



中国人民大学化学与生命资源学院

SCHOOL OF CHEMISTRY AND LIFE RESOURCES, RENMIN UNIVERSITY OF CHINA

理化分析测试中心

INSTRUMENTAL ANALYSIS CENTER (IAC)

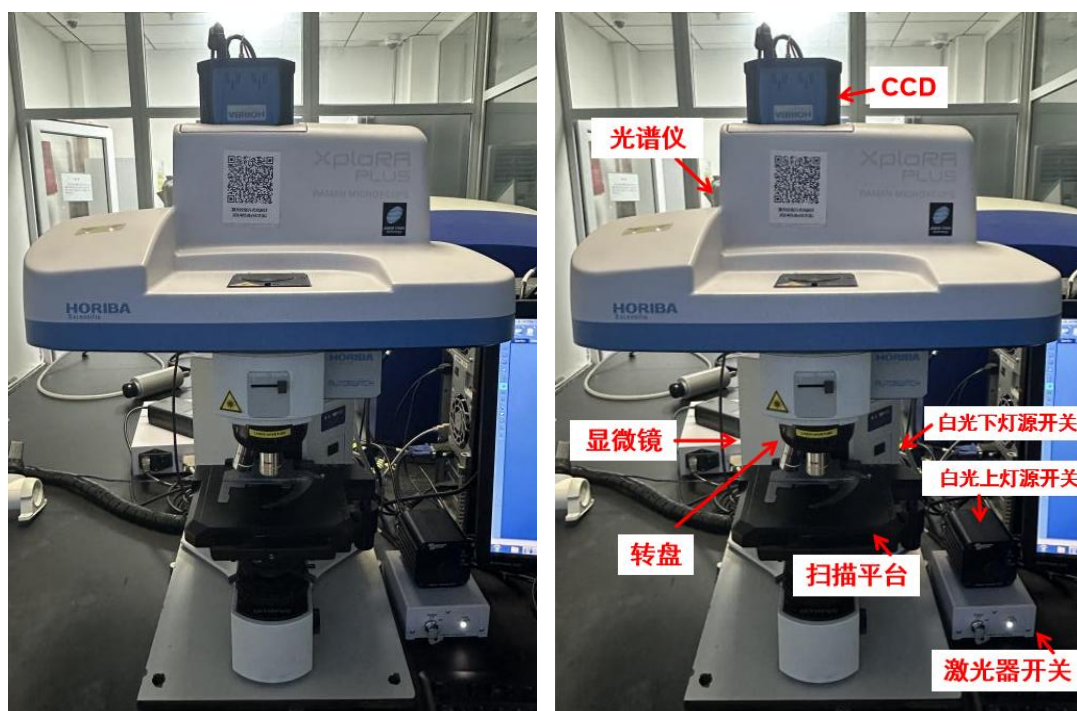
# 激光共聚焦显微拉曼光谱仪 Horiba XploRA PLUS 操作指南

制作团队：蔡雨晴，朱振东，沈周子涵，任国圆

指导老师：杨旻

中国人民大学化学与生命资源学院

## 一、仪器基本信息



1. 仪器型号：Horiba XploRA PLUS 激光共聚焦显微拉曼光谱仪
2. 生产厂家：HORIBA Scientific
3. 核心功能：表征材料组成和结构等，包括物质的化学组成及分布；分子结构及官能团表征；晶型、手性、应力、掺杂、缺陷等研究；相变研究/反应监控；超光谱成像/多层分析等。
4. 关键参数：
  - 激光器配置：532 nm 固体激光器，  
638 nm 固体激光器，  
785 nm 固体激光器；
  - 物镜配置：10×，100×平场物镜，50×近红外物镜；
  - 光栅配置：600，1200，1800，2400 刻线密度光栅；
  - 拉曼频移范围：60  $\text{cm}^{-1}$  - 9000  $\text{cm}^{-1}$  (532 nm 激发)  
50  $\text{cm}^{-1}$  - 6000  $\text{cm}^{-1}$  (638 nm 激发)  
50  $\text{cm}^{-1}$  - 3400  $\text{cm}^{-1}$  (785 nm 激发)

