

文章编号: 1000-5013(2011)06-0623-05

# 脉冲 LED 激发罗丹明 B 瞬态荧光光谱特征

叶明树, 田治富, 胡庆, 庄其仁

(华侨大学 信息科学与工程学院, 福建 泉州 362021)

**摘要:** 采用发光二极管(LED)脉冲光源作为激发光,研究罗丹明 B 荧光的瞬态光谱特征.激发光源为 3 个中心发射波长分别为 406,464 和 528 nm 的超高亮紫光、蓝光和绿光 LED.实验结果表明:不同激发光颜色(波长)、不同脉冲宽度和不同罗丹明 B 浓度得到的荧光强度有很大差别;在同一浓度下,激发光持续时间(脉冲宽度)小于 10 ms,只有绿光激发能产生强的荧光,紫光和蓝光不能产生荧光;而脉冲宽度大于 20 ms 时,紫光和蓝光激发有荧光出现,但强度都比绿光激发时小很多,并且蓝光激发时荧光最弱.采用合适脉冲宽度的紫光、蓝光和绿光 LED 作为激发光源,可以得到罗丹明 B 的特征荧光光谱.

**关键词:** 发光二极管;罗丹明 B;荧光光谱;脉冲宽度

**中图分类号:** TN 29

**文献标志码:** A

传统的荧光仪器大多采用脉冲氙灯、激光器、汞灯等作为激发光源,不仅需要高压供电,而且体积大、成本高,无法满足实时原位监测的要求.近年来,随着发光二极管(LED)技术和工艺的不断提高,各种超高亮、短波长的 LED 不断出现,使得 LED 的发射波长几乎覆盖了整个近紫外-近红外光谱区,有望取代传统激发光源<sup>[1-2]</sup>.然而,荧光光谱仪由于受到激发光源、单色仪和探测器的光谱特性的影响,其荧光光谱(激发光谱和发射光谱)并不是所研究物质的真实光谱,而要得到物质的真实光谱,一般要采用罗丹明 B 法<sup>[3-5]</sup>对实验光谱进行校正.罗丹明 B 荧光染料具有光稳定性好,对 pH 值不敏感,较宽的波长范围和较高的荧光量子产率等优点,是分析化学和生物医药科学等生物技术领域中最常用的荧光染料.已有的文献中,采用常规光源和分光光度计法测量罗丹明 B 二维及三维荧光光谱的报道较多<sup>[6-9]</sup>.司马伟昌等<sup>[10]</sup>报道了采用多波长 LED 阵列诱导罗丹明 B 的荧光发射光谱.本文采用电子快门控制光脉冲,研究 LED 激发罗丹明 B 荧光的瞬态光谱特征.

## 1 实验方法

图 1 为实验装置原理图,由 LED 激发光源、样品池、聚焦透镜和光纤光谱仪共同组成.激发光源为中心发射波长分别为 406,464 和 528 nm 的 3 个超高亮紫、蓝、绿发光二极管(LED),直径均为 5 mm,LED 为半球形封装,具有较小的光束发散角(小于 15°),样品池大小为 12 mm × 12 mm × 450 mm.

激发光从一个方向入射样品池,在垂直方向上由焦距 50 mm 的聚焦透镜收集荧光,在焦点处为 USB 4000 型光纤光谱仪(美国 Ocean Optics 公司)的光纤入射端面,最后由计算机进行数据处理.LED 光源采用恒流驱动输出,幅度稳定,激发光脉冲通过 1/1 000 s 的电子快门控制,激发光脉冲宽度控制为 50 ms.

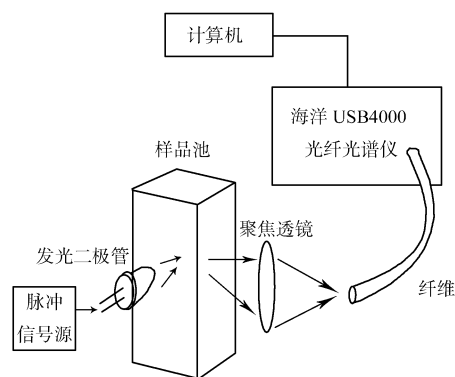


图 1 实验装置原理图

Fig. 1 Experimental schematic diagram

收稿日期: 2010-11-22

通信作者: 庄其仁(1960-),男,教授,主要从事光检测技术的研究. E-mail: qrzhuang@hqu.edu.cn.

