实现批量导出数据的功能，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】）

#### 4.3.2 Mapping 图像处理（线扫处理方法和 Mapping 一样）

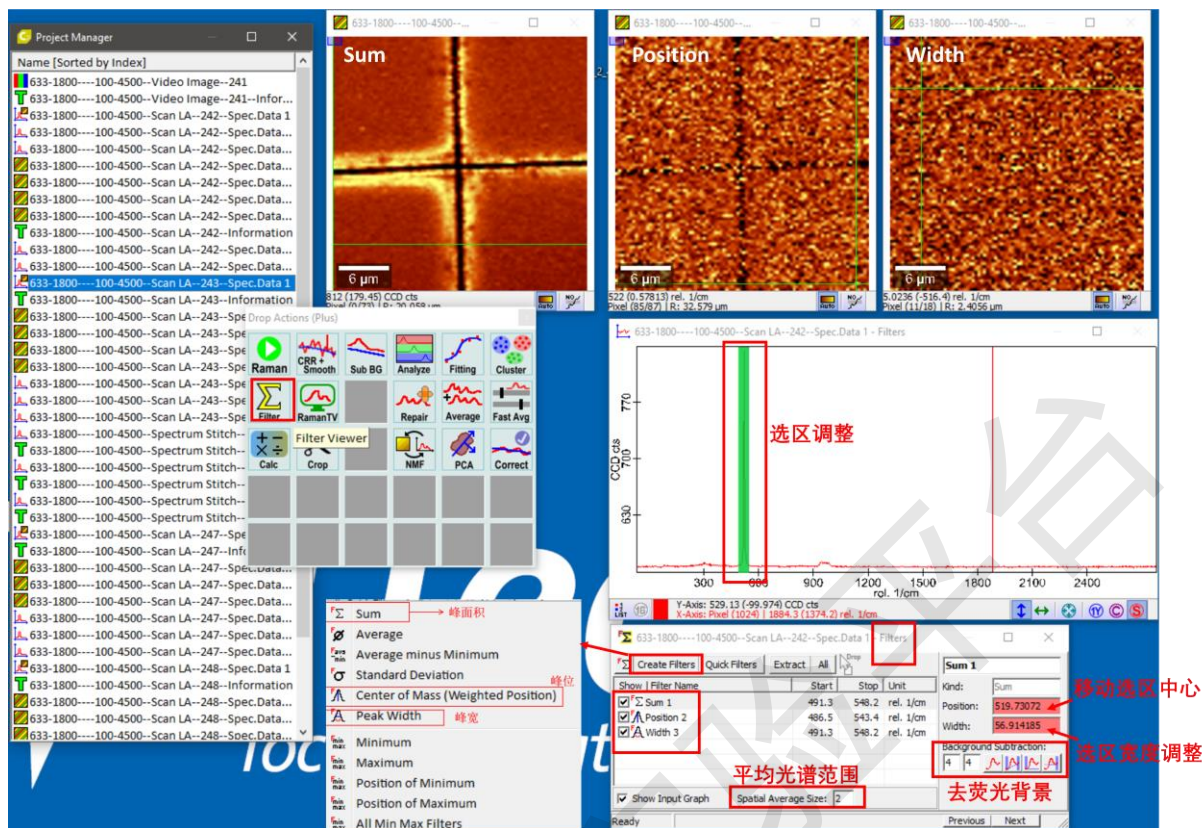


图 4-23 Mapping 图像处理


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 4-23 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 4-24 图像窗口中各个图标的含义

【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 4-24 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。

