

双指数荧光衰减动力学模型分析*

陈文驹 林美荣 姜宏丽
(南开大学现代光学研究所)

提 要

本文提出了一种对双指数荧光衰减进行拟合及分析的较简便的有效方法。文中根据四种典型情况,给出了如何合理地选取和修正各个衰减参量的规则,以迅速获得双指数衰减的最佳拟合。同时讨论了在最佳拟合下,对拟合模型的合理性作出判断等问题。该方法计算程序简单,只需借助微计算机就可完成,便于推广应用。

一、前 言

分子的荧光寿命的测量,在光物理、光化学及光生物学的研究中是一个重要的课题。一般的有机荧光分子,其荧光衰减多为简单的单指数衰减,但是大多数多聚物和生物分子的荧光衰减,一般都不是单指数过程,而是复杂的多指数过程。单指数衰减是分子的激发态只有一个,其衰减过程也只有一个衰减速率。而多指数衰减的机制则是分子有多个分立的激发态,每一个态都有自己的特征寿命,对辐射过程都有贡献。因此单指数的荧光衰减规律与多指数的荧光衰减规律有所不同。对实验测量到的荧光衰减曲线进行分析就可以对该分子体系的荧光衰减动力学模型作出判断:是属于单指数衰减,还是属于多指数衰减,搞清分子的荧光衰减模型,对于研究分子激发态的性质和弛豫过程,分子内或分子间的能量转移和传递过程以及光化学反应过程的机理等,都有十分重要的意义^[1]。

在单指数荧光衰减模型中,待定的参量只有一个,情况比较简单,已有不少工作^[2,3],在多指数荧光衰减模型中,若有 n 个衰减分量,就需要确定 n 个衰减寿命和 $(n-1)$ 个衰减振幅比值,共 $2n-1$ 个参量。因此对多指数衰减模型分析要比单指数模型复杂得多,困难得多。现有文献所报道的有关多指数荧光衰减的研究^[4,5]都是在配有专用计算机的仪器上,利用附有的专用程序进行的,无法广泛使用。

本文提出了分析双指数荧光衰减模型的一种较简便的有效方法。文中首先对四种典型的双指数荧光衰减曲线进行分析,给出在拟合曲线过程中,如何合理选取和修正有关参量以获得最佳拟合。全部计算,程序简单,可在Apple II微型计算机上完成。文中还讨论了在最佳拟合条件下,参量的可信区域及对拟合模型的合理性作出判断等问题。此方法的原则也适用于多指数荧光衰减模型的分析。

收稿日期:1986年3月6日

* 中国科学院科学基金资助的课题。

二、用迭代卷积法拟合双指数衰减曲线

对于双指数荧光衰减过程可用函数形式表示为:

$$G(t) = A_1 \exp(-t/\tau_1) + A_2 \exp(-t/\tau_2). \quad (1)$$

一般取 A_2/A_1 的比值, 因此需要确定 A_2/A_1 、 τ_1 、 τ_2 三个参量。实验中观测到的荧光衰减曲线是真实荧光衰减函数 $G(t)$ 与仪器函数 $F(t)$ 卷积的结果, 用数学关系表示为:

$$D(t) = \int_0^t G(t-t')F(t')dt, \quad (2)$$

其中 $D(t)$ 是观测的荧光衰减曲线。

通常可用迭代卷积法求得真实荧光衰减函数。但是由于双指数衰减的参量不只一个, 而且相互关联, 在拟合曲线时选择参量的初始值存在很大困难, 为解决这个困难, 我们提出拟合分两步进行。

第一步首先确定双指数拟合的参考 τ 值。作法是, 假设样品的荧光衰减为单指数模型, 即 $G(t) = \exp(-t/\tau_0)$ 。当仪器函数 $F(t)$ 为已知时, 代入(2)式作卷积运算, 然后计算最小二乘判断参数 H 。 H 定义为:

$$H = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^n [D_{\text{cal}}(t_i) - D_{\text{obs}}(t_i)]^2, \quad (3)$$

式中 $D_{\text{cal}}(t_i)$ 为计算值, $D_{\text{obs}}(t_i)$ 为观测值, 从而求得单指数衰减寿命 τ_0 。此时平均寿命 τ_0 即为双指数拟合的参考 τ 值。

