

时间分辨光谱测量中时间加宽效应的研究

刘国军

摘要: 本文推导和讨论了两高斯脉冲的卷积以及高斯脉冲与单一负 e 指数相卷积时脉宽间“勾股定理”关系的正确性,并结合实验中具体数据,借助计算机讨论了用条纹相机测量时间分辨荧光光谱中的解卷积问题。

一、引言

在进行时间分辨光谱测量中,由于分析仪器总具有一定的响应时间,因此所测得的函数形式总要偏离真实函数。这类问题的特点是总存在着一种卷积关系。比较简单的一种情形是用具有高斯型时间响应函数的接收器接收高斯型脉冲,则所测得的波形为该两高斯型函数的卷积。在时间分辨荧光光谱测量中一般包括两重卷积(有时包括三重卷积),即激发光脉冲函数、荧光衰变函数和仪器响应函数之间的卷积。因此,一般所测得波形有加宽效应。

在以上两种物理过程中都存在一种所谓“勾股定理”关系。设一光脉冲真实形状为高斯型,其 $\frac{1}{e}$ 倍峰值处半宽为 τ_p , 仪器响应函数亦为高斯型,其 $\frac{1}{e}$ 处半宽为 τ_n , 则实际测得的函数“宽度” τ 与 τ_p , τ_n 之间近似满足“勾股定理”关系,即 $\tau^2 = \tau_p^2 + \tau_n^2$ 。本文验证了该关系的正确性和适用条件,用高斯型脉冲激发呈单一负 e 指数型衰变的荧光样品,测得衰变曲线宽度。本文证明了如果接收荧光的仪器响应时间非常短(与脉冲宽度、荧光寿命相比),则所测得的曲线的 $\frac{1}{e}$ 处宽度与激发脉冲宽度及荧光寿命之间也近似满足“勾股定理”关系。本文也推导并用计算机计算了该关系。这使对时间分辨荧光光谱荧光寿命的初步估计有了理论依据;本文后一部分讨论了时间分辨荧光光谱测量中消除时间加宽的解卷积方法。为便于说明问题,引用前面所述的卷积关系:

$I(t) = L(t) \otimes R(t) \otimes F(t)$, 其中 $I(t)$, $L(t)$, $R(t)$, $F(t)$ 分别为实测波形, 激发光脉冲波形, 仪器响应函数和荧光衰变的真实波形, 使得 $I(t)$ 宽度大于 $F(t)$ 的宽度即荧光寿命, 由于所选实验条件不同, 以上两加宽因素的影响程度也不同。有关作者在这方面进行了实验上的探讨。如(2)报道了当激光脉宽较窄(200ps), 而仪器响应时间为4.8ns时, 通过对实验曲线解卷积而消除仪器时间响应引起的加宽; (3)中报道了用时间相关单光子计数法, 在ns范围内的解卷积问题。而由于我们的实验研究中所用的主要仪器是超快条纹相机, 其最高时间分辨率为2ps, 且目前实验中用锁模的 Ar^+ 激光作激发源, 其脉宽约为200~700ps(700ps为工作状况不好加上电子学抖动), 所选荧光样品的寿命为1ns~5ns范围, 因此实验系统中时间加宽的主要来源是激发光脉宽, 本文结合实验中具体数据, 用计算机进行解

卷积处理,求得荧光衰变寿命,重点指出解卷积过程中的注意问题。

二、脉宽“加宽”问题的数学探讨—— “勾股定理”关系验证

设一高斯型脉冲为 $F_1(t)$,图形为图1 I,用具有高斯型时间响应 $F_2(t)$ 的接收器接收,图形为图1 II。

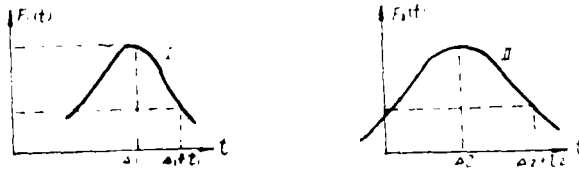


图 1

其一般表达式为:

$$\text{I: } F_1(t) = \exp\left\{-\left(\frac{t-\Delta_1}{\tau_1}\right)^2\right\} \quad (1)$$

$$\text{II: } F_2(t) = \exp\left\{-\left(\frac{t-\Delta_2}{\tau_2}\right)^2\right\} \quad (2)$$

