Fluorimetro Edinburgh FLS1000

LISTA DI DISTRIBUZIONE:

La presente SOP verrà inserita nel sito del Dipartimento e sarà accessibile agli utenti autorizzati

PREPARATO	DATA	VERIFICATA Responsabile Lab.	DATA	APPROVATO Direttore Dipartimento	DATA
Gloria Ferrari	02/10/20	Francesca Terenziani	27/11/20	Roberto Corradini	21/12/20

INDICE

1. SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE
2. QUALIFICA DEL PERSONALE
3. DESCRIZIONE E CARATTERISTICHE
4. MODALITA' OPERATIVE

1. SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE

La presente procedura ha lo scopo di indicare e sintetizzare la corretta sequenza di operazioni necessaria per l'utilizzo dello strumento.

2. QUALIFICA DEL PERSONALE

Per l'utilizzo del Fluorimetro Edinburgh FLS1000 è necessario l'impiego di personale con un certo grado di specializzazione ed esperienza, preventivamente formato ed autorizzato dal Direttore del Dipartimento o dal Responsabile del Laboratorio.

Responsabile di Laboratorio: Docente incaricato dal Direttore che, individualmente o come coordinatore di gruppo, svolge attività didattiche o di ricerca in laboratorio (DM 363/98)

Operatore: personale del Dipartimento adeguatamente addestrato per eseguire le varie operazioni, verifica ed eventuale manutenzione degli strumenti. Viene incaricato dal Direttore del Dipartimento o dal Responsabile del Laboratorio

Responsabile del Laboratorio:

- gestisce la formazione ed identifica il personale abilitato all'utilizzo degli strumenti
- gestisce la formazione ed identifica gli operatori idonei ad effettuare operazioni di manutenzione sugli strumenti
- verifica la preparazione ed il contenuto delle schede strumenti e dei registri di utilizzo
- verifica l'attuazione e la registrazione delle operazioni di taratura e manutenzione degli strumenti
- verifica l'attuazione e l'aggiornamento del registro digitale o cartaceo di manutenzione
- si assicura che ogni intervento venga registrato sull'apposita scheda
- controlla la scheda di "segnalazioni malfunzionamenti ed anomalie rilevate a seguito di utilizzo dello strumento" e predispone eventuali interventi, evidenziando se ricadenti o meno nel periodo di garanzia fornita dal costruttore
- pianifica azioni correttive per gli strumenti risultati non idonei alla taratura/verifica
- assicura la conservazione di tutte le registrazioni
- vigila sul buon funzionamento degli strumenti
- valuta le richieste di utilizzo degli strumenti
- verifica con gli utenti la fattibilità e definisce i tempi di esecuzione delle prestazioni richieste
- garantisce il supporto tecnico/scientifico
- predispone gli interventi straordinari sugli strumenti

Operatore:

- redige ed aggiorna le schede degli strumenti ed i registri di utilizzo
- predispone e registra sull'apposita scheda ogni intervento effettuato sullo strumento
- esegue le operazioni di manutenzione, taratura ed eventuale calibrazione sugli strumenti di competenza, in seguito a specifica qualifica (D.Lgs. 81/2008 art.71-c.7b), ed aggiorna il registro digitale o cartaceo di manutenzione
- esegue e registra i controlli degli strumenti affidati
- informa il Responsabile del Laboratorio quando uno strumento è risultato non idoneo alla taratura o verifica
- in caso di interventi di manutenzione affidati a ditte esterne, verifica l'esito dell'intervento e conserva la documentazione
- conserva le registrazioni

3. DESCRIZIONE E CARATTERISTICHE

Il fluorimetro Edinburgh FLS1000 permette di misurare spettri di emissioni e di eccitazione stazionari nella zona spettrale dell'UV-vis-NIR, con sensibilità al singolo fotone.
È dotato di polarizzatori di eccitazione e di emissione controllabili da software (per misure di anisotropia, per esempio).
Consente di misurare decadimenti dell'emissione nella zona spettrale UV-vis-NIR si scale di tempi dalle centinaia di ps ai secondi.
È dotato di porta campioni per cuvette (soluzioni) e per solidi, in quest'ultimo caso in configurazione front-face.
È dotato di filtri automatici per la rimozione del secondo ordine di grating.

Sorgenti: 450 W Xenon Lamp; 60 W Microsecond Flashlamp; 375 nm and 405 nm ps pulsed diode lasers; 295 nm ps pulsed LED.

