

同步辐射时间分辨荧光光谱技术*

邓杰 石军岩 施朝淑¹⁾

(中国科学技术大学国家同步辐射实验室 合肥 230026)

摘要 时间分辨光谱技术是研究原子、分子和凝聚态物质的激发动力学,特别是研究发光动力学的有力工具.文章主要介绍以同步辐射为激发光源研究时间分辨光谱的两种方法——时间相关单光子计数法和相移调制法,并比较了两者的优缺点.还讨论了同步辐射光源与其他激发光源相比的特点.

关键词 时间分辨光谱技术,同步辐射,时间相关单光子计数法,相移法

TIME-RESOLVED SPECTROSCOPY WITH SYNCHROTRON RADIATION

Deng Jie Shi Junyan Shi Chaoshu

(National Synchrotron Radiation Laboratory, University of Science and Technology of China, Hefei 230026)

Abstract Time-resolved spectroscopy is a powerful tool for studying excitation dynamics, especially the luminescence dynamics of atoms, molecules and condensed matter. In this paper, two types of time-resolved spectroscopy using synchrotron radiation as the excitation light source, one based on time-correlated single photon counting and the other on phase-modulation, are described and compared. A comparison of the properties of synchrotron radiation to other excitation sources is also given.

Key words time-resolved spectroscopy, synchrotron radiation, time-correlated single photon counting, phase modulation method

1 引言

光谱测量技术是研究物质的结构、成分和能态的最灵敏、最有力的工具之一,广泛应用于物理、化学及生物等基础科学研究中.静态光谱即静态荧光激发谱和发射谱,测量的是物质吸收和发射光子的强度随波长(即能量)的分布;如能在测量荧光光子的能量分布的同时,也得到荧光光子发射的时间分布,这就是我们所说的时间分辨光谱.时间分辨光谱是一种瞬态光谱,是激发光脉冲截止后相对于激发光脉冲的不同延迟时刻测得的荧光发射谱,反映了激发态电子的运动过程(即荧光动力学),又名动态光谱.时间分辨光谱包括荧光衰减谱(固定激发波长 λ_{ex} 和发射波长 λ_{em} ,激发停止后,荧光强度随时间的变化)、时间分辨发射谱(固定激发

波长,在某一延迟时间 T_d 和一定时间窗口 T_w 内,荧光强度随着发射波长变化的函数)和时间分辨激发谱(固定发射波长,在一定的时间窗口 T_w 内,荧光强度随着激发波长变化的函数).图1是典型的时间分辨光谱.

处于高能态的电子在纳秒和亚纳秒时间范围内回到低能态有多种可能途径,包括辐射跃迁发射光子、通过热运动失去能量或能量转移到其他中心等无辐射跃迁过程.荧光光谱在激发态的寿命期间可能有大的改变.在稳态激发下测量的光谱是对时间的平均,掩盖了与辐射跃迁竞争的一种或多种光化学、光物理中的无辐射跃迁过程,而时间分辨光谱正是研究这些

* 中国科学院“八五”重点科研项目子项目
1997-10-24收到初稿,1998-11-16修回

1) 中国科学技术大学天文与应用物理系教授

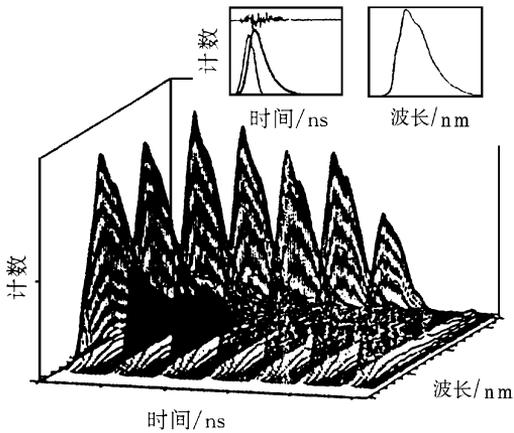


图1 三维形式的时间分辨光谱示意图

动力学机制的有力工具. 通过测量荧光发射的参数,特别是荧光发射寿命,在研究原子、分子、固体的激发态性质方面获得许多重要信息. 具体地说,它提供不同中心间的相互作用与激发能的转移以及去激发的通道等重要信息;跟踪光物理、光化学和光生物学的快速变化过程,结合荧光量子产额,由寿命可得到激发态动力学的重要参数,如激发态辐射跃迁与所有去激发的一切无辐射跃迁的速率常数;探测生物大分子的构像变化;测定能量转移和分子内或分子间活性基团间的距离、相互作用、二聚物或络合物的形成;结合荧光偏振光谱学可以推测生物大分子的形状、大小以及在溶液中的转动弛豫时间等^[1-7]. 通过时间分辨光谱的测量,可以分析激发态的势能曲线、振动弛豫、能量传递和发光起源等.

