

# 荧光寿命的正弦调制测量法及分析

冯颖, 黄世华\*

北京交通大学光电子技术研究所, 发光与光信息技术教育部重点实验室, 北京 100044

**摘要** 设计并制作了光强调制度和频率可调的发光二极管驱动电路, 应用这种激励源激发荧光样品  $\text{Eu}_2\text{L}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$  ( $\text{L} = \text{C}_4\text{H}_4\text{O}_4$ ), 测量了激发光和  $\text{Eu}^{3+}$  离子的  $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$  发射光的波形。实验得到的数据用按照相位法测量荧光寿命的原理用非线性最小平方曲线拟合, 得到  $\text{Eu}^{3+}$  离子激发态  $^5D_0$  的寿命约为 0.680 ms。讨论了光源调制中的高次谐波分量对测量结果的影响以及寿命具有一定分布的多指数衰减体系的测量和处理方式, 提出应用傅里叶级数展开处理数据的修正方法, 以扩大相位法测量荧光寿命的适用范围, 得到更准确的荧光寿命值。

**关键词** 荧光寿命; 相移法; 高次谐波分量; 多指数衰减

**中图分类号**: O433.1 **文献标识码**: A **文章编号**: 1000-0593(2007)12-2523-04

## 引言

荧光寿命是反映物质光物理或光化学过程特性的重要参数, 它的测量是一种重要的光谱技术。通常, 测量瞬态过程需要用持续时间远小于被测过程特征时间的脉冲激发源<sup>[1]</sup>, 根据时间分辨率的不同, 采用不同测量技术<sup>[2-4]</sup>, 设备比较复杂。虽然这些技术用于发光呈单指数形式衰减的样品已经很多年了, 但是比较好的还是相移法<sup>[5]</sup>。

相移法是利用相位变化测量荧光寿命, 不同于脉冲法, 它要求的仪器相对简单<sup>[4]</sup>。激发源常采用正弦调制的电源, 频率和调制度在一定范围内可调。样品被激发后发出的荧光也是调制光, 不过相位和调制度相对于激发光都有了变化。测量这些变化, 就可以解析出荧光寿命。由于设备相对简单, 现代用于生物技术、物理化学实验等领域的荧光计很多都是以这种相移法为基础的<sup>[6,7]</sup>。本文设计制作了一个正弦调制的 LED 光源, 用这个光源激励样品, 得出荧光寿命。对这种测量技术中如何处理光源调制的高次谐波分量的影响以及衰减过程的多指数性进行了讨论。

## 1 原理

### 1.1 单指数衰减

对于单分子发光过程, 用一个短脉冲光  $e(t)$  激发样品后, 发光强度随时间按指数规律衰减

$$I(t) = I_0 e^{-t/\tau} \quad (1)$$

荧光寿命  $\tau$  是发光强度衰减到初始值  $I_0$  的  $1/e$  时所需的时间。

一般, 如果一个线性系统在  $e(t)$  激发下的响应为  $K(t)$ , 那么, 这个系统对任意形式的均匀弱激发  $e(t)$  的响应  $F(t)$  可以表示为<sup>[8]</sup>

$$F(t) = \int_0^t e(t-t') K(t') dt' = e(t) * K(t) \quad (2)$$

即  $F$  是  $e$  和  $K$  的卷积。这个关系可以用 Laplace 变换写为

$$F(s) = \hat{e}(s) K(s) \quad (3)$$

对于(1)式描述的体系,

$$K(t) = e^{-t/\tau}, \quad K(s) = \frac{1}{s + 1/\tau} \quad (4)$$

### 1.2 由调制度的变化 $m$ 和相位差 $\phi$ 得到

设激发光是正弦调制的

$$e(t) = A \left[ 1 + \frac{B}{A} \sin(2\pi f t) \right] \quad (5)$$

调制度  $m = B/A$ 。对  $e(t)$  激发下(4)式描述的体系, 由(2)或(3)式可以得出在稳定状态下它的发光强度正比于

$$F(t) = \frac{B/A}{\sqrt{1 + (2\pi f \tau)^2}} \sin[2\pi f t - \arctan(2\pi f \tau)] = \frac{1}{\sqrt{1 + (2\pi f \tau)^2}} \sin(2\pi f t - \phi) \quad (6)$$

