

# 利用条纹相机研究皮秒时间 分辨荧光光谱

刘国军 贾欣志 荆宝全

**摘要:** 本文介绍以皮秒条纹相机为主要观测仪器,以主动锁模 $\text{Ar}^+$ 激光为激发源,测量物质时间分辨荧光光谱的方法。讨论了实验中信号的有效收集等问题,分析了各实验环节的测量误差来源及误差大小,最后给出实验结果,并同已往发表的典型结果比较,证明这种方法是准确、可行的。

## 一、引言

荧光是指分子从受激态通过自发辐射跃迁到较低能级的过程。分子被激发到高能态后以各种弛豫途径返回较低能级,如自发辐射、受激辐射、内转换、系间交叉等过程,高能级粒子数的变化取决于这些过程速率的大小。因此测量荧光衰变的时间过程有助于了解和分析各种弛豫机制。

由于很多物理学、化学、生物学及医学方面的发光过程发生在纳秒、亚纳秒甚至皮秒时间内<sup>[1]</sup>,因此准确地测量这些超快过程的时间行为能得到有关这些过程机制的极其丰富的信息,对推动物理学和化学的发展,对了解生命过程,对生物工程学的发展等具有重要意义。

荧光时间分辨光谱测量方面的文章很多,随着探测技术的发展,所能研究的对象日益增加,能测寿命短至几ps,能研究各种状态的样品,也可研究微量物质的样品。因此这方面工作早已成为超快时间领域的重要工作。

时间分辨荧光光谱测量的基本原理大多是基于所谓激发——探测技术,但具体的激发和探测的方式是多种多样的,最主要的区别是探测技术和数据处理方法的不同。

早期 R. G. Bennett 等人用闪光氩灯和加快门的光电倍增管及示波器测量了一些荧光物质的时间分辨荧光光谱,精度为100ps<sup>[2]</sup>;文献<sup>[4]</sup>报导了用窄激光脉冲和较慢响应的仪器(上升时间为2ns的倍增管)测量纳秒或亚纳秒量级的寿命,所获得的时间分辨率为130ps。

在皮秒时间范围内,荧光衰变测量可采用以下几种方法:1. 时间相关单光子计数法,2. 光学选通法,3. 条纹相机法。这三种测量方法的特点汇于表1以便比较并选用合适的方法。

由表看出,条纹相机是目前时间分辨率最高的实时测量仪器,它可给出所测脉冲的形状。与其它方法相比,其优点在于:1. 时间分辨率高,目前可买到的商品条纹相机的最高时间分辨率为2ps;2. 可使实验装置集成化,探测和处理同时进行,调节方便,准确度高;3. 可同时测量空间、时间及强度三维信息。其主要缺点是总灵敏度不高,且价格昂贵。

表1<sup>[16]</sup> 皮秒时间衰变荧光测量法比较

| 特性参数               | 条纹照相机法       | 时间相关单光子计数法        |                   | 光学选通法             |
|--------------------|--------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 激发光源               | 锁模固体激光       | 锁模倒空离子激光          | 同步抽运染料激光          | 同步抽运染料激光          |
| 被测荧光波长             | 紫外~可见        | 紫外~可见             | 紫外~可见             | 650nm~            |
| 激光波长范围             | 分立紫外线, 可见单谱线 | 分立紫外<br>可见单谱线     | 紫外~可见             | 可见光宽带             |
| 工作方式               | 单脉冲激发        | 重复脉冲激发            | 重复脉冲激发            | 重复脉冲激发            |
| 时间分辨率<br>(单一指数衰变时) | >2ps         | >200ps            | >50ps             | >5ps              |
| 测量的持续时间            | 10ns         | 1μs               | 1μs               | 1ns               |
| 测量强度范围             | 10~15        | 40~60             | 40~60             | 30~40             |
| 总灵敏度               | 低            | 高                 | 高                 | 高                 |
| 被测样品量子效率 $\phi_f$  | >0.1         | >10 <sup>-4</sup> | >10 <sup>-4</sup> | >10 <sup>-2</sup> |
| 其它                 |              |                   |                   |                   |

已有许多人把条纹相机用于测量物质的荧光寿命。Michael, A. J. Rodgers 等测量了 *erythrosin B* 的荧光寿命为 81ps (溶于水) 和 420ps (溶于 CH<sub>3</sub>OH)<sup>[5]</sup>; B. T. Turko 等报导测量了短至 25ps 的荧光寿命<sup>[6]</sup>; 文献<sup>[7]</sup>也报导了 *erythrosin* 染料 (溶于水) 的荧光寿命为 80ps; <sup>[8]</sup>报导了对 *CN7/glycerol* 的测量, 激发光脉宽为 6ps, 测得了当粘度为  $5 < \eta < 870 \text{cp}$  时,  $\tau \propto \eta^{2/3}$  的规律。以上实验所用激发源皆为锁模 Nd: YAG 或其倍频光, 激发强度非常高, 样品容易受热分解, 荧光强度猝灭, 还能产生受激辐射及其它非线性效应, 影响荧光衰变的测量。比如文献<sup>[5]</sup>中所用激发源为锁模 Nd: YAG 激光, 脉宽为 35ps, 每脉冲激发光子数高达 10<sup>10</sup> 个; 文献<sup>[9]</sup>报导了以锁模 R6G 染料激光经放大至 300~400MW 为激发源, 相当  $2 \times 10^{10}$  光子/脉冲, 实验中峰值光功率密度为 0.5TW/cm<sup>2</sup>, 相当于  $1.5 \times 10^{30}$  光子/cm<sup>2</sup>·s。据<sup>[10]</sup>可知, R6G 染料荧光光强在激发光子数密度超过  $5 \times 10^{30}$  光子/cm<sup>2</sup>·s (对 10<sup>-3</sup>m/l) 时发生猝灭现象, 所以以上激发源的光子数密度均接近了荧光物质的猝灭极限。

