

文章编号: 0253-2239(2006)10-1543-6

血液静态荧光偏振光谱研究

彭长德^{1,2} 刘莹^{1,2} 兰秀凤² 陆建² 倪晓武²

(¹ 徐州师范大学物理系, 徐州 221116)
(² 南京理工大学理学院, 南京 210094)

摘要: 报道了用 408 nm 的 LED 偏振光诱导浓度为 0.3%~10% 的人全血溶液在 350~800 nm 波段的静态荧光偏振光谱, 讨论了其光谱的结构特征和红移现象并给出了机理解释; 检测了不同浓度全血溶液荧光偏振光谱中在 490 nm 和 610 nm 附近处两个各主要荧光区的偏振度, 实验结果表明, 当血液浓度为 1.0% 时, 在两个主要荧光区的偏振度分别为 0.4796 和 0.4344, 当浓度增加到 8.0% 时, 相应的偏振度分别为 0.2064 和 0.0538。研究了偏振度随浓度的变化规律, 用能量转移理论分析了在不同荧光区、不同浓度下, 血液中各荧光团之间的不同能量转换机理及偏振度的变化现象。研究结果对光诱导生物组织自体荧光诊断技术有一定的参考价值。

关键词: 医用光学与生物技术; 荧光偏振光谱; 偏振度; 能量转移; 红移

中图分类号: Q631 文献标识码: A

Research on Static Fluorescence Polarization Spectrum of Whole Blood

Peng Changde^{1,2} Liu Ying^{1,2} Lan Xiufeng² Lu Jian² Ni Xiaowu²

(¹ Department of Physics, Xuzhou Normal University, Xuzhou 221116)
(² Department of Physics, Nanjing University of Science and Technology, Nanjing 210094)

Abstract: The static fluorescence polarization spectrum of human whole blood whose concentrations are from 0.3% to 10% at the band 350~800 nm induced by 408 nm polarized light of LED is reported. The spectral characteristics and red-shifted phenomenon for different concentrations of the sample solutions are discussed, and the mechanism of the red shift is also given. The polarization degrees of two key fluorescence emission bands (around 490 nm and 610 nm) in polarization spectrum are measured. The result shows that the polarization degrees of two key fluorescence emission bands are 0.4796 and 0.4344 when the concentration of blood is 1.0%, and the polarization degrees are 0.2064 and 0.0538 when the concentration is 8.0%. The variation rule of the polarization degree with the concentrations of whole blood is studied. The different energy transfer mechanisms as well as the variation of polarization degree in different fluorescence areas for different concentrations of whole blood is studied by the theory of energy transfer. The research will give reference to light-induced autofluorescence diagnostic techniques of organic tissue.

Key words: medical optics and biotechnology; fluorescence polarization spectrum; polarization degree; energy transfer; red shift

1 引 言

近年来国内外普遍开展的激光诱导生物组织自体荧光 (laser-induced autofluorescence, LIAF) 诊断技术, 以其快速、无损被广泛应用在早期癌等病症的诊断和治疗上^[1~4]。但是, 目前多数都是通过

正常与病变组织样品进行荧光光谱测定, 从光谱图上找出它们结构特征差异进行诊断^[5~8]。由于人体组织的复杂性, 即使是同一个健康组织, 在不同的物化条件下发出的荧光光谱结构特征也会有较大变化^[9,10], 实际所测的荧光光谱, 并不能真实地反映组

* 江苏省高校自然科学基金(04KJD140197)和徐州师范大学科研基金重点项目(03XLA05)资助课题。

作者简介: 彭长德(1960~), 男, 江苏徐州人, 徐州师范大学副教授, 硕士, 主要从事光与生物组织的相互作用研究。

E-mail: pengchangde@126.com

收稿日期: 2005-12-12; 收到修改稿日期: 2006-03-13

织内部荧光团的内源性荧光光谱的结构特征及其发光机理。因此,对于荧光光谱的结构特征、变化规律及其发光机理的深入研究,可为正确区分正常与病变组织的荧光光谱提供理论依据。