则所测得的波形应为它们的卷积

$$\begin{aligned} F(t) &= F_1(t) \otimes F_2(t) \\ &= \int_0^t F_1(t_1) F_2(t-t_1) dt_1 \end{aligned} \quad (3)$$

通过变量代换得:

$$F(t) = \frac{1}{\sqrt{k_1}} \exp\left\{-\frac{(t-\Delta)^2}{\tau_1^2 + \tau_2^2}\right\} \int_{-\sqrt{k_1}(t-\Delta_1-k_2)}^{\sqrt{k_1}(t-\Delta_1-k_2)} \exp\{-t_3^2\} dt_3 \quad (4)$$

其中 $k_1 = \frac{1}{\tau_1^2} + \frac{1}{\tau_2^2} \quad (5)$

$$k_2 = \frac{t-\Delta}{\tau_2^2\left(\frac{1}{\tau_1^2} + \frac{1}{\tau_2^2}\right)} \quad (6)$$

$$\Delta = \Delta_1 + \Delta_2 \quad (7)$$

$$\text{借助误差函数 } \text{erf}(t) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^t \exp(-\tau^2) d\tau \quad (8)$$

$$\begin{aligned} \text{把(4)式改写为 } F(t) &= \frac{\sqrt{\pi}}{2\sqrt{k_1}} \exp\left\{-\frac{(t-\Delta)^2}{\tau_1^2 + \tau_2^2}\right\} \left\{ \pm \text{erf}\left(\left|\frac{\tau_2}{\tau_1\sqrt{\tau_1^2 + \tau_2^2}}(t-\Delta_1 + \frac{\tau_1^2\Delta_2}{\tau_2^2})\right|\right) \right. \\ &\quad \left. \pm \text{erf}\left(\left|\frac{\tau_1}{\tau_2\sqrt{\tau_1^2 + \tau_2^2}}(t-\Delta_2 + \frac{\tau_2^2\Delta_1}{\tau_1^2})\right|\right) \right\} \end{aligned} \quad (9)$$

(9) 式大括号中正负号的选取原则:

当 $t - \Delta_1 + \frac{\tau_1^2 \Delta_2^2}{\tau_2^2} > 0$ 时第一项为正, 否则为负

当 $t - \Delta_2 + \frac{\tau_2^2 \Delta_1^2}{\tau_1^2} > 0$ 时第二项为正, 否则为负

结论 I: 两高斯型函数卷积后, 所得函数为一新的高斯函数乘上一调制函数——两误差函数的线性迭加。

误差函数定义在 $[0, \infty]$ 区间上, 为单调递增函数, 取值范围为 $0 \leq \text{erf}(t) \leq \sqrt{\frac{\pi}{2}}$, 见图 2

由图看出, $\text{erf}(t)$ 在 $t = 0$ 附近变化较快, 在 $t > 1$ 时变化相当缓慢, 所以它对高斯函数的调制作用只在宗量 $t = 0$ 附近最明显, 而宗量远离零时误差函数近似等于 $\sqrt{\pi}/2$, 因此几乎没有什么调制作用。式 (9) 中如不考虑调制函数, 则应得到高斯波形, 但其峰值离原点为 Δ , $\frac{1}{e}$ 处宽度为 $\sqrt{\tau_1^2 + \tau_2^2}$ 。当考虑到 $\text{erf}(t)$ 的调制作用时, 峰值位置和寿命都会产生移动。比如高斯函数的峰值处 Δ 与某一 $\text{erf}(t)$ 函数的宗量相等时, 调制最强, 则峰值位置变到其它值, 无论对峰值位置还是对寿命值都有很大影响。举一特例, 当 $\tau_1 = \tau_2 = \tau, \Delta_1 = \Delta_2 = 0$ 时 $\exp(-t^2/\tau^2) \otimes \exp(-t^2/\tau^2) = \frac{\sqrt{\pi}}{2} \tau \exp(-t^2/2\tau^2) \cdot \exp(\frac{t}{\sqrt{2}\tau})$ (10)

