

文章编号 : 0253-2239(2002)09-1141-04

一种独立于激发光脉冲参量的磷光寿命测量方法^{*}

李成军 曾绍群 骆清铭^{**} 陈同生 龚 辉

(华中科技大学生物医学光子学教育部重点实验室, 武汉 430074)

摘要 : 脉冲法磷光寿命测量中, 激发光脉冲参量(脉冲宽度和形状) 用于磷光强度衰减分析的起始时刻的选取是影响寿命计算准确度的关键因素。以线性时不变系统理论为依据, 探讨了磷光强度衰减特性与激发光脉冲参量之间的关系, 发现对于有限宽度的激发光, 激发光脉冲消失之后的磷光强度衰减特性独立于激发光脉冲参量, 选取激发光脉冲消失时刻作为磷光强度衰减分析的起始时刻, 可获得准确的寿命计算。利用磷光探针氧卟啉(Oxy-Phor R2) 标准试样做了针对性实验, 实验结果验证了理论的正确性。

关键词 : 磷光寿命 ; 线性时不变性 ; 单指数拟合

中图分类号 : TN247 文献标识码 : A

1 引 言

磷光寿命测量技术为监测生物组织中局部区域的血液循环功能提供了有力工具^[1-3], 对脑活动过程中氧代谢状况的监测为认知科学提供了一项基础性研究手段^[4]。因此, 磷光寿命的准确测量具有非常重要的意义。

对于磷光寿命的脉冲测量法, 磷光强度衰减分析中起始时刻的选取是影响寿命计算准确度的关键因素。曾有文献^[5]提到跳过磷光强度曲线的上升部分和衰减部分前期数据点的处理方法, 但文中并未阐述这样处理的依据; 另外, 按此原则选取用于寿命计算的起始时刻, 其位置仍存在不确定性。

本文从超短光脉冲激励下磷光发射强度的单指数衰减规律和线性时不变系统的一般原理出发, 研究了有限宽激发光脉冲激励下磷光发射强度的衰减规律与激发光脉冲参量之间的关系, 发现当激发光脉冲消失后, 磷光发射强度的衰减特性独立于激发光脉冲参量, 仅依赖于磷光探针的特征寿命。据此, 选取激发光脉冲消失的时刻作为磷光寿命计算的起始时刻, 这样处理, 理论上讲可获得准确的寿命计算; 并用磷光探针氧卟啉(Oxy-Phor R2) 标准试样做了对比实验, 实验结果验证了此种处理的有效性。

2 激发光脉冲参量对磷光强度衰减特性的影响规律

2.1 超短光脉冲激励下磷光发射强度的单指数衰减规律

磷光物质经由超短光脉冲激励, 其发射磷光强度的衰减规律可由下式描述^[6] :

$$I(t) = I_0 \exp(-t/\tau), \quad (1)$$

$I(t)$ 为磷光发射强度, 它是时间 t 的函数, I_0 为 $t = 0$ 时的磷光发射强度, τ 为磷光寿命。(1) 式所描述的磷光发射强度衰减规律即为磷光探针在超短光脉冲激励下的响应, 可以近似为磷光探针的冲击响应。

2.2 有限宽激发光脉冲激励下磷光发射强度的衰减规律

脉冲法磷光寿命测量中, 理想的激发光脉冲是在 $t = 0$ 时刻可由 δ 函数来描述的一个冲击光脉冲; 但实际中采用的激发光脉冲一般都有有限宽度, 具有复杂的时间函数。对于有限宽光脉冲而言, 观测到的磷光信号将是在激发光脉冲存在期间不同瞬间发射的磷光的总体效应, 是对激发光脉冲的时间响应。

依据线性时不变系统理论, 一个具有传递函数 $h(t)$ 的线性时不变系统, 当输入激励为 $e(t)$ 时, 输出响应 $y(t)$ 由 $h(t)$ 和 $e(t)$ 的卷积确定, 即 :

$$y(t) = h(t) \otimes e(t) = \int_0^{\infty} e(u) h(t-u) du. \quad (2)$$

对于磷光信号的探测系统而言, 当激发光强度控制在系统的线性响应范围内时, 将具备线性时不变特性。在冲击光激励下的磷光信号具有(1) 式所表

^{*} 国家杰出青年科学基金(60025514) 国家自然科学基金(59836240、39870205、30070215) 高校博士点专项基金(98048733) 资助课题。