时间分辨光谱的应用范围很广,下面举一具体例子. 在1982年,发现BaF₂有快发光成分($\tau = 0.6\text{ns}$). 然而,具有亚纳秒快发光的起源却众说纷纭. 人们对BaF₂的发光光谱特性进行研究,特别是通过激发光谱、发射光谱、时间分辨光谱、荧光衰减性质及其温度依赖关系的充分研究,才确认了这一种快发光成分源于新的发光机理^[2,3],被称为cross-luminescence,实质是价带电子与最高芯带空穴间的带间复合跃迁发光. 由图2^[3]所示的时间分辨光谱可见:BaF₂的220nm快发光带迅速衰减至消失,而300nm慢发光带($\tau = 0.6\mu\text{s}$)在激发停止后3.4—7.4ns

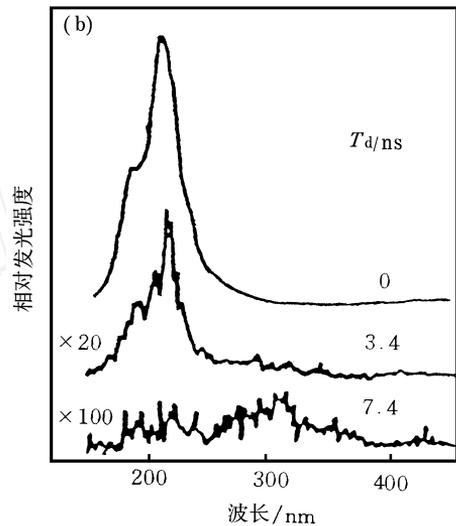
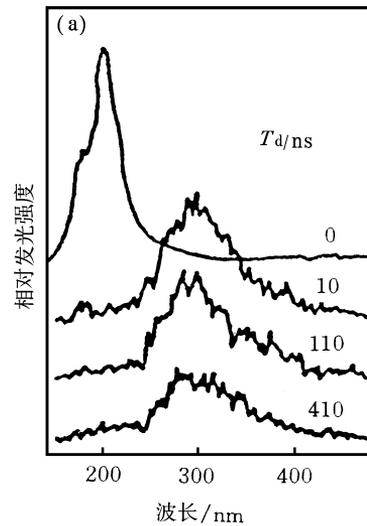


图2 64.1nm光激发BaF₂晶体的时间分辨光谱

(a) 延迟时间(T_d)0, 10, 110, 410ns, 时间窗口(T_w)100ns;

(b) 延迟时间(T_d)0, 3.4, 7.4ns, 时间窗口(T_w)6ns

内才出现,在10—110ns内先逐渐增强,随后逐渐衰减,这就进一步揭示了BaF₂的本征发光过程:当Ba²⁺5p芯电子被激发到导带后,留下的芯空穴立即与F⁻2p价电子复合而产生220nm快发光组分,随后,价带空穴与导带电子形成自由激子,进而形成自陷激子,产生了300nm慢发光带. 而导带电子与价带空穴的弛豫时间都很短(一般为皮秒量级),所以300nm带出现的延迟(3.4—7.4ns)主要是来源于激子的自陷过程及自由激子穿越势垒形成自陷所需的时间,或者说形成自陷激子所需的时间为纳秒量

级.

2 同步辐射光源在研究时间分辨光谱中的重要性

同步辐射光源是一种新型的光源,它覆盖了 X 射线、真空紫外 (VUV)、可见光到远红外波段,而且连续可调,其光谱分布可以精确计算,可作辐射计量的标准;同步辐射光源有好的准直性和偏振特性,在电子轨道平面内是 100% 的线偏振光;此外,同步辐射光又是一种具有时间结构的快脉冲光源(脉宽为 30—700ps),满足了测量时间分辨光谱最基本的要求.鉴于上述特点,同步辐射光是时间分辨光谱测试的理想光源.在短于 200nm 的真空紫外和 X 射线的波段内,同步辐射光的各项指标全面优于常规光源的同类指标,在近紫外区和可见区,同步辐射光也是激光的重要补充.表 1 是同步辐射光与激光脉冲、闪光灯光源的比较.

