

两种新的时间分辨光谱技术

锁志勇 魏先文 徐正* 刘德军 余智 张昀 李重德

(南京大学配位化学研究所, 配位化学国家重点实验室, 南京 210093)

时间分辨光谱(Time Resolved Spectrometry, TRS)是研究物质光物理、光化学性质的基本手段。本文简要介绍了这一领域中较新的两种光谱技术: 相调制法测定荧光寿命(Phase-shift and Demodulation Measurement of Fluorescence Lifetime)和利用步进扫描(Step-Scan)技术测量瞬态红外吸收光谱。

关键词: 时间分辨光谱 相调制法 步进扫描

分类号: O657.3

0 引言

时间分辨光谱是指样品受到激发以后,一段时间内在某一频域上光谱随时间的变化。对于瞬态物种(激发单重态、激发三重态、过渡态、自由基、电荷分离态等)的检测及其动力学过程的跟踪,一般需要借助时间分辨光谱(TRS)。在新型光电转换材料开发、光催化/光合成机理揭示、光动力学治疗新药研究以及物质基本光物理、光化学性质表征等诸多领域,TRS都是一个非常有力的研究工具。

TRS按检测光的来源可以分为时间分辨发射光谱和时间分辨吸收光谱,前者包括TRS荧光光谱^[1]和TRS喇曼光谱^[2],检测样品被激发后的自身辐射;后者一般指TRS-UV/Vis^[3]和TRS-IR光谱^[4],检测光由仪器光源提供。近年来时间分辨的NMR/EPR技术也有一定发展^[5,6]。

时间分辨光谱仪的配置形式很多,但大多数都由脉冲激发源和检测器两部分构成,激发源可以有光激发、电子束激发^[7]、电脉冲激发^[8]和化学激发(Stop Flow技术)^[9]等形式,其中较为常见的是用光脉冲和辐射脉冲激发样品,然后观测样品荧光或吸光度随时间的变化,从而捕捉瞬态物种或解析其动力学过程,即闪光光解技术^[3]和脉冲辐解技术^[7]。检测器依据系统时间分辨率的不同而有所区别,对于时间分辨率在ns级或 μs 级的仪器,一般可以采用快响应的光电倍增管(PMT)并且用电子线路实现激发源与检测器的同步;而对于ps级的仪器,多采用电荷耦合装置(CCD)、条纹相机(Streak Camera)或双重二极管阵列(Dual Diode Array)作检测器,利用光学方法实现激发源与检测信号的同步^[10];现代的时间分辨光谱技术已较为成熟,已经有fs级的时间分辨光谱仪^[11]。

相对于上述仪器配置,还有一种较特殊的时间分辨荧光光谱系统:相调制荧光光谱系统,其最大特点是采用连续光作为激发源来检测物质的荧光寿命,特别适用于多荧光发色团复杂

收稿日期:1999-08-05。收修改稿日期:1999-09-22。

国家自然科学基金资助项目(No. 29823001和No. 29971016)和江苏省自然科学基金资助项目。

* 通讯联系人。

第一作者:锁志勇,男,26岁,博士生;研究方向:富勒烯化学,光电材料。

体系的解析^[12]。另外由于中红外(MIR)区谱图自身具有复杂精细结构的特点,要求测定仪器有较高的频率分辨率,因而长期以来难于实现在 MIR 区的时间分辨测量,近年来发展的步进扫描系统可以较好的解决这一问题^[13]。南京大学化学化工学院近年建立了这两种瞬态光谱系统,本文将对这两种系统的原理及仪器配置做一简要介绍。

2 相调制法测定荧光寿命

相调制法 (Phase-shift and Demodulation Measurement) 是相对于脉冲法 (Pulse Measurement) 的一种测定荧光发色团寿命的方法,其基本概念最早出现在本世纪二十年代^[14],六十年代末由 Spencer 和 Weber 加以改进^[12],奠定了这种方法的基础,到八十年代已逐渐成熟,出现了商品化的测量系统,成为测定复杂体系荧光寿命的一个重要手段。