Doppio monocromatore di eccitazione: 1200 grooves/mm, blaze 400 nm; 1200 grooves/mm, blaze 750 nm.

Polarizzatore di eccitazione: 220-900 nm.

Monocromatore di emissione: 1800 grooves/mm, blaze 500 nm; 1200 grooves/mm, blaze 750 nm; 830 grooves/mm, blaze 1200 nm.

Polarizzatore di emissione: 240-2300 nm.

Rivelatori: PMT-900 Detector 200-870 nm; PMT-NIR in Liquid Nitrogen Cooled Housing, 300-1700 nm. Rivelatore per la luce trasmessa 200-1000 nm.

Elettronica di acquisizione per misure risolte nel tempo: Multi-Channel Scaling (MCS) per dinamiche tra 1 µs and 10 s; Time-Correlated Single Photon Counting (TCSPC) per dinamiche dai 5 ps ai 50 µs.

Il detector PMT-900 può essere utilizzato in modalità "gated" (per discriminare fluorescenza da fosforescenza).

4. MODALITA' OPERATIVE

- Accendere l'alimentatore tramite l'apposito tasto (PH 1). Il detector PMT-900 si accende automaticamente (non spegnere mai CO1) e comincia a raffreddarsi. La temperatura deve arrivare a circa -21,9 (occorrono circa 20 minuti).

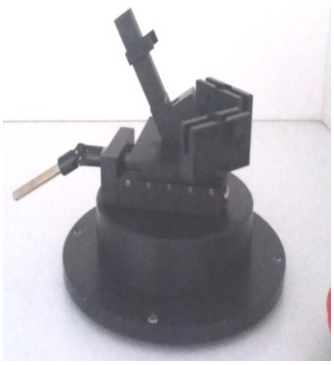
- Nel caso in cui si intenda utilizzare il detector **PMT-NIR**, esso va **raffreddato ad azoto liquido per un paio d'ore prima di essere acceso**. In questo caso: assicurarsi che il dewar dell'azoto sia pieno; inserire lentamente il pescante all'interno del dewar; accendere la pompa (sistemata sul pavimento) per avviare la circolazione dei vapori di azoto nel detector. Solo dopo che il detector si è raffreddato adeguatamente (circa due ore), collegare il detector al suo alimentatore attraverso il cavo BNC:

Quindi accendere il suo alimentatore (HV-1). Infine schiacciare H.V. ON (high voltage). Solo in quel momento il detector si accende. **ATTENZIONE: l'accensione del detector PMT-NIR non correttamente raffreddato lo danneggerebbe permanentemente**.

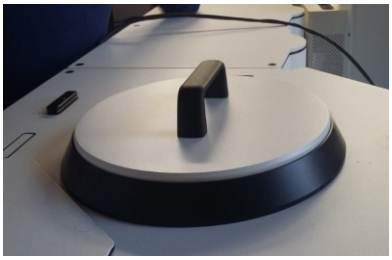
La circolazione dell'azoto deve essere mantenuta durante tutto il tempo di utilizzo del PMT-NIR.

- Accendere la lampada Xe (tasto di alimentazione sul retro su 1 e poi tasto sul davanti, parte superiore, per l'accensione) con circa mezz'ora di anticipo rispetto al momento in cui si intende cominciare ad utilizzarla. Accendere la lampada flash solo se serve (cioè per misure di tempi di vita di fosforescenza).