5. 放置位置：理工楼 116 实验室

6. 责任人：杨旻 13811611012

## **二、操作前准备**

### **2.1 人员要求**

1. 需持有实验室安全准入证，需完成 Raman 光谱仪专项培训并持有操作资格证；

2. 通过预约系统使用仪器。

### **2.2 仪器检查**

1. 确认主机、显微镜、激光器外壳无破损；

2. 检查数据线连接是否牢固；

3. 确认物镜镜头清洁无污渍；

4. 确认激光器电源开关处于关闭状态；

5. 检查样品台是否干净、无残留化学品；

6. 室内温度适宜。

### **2.3 样品准备**

1. 固体样品：按测试需要制样，放置在载玻片或专用样品台上，尽量使表面平整，并与样品台紧密接触；确保测试区域清洁干燥，无挥发物；粉末样品需充分研磨，块状样品测试区域需明确标记，高度一般小于 8mm。

2. 液体样品：按测试需要制样，置于自备容器（如离心管等）中。对于合适的液体样品，测试前用移液枪吸取至石英比色皿内盛放。确保液体占石英比色皿约 2/3 高度、无气泡，避免测试时产生杂散光影响光谱质量；液体样品应无潮解性，真空下不挥发。如液体样品不宜放在比色皿中，可根据实际情况制样。

### **2.4 文献查阅及数据预测**

1. 文献查阅：根据测试的材料查阅相关文献资料，确定测试参数并记录在测试准备本上备用；
2. 数据预测：总结文献内容，结合理论知识预测大致出峰范围，测试前做到心中有数，以便更好地记录、观察、调整。

### 三、标准操作流程

#### 3.1 测试准备

##### 3.1.1 激光器预热

1. 一般情况下仪器电源、电脑电源、配套操作软件 LabSpec 6 均保持待机状态；



2. 旋转激光电源 POWER 旋钮（OFF→ON），至“LASER EMISSION”灯亮，激光器电源已打开；



3. 激光器预热至少 30min；
4. 准备好样品，待预热完毕后开始校准。

##### 3.1.2 谱峰校准

利用标准硅片校准 XploRA PLUS 光谱仪，可针对特定的光栅和激光器进行自动校准（*Auto Calibration*），也可以对所有的激光器和光栅进行自动校准。根据实际测试需要进行选择。

详细操作如下：

1. 首先进行显微聚焦，打开外部白光光源，白光光源共两个，根据样品测试需要选择；



2. 旋转转盘，使低倍镜正对待测区；
3. 取出标准硅片，小心放置在物镜镜头下，调节操纵杆，使标准待测位正对通光孔；



4. 点击摄像机形状按钮，显示“Start video acquisition”，同时仪器物镜上方滑块自动滑动至“VIEWING”，切换到显微聚焦模式；



5. 点击仪器操作软件面板上方“Video”按钮（一般第4步后这一步可以自动跳转，如未自动跳转则需手动点击）；
6. 等待数秒，软件面板上开始显示聚焦画面；
7. 先调节粗准焦螺旋，再调节细准焦螺旋，同时旋转进光旋钮调节亮度，直至屏幕上可以清晰看到画面；