基金项目: 福建省自然科学基金资助项目(A0710012)

实验所用工作液采用母液逐级稀释得到. 首先取 0.50 g 罗丹明 B 用少量水溶解, 于 500 mL 容量瓶中定容, 然后取 1 mL 罗丹明 B 溶液在量筒中稀释, 再进行荧光测定. 光纤光谱仪的积分时间是 5 ms, 光谱仪的工作方式设定为外部触发, 触发信号由控制电子快门的单片机发出. 由于电子快门开启跟关闭相对于光谱仪都有延迟, 所以电子快门跟光谱仪的开启时间误差会前后相减延迟而抵消, 达到整个系统的时间同步. Atmega16 单片机(美国 Atmel 公司)系统时钟设定为 8 MHz, 以减少定时时间误差.

2 结果和分析

2.1 LED 光源的发射谱

紫光、蓝光和绿光 LED 的发射光谱, 如图 2 所示. 3 种 LED 光源的中心发射波长分别为 406, 464 和 528 nm, 峰值相对光强度相差不大(约 62 000 单位), 光谱半高全宽分别为 25, 33 和 45 nm. 并且, 528 nm 绿光 LED 的发射光谱基本覆盖了罗丹明 B 最大量子产率的 554~566 nm 激发波长范围<sup>[6]</sup>.

2.2 瞬态荧光光谱特征

分别用上述紫光、蓝光和绿光 LED 光脉冲激发罗丹明 B 溶液(质量浓度为 0.5 g · L<sup>-1</sup>), 其瞬态荧光光谱分别如图 3~5 所示.

从图 3(a)可看出: 紫光脉冲激发罗丹明 B 溶液时, 荧光峰值波长在 625 nm 左右, 荧光强度逐渐增强, 25 ms 荧光峰值达到稳定的最大值, 其相对光强度约 3 000 个单位, 25 ms 后, 长波长的荧光强度继续增大, 40 ms 后荧光光谱基本稳定不变. 从图 3(b)可看出, 当紫光脉冲熄灭后, 荧光强度急剧下降, 5 ms 后荧光强度就下降到最大值的一半以下, 并且峰值波长和短波长部分下降速度最快, 长波长荧光强度下降速度较慢.

从图 4(a)可知: 蓝光激发罗丹明 B 荧光有很大的延迟, 在激发光入射 20 ms 后才有明显的荧光出现, 并且强度很低. 20 ms 的荧光光强缓慢增长, 45 ms 的荧光强度才达到最大, 但幅度很小, 峰值约 1 750 个单位. 从图 4(b)可以看出, 蓝光激发的罗丹明 B 荧光的消失也比较缓慢.

从图 5(a)可以看出: 与紫光和蓝光激发罗丹明 B 荧光比较, 绿光激发的荧光出现速度最快, 10 ms 就有很明显的荧光出现, 其峰值约 3 000 个单位; 10 ms 的荧光强度达到最大, 其峰值约 9 600 个单位, 10 ms 后的荧光光谱向长波长展宽. 从图 5(b)可以看出, 绿光激发的荧光在激发光熄灭后强度快速下降, 10 ms 后已下降至最大值的 5% 以下.

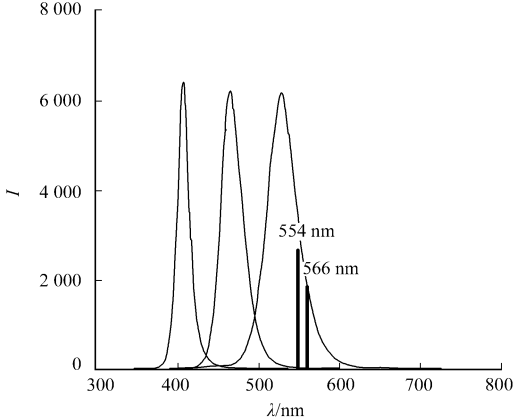
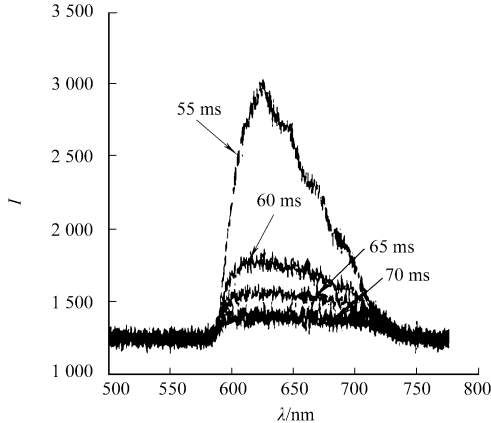
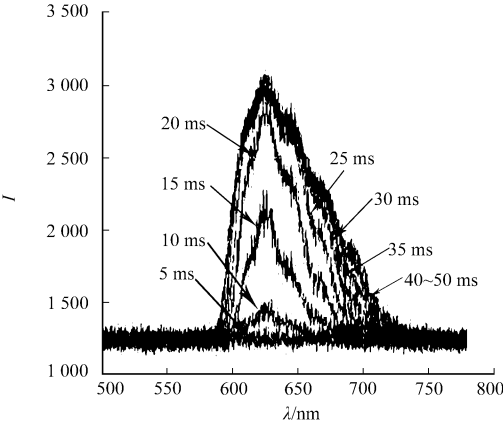