因此正是调制最强情形, $\exp(-t^2/2\tau^2)$ 峰值位置 $t = 0$ 与 $\text{erf}(\frac{t}{\sqrt{2}\tau})$ 的函数零点位置重合, 峰值向后移, 寿命短于 $\sqrt{2}\tau$ 如图 3。

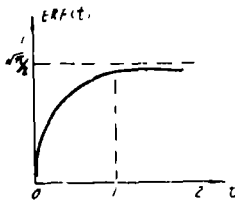


图 2

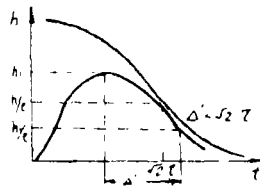


图 3

虽然 (9) 式很明了地说明了波形的大致形状, 但在具体讨论脉宽间的数值关系时用此式并不简单, 因为一方面考虑到上面提到的符号选取原则, 计算机计算时要用条件语句。另一方面, 求误差函数仍然要用循环, 所以用计算机时用 (9) 式较麻烦, 不如直接用卷积定义 (3) 直接编程计算。在计算时间方面, 如果所取参数 $\Delta_1, \Delta_2, \tau_1, \tau_2$ 较小时用后者省时间, 否则相反。

为形象地说明调制关系, 举一数值例子, 当 $\Delta_1, \Delta_2, \tau_1, \tau_2 = 50, 50, 30, 30$ 时

$$E_o(T) = \exp\{-(t - \Delta)^2/\tau_1^2\}$$

$$E(T) = \exp\{-(t - \Delta_1 - \Delta_2)^2/(\tau_1^2 + \tau_2^2)\}$$

以及调制函数项 (两项迭加) $SM(t)$ 分别示于图 4。

由于用以上两种方法可得到相同的计算结果, 因此用后一种方法 (直接用卷积公式) 求出函数 $F_1(t) \otimes F_2(t)$, 显示出其数值、峰值位置及 $\frac{1}{e}$ 倍峰值位置, 求出 τ , 对各种 Δ_1, Δ_2 ,

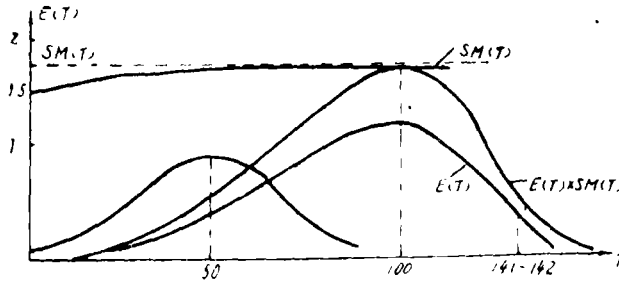


图 4

τ_1, τ_2 , 情形作了详细的考查, 得到了关于 $\Delta_1, \Delta_2, \tau_1, \tau_2, \tau, \sqrt{\tau_1^2 + \tau_2^2}$, 以及 $N = \frac{\tau_{max} - \sqrt{\tau_1^2 + \tau_2^2}}{\sqrt{\tau_1^2 + \tau_2^2}}$ (误差量度) 的计算表格, 见表 1, 以下为几组典型的有代表性的数据 (详细表格略), 代表了能实现的各种实际情形。

表 1

序 号	$\Delta_1, \tau_1, \Delta_2, \tau_2$	τ 范围	$\sqrt{\tau_1^2 + \tau_2^2}$	$N = \frac{\tau_{max} - \sqrt{\tau_1^2 + \tau_2^2}}{\sqrt{\tau_1^2 + \tau_2^2}}$
1	0, 0.1, 0, 5	$\tau = 5$	5	≈ 0
2	10, 5, 10, 1	$5 < \tau < 6$	5.09	≈ 0
3	5, 10, 5, 10	$12 < \tau < 13$	14.14	-0.08
4	10, 10, 10, 10	$13 < \tau < 14$	14.14	-0.01
5	20, 20, 10, 5	$20 < \tau < 21$	20.6	≈ 0
6	30, 10, 2, 10	12~13	14.11	-0.08