由于高强度激发时存在各种问题, 因此本项研究的注意力在于用低强度激发和高效率的光学收集系统, 并用超快型条纹相机, 最大限度地发挥它的功能 (用直流背景消除及信号累加功能)。我们还具备主动锁模 Ar<sup>+</sup> 激光器, 脉宽约 200ps (标准值), 平均功率 500~800mW, 它有特定的 488nm 和 514.5nm 两条强谱线, 且其锁模也较易实现。尽管其脉宽较宽, 但对测量寿命为 ns 量级的荧光衰变曲线时, 影响不大。本文就是探索这一低强度激发和用非同步条纹相机接收时间分辨荧光光谱的研究方法。

有关该方法的可行性, 可以通过计算所能接收的光子数并与所用条纹相机的探测极限相比较。

对我们的激发系统, 锁模 Ar<sup>+</sup> 激光平均功率为 800mW, 脉宽约为 200ps, 周期为 12ns, 由此可计算出每个脉冲的激发光子数为  $2.48 \times 10^{10}$  光子/脉冲 (对 514.5nm 线), 根据我们的信号收集系统的空间接收立体角和典型物质的荧光发射截面, 求得对  $2 \times 10^{-4}$ M/l 的吡啶橙, 可接收的荧光光子数约为 10<sup>3</sup> 量级。而非同步型条纹相机的最小探测光子数为 770 光子/脉冲 (或 120 光子/脉冲), 且采用信号累加技术可得到信噪比足够大的荧光时间分辨光谱。

## 二、实验原理、装置及设计

采用条纹相机法测量时间分辨光谱就是采用脉冲激发加实时观测的方法，因此必须有脉冲激发源和实时接收系统，此外还要有分光仪器、监视设备及一些附加设备，装置如图

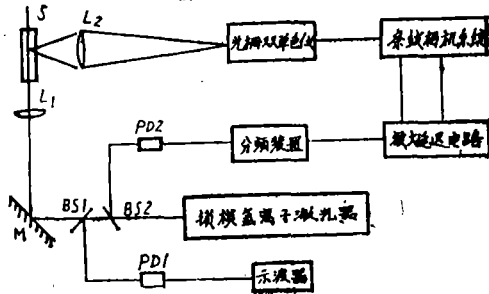


图1 实验装置总图

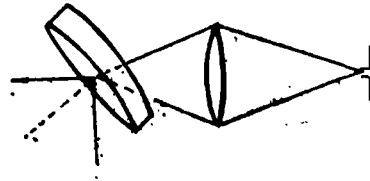


图2 扁状样品池

1. 激发源部分：锁模Ar<sup>+</sup>激光器系统及监视器(PD1 + 示波器)

2. 荧光发射系统：聚焦透镜L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub>及样品池S

3. 色散部分：光栅双单色仪M

4. 接收和处理部分：C1370-01 条纹相机及它的驱动信号所用的同步放大及延迟电路  
为了实时监视锁模脉冲波形，用一光电接收器(PD1) 和 500MHz 示波器来显示，并用这一装置来精确调节锁模波形。

首先对样品池做了研究，比较了三种不同形式的样品池：1. 进口的长方形石英样品盒，实验发现用它时所能收集到的荧光太弱；2. 用两薄玻璃片，中间夹一圆环（直径约1.5cm），共同粘在一起的扁状样品池，高度约2mm，发现如图2那样倾置效果较好。3. 受扁状样品池的启发，吹制薄壁玻璃管，其底部封闭成半球形，管内放样品，如图3，实验发现用(a)(b)两种方式都能收到较强的荧光信号，且斜置方式(b)较易调节，所以实验上采用这种放置方式。

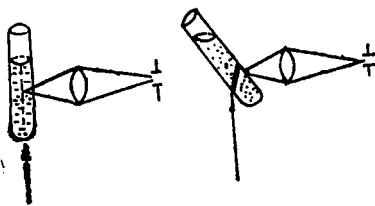


图3 管状样品池

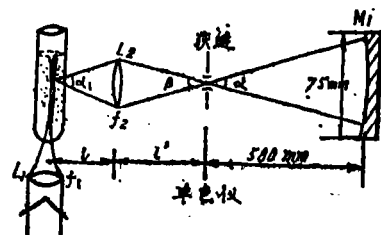


图4 荧光信号收集装置

用单色仪可容易地验证这时所收集的信号既不是瑞利散射，也不是样品或玻璃的喇曼散射光，而确是样品所发的荧光信号。

信号的收集系统，如图4，用会聚透镜（或透镜组合）把荧光发射中心成像于单色仪入缝，还要使荧光充满单色仪内的准直球面反射镜M<sub>1</sub>，这就要求会聚透镜（或透镜组中最靠近单色仪的一个）的孔径、狭缝和M<sub>1</sub>的孔径匹配。根据这两点有两关系式：

$$\begin{cases} D/l' = 75/850 & (1) \\ \frac{1}{l'} + \frac{1}{l} = \frac{1}{f} & (2) \end{cases}$$