图 2 3 种 LED 光源的发射光谱  
Fig. 2 Emission spectrum of three LED sources



(a) 激发阶段 (b) 熄灭阶段

图 3 紫光 LED 瞬态荧光光谱

Fig3 Transient fluorescence spectra excited by the purple LED light pulse

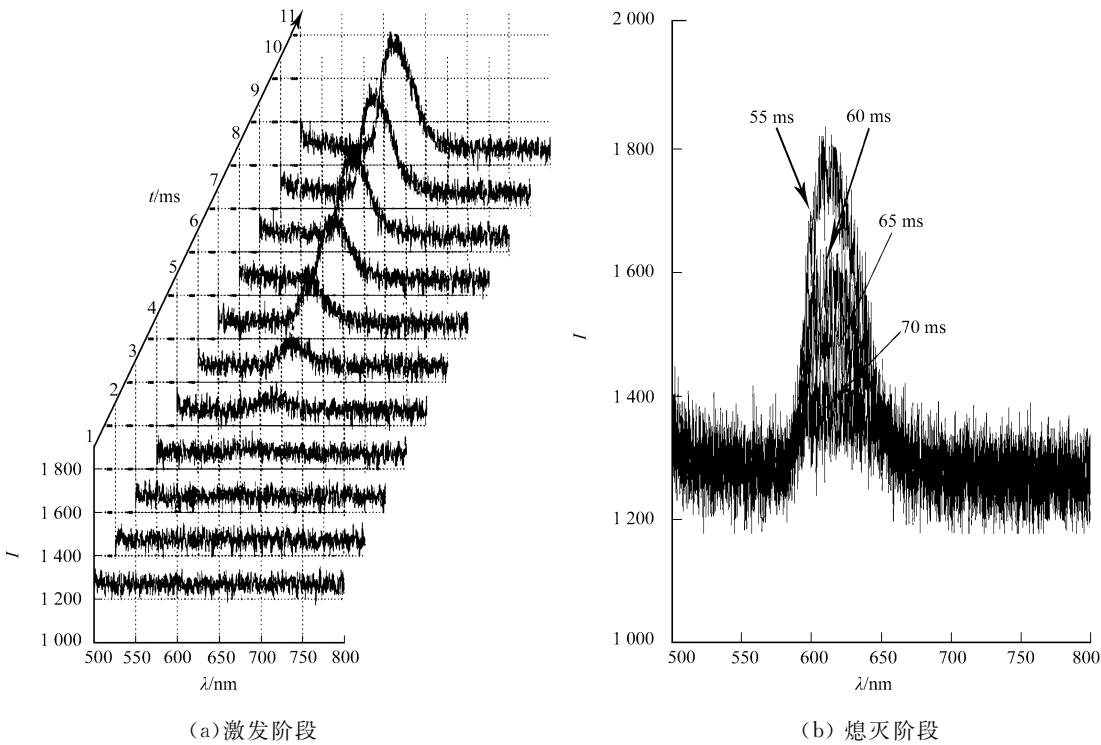


图 4 蓝光 LED 瞬态荧光光谱

Fig. 4 Transient fluorescence spectra excited by the blue LED light pulse

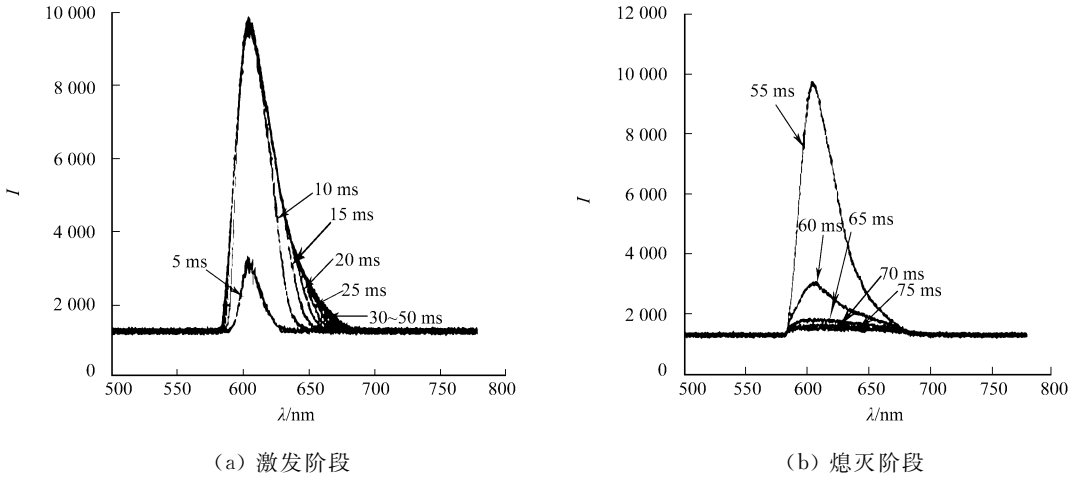


图 5 绿光 LED 瞬态荧光光谱

Fig. 5 Transient fluorescence spectra excited by the green LED light pulse

2.3 罗丹明 B 荧光与激发光脉冲宽度的关系