1926年 Perrin 首次提出了荧光偏振理论。1953年 Weber 成功地将该理论的应用范围由最初的球形分子拓展到非球形分子。此后,荧光偏振分析方法的基础研究与实际应用均取得了进展。对于有机大分子或生物分子如蛋白质、核酸、碳水化合物、类脂和药物等均能提供快速、可靠的成键平衡分析、分子降解测定等^[11]。近年荧光偏振分析方法在分析化学、生物化学、分子生物学、药物化学和医学(特别是诊断学)等领域的应用得到了快速发展。在激光诱导生物组织自体荧光诊断技术中,荧光光谱一般为偏振光谱,通过对其偏振性的研究可以了解血液内各荧光团之间的能量转移情况,借助内源或外源性的发光与发光分子的能级结构分析,阐明溶液状态下生物大分子的构象以及相应的生物活性,从而搞清荧光团的发光机理,并对血液内生物大分子进行荧光标识,为最终搞清激光诱导生物组织自体荧光诊断和治疗机理提供依据。然而,国内外对血液荧光偏振性的研究少见报道,本文给出了在这方面研究的初步成果。

在激光诱导生物组织自体荧光诊断技术中,依据的是组织自体荧光光谱的本征特性,但由于激光的线宽极窄,它对生物组织中的荧光团有较强的选择性,造成荧光强度太弱。作为探索实验研究,选用了发光二极管(LED)与偏振器作为激励偏振光源。LED的线宽虽有几十纳米,但仍可视为单色光源,因而可使血液中更多的荧光团产生荧光,从而获得较强的荧光光谱。为了提高荧光效率,LED中心波长选在血液强吸收区域的波长为408 nm处。

2 实 验

取30岁健康男子的鲜血2 ml,加5%的肝素抗凝获得全血溶液,再加适量的NaCl溶液,配制成不同体积比的全血溶液作为实验用样品。

将配制好的2 ml全血溶液样品装入石英比色皿内,在另一相同的比色皿内装入相应的NaCl溶液作为空白,在二比色皿与光源之间各放一个偏振片,使它们的偏振方向相同,用UV-2201分光光度计描绘出波长230~800 nm的全血溶液的吸收光谱。

用FLS920多功能稳态、时间分辨荧光光谱仪,

分别扫描装入比色皿内的不同浓度的全血溶液样品。样品与光源间放一偏振器作为起偏器,激发光波长为408 nm的LED,扫描步长0.1 nm,范围350~800 nm。扫描得到相应的全血溶液的静态荧光偏振光谱。再在样品与光谱仪间放入另一偏振器作为检偏器,分别选择检偏器与起偏器相互平行与垂直,扫描获得平行静态荧光偏振光谱和垂直静态荧光偏振光谱。整个实验过程均在室温下进行。

3 结果与讨论

3.1 血液对偏振光的吸收光谱及荧光偏振光谱

图1是体积比分别为0.3%、0.5%、0.8%的全血溶液在230~800 nm波段间对偏振光的吸收光谱。吸收光谱有五个明显的吸收峰,波长分别为272 nm, 340 nm, 417 nm, 540 nm和576 nm。它们的位置与血液浓度没有关系,但吸收峰强度却随浓度的增加而增加。从整个吸收光谱来看,在短波区吸收较强,尤其是位于波长417 nm处的吸收峰很大,在长波区吸收较弱,在波长大于600 nm的区域吸收很小。

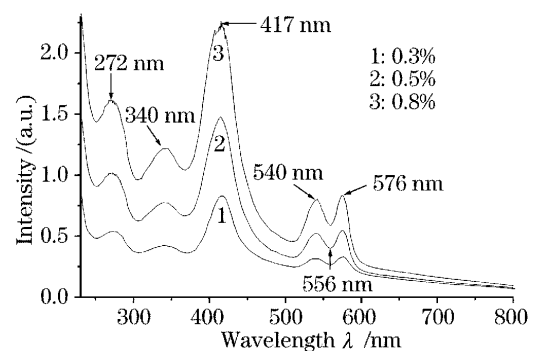


图1 不同体积比全血溶液对偏振光的吸收光谱

Fig. 1 Absorption spectra of whole blood solutions with different concentrations when induced by polarized light