8. 旋转物镜镜头，切换至高倍镜成像，调节光亮度，调节细准焦螺旋直至清晰聚焦；



9. 点击右上角“STOP ALL”黄色按钮，至按钮变成灰色，显微聚焦过程结束；



10. 点击左上角“Spectra”按钮，切换为谱图扫描模式，同时仪器物镜上方滑块自动滑动至“RAMAN”；

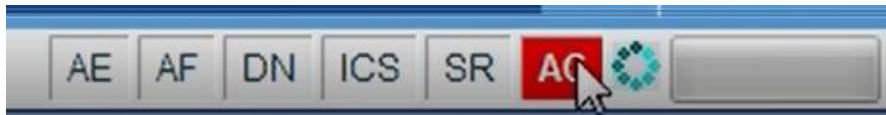


11. 点击右侧边栏“Acquisition”，点击子选项“Instrument setup”，弹出下拉选项，根据后续测试实际需要，选择合适的光栅和激光波长；





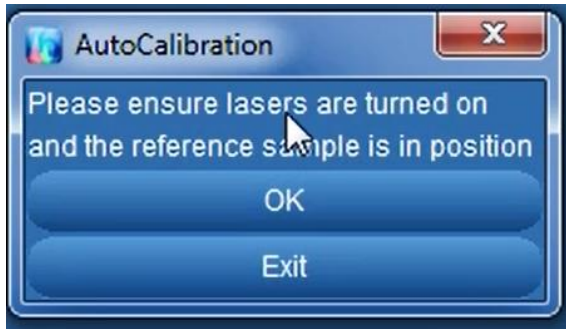
12. 设置完毕，点击软件界面右下角红色的“AC”按钮，进行自动校准；



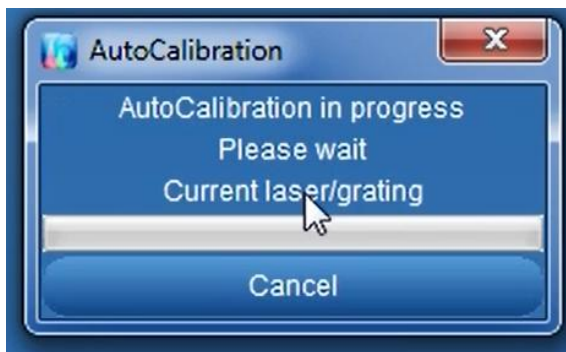
13. 自动弹出提示弹窗，按实际需要选择校准：“Current laser/grating”表示仅校准当前设置的激光和光栅，“All laser/gratings”表示自动校准所有激光和光栅两两组合；



