

用解卷积方法测量亚毫微秒荧光寿命*

陈文驹 林美荣 姜宏丽
(南开大学现代光学研究所)

提 要

本文报道了用光电倍增管及取样示波器测量 Rh6G 和不同浓度的 KI 混合水溶液的荧光衰变曲线。系统的响应时间是毫微秒量级的, 测量得到的衰变曲线是溶液的真实衰变曲线与仪器响应函数卷积的结果。应用相平面法与迭代卷积法相结合来进行解卷积处理, 求得溶液的真实荧光寿命, 其结果可获得最小时间分辨为 180 ps, 达到仪器的响应函数半宽度的 3%。

一、引 言

分子荧光寿命的测量对于研究分子激发态的衰变过程, 分子间的相互作用, 分子内和分子间的能量转移等分子体系微观动力学过程具有十分重要的意义, 近年来已发表了不少关于精确测量荧光寿命方法的报道^[1~3]。

荧光寿命的测量通常利用短脉冲光激发待测样品, 用光电器件和相应的显示仪器来检测荧光的衰变曲线。如果激发光脉冲宽度、检测器件及显示仪器的响应时间远小于样品的荧光寿命, 则所观测到的表观荧光衰变曲线就可看作是真实的荧光衰变曲线。一般的检测系统的响应时间是毫微秒量级, 用这种直接检测方法可测得的荧光寿命只能远大于毫微秒。利用条纹像机可直接观测微微秒光信号^[4], 但这种仪器的价格昂贵, 非一般实验室所能装备。因此如何利用毫微秒响应时间的检测仪器来测量毫微秒乃至亚毫微秒的荧光寿命, 就成为一个很有实用意义的课题。

本文报道在解卷积的处理过程中, 应用相平面法和迭代卷积法相结合的方法, 使得结果精确度高, 方法简便, 比采用单一种解卷积的方法要优越得多。

二、原 理

荧光样品在脉冲光激励下, 分子从基态跃迁至激发态, 随后以辐射及无辐射方式将能量释放而跃迁至基态。这里我们只考虑荧光衰变过程。分子未受其它扰动情况下, 它的荧光衰变为一阶过程, 可用关系式

$$G(t) = A \exp(-t/\tau) \quad (1)$$

来描述。 τ 为待测分子的荧光寿命。

当检测仪器的响应时间接近或大于待测样品的荧光寿命时, 观测到的表观荧光衰变曲

收稿日期: 1984年12月28日; 收到修改稿日期: 1985年4月23日

* 中国科学院科学基金资助的课题。

线,不再是样品的真实衰变曲线 $G(t)$, 而是 $G(t)$ 与检测系统脉冲响应(仪器函数) $F(x)$ 的卷积,即

$$D(t) = \int_0^t F(x)G(t-x)dx, \quad (2)$$

式中, $D(t)$ 为观测到的表现荧光衰变曲线。

将一个短激光脉冲激励待测样品所产生的荧光由光电倍增管接收,并在取样示波器上显示,就可获得 $D(t)$ 。将激发脉冲直接输入到检测仪器系统,所得到的脉冲响应函数,即为仪器函数 $F(x)$,它是激发脉冲函数与仪器时间响应函数的卷积。根据(2)式,通过解卷积运算即可求得真实荧光衰变曲线 $G(t)$ 。虽然有许多种解卷积方法^[1~3],但因示波器的信噪比较低,使一些解卷积方法不能应用。在此情况下迭代卷积法是唯一能得到满意结果的方法。

迭代卷积法的基本原理是,首先假设样品的荧光寿命 $\tau = \tau_0$,将猜测值 τ_0 代入(1)中作卷积运算。当检测仪器的取样时间间隔远小于实验得到的荧光衰变曲线的宽度时,(2)式的卷积积分可用分立值求和来代替^[5],即

$$D(t_i) = \sum_{j=0}^i F(t_i - t_j)G(t_j) \quad (3)$$

然后将计算所得 $D^0(t)$ 与实验观测 $D(t)$ 进行比较,用参数 H 评价 $D^0(t)$ 逼近 $D(t)$ 的程度。 H 被定义为

$$H = (1/N) \sum_{i=1}^N [D^0(t_i) - D(t_i)]^2. \quad (4)$$

根据 H 的计算结果对 τ_0 进行修正,使其 H 为最小,此时的 $G_0(t)$ 即为真实的荧光衰变曲线 $G(t)$,它所对应的 τ 即为样品的真实荧光寿命。