表 1 同步辐射光与激光、闪光灯光源性质比较

	同步辐射光源	脉冲激光	闪光和放电灯
光谱范围	X 射线到远红外调谐	仅在可见和 UV 区的小范围内可调谐,在红外和 VUV 区仅有几条线	不同的气体源,1cm 到特定的 X 射线
脉冲强度 (0.1% /)	$< 10^9$ 光子数 $> 10^{12}$ (使用波动物器)	$> 10^{10}$ 光子数 (1ps, 脉宽 10cm^{-1})	一般较低, $< 10^6$ 光子数
最小脉冲宽度	典型 100ps, 前沿 20ps, 脉冲形状不依赖于波长	0.2ps, 脉冲形状依赖于波长	$> 1\text{ns}$, 脉冲形状随波长变化较大
脉冲重复频率	从 ~ 1MHz 到 GHz, 很稳定, 完全调制	连续到 ~ 100MHz, 长周期不稳定, 部分调制	连续到 $< 100\text{MHz}$, 有限的周期稳定, 部分调制
脉冲形状和幅度	稳定, 可精确计算	不同	不同
源大小发射角	~ 1mm^2 $< 10\text{mrad}$ (依赖于波长)	1mm^2 5mrad	几个 mm^2 各向同性
其他性质	完全线偏振, 非相干光	一般是线偏振, 相干光	非偏振光, 非相干光

在合肥国家同步辐射实验室 (NSRL) 的时间分辨光谱站,同步辐射是通过光束线即 Seya - Namioka 型激发单色仪单色化之后激发样品.该仪器为覆盖 35—800nm 的光谱波段,使用了 3 块光栅:2400 线/毫米、1200 线/毫米、600 线/毫米,波长分辨率 $\pm 0.2\text{nm}$,样品处光斑尺寸 $0.3\text{mm} \times 3\text{mm}$,同步辐射光的水平收集角为 25mrad ,到达样品的光强度为 10^9 光子/秒 0.1 纳米带宽,毫弧度,NSRL 的工作束流为 100—300mA,储存环电子能量 800MeV,电子轨道周长为 66m,多束团运行时共有 45 个束团,脉冲宽度约为 300ps,光脉冲间隔仅为 5ns,难以进行时间分辨光谱测试和研究.在单束团运行模式下,光脉冲间隔为 225ns,是纳秒和亚纳秒时间分辨光谱研究的理想光源.

下面讨论测量时间分辨光谱的两种方法:时间相关单光子计数法和相移调制法.

3 时间相关单光子计数法

3.1 荧光衰减寿命测量

时间相关单光子计数法 (time - correlated single photon counting) 简称“单光子计数 (SPC) 法”.其基本原理是,脉冲光源激发样品后,样品发出荧光光子信号,每次脉冲后只记录某特定波长单个光子出现的时间 t .经过多次计数,测得荧光光子出现的几率分布 $P(t)$,此 $P(t)$ 曲线就相当于激发停止后荧光强度随时间衰减的 $I(t)$ 曲线.这好比一束光(许多光子)通过一个小孔形成的衍射图与单个光子一个一个地通过小孔长时间的累计可得完全相同的衍射图一样的原理.图 3(a) 是 SPC 法测量荧光衰减的装置示意图.同步辐射经光束线即激发单色仪色散后选择出一定波长的激发光,样品被单色的同步辐射光激发后发出荧光,并经发射单色仪选择要观察的荧光波长,荧光信号由光电倍增管 (PMT) 接收,严格控制每次脉冲激发后只接收一个发光光子信号(但不同光子到达 PMT 的时间不同),PMT 的信号经前置放大器 (PA),再经恒比甄别器 (CFD) 定阈、整形产生一个标

