

文章编号: 1001-3806(2005)02-0126-04

时间分辨荧光光谱中信噪比与测量精度的提高

王 鲲^{1,2}, 张心正^{1,2}, 王振华^{1,2}, 唐莉勤^{1,2}, 吴 强^{1,2}, 许京军^{1,2*}

(1. 南开大学 泰达应用物理学院 超快光子学实验室, 天津 300457; 2 南开大学 物理科学学院 光子学中心, 天津 300071)

摘要: 建立了随机噪音的经验模型, 并通过计算机模拟超短寿命的荧光衰减过程, 研究了利用取样法测量时间分辨荧光光谱实验中实验参数的选取对实验结果的影响。结果表明, 增大“门宽”可以提高信噪比, 从而实现微弱荧光信号的测量; 减小“延时”可以提高时间分辨率, 即提高测量精度; 选取不同的“门宽”时, 测量结果中各个衰减组分初始荧光强度的比例关系会发生改变, 并推导出测量值与实际值的对应关系, 可以从测量结果反推出实际的比例。另外, 测量了 GaP 样品的时间分辨荧光光谱, 实验结果验证了所提出的随机噪音经验模型以及提高信噪比与测量精度的方法。并且利用该结论测量了 LN:Er 样品微弱荧光的时间分辨荧光光谱。

关键词: 时间分辨荧光光谱; 取样法; 信噪比; 测量精度

中图分类号: O433.5 **文献标识码:** A

Enhancement of SNR and precision in measurement of time resolved fluorescence spectra

WANG Kun^{1,2}, ZHANG Xin-zheng^{1,2}, WANG Zhen-hua^{1,2}, TANG Li-qin^{1,2}, WU Qiang^{1,2}, XU Jing-jun^{1,2}

(1. Ultrafast Photonics Laboratory, School of TEDA Applied Physics, Nankai University, Tianjin 300457, China; 2. Photonics Research Center, College of Physical Science, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract: An experiential model of random noise is setup to simulate the ultrafast fluorescence decay for researching how the experiment parameters influence the measurement of time resolved fluorescence spectra. It is found that the SNR can be improved extremely by increasing the gating time and precision can be improved by decreasing the delaying time. So the feeble fluorescence signal can be measured and the time-resolving degree can be enhanced. The ratio between each decay component's initial intensity varies with different gating time. The relationship between them has been found and the actual value can be deduced from measurement result. The experiment results of GaP testifies our model and the simulation conclusion. This method is successfully used to measure the time resolved fluorescence spectra of LN:Er whose fluorescence is weak.

Key words: time resolved fluorescence spectra; sampling method; SNR; precision

引 言

时间分辨荧光光谱技术在材料、化学及医学研究中发挥着越来越重要的作用。在材料研究中, 当分子体系存在能量传递、生成活泼中间体或相互作用等过程时, 其荧光强度将随时间而变化。测量材料的荧光寿命, 可以获得能级结构和激发态弛豫时间等信息; 在化学反应研究中, 时间分辨荧光提供了有关分子动态结构方面的信息, 是分子结构研究中极为有用的研究手段; 根据不同组织荧光光谱时间特性的不同, 可以进行人体组织的荧光寿命成像, 从而大大提高疾病诊断的准确率^[1,2]。

取样法测量时间分辨荧光光谱实验中, 有时会因为信号微弱而无法测出其荧光光谱。目前普遍的做法是把采集探测装置的输出经由 Boxcar 积分平均微处理器接收和处理, 通过多次采集平均可将信噪比提高 $M^{0.5}$ 倍 (M 为重复测量的次数)^[3,4]。但这种重复采样的方法势必造成测量时间成倍增加, 因此, 如何更有效地提高信噪比, 实现微弱信号的测量是一个亟待解决的问题。本文中建立了实验中随机噪音的经验模型, 并在其基础上通过计算机模拟来研究实验参数的选取对实验结果的影响。通过分析得出, “延时”的大小决定了测量的精度; 改变“门宽”对测量精度没有影响, 但可以获得不同的信噪比, 在一定范围内优化选取“门宽”既可以提高信噪比又不必使采集时间过长; 测量多指数衰减的时间分辨荧光光谱, 可以从测量值反推得到实际各衰减组分初始荧光强度间的比例关系。最后通过对 GaP 样品的测量, 验证了模拟分析的结论。并且还把上述结论用来指导微弱荧光的测量, 成