再考虑到使收集立体角增大，必须缩小物距，使其小于象距，即

$$l' > l \quad (3)$$

由于狭缝和M1宽度都有一定限度，因此放大率不能太大，一般至少要求 $l'/l$ 小于10，否则像趋于发散。另外，为使成象质量好，不能使透镜太厚，因此焦距不能太短，表2汇集了所考虑的几种镜子的计算结果：

表2 几种会聚镜各参数比较

| 编 号       | 口径 (mm)    | 焦距 (mm) | 最佳像距 $S'$ (mm) | 最佳物距 $S$ (mm) | 最佳立体角                |
|-----------|------------|---------|----------------|---------------|----------------------|
| 会聚透镜A     | 35         | 85      | 270            | 124           | $\sim \pi/50$        |
| 会聚透镜B     | 80         | 135     | 619            | 173           | $\sim \pi/18.7$ 像质不好 |
| 球面反射镜C    | 100        | 150     | 773            | 186           | $\sim \pi/13.8$      |
| 球面反射镜C'   | 130        | 397     | 1 005          | 656           | $\sim \pi/102$ 太小    |
| 球状球面反射镜D  | 外径170 内径70 | 115     | 1 315          | 126           | $\sim \pi/2.65$      |
| 特大口径会聚透镜P | 195        | 155     | 1 508          | 173           | $\sim \pi/3.14$      |
| 半积分球      | 140        |         |                |               |                      |

通过分析和实验验证证明A, D, P, C效果较好。

此外，还可计算得理论上最大接收立体角  $\Omega_m < \frac{\pi}{4} \left( \frac{D}{f} \right)^2$ 。

实验所用的分光仪是本所研制的光栅双单色仪，分辨率为0.02nm，由于本实验所测物质的荧光谱带一般均在可见光，且单色仪杂散辐射小，配有数字波长显示器，因此用该单色仪比较理想。

当光脉冲信号经光栅单色仪时，脉冲会有加宽效应<sup>[11][12]</sup>。衍射光栅时间展宽量 $\Delta\tau$ 由下式给出：

$$\Delta\tau = \frac{\lambda}{C} \cdot \frac{kW}{d} \quad (4)$$

对我们所用的光栅双单色仪计算得(对 $\lambda = 600\text{nm}$ )单光栅加宽量为180ps, 双光栅时为255ps, 加宽量的实验验证见以下部分。

为提高微弱重复信号测量时的信噪比，可用条纹相机的信号累加和直流背景校正功能。信号累加就是对条纹图作加法运算，作长时间信号测量，对事件累加的次数为1~4096次；还可对荧光屏上的残像作加法运算（多次读电荷），次数亦为1~4096。

当用条纹相机测量超短光脉冲时，可在荧光屏上观察到条纹图的抖动。因此用条纹相机的信号累加功能测量微弱重复信号时会严重影响时间分辨率。设触发动抖函数为高斯型，FWHM值为 $T_s$ ，条纹相机本身的时间分辨率为 $T_c$ ，单个脉冲宽度为 $T_p$ ，则所观测到总的条纹宽度为：

$$T = (T_s^2 + T_p^2 + T_j^2)^{1/2} \quad (5)$$

$$\text{即 } T_j = (T^2 - T_s^2 - T_p^2)^{1/2} \quad (6)$$

我们对本实验系统做一些重复实验，考查了做多次信号累加时的加宽情况（详见实验部分）

### 三、实验研究

#### 1. 激发源调节

要想得到比较可靠的实验曲线，要求激发源锁模 Ar<sup>+</sup> 脉冲既窄而又稳定，值能图 5 和图 6 分别表示较好和不好的锁模脉冲列以及用它们激发所测荧光衰变曲线。

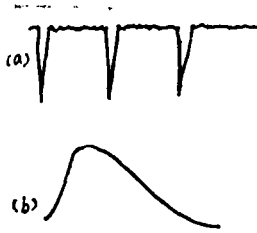


图 5



图 6

图 6 这种衰变曲线，很难确定荧光衰变形式和寿命值。因此应随时监视示波器上的锁模脉冲列，使之保持如图 5 的形式。

#### 2. 同步信号的取得

得到抖动较小的同步信号，对保证时间分辨光谱测量的精度关系很大，因此至少要求由同步信号的抖动造成的时间加宽远小于荧光衰变寿命。如图 1，在我们的实验中，同步信号取自锁模光脉冲（光同步），用分束器 BS2 取出一光信号，用光电接收器 PD2（响应时间 1ns）转换成电信号，采用激光器腔倒空器上的分频装置进行分频，得到抖动较小的同步电脉冲信号，分频信号经放大后分成两路，两信号相对延迟大约 200ns。要求门触发信号 2~10V，条