14. 选择校准组合后，自动弹出提示，此时请再次确认激光光源已打开、硅片已正确放置在扫描成像台上，点击“OK”；

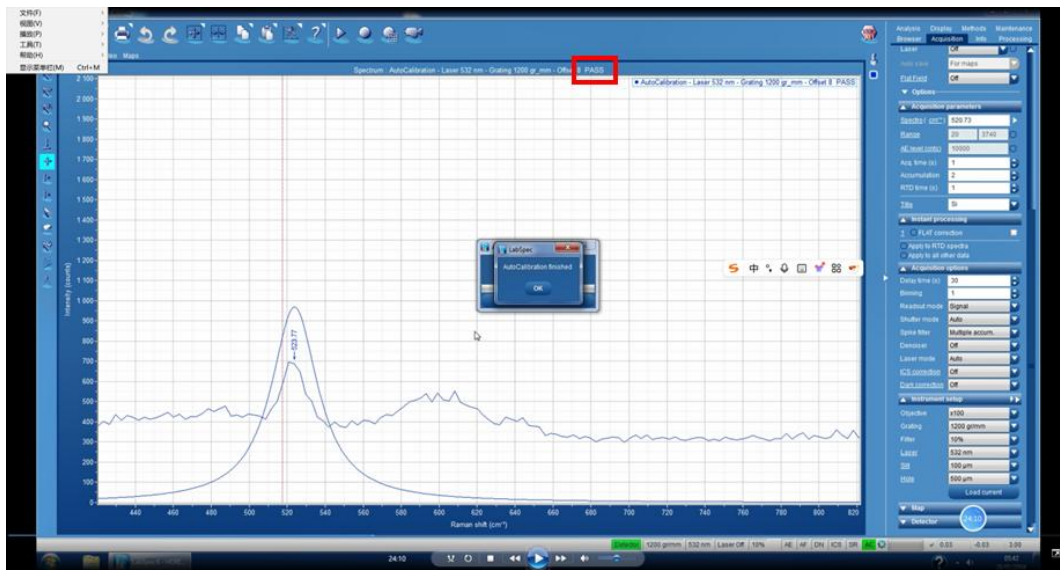


15. 校准开始，耐心等待，此时右下角“AC”按钮右侧有运转中图示、绿色进度条向前移动；



16. 自动校准结束，此时软件界面显示硅片标准谱图，中间弹出“AutoCalibration finished”弹窗，同时界面上方显示“PASS”，

说明校准成功；点击“OK”；



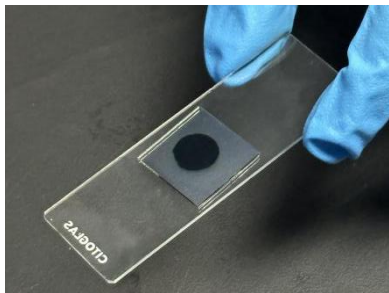
17. 旋转物镜切换回低倍镜，小心取下硅片并收好。

## 3.2 样品测试

### 3.2.1 样品放置

将制备好的样品小心放置在样品台上：

(1) 对于固体样品：置于载玻片上，尽量铺平；粉末样品需充分研磨，块状样品测试区域需明确标记，高度一般小于 8mm；



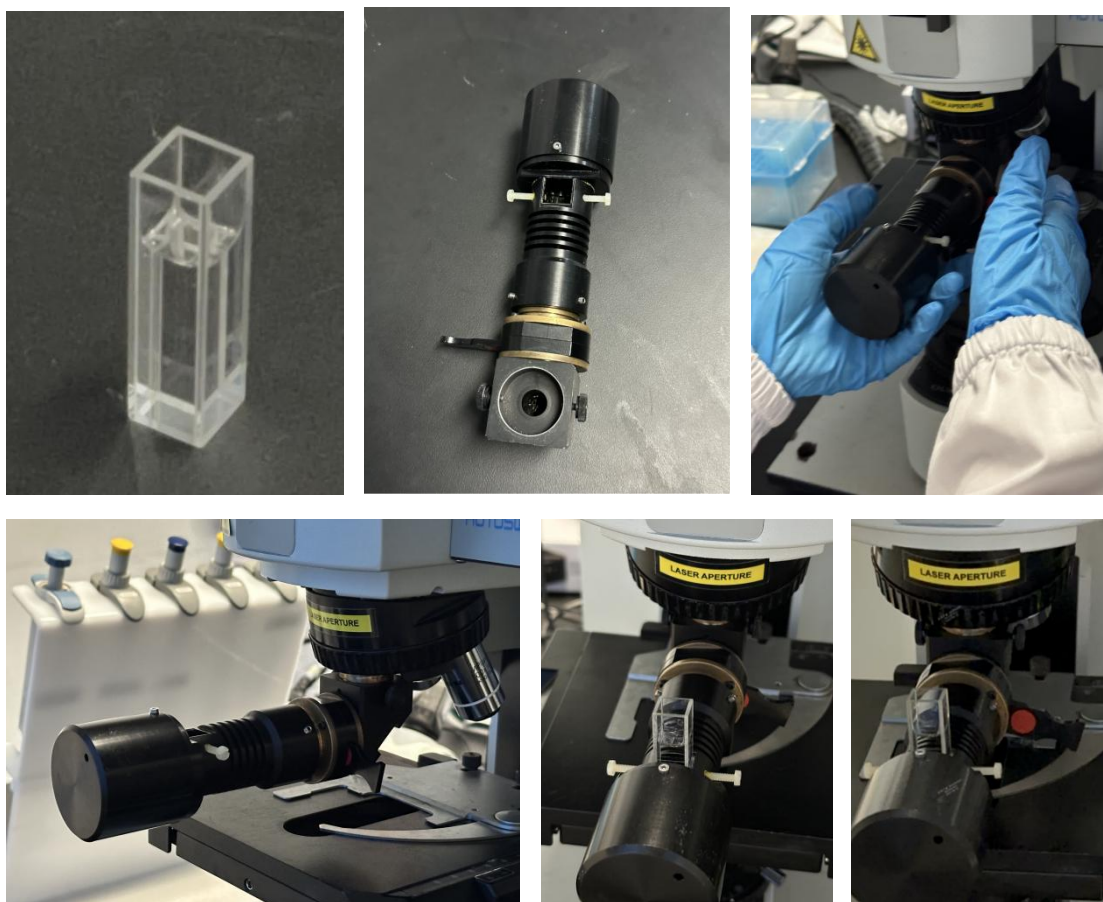
(2) 对于液体样品（以放置在比色皿中的样品为例）：

用移液管吸取适量至清洁的石英比色皿中，取出液体样品架；

将物镜镜头旋转到通光孔背面，无需使用；

对准并旋转螺丝将样品台固定在仪器上；

将盛有样品的比色皿放置在样品台上，打开样品架尾端遮光板；



注意，如液体样品不宜放置在比色皿中测试，可根据实际情况直接滴加在载玻片上或孔板上等方式进行测试。

### 3.2.2 显微聚焦（仅固体样品）

1. 选择合适的白光光源
2. 选择合适的物镜（优先使用低倍镜，切换至高倍镜时注意样品不要污染镜头），使其对准待测区；
3. 点击软件界面上方摄像机形状按钮，显示“Start video acquisition”，同时仪器物镜上方滑块自动滑动至“VIEWING”；