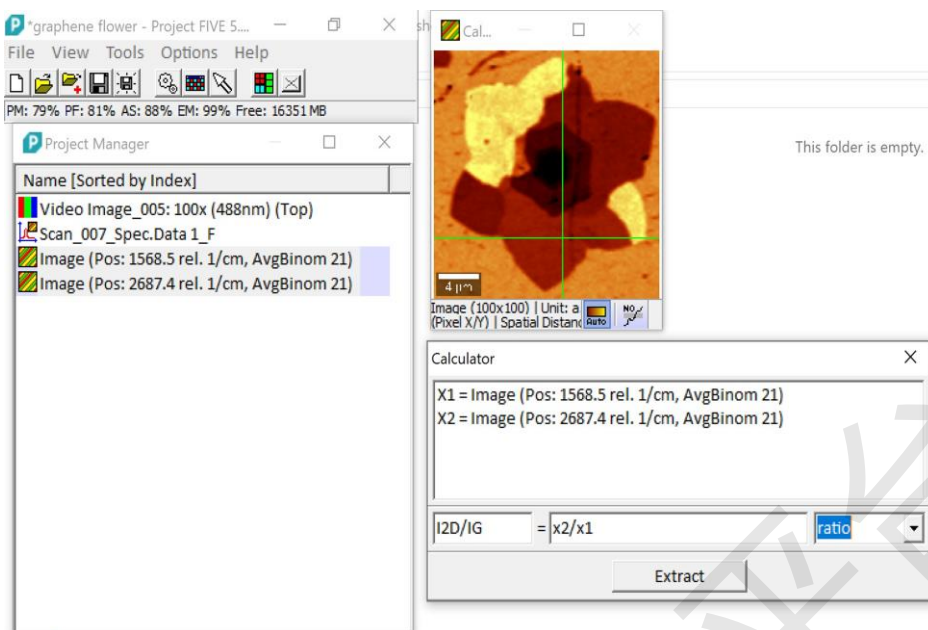


图 4-25 图像运算【Calc】处理

图像运算【Calc】处理需要同时拖放两幅图像，如图 4-25 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。