物理

准的荧光脉冲,用它作为起始信号触发时幅转换器(TAC)产生“斜波电压” $V(t)$,另一路探测器直接接收激发光脉冲信号或由同步辐射的射频信号(与同步辐射光脉冲同频率),作为时钟信号零时间使 TAC 停止,这样,TAC 的输出信号幅度正比于这两路脉冲信号间的时间间隔.根据 TAC 的输出信号送入多道分析器 MCA 中分道计数,经过长时间的数据累计,在 MCA 中得出几率分布 $P(t)$ 曲线,该曲线相当于在选择某一波长时荧光强度相对于时间的衰减曲线 $I(t)$.选择一定的光谱区域内测得多条 $P(t)$ 曲线的集合就称为该波段内的三维时间分辨光谱.图 3(b)为 SPC 法测量时间分辨光谱的基本实验框图.

使用 SPC 方法^[5,6]进行荧光衰减时间测量实验时,必须满足每次激发后仅有单个荧光光子到达光电探测器的条件,大量累计所得的单个荧光光子到达时间的几率分布才能代表荧光同步辐射电子储存环

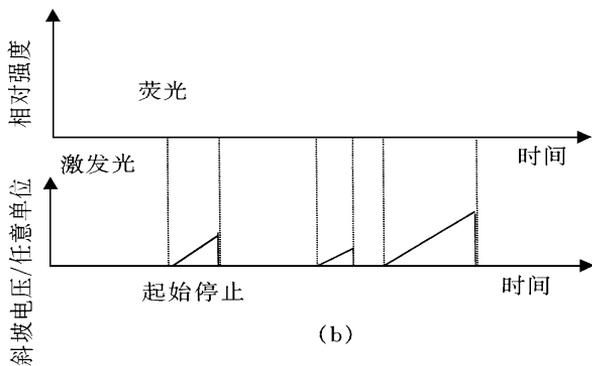
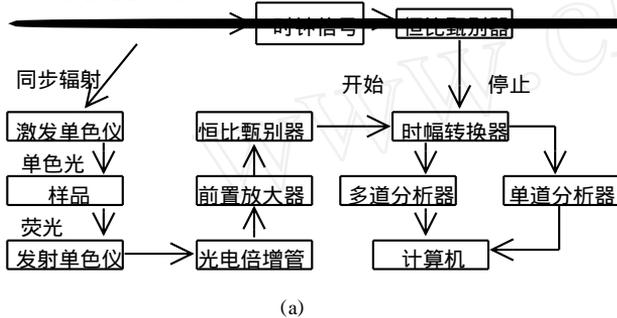


图 3

- (a) SPC 法测量荧光衰减的装置示意图;
(b) SPC 法测量时间分辨光谱的基本实验框图

强度随时间的衰减规律.否则,若有多光子事件或脉冲堆积时,都会由于脉冲堆积效应使测量的衰减时间变短.对未知的时间衰减函数,信号平均收集率低于激发频率的 2% 时,测量的曲线仅有小于 1% 的误差^[7].在实验中,用强度衰减(通过调节激发单色仪狭缝或用光阑限制荧光收集的立体角)来调节计数率.一般认为,当计数率 1% 时,荧光信号满足单光子发射.在实验上可能通过数字阻通电路等电子学器件排除脉冲堆积,从而在较高的计数率下完成实验,但这些电子学器件仅对一些脉冲堆积和多光子事件有效,测量精度不如降低计数率好,特别是对于短荧光寿命的测量^[7],因此在实验中很少使用.

在利用 SPC 方法测量荧光寿命时,由于同步脉冲光源的一定宽度($\sim 200\text{ps}$),当测量的荧光寿命也在 ns 量级时,激发光源不能看成是若干脉冲所组成的光源,同时,快电子学检测系统也有一定的响应时间,因而实验测得的荧光衰减曲线 $I(t)$ 不是样品真实的荧光衰减函数 $F(t)$,而是 $F(t)$ 与仪器响应函数 $R(t)$ 的卷积^[8],必须通过解卷积才能得到真实的荧光衰减参数.在数学上,解卷积得到真实荧光衰减参数的方法有:傅里叶和拉普拉斯变换法^[9]、矩阵法^[10]、最小二乘法^[5,11],其中最小二乘法拟合的精度最好,为人们所常用.