表 3 激光脉冲宽度实验数据

| 序 号 | 事件迭加数 | 增 益 档 | 寿命实验值 | 相对单次的抖动宽度<br>$T_j = \sqrt{T^2 - T_s^2}$ |
|-----|-------|-------|-------|---|
| 1   | 1     | 4     | 455ps |   |
| 2   | 100   | 3     | 598ps | ~388ps                                  |
| 3   | 150   | 3     | 663ps | ~482ps                                  |
| 4   | 250   | 4     | 663ps | ~482ps                                  |
| 5   | 400   | 3     | 689ps | ~517ps                                  |
| 6   | 100   | 4     | 624ps | ~427ps                                  |
| 7   | 150   | 2     | 663ps | ~482ps                                  |

纹触发信号5~40V，我们的放大及延迟电路提供的两信号约为7.5V和11V。对我们的分频器及放大延迟电路，用比较稳定的Ar<sup>+</sup>脉冲进行实验，分别测量单个脉冲宽度和多次迭加后的宽度以验证各种抖动因素，结果汇于表4、表5及图7。

表4 激光脉冲宽度实验数据

| 序 号 | 事件迭加数 | 增 益 档 | 宽度实验值 | 相对单次的抖动<br>$T_1 = \sqrt{T^2 - T_1^2}$ |
|-----|-------|-------|-------|---------------------------------------|
| 1   | 1     | 3     | 351ps |                                       |
| 2   | 20    | 2     | 364ps | ~96ps                                 |
| 3   | 20    | 1     | 390ps | ~170ps                                |
| 4   | 50    | 1     | 442ps | ~269ps                                |
| 5   | 50    | 1     | 403ps | ~198ps                                |
| 6   | 50    | 1     | 403ps | ~198ps                                |
| 7   | 100   | 1     | 416ps | ~223ps                                |
| 8   | 100   | 1     | 429ps | ~247ps                                |
| 9   | 100   | 1     | 442ps | ~269ps                                |
| 10  |       |       |       |                                       |



图7 不同累加次数下的氩离子脉冲波形

- A: 累加数1000    B: 累加数2000    C: 累加数2000    D: 累加数1    E: 累加数1
- 增益档2        增益档1        增益档2        增益1        增益档1
- F: 累加数1      G: 累加数100    H: 累加数100    I: 累加数150    J: 累加数150
- 增益档4        增益档4        增益档3        增益档2        增益档3
- K: 累加数250    L: 累加数400
- 增益档4        增益档3

注：测前三条曲线时把氩离子激光脉冲衰减许多倍。

由以上图表看出，当迭加次数增加时，抖动量最大约517ps，这时测得氩离子宽度为689ps，这样的抖动量对测量寿命值为ns量级的荧光寿命来说是允许的。一方面，可以按所谓“勾股定理”关系粗略去掉这些加宽；另一方面，可以用解卷积方法严格地消除这种时间加宽。

### 3. 荧光系统的调节

为了提高信噪比，必须首先调节好光路，由于荧光较弱，因此首先用连续波激光经800

周/秒调制来激发荧光，再用光电倍增管加示波器组合系统调节光路，这种调节方法比较灵敏、快速。

用该系统作了几种物质的荧光频谱实验，结果汇于表 5。

表5 荧光频谱实验结果

| 参 量  | 种类<br>R6G/乙二醇<br>$2.7 \times 10^{-4}$<br>mg/ml | 吡啶红/<br>乙二醇<br>$6.3 \times 10^{-2}$ | 吡啶红/<br>乙二醇<br>$1.3 \times 10^{-2}$ | 吡啶红/<br>乙二醇<br>$2.5 \times 10^{-2}$ | 吡啶红/<br>丙三醇<br>1.8mg/ml | 吡啶橙/<br>乙二醇<br>未知 $\times 1$ | 吡啶橙/<br>乙二醇<br>$\times 2 = \times 1/50$ |
|------|--|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------|------------------------------|---|
| 峰值波长 | 570nm  | 576nm                               | 564nm                               | 568nm                               | 606nm                   | 547nm                        | 530nm                                   |
| 带 宽  | 540~730nm                                      | 540~66nm                            | 512~630nm                           | 522~636nm                           | 582~730nm               | 520~660nm                    | 496~601nm                               |

在理论介绍部分曾谈到，我们的激发光脉冲功率远低于荧光强度猝灭极限。对此进行了实验，测得了荧光幅度与激光功率的关系曲线如图 8

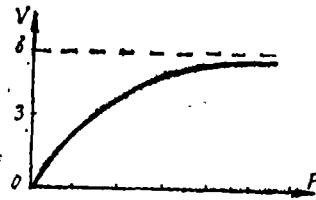


图 8 荧光幅度随激光功率变化

尽管幅度趋于稳定，但用激光作相同的实验也得相同的曲线，由此可证明荧光强度并未猝灭。

#### 4. 光栅单色仪的时间加宽实验

前面谈到光栅单色仪可使光脉冲变宽。我们的光栅单色仪对600nm的光脉冲的理论加宽量为：

$$\Delta\tau_1 = 180\text{ps} \text{ (单光栅)} \tag{7}$$

$$\Delta\tau_2 = \sqrt{2} \Delta\tau_1 \doteq 255\text{ps} \text{ (双光栅)} \tag{8}$$