与脉冲法不同,相调制法测定荧光寿命时使用连续光来激发样品,但激发光事先经过调制,这样,样品发出的荧光也是调制光,依据调制强度和相位的变化就可以解析荧光寿命。

在实验中,需要测定相移 (phase-shift) 和解调因子 (demodulation factor) 两个参量,若将调制频率为 ω 的激发光描述为 $f(t) = a + b\sin\omega t$, 样品荧光可描述为 $F(t) = A + B\sin(\omega t - \varphi)$, 其中 φ 为相移并定义 $m = Ba/Ab$ 为解调因子 (图 1), 相移 φ 和解调因子 m 与调制频率 ω 相关, m 随 ω 增大而减小, φ 随 ω 增大而增大。考虑一个单一荧光发射过程,它遵守指数衰减规律,可以表达为 $I(t) = I_0 e^{-t/\tau}$; 对它作 Fourier 变换,有

$$R = \int_0^{\infty} I(t) \cos\omega t dt = \int_0^{\infty} I_0 e^{-t/\tau} \cos\omega t dt$$

$$I = \int_0^{\infty} I(t) \sin\omega t dt = \int_0^{\infty} I_0 e^{-t/\tau} \sin\omega t dt$$

其中 $\varphi = \arctan \frac{I}{R}$, 可以解出 $\tau_{\varphi} = \omega^{-1} \tan \varphi, m = \sqrt{R^2 + I^2}$, 类似地可以解出 $\tau_m = \omega^{-1} [(1/m^2) - 1]^{1/2}$ 。

这样就可以得到两个与样品荧光寿命相关的参量: τ_{φ} 、 τ_m , 但需要注意的是仅仅在被测量体系中只有一种荧光发色团 (荧光寿命单一) 并且荧光衰减遵守一级指数衰减规律时,才有 $\tau_{\varphi} = \tau_m = \tau$, τ 为真实荧光寿命,而在其它大多数情况下 τ_{φ} 、 τ_m 并不能直接作为荧光寿命。当体系中有多种荧光发色团时,在某一波长处的荧光可以表达为 $I(t) = \sum \alpha_i e^{-t/\tau_i}$, 其中 α_i 为第 i 种荧光所占权重, τ_i 为第 i 种荧光寿命。作 Fourier 变换,可以推出

$$R = \int_0^{\infty} \left(\sum_i \alpha_i e^{-t/\tau_i} \right) \cos\omega t dt = \sum_i \left(\int_0^{\infty} \alpha_i e^{-t/\tau_i} \cos\omega t dt \right)$$

$$I = \int_0^{\infty} \left(\sum_i \alpha_i e^{-t/\tau_i} \right) \sin\omega t dt = \sum_i \left(\int_0^{\infty} \alpha_i e^{-t/\tau_i} \sin\omega t dt \right)$$

考虑到定积分公式: $\int_0^{\infty} ce^{-\alpha x} \cos bx dx = ca/(a^2 + b^2)$ 和 $\int_0^{\infty} ce^{-\alpha x} \sin bx dx = cb/(a^2 + b^2)$ 简化为:

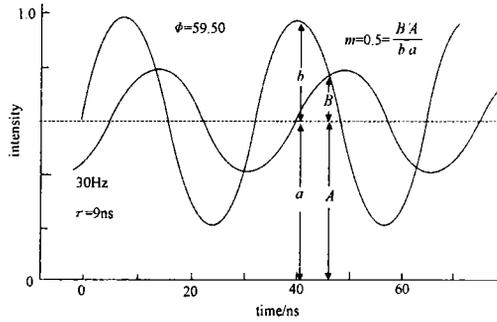


图 1 相调制法原理

Fig. 1 Principle of phase-demodulation measurement.