由于血液在417 nm处有较强吸收,在该处附近选择408 nm的激励光,有较高的荧光效率。图2是波长为408 nm的LED偏振光激发不同浓度的全血溶液位于350~800 nm波段的荧光偏振光谱。谱线似乎以556 nm为中心的W底分成了大致相等的两个荧光区域,W的两个底位置几乎不随浓度发生变化,分别位于540 nm和576 nm处。整个荧光偏振光谱呈现出一种宽谱带的结构特征。我们曾对不同年龄和性别健康人血液做了该项实验,实验结果基本相同,图2的荧光偏振光谱具有代表性。

图2中以小峰556 nm为中心的W的两个底,恰好对应吸收光谱(图1)的两个吸收峰540 nm和576 nm。显然556 nm的谱峰主要是由于其两边的

光谱被吸收而形成的。可以说:峰值位置在 556 nm 处的波峰并不是由荧光团所产生的特征峰,而是因吸收造成的假象^[12]。

在波长为 350~540 nm 区域内有两个明显的

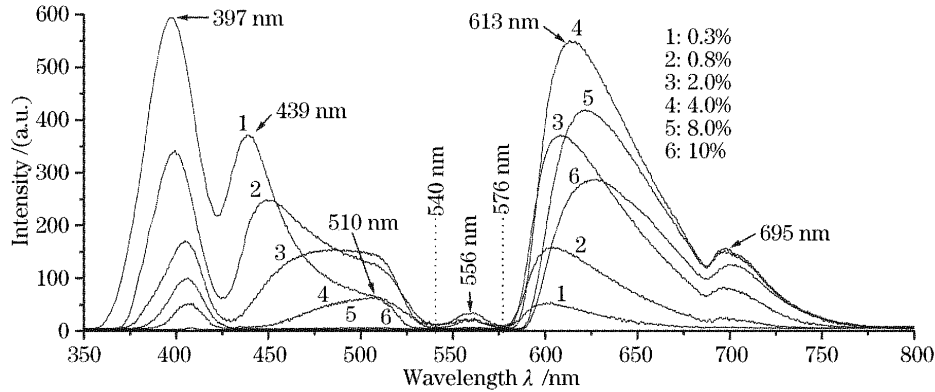


图 2 不同体积比全血溶液的荧光偏振光谱

Fig. 2 Fluorescence polarization spectra of whole blood solutions with different concentrations

400 nm 附近近似正态曲线的大谱峰,主要是由 408 nm 的激励光的散射形成的。随着血液浓度的增加,溶液对激励光的吸收增大,致使散射光强度随着血液浓度的增加而减小。只有血液浓度为 10% 的散射波峰位恰为激励光的中心波长 408 nm,其它各峰位均随着血液浓度的减小出现了不同程度的蓝移。对浓度为 0.3% 的谱线 1 而言,峰值位置竟蓝移了 11 nm,这显然是因血液在 417 nm 处有一个强吸收造成的,此吸收中心恰在 408 nm 散射峰右侧的斜面上,吸收使右侧斜面深度下凹,将峰的最高点推向左侧而形成蓝移。

在 510 nm 附近有一小峰,由于该峰和 439 nm 峰(谱线 1 的峰值位置)的强度对血液浓度的敏感程度不同,在低浓度时它几乎显现不出来,随着血液浓度的增加 439 nm 峰的强度迅速减小,510 nm 峰明显地表现出来,之后又随浓度的进一步增加开始减小,直至为零。

在 576~800 nm 波段内有两个荧光峰,其中在波长为 613 nm 附近波峰的强度较强;相比较而言,在波长为 695 nm 附近的波峰强度要小得多。而在血液浓度小于 4% 时,荧光强度随浓度的增加而增加;在浓度大于 4% 时,荧光强度随浓度的增加而减小。两谱峰的峰值位置 λ_{\max} 均随着浓度的增加而出现红移。大峰的红移较明显,小峰的红移很小。

在人的血液中存在大量的血卟啉(原卟啉和锌卟啉)。原卟啉吸收光子后,发射 630 nm 和 690 nm 的荧光,相应的能级跃迁为 $^1S_{1,0} \rightarrow ^0S_{0,0}$ 和 $^1S_{1,0} \rightarrow ^0S_{1,0}$, 锌卟啉吸收光子后,发射 590 nm 的荧光,相应的能