^{**} 联系人, E-mail: q_luo@mail.hust.edu.cn

收稿日期: 2001-07-25; 收到修改稿日期: 2001-11-02

的单指数衰减规律,由于初始磷光强度 I_0 正比于激发光的强度,取 $h(t) = \exp(-t/\tau)$ 作为系统传递函数,其中 $t \in [0, \infty]$; 对于有限宽度的激发光脉冲,可以用区间 $[0, T]$ 上的连续函数 $L(t)$ 描述。探测到的磷光信号将是 $h(t) = \exp(-t/\tau)$ 与 $e(t) = L(t)$ 的卷积,代入(2)式得:

$$y(t) = \exp(-t/\tau) \otimes L(t) = \int_0^{\infty} L(u) \cdot \exp[-(t-u)/\tau] du, \quad (3)$$

由于 $u \in [0, T]$, $t-u \in [0, \infty]$, 可知(3)式的积分区间为:

$$\begin{cases} [0, t], & t < T \\ [0, T], & t \geq T \end{cases}$$

这样(3)式可化为:

$$y(t) = \begin{cases} \exp(-\frac{t}{\tau}) \int_0^t L(u) \exp(\frac{u}{\tau}) du, & t < T \\ \exp(-\frac{t}{\tau}) \int_0^T L(u) \exp(\frac{u}{\tau}) du, & t \geq T \end{cases} \quad (4)$$

当 $t < T$ 时, $L(u) \exp(u/\tau)$ 为区间 $[0, t]$ 上的连续函数,因此 $\int_0^t L(u) \exp(\frac{u}{\tau}) du$ 是可积的,积分结果为

t 的函数,记为 $x(t)$; 当 $t \geq T$ 时, $L(u) \cdot \exp(\frac{u}{\tau})$ 为区间 $[0, T]$ 上的连续函数, $\int_0^T L(u) \cdot \exp(\frac{u}{\tau}) du$

同样是可积的,积分结果是与 t 无关的常数,记为 K 。(4)式可进一步化简为:

$$y(t) = \begin{cases} x(t) \cdot \exp(-t/\tau), & t < T \\ K \cdot \exp(-t/\tau), & t \geq T \end{cases} \quad (5)$$

此即为有限宽激发光脉冲激励下磷光发射强度的函数表达式。

从(5)式可以清楚地看到,当 $t < T$ 时,磷光信号受激发光脉冲参量影响; 当 $t \geq T$ 时,磷光信号的衰减特性独立于激发光脉冲参量(脉冲宽度与形状),磷光强度呈现严格的单指数衰减规律,且衰减寿命为 τ 。若将分析的起始时刻选在 $t \geq T$ 区间,可获得准确的寿命计算。

3 实验验证

为证实 2.2 节中所得结论对磷光寿命测量的指导意义,利用磷光探针氧卟啉(Oxy-Phor R2)标准试样^[3,7](按照文献[3,7]的标定方法及本实验条件,

此试样的磷光寿命为 $\tau = 100 \mu\text{s}$)做了对比实验。实验系统以 BIO-RAD 公司提供的共焦显微成像系统为基础,在原有光路中加入斩波器,将氩离子气体激光器(共焦显微成像系统原有激光器)产生的连续光转换为脉冲光。在确保其它实验条件完全相同的情况下,利用两种不同脉冲宽度(半峰值宽度分别为 $12 \mu\text{s}$ 和 $34 \mu\text{s}$)的激发光激励同一样品,由光探测系统实现对激发光和磷光强度信号的分通道同步测量,成像系统以灰度图形式(各像素灰度值与所记录时刻的光强度成正比)记录下了不同瞬间的激发光和磷光强度信息,结果如图 1 所示。