A sample with a fluorescence lifetime of 9ns is shown, whose phase shift is 59.50° and demodulation factor is 0.5.

$R = \sum_i \frac{\alpha_i \tau_i}{1 + \omega^2 \tau_i^2}$ 和 $I = \sum_i \frac{\alpha_i \tau_i^2 \omega}{1 + \omega^2 \tau_i^2}$, 再结合 $\varphi = \arctan \frac{I}{R}$ 、 $m = \sqrt{R^2 + I^2}$, 这样在 i 个调制频率下分别测定 φ_i 、 m_i , 就可以得到 $2i$ 个方程, 进而解出 α_i 、 τ_i 。

在进行实验时, 为了提高实验的精确度, 实际上不论体系中包括几个荧光成份, 都采用多频率分析技术(MFA), 即按中心频率公式选取中心频率 ω_0 再向上、向下扩展, 选定一组不同调制频率(ω_i)的调制光, 分别激发样品, 然后可以测得一组相移(φ_i)和一组解调因子(m_i), 再利用上述公式及误差公式以 α_i 、 τ_i 为自由变量拟合, 使方差最小的 τ_i 、 α_i 即为被测体系中荧光寿命及其权重。误差拟合的公式有很多形式, 下述为其中之一:

$$X^2 = \sum_{\omega} \left[\frac{1}{\sigma_{\phi_{\omega}}^2} (\phi_{\omega} - \phi_{\omega}^c)^2 + \frac{1}{\sigma_{m_{\omega}}^2} (m_{\omega} - m_{\omega}^c)^2 \right]$$

其中 $\sigma_{\phi_{\omega}}^2$ 、 $\sigma_{m_{\omega}}^2$ 为 ϕ 和 m 的估计误差, ϕ_{ω}^c 、 m_{ω}^c 为频率 ω 下 ϕ 和 m 的计算值。

相调制法的基本装置包括激发光源(cw)、调制器、单色仪和光电倍增管(PMT)等。激发光源可以选用氙弧灯、汞灯或激光器, 氙弧灯、汞灯的优点是价格适宜并且激发波长连续可调, 但光强弱, 不适于检测荧光较弱的物质; 激光单色性好、强度大, 适合于检测荧光较弱的样品, 具有激光诱导荧光(LIF)的一般特点^[15], 并且可以省去激发光单色仪, 但可获得的激发波长少并且价格昂贵。调制器一般有电光调制器和声光调制器两类^[14, 16], 常见的有 Kerr 池、Pockel 池、Debye-Sears 池等。我们实验室所购 SLM-Aminco 公司 SLM48000DSCF 荧光仪选用 Pockel 池^[17], 属于二阶电光调制器, 调制频率范围 1~310MHz, 相应测量的荧光寿命范围为 7ps~15 μ s。就整个系统而言, 采用相调制法的仪器要比性能相当的采用脉冲法的仪器节省很多费用。

早期相调制法受光源、调制器性能等技术因素的限制发展较慢, 六、七十年代调制器一般为单频或双频, 调制频率只有几十兆赫, 后来调制器的性能有了很大提高(调制频率连续可调、调制范围宽), 并且出现了交叉相关测量技术(Cross-correlation Detection)^[18]和相敏感测量技术(Phase-sensitive Detection)^[19], 使这种方法渐渐成熟。在八十年代就有人采用激光作光源, 利用相调制法测定荧光寿命, 实现了 ps 级的时间分辨率^[20]。SLM48000DSCF 采用数字序列傅立叶(Digital Sequential Component Fourier, DSCF)技术和交叉相关测量技术, 光调制频率和 PMT 调制频率的差值 $\Delta\omega$ 可调(1~1560Hz), 进一步提高了其测定的时间分辨率。