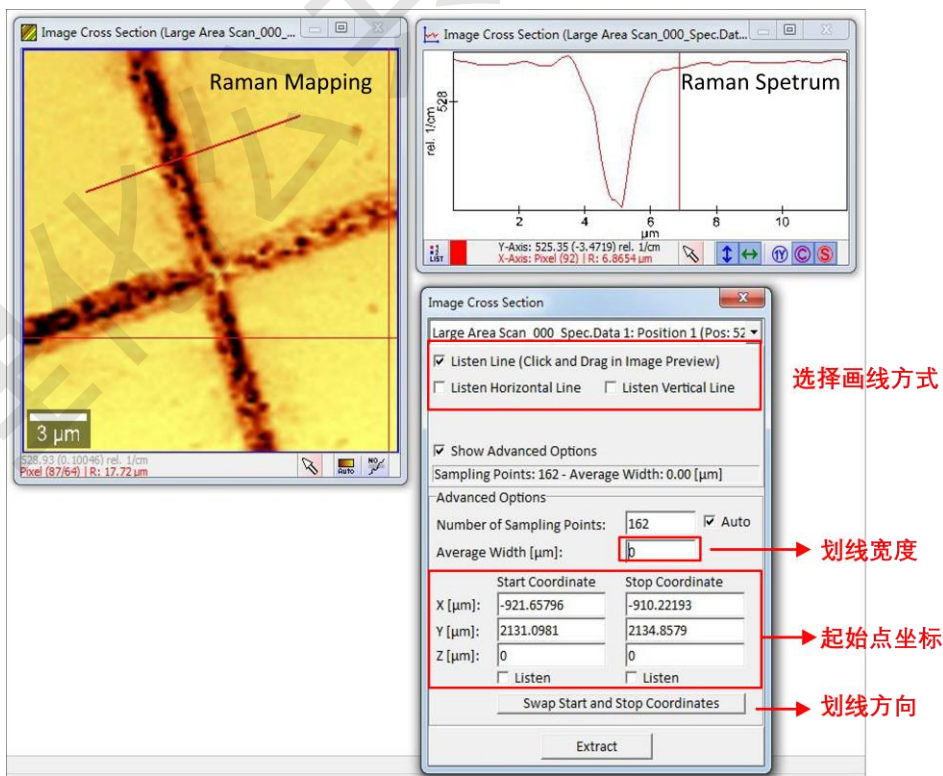


图 4-26 拉曼图像截面【Section】

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。

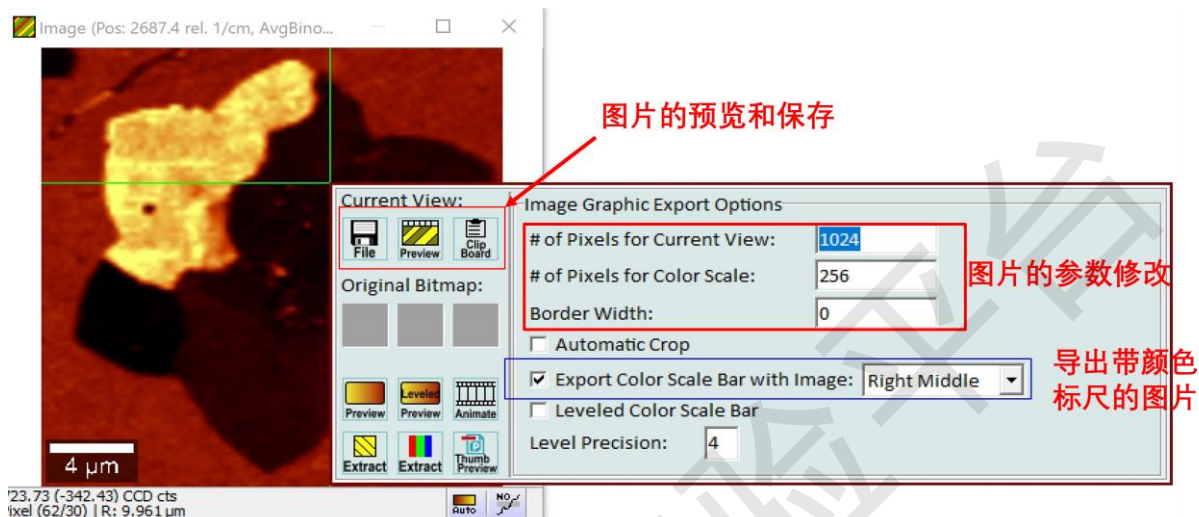


图 4-27 拉曼图像的导出

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】后对出现图片导出窗口，具体参数设置如图 4-27 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。

#### 4.4 结束前的检查

- 4.4.1 退出账号
- 4.4.2 关闭激光器
- 4.4.3 收拾桌面和处理废物

#### 5. 相关/支撑性文件

Q/WU FLHR001 文件编写规范

#### 6. 记录

《仪器设备使用记录本》（科研实施与公共仪器中心通用版）



### 附录 1. 硅峰校准

1. 对硅片聚焦后, 在标准条件下采集单谱

(采集后会弹出两个光谱对话框)

标准条件:

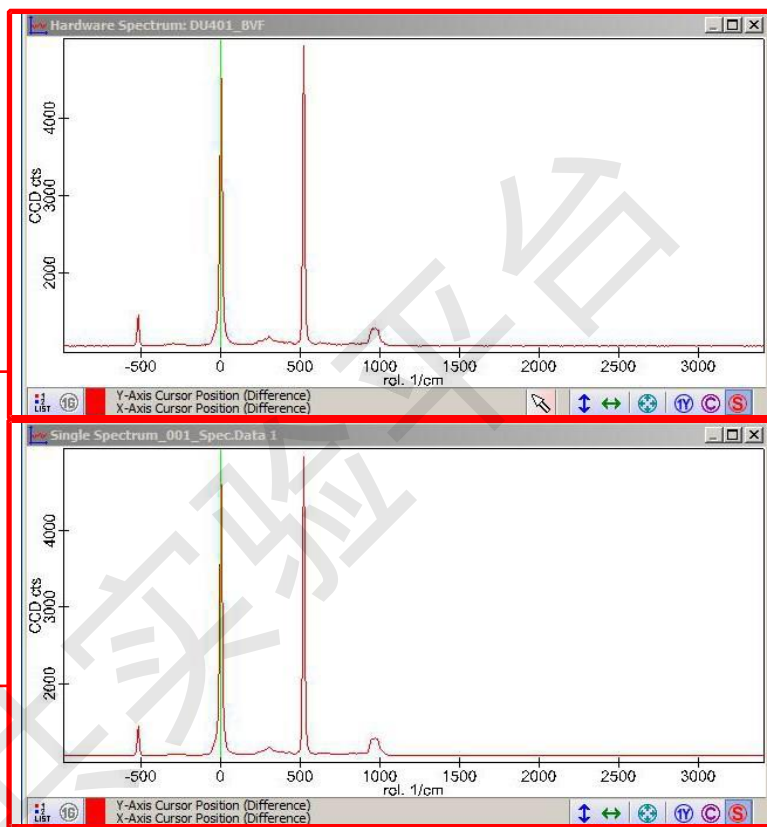
积分时间: 0.5 s

积分次数: 10 次

激光功率: 10mW

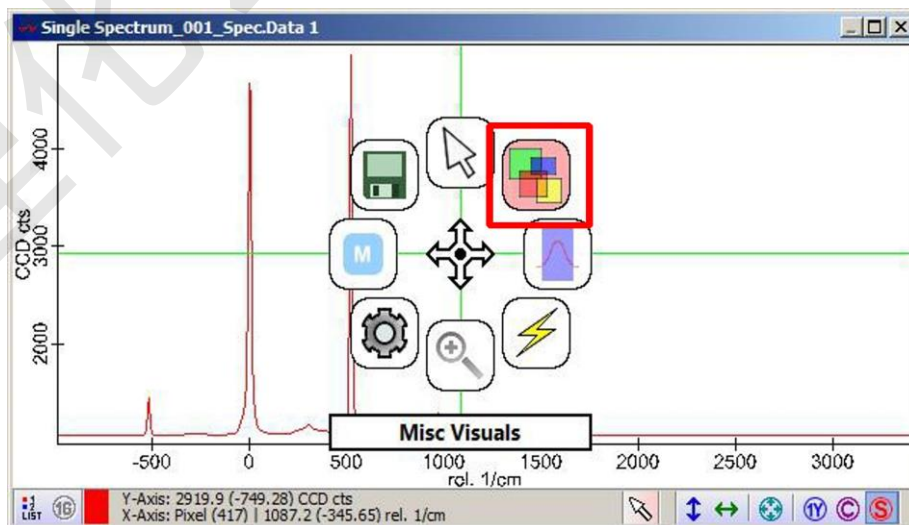
检测器  
实时光谱

采集到的光谱

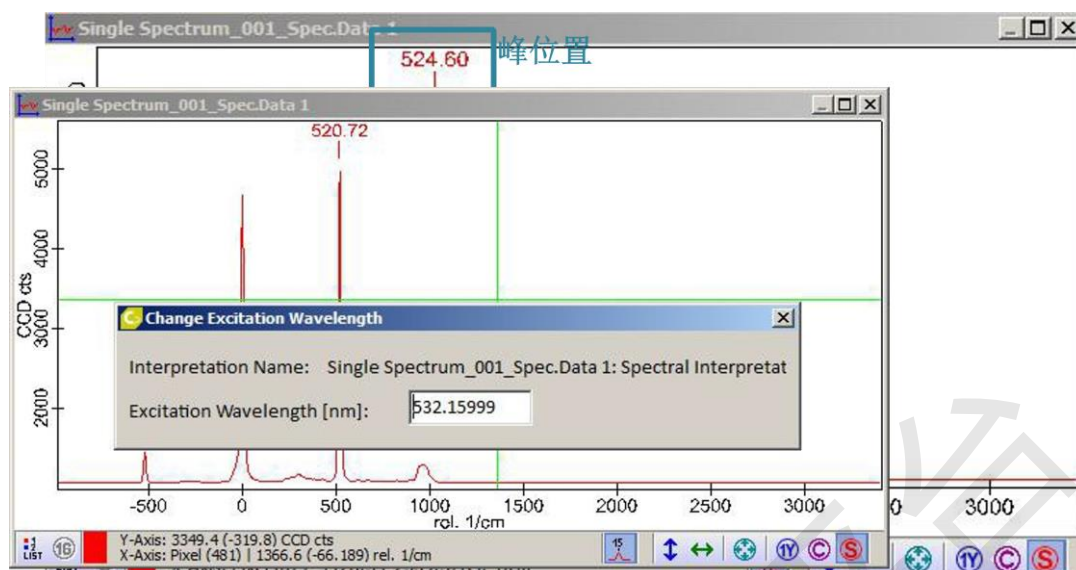


2. 寻峰 (在采集到的光谱窗口上操作)

a. 右键-选择【MiscVisuals】模块

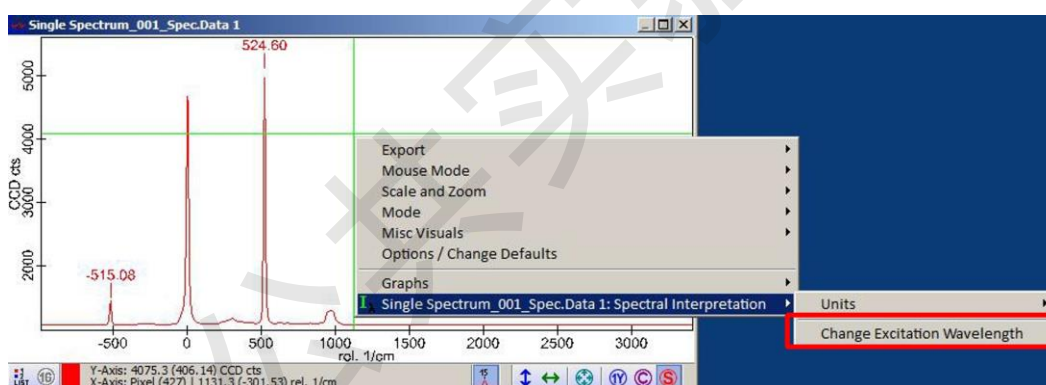


b. 在【Misc Visuals】中选择【Peaks】



### c. 调整峰位置

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



点击“OK”，以调整 Si 峰位置

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：

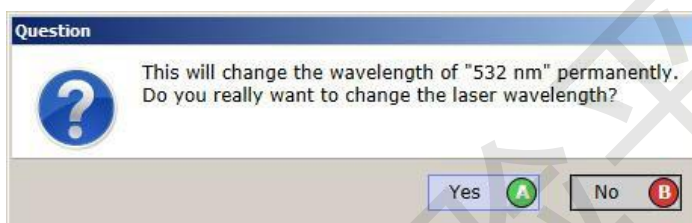
$$R_{shift} = \left( \frac{1}{\lambda_{laser}} - \frac{1}{\lambda_{CCD}} \right) \times 10^7$$