4. 等待数秒，软件面板上开始显示显微聚焦画面；
5. 先调节粗准焦螺旋，再调节细准焦螺旋，同时旋转进光旋钮调节亮度，直至屏幕上可以清晰看到画面；

6. 点击右上角“STOP ALL”黄色按钮，至按钮变成灰色，聚焦过程结束；

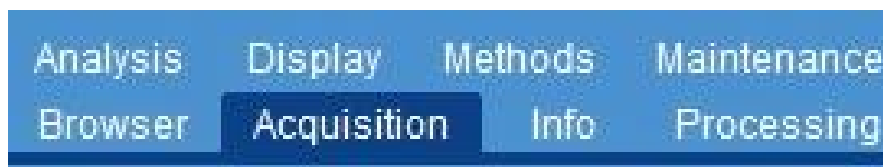


### 3.2.3 光谱采集

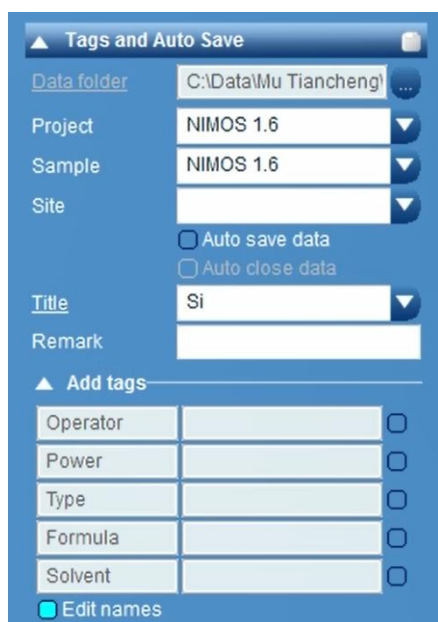
1. 点击软件操作界面左上角“Spectra”按钮，切换为谱图扫描模式；



2. 点击右侧边栏“Acquisition”设置参数；



3. 点击右侧边栏“Tags and Auto Save”，弹出下拉选项，设置是否自动保存数据、数据保存位置、文件名等，注意“Title”应改为待测样品名称；



4. 点击右侧边栏 “Acquisition parameters”，弹出下拉选项，**根据文献报道及实际待测样品所需设置测试参数：**

(1) Spectro( $\text{cm}^{-1}$ ): 光谱仪校准值。这是光谱仪的内部校准参数，通常与仪器本身的稳定性有关，该数值由仪器自动校准和维护，确保波数读数的准确性，平时测试时无需手动更改。

(2) Range: 光谱采集范围。应根据样品的预期拉曼峰位置来设置，设置过宽会包含无用的数据，增加采集时间；设置过窄可能会漏掉关键峰。不确定采集范围时，建议做全谱扫描。

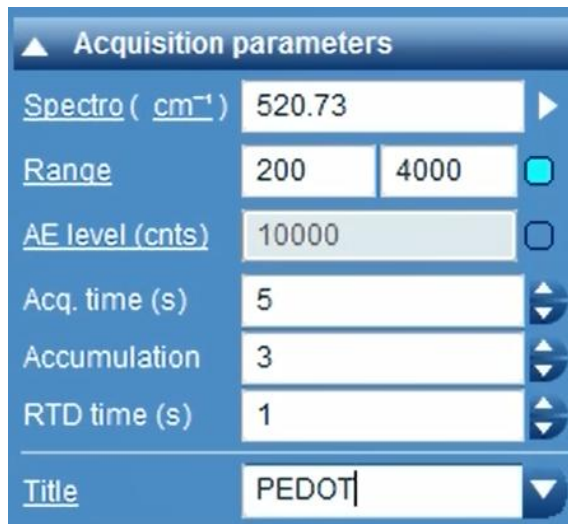
(3) AE level(cnts): 自动曝光目标强度。软件会自动调整曝光时间，使光谱中最强峰的强度接近这个值。设置过高可能导致曝光时间过长，甚至使探测器饱和；设置过低则信号太弱。一般测试时使用默认值 10000，无需手动更改。

(4) Acq. time(s): 单次采集时间。应根据样品的文献报道拉曼测试参数来设置。时间越长，接收到的光子越多，信号越强，信噪比越高。对于敏感或不稳定的样品（如生物样品、高分子），时间不宜过长，以免激光损伤样品。注意（3）和（4）只能选其中一种设置，不能同时设置。

(5) Accumulation: 累积次数。应根据样品的文献报道拉曼测试参数来设置。这是将多次采集的光谱进行叠加平均的次数，用于提高信噪比，注意信噪比大致与累积次数的平方根成正比，但累积次数过多同样会增加总采集时间。测试时一般设置为 2-10 次。

(6) RTD time(s): 实时监测时间。应根据样品的文献报道拉曼测试参数来设置。即在正式采集前，实时预览光谱时每帧的刷新时间，通常设置较短（1-2 秒），以便快速响应。

(7) Title: 待测样品名称。根据实际情况设置。



5. 点击右侧边栏“Instrument setup”，弹出下拉选项，按需设置各项参数：

(1) Objective: 物镜。用于选择显微镜物镜的放大倍数，需根据样品实际情况选合适的物镜，如 100× 是拉曼测试中最常用的物镜，它能提供较高的空间分辨率和激光功率密度。