在  $e(t)$  激发下稳态发光  $F(t)$  随时间的变化见图 1。由调制度的变化

$$m = \frac{1}{2} = \frac{1}{\sqrt{1 + (2\pi f \tau)^2}} \quad (7)$$

收稿日期: 2006-07-05, 修订日期: 2006-10-16

基金项目: 国家自然科学基金项目(10374002, 10434030)资助

作者简介: 冯颖, 女, 1982年生, 北京交通大学光电子技术研究所研究生

\*通讯联系人 e-mail: shhhuang@science.njtu.edu.cn

可以得到荧光寿命

$$= \frac{\sqrt{m^2 - 1}}{2f} \tag{8}$$

同样，由发射光相对于激发光的相位延迟，也可以得到

$$= \frac{\tan(\phi)}{2f} \tag{9}$$

## 2 实验

### 2.1 仪器设备与实验方法

实验装置主要包括发光激励源、荧光信号探测系统和数据采集记录系统(见图 2)。LED 是发光激励源;光谱仪、光电倍增管及其电源组成了荧光信号探测系统;示波器和计算机构成数据采集记录系统。

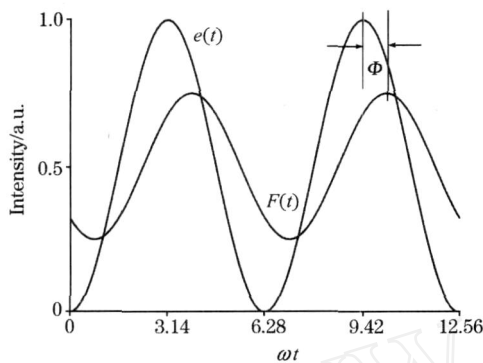


Fig. 1 The steady state luminescence waveform under a sinusoid modulated  $e(t)$  excitation

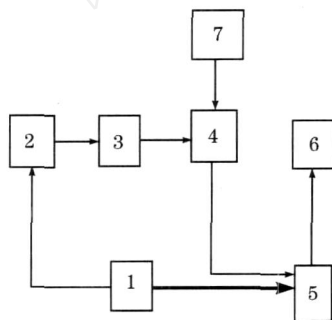


Fig. 2 Experimental setup

1: LED and driver; 2: Sample;

3: Spectrometer; 4: Photomultiplier tube;

5: Digital oscilloscope; 6: Computer; 7: PMT power supply

根据移相法的要求，我们自行设计制作了 LED 发光激励源的驱动电路，使发光二极管发射具有一定频率和调制度的正弦光波。电路由以文氏电桥振荡器为基础的可调频率的正弦波产生电路、电位提升电路、正弦波幅度调节电路以及发光二极管驱动电路四部份组成。

### 2.2 样品

实验中所采用的样品为  $\text{Eu}_2\text{L} \cdot 3 \cdot \text{nH}_2\text{O}$  ( $\text{L} = \text{C}_4\text{H}_4\text{O}_4$ )，激发光激发  $\text{Eu}^{3+}$ ，测量它的  ${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_2$  发射，对应波长为 622

nm。

### 2.3 实验过程

紫色发光二极管发出的 408 nm 的调制光波照射到荧光样品上，激发样品产生荧光。将光谱仪调节在发射光谱的峰值位置，光电倍增管输出的电信号进入数字示波器，显示出发光波形，输入计算机进行数据处理。

激励光源的正弦电流信号作为示波器的触发信号。激励光的波形也用这个系统测量和处理。

### 2.4 数据处理

以合适的拟合函数式，利用 Origin 软件的非线性最小平方拟合来处理数据<sup>[9]</sup>，可以直接从拟合参数中得到荧光寿命。

由于触发电平的影响，激发光波形在示波器上具有初相位  $2ft_0$ ，因此用函数

$$e(t) = A + B_1 \sin[2f(t - t_0)] \tag{10}$$

拟合。参数  $A$  表示直流分量， $B_1$  为调制波的振幅， $f$  是调制波的频率，所有参数均可通过拟合确定。拟合得到  $A = 0.64011 \pm 0.00035$ ， $B_1 = 0.59689 \pm 0.00052$ ， $f = 192.5684 \pm 0.0852$  Hz， $t_0 = (-0.340 \pm 0.001)$  ms。

发射光的波形用函数

$$F(t) = k \left\{ A + \frac{B_1}{\sqrt{1 + (2f)^2}} \sin[2f(t - t_0) - \arctan(2f)] \right\} \tag{11}$$