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。

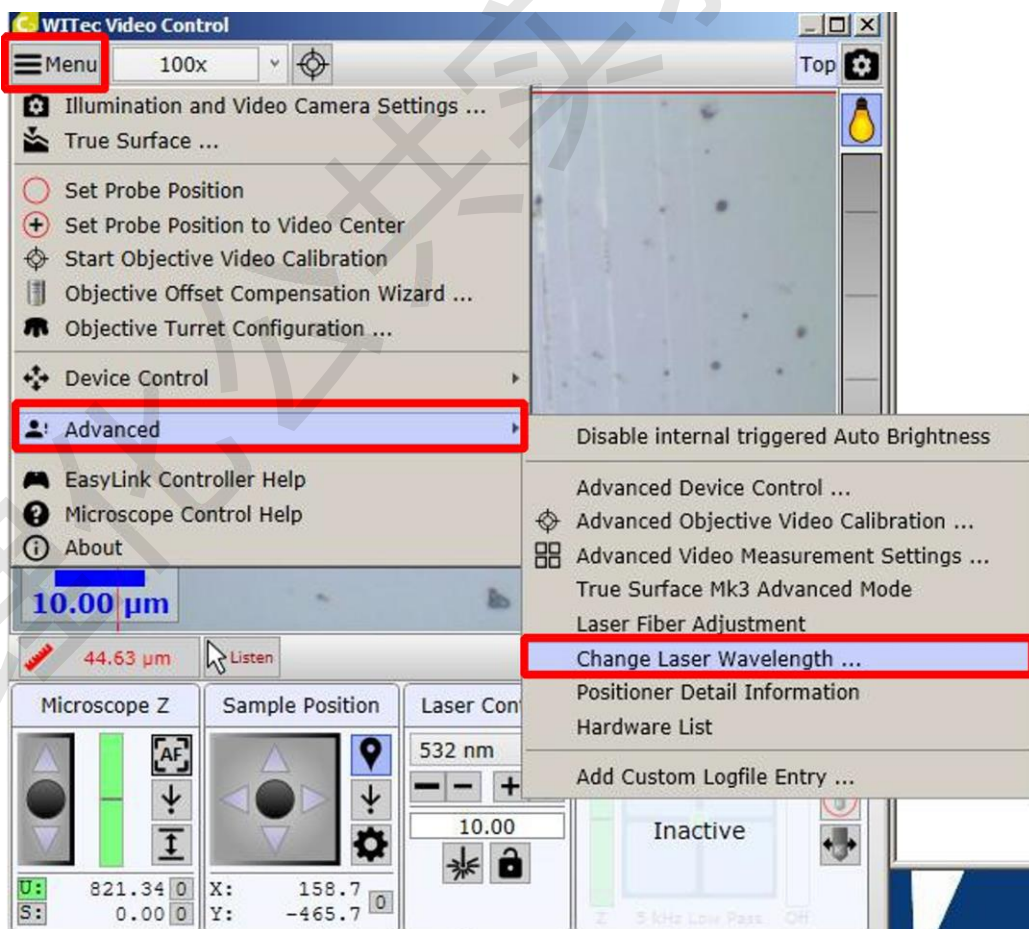
- d. 将调整后的【Excitation Wavelength】数值复制

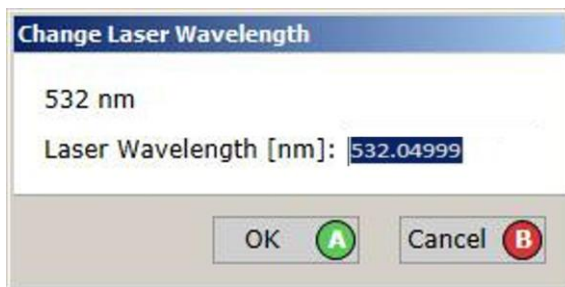


3. 更改参数，【Menu】-【Advanced】-【Change Laser Wavelength】，点击【Yes】，以更改参数



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





5. 重新采集光谱, 可以看到硅片校准已经完成