不同质量浓度的罗丹明 B 被紫色、蓝色和绿色 LED 激发出荧光的时间和荧光的熄灭时间并没有明显的不同,但是在荧光峰值和峰值中心却有着很大的差异. 紫色、蓝色和绿色 LED 激发不同质量浓度( $\rho$ )的罗丹明 B 的荧光光谱,如图 6 所示.

从图 6 可知:不同质量浓度的罗丹明 B 被紫色、蓝色和绿色 LED 激发出的荧光光谱同样在 25, 45 和 10 ms 时峰值达到最大. 在罗丹明 B 浓度增加的情况下,光谱的峰值逐渐降低,而且荧光中心都明显的红移了. 发射波长发生红移可能是由于溶液质量浓度过大,罗丹明 B 发生聚集状态形成了二聚体或多聚体后,导致能量在组分分子间来回转移,延长了分子在发生荧光之前的寿命<sup>[11]</sup>. 同时,由于可能存在的自熄灭作用增强,所以体系的荧光强度随着罗丹明 B 质量浓度的增加反而减小.

根据实验结果,罗丹明 B 的荧光光谱不但与激发光波长有关,还与激发光持续时间有关. 从图 6 还可以看出,不同激发光颜色(波长)和脉冲宽度得到的罗丹明 B 荧光强度有很大差别. 当激发光持续时间(脉冲宽度)小于 10 ms 时,只有绿光激发能产生强的荧光,紫光 and 蓝光不能产生荧光;当脉冲宽度大