级跃迁为 $^1S_{1,0} \rightarrow ^0S_{0,0}$ ^[1]。由于在电子的能级态上存在着不同的振动能级,这些荧光的波长和强度又会因血液所处的物理、化学环境而有所变化,且在血液生物大分子中存在着多种荧光团,这样就形成了荧光偏振光谱的宽谱带结构特征。图 2 中 613 nm 附近的大峰主要是锌卟啉发射的 590 nm 荧光和原卟啉发射 630 nm 的荧光二者叠加形成的。695 nm 的小峰主要是原卟啉 $^1S_{1,0} \rightarrow ^0S_{1,0}$ 能级跃迁所产生。

3.2 血液荧光偏振光谱的偏振度

图 3 是体积比为 1.3% 的全血溶液荧光偏振光谱。曲线 1 为仅有起偏器时由偏振光激发的血液荧光光谱 f_p , 曲线 2 为起偏器与检偏器都存在且二者偏振方向相同时血液的荧光光谱 f_{\parallel} , 曲线 3 为起偏器与检偏器相互垂直时的血液荧光光谱 f_{\perp} 。显然,它们在 I、II 的荧光强度发生了明显的变化。不难

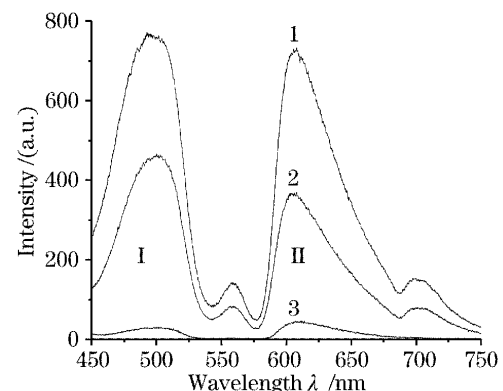


图 3 浓度为 1.3% 全血溶液的 $f_p, f_{\parallel}, f_{\perp}$ 的荧光光谱
Fig. 3 Fluorescence spectra of whole blood solutions with concentration of 1.3% induced by linearly polarized light, parallel analyzer plate, vertical analyzer plate

看出曲线 1 的两个荧光区域 I 和 II (以下简称荧光峰 I 和荧光峰 II) 具有不同的偏振度。根据所测的荧光强度 I_{\parallel} , I_{\perp} , 利用偏振度公式

$$p = (I_{\parallel} - I_{\perp}) / (I_{\parallel} + I_{\perp}), \quad (1)$$

可计算出曲线 1 的荧光峰 I 和峰 II 的荧光偏振度分别为 0.4731 和 0.4023。

当用偏振光激发荧光系统时, 样品发射的荧光也是偏振的, 这是由于分子的荧光发色团按它与激发光偏振方向的相对取向进行光选择的结果。在如图 4 所示的实验装置中, 偏振光沿 z 轴偏振, 从 x 轴入射并在 y 轴检测 I_{\parallel} 和 I_{\perp} , 分子取向以吸收跃迁偶极矩与发射跃迁偶极矩描述。经分析计算可得到激发分子取向在 $\theta + d\theta$ 及 $\varphi + d\varphi$ 之间的概率为

$$w(\theta, \varphi) d\theta d\varphi = \frac{3}{4\pi} \cos^2 \theta \sin \theta d\theta d\varphi,$$

发射团发射的沿 z 轴方向偏振的荧光概率正比于 $|\boldsymbol{\mu} \cdot \mathbf{k}|^2$, $\boldsymbol{\mu}$ 为发射团吸收跃迁偶极矩矢量, \mathbf{k} 为 z 轴的单位矢量。于是发射概率正比于 $\cos^2 \theta$ 。将激发分子的取向分布 $w(\theta, \varphi)$ 乘以发射概率并对所有的方向积分, 得沿 z 轴偏振的荧光相对强度 I_{\parallel}

$$I_{\parallel} \propto \int_0^{2\pi} d\varphi \int_0^{\pi} d\theta \cos^2 \theta w(\theta, \varphi) = \frac{3}{4\pi} \int_0^{2\pi} d\varphi \int_0^{\pi} d\theta \cos^4 \theta \sin \theta = \frac{3}{5}, \quad (2)$$

