用时间分辨光谱研究红细胞悬液的荧光发射

韩彩芹^{1,2} 段培同¹ 刘 莹¹ 骆晓森² 倪晓武² (¹ 徐州师范大学物理与电子工程学院,江苏 徐州 221116 ² 南京理工大学理学院,江苏 南京 210094

实验获得了激光照射红细胞悬液的荧光光谱,并分别监测不同荧光峰值波长处强度随时间的衰变过程,测 摘要 试了其相应的荧光寿命。结果表明,在波长为 407 nm 的激光照射下,红细胞悬液向外发射中心波长分别位于 596, 628,692 nm的荧光光谱,各荧光峰对应衰变过程的平均荧光寿命分别为1.97,13.31,14.58 ns。利用荧光强度和 吸收率的加和性表示了混合物的总吸收率和总荧光发射强度,通过理论计算获得了红细胞悬液中锌卟啉、原卟啉 和其他游离物参与荧光发射的相对含量和相对强度在不同荧光峰位的变化关系,进一步解释了不同峰位处荧光发 射强度和平均荧光寿命的变化原因。

关键词 医用光学;荧光光谱;荧光寿命;相对荧光强度;红细胞悬液 文献标识码 A doi: 10.3788/AOS201232.0430005 **中图分类**号 O433.4

Fluorescent Emission of Ervthrocyte Suspension with Time-Resolved Fluorescence Spectrometer

Han Caigin^{1,2} Duan Peitong¹ Liu Ying¹ Luo Xiaosen² Ni Xiaowu ²

¹ School of Physics and Electronic Engineering, Xuzhou Normal University, Xuzhou, Jiangsu 221116, China S ² School of Science, Nanjing University of Science and Technology, Nanjing, Jiangsu 210094, China

Abstract The fluorescence spectrum of erythrocyte suspension irradiated by laser is studied experimentally. The decay processes of fluorescence intensity are monitored at the emission band with different fluorescence peaks. The results show that when erythrocyte suspension is irradiated by laser with wavelength of 407 nm, there are three fluorescence peaks locate at 596, 628 and 692 nm, respectively. The average fluorescence lifetimes of each decay process in turn are 1.97, 13.31 and 14.58 ns. The total absorptivity and total fluorescence counts are expressed based on the theory of additive property of absorptivity and fluorescence intensity. By theoretical analysis, the variations of relative concentration and relative fluorescence intensity at different peak have been obtained in erythrocyte suspension, which are protoporphyrin, zinc protoporphyrin and other free substances. The change of fluorescence intensity and average lifetime in different fluorescence peaks are illuminated.

Key words medical optics; fluorescence spectrum; fluorescence lifetime; relative fluorescence intensity; erythrocyte suspension

OCIS codes 300.6500; 260.2510; 300.6360; 300.6170

引 1 言

近年来,随着低强度激光血管内照射疗法和自 体荧光光谱诊断技术在国内外医院的开展,激光与 血液相互作用的研究已成为国内外学术界关注的热 点问题之一[1~5]。荧光光谱技术是分析物质成分和 分子结构的有力工具,荧光光谱不仅能反映出发光 分子的化学结构及电子的能量状态,而且能反映出 发光分子与周围分子相互作用的信息,由于具有极

收稿日期: 2011-11-15; 收到修改稿日期: 2011-12-06

基金项目:国家自然科学基金(61108013)和江苏省自然科学基金(BK2010173)资助课题。

作者简介: 韩彩芹(1972一),女,博士研究生,副教授,主要从事光与生物相互作用方面的研究。

E-mail: hancqin@163.com

导师简介:倪晓武(1955—),男,教授,博士生导师,主要从事激光物理和光生物物理与应用等方面的研究。 E-mail: nxw@mail.njust.edu.cn(通信联系人)

