

摘要

本文从实验和理论上研究了人血液的荧光光谱,对荧光光谱的结构特征、变化规律及其发光机理进行了探讨,主要研究成果包括以下几个方面。

研究了 408nm 的 LED 光诱导不同浓度人全血液的荧光光谱,包括研究了血液的自吸收对其荧光光谱结构产生的影响;分析了血液的荧光光谱随其浓度增加出现红移的现象;提出了 556nm 谱峰不是某一荧光团所产生的特征峰,而是由吸收所造成的假峰的观点;讨论了激励光散射中心波长偏离激励光中心波长现象的原因。

用不同波长的 LED 光诱导了不同浓度的