(2) Grating: 光栅。作为核心分光元件，其刻线密度直接决定光谱分辨率。刻线数越高，分辨率越高，光谱范围越窄。需根据测试目的选择。（如 600 gr/mm 常用于需要宽光谱范围的情况；1800 gr/mm 或 2400 gr/mm 用于需要高分辨率区分精细峰的情况；1200 gr/mm 是一个在分辨率和范围之间取得良好平衡的常用选择。）

(3) Filter: 滤光片。用于衰减激光到达样品表面的功率。如下图设置为 10%，表示透过滤光片后，激光功率变为原来的 10%。为了防止样品被激光灼烧，对于敏感样品（如碳材料、生物样品、高分子）或未知样品，此处应先设置较低数值，逐渐增大功率，以峰形和峰位不变为准。

(4) Laser: 激光波长。短波长激光更容易激发样品产生荧光，可能淹没微弱的拉曼信号；长波长激光能有效抑制荧光，但拉曼散射效率会降低。如果激光波长与样品的电子吸收带匹配，可以大幅增

强拉曼信号（共振拉曼效应）。应根据样品的文献报道拉曼测试参数及理论预测来合理设置激光波长。

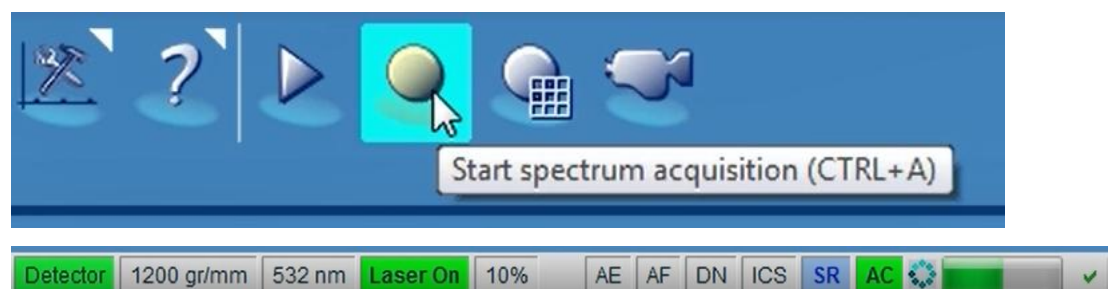
(5) Slit: 狭缝宽度。狭缝越窄，光谱分辨率越高，通光量越少，信号越弱。通常与光栅配合使用；在保证信号强度的情况下，可使用更窄的狭缝来获取更高分辨率的光谱。应根据样品的文献报道拉曼测试参数及理论预测来合理设置狭缝宽度。