仪器响应函数的半宽度(FWHM)决定了实验系统的时间分辨本领,这主要由激发光脉冲的形状和探测器单光电子的渡越时间弥散所决定^[12,13].为了获得最佳的实验结果,必须选择好系统所用的探测器和电子学元件,仔细调节其工作状态.对探测器选用快响应、高增益、线性好和脉冲分辨率也高的光电倍增管.在光子计数实验上,常用的光电倍增管有 RCA8850, RCA31034, XP2020Q;典型的微通道板光电倍增管有 VPM 154A - 6D, R1294 U - 01.探测器方面的最新改进是使用影像型微通道板光电倍增管,并附加位置敏感探测器,如日本的滨松公司和美国的 Quantar 公司已有这类产品.

3.2 时间分辨光谱

利用 SPC 法测荧光衰减的实验装置稍做改变即可进行时间分辨光谱测试,用单道分析器 SCA 代替多道分析器 MCA(图 3),设定相对激发脉冲延迟 T_d 后的时间窗口 T_w ,即仅落在时间窗口内的事件才被 SCA 记录,通过发射单色仪或多色仪,可以获得相对于激发脉冲不同延迟时刻的发射谱,即时间分辨的荧光谱^[1,5,15].

4 相移法

4.1 相移法基本原理

相移法(phase - modulation method)的基本原理由 F. Dushinsky 提出^[16]. 激发光源是频率 f (即角频率 $\omega = 2\pi f$) 强度调制的正弦调制光源:

$$R(t) = R_0[1 + \cos(\omega t)],$$

其中 R_0 是幅度的调制.

假设荧光是按单指数规律衰减,这时测量的荧光信号是激发函数与荧光衰减 $F(t) = \exp(-t/\tau)$ 的卷积:

$$I(t) = R(t) \otimes F(t) \\ = R_0[1 + \cos(\omega t - \theta)].$$

因此,从上式可知,检测的荧光信号也是按同样频率 f 调制的,但具有不同的调制幅度和位相延迟(如图 4).

位相延迟 可用下式表示:

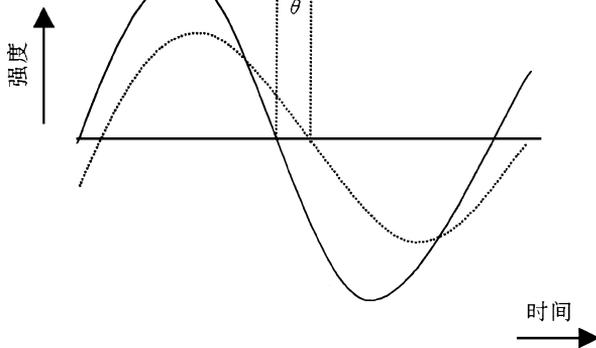


图 4 相移法的基本原理示意图

——: 激发相位;: 荧光相位; - - -: 相移角

$$\tan \theta = \tau \omega \quad (1)$$

幅度调制率 m (即两个调制幅度的比值)为

$$m = \cos \theta = (1 + \tau^2 \omega^2)^{-1/2}, \quad (2)$$

因此,通过测量荧光信号相对于激发信号位相移动或调制幅度,可获得激发态的寿命 τ . τ 值是荧光发射波长的函数,也是时间分辨光谱的一种表述形式.

相移法的缺点是不易获得多指数或非指数衰减寿命,需要在许多不同频率处进行重复实验才能分析多指数或非指数衰减,早期因激发光源调谐频率单一的原因,使相移法的使用大大受到限制.高重复频率的脉冲光源同时具有大量的调制频率,Gratton 和 Lopez - Delgado^[17]提出用高重复频率的脉冲光源代替正弦调制的光源.上面得到的正弦调制光源激发下荧光信号的相移原理同样适用于激发光中的任何傅里叶成分^[18],此时荧光信号的相移和幅度调制有:

$$\tan \theta_n = n \tau \omega,$$

$$m_n = [(1 + (n \tau \omega)^2)^{-1/2}]. \quad (3)$$

其中 n 表示第 n 阶傅里叶成分, $\omega = 2\pi f$ 为基频.