发射团发射的沿 x 轴方向偏振的荧光概率正比于 $|\boldsymbol{\mu} \cdot \mathbf{i}|^2$, \mathbf{i} 为 x 轴的单位矢量。发射概率正比于 $(\sin \theta \cos \varphi)^2$, 得沿 x 轴偏振的荧光相对强度 I_{\perp}

$$I_{\perp} \propto \int_0^{2\pi} d\varphi \int_0^{\pi} d\theta \sin^2 \theta \cos^2 \varphi w(\theta, \varphi) = \frac{3\pi}{4} \int_0^{2\pi} d\varphi \cos^2 \varphi \int_0^{\pi} d\theta \cos^2 \theta \sin^3 \theta = \frac{1}{5}, \quad (3)$$

将 I_{\parallel} 和 I_{\perp} 代入偏振度公式得偏振度 $P = 0.5$ 。可见

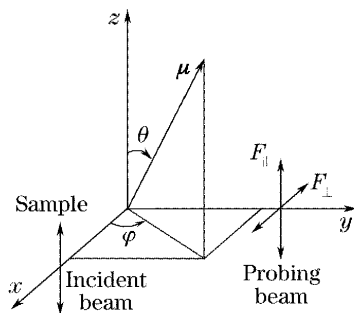


图 4 荧光偏振光谱的 I_{\parallel} 和 I_{\perp} 检测光路
Fig. 4 Light path detecting I_{\parallel} and I_{\perp} in fluorescence polarization spectra

对于随机取向分子的样品被偏振光激发时, 所发射荧光偏振度的最大值只有激发光偏振度 ($P = 1$) 的一半, 实验结果较接近这一理论值。显然, 这种偏振主要是发射荧光团记忆了激发光的偏振信息的结果。

荧光的偏振度 $P = 0.5$, 是当荧光体的分子不发生旋转以及分子间无能量转移的情况下的极限偏振值。当处在激发态的分子受到旋转布朗运动的影响, 改变了受激发时的原有方位时, 它将部分地丧失记忆能力, 表现出去偏振的结果。荧光的偏振度与分子的旋转弛豫时间 τ 成正比^[11]

$$\tau = 3\eta V / (RT), \quad (4)$$

其中 η 为粘度, V 为分子体积, R 为普适常量, T 为绝对温度。若 η, R, T 均为常数, 则分子的旋转弛豫时间与其分子体积成正比, 分子体积越大, 分子的旋转弛豫时间便越长, 因而分子的荧光偏光就越大。当考虑旋转时荧光的偏振度为^[13]

$$P = \frac{3\cos^2 \xi - 1}{\cos^2 \xi + \tau_F / \tau + 3}, \quad (5)$$

其中 ξ 为发射跃迁偶极矩与吸收跃迁偶极矩之间的夹角, τ_F 为观察的荧光衰变时间。显然, 当 $\xi = 0$, $\tau_F \ll \tau$ 时, $P = 0.5$ 。对于所研究的血液生物大分子可估算出 τ 约为几个 ns, 而血液中的主要发光物质血卟啉的荧光衰变时间 τ_F 约在 ps 的数量级, 因此分子因旋转布朗运动所产生的去偏振可以忽略不计。

荧光峰 I 的波长较接近激发光波长, 吸收跃迁与发射跃迁在相同能级间进行的概率较大, 吸收跃迁偶极矩与发射跃迁偶极矩可以近似看作平行, $\xi \rightarrow 0$, ξ 的去偏振效果也就不明显了。荧光峰 II 相对荧光峰 I 远离激发光波长, 不同能级之间的吸收跃迁概率增大, ξ 不再为零, 其去偏振的效果将部分地表现出来, 因此, 我们认为这是造成荧光峰 II 的偏振度小于荧光峰 I 的偏振度的主要原因之一。