(6) Hole: 共焦孔径。孔径越小，共焦效果越好，可以有效排除焦平面以外的信号干扰，但会降低信号强度。在需要高空间分辨率

（如测单层石墨烯）或进行深度扫描时，使用小孔径；在信号很弱或不需高共焦性时，可以增大孔径。应根据样品的文献报道拉曼测试参数及理论预测来合理设置共焦孔径。



6. 点击界面上方绿色圆形按钮，显示“Start spectrum acquisition”，开始采谱，此时界面下方进度条开始移动；

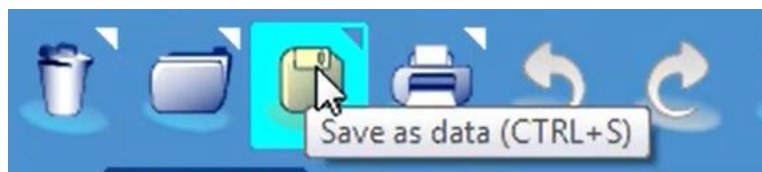


7. 当界面下方进度条不再移动且运行中的圆形图标消失，表示采谱已完成。

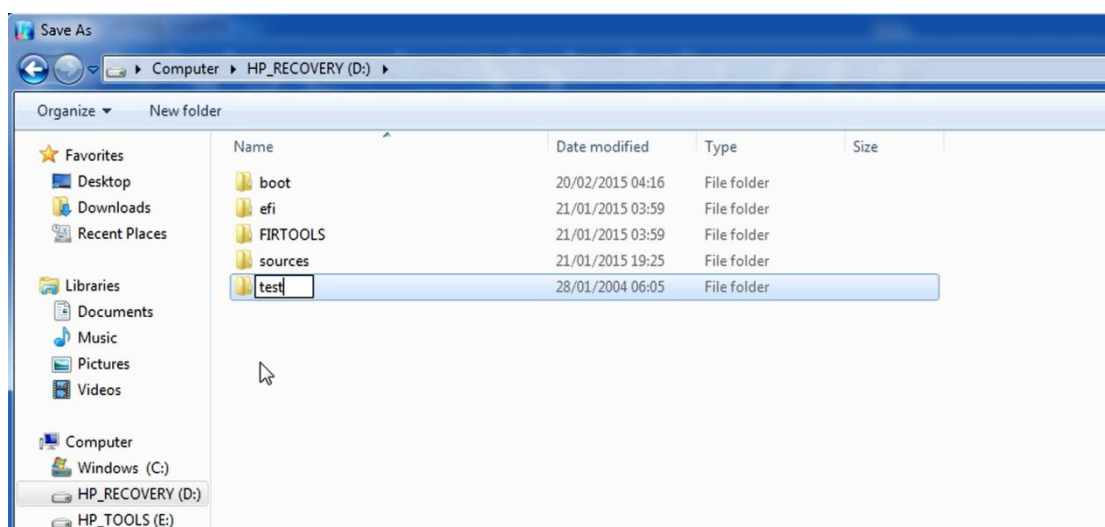
### 3.3 结束测试

#### 3.3.1 数据保存

1. 点击软件操作界面左上角保存按钮；



2. 选择合适的保存位置；



3. 修改文件名称；

4. 修改文件类型，可以保存 Text (\*.txt) 文本格式及 LabSpec (\*.l6s) 原始格式各一份；

5. 用格式化的光盘或 u 盘拷取数据。

#### 3.3.2 结束使用

关闭激光器电源及白光灯；清理样品台，登记使用记录。

## 四、数据处理

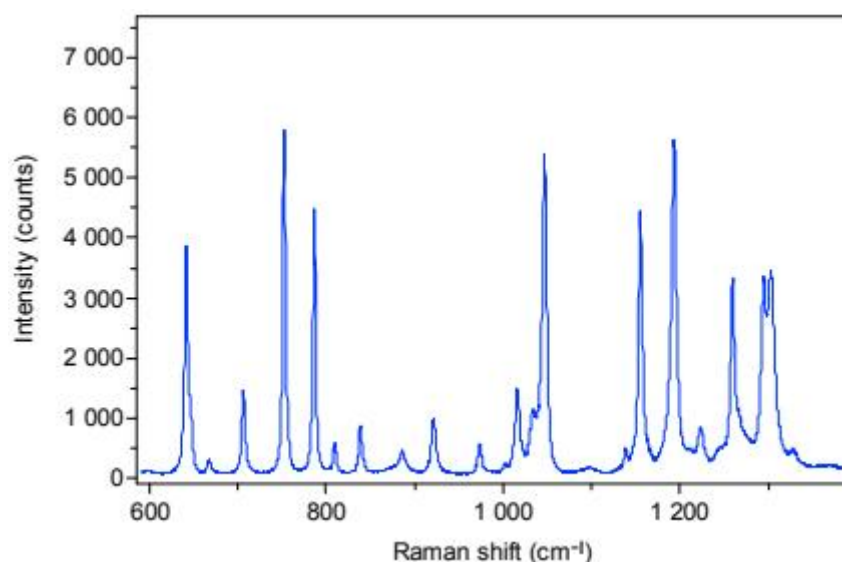
一般选择将原始数据拷走后，在个人电脑上使用 Excel、Origin 等软件处理数据和绘图；如需使用 Horiba XploRA PLUS 仪器系统软件处理数据，基本方法如下：

#### 4.1 扣背底

Processing → Baseline Correction, 选择多项式拟合 (Poly) 或手动划线。

## 4.2 标峰位

Analysis → Peaks → Find, 按强度阈值自动标记或手动添加。



## 4.3 峰位拟合

根据需要进行峰位拟合操作。

# 五、常见故障处理

## 5.1 信号弱或无信号

- 1、检查激光器是否正常开启, 检查激光器电源和指示灯, 确认激光功率设置是否合适;
- 2、确认样品是否放置正确, 聚焦是否清晰;
- 3、检查光路是否对准, 滤光片等部件是否处于正确的位置, 必要时行光路校准;

## 5.2 光谱噪声过大

- 1、检查环境光是否干扰, 确保测量环境黑暗或使用遮光罩;
- 2、确认样品是否荧光干扰 (强度远高于拉曼信号), 可尝试更换激发波长或进行荧光扣除;

- 3、高能宇宙射线击中探测器产生的随机尖锐尖峰（正常物理现象，可通过多次短时间采集叠加和软件的功能去除；
- 4、检查电源是否稳定，避免电压波动影响；
- 5、确认仪器是否预热充分，建议预热至少 30 分钟。