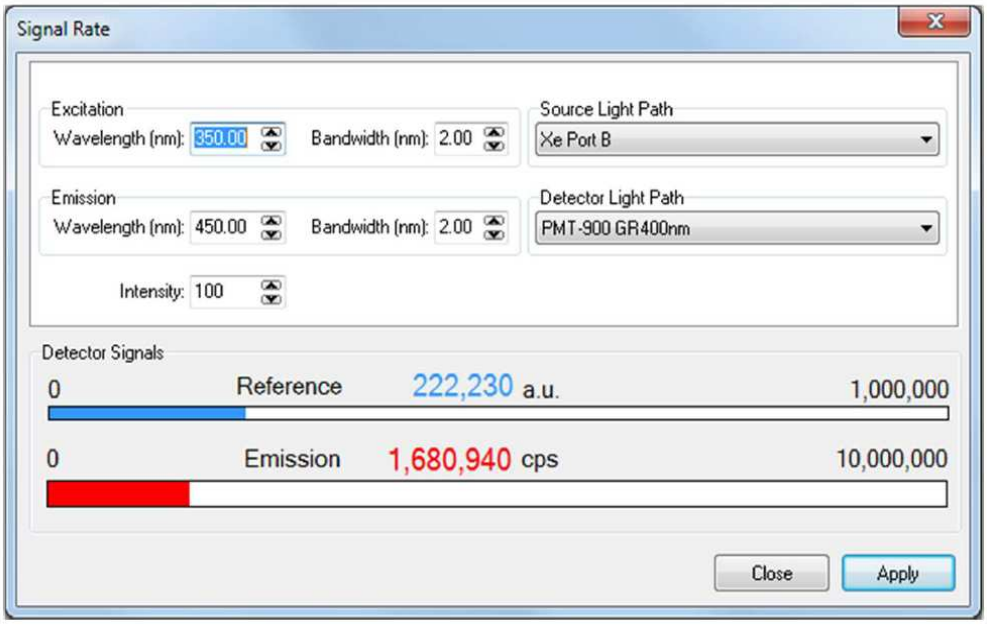
- Accendere il PC ed accedere all'account con la Password (scritta ed appesa allo schermo del PC).
- Il software FLUORACLE può essere aperto anche se la temperatura non è ancora stabile.
- Scegliere il portacampione idoneo e posizionarlo correttamente.
  Esistono 2 tipologie di portacampioni:
  - per solidi (vetrini/film)
  - per liquidi (cuvette)



- Per posizionare il portacampione scelto occorre sollevare il coperchio, così da poter accedere al vano. L'apertura del coperchio chiude ed oscura il rivelatore.



- Quando il detector si è raffreddato si possono iniziare le misure.
- Attraverso la finestra "**Signal Rate**" (icona) del software, selezionare la sorgente e il monocromatore di eccitazione (Source Light Path), il detector e monocromatore di emissione (Detector Light Path), le lunghezze d'onda di eccitazione e di emissione, l'apertura delle fenditure (si consiglia di partire da bandwidth non superiore a 1 nm). Verificare di avere un segnale di emissione sufficiente e verificare di non saturare il detector. **Entrambi i detector saturano quando si arriva a 1.500.000 cps**. In tal caso si ha un warning (barra rossa, vedi figura) e occorre subito **alzare rapidamente il coperchio del vano campioni** (questa operazione protegge i detector attraverso la chiusura dello shutter). Prima di richiudere il coperchio, ridurre l'apertura delle fenditure o cambiare altre impostazioni per portare il segnale sotto la soglia di saturazione.

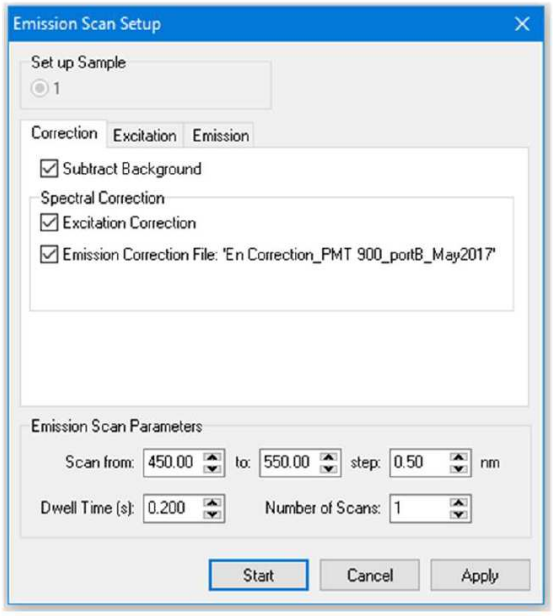


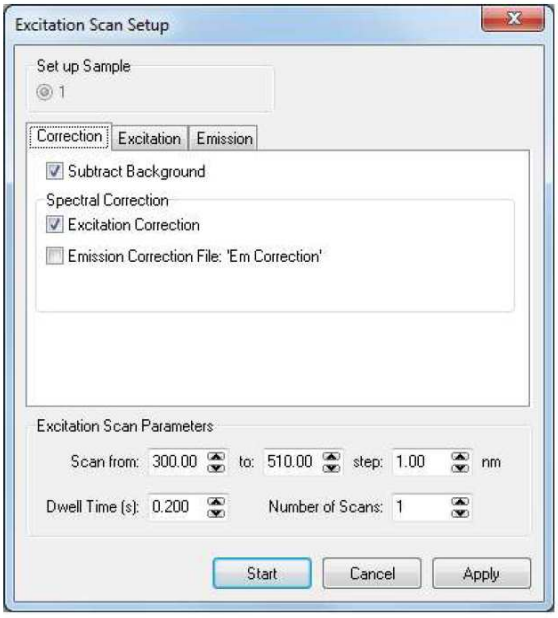
- Una volta trovate le impostazioni soddisfacenti, si può procedere con l'impostazione delle misura vera e propria, schiacciando l'icona (**New Spectral Measurement**). Si può scegliere tra: Excitation Scan, Emission Scan, Synchronous Scan, a seconda delle misura desiderata.