Weber 在 80 年代即已证明, 采用相调制法的仪器在理论上最少只需要具有 n 个调制频率, 即可以测定具有 n 个荧光寿命的体系^[21]。目前受到仪器分辨率等技术因素的限制, 虽然暂时还不能仅用 n 个调制频率就测出 n 个荧光寿命, 但对于多荧光发色团体系的解析来说, 相调制法仍然是非常有力的手段, 这一点则是脉冲法测量所难以解决的问题。SLM48000DSCF 可以很方便地解析在同一发射波长含有 5 个荧光成份的系统。相调制法设备比较简单, 但通常只能给出衰减时间常数的数值而很难直接得到

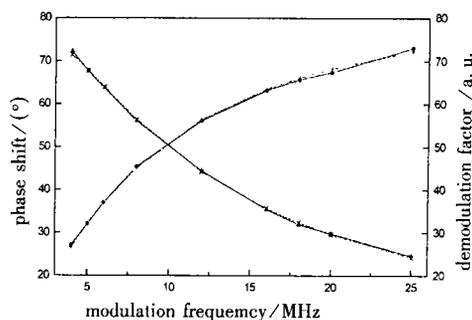


图 2 硫酸喹啉的相移/解调因子-频率图
Fig. 2 Relationship between phase shift/demodulation factor and modulation frequency of quinine sulphate, in which phase shift increases but demodulation factor decreases as frequency increases. The solid line is experiment data and the dash line is simulated data

时间分辨光谱,这是其局限性所在。

硫酸喹啉在 $0.1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}\text{H}_2\text{SO}_4$ 中的荧光寿命 $\tau = 19.4\text{ns}^{[22]}$, 选取中心调制频率为 12MHz , 以 2MHz 为间隔, 扩展到 4MHz 和 25MHz , 对样品进行激发 ($\lambda_{\text{max}} = 403\text{nm}$), 得到相移 φ 和解调因子 m 相对于 φ 的变化, 对此进行拟合, 得 $\tau = 19.97\text{ns}$ (图 2)。可以看到, 实测值与文献报道用脉冲法所测符合得很好, 并且 X^2 很小 (1.9), φ 和 m 的计算值与测量值也符合得很好, 平均偏差小于 1%。

3 利用步进扫描技术测定瞬态吸收光谱

测定物质在 UV-Vis-NIR 区域的瞬态吸收光谱, 一般采用色散型闪光光解装置。这类仪器一般是对探测光采用光栅单色仪进行分光, 在选定探测波长处记录 ΔOD 的衰减曲线 (采用快速光电管作检测器, 或者采用 CCD、光学多道分析器 (OMA)、条纹相机等检测器同时记多个波长处 ΔOD 的衰减曲线)。