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (60208003)

作者简介: 王 鲲 (1978-), 男, 硕士研究生, 现从事飞秒脉冲激光器应用的研究。

* 通讯联系人。E-mail: jixu@nankai.edu.cn

收稿日期: 2004-03-26; 收到修改稿日期: 2004-05-25

功地测量出 LN Er 样品的时间分辨荧光光谱。

1 取样法原理与噪音模型的建立

取样法是测量时间分辨荧光光谱较有效的方法^[5,6],工作原理见图 1,与光脉冲同步,电脉冲触发或

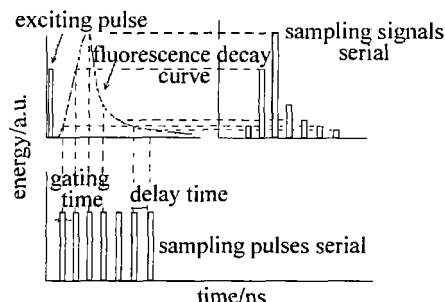


Fig 1 The sketch map of sampling method

按一定程式延时触发探测装置,探测装置按预设的时间“门宽”(t_g)对荧光信号进行采集。这样以一定的延时(t_d)逐渐改变触发时间,可以得到样品被脉冲光激发后不同时刻的一系列荧光强度。按时间的先后次序将取样信号组合在一起,就构成荧光强度的时间衰减曲线,即时间分辨荧光光谱。由极窄脉冲(δ 函数)激发,并且考虑最简单的单指数荧光衰减过程,则荧光强度表达式为:

$$P(t) = P(0) \exp(-t/\tau) \quad (1)$$

式中, $P(t)$ 为 t 时刻的荧光强度, $P(0)$ 为初始时刻的荧光强度, τ 是荧光寿命^[7]。通过取样法测得的时间分辨光谱实际上是激发光波形、仪器响应函数和实际荧光衰减函数三者的卷积。本文中主要研究实验参数对信噪比以及测量精度的影响,而仪器响应函数对这方面的影响可以忽略。此外,由于是以飞秒脉冲激光作为激发光来研究皮秒和纳秒量级的荧光衰减,激发光波形的影响也可以忽略。因此,在本文中近似认为取样法中取样值的大小就是对 $P(t)$ 按时间 t_g 积分,则测量单指数衰减荧光在 t 时刻的取样值大小近似为:

$$E(t) = \int_t^{t+t_g} P(t) dt =$$

$$P(0)\tau[1 - \exp(-t_g/\tau)]\exp(-t/\tau) \quad (2)$$

大多数有机分子和生物大分子的荧光衰减过程都具有单指数特性,但有些复杂体系可能会出现多指数的衰减过程,以双指数衰减为例,其荧光强度以及取样值大小为:

$$P(t) = P_1(0) \exp(-t/\tau_1) + P_2(0) \exp(-t/\tau_2) \quad (3)$$

$$E(t) = \int_t^{t+t_g} P(t) dt =$$

$$P_1(0)\tau_1[1 - \exp(-t_g/\tau_1)]\exp(-t/\tau_1) +$$

$$P_2(0)\tau_2[1 - \exp(-t_g/\tau_2)]\exp(-t/\tau_2) \quad (4)$$

式中, $P_1(t)$, $P_2(t)$, τ_1 , τ_2 分别是各衰减组分的初始荧光强度以及荧光寿命^[7]。

上面的 (1) 式和 (3) 式是在理想条件下的荧光强度表达式,但在实验中,随机噪音是不可避免的,因此,实际取样测量的信号中还包含随机噪音: $P'(t) = P(t) + N(t)$ 。 $P'(t)$ 是实际的信号强度, $N(t)$ 是噪音强度。在取样法实验中产生随机噪音的因素主要有:

(1) 实验仪器中电信号产生的噪音; (2) 其它光源产生的背景噪音; (3) 信号光散射产生的散斑噪音。前两种噪音与荧光信号无关,而最后一种噪音则与荧光信号的强度 $P(t)$ 有关。在此基础上建立随机噪音的经验模型: $N(t) = N'(X_{\text{seed}}) + a \cdot N'(P(t))$ (5) 这个随机噪音经验模型的建立是借助于计算机编程的手段来实现的,其中 $N'()$ 是用计算机实现的随机噪音产生函数,其参数决定了随机噪音扰动的范围;第 1 项 $N'(X_{\text{seed}})$ 与具体的实验环境有关,其中 X_{seed} 的大小反映了与信号无关的噪音随机扰动的范围;后一项 $a \cdot N'(P(t))$ 则与荧光信号的强弱有关,其中 a 为常数。当荧光开始衰减时,荧光信号比较强,这时噪音大小主要由第 2 项决定;而在荧光衰减后期,荧光信号已经很弱,这时的噪音大小就由第 1 项决定。因此,实验中的信号强度表达式修正为:

$$P'(t) = P(t) + N(t) \quad (6)$$

取样值 $E'(t)$ 则是对 $P'(t)$ 按时间 t_g 进行积分,并且与 $E(t)$ 具有相同的形式。在噪音经验模型中 X_{seed} 与 a 需要通过实验数据来确定其大小。首先,测量在没有荧光信号的情况下噪音大小,根据实验数据确定 $X_{\text{seed}} = 0.08$ 。然后变换 a 产生模拟数据,发现当 $a = 0$ 时模拟数据和实验数据最接近,据此确定 $a = 0.1$ 。

2 模拟分析

首先模拟单指数衰减荧光,来说明 t_g 对 SNR 的影响。多次模拟取样的结果 $E(t)$ 平均值记为信号值 S ,模拟取样结果中最大值和最小值的差值作为噪音值 N ,信噪比即 $y_{\text{SNR}} = S/N$ 。在 (1) 式中 $P(0)$ 和 τ 表征了荧光材料的荧光特性,设定 $P(0) = 5a$ u, $\tau = 15$ ns 来模拟一种单指数衰减的荧光。在模拟取样时改变 t_g 以获得不同的信噪比 SNR,结果见图 2, SNR 随着 t_g 的

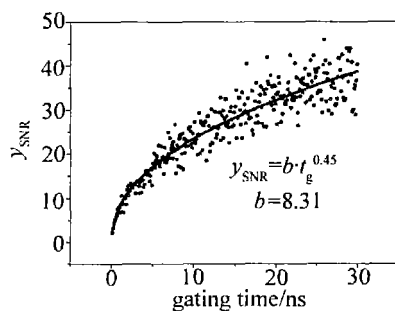


Fig 2 The simulation SNR at different gating time when lifetime $\tau = 15$ ns

增加而增大,其关系为 $y_{\text{SNR}} = b \cdot t_g^{0.45}$ 。当 t_g 接近于荧光寿命 τ 的 $1/3$ 时,就可以获得比较高的信噪比;而当 $t_g > \tau$ 后,SNR 的增长则趋于平缓。因此,在 $\tau/3$ 与 τ 之间优化选取 t_g ,既提高了信噪比又避免了由于增加 t_g 而造成采集时间过长。还模拟不同的荧光寿命 τ 的情形,当 $\tau = 30\text{ns}$ 时,测得 SNR 与 t_g 关系为 $y_{\text{SNR}} = b \cdot t_g^{0.46}$,这说明 SNR 与 t_g 的关系对于不同的荧光寿命 τ 都是成立的,但 τ 越大时,通过增大 t_g 来提高 SNR 的效果就越好。注意到 t_g 的指数总是小于 0.5 ,与此对比,在重复采样方法中信噪比 SNR 与重复测量次数 M 的关系总是满足 $y_{\text{SNR}} = b \cdot M^{0.5}$ [3,8]。虽然通过重复采样 SNR 提高得迅速,但重复测量势必造成测量时间的增加,而通过优化 t_g 来提高 SNR 可以使测量一次完成,大大缩短测量时间。