拟合，式中  $k$  为比例系数，就是荧光寿命。参数  $A$ ， $B_1$ ， $f$ ， $t_0$  用对激发光波形拟合得到的数值，拟合发光波形得到  $k = 1.254 \pm 0.006$ ，样品  $\text{Eu}_2\text{L} \cdot 3 \cdot \text{nH}_2\text{O}$  ( $\text{L} = \text{C}_4\text{H}_4\text{O}_4$ ) 中  $\text{Eu}^{3+}$  离子激发态  ${}^5\text{D}_0$  的寿命 ( $\tau = 0.680 \pm 0.002$ ) ms。

拟合结果见图 3。

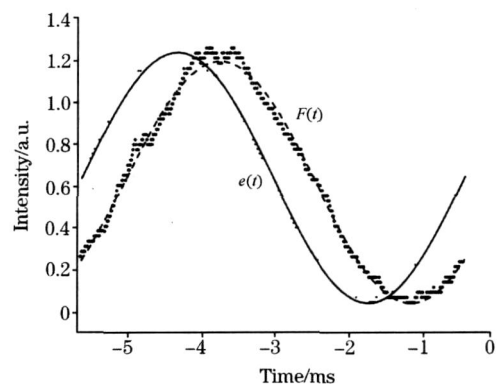


Fig. 3 Fitting result, assuming the excitation waveform contain only basic frequency

$F(t)$  : exp; : fitted;  $e(t)$  : exp; —: fitted

## 3 讨论

### 3.1 激发波形中的高次谐波

正弦调制测量荧光寿命所使用的激励源，理想情况下应当是简谐振荡调制的，其输出波形成标准正弦，只有频率  $f$  的基频成分。实际上，由于电路中的非线性以及发光二极管亮度——电压特性的非线性，实际的调制信号中，除基频  $f$

外, 往往还含有高频  $2f, 3f$  等高次谐波成分。高频成分的出现, 将导致调制度  $m$  以及相位差  $\phi$  发生变化, 从而影响结果。

如果忽略激发中的高频分量而将其而视为只有基波, 高频  $2nf$  对“ $(2nf)$ ”的贡献转化为只含有唯一频率的“ $2f(n)$ ”。因此, 如果处理中忽略了激发中含有的高次谐波分量, 将使荧光寿命的测量结果比真实值偏大。但并未见有关这方面的讨论内容被报道。在以下的处理中, 作者考虑了激发波形中含高次谐波的情况。

把激发光波形作傅里叶展开, 得到如图 4 所示的频谱。

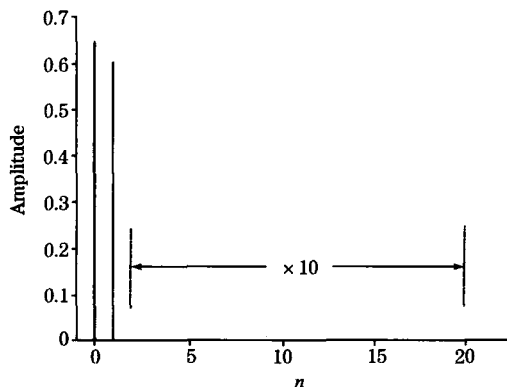


Fig 4 The spectrum of the excitation waveform

用具有频率高阶量这样的电路去驱动发光二极管发光时, 将会对测量的结果造成影响。一般, 按照傅里叶级数展开, 激发波函数写为

$$e(t) = \frac{A_0}{2} + \sum_{n=1}^{\infty} (A_n \cos 2nft + B_n \sin 2nft) \quad (12)$$

合并同频率项并简化(12)式, 有

$$e(t) = 1 + \sum_{n=1}^{\infty} a_n \sin(2nft + \phi_n) \quad (13)$$

傅里叶级数中各量之间有如下关系:  $a_n = \frac{2}{A_0} \sqrt{A_n^2 + B_n^2}$ ,  $\phi_n$

$= \arctan \frac{A_n}{B_n}$ 。相应地, 发射波函数是

$$F(t) = 1 + \sum_{n=1}^{\infty} a_n m_n \sin(2nft + \phi_n - \tau_n) \quad (14)$$