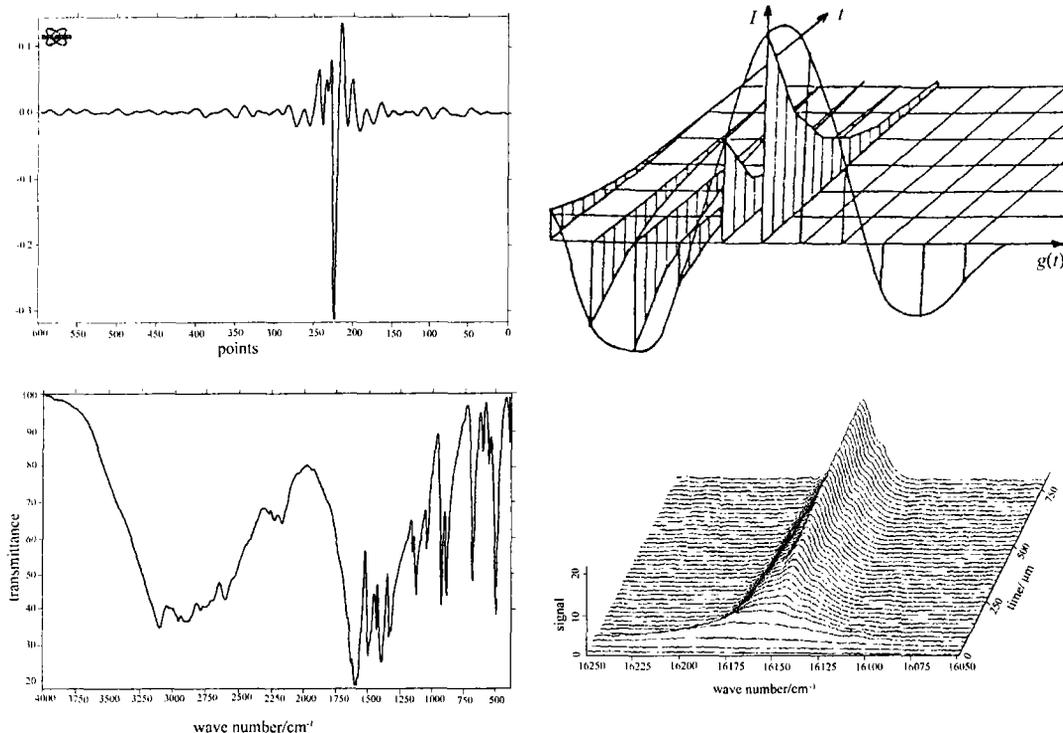


图 3 (a) FTIR 原理, 由二维干涉图得到二维 MIR 图谱

(b) Step Scan 原理, 由三维干涉图得到三维 MIR 图谱

Fig. 3 (a) Principle of FTIR, in which 2-D MIR spectrum is from 2-D interferogram

(b) Principle of Step Scan, in which 3-D MIR spectrum is from 3-D interferogram

同样的方法不适用于 MIR 区域谱图的采集, 物质在此区域有非常精细的振动、转动跃迁, 因此现代中红外光谱仪普遍采用 Fourier 变换技术来达到较高的频率分辨率。步进扫描技术是由 R. A. Palmer 和 A. Simon 于八十年代末提出与 FTIR 相适应的一种新技术, 可以用于记录 MIR 区瞬态吸收光谱^[13, 23]。经典的 FTIR 技术中, Macklson 干涉仪中动镜做匀速运动, 同时仪器记录光强信号, 得到一条干涉谱线 (图 3a), 这样一张谱图只有在动镜完成一个移动过程以后

才能得到,而从机械角度讲,动镜扫描频率的物理极限不超过 50Hz,限制了时间分辨率的提高。而在步进扫描中时间分辨率不是依靠动镜移动速度实现的,动镜的移动被分为许多步(step),仪器仅仅在动镜停止在某一步时才记录信号,这样干涉谱线就被分为一些点。如果在动镜停稳以后给样品一个激发脉冲,然后利用快响应探测器(PMT)结合快速数据采集板记录样品在这一步位置上 ΔOD 随时间的变化,并在每一步都重复这一过程,就可以得到样品在受到激发以后整个干涉图谱随时间的变化,然后取出某个时刻 t 的干涉谱线作 Fourier 变换,就可以得到样品在受激发后 t 时刻的 MIR 吸收光谱(图 3b)。因此,在进行实验时,要在所有数据采集完成(动镜走完所有的 Step)后统一解出按时间顺序排列的 3D 光谱。特别要注意的是在实验过程中所观测的过程在每次激发后都必须是完全一致、可重复的、样品不能有光降解等现象。对于易分解样品一般选用流动样品池。