考虑有实际物理意义的情形, 即 $\Delta_1 > \tau_1$ (这可由选择坐标原点来满足), 因为只有这时才考虑到了整个脉冲的作用。

结论 II:

- ① 当 $\Delta_2 > \tau_2$ 时, 则 $\tau_1^2 + \tau_2^2 \approx \tau^2$ 基本满足“勾股定理”
- ② 当 $\Delta_2 < \tau_2$ 时有关系 $\tau^2 < \tau_1^2 + \tau_2^2$ 即 τ 窄于 $\sqrt{\tau_1^2 + \tau_2^2}$ ($N < 0$)
- ③ 无论在什么情况下都不存在 $\tau^2 > \tau_1^2 + \tau_2^2$ 的现象, 这同下面要提的问题 $\exp(-(t - \Delta_1)^2 / \tau_1^2) \otimes \exp(-t / \tau_2)$ 不同。
- ④ 当 Δ_2 / τ_2 的值不同时, 衡量偏差的量 N 也不同, 一般 $|N|$ 最大为 0.08 左右, 所以, 所得卷积函数从峰值处起的 $\frac{1}{e}$ 宽度 τ 与 $\sqrt{\tau_1^2 + \tau_2^2}$ 偏差不太大, 一般可用“勾股定理”来估计, 但在精确计算时, 必须具体求卷积。

关于 Δ_2 / τ_2 的值取决于所用的仪器。 Δ_2 与 τ_2 存在的关系如图 5: 有 ① $\Delta_2 = 0$ ② $\Delta_2 \sim \tau_2$ ③ $\Delta_2 \gg \tau_2$

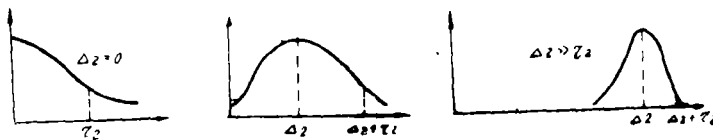


图 5

以上讨论了两高斯函数卷积及所代表的实际问题。

类似的一个重要问题就是测量时间分辨荧光光谱中的时间加宽效应。常常要知道荧光衰变的寿命。在实际情况下一般不能肯定应以什么寿命为准(包括 $\frac{1}{e}$ 处宽度、半高全宽、“平均持续时间”宽度^[5])。下面讨论这类问题中的一种情形即我们实验的具体情形。用高斯型脉冲激发荧光样品, 设荧光衰变真实曲线(即以 δ 函数脉冲激发并用快速时间响应仪器接收荧光所得曲线为单一负 e 指数型, 用时间分辨率为2ps的条纹照相机接收, 发现所得曲线可近似认为单一负 e 指数函数, 仅是峰值位置有所移动, 寿命近似满足“勾股定理”关系。

$$\text{推导类似前面 } F(t) = F_1(t) \otimes F_2(t) = \exp\left\{-\left(\frac{t-\Delta_1}{\tau_1}\right)^2\right\} \otimes \exp(-t/\tau_2) \quad (11)$$

这里假设了荧光波形为 $\exp\left(-\frac{(t-\Delta_2)}{\tau_2}\right)$ 中 $\Delta_2 = 0$ 。

$$\text{推得 } F(t) = \frac{\sqrt{\pi}}{2} \tau_1 \exp\left\{-\frac{t-(\Delta_1 + \frac{\tau_1^2}{4\tau_2})}{\tau_2}\right\} \left\{ \pm \operatorname{erf}\left(\left|\frac{1}{\tau_1}\left[t-(\Delta_1 + \frac{\tau_1^2}{2\tau_2})\right]\right|\right) + \operatorname{erf}\left(\left|\frac{1}{\tau_1}\left(\Delta_1 + \frac{\tau_1^2}{2\tau_2}\right)\right|\right) \right\} \quad (12)$$