第二步进行双指数拟合。先选取(1)式中的 A_2/A_1 等于某一值, 参考单指数拟合得到的寿命值 τ_0 , 取 τ_1 比 τ_0 小, 而 τ_2 比 τ_0 大的方向变化。根据(2)式作卷积运算, 然后计算最小二乘判断参数 H 。从 H 值的变化, 判断参量的修正方向是否正确。参量的修正方式可采用逐个进行修正, 反复循环, 直至达到最佳拟合为止。问题的困难就在于如何正确选取和修正参量, 以迅速得到最佳拟合。

我们分析了大量的双指数荧光衰减实验观测曲线, 发现用单指数衰减模型拟合结果与实测曲线作对比时, 偏差情况一般可分为四种类型:

(1) 曲线的前沿符合较好, 但后沿相差颇大, 计算曲线与观察曲线有交叉, 并且交叉点位于曲线后沿的中部, 如图 1 所示。这种情况一般是 τ_1 、 τ_2 应占有相等或相近的权重, 即 $A_2/A_1 \approx 1$, 并且 τ_1 、 τ_2 均偏离 τ_0 值较远。根据这一准则对衰减参量进行修正, 很快可使 H 达到最小值。对图 1 曲线的计算结果见表 1。

(2) 曲线的前沿相差较大, 后沿基本上符合, 如图 2 所示。这种情况, τ_2 值较接近 τ_0 值, 并占有较大的权重, 即 $A_2/A_1 > 1$ 。这时主要是对 τ_1 进行修正。对图 2 曲线的计算结果见表 1。

(3) 曲线的前沿有很小的偏差, 后沿也仍存在着两条曲线的交叉现象, 但是两者相差不是很大, 如图 3 所示。这种情况 τ_2 应占较小的权重, 取 $A_2/A_1 < 1$ 。 τ_1 、 τ_2 则按一般修正方法进行修正。对图 3 曲线的计算结果见表 1。

(4) 单指数拟合曲线与实测曲线差别不大, 这是一种特殊的情况, 如图 4 所示。这种情况通常取 $A_2/A_1 \ll 1$, 而且 τ_1 接近 τ_0 值, A_2 只起补偿作用, 对图 4 曲线的计算结果见表 1。

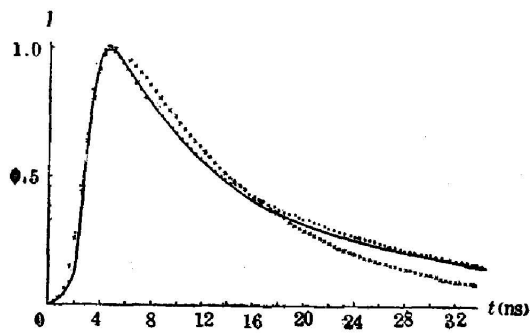


Fig. 1 Case (1): The comparison of fitting curves for single and double exponential model with the observed curve

- (-) observed curve^[4], sample: quinacrine bound to single cell of *samoae leonensis*
- (·) double exponential model
- (×) single exponential model

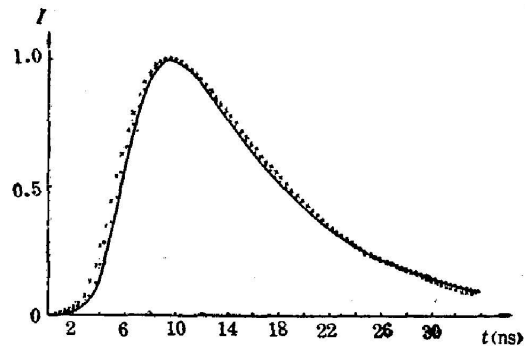


Fig. 2 Case (2): The comparison of fitting curves for single and double exponential model with the observed curve

- (-) observed curve^[4], sample: quinacrine in 0.1M NaCl, 0.01M N-2-hydroxyethyl piperazine-N'-2-ethane-sulfonic acid (HEPES), pH 8.8
- (·) double exponential model
- (×) single exponential model

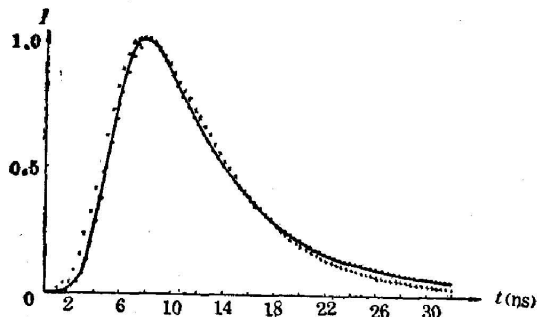


Fig. 3 Case (3): The comparison of fitting curves for single and double exponential model with the observed curve