我们用810nm的砷化镓激光和单光栅单色仪验证时间加宽量约为125ps。由于所用光脉冲为红外光，因此很难确定是否充满光栅。按理论计算，当红外光  $\lambda = 801\text{nm}$  充满光栅时的时间加宽量为  $\Delta\tau_1 \doteq 240\text{ps}$  (单光栅)，因此我们估计激光照射光栅的部分占  $\frac{125}{240} \approx 52\%$ 。

#### 5. 时间分辨荧光光谱测量

有了以上的考虑和准备，就可以进行时间分辨光谱测量了。

鉴于前面所述的条纹相机探测灵敏度的限制，我们选择了一些量子效率较高的物质，采用条纹相机的信号累加功能，在大多数情况下都得到了比较满意的信噪比。

当用快扫描元件时，适合测量寿命在4ns以下的样品，这时在荧光屏上可显示衰变曲线的大半部分或全貌，完全能确定衰变规律及寿命值。根据已有的荧光样品，主要选择了吡啶红(Acri-dine red)溶液作为测量对象。对吡啶红研究的人并不多，只见<sup>[2]</sup>报导了其寿命的大致值为2.4ns，未给出任何实验条件(如溶剂、波度、激发强度等)。

在我们的实验中取甲醇，乙醇，正丁醇，乙二醇，丙三醇和水等作溶剂，分别在不同浓度下，不同偏振方向时不同发射波长处的时间分辨荧光光谱，实验结果汇于总表及相应的实

表6 荧光寿命测量值总表

溶液浓度, mg/ml

| 样品 / 溶剂<br>浓度、波长                          | 寿命<br>(ns) |  |      |   |      |   |      |
|---|------------|--|------|---|------|---|------|
| 吡啶红/乙醇<br>$2.5 \times 10^{-2}$<br>576nm   | 1.35       | 吡啶红/乙醇<br>$2.5 \times 10^{-2}$<br>588nm  | 1.51 | 吡啶红/乙醇<br>$2.5 \times 10^{-2}$<br>594nm   | 1.49 | 吡啶红/乙醇<br>$2.5 \times 10^{-2}$<br>612nm   | 1.11 |
| 吡啶红/乙醇<br>$1.25 \times 10^{-1}$<br>576nm  | 1.01       | 吡啶红/乙醇<br>$1.25 \times 10^{-1}$<br>588nm | 0.91 | 吡啶红/乙醇<br>$1.25 \times 10^{-1}$<br>594nm  | 0.91 | 吡啶红/乙醇<br>$1.25 \times 10^{-1}$<br>612nm  | 0.96 |
| 吡啶红/乙醇<br>$3.125 \times 10^{-1}$<br>576nm | 0.96       |  |      | 吡啶红/乙醇<br>$3.125 \times 10^{-1}$<br>594nm | 0.91 | 吡啶红/乙醇<br>$3.125 \times 10^{-1}$<br>612nm | 0.96 |
| 吡啶红/乙醇<br>$6.25 \times 10^{-1}$<br>576nm  | 0.96       | 吡啶红/正丁醇<br>$\times 1$<br>570nm           | 2.11 | 吡啶红/正丁醇<br>$\times 1$<br>588nm            | 2.52 | 吡啶红/正丁醇<br>$\times 1$<br>606nm            | 2.21 |
| 吡啶红/乙二醇<br>$1.59 \times 10^{-2}$<br>600nm | 2.01       | 吡啶红/丙三醇<br>$2.5 \times 10^{-1}$<br>576nm | 1.16 | 吡啶红/丙三醇<br>$2.5 \times 10^{-1}$<br>588nm  | 1.81 | 吡啶红/丙三醇<br>$2.51 \times 10^{-1}$<br>606nm | 1.41 |
| 吡啶红/乙二醇<br>$1.59 \times 10^{-2}$<br>600nm | 1.21       | 吡啶红/正丁醇<br>$7.7 \times 10^{-4}$<br>594nm | 1.70 | 吡啶红/正丁醇<br>70.38<br>594nm                 | 1.33 | 吡啶红/正丁醇<br>$3.8 \times 10^{-2}$<br>570nm  | 1.57 |
| 吡啶红/乙二醇<br>$7.95 \times 10^{-2}$<br>600nm | 1.41       | 吡啶红/正丁醇<br>$3.8 \times 10^{-2}$<br>594nm | 2.78 |   |      | 吡啶红/正丁醇<br>$3.8 \times 10^{-2}$<br>582nm  | 1.64 |
| 吡啶红/乙二醇<br>$2.87 \times 10^{-1}$<br>600nm | 0.97       | 吡啶红/正丁醇<br>$3.8 \times 10^{-2}$<br>594nm | 1.99 |   |      | 吡啶红/正丁醇<br>$3.8 \times 10^{-2}$<br>594nm  | 1.99 |
|   |            | 吡啶红/正丁醇<br>0.38<br>594nm                 | 1.99 |   |      | 吡啶红/正丁醇<br>$3.8 \times 10^{-2}$<br>606nm  | 2.37 |

验曲线。

### 6. 实验规律总结

①实验曲线的信噪比直接与荧光波长有关。

由于荧光谱带中心处比较强，故测其时间分辨光谱较容易，不必迭加非常多次。但由于荧光照射、接收系统及光源本身都会有一定的变化，因此强度有涨落，所以曲线中个别数据有反常现象（信噪比）。