结论Ⅲ: 一高斯型脉冲与单一负 e 指数函数卷积后为一基本的负 e 指数函数乘上一调制函数(即两误差函数的线性迭加), 调制结果使曲线不再为负 e 指数下降。但经数值计算表明, 虽调制对峰值位置有影响, 但对波形影响不大, 且对寿命的影响比较特殊, 本来由(12)式中负 e 指数 $\exp\left\{-\frac{t-(\Delta_1 + \tau_1^2/4\tau_2)}{\tau_2}\right\}$ 看出寿命近似为 τ_2 , 但调制结果: 若所得的卷积按负 e 指数求其寿命, 则近似满足“勾股定理”: $\tau^2 = \tau_1^2 + \tau_2^2$ 。对各种情形下的验证过程是借助计算机完成的。过程类似前面, 把计算的典型情形列于表2:

表 2

序号	Δ_1	τ_1	τ_2	τ 范围	$\sqrt{\tau_1^2 + \tau_2^2}$	$N = \frac{\tau_{max} - \sqrt{\tau_1^2 + \tau_2^2}}{\sqrt{\tau_1^2 + \tau_2^2}}$
1	0	20	0.1	17~18	20.02	$\sim 0 (< 0)$
2	0	30	30	44~45	42.43	$+ 0.06 > 0$
3	20	2	2	2~3	2.83	~ 0
4	0	20	13	23~24	23.85	~ 0
5	0	20	20	29~30	28.28	$+ 0.06 > 0$
6	0	20	10	21~22	22.36	$- 0.016 < 0$

结论Ⅲ: 在有实际物理意义的情形下 $\Delta_1 > \tau_1$ (靠选择坐标原点实现)

① 当 $\tau_1 \ll \tau_2$ 时 $\tau = \tau_2$

② 当 $\tau_1 \gg \tau_2$ 则 $\tau = \tau_1$

③ 当 $\tau_1 \sim \tau_2$ 时, N 可正可负, $|N|_{max}$ 为 0.15 左右, 因此一般情况下近似满足“勾股定理” $\tau^2 = \tau_1^2 + \tau_2^2$ 其中③是比较重要的一种情形, 在我们的测量系统中, $\tau_1 = 700\text{ps}$, $\tau_2 \approx 1.885\text{ns}$, 条纹相机响应时间约 2ps, 正是这种情形, 按上面的结论, 所测寿命应近似满足“勾股定理”关系, 具体讨论这种加宽见下面的内容。

三、PS 时间分辨荧光光谱测量中解卷积方法的一些问题

我们的荧光测量系统, 激发光脉宽为 200~700ps, 较宽, 且由于锁模光脉冲周期为 12ns, 只适合研究寿命小于 12ns (其实应为小于 4ns 或更短, 否则重叠严重) 的荧光衰变, 这样不能设激发脉宽为 δ 函数, 必须通过解卷积来消除这种加宽因素。具体采用“卷积 + 拟合”方法, (Convolute and Fit), 以寿命为变量寻优, 求得真实寿命。

设 $A(c)$ 为激发脉冲波形 (c 为条纹相机通道数, 对应时间), $F(c) = K \exp(-c/c_0)$, 为荧光衰变形式 (c_0 为待寻优的寿命变量), 则卷积 $E(c) = F(c) \otimes A(c)$ 应对应通道 c 处的拟合函数值, 设 $E_1(c)$ 为实验函数值, 则 $E(c)$ 与 $E_1(c)$ 越接近越好, 当通道变量 c 取值很密 (在条纹相机中有 512 通道) 时, 用离散级数代替积分:

$$E(c) = \sum_{c_1=0}^c K \exp[-(c-c_1)/c_0] \otimes A(c_1)$$

通过循环计算, 在计算机上不难求出 $E(c)$ 和最佳寿命值 c_0 , 计算所需的 $A(c)$ 和 $E_1(c)$ 为从条纹相中显示的数据 (实验测量结果), 输入计算机计算, 在没有实现与计算机接口时这样做是消耗时间的, 但有一个好处, 就是通过解一次卷积就可以消除两个因素 (激光脉宽和仪器响应时间) 的影响, 因此是值得的。

本部分只对“吡啶红 + 正丁醇”荧光系统的测量数据进行解卷积处理。实验测得的衰变曲线从峰值到 $\frac{1}{e}$ 处寿命为约 2.171ns, 而解卷积后 c_0 为: $c_0 \approx 1.885\text{ns} \pm 0.013\text{ns}$, 时间分辨准确度 $< 13\text{ps}$ 。由于 $\tau^2 = 2.171^2 > \sqrt{\tau_1^2 + \tau_2^2} = \sqrt{1.885^2 + 0.7^2}$, 恰为前面所提的 100, 20, 40 的情形, 这也证明了前面的推导和结论正确。