高的灵敏度以及无损、安全和实时等优点而成为光 生物医学的主要研究领域之一^[6~10]。

自 20 世纪 80 年代开始,生物组织荧光分析技 术发展很快,特别是激光诱导荧光法在临床诊断上 的应用一直受到人们的关注[11~14],荧光光谱分析在 血液光谱、肿瘤诊断和皮肤等生物组织中的应用与 研究报道较多[15~18]。血液的荧光光谱则可以部分 地反映血液分子吸收光子能量以后所发生的能量转 移情况,分析研究这些谱线的结构,有助于进一步理 解激光与血液的相互作用机理。本文通过实验获得 红细胞悬液的稳态荧光光谱和时间衰变过程曲线, 并采用指数拟合方法进行解卷积处理,测试了不同 荧光团在 596,628,692 nm 荧光峰处的荧光寿命。 利用荧光强度和吸收率的加和性分析混合物的总吸 收率和总荧光光子数目,计算不同峰位对应整个衰 变过程的平均荧光寿命,并通过对比锌卟啉和原卟 啉进行荧光发射的相对百分含量和相对荧光强度, 对红细胞悬液荧光发射的结构特性进行了解释。

2 实验仪器和方法

2.1 实验样品制备

血液样品取自健康小白鼠,经眼眶采血后,加入 质量分数为5%的肝素1mL抗凝获得全血溶液。 用台式离心机分离血细胞,经3000r/min的转速分 离10min,去除上清液和部分白细胞,上述过程重 复3次,获取红细胞。再加入适量生理盐水,配制成 质量分数为3%的红细胞悬液。

2.2 实验器材和方法

实验中采用英国 Edinburgh Instrument Inc 生产的 FSL920 型稳态和瞬态荧光光谱仪,其扫描波 长在 200~900 nm 范围内连续可调。激发光光源 为半导体激光器,其功率为 5 mW,波长为 407 nm, 脉宽为 1.0~1.6 ns。

稳态光谱测量时,选取发射光的狭缝波带宽度为5 nm,波长范围为560~800 nm,光谱的扫描间 隔为1 nm,每一波长处的积分时间为0.2 s。荧光 寿命测量采用时间相关单光子计数方法,重复频率 为40 kHz,在荧光峰值波长 596,628,692 nm 处进 行监测,累积计数 1000 次左右。

实验检测时将盛有 3 mL 红细胞悬液的石英比 色皿置于样品池中,所有检测均在 22 ℃左右的室温 下进行,每一样品均进行三次扫描测试,每次检测前 摇均,以保证红细胞悬液浓度的相对准确性。

3 实验结果与分析

3.1 用 407 nm 的激光照射红细胞悬液的稳态荧 光光谱

图 1 为实验获得的 407 nm 激光照射红细胞悬 液的稳态荧光光谱,扫描范围为 560~800 nm。可 以看出,该谱线中有 3 个荧光峰,其对应波长分别为 596,628,692 nm,其中 628 nm 处为一谱带较窄的 荧光峰,其荧光强度最大,692 nm 附近为一较宽谱 带的荧光峰,而 596 nm 对应荧光峰的峰值强度最 弱。





人和哺乳动物血液中通常都存在微量光敏性物质,这些光敏性物质主要是游离性的卟啉^[19,20]。卟啉类光敏性物质通常具有在 600~700 nm 波长范围内发射荧光的特征,其中原卟啉在 630 nm 处有一最大荧光发射峰,其次为 690 nm^[21];而锌卟啉的最大荧光发射峰位于 594 nm,其次为 630 nm,此外锌卟啉在波长为 690 nm 处也有微弱的荧光^[22]。因此,在实验获得的红细胞悬液荧光光谱中,596 nm 的荧光峰主要由锌卟啉发射,而 628 nm 和 692 nm 处的荧光峰则主要是锌卟啉和原卟啉共同发射而成。

3.2 红细胞悬液的时间分辨荧光光谱

为了详细研究红细胞悬液发射荧光的结构特 点,对其发射荧光光子的荧光寿命进行了研究,图 2 为 407 nm 的激光照射下,596,628,692 nm 荧光光 子的数目随时间衰变的过程及数据拟合曲线。探测 荧光光子的寿命时,若发光物质由两种以上组成,则 整个曲线含有多个部分,将曲线分成不同的部分再 分别进行拟合成不同的直线,根据不同直线的条数 和斜率就可以计算出发射荧光的物质种类和各自不 同的荧光寿命。从图 2 中可以看出,荧光强度随时