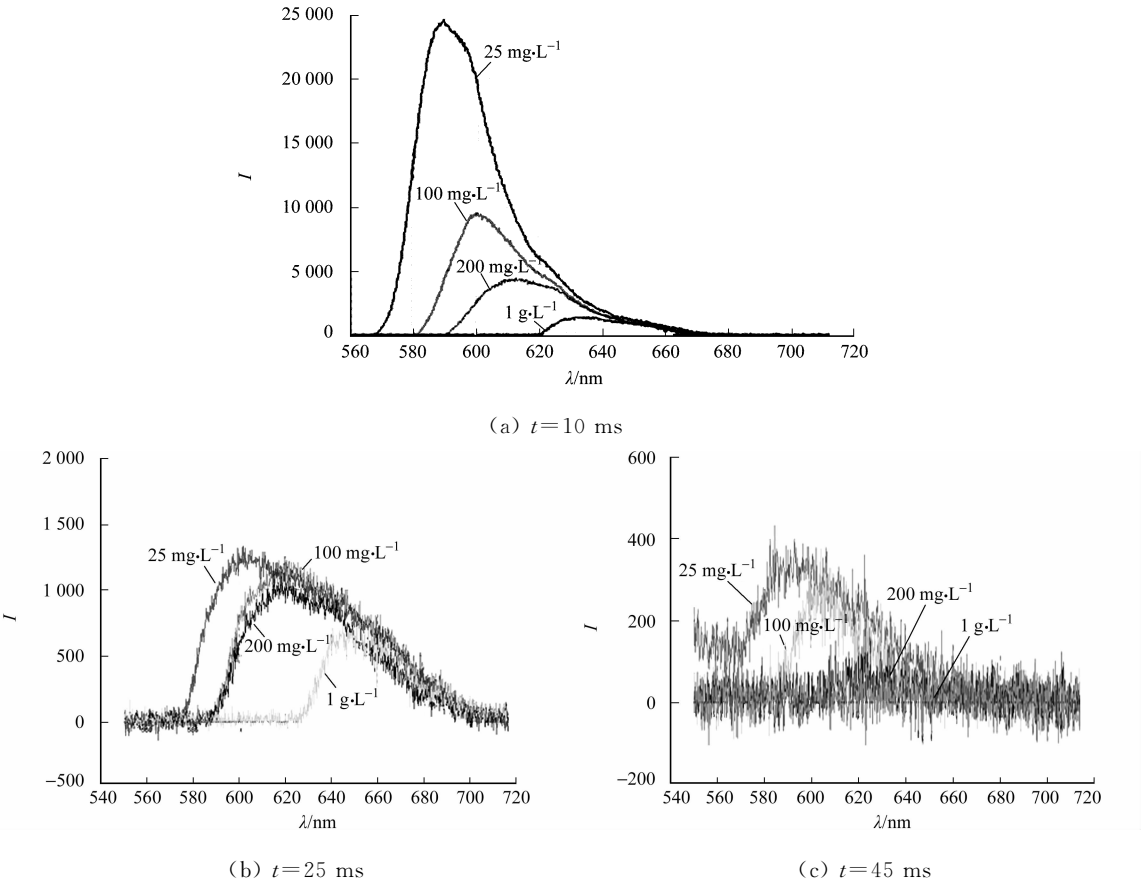


图 6 不同质量浓度的罗丹明 B 荧光光谱

Fig. 6 Fluorescence spectra of rhodamine B in different concentrations

于 20 ms 时,紫光 and 蓝光激发有荧光出现,但强度都比绿光激发时小很多,并且蓝光激发时荧光最弱. 从图 5(a)还可以看出,激发光持续时间(脉冲宽度)小于 10 ms 时,绿光激发产生的荧光光谱宽度窄,激发光持续时间增加,荧光光谱宽度变宽. 因此,采用合适的激发光持续时间(脉冲宽度)的紫光、蓝光和绿光 LED 作为激发光源,可以得到罗丹明 B 的特征荧光光谱,如图 7,8 所示. 图 7,8 中:激发光脉冲宽度为 10 ms.

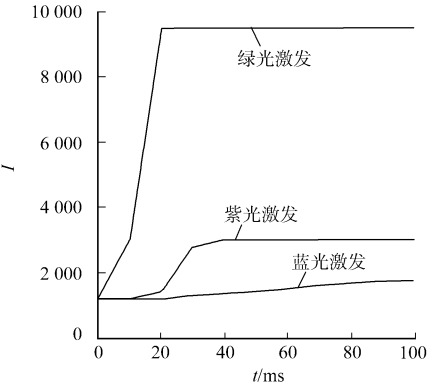


图 7 荧光峰值强度跟激发光持续时间的关系

Fig. 7 Relationship between fluorescence peak intensity and excited light duration

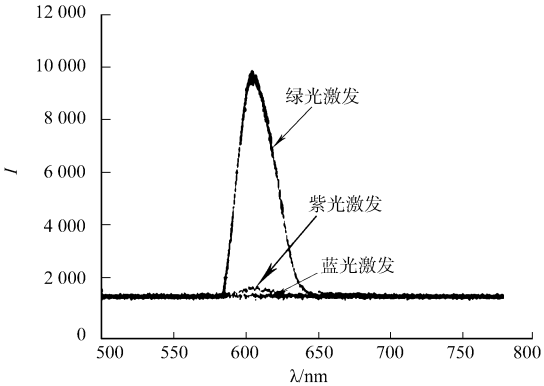


图 8 罗丹明 B 的光谱特征

Fig. 8 Characteristics of fluorescence spectra of rhodamine B

3 讨论

上述实验结果表明,罗丹明 B 荧光光谱中包含荧光和磷光<sup>[12-13]</sup>现象. 当激发光持续时间(脉冲宽度)小于 10 ms 时,发光光谱主要为荧光光谱. 这是因为荧光寿命短,有激发源时会发光,激发源去除

后, 荧光就立即消失. 当激发光脉冲宽度大于 20 ms 时, 紫光和蓝光激发有荧光出现, 绿光激发的荧光光谱展宽, 主要向长波长展宽. 这部分荧光包含了磷光成分, 激发源去除后荧光依然存在(缓慢减弱). 因此, 罗丹明 B 特征荧光光谱才是没有磷光成分的纯荧光光谱, 该特征光谱可用于罗丹明 B 成分检测和其他采用罗丹明 B 作为试剂的传感领域.