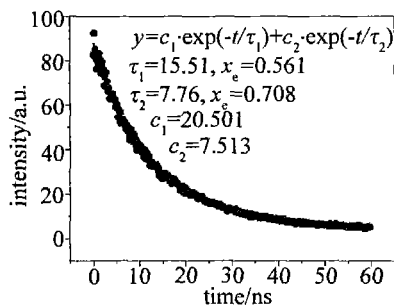


Fig 3 The simulation time resolved spectra when delaying time $t_d = 0.1\text{ns}$

然后模拟双指数荧光衰减来说明 t_d 对精度的影响。实际上 t_d 反映了采样点的密集程度,采样点越密集测量精度也就越高。令 $P_1(0) = 5\text{a.u.}$, $P_2(0) = 2\text{a.u.}$, $\tau_1 = 15\text{ns}$, $\tau_2 = 7\text{ns}$, $t_g = 5\text{ns}$,以不同的“延时” t_d 来进行模拟采集。当 $t_d = 0.1\text{ns}$ 时拟合出时间分辨荧光光谱见图 3,拟合曲线为:

$$y = c_1 \cdot \exp(-t/\tau_1) + c_2 \cdot \exp(-t/\tau_2) \quad (7)$$

式中, y 为荧光强度,拟合出的荧光寿命 $\tau_1 = 15.51\text{ns}$, $\tau_2 = 7.76\text{ns}$,拟合误差分别为 0.561 和 0.908 ,而 c_1 , c_2 分别为拟合得到的不同衰减组分初始的荧光强度。选取不同的 t_d 并且其它参数保持不变,荧光寿命的拟合误差会发生变化,见图 4。 t_d 在 $0.1\text{ns} \sim 10\text{ns}$ 之间取

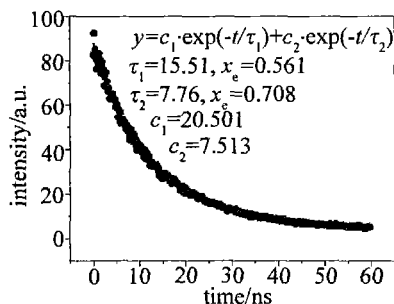


Fig 4 The fit error of time resolved spectra at different delaying time

值,其它参数的选取不变,将对应于不同 t_d 的荧光寿命拟合误差绘制在图中。其中曲线 a 是荧光寿命 τ_1 的拟合误差,曲线 b 是荧光寿命 τ_2 的拟合误差。可见随着

t_d 的增大,拟合误差逐渐增大,测量精度逐渐减小。

另外,在测量多指数衰减荧光光谱时,选取不同的“门宽”,会改变拟合结果中各个衰减组分初始荧光强度的比例大小。对比 (7) 式和 (4) 式,可推导出:

$$\frac{P_1(0)}{P_2(0)} = \frac{c_1 \cdot \tau_2 [1 - \exp(-t_g/\tau_2)]}{c_2 \cdot \tau_1 [1 - \exp(-t_g/\tau_1)]} \quad (8)$$

即可以从测量值反推得到实际各衰减组分初始荧光强度间的比例关系。

3 实验验证

现通过实验来验证模拟分析的结论,实验所用光源为 Spectra Physics 生产的飞秒脉冲光源系统 (包括 MaiTai 和 Spitfire),脉冲宽度小于 130fs ,工作波长为 800nm ,重复频率为 1kHz 。探测系统为德国 Lavision 时间分辨率荧光光谱仪,样品为 GaP 和 LN Er,光路如图 5 所示,光脉冲经中性滤波片以及准直光路后聚集到样品中,然后在 90° 方向收集荧光。荧光经光谱仪入射到 Gated CCD,电脉冲则相对光脉冲有一定延时去触发 CCD 快门,进行信号采集。