图 2 不同荧光峰处检测的荧光光子强度随时间的实际 衰变过程曲线

Fig. 2 Fluorescent photon intensity decay process versus time at different fluorescence peaks

间的实际衰变过程呈对数曲线发生弯曲而不是一条 直线,说明红细胞悬液中发射荧光光子的物质不止 一种。将获得的荧光衰减动力学曲线去除背景带来 的干扰,采用指数方法拟合并分别进行解卷积处理, 最终得到各荧光光子的寿命。其拟合式为

$$\begin{cases} R_{596 \text{ nm}}(t) = 19.18 \pm 0.71 \exp(-t/4.21) \pm \\ 6.88 \exp(-t/0.99) \\ R_{628 \text{ nm}}(t) = 8.78 \pm 4.73 \exp(-t/15.78) \pm \\ 4.22 \exp(-t/4.52) \pm 1.03 \exp(-t/1.21) \\ R_{692 \text{ nm}}(t) = 17.40 \pm 6.19 \exp(-t/15.48) \pm \\ 3.03 \exp(-t/4.19) \end{cases}$$

(1)

式中 596 nm 荧光峰对应 2 个寿命值分别为 4.21 ns 和 0.99 ns,其中 4.21 ns 为锌卟啉的荧光寿命, 0.99 nm为其它游离物的荧光寿命;主峰位 628 nm 处对应有 3 个荧光寿命,大小为 15.76,4.52, 1.21 ns,分别对应了原卟啉、锌卟啉和其它游离物的荧光寿命;峰值为 692 nm 的荧光峰位相应有 2 个荧光寿命,分别为 15.48 ns 和 4.19 ns,与原卟啉和 锌卟啉的荧光寿命相对应。

4 讨 论

当用波长为 407 nm 的激光照射时,在 596,628, 694 nm 处产生了 3 个荧光峰。根据吸光度的加和 性^[6],若用 ε_{i,λi}表示不同的荧光峰处各荧光团分子吸 收 407 nm 入射光的吸收强度,c_i 为各参与发光组分 的浓度,b 为液池的长度,则当入射光照射红细胞悬液 时,溶液中不同发射峰对应荧光团的总吸光度为

$$\begin{pmatrix} A_{\lambda_1} \\ A_{\lambda_2} \\ A_{\lambda_3} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \varepsilon_{1,\lambda_1} & \varepsilon_{2,\lambda_1} & \varepsilon_{3,\lambda_1} \\ \varepsilon_{1,\lambda_2} & \varepsilon_{2,\lambda_2} & \varepsilon_{3,\lambda_2} \\ \varepsilon_{1,\lambda_3} & \varepsilon_{2,\lambda_3} & \varepsilon_{3,\lambda_3} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} bc_1 \\ bc_2 \\ bc_3 \end{pmatrix},$$
(2)

式中 A_{λ_1} , A_{λ_2} , A_{λ_3} 分别表示红细胞悬液对发射峰位 于 $\lambda_1 = 596 \text{ nm}$, $\lambda_2 = 628 \text{ nm}$ 和 $\lambda_3 = 694 \text{ nm}$ 的荧光 团的总吸光度。

根据实验结果可得: $\epsilon_{2,\lambda_1} = 0$, $\epsilon_{3,\lambda_3} = 0$ 。因而(2) 式为

$$\begin{pmatrix} A_{\lambda_1} \\ A_{\lambda_2} \\ A_{\lambda_3} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \varepsilon_{1,\lambda_1} & 0 & \varepsilon_{3,\lambda_1} \\ \varepsilon_{1,\lambda_2} & \varepsilon_{2,\lambda_2} & \varepsilon_{3,\lambda_2} \\ \varepsilon_{1,\lambda_3} & \varepsilon_{2,\lambda_3} & 0 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} bc_1 \\ bc_2 \\ bc_3 \end{pmatrix}.$$
(3)