②与前面所述的频谱实验一样，当浓度增大时，谱带区域和峰值位置都向长波方向移动。



图9 荧光衰变曲线随浓度变化规律

|  |  |
|--|--|
| <i>A</i>                               | <i>B</i>                               |
| 样品: 吖啶红                                | 样品: 吖啶红                                |
| 溶剂: 乙二醇                                | 溶剂: 乙二醇                                |
| 浓度: $1.59 \times 10^{-3} \text{mg/ml}$ | 浓度: $1.59 \times 10^{-2} \text{mg/ml}$ |
| 荧光波长: 600nm                            | 荧光波长: 600nm                            |
| 寿命测量值: 2.01ns                          | 寿命测量值: 1.21ns                          |
| <i>C</i>                               | <i>D</i>                               |
| 样品: 吖啶红                                | 样品: 吖啶红                                |
| 溶剂: 乙二醇                                | 溶剂: 乙二醇                                |
| 浓度: $7.95 \times 10^{-2} \text{mg/ml}$ | 浓度: $2.87 \times 10^{-1} \text{mg/ml}$ |
| 荧光波长: 600nm                            | 荧光波长: 600nm                            |
| 寿命测量值: 1.41ns                          | 寿命测量值: 0.97ns                          |



图10 荧光时间衰变随浓度变化规律

|  |  |
|--|--|
| <i>A</i>                               | <i>B</i>                               |
| 样品: 吖啶红                                | 样品: 吖啶红                                |
| 溶剂: 乙醇                                 | 溶剂: 乙醇                                 |
| 荧光波长: 576nm                            | 荧光波长: 576nm                            |
| 浓度: $2.5 \times 10^{-2} \text{mg/ml}$  | 浓度: $1.25 \times 10^{-1} \text{mg/ml}$ |
| 寿命测量值: 1.35ns                          | 寿命测量值: 1.01ns                          |
| <i>C</i>                               | <i>D</i>                               |
| 样品: 吖啶红                                | 样品: 吖啶红                                |
| 溶剂: 乙醇                                 | 溶剂: 乙醇                                 |
| 荧光波长: 576nm                            | 荧光波长: 576nm                            |
| 浓度: $3.13 \times 10^{-1} \text{mg/ml}$ | 浓度: $6.25 \times 10^{-1} \text{mg/ml}$ |
| 寿命测量值: 0.96ns                          | 寿命测量值: 0.96ns                          |



图11 荧光时间衰变曲线随波长变化规律

|                                |                                |
|--------------------------------|--------------------------------|
| <i>A</i>                       | <i>B</i>                       |
| 样品: 吖啶红                        | 样品: 吖啶红                        |
| 溶剂: 乙醇                         | 溶剂: 乙醇                         |
| 浓度: $2.5 \times 10^{-2}$ mg/ml | 浓度: $2.5 \times 10^{-2}$ mg/ml |
| 荧光波长: 558nm                    | 荧光波长: 576nm                    |
| 寿命测量值: 1.51ns                  | 寿命测量值: 1.35ns                  |
| <i>C</i>                       | <i>D</i>                       |
| 样品: 吖啶红                        | 样品: 吖啶红                        |
| 溶剂: 乙醇                         | 溶剂: 乙醇                         |
| 浓度: $2.5 \times 10^{-2}$ mg/ml | 浓度: $2.5 \times 10^{-2}$ mg/ml |
| 荧光波长: 594nm                    | 荧光波长: 612nm                    |
| 寿命测量值: 1.49ns                  | 寿命测量值: 1.11ns                  |

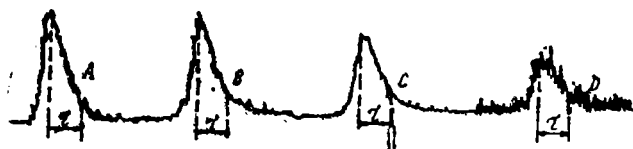


图12 荧光衰变曲线随波长的变化规律

|                                 |                                 |
|---------------------------------|---------------------------------|
| <i>A</i>                        | <i>B</i>                        |
| 样品: 吖啶红                         | 样品: 吖啶红                         |
| 溶剂: 乙醇                          | 溶剂: 乙醇                          |
| 浓度: $1.25 \times 10^{-1}$ mg/ml | 浓度: $1.25 \times 10^{-1}$ mg/ml |
| 荧光波长: 612nm                     | 荧光波长: 594nm                     |
| 寿命测量值: 0.96ns                   | 寿命测量值: 0.91ns                   |
| <i>C</i>                        | <i>D</i>                        |
| 样品: 吖啶红                         | 样品: 吖啶红                         |
| 溶剂: 乙醇                          | 溶剂: 乙醇                          |
| 浓度: $1.25 \times 10^{-1}$ mg/ml | 浓度: $1.25 \times 10^{-1}$ mg/ml |
| 荧光波长: 576nm                     | 荧光波长: 558nm                     |
| 寿命测量值: 1.01ns                   | 寿命测量值: 0.91ns                   |

③时间分辨谱随浓度变化有一定规律。以吖啶红/乙二醇为例, 固定荧光波长(如600nm), 随着浓度增加, 寿命实验值的变化为: 2.01→1.21→1.41→0.97ns, 其中 $\tau=1.21$ ns 属反常现象, 总的趋势是随浓度增加, 寿命变短。如图9, 10。