  Attivare le correzioni come da figura sottostante per l'emissione e l'eccitazione, rispettivamente (a meno di necessità specifiche diverse).

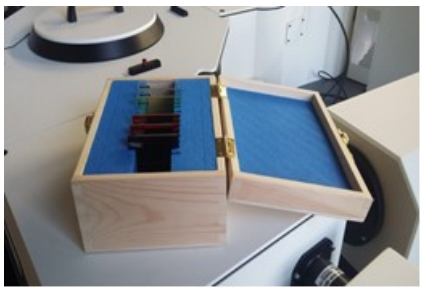
Impostare il range di acquisizione, facendo attenzione a non misurare lo scattering della luce eccitatrice (questo saturerebbe il detector, rischiando di danneggiarlo). Per esempio, per misure di emissione, se si eccita a 400 nm, impostare la scansione di emissione da 405/410 nm (non prima) fino a dove si desidera. Per misure di eccitazione, se si rivela a 600 nm, impostare il range di eccitazione dalla lunghezza d'onda desiderata (per esempio 300 nm) fino a 590/595 nm, non oltre.

Impostare il Dwell Time desiderato (si consiglia non inferiore a 0.3 sec) e eventualmente il numero di scansioni.





- Nel caso di campioni solidi è necessario l'uso di filtri in emissione (da inserire nell'apposito vano) per ridurre che la luce diffusa giunga al detector. Vi sono diversi filtri passa-lungo a disposizione (ogni filtro trasmette le lunghezze d'onda superiori a quella indicata su di esso, quindi va scelto in base alla lunghezza d'onda in cui si intende eccitare e al range di emissione che si vuole misurare).



- Una volta ottimizzate le condizioni di misura: procedere con l'acquisizione.

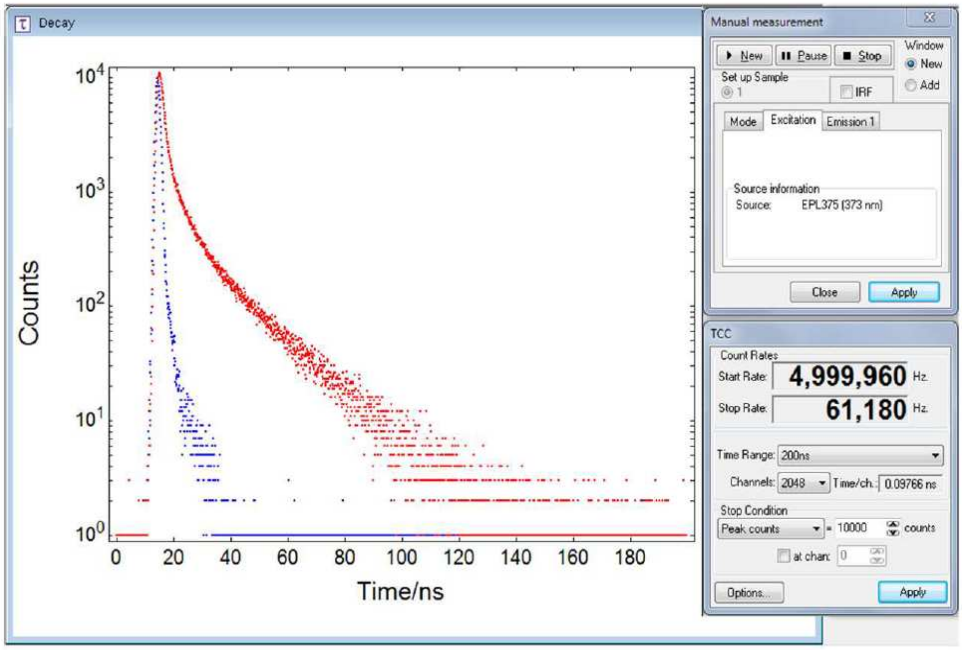
MISURE DI TEMPI DI VITA:

- A seconda della scala di tempi, nella finestra "Signal Rate" scegliere come sorgente la flash lamp oppure EPL (ovvero i laser). Nel secondo caso, montare uno dei Laser lateralmente (da scegliere in base alla lunghezza d'onda):

- Come tecnica di rivelazione (nel Detection Path) scegliere una delle seguenti, a seconda del range temporale:

Technique	Time Range						
	pico	nano	micro	mili	sec	min	hour
Standard Single Photon Counting (SPC)				✓	✓	✓	✓
Multi-Channel Scaling (MCS)			✓	✓	✓		
Time-Correlated Single Photon Counting (TCSPC)	✓	✓	✓				

- Nel caso dell'uso di uno dei laser, per accenderlo girare la chiave, premere il tasto rosso (ON) e impostare, con la rotellina, la spaziatura temporale tra gli impulsi emessi. Occorre scegliere un valore più lungo rispetto all'intervallo temporale entro il quale si vuole effettuare la misura.
- Dalla finestra "Signal Rate" modificare le impostazioni in modo da avere un segnale sufficiente, senza saturare il detector. Quando si apre il coperchio dello strumento il Laser si spegne automaticamente.
- Una volta trovate le condizioni, per effettuare la misura, schiacciare l'icona , poi Manual. Nella finestra che si apre, impostare l'intervallo temporale della misura e la "stop condition".



- Una volta misurato il decadimento temporale, se ne può fare un fit: dal Menu principale del software, schiacciare "Data", poi scegliere "Tail fit" oppure "Exponential reconvolution fit", a seconda del fit desiderato. Nel secondo caso è necessario aver misurato l'IRF (instrument response function), ovvero il "decadimento" del segnale di scattering della luce eccitatrice.

OPERAZIONI DI SPEGNIMENTO del FLUORIMETRO

- Spegnere la lampada (tasto superiore sul davanti) aspettare che le ventole si spengano. Il tempo che compare sullo schermo (900s) si riferisce a quello di attesa necessario per poter riaccendere la lampada.
- Dopo che le ventole si sono arrestate, spegnere la lampada sul retro (0 sul tasto dietro).
- Chiudere il software.
- Spegnere PH1 (alimentatore).
- Attenzione: il software non funziona a strumento spento, quindi spegnere PH1 per ultimo.
- Se si stava usando il detector PMT-NIR: spegnere il tasto H.V., quindi spegnere l'alimentatore HV-1. Arrestare la pompa dell'azoto; estrarre il pescante e tappare il dewar col suo tappo. Scollegare il cavo BNC dal detector.

5. NOTE

Ubicazione: Locale 13.01.0.033
Responsabile: Francesca Terenziani (0521905453, francesca.terenziani@unipr.it)

Per utilizzare il fluorimetro Edinburgh FLS1000 è necessario effettuare in anticipo la prenotazione attraverso il sito SCVSA Servizi:
https://scvsa-servizi.campusnet.unipr.it/do/dotazioni.pl/Show?_id=znpv

Solo il personale abilitato può effettuare le prenotazioni.

All'atto della prenotazione verrà chiesto di specificare un fondo sul quale imputare le spese (che verranno pagate a consuntivo, si veda oltre).

All'atto dell'esecuzione della misura, l'utente è tenuto a compilare il **registro cartaceo di utilizzo**, posto a fianco dello strumento, e a segnalare tempestivamente anomalie e/o malfunzionamenti al responsabile dello strumento. Ogni utente dovrà utilizzare il proprio materiale consumabile (cuvette, pipette, solventi, etc.) avendo cura di lasciare la postazione di lavoro in stato ottimale.

Ogni utente deve obbligatoriamente creare una cartella nominata "CognomeNome" nella directory "Documents". Non è permesso salvare file in nessun altro percorso, tantomeno sul Desktop (esso verrà periodicamente svuotato, cancellando gli eventuali dati che vi siano salvati).

Non è permesso l'uso di chiavette USB: l'esportazione dei dati deve essere fatta tramite la rete internet.

L'utilizzo da parte del personale abilitato interno al Dipartimento non è soggetto a tariffazione, ma le spese relative alla manutenzione ordinaria e straordinaria verranno ripartite a consuntivo proporzionalmente alle ore di utilizzo dei singoli utenti.

Chiunque provochi danni allo strumento per negligenza o cattivo utilizzo sarà tenuto a farsi carico in toto delle spese di riparazione.