当对样品没有任何了解的情况下,设置初始 τ_0 就存在着一定的困难。而相平面法则可由实验观测的荧光衰变曲线迅速、直观地给出样品的粗略 τ 值。

相平面法的原理是根据相平面方程^[6]

$$W(t) = -(1/\tau)z(t) + K \quad (5)$$

求得真实荧光寿命,式中

$$z(t) = \int_0^t D(x)dx / \int_0^t F(x)dx, \quad (6)$$

$$W(t) = D(t) / \int_0^t F(x)dx, \quad (7)$$

$D(x)$ 与 $F(x)$ 同前定义。从实验中获得 $D(x)$, $F(x)$, 根据(6)、(7)两式可求得 $W(t)$ 、 $z(t)$ 。根据(5)式拟合 $W(t)$ 与 $z(t)$ 的直线,其斜率即为 $-1/\tau$,从而求得 τ 。

相平面法虽然具有计算简单,结果直观的优点,其缺点是精确度差。因此我们的工作先通过相平面法得到样品的粗略荧光寿命 τ ,再用 τ 值作为迭代卷积法的初始尝试值 τ_0 ,进行卷积运算。这样就克服了迭代卷积法在设置 $G(\tau_0)$ 的困难,使卷积运算迅速得到收敛,最后获得样品的荧光寿命 τ 。两种方法的结合使运算简化,并达到较高的拟合精度。全部运算可由微型计算机完成。

三、实 验

用氩离子锁模激光器 1 的光脉冲作为激发光,波长为 5145 Å,脉冲宽度约 200 ps,脉冲

重复率为 96 MHz。激光器可连续稳定工作 4 小时以上。用 RCA-931 A 型光电倍增管 6 接收荧光,倍增管的上升时间为 2 ns。倍增管的信号输出直接输入到 SQ-12 型取样示波器 7,从荧光屏上显示出荧光衰变曲线 $D(t)$ 及仪器响应函数 $F(t)$ 。示波器时标取 200 ps/div。其实验装置如图 1 所示。图中: 2—锁模驱动源, 3—样品池, 4—会聚透镜。

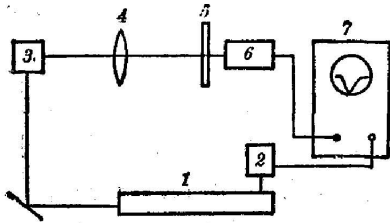


图 1 荧光寿命测量实验装置
Fig. 1 Experimental setup for measuring fluorescence lifetimes

利用这套装置对 5 种若丹明 6G 与碘化钾不同配比的水溶液的荧光寿命进行了测量。

若丹明 6G 是天津染料研究所提纯的激光染料,碘化钾为分析纯试剂,溶剂为去离子水。

测量仪器的响应函数时,在图 1 中的 3 处换为石英板,将激光脉冲反射到光电倍增管阴极上,在示波器

表 1 若丹明 6G 与不同浓度碘化钾混合水溶液样品荧光寿命计算值
Table 1 Calculated values of fluorescence lifetime for Rh6G ($1 \times 10^{-6} M$) with different concentrations of KI in water.

Rh6G ($1 \times 10^{-6} M$)	加入 KI 浓度				
	0.075 M	0.15 M	0.3 M	0.6 M	1.2 M
寿命 τ (ns)	1.24	0.690	0.370	0.270	0.130
文献 τ 值 ^[7]	1.12	0.69	0.362	0.210	0.128

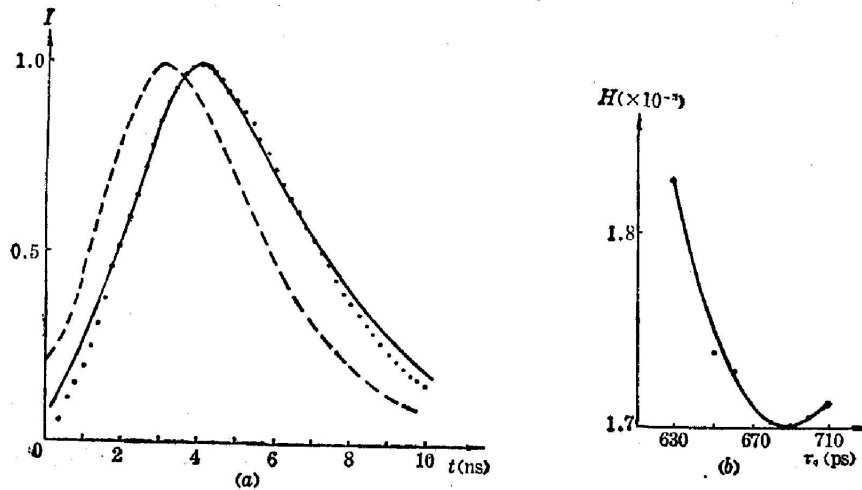


图 2 (a)若丹明 6G ($1 \times 10^{-6} M$) 水溶液加入碘化钾 (0.15 M) 样品的观测和计算的荧光衰变曲线

Fig. 2 (a) Observed and calculated fluorescence decay curves for Rh 6G ($1 \times 10^{-6} M$) with 0.15 M KI in water