对于溶液型发光物质的荧光强度 F,除了和物质的荧光量子产率 Y_F 有关外,还和浓度 c 以及物质的摩尔吸光系数 ε 有关^[6]:

$$F = 2.3Y_F I_0 \varepsilon b c , \qquad (4)$$

式中 I_0 为入射光强度。利用荧光强度的加和性^[6], 若用 $Y_{F_{\lambda_2}}^1$, $Y_{F_{\lambda_2}}^2$ 和 $Y_{F_{\lambda_2}}^3$ 分别表示锌卟啉、原卟啉和 其它游离物吸收波长为 407 nm 的入射光而发射荧 光波长为 628 nm 的荧光量子产率,则产生波长为 628 nm 荧光光子的强度为

$$F_{628 \text{ nm}} = 2.3Y_{F_{\lambda_2}}^1 I_0 \varepsilon_{1\lambda_2} bc_1 + 2.3Y_{F_{\lambda_2}}^2 I_0 \varepsilon_{2\lambda_2} bc_2 + 2.3Y_{F_{\lambda_2}}^3 I_0 \varepsilon_{3\lambda_2} bc_3.$$
(5)

同样,根据锌卟啉、原卟啉和其它游离物产生荧 光光子的特点,也可以得到产生波长为 596 nm 和 692 nm 荧光光子的强度。

如果发射荧光光子的物质不止一种且混合在一起,每种物质均有可能吸收入射光能量并发射荧光 光子,利用单光子计数法并结合仪器软件分析混合 物中各发射荧光物质的相对含量,荧光强度的百分 比等信息,其计算式为

$$c_{i} = B_{i} / \sum_{i=1}^{3} B_{i}, \quad \phi_{i} = B_{i} \tau_{i} / \sum_{i=1}^{3} B_{i} \tau_{i},$$
$$\langle \tau \rangle = \sum_{i=1}^{3} B_{i} \tau_{i}^{2} / \sum_{i=1}^{3} B_{i} \tau_{i}, \qquad (6)$$

式中 c_1 , c_2 , c_3 为红细胞悬液中锌卟啉、原卟啉和其 它游离物的质量分数, B_1 , B_2 , B_3 为各组分在数据 拟合中对应的前置因子, ϕ_1 , ϕ_2 , ϕ_3 为锌卟啉、原卟 啉和其它游离物所发射荧光光子数(强度)占总荧 光光子数目(总强度)的百分比, $\langle \tau \rangle$ 为整个衰变过 程的平均衰变时间,即混合溶液的平均荧光寿命, τ_1 , τ_2 , τ_3 分别为锌卟啉、原卟啉和其他游离物的荧 光寿命。

通过以上公式可以将红细胞悬液中含有的锌卟 啉和原卟啉参与发射荧光的质量分数、荧光强度占 总发射强度的百分比以及总衰变过程的荧光寿命计 算得出。对于主荧光峰位 628 nm 处的荧光发射, 原卟啉、锌卟啉和其它游离物参与荧光发射的质量 分数分别为: $c_1 = 42.27\%$, $c_2 = 47.40\%$, $c_3 = 10.33\%$ 。各荧光强度占总强度的相对百分比分别 为: $\phi_1 = 20.10\%$, $\phi_2 = 78.58\%$, $\phi_3 = 1.27\%$ 。整个 衰变过程的平均荧光寿命为: $\langle \tau \rangle_{628 nm} = 13.31$ ns。通 过计算结果可以看出,原卟啉参与荧光发射的相对含 量和锌卟啉基本相同,但相对荧光强度约为锌卟啉的 4 倍,可见在 628 nm 峰值处原卟啉的量子产率明显 高于锌卟啉。此时对应的电子跃迁能级间隔约为 1.08 eV。

同理,596 nm 峰位处,该衰变过程的平均荧光 寿命为 $\langle \tau \rangle_{598 nm} = 1.97$ ns,对应的电子跃迁能级间 隔约为 0.97 eV。锌卟啉和其他游离物参与荧光发 射的质量分数分别为 90.68%和 9.32%,对应的相 对荧光强度分别为 69.59%和 30.41%,此时锌卟啉 为主要的荧光发射团,但其他游离物也在该峰位荧 光发射处做出了一定的贡献。而在 692 nm 峰位 处,此衰变过程的平均荧光寿命为 $\langle \tau \rangle_{692 nm} =$ 14.58 ns,对应的电子跃迁能级间隔约为 1.26 eV。 原卟啉的质量分数为 75.67%,其相对荧光强度为 91.99%;锌卟啉的质量分数为 24.33%,相对荧光 强度为 8.01%。原卟啉的相对浓度为锌卟啉的 3 倍,而相对荧光强度却为锌卟啉的十几倍,其量子产 率较高,进一步说明此峰位的荧光发射主要来源于 原卟啉。