同步辐射光是典型的高重复频率(0.5—500MHz)脉冲光源,形状为高斯型.意大利的 ADONE 环的同步辐射光脉冲时间间隔为 346ns,脉宽 FWHM 为 2ns,其能量谱由间隔为基频 2.88MHz 的许多函数组成,其外包络为半宽 500MHz(1/2ns)的高斯型,因脉冲宽度和脉冲周期的很大不同,第 n 阶傅里叶成分的强度可与零频率的强度(即平均值)相比拟,因此可分析高次谐波的相移.这样,根据(3)式可以测量很短的寿命(亚皮秒量级),而不致严重影响信号的探测.意大利的同步辐射装置 ADONE 环近年来就是用相移法来测量荧光寿命的.

4.2 单光子计数法与相移法的比较

相移法的突出优点是可能得到皮秒量级时间分辨率,但需要足够的光强以给出具有良好的统计性质的模拟信号.在用同步辐射激发的荧光实验中,同步辐射经激发单色仪分光后激

发样品,发射光再经过发射单色仪发光后被检测,即使仪器调到最佳状态,一般地一次激发后被检测的光子数仅 $1 \sim 10^4$ 个/秒.光强很低时,SPC方法的灵敏度优于相移法.对溶液和固体样品,激发中心与其周围环境的相互作用是较强的,从而使荧光衰减表现为多指数衰减规律或呈非指数衰减规律,而多指数衰减中可能一个成分比另一个成分强几个量级,当信号强度在两个量级范围内变化时,相移法检测能保持线性和灵敏度,而SPC方法能在信号强度至少在3个量级内变化时都保持线性响应.相移法只能得到一定发射波长的发光衰减时间(τ)值,不能直接观察到光谱的变化,不如SPC方法直观.相移法测量相位延迟或调制率来获得荧光寿命参数,不需对一定宽度的脉冲和电子学系统的时间响应进行去卷积处理,因此,相移法可以达皮秒量级的时间分辨,而SPC方法在对响应函数去卷积处理后可以获得50ps量级的时间分辨.

表2 目前国际上几个主要同步辐射实验室研究
荧光动力学使用的实验技术

实验室	国别	实验技术
DORIS(Hamburg)	德国	SPC
SPEAR(Stanford)	美国	SPC
CHESS(Cornell)	美国	SPC
NSLS(Brookhaven)	美国	SPC
SRS(Darebury)	英国	SPC
ACO(Orsay)	法国	SPC
ADONE(Frascati)	意大利	相移法

参 考 文 献

- [1] Yguerabide J, Yguerabide E E. Nanosecond Fluorescence Spectroscopy, (Optical Techniques in Biological Research), Bell Telephone Lab. Incorporated, 1984. 181
- [2] Itoh M *et al.* Solid State Comm., 1988, 65:53—526
- [3] Shi C S, Kloiber T, Zimmerer G. Physical Scripta, 1990, 41:1022—1024
- [4] Ternov I M, Mikailin V V, Khalilov V R. Synchrotron Radiation and Its Applications. Harwood Academic Publishers, 1985. 298—299
- [5] O'Connor D V, Phillips D. Time - Correlated Single Photon Counting. London: Academic Press, 1984. 36—54
- [6] Becker J, Belsky A N, Boutted D *et al.* J Electron Spec. and Related Phenomena, 1996, 79:99—102
- [7] Hegarty J *et al.* Appl. Opt., 1980, 19:1889—1892
- [8] Helman W P. Int. J. Radiat. Phys. Chem., 1971, 3: 283—294
- [9] Strand O N *et al.* J. Ass. Comp. Mach., 1968, 15: 100—114
- [10] Isenberg I *et al.* Biophys. J., 1973, 13:1090—1115
- [11] Wong A L, Harris J M. Anal. Chem., 1989, 61:2310—2315
- [12] Bebelaar D. Rev. Sci. Instr., 1986, 57:1116—1125
- [13] Sipp B *et al.* Opt. Comm., 1976, 16:202—204
- [14] Polewski K *et al.* Rev. Sci. Instr., 1994, 65:2562—2567
- [15] Rehn V. Nucl. Instr. Meth., 1980, 177:193—205
- [16] Duschinsky F. Z. Phys., 1933, 81:7—22
- [17] Gratton E, Lopez - Delgado R. Nuovo Cimento B, 1980, 56:110-124
- [18] Munro I H, Schwentner N. Nucl. Instr. Meth., 1983, 208:819—834