步进扫描技术最早出现于八十年代,目前采用步进扫描技术的 FTIR 光谱仪已由德国 Bruker 公司实现商品化,给这样的仪器外接一个激光源并解决同步问题,即可完成 MIR 区域的闪光光解实验。系统建立很方便,符合模块化系统配制的要求。这样的系统由于仍然采用 FTIR 技术,所以能达到和稳态 FTIR 相同的频率分辨率。具体实验中这个频率分辨率和动镜移动的步数有关,分辨率越高,则动镜移动的步数越多,每一步移动的距离越小,相应的采谱时间越长。对于系统的时间分辨率来说,并不受步进扫描技术本身的限制,而仅仅受激光脉宽、同步方式、检测器响应时间、快速数据采集板性能的影响。目前商品化的仪器在 MIR 区域所能达到的最快的时间分辨率为 5ns,适合于观测大多数三重态、反应过渡态和分子间能量/电荷传递过程。

与 MIR 区域的情况类似,在 UV-Vis-NIR 区域如果换用相应的光源/分束器/检测器,也可以使用 FT-StepScan 技术来观测瞬态吸收光谱,这样就实现了在同一台仪器上观测 UV-Vis-NIR-MIR-FIR 区域瞬态吸收光谱,非常方便,并且节省仪器费用。我们建立的纳秒级瞬态吸收光谱系统采用 Spectra Physics 公司的 Nd: YAG(激光脉宽: 8ns)激光器作为激发光源, Bruker 公司的 IFS 66/S 光谱仪做探测器,可以在 25000 ~ 400 cm^{-1} 范围内达到 5ns ~ 10 μs 的时间分辨率和 $\geq 0.25\text{cm}^{-1}$ 的频率分辨率。

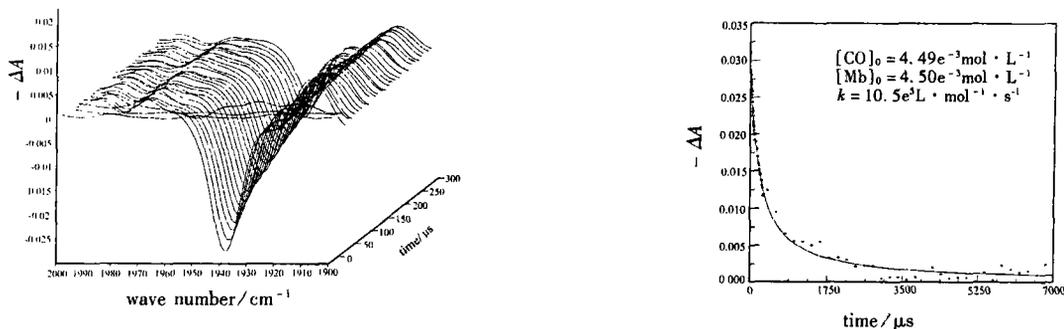


图 4 (a) FeC-O 在 1944 cm^{-1} 处的特征振动 (b) 1944 cm^{-1} 处振动衰减的二级动力学拟合

Fig. 4 (a) Characteristic vibration of FeC-O at 1944 cm^{-1} . Frequency resolution: 8 cm^{-1} , time resolution: 10 μs
(b) Simulating of 1944 cm^{-1} vibration as second dynamics

对于肌红蛋白的 CO 中毒机理研究来说,在 MIR 区的 FeCO 振动(1944 cm^{-1})是一个很灵敏的探针,可以反映 CO 与肌红蛋白的结合速度。图 4a 所示为在 7mMD₂O 中 CO 与肌红蛋白在光

解离后的再结合过程,图4b为 1944cm^{-1} 处 ΔA 随时间的变化以及按二级反应过程拟合出的反应速率常数^[24]。

利用 Step Scan 技术也可以观测荧光瞬态光谱^[23],其基本原理和仪器配置与上面所讲类似。除了可以用来做闪光光解实验,Step Scan 技术还可以有其他用途,诸如 Lockin 和 Mapping 等,将另文讲述。

4 结 论

TRS 技术是研究快速过程的有力工具,已在新材料开发、新药研制等诸多方面得到广泛应用,并且得到了许多用其它手段难以取得的信息。随着光电原件制造水平的提高,相调制技术和步进扫描技术自身也将进一步发展,实现灵敏度、时间/频率分辨率上的突破。我们相信随着科学技术的进步。这两种新技术可提供的信息将日益丰富,其重要性也将日益为人们所认识。