最有说服力的一组曲线是对吖啶红/正丁醇系统, 当浓度由 $7.7 \times 10^{-4}$ mg/ml变为  $>0.38$  mg/ml时, 寿命实验值变化为: 1.70→2.78→1.99→1.99→1.33ns即取一最佳浓度时寿命最

长。

只有文献<sup>[1]</sup>中谈到过寿命随浓度的变化关系。但文中所引用的数据都是在稀溶液下的测量值，如叶绿素 *a* 溶于95%的乙醇，当浓度为  $3 \times 10^{-7} M \rightarrow 4 \times 10^{-6} M$  时，寿命为  $5.5 ns \rightarrow 6.5 ns$ ，这和我们所测的结果恰恰符合，只是他们所取的浓度范围较小，不能说明在各种浓度下的变化规律。<sup>[13]</sup>所示结论亦与<sup>[1]</sup>相同。

文献<sup>[15]</sup>所测的数据如表 7

表7 R6G/乙醇荧光寿命随浓度变化表<sup>[15]</sup>

| 浓度 (M)  | $10^{-1}$  | $2 \times 10^{-2}$ | $2 \times 10^{-3}$ | $2 \times 10^{-4}$         | $1 \times 10^{-5}$ | $4 \times 10^{-6}$ |
|---------|------------|--------------------|--------------------|----------------------------|--------------------|--------------------|
| 寿命 (ns) | $\leq 0.6$ | 1.8                | 4.2                | $\frac{4.8}{\phi r = 1.0}$ | 3.1                | 3.1                |

该文献恰好说明了寿命随浓度变化规律的全貌（由极稀至极浓），也说明了寿命变化短→长→短的规律，与我们的结论一致。文献<sup>[14]</sup>中的图示也间接地说明了该结论。

文献<sup>[1]</sup>曾对以上变化规律做过简短的解释，作者所选样品较稀  $10^{-7} M \sim 10^{-6} M$ ，因此寿命随浓度的增加而变长，把这种现象解释为自吸收现象，认为测量的表观寿命是几次发射寿命的加权平均值。本文认为当浓度非常大时，分子密度过大，周围分子的作用加强，使上能级粒子数弛豫加快，因此寿命缩短。

④我们测量了其它条件固定时不同波长处的时间分辨谱。一般说寿命值与荧光波长间无确定的规律性，这是与物质荧光能级的复杂性有关的。但表 7 中最后一组实验数据却有一定规律性。对浓度为  $3.8 \times 10^{-2} mg/ml$  的吡啶红/正丁醇，当波长  $\lambda_f$  变化为  $570 \rightarrow 582 \rightarrow 594 \rightarrow 606 nm$  时，其寿命值单调上升， $\tau_f$  为  $1.57 ns \rightarrow 1.64 ns \rightarrow 1.99 ns \rightarrow 2.57 ns$ 。如图 11、12。

⑤荧光寿命与温度有一定关系

文献<sup>[14]</sup>介绍了这方面的理论和实验。一般在低温范围内关系曲线如图 13

⑥对某些物质，荧光还与偏振方向有关。我们对其中一种样品吡啶红/乙醇进行了验证，结果两垂直方向偏振的荧光寿命无显著差别，结果如图 14

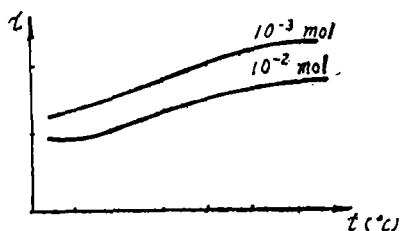


图13 荧光寿命随温度变化

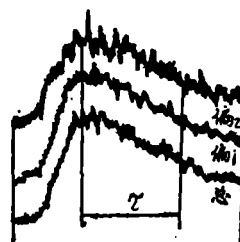


图14 荧光寿命偏振效应实验曲线

其中：偏 1 的偏振方向平行于激发光偏振方向，  
偏 2 的偏振方向垂直于激发光偏振方向，  
总：代表不加偏振片时所测曲线。  
三曲线寿命值皆近似为：2.6~2.7 ns

⑦以上总结了同一样品在同一种溶剂中荧光衰变的实验规律。同一样品在不同溶剂中的衰变是有区别的，如图 15 示出了吡啶红在丙三醇、乙二醇、乙醇及正丁醇之中荧光时间衰变曲线。



图15 同一样品在几种不同溶剂中荧光衰变曲线比较

|  |   |
|--|---|
| <p>A: 吡啶红/丙三醇<br/>浓度: <math>2.5 \times 10^{-1} \text{mg/ml}</math><br/>荧光波长: 600nm<br/>寿命实验值: 1.41ns</p> | <p>B: 吡啶红/乙二醇<br/>浓度: <math>2.87 \times 10^{-1} \text{mg/ml}</math><br/>荧光波长: 600nm<br/>寿命实验值: 0.97ns</p> |
| <p>C: 吡啶红/乙醇<br/>浓度: <math>3.13 \times 10^{-1} \text{mg/ml}</math><br/>荧光波长: 594nm<br/>衰命实验值: 0.91ns</p> | <p>D: 吡啶红/正丁醇<br/>浓度: <math>3.8 \times 10^{-2} \text{mg/ml}</math><br/>荧光波长: 606nm<br/>寿命实验值: 2.37ns</p>  |