编程中考虑的几个问题:

① 如下图 6 分别为条纹相机测得的激发脉冲波形和荧光实验曲线, 左近于对称 (近高斯), 右的特点之一是逐点起伏很大 (受条纹相机线性性、信号散粒噪声和暗噪声等影响), 另一特点是它与激发光脉冲的起始处有一段延迟, 推测该延迟为荧光物质基态粒子被激发到上能级所需时间 [在本例中该时间约 299ps (23 通道)]。另一特点, 由于测 $A(c)$ 和 $E_1(c)$ 时所用增益档不能完全一样 (考虑到信号强弱不同), 因此两个波形的幅度都是相对值。

因此编程时考虑了以下办法:

① 适当地对实验曲线进行光滑处理 (平均方法), 以便计算出的曲线与实验曲线接近程度好, 可采用一次光滑或多次光滑 (本例采用一次)。

② 首先把激发脉冲曲线和荧光实验曲线进行横轴平移, 使它们皆在坐标原点起开始上升 (图 6)

③ 拟合函数值 (计算值) 乘以适当因子 (F) 以使之与实验函数值接近。

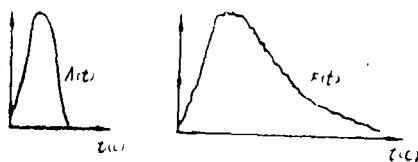


图 6

④ 考虑到②中经过了平移（其量称为“调延量”），则可能出现下面的现象，即Ⅱ、Ⅲ峰值相差太远，见图7。

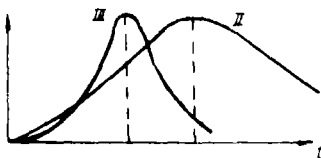


图7

这时无论预先设寻优变量 ω 为多少，都不能很好拟合，必须再经过平移（该平移量未必等于②中的调延量），由于求卷积过程需二重循环，寻优还要一重循环，且数据点数多（480），为了节省时间，寻优变量大致范围必须事先估计，而且最好时时监测计算结果，以便调节延迟量和 F 因子，达到最快拟合。判断最佳拟合的标准采用“差·方·和”法，即使 $\sum(F_{\text{计算}} - F_{\text{实}})^2$ 最小。还有个问题就是是否一定要使计算曲线与实验曲线的峰值完全重合（由调延量调节），本文认为绝对重合未必好，因为实验曲线的起伏很大，尽管经过了光滑处理，但峰值处的值可能不代表真正的极值，因此一味地追求峰值重合会使 $I = \sum(F_{\text{计算}} - F_{\text{实验}})^2$ 很大，从统计观点这不好。因此认为无论峰值差为多大，只要 I 最小则拟合最佳。其实当信号强后曲线自然光滑（信噪比正比于 \sqrt{N} ， N 为事件数），峰值能代表真正的峰值。通过多次光滑处理也可以使 I 因子变小，但容易损坏实验曲线的“形象”。

由于所用的扫描速度范围决定了每通道代表13ps，因此解卷积处理最高可分辨13ps。

◆ 考 文 献

[1] Picosecond, 8, Published by Hamamatsu
 [2] 陈文驹, 林美荣等, 光学学报, 6, No10 P 904 1985
 [3] 李勤庸、李庆华等, 发光与显示, 6, No 2 P123 1985
 [4] R.L.Fork, B.I.Greene, et. al., Appl. Phys. Lett., 38 N09 P 671 1981
 [5] 郭楚, 《荧光时间分辨测量》, 中科院化学所

A Study of the Time Broadening Effects in Time-Resolved Fluorescence Spectrum Measurement

Liu Guojun

Abstract

The So-called "Pythagorass theorem" relationship between the pulsewidths in convoluting two Gaussian pulses or a Gaussian pulse with a single exponential function has been deduced and, in accordance with the experimental data, the deconvoluting problem in time-resolved fluorescence measurement with streak camera has been analysed with the aid of a computer.