- (-) observed curve^[4], sample: quinacrine in HEPES, pH 7.5
- (·) double exponential model
- (×) single exponential model

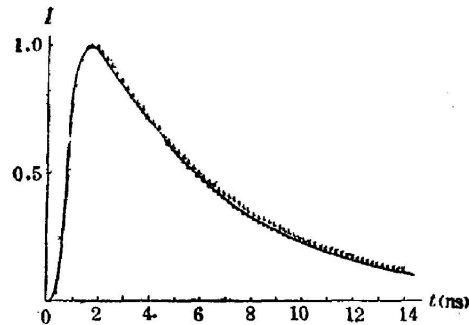


Fig. 4 Case (4): The comparison of fitting curves for single and double exponential model with the observed curve

- (-) observed curve^[2], sample: cyclohexane solution of anthracene ($2.1 \times 10^{-6}M$) and 5-*p*-phenyloxazole ($5 \times 10^{-6}M$)
- (·) double exponential model
- (×) single exponential model

Table 1 The comparison of calculation results using single exponential and double exponential model

model	single exponential		double exponential				reference value	
	τ_0 (ns)	H_{min}	τ_1 (ns)	τ_2 (ns)	A_2/A_1	H_{min}	τ_1 (ns)	τ_2 (ns)
1	9.5	0.290	3.20	17.5	1.222	0.052	3.5	18.7 ^[4]
2	6.9	0.098	3.50	7.80	1.838	0.015	3.1	8.7 ^[4]
3	4.0	0.113	1.95	7.45	0.219	0.017	1.9	7.1 ^[4]
4	2.0	0.325	1.30	4.30	0.100	0.232	1.10	4.89 ^[2]

三、衰减参量的可信区域

对于多指数衰减过程,各个参量之间是相互关联的,其中一个参量的变化,可以通过其它参量的变化作补偿,而不改变拟合曲线的结果。因而参量总存在一个给定的可信区域,在这个区域内的参量值都是误差所允许的。

根据统计理论^[6],对于某一参量 x , 设其估计值为 x_0 , 则存在一个区间: $x_1 \leq x_0 \leq x_2$ 。在这个区间内包含参量 x 的几率为:

$$P(x_1 \leq x_0 \leq x_2) = 1 - \alpha,$$

α 称为可信度 (Confidence level)。它表示参量 x 的真值落在 (x_1, x_2) 区域的几率为 $100 \times (1 - \alpha)\%$ 。参量 x 的可信区域取决于 α , α 依赖于实验的噪声大小。对于最坏的可能分布,可信区域具有几率为 95%, 因而得 α 为 0.05。

对于多指数衰减过程的最小二乘拟合,我们通过定义最佳拟合判断参数 H 的分布范围来确定相应的参量的可信区域。 H 由(3)式定义。

按照上一节方法对双指数衰减曲线拟合,得到一组最佳拟合参量 τ_1 、 τ_2 、和 A_2/A_1 , 它们所对应的 H 最小值 H_{\min} , 令为 H_0 。取 $\alpha = 0.05$, 根据有关计算^[6], 可求得其 H 的临界值 $H_c \leq 1.05H_0$ 。为了确定各参量的可信区域, 可先固定其它参量, 依次改变其中某一参量, 使 H 达到临界值 H_c , 就可获得各参量的可信区域。以上节类型(2)及(3)的荧光衰减为例, 计算其荧光衰减参量的可信区域及所对应的 H_c 值, 结果列于表 2。

Table 2 The confidence ranges and H_c values of fluorescence decay parameters

sample	(2)	(3)
H_0	0.015	0.017
τ_1 (ns)	3.50	1.95
τ_1 range	$3.53 \leq \tau_1 \leq 3.66$	$1.90 \leq \tau_1 \leq 2.05$
$H_c(\tau_1)$	$H \leq 1.02H_0$	$H \leq 1.04H_0$
τ_2 (ns)	7.80	7.45
τ_2 range	$7.71 \leq \tau_2 \leq 7.90$	$7.30 \leq \tau_2 \leq 7.63$
$H_c(\tau_2)$	$H \leq 1.04H_0$	$H \leq 1.05H_0$
A_2/A_1	1.838	0.219
A_2/A_1 range	$1.761 \leq A_2/A_1 \leq 1.923$	$0.210 \leq A_2/A_1 \leq 0.237$
$H_c(A_2/A_1)$	$H \leq 1.02H_0$	$H \leq 1.04H_0$