#### 四、实验结论数据处理及精度分析

评价时间分辨荧光光谱测量的好坏就要看所测得的曲线形状, 信噪比, 寿命准确性及重复性。

1. 由于本实验只验证用条纹相机这种方法, 而并不是针对某一种特定的物质进行测量, 因此才未取最大迭加数, 其实信噪比还有很大的提高潜力。

2. 在<sup>[17]</sup>中说明了激发光脉冲的形状及宽度会影响荧光实验曲线的形状和测量值。如果用具有一定宽度的脉冲来激发, 则荧光实验曲线为激发脉冲波形与荧光本身衰变函数的卷积。且证明, 对单一 e 指数荧光, 卷积结果仍近似为单一 e 指数型 (对高斯激发脉冲函数), 且寿命值近似满足“勾股定理”关系: 即所测曲线的  $\frac{1}{e}$  峰值处寿命值  $\tau$  与激发脉冲宽度  $\tau_f$  和荧光真实寿命  $\tau_f$  间有近似关系:

$$\tau^2 \approx \tau_f^2 + \tau_f^2 \quad (9)$$

##### 3. 寿命准确性

前面详细地分析了荧光衰变测量中一系列加宽因素, 如激发脉冲本身的宽度及抖动, 电触发信号的抖动, 单色仪等的时间加宽以及条纹相机的时间分辨率等。

为消除以上加宽因素 (系统误差) 以求得荧光衰变真实形状和寿命, 这里介绍两种方法<sup>[18]</sup>:

##### ①粗略估计法

用与测量荧光时间谱相同的系统测得激发光脉宽为  $\tau_e$ , 则测量荧光寿命的实验宽度  $\tau_{\text{实}}$  近似为:

$$\tau_{\text{实}}^2 \approx \tau_e^2 + \tau_f^2 \quad (10)$$

尤其当  $\tau_f \gg \tau_e$  时该公式较准确, 所以由

$$\tau_f \approx \sqrt{\tau_{\text{实}}^2 - \tau_e^2} \quad (11)$$

##### ②精确法—解卷积方法

所谓解卷积就是先假设荧光衰变形状, 以寿命为寻优变量, 与激发函数相卷积, 再与实际

测波形相比较,即所谓卷积+符合 (*convolute and fit*) 法。通过对寿命变量寻优,最佳吻合时的寿命值即为真正寿命。

对吡啶红/正丁醇(浓度未知,波长588nm)的一组实验曲线进行了解卷积处理,本来实验寿命值为2.17ns,而激发光脉宽约0.7ns,则解卷的积得:

$$\tau_0 \approx 1.885 \pm 0.013 (\text{ns})^{[17]}$$

其中0.013ns是所用扫描档(或速度)所决定的。

### 参 考 文 献

- [1] 郭尧君,《荧光实验技术及其在分子生物学中的应用》。
- [2] Anthony J. Campillo et. al., IEEE Journal of Quantum Electronics, 1983, QE-19 No. 4, 585-603.
- [3] R. G. Bennett, Review of Scientific Instruments, 1960, 31, No. 12, 1275.
- [4] 陈文驹, 林美荣, 姜宏丽,《光学学报》, 1985.5, No. 10, 904-909.
- [5] Michael A. J. Rodgers, Optical Engineering, 1983, 22, No. 5, 521.
- [6] Bojan T. Turko, Review of Scientific Instruments, 1983, 54, 118.
- [7] Picosecond Technical Bulletin by Hamamatsu. 3.
- [8] Picosecond Technical Bulletin by Hamamatsu. 7.
- [9] R. S. Adrain, E. G. Arthurs et. al., Optics Communications, 1975, 15 No. 2, 290.
- [10] S. Mory, D. Leupold and R. König, Optics Communications, 1972, 6, No. 4, 394.
- [11] Picosecond Technical Bulletin by Hamamatsu. 15.
- [12] 加藤冽,《电子科学》, 1970, 20, No. 2, No. 3, 86-91, 109-115.
- [13] Guo Chu, Zhang Xing Kang, 光学学报. 1983, 3, No. 1, 64-68.
- [14] F. J. Theiss and Weber, Optics Communications, 1974, 12, No. 4, 368.
- [15] R. R. Alfano, S. L. Shapiro, Optics Communications 1973, 7, No. 3, 191.
- [16] J. Knof, F. J. Theiss, Optics Communications 1976, 17, No. 3, 264.
- [17] 刘国军, 光学机械, 1988. 4期
- [18] 郭础,《荧光的时间分辨测量》, 1984年12期, 中国科学院化学研究所。

## Studying ps Time-Resolved Fluorescence Spectrum with Streak Camera

Liu Guojun Jia Xinzhi Jing Baoquan

### Abstract

This paper introduces a scheme for time-resolved fluorescence spectrum measurement in which ps time resolution streak camera is used as the main measuring device actively mode-locked Ar<sup>+</sup> laser as the excitation source. The effective collection of light signals has been discussed. The error sources and their amount in every experimental link have been analysed. Then the experimental results have been given and compared with the typical published data. This scheme has been proved to be precise and practical.