血液的吸收光谱与发射光谱在较大范围内是重叠的, 由于血液内存在多种荧光团, 各荧光团之间的能量转移不可避免。能量转移必伴随着偏振度的降低。Demidov 研究了两个发射团均能吸收与发射, 并经能量转移而交换激发的体系, 给出了荧光偏振度的计算公式^[14]:

$$P = \frac{3\cos^2 \xi - 1 + 2A}{\cos^2 \xi + 3 + 4A}, \quad (6)$$

$$A = \frac{\tau_2^{-1} + K_{21} + (\tau_1^{-1} + k_{12})\alpha\gamma}{\alpha k_{21} + \gamma k_{12}}, \quad (7)$$

$$\alpha = \sigma_2(\lambda_{\text{ex}}) / \sigma_1(\lambda_{\text{ex}}), \quad (8)$$

$$\gamma = \phi_2 f_2(\lambda_{\text{fl}}) \tau_1 / \phi_1 f_1(\lambda_{\text{fl}}) \tau_2, \quad (9)$$

其中 τ_i 是孤立发射团的荧光寿命, k_{ij} 是从发射团到 i 的 j 能量转移速率, σ_i 和 f_j 分别是发射团 i 的吸收和荧光光谱, λ_{ex} 和 λ_{fl} 分别是激发和荧光波长, ϕ 是荧光量子产率, ξ 为两发射团偶极矩之间的夹角。当 $\xi = 0, \sigma_2(\lambda_{ex}) = 0, \phi_1 = 0$ 时, 即当第一个发射团只吸收光, 第二个发射团只发射光时, $A = 0$, 荧光偏振度 $P = 0.5$ 。只要不是这样, 当两发射团有能量转移时必导致荧光偏振度的减小, 实验就属于这种情况, 即发射荧光峰 II 的荧光团部分的吸收了荧光峰 I 的荧光, 形成激发再发射(也有可能出现无辐射的能

量转移), 由于荧光峰 I 的荧光的偏振度已降到 0.5 以下, 由它所激发的二次荧光其偏振度会更小, 这是造成荧光 II 的偏振度小于荧光峰 I 的偏振度的另一重要原因。

3.3 血液荧光偏振光谱的偏振度随其浓度的变化

表 1 给出了不同浓度的血液荧光偏振光谱的荧光峰 I 和荧光峰 II 的偏振度的实验值, 同时给出了同一浓度下荧光峰 II 的偏振度与荧光的偏振度之比。

表 1 不同浓度的血液荧光偏振光谱的荧光峰 I 和荧光峰 II 的偏振度

Table 1 Polarization degree of fluorescence emission peak I and II from whole blood with different concentrations

Concentration	1.0%	1.3%	1.6%	2.0%	3.0%	4.0%	8.0%
Polarization degree P_I	0.4796	0.4731	0.3748	0.3006	0.2718	0.2492	0.2064
Polarization degree P_{II}	0.4344	0.4023	0.2528	0.1398	0.1016	0.0726	0.0538
P_{II}/P_I	0.9058	0.8503	0.6744	0.4651	0.3739	0.2914	0.2607

从表中可以看出, 荧光的偏振度随血液浓度的增加而减小, 在相同浓度下荧光峰 II 的偏振度总是小于荧光峰 I 的偏振度。并且, 荧光峰 II 的偏振度与荧光峰 I 的偏振度之比 P_{II}/P_I 随血液浓度的增加而减小, 也就是说荧光峰 II 的偏振度比荧光峰 I 的偏振度随浓度的增加衰减得更快。

对于荧光的偏振度随血液浓度的增加而减小的主要原因, 可以从荧光团之间发生能量转移的概率大小给予解释。由于血液的吸收光谱和发射光谱有较大的重叠, 将发生能量转移^[15], 有一部分的荧光会被同一种物质的基态分子所吸收。这是一种能量由激发态分子转移到同一种物质的基态分子的能量转移过程。由于在偏振光的激发下, 荧光体所发射的荧光是偏振光^[16], 吸收跃迁偶极矩与发射跃迁偶极矩很难保证完全平行, 因此这一过程必伴随着所发射荧光的偏振度的降低。又因为这种能量转移的概率除了与吸收光谱和发射光谱的重叠程度有关外, 还与给体-受体的距离以及受体的吸收系数有关^[14]。随着血液浓度的增加, 必伴随着给体-受体的距离减小、自吸收现象的加剧^[12], 这样就增大了能量转移的概率, 使得荧光偏振度的进一步降低, 从而导致了荧光的偏振度随血液浓度的增加而减小。