瞬态荧光光谱测量方法, 如采用波长连续可调的激发光源, 就能得到罗丹明 B 的四维荧光光谱(激发-发射-时间-荧光光谱). 相比较于三维荧光光谱图, 罗丹明 B 的四维荧光光谱图更能详细描述被测组分的性质.

### 参考文献:

- [1] 吴震, 钱可元, 韩彦军, 等. 高效率、高可靠性紫外 LED 封装技术研究[J]. 光电子·激光, 2007, 18(1): 1-4.
- [2] 怀素芳, 李旭. 新一代照明光源白光 LED 的发展概况[J]. 物理通报, 2007(11): 53-55.
- [3] 高勇, 张敏, 郭斌. 罗丹明荧光探针在生化分析中的应用[J]. 化学通报, 2009, 72(1): 15-19.
- [4] 贾佳, 马会民. 新的罗丹明 B 类光学探针的研究[C]//第 15 届全国有机分析及生物分析学术研讨会. 北京: 中国化学会, 2009.
- [5] 刘中仕, 荆西平. 荧光光谱的罗丹明 B 校正原理[J]. 化学通报, 2005, 20(1): 771-775.
- [6] 黄保军, 李建军, 屈凌波. 罗丹明 B 荧光光谱机理的研究[J]. 天津师范大学学报: 自然科学版, 2005, 25(3): 8-10.
- [7] 杨美玲, 崔东亚, 朱运德, 等. 金(III)-罗丹明 B-碘化钾体系的荧光光谱分析[J]. 陕西理工学院学报, 2008, 24(2): 75-77.
- [8] 魏永巨, 康志敏, 刘翠格, 等. 罗丹明 B 的共振散射光谱研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2004, 24(12): 1659-1662.
- [9] 王雅娜, 崔励, 马杰, 等. 罗丹明 B 的三维荧光光谱研究[J]. 染料与染色, 2007, 44(9): 57-59.
- [10] 司马伟昌, 张玉钧, 王志刚, 等. 多波长 LED 阵列诱导荧光光谱在多组分分析中的应用研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2008, 28(1): 105-168.
- [11] KEMNITZ K, TAMAI N, YAMAZAKI I, et al. Fluorescence decays and spectral properties of rhodamine B in sub-mono, mono, and multilayer systems[J]. Phys Chem, 1986, 90(21): 5094-5101.
- [12] 赵瑜, 李隆弟. 罗丹明和荧光素类染料的固体基质室温磷光研究[J]. 分析化学, 1996, 24(7): 745-749.
- [13] 宋秀丽. 罗丹明类染料的固体表面室温磷光分析法的研究: 罗丹明类碱性染料用作磷光探针的尝试[J]. 山西师范大学学报: 自然科学版, 2000, 14(4): 44-50.

## Spectrum Characteristics of the Transient Fluorescence Spectra of Rhodamine B Stimulated by Pulsed LED

YE Ming-shu, TIAN Zhi-fu, HU Qing, ZHUANG Qi-ren

(College of Information Science and Engineering, Huaqiao University, Quanzhou 362021, China)

**Abstract:** In this paper, light-emitting diode (LED) source as excitation light pulses is used to study the transient spectra characteristics of rhodamine B. Excitation light source with three central wavelengths are 406 nm, 464 nm and 528 nm super bright purple, blue and green LED. Experimental results show that the fluorescence intensities are very different with the different excitation light color (wavelength), pulse duration and different concentration of the rhodamine B. In the same concentration, if the excitation duration (pulse width) is less than 10 ms, only green fluorescent excitation can produce strong fluorescence, purple and blue light can not produce fluorescence; if the pulse width is greater than 20 ms, the purple and blue can excite fluorescence but the intensity of excitation is much smaller than that of the green, and the fluorescence of blue is weakest. Using a suitable pulse width of purple, blue and green LED as the excitation source, the characteristics of the fluorescence spectra of rhodamine B can be obtained.

**Keywords:** light emitting diode; rhodamine B; fluorescence spectra; pulse duration

(责任编辑: 黄晓楠 英文审校: 吴逢铁)