### 5.3 激光无法启动或功率不稳定

- 1、检查冷却系统是否正常运行，确保激光器温度在允许范围内；
- 2、确认电源连接是否牢固，重启激光器控制模块；
- 3、如仍无法解决，联系工程师进行检测或更换激光模块。

### 5.4 软件连接异常或死机

- 1、重启计算机和仪器控制软件；
- 2、检查 USB 或网络连接是否正常；
- 3、如软件频繁异常，尝试重新安装驱动程序或联系技术支持。

## 六、注意事项

### 6.1 操作环境与安装条件

#### 1、环境稳定性：

（1）防震：仪器必须放置在稳定的光学平台上或坚固的实验台上，远离振动源（如离心机、压缩机等会产生剧烈震动的仪器）。

（2）温湿度：保持实验室环境恒温恒湿（通常要求温度 15-25℃，湿度 < 60%），剧烈的温湿度变化会导致光路偏移和波长漂移。

（3）洁净度：保持环境清洁，防止灰尘进入光学系统内部，污染镜片和光栅；

#### 2、电源与接地：

使用稳压电源（UPS）以避免电压波动对激光器和探测器造成损害；确保仪器良好接地，以避免电噪声干扰，获得最佳信噪比。

### 6.2 开机与校准

1、预热：激光器和整个光学系统需要充分预热，以达到热稳定状态。  
未预热就进行测量会导致测量结果不稳定，峰位漂移；



2、定期校准：

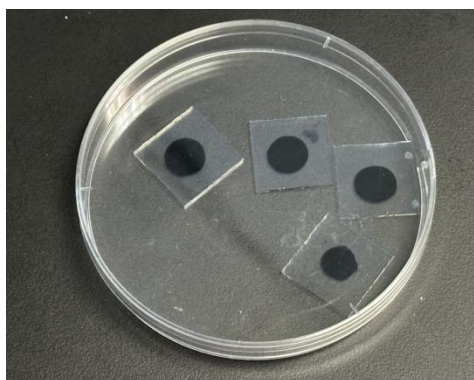
波长校准：定期（建议每周或每月，高频使用则更频繁）使用标准样品进行波长校准，确保数据准确性；

强度校准：如需进行定量或强度对比分析，需使用标准白光源或标准样品进行强度校准。

### 6.3 样品制备与放置

1、避免荧光干扰：

使用玻璃载玻片而非塑料培养皿，因为玻璃拉曼信号很弱；



确保样品纯净无杂质，许多有机物杂质会产生强荧光背景；

若样品荧光很强，可尝试，使用更长波长的激光（785nm 或 1064nm）激发，或者对样品进行光漂白（用激光预照射一段时间）。

## 2、防止激光损伤样品：

对于易降解的有机、生物样品或深色吸光材料，从低激光功率开始，逐步增加，找到能产生良好信号又不破坏样品的最小功率，可使用衰减片来降低激光功率。

## 3、确保正确聚焦：

对于不均匀样品，寻找一个平整、有代表性的区域进行聚焦。

使用显微镜时，先用低倍物镜找到样品，再切换到高倍物镜进行测量，避免物镜撞到样品。

对于透明样品，注意聚焦在样品的内部而非容器表面；

对于液体样品的测量，注意打开遮光片确保光路正常通过。



## 6.4 测量参数设置

1、激光功率：遵循“用所需的最小功率”原则，在获得足够信号的同时，避免样品损伤和荧光效应。

## 2、积分时间：

不宜过长，否则会导致探测器饱和（峰顶被削平）或宇宙射线干扰增多。

信噪比与积分时间的平方根成正比。信噪比不好时，优先选择多次短时间扫描叠加，而非单次长时间扫描。

3、光路设置：根据激光波长选择正确的滤光片和光栅。

## **6.5 安全注意事项**

1、激光安全：

绝对不要眼睛直视激光出口或反射光路，即使激光不可见（如785nm, 1064nm）必须佩戴针对该激光波长的专用防护眼镜；  
设备运行时，始终关闭样品仓盖，防止激光意外泄露。

2、化学品安全：处理未知样品时，注意其毒性和腐蚀性，避免直接接触或吸入其挥发物。

## **七、维护与保养**

1、定期清洁显微镜物镜，使用专用擦镜纸和清洗液（如无水乙醇）轻轻擦拭，指纹和油污会严重影响光通量和图像质量；

2、保持样品台清洁，防止样品残留物污染后续实验；

3、关机时，先关闭激光器，然后关闭探测器制冷，最后关闭仪器总电源和电脑，不损坏仪器；

4、如长期不用，建议每周开机预热运行一段时间，以保持内部电子元件的干燥和状态良好。