四、剩余自相关函数

从表 1 计算结果可以看出, 对于前三种情况, 用双指数模型拟合所得 H_{\min} 远小于用单指数模型拟合的结果。据此表明, 双指数模型要比单指数模型更为合理, 更符合于实测的衰

减曲线。但在第四种情况中,两种模型的 H_{\min} 相差很小,难以判断哪一种模型更为合理,这时必须引入剩余自相关函数作进一步的判断。

剩余自相关函数定义为^[7]

$$C(t_j) = \frac{1}{m} \sum_{i=1}^m (\omega_i)^{1/2} \Delta_i (\omega_{i+j})^{1/2} \Delta_{i+j} / \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \omega_i \Delta_i^2, \quad (4)$$

式中 $\omega_i = [1/D(t_i)] / \left[\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{1}{D(t_i)} \right]$, $\Delta_i = D_{\text{cal}}(t_i) - D_{\text{obs}}(t_i)$ 。

$C(t_i)$ 是用于判断实验值对于理论值的随机散射分布,因此可用来判断是测量引起的随机偏差还是模型偏差。当选取的模型正确时, $C(t)$ 表现为在零附近的随机分布,否则 $C(t)$ 是具有很大摆动幅度的低频振荡。对情况 4 计算其剩余自相关函数结果如图 5 所示。从剩余自相关函数的特征表明,它是属于双指数衰减模型。对于前三种情况所得剩余自相关函数与此结果相同。

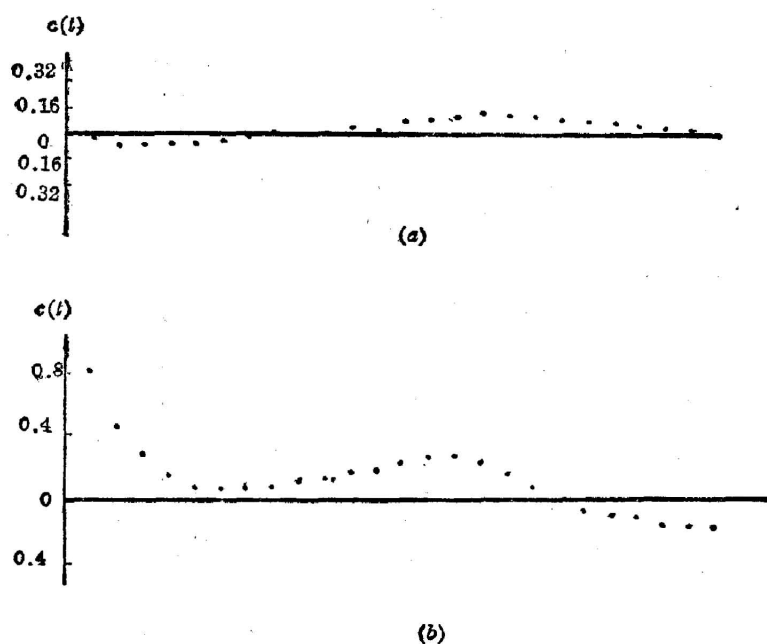


Fig. 5 Autoerrelation function of the residuals for case (4)
(a) double exponential model; (b) single exponential model

参 考 文 献

- [1] G. Weber; *Abstracts of the Biophysical Society 13 th Annual Meeting*, 1969, **9**, 23.
- [2] A. E. Mckinnon *et al.*; *J. Phys. Chem.*, 1977, **81**, No. 16 (Aug), 1564.
- [3] 陈文驹, 林美荣, 姜宏丽; 《光学学报》, 1985, **5**, No. 10 (Oct.), 904.
- [4] D. J. Arndt-Jovin *et al.*; *J. Histochem. Cytochem.*, 1979, **27**, No. 1, 87.
- [5] A. Andreon *et al.*; *Opt. Commu.*, 1980, **33**, No. 3 (Jun), 277.
- [6] W. C. Hamilton; *Statistics in Physical Science*, Ronald Press, 1964.
- [7] A. Grinvald *et al.*; *Anal. Biochem.*, 1974, **59**, 583.

Analysis of kinetic model of double exponential fluorescence decay

CHEN WENJU, LIN MEIRONG AND JIANG HONGLI

(Institute of Modern Optics, Nankai University, Tianjin)

(Received 6 March 1986)

Abstract

This paper presents a simple and effective method for fitting and analysis of the kinetic model of double exponential fluorescence decay. According to four typical cases, we give the rules for selection and modification of decay parameters to get the best fit. In this paper, the judgment of correction of the model fitted by our method is also discussed. The calculation program of this method is simple and can be carried out on a microcomputer. It can be easily used in further.