参 考 文 献

- [1] Badea M. G., Brand L. *Methods Enzymol.*, **1971**, **61**, 378.
- [2] Jas Gouri S., Wan C. Z., Johnson C. Z. *Appl. Spectrosc.*, **1995**, **49**, 645.
- [3] YU Qun(虞 群), YE Jian-Ping(叶建平), SHOU Han-Ceng(寿涵森) *Huaxue Tongbao (Chemistry)*, **1989**, (5), 51.
- [4] Rimai L., Kaiser E. W., Schwab E. *Appl. Opt.*, **1992**, **31**, 350.
- [5] Montigny F., Brondeau J., Canet D. *Chem. Phys. Lett.*, **1990**, **170**, 175.
- [6] McLauchlan K. A., Yeung M. T. *Electron Spin Reson.*, **1994**, **14**, 32.
- [7] Von Sonntag C., Schuhmann H. -P. *Methods Enzymol.*, **1994**, **233**, 3.
- [8] WU Lin-Lin(吴琳琳), LIN Zhong-Hua(林仲华) et al *Huaxue Tongbao (Chemistry)*, **1999**, (2), 32.
- [9] Christian G. D., Ruzicka J. *Anal. Chim. Acta*, **1992**, **261**, 11.
- [10] Ebbesen T. W. *Rev. Sci. Instrum.*, **1988**, **59**, 1307.
- [11] Abrash S., Repinec S., Hochstrasser R. M. *J. Chem. Phys.*, **1990**, **93**, 8658.
- [12] Spencer R. D., Weber G., Ann N. Y. *Acad. Sci.*, **1969**, **158**, 361.
- [13] Palmer R. A., Manning C. J., Rzepiela J. A. et al *Appl. Spectrosc.*, **1989**, **43**, 193.
- [14] Gaviola Z. Z. *Phys.*, **1926**, **42**, 853 .
- [15] Harrington M. F. et al *Anal. Chem.*, **1975**, **47**, 271.
- [16] Birks J. B., Dyson D. J. *J. Sci. Instrum.*, **1961**, **38**, 282.
- [17] Müller A., Lumry R., Kokubun H. *Rev. Sci. Instrum.*, **1965**, **36**, 1214.
- [18] Lakowicz J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Plenum Press: New York, **1983**, 78.
- [19] Lakowicz J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Plenum Press: New York, **1983**, 95.
- [20] Gratton E., Limkeman M. *Biophys. J.*, **1983**, **44**, 315.
- [21] a) Weber G. *J. Phys. Chem.*, **1981**, **85**, 949 b) Jameson D., Weber G. *J. Phys. Chem.*, **1981**, **85**, 953.
- [22] Lopez-Delgado R., Tramer A., Munro I. H. *Chem. Phys.*, **1974**, **5**, 72.
- [23] Hartland G. V., Xie W., Simon A. et al *Rev. Sci. Instr.*, **1992**, **63**, 3261.
- [24] Plunkett S. E., Chao J. L., Tague T. J. et al *Appl. Spectros.*, **1995**, **49**, 702.

Two Novel Time Resolved Spectrometry Systems

SUO Zhi-Yong WEI Xian-Wen XU Zheng* LIU De-Jun

YU Zhi ZHANG Yun LI Chong-De

(*Coordination Chemistry Institute, State Key Laboratory of Coordination Chemistry,
Nanjing University, Nanjing 210093*)

Time resolved spectrometry (TRS) is a might tool for the research of the photophysical and photochemical properties of materials. Two novel techniques in this field are introduced at this article, namely, phase-shift and demodulation measurement of fluorescence lifetime and time resolved absorption spectrometry based on Step Scan.

Keywords: time resolved spectrometry phase-shift and demodulation measurement
step scan