- $F(t)$ instrumental response function
 - $D(t)$ observed fluorescence decay curve
 - $D^o(t)$ calculated fluorescence decay curve for $\tau=0.690$ ns, the best fit value
- (b) A plot of H goodness-of-fit vs. τ_p

荧光屏上显示出 $F(t)$ 。测量荧光衰变曲线时, 在 3 处放样品池, 用石英透镜 4 将荧光会聚在倍增管阴极上, 在倍增管前放置滤光片 5, 其 $\lambda_{\max} = 5900 \text{ \AA}$, 示波器荧光屏上显示的为 $D(t)$ 。

由实验测得 $D(t)$ 及 $F(t)$ 曲线, 以步长 $\Delta t = 200 \text{ ps}$ 取分立数据点, 用 Apple II 台式微型计算机计算。

表 1 给出若丹明 6G 与五种不同浓度的碘化钾混合水溶液的荧光寿命计算结果。图 2~4 给出三种不同浓度溶液的观测和计算得到的荧光衰变曲线以及所对应的 H 与 τ_0 的关系曲线。其中图 (b) 的 H 最小值所对应的 τ_0 是 τ 分布区域中最佳拟合, 该 τ_0 值即为样品的荧光寿命。

四、讨 论

1. 所拟合的荧光衰变曲线有时出现曲线尾部计算值低于观测值的现象, 如图 3(a) 和图 4(a) 所示。这是由于当样品的荧光寿命长到使得荧光衰变曲线宽度超过激发周期时, 前一周期的荧光衰变后沿的尾部与后一周期衰变曲线的前沿相重叠, 从而造成观测曲线的偏差。荧光寿命越长, 这种偏差就越大。图 3(a) 和图 4(a) 的寿命分别为 0.690 ns 和 0.270 ns , 尾部偏差就较明显。而图 5(a) 的寿命较短, τ 为 0.124 ns , 它的衰变曲线未超过激发脉冲周期, 所以计算值与实验值符合很好。不过曲线尾部的这种偏差对寿命的测量结果影响不大, 可以忽略。

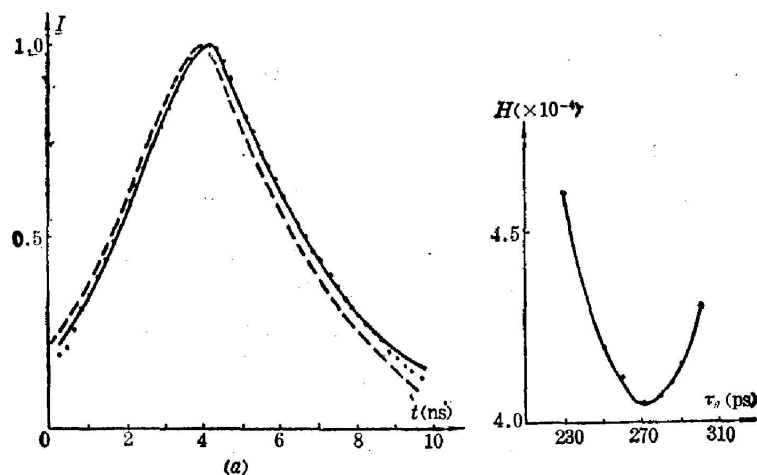


图 3 (a) 若丹明 6G ($1 \times 10^{-6} M$) 水溶液加入碘化钾 ($0.6 M$) 样品的观测和计算的荧光衰变曲线

Fig. 3 (a) Observed and calculated fluorescence decay curves for Rh6G ($1 \times 10^{-6} M$) with $0.6 M$ KI in water

----- $F(t)$ instrumental response function
 ——— $D(t)$ observed fluorescence decay curve
 $D(t)$ calculated fluorescence decay curve for $\tau = 0.270 \text{ ns}$, the best fit value
 (b) A plot of H goodness-of-fit vs. τ_0 .