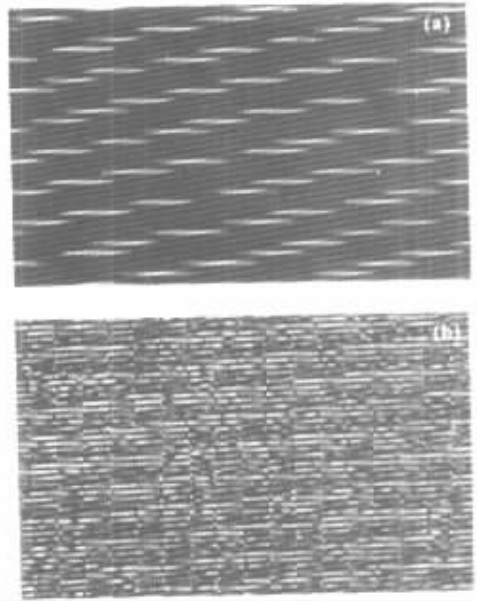


Fig.1 Gray images of the excitation light (a) and phosphorescence (b)

图 1 中反映激发光和磷光强度变化的灰度图是离线处理的数据来源。图 1(a)和图 1(b)均为 $512 \text{ pixel} \times 512 \text{ pixel}$,由成像系统参量可知,一个像素上停留的时间为 $2 \mu\text{s}$,在一行像素上共停留时间 $2 \times 512 = 1024 \mu\text{s}$,而激发光脉冲的重复周期为 $500 \mu\text{s}$,这样,每一行至少含有一个完整的周期。只要确定了激发光灰度图每一行中完整周期的峰值强度所对应的像素序号,将此序号作为同相位点应用于发射磷光灰度图,即可实现多组单个激发光脉冲激励下磷光强度信号的同相位平均,有效提高磷光强度信号的信噪比。

图 2(a)、图 2(b)所示曲线为 300 组单个激发光脉冲作用下探测到的光强度信号经同相位平均并减去背景信号后所得结果,其中,实线代表激发光信号,点线代表发射磷光信号。

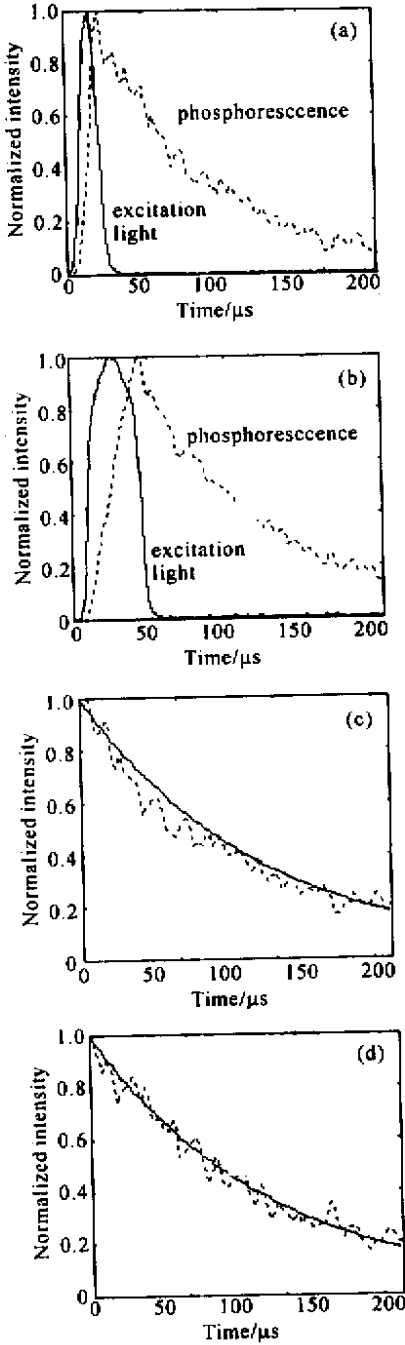


Fig.2 Averaging of data with the same phase [(a)(b)] and single exponential least-squares fitting to phosphorescence data after time t_0 [(c)(d)]

依据 2.2 节所得结论选取用于磷光寿命计算的起始时刻,即激发光脉冲完全消失的时刻。为提高计算的可操作性,我们选取的是激发光脉冲下降沿上 1% 峰值强度所对应的时刻作为磷光强度衰减分析的起始时刻。图 2(a) 中激发光脉冲的半峰值宽度为 12 μs , 用于磷光强度衰减分析的起始时刻;用于磷光强度衰减分析的起始时刻 $t_0 = 36 \mu\text{s}$;图 2(b) 中激发光脉冲的半峰值宽度为 34 μs , 用于