由计算结果可知,在一定浓度的红细胞悬液中, 原卟啉、锌卟啉和其他游离物的含量固定不变,但在 激发光照射下,由于各发光组分对荧光发射波长的 变化较为敏感,其参与荧光发射的相对百分比在不 同荧光峰位处有所不同,因而引起各组分的荧光强 度占总强度的相对含量发生了变化,并导致了总荧 光发射强度和平均荧光寿命在不同峰位处的改变。

5 结 论

实验检测了红细胞悬液在激光照射下的稳态和 瞬态荧光光谱,获得了相应的荧光寿命,并理论计算 了红细胞悬液中锌卟啉和原卟啉发射荧光的质量分 数和相对荧光强度。在波长为 407 nm 激光照射 下,溶液向外发射中心波长分别位于 596,628,692 nm的荧光光谱,各荧光峰对应的整个衰变过程的 平均荧光寿命分别约为 1.97,13.31,14.58 ns。对 于主荧光峰位 628 nm 处, 原卟啉参与荧光发射的 相对含量和锌卟啉基本相同,但相对荧光强度约为 锌卟啉的 4 倍。596 nm 峰位处,锌卟啉作为主要的 荧光发射团,其对应的相对荧光强度约占总强度的 2/3。而在 692 nm 峰位处,原卟啉的相对浓度为锌 卟啉的3倍,而相对荧光强度却为锌卟啉的11倍。 锌卟啉和原卟啉在不同峰位处发射荧光相对含量的 差异,可为进一步研光与血液的相互作用提供理论 依据,并对临床上健康和异常生命体特征识别具有 参考价值。

参考文献

- 1 J. Haapaniemi, A. Schrey, E. Laurikainen. The effect of promontorial bone on laser light transmission in measuring capillary blood flow in vivo [J]. *Eur. Arch Otorhinolaryngol.*, 2001, 258(5): 209~212
- 2 J. V. Kruchenok, S. B. Bushuk, G. I. Kurilo *et al.*. Orientation of red blood cells and rouleaux disaggregation in interference laser fields [J]. J. Biol. Phys., 2005, **31**(1): 73~85
- 3 O. G. Bondarenko, G. K. Popov. Effect of low-intensity laser radiation on peripheral blood eosinophils [J]. Bulletin of Experimental Biology and Medicine, 2004, **138**(5); 510~512
- 4 Pan Zhenhua, Li Yingxin, Wang Xing *et al.*. Effects of low-level laser therapy on cutaneous wound healings with three doses [J]. *Chinese J. Lasers*, 2010, **37**(2): 599~604
 潘振华,李迎新,王 兴等.3 种剂量弱激光对大鼠皮肤创伤愈合的影响[J]. 中国激光, 2010, **37**(2): 599~604
- 5 Yao Baofu, Zhou Huijun. Effect of semiconductor laser extravascular irradiation on blood biochemical parameters [J]. *Chinese J. General Practice*, 2011, 9(5): 740~741 姚保富,周惠君. 半导体激光血管外照射对血液生化指标的影响 [J]. 中华全科医学, 2011, 9(5): 740~741
- 6 Xu Jingou, Wang Zunben. Method of Fluorescence Analysis (3rd Edition) [M]. Beijing: Science Press, 2006. 162~167 许金钩,王尊本. 荧光分析法(第三版) [M]. 北京:科学出版社, 2006. 162~167
- 7 Cheng Cheng, Lin Yanguo, Yan Jinhua. Red shift of photoluminescence spectrum of CdSe/ZnS-quantum-dot dpoed fiber [J]. *Acta Optica Sinica*, 2011, **31**(4): 0406002