结合图 2 中荧光偏振光谱强度随浓度的变化规律发现, 尽管两荧光的偏振度均随浓度增加而减小, 但它们的荧光强度随浓度的变化却有很大不同。荧光峰 I 的强度随浓度增加而单调减小, 荧光峰 II 的强度却随浓度增加出现先增加然后再减小的现象。可见, 两荧光峰偏振度减小的微观机理还有所差异。

对于荧光峰 I 来讲, 由于血液的吸收光谱和发射光谱有较大的重叠, 因此将发生能量转移现象。随着血液浓度的增加, 自吸收现象的加剧, 荧光峰 I 中部分地吸收偏振度较低的荧光而再发射的二次荧光比例加大, 其偏振度随浓度增加而减小。由于荧光效率通常小于 1, 基态分子吸收荧光后不可能百分之百地再发射, 所以自吸收的结果使荧光峰 I 的强度随浓度增加而单调减小。

对于荧光峰 II 来讲, 由于其荧光团的发射能级小于荧光峰 I 的荧光团的发射能级, 荧光团 II 会作为受体接受来自于荧光团 I 供体的能量, 出现共振能量转移。当浓度较低时, 两荧光团之间的分子间距离 r 大于临界转移距离 R_0 ^[14], 由于在 R_0 的距离下, 从供体到受体的能量转移概率, 等于供体的衰变概率, 在 $r > R_0$ 时, 共振能量转移效率很低, 去偏振能力较差, 荧光有较大的偏振度。这时的荧光峰 II 主要是靠荧光团直接吸收激励光而产生的, 效率也很低, 因此荧光强度较弱。随着血液浓度的增加, 两种荧光团之间的分子距离在减小, 共振能量转移效率提高, 特别是当 $r < R_0$ 时, 荧光团 II 的能量大部分来自于荧光峰 I 发射的荧光, 导致荧光峰 II 偏振度减小, 荧光强度增大, 荧光峰 I 的强度减小。随着血液浓度的进一步增加, 荧光峰 I 的荧光几乎被荧光团 II 全部吸收, 其强度几乎为零, 荧光峰 II 的强度达到最大。血液浓度再增加, 荧光团 II 来自于荧光峰 I 发射的荧光达到吸收饱和, 荧光峰 II 的强度不再增大。与此同时, 荧光峰 II 的自吸收机理开始出现, 导致进一步的去偏振以及降低荧光强度。