磷光强度衰减分析的起始时刻 $t_0 = 54 \mu\text{s}$ 。

起始时刻 t_0 确定后,并不能直接从磷光信号强度衰减的实验曲线中计算得样品的磷光寿命。理想的处理方法是将时刻 t_0 及以后的数据归一化,利用最小二乘拟合算法将归一化后的数据进行单指数拟合,获得实验曲线的最佳单指数拟合曲线 $y_f(t) = \exp(-t/\tau_f)$, τ_f 即为所要计算的样品磷光寿命。取寿命计算的精度为 0.1 μs , 得到两种激发光脉冲情况下磷光强度拟合曲线(图 2(c) 图 2(d) 中的实线)的解析表达式分别为 $y_{f1}(t) = \exp(-t/99.3)$ 和 $y_{f2}(t) = \exp(-t/99.6)$, 对应的样品磷光寿命计算值分别为 99.3 μs 、99.6 μs , 该结果与氧卟啉(Oxy-Phor R2)标准试样的标定寿命非常接近。

结论 本文研究了有限宽度激发光脉冲激励下磷光发射强度的衰减规律与激发光脉冲参量之间的关系,发现当激发光脉冲消失后,磷光发射强度的衰减特性独立于激发光脉冲参量,仅依赖于磷光探针的特征寿命,据此提出了磷光寿命脉冲测量法中寿命计算起始时刻的选取原则,其正确性由实验结果所验证。

参考文献

- [1] Rumsey W L, Vanderkooi J M, Wilson D F. Imaging of phosphorescence: A novel method for measuring distribution of oxygen in perfused tissue. *Science*, 1988, **241**(4873):1649 ~ 1651
- [2] Shonat R D, Wilson D F, Riva C E et al.. Oxygen distribution in the retinal and choroidal vessels of the cat as measured by a new phosphorescence imaging method. *Appl. Opt.*, 1992, **31**(19):3711 ~ 3718
- [3] Lo L W, Koch C J, Wilson D F. Calibration of oxygen-dependent quenching of the phosphorescence of Pd-meso-tetra(4-carboxyphenyl)porphine: A phosphor with general application for measuring oxygen concentration in biological systems. *Analy. Biochem.*, 1996, **236**:153 ~ 160
- [4] Vanzetta I, Grinvald A. Increased cortical oxidative metabolism due to sensory stimulation: Implications for functional brain imaging. *Science*, 1999, **286**:1555 ~ 1557
- [5] Golub A S et al.. Analysis of phosphorescence decay for nonuniform oxygen tension: consequences of finite excitation flash duration. In: Eke, Delpy. *Oxygen Transport to Tissue XXI*, New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 1998. 649 ~ 659
- [6] Lakowicz J R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. New York: Plenum Press, 1999. 95 ~ 140
- [7] Lo L W, Vinogradov S A, Koch C J et al.. A new, water soluble, phosphor for oxygen measurements in vivo. In: Harrison, Delpy. *Oxygen Transport to Tissue XIX*, New York: Plenum Press, 1997. 651 ~ 656

Phosphorescence Lifetime Measurement Independent on the Parameters of the Excitation Light Pulse

Li Chengjun Zeng Shaoqun Luo Qingming Chen Tongsheng Gong Hui

(*The Key Laboratory of Biomedical Photonics , Ministry of Education ,
Huazhong University of Science and Technology , Wuhan 430074*)

(Received 25 July 2001 ; revised 2 November 2001)

Abstract : In the phosphorescence lifetime measurements with pulse method , both the excitation light pulse parameters and initial time selected for intensity decay analysis are crucial to the accurate lifetime calculation. The relation between phosphorescence intensity decay and the parameters of the excitation light pulse is analyzed based on the linear time invariance. it is found that the phosphorescence intensity decay is independent on the parameters of the excitation light pulse after the excitation light vanishing. If the excitation light pulse vanishing moment is selected as the initial time , the accurate lifetime can be obtained. The experimental results from the Oxy-Phor R2 samples excited by different excitation light pulse have proved the above conclusion.

Key words : phosphorescence lifetime ; linear time invariance ; single exponential fitting