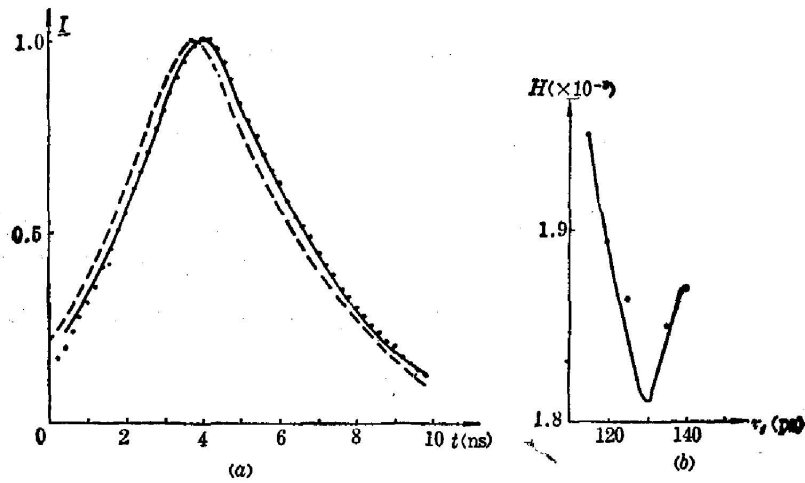


图 4 (a) 若丹明 6G ($1 \times 10^{-6} M$) 水溶液加入碘化钾 ($1.2 M$) 样品的观测和计算的荧光衰变曲线。

Fig. 4 (a) Observed and calculated fluorescence decay curves for Rh6G ($1 \times 10^{-6} M$) with $1.2 M$ KI in water

---- $F(t)$ instrumental response function
 ——— $D(t)$ observed fluorescence decay curve
 $D^c(t)$ calculated fluorescence decay curve for $\tau = 0.130$ ns, the best fit value
 (b) A plot of H goodness-of-fit vs. τ_p

2. 测量值的标准偏差 σ 定义为

$$\sigma = \left[\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 / n - 1 \right]^{1/2}, \quad (8)$$

其中 x_i 为测量值, \bar{x} 为多次测量平均值。系统的不确定度为

$$\Delta = c \cdot \sigma, \quad (9)$$

c 称为置信系数, 一般取 $3 \sim 2^{[8]}$ 。

表 2 给出一种溶液的荧光寿命三次测量的计算结果的不确定度。

表 2 用迭代卷积法与相平面法计算荧光寿命的不确定度

Table 2 Comparison of the uncertainty of calculated fluorescence lifetime by means of iterative convolution method and phase plane method, respectively

Rh6G ($1 \times 10^{-6} M$)	相 平 面 法	迭 代 卷 积 法
加入 $0.075 M$ KI	1.02 ± 0.30 ns	1.24 ± 0.04 ns

可见迭代卷积法获得结果的不确定度比相平面法要好。

3. 本工作检测系统的时间响应半宽度为 4.8 ns。用本文方法对测试数据进行解卷积可获得最小时间分辨为 130 ps 左右, 达到仪器响应半宽度的 3% 。其不确定度为 $\pm 3\%$ 。由于示波器水平轴的漂移及光电倍增管对不同波长光的时间响应不同, 将给测量带来误差。虽然在本工作中这种影响可忽略不计, 但在更精确的测量中应对这些误差作进一步校正^[9]。

郑波、陈冬青作毕业论文期间参加部分工作。

参 考 文 献

- [1] D. V. O'Connor *et al.*; *J. Phys. Chem.*, 1979, **83**, No. 10, 1333.
- [2] W. E. Ware, *et al.*; *J. Phys. Chem.*, 1973, **77**, No. 17, 2038.
- [3] J. C. Andre, *et al.*; *J. Phys. Chem.*, 1979, **83**, No. 17, 2285.
- [4] A. J. Lieber, *et al.*; *SPIE*, **94**, High Speed Optical Techniques, (Eds. M. A. Dugnag and R. K. Petersen, Proc. SPIE, California, 1976).
- [5] J. C. Gauthier and J. F. Delpach; *Advances in Electronics and Electron Physics*, **46**, (Academic Press, New York, 1978).
- [6] J. N. Demas and A. W. Adamson; *J. Phys. Chem.*, 1971, **75**, No. 16, 2463.
- [7] J. M. Harris and F. E. Lytle; *Rev. Sci. Instrum.*, 1977, **48**, No. 11 (Nov), 1469.
- [8] 肖明耀;《实验误差估计与数据处理》, (科学出版社, 1980).
- [9] D. M. Rayner *et al.*; *Can. J. Chem.*, 1976, **54**, No., 3246.

Measurement of subnanosecond fluorescence lifetimes by deconvolution

CHEN WENJU LIN MEIRONG AND JIONG HONGLI
(*Institute of Modern Optics, Nankai University*)

(Received 28 December 1984; revised 23 April 1985)

Abstract

Fluorescence decay curves of Rh6G with different concentrations of KI in water were measured by using a photomultiplier tube and a sampling oscilloscope. The response time of the system was in the order of nanoseconds. The observed fluorescence decay curves were convolutional results of the real decay curves and the instrumental response curve. A combination of the phase plane method and iterative convolution method was used in making deconvolution to obtain the real fluorescence lifetimes. The minimum time resolution was found to be 130 picoseconds, that is, 3% of the FWHM of the instrumental response time.