参 考 文 献

- 1 Markolf H. Niemz. *Laser-Tissue Interactions Fundamentals and Applications* [M]. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1996. 50~81
- 2 Semion Rochkind, Moshe Nissan, Malvina Alon *et al.*. Effects of laser irradiation on the spinal cord for the regeneration of crushed peripheral nerve in rats[J]. *Lasers in Surgery Medicine*, 2001, **28**(3): 216~219
- 3 Lan Xiufeng, Liu Xiaoran, Wang Yawei *et al.*. Physical analysis of intravascular low-reaction-level laser irradiation decreasing the aggregate of erythrocyte[J]. *Chin. J. Lasers*, 2000, **27**(5): 477~480 (in Chinese)
兰秀凤, 刘晓然, 王亚伟 等. 弱激光血管内照射改善红细胞聚集能力的物理机理研究[J]. 中国激光, 2000, **27**(5): 477~480
- 4 D. Rohleder, G. Kocherscheidt, K. Gerber *et al.*. Comparison of mid-infrared and Raman spectroscopy in the quantitative analysis of serum[J]. *J. Biomedical Optics*, 2005, **10**(3): 1~10
- 5 Robert R. Alfano, Darayash B. Tata, Julius Cordero *et al.*. Laser induced fluorescence spectroscopy from native cancerous and normal tissue [J]. *IEEE J. Quant. Electron.*, 1984, **20**(12): 1507~1511
- 6 Chen Xiaodong, Yu Daoyin, Xie Hongbo *et al.*. Reconstruction of tissue autofluorescence spectra by Monte-Carlo modeling[J]. *Acta Optica Sinica*, 2003, **23**(5): 612~615 (in Chinese)
陈晓冬, 郁道银, 谢洪波 等. 蒙特卡罗模拟重建组织的自体荧光光谱[J]. 光学学报, 2003, **23**(5): 612~615
- 7 Wang Wei, Sun Yue, Zhou Naikang *et al.*. Laser-induced autofluorescence spectroscopy of normal lung, normal bronchus and lung cancer[J]. *Chin. J. Laser Med. Surg.*, 2000, **9**(3): 137~140 (in Chinese)
王伟, 孙玉鹗, 周乃康 等. 正常肺、支气管组织与肺癌组织激光诱发自体荧光光谱[J]. 中国激光医学杂志, 2000, **9**(3): 137~140
- 8 Sonoto Ijichi, Takashi Kusaka, Kenich Isobe *et al.*. Quantification of cerebral hemoglobin as a function of oxygenation using near-infrared time-resolved spectroscopy in a piglet model of hypoxia[J]. *J. Biomedical Optics*, 2005, **10**(2): 1~9
- 9 Jan Laufer, Clare Elwell, Dave Delpy *et al.*. In vitro measurements of absolute blood oxygen saturation using pulsed near-infrared photoacoustic spectroscopy: accuracy and resolution [J]. *Physics in Medicine and Biology*, 2005, **50**(18): 4409~4428
- 10 Yasuo Takahashll, Niklas Bark, Masataka Kinj *et al.*. Fluorescence correlation spectroscopy (FCS) analysis of human red blood cell system[J]. *Opt. Rev.*, 2003, **10**(6): 596~599
- 11 Song Lexin, Ke Xiaokang, Guo Zijian. Study on inclusion behavior of labeling CD dimers with a fluorescence tracer to small peptide derivatives[J]. *Acta Chimica Sinica*, 2002, **60**(8): 1419~1427 (in Chinese)
宋乐新, 柯晓康, 郭子建. 荧光标识的环糊精二聚体与小肽衍生物之间的包合行为研究 [J]. 化学学报, 2002, **60**(8): 1419~1427
- 12 Peng Changde, Gao Shumei, Liu Ying *et al.*. Investigation of LED-induced fluorescent spectra from human blood solution[J]. *Applied Laser*, 2003, (4): 232~235 (in Chinese)
彭长德, 高淑梅, 刘莹 等. LED诱导人血液荧光光谱研究[J]. 应用激光, 2003, (4): 232~235
- 13 Li Qingguo, Wang Hemu, Li Anzhi *et al.*. *Numerator Biophysics* [M]. Beijing: Higher Education Press, 1992. 396~403 (in Chinese)
李庆国, 汪和睦, 李安之 等. 分子生物物理学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1992. 396~403
- 14 Pan Gongmei, Tong Zhenhe, Zhang Jiancheng *et al.*. *The Fundamental on Photochemistry and Photon Material Science* [M]. Beijing: Science Press, 2001. 46~49 (in Chinese)
樊美公, 佟振合, 张建成 等. 光化学基本原理与光子学材料科学 [M]. 北京: 科学出版社, 2001. 46~49
- 15 Yang Haihu, Yu Dingshan, Li Xiaofu *et al.*. Spectroscopic studies of colloidal TiO₂ and its self-assembled composite films [J]. *Acta Optica Sinica*, 2005, **25**(10): 1425~1428 (in Chinese)
余海湖, 余丁山, 李小甫 等. 二氧化钛胶体及其自组装薄膜的光谱分析[J]. 光学学报, 2005, **25**(10): 1425~1428
- 16 Li Haitao, Wang Meiling, Zhang Youyu *et al.*. Aggregation behavior of chitosan in dilute aqueous solution [J]. *Chin. J. Applied Chemistry*, 2004, **21**(2): 159~163 (in Chinese)
李海涛, 王美玲, 张友玉 等. 壳聚糖在稀溶液中的聚集行为 [J]. 应用化学, 2004, **21**(2): 159~163