程 成,林彦国,严金华. CdSe/ZnS量子点光纤光致荧光光谱的红移[J]. 光学学报, 2011, **31**(4): 0406002

- 8 Han Caiqin, Liu Ying, Yang Yang *et al.*. Study on fluorescence spectra of molecular association of acetic acid-water [J]. *Chin. Opt. Lett.*, 2009, 7(4): 357~360
- 9 Wu Hao, Zhu Tuo, Kong Yan *et al.*. Study on the absorption and fluorescence spectra of lactobacillus plant arum [J]. *Acta Optica Sinica*, 2010, **30**(1): 262~266 武浩,朱 拓,孔 艳等. 植物乳杆菌的吸收和荧光光谱研究

武 后, 禾 拍, 孔 把 等. 植物乳杆菌的吸收和灾元元谱研究 [J]. 光学学报, 2010, **30**(1): 262~266

- 10 Han Caiqin, Liu Ying, Zhao Wenyan *et al.*. Experimental research on fluorescence spectra of melamine solution [J]. *Acta Optica Sinica*, 2009, **29**(11): 3163~3167 韩彩芹,刘 莹,赵文艳等. 三聚氰胺溶液的荧光光谱实验研究
- [J]. 光学学报, 2009, 29(11): 3163~3167
 11 Zhihua Lü, Yan Sun, Yuanhong Wang et al.. Ultrasensitive capillary eectrophoresis of oligoguluronates with laser-Induced
- fluorescence detection [J]. Chromatographia, 2005, 61 (6): 615~618
- 12 L. S. Jr., J. B. Filho, F. L. Silveira *et al.*. Laser-induced fluorescence at 488 nm excitation for detecting benign and malignant lesions in stomach mucosa [J]. *J. Fluorescence*, 2008, 18(1): 35~40
- 13 V. M. Fomin, A. M. Karas' kov, P. M. Larionov *et al.*. Determination of myocardium viability on the basis of the spectra of laser-induced fluorescence [J]. *Doklady Biol. Sci.*, 2003, **391**(1-6): 296~298
- 14 R. Hage, P. R. Galhanone, R. A. Zangaro *et al.*. Using the laser-induced fluorescence spectroscopy in the differentiation between normal and neoplastic human breast tissue [J]. *Lasers Med. Sci.*, 2003, **18**(3): 171~176

- 15 Pramod V. Butte, Adam N. Mamelak, Miriam Nuno et al.. Fluorescence lifetime spectroscopy for guided therapy of brain tumors [J]. NeuroImage, 2011, 54(suppl.): S125~S135
- 16 Fei Ding, Guangyu Zhao, Jinli Huang et al.. Fluorescence spectroscopic investigation of the interaction between chloramphenicol and lysozyme [J]. Eur. J. Medicinal Chem., 2009, 44(10): 4083~4089
- 17 M. S. Roberts, Y. Dancik, T. W. Prow *et al.*. Non-invasive imaging of skin physiology and percutaneous penetration using fluorescence spectral and lifetime imaging with multiphoton and confocal microscopy [J]. *Eur. J. Pharm. and Biopharm.*, 2011, 77(3): 469~488
- 18 T. Ando, E. Kobayashi, H. Liao *et al.*. Precise comparison of protoporphyrin IX fluorescence spectra with pathological results for brain tumor tissue identification [J]. *Brain Tumor Pathol.*, 2011, 28(1): 43~51

19 Cheng Jiji. Optics Biophysics [M]. Beijing: Higher Education Press, 1987.238

程极济. 光生物物理学[M]. 北京:高等教育出版社, 1987. 238 20 Zhu Zhongyong. Practical Medicine Examination Course (1st

Edition) [M]. Beijing: People's Military Medical Press, 1992. 84~86

朱忠勇. 实用医学检验学(第一版)[M]. 北京:人民军医出版社, 1992. 84~86

- 21 M. B. Ericson, S. Grapengiesser, F. Gudmundson *et al.*. A spectroscopic study of the photobleaching of protoporphyrin IX in solution [J]. *Lasers Med. Sci.*, 2003, **18**(1): 56~62
- 22 R. Benedini, V. Raja, G. Parolari. Zinc-protoporphyrin IX promoting activity in pork muscle [J]. LWT-Food Sci. & Technol., 2008, 41(7): 1160~1166

栏目编辑:韩 峰