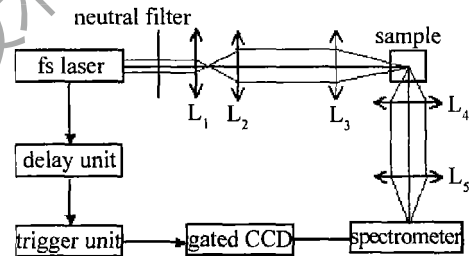


Fig 5 Experiment setup of measurement of time-resolved fluorescence spectra

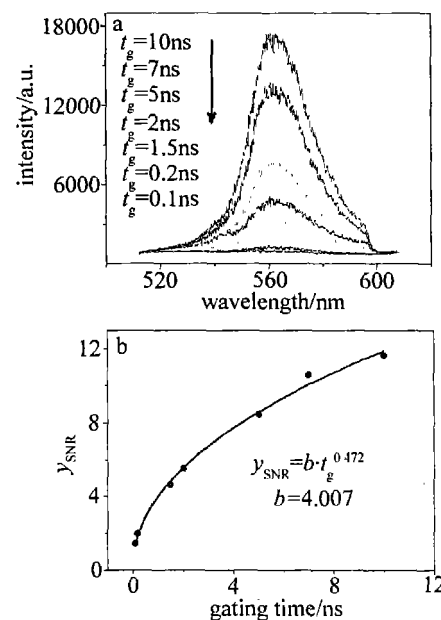


Fig 6 a—the fluorescence spectra of GaP at different gating time b—the fluorescence SNR of GaP at different gating time

实验中首先测量了 GaP 样品的时间分辨荧光光谱,见图 6a,峰值的大小为信号值,图中的锯齿反映了

随机噪音的大小,可以看到当 $t_g = 0.1\text{ns}$ 时,荧光峰值信号很弱,且随机噪音大,荧光信号完全淹没在噪音之中,无法提取。逐渐增大 t_g ,测得信噪比 SNR 与“门宽” t_g 的关系满足 $y_{\text{SNR}} = b \cdot t_g^{0.47}$,见图 6b。当 $t_g = 0.1\text{ns}$ 时,SNR 接近于 0,而当 $t_g = 10\text{ns}$ 时,SNR 则增大到 11.6。实验结果与计算机模拟的结果很吻合,验证了提出的随机噪音的经验模型,并证明了在取样法实验中优化选取“门宽”可以提高信噪比。

设置实验参数 $t_g = 15\text{ns}$, $t_d = 5\text{ns}$,测得 GaP 样品的时间分辨荧光光谱见图 7,拟合得到荧光寿命: $\tau_1 = 170.29\text{ns}$, $\tau_2 = 31.71\text{ns}$,荧光寿命的拟合误差分别为

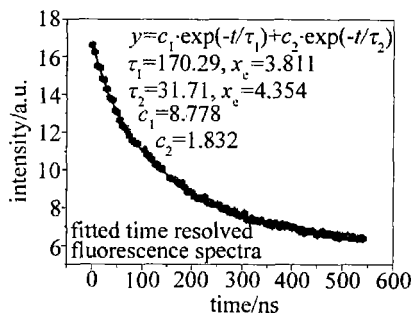


Fig 7 The fluorescence decay curve of GaP sample when $t_g = 15\text{ns}$, $t_d = 5\text{ns}$

3.811 和 4.354。选取不同的 t_d 并且其它参数保持不变,反复测量样品的时间分辨率荧光光谱,得到荧光寿命的拟合误差与 t_d 之间的关系见图 8,其中曲线 a 是荧光寿命 τ_1 的拟合误差,曲线 b 是荧光寿命 τ_2 的拟合误差。可见随着 t_d 的增大,拟合误差逐渐增大,测量精度逐渐减小。

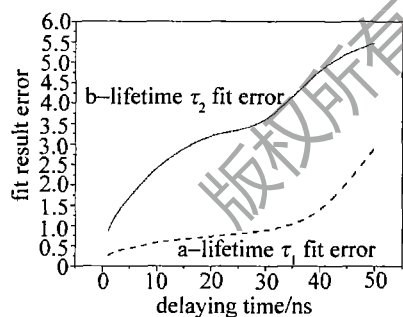


Fig 8 The fit error of GaP sample at different delaying time when $t_g = 5\text{ns}$