其中  $m_n \arctan 2nft$ ,  $m_n = \frac{1}{\sqrt{1 + (2nft)^2}}$ , 是第  $n$  阶高频造成

的相位差及调制度变化。最终可观测的波形是各个傅里叶成分的叠加。为消除高次谐波的影响, 我们可以对数据作这样处理: 用(13)式拟合激发波形, 确定直流分量、基频  $2f$  以及直到某个适当的  $N$  的各阶 ( $n = 1, 2, \dots, N$ ) 分量的幅度  $a_n$  和相角  $\phi_n$ 。用(14)式和已经确定的  $2f, a_n, \phi_n$  来拟合发射波形, 确定唯一的变量  $\tau$ 。从而在高次谐波不可忽略的情况下得到更准确的荧光寿命值。

对波形实际作傅里叶展开时, 求和上限只能取到有限值  $N$ 。由于测量中存在着噪声的影响, 过大的  $N$  并没有实际意义。而且, 在这种用相位法测量寿命的方法中, 要求激发源有良好的简谐性, 高次谐波的影响是次要的。我们的实验

中, 二次以上高次谐波的功率与总功率的比为,

$$\frac{\int_0^{1/f} [e(t) - (1 + \sum_{n=1}^2 a_n \sin(2nft + \phi_n))]^2 dt}{\int_0^{1/f} [e(t)]^2 dt} = 0.323\%$$

所以  $N = 3$  的高次谐波引起的误差不会超过 0.323%。我们取  $N = 3$ 。按照(13)式拟合激发波, 确定参数项  $f$ , 以及  $a_n$  和  $\phi_n$  ( $n = 0, 1, 2, 3$ ), 进而利用(14)式拟合发光波形确定比例系数  $k$  和寿命  $\tau$ 。拟合结果如图 5 所示。这样得到的  $\tau = (0.670 \pm 0.002)$  ms。正如我们在上面所分析的, 与把激发波看作简谐波得到的结果比较, 得到的  $\tau$  略有减小。

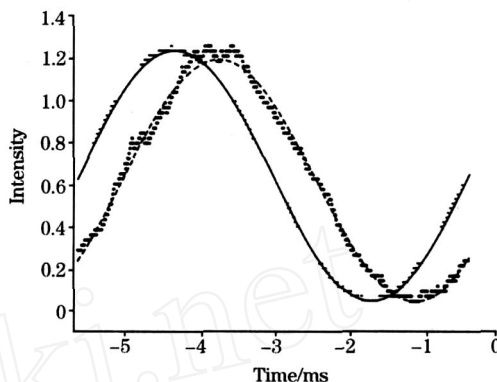


Fig 5 Fitting result, taking high order (up to 3) harmonics of the excitation waveform into account

$F(t)$ , : exp; : fitted;  $e(t)$ , : exp; —: fitted

应用傅里叶级数展开处理数据, 将使得在高次谐波不可忽略的情况下得到更准确的荧光寿命值。

### 3.2 非指数/多指数衰减的发光体系

荧光样品发光强度比例于激发光源强度, 并假设发光衰减呈单指数形式, 相位延迟  $\tau$  和荧光寿命  $\tau_f$  的关系才能用(9)式描述。当发光多指数形式衰减或具有多个单指数衰减的发光中心时, 其处理方法显然不能与前相同。在本文中, 设荧光体系中有  $N$  种发光中心, 每种中心的概率为  $P_j$ ,  $j = 1, 2, \dots, N$ ,  $\sum_{j=1}^N P_j = 1$ 。这  $N$  种发光中心各自按指数规律衰减, 寿命分别为  $\tau_j$ 。在均匀弱激发下, 宏观上观测到的发光为

$$F(t) = \sum_{j=1}^N P_j e^{-t/\tau_j} \quad (15)$$

式中  $P_j, \tau_j$  分别为荧光体系的第  $j$  个指数分量的幅度以及衰减时间。用角频率  $2f_k$  的简谐波调制的激发源激发, 用第 1 节的方法分析, 我们得到, 发光波形与激发源的相位差以及调制度变化分别为

$$k = \arctan \frac{I_k}{R_k} \quad (16)$$

$$m_k = \frac{I_k}{\sqrt{R_k^2 + I_k^2}} \quad (17)$$

其中

$$I_k = \sum_{j=1}^N \frac{2 f_k P_j \tau_j}{1 + (2 f_k \tau_j)^2} \quad (18)$$

$$R_k = \sum_{j=1}^N \frac{P_j}{1 + (2 f_k \tau_j)^2} \quad (19)$$

由每个频率  $2f_k$ , 可以得到 (16) 和 (17) 式两个含有  $2N$  个未知数的方程。改变频率  $2f_k$ , 进行  $M$  次测量 ( $k = 1, 2, \dots, M$ ;  $M > N$ ), 就可以通过拟合得到  $P_j$  和  $\tau_j$ 。

在实际测量荧光寿命时, 往往不清楚样品体系的具体情况。因而需要采用一系列调制频率重复试验, 得到的数据按照以上叙述的方法处理。这种方法极大地增加了结果的真实性, 尤其是适用于非指数/多指数衰减的发光体系。

## 4 总 结

正弦调制频率及调制度与荧光寿命的关系可以用具体表

达式来描述。非线性最小平方曲线拟合处理实验数据得出荧光寿命。正弦调制频率在很大的范围连续可调, 相应地, 能够检测的荧光寿命量级就较宽。从讨论中看出, 激发波形中的高次谐波分量对测量结果的有一定影响, 提高简谐度或者多阶拟合都有助于得到更准确寿命值。多指数衰减在测量中的宏观表现为单一寿命值, 改变正弦调制函数的频率多次测量, 将能够得出寿命具有一定分布的体系的衰减寿命分布。解决了高次谐波分量以及多指数衰减体系对测量结果存在影响的问题, 提高使用正弦调制的相移法的适用性。

致谢: 作者感谢北京师范大学化学系金林培教授为实验提供了样品。

## 参 考 文 献

- [1] XU Xu-rong, SU Mian-zeng (徐叙琰, 苏勉曾). Luminescence Science & Luminescent Material (发光学与发光材料). Beijing: Chemical Industry Press (北京: 化学工业出版社), 2004. 627.
- [2] PAN Li-hua, DU Ji-xian, DONG Xiang-ming, et al (潘利华, 杜继贤, 董向明, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis (光谱学与光谱分析), 1995, 15(1): 5.
- [3] ZHANG Bao-di, WANG Ji-bo, LIU Yu-lan (张宝棣, 王继波, 刘玉兰). Spectroscopy and Spectral Analysis (光谱学与光谱分析), 1993, 13(6): 113.
- [4] SUO Zhi-yong, WEI Xian-wen, XU Zheng, et al (锁志勇, 魏先文, 徐 征, 等). Chinese Journal of Inorganic Chemistry (无机化学学报), 2000, 16(3): 404.
- [5] Zukauskas Arturas, Shur Michael S, Caska Remis. Introduction to Solid state Lighting, New York: Wiley Publisher, 2002.
- [6] McDonagh C, Kollé C, McEvoy A K, et al. Sens. Actuators B, 2001, 74: 124.
- [7] Andrzejewski D, Klimant I, Podbielska H. Sens. Actuators B, 2002, 84: 160.
- [8] HUANG Shi-hua, LOU Li-ren (黄世华, 楼立人). Acta Physica Sinica (物理学报), 1989, 38(3): 422.
- [9] HAO Hong-wei, SHI Guang-kai (郝红伟, 施光凯). Origin 6.0 Example Tutorial (Origin 6.0 实例教程). Beijing: China Electric Power Press (北京: 中国电力出版社), 2000. 88.

# The Analysis of Sinusoidal Modulated Method Used for Measuring Fluorescence Lifetime

FENG Ying, HUANG Shi-hua\*

Institute of Optoelectronics and Technology, Beijing Jiaotong University, Key Laboratory of Luminescence and Optical Information Ministry of Education, Beijing 100044, China

**Abstract** This paper has built a system with a sinusoidal modulated LED as the excitation source. Such exciter was used upon the sample  $\text{Eu}_2\text{L}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$  ( $L = \text{C}_4\text{H}_4\text{O}_4$ ). Both the excitation light and the  ${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_2$  emission of  $\text{Eu}^{3+}$  ion were measured. Fluorescence lifetime, which approximate to 0.680 ms, can then be obtained from the measured excitation and fluorescence waveforms by non-linear least square curve fitting based on the principle of phase-shift measurement of fluorescence lifetime. Data processing methods considering respectively the high order harmonics in the modulation and multi-exponential decay of the fluorescence were discussed. A method of utilizing Fourier series expandedness to amendatory the result was put forward. Accordingly, the applicability for phase-shift method was expanded as well as a more exact result was acquired.

**Keywords** Fluorescence lifetime; Phase-shift method; High-order harmonics; Multi-exponential decay

(Received Jul. 5, 2006; accepted Oct. 16, 2006)

\*Corresponding author