通过对 GaP 样品的测量,验证了随机噪音的模型以及模拟分析的结论。但 GaP 样品的荧光信号相对较强,为了验证上述结论也能应用到测量微弱荧光的时间分辨荧光光谱中,作者又测量了 LN Er 样品。利用上述结论来指导实验,在不同 t_g 的条件下测得荧光光谱见图 9,可以看到随着 t_g 的增大,SNR 明显增大。通过优化参数 $t_g = 15\text{ns}$, $t_d = 5\text{ns}$ 成功地测量了 LN Er 样品的双指数衰减时间分辨荧光光谱,并且拟合得出左峰衰减指数分别为 163ns 和 26ns,右峰衰减指数分别为 219ns 和 32ns。

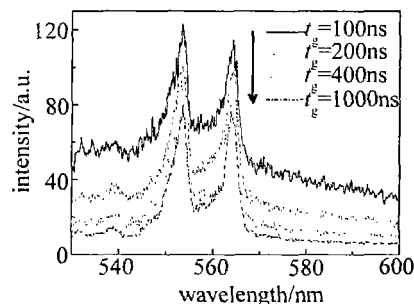


Fig 9 The fluorescence spectra of LN Er at different gating time

4 结 论

所建立的随机噪音经验模型在测量 GaP 样品的时间分辨荧光光谱的实验中得到了很好的验证,并且通过测量 LN Er 样品微弱荧光的时间分辨荧光光谱,最终证明了: (1) 取样法实验中增大“门宽”可以提高信噪比,从而可以测量微弱的荧光信号,与重复采样方法相比,通过优化选取 t_g 不但可以提高信噪比,而且还大大节省了测量时间; (2) 增大“门宽”不会影响到测量结果的时间分辨率,而减小“延时”,即增加采样密集度,则可以提高时间分辨率,即保证了测量精度; (3) 测量多指数衰减时间分辨荧光光谱,选取不同的“门宽”,则测量结果中各个衰减组分初始荧光强度的比例关系会发生改变,推导出测量值与实际值的对应关系,可以从测量结果反推出实际的比例大小。

本文中得出的结论有着实际的应用价值,运用所提出的这种提高信噪比与测量精度的方法来指导取样法测量时间分辨荧光光谱的实验,可以有效地提高测量精度以及对微弱荧光地测量能力与效率。

参 考 文 献

- [1] LARSEN O F A, van STOKKUM I H M, COBETS B *et al* Probing the structure and dynamics of a DNA hairpin by ultrafast fluorescence quenching and depolarization [J]. Biophysical Journal, 2001, 81: 1115 ~ 1126.
- [2] RUBTSOV I V, EBNA K, SATOU F *et al* Spectral sensitization and supersensitization of AgBr nanocrystals studied by ultrafast fluorescence spectroscopy [J]. J Phys Chem, 2002, A106: 2795 ~ 2802.
- [3] 贺俊芳,王才水,张舒 *et al* PS II 的荧光光谱特性 [J]. 光子学报, 2001, 30 (3): 257 ~ 261.
- [4] 贺俊芳,王才水,张舒 *et al* 核心天线 CP43、CP47 的荧光光谱特性 [J]. 光子学报, 2001, 30 (8): 933 ~ 937.
- [5] STRAUB M, HELL S W. Fluorescence lifetime three-dimensional microscopy with picosecond precision using a multifocal multiphoton microscope [J]. A P L, 1998, 73 (13): 1769 ~ 1771.
- [6] 王光斌,干福熹,王建岗 *et al* 偶氮染料掺杂高分子薄膜的荧光光谱特性 [J]. 光学学报, 2001, 21 (4): 495 ~ 498.
- [7] 房喻,王辉. 荧光寿命测定的现代方法与应用 [J]. 化学通报, 2001, 61 (10): 631 ~ 636.
- [8] 刘文生,李锦林. 取样技术原理与应用 [M]. 北京: 科学出版社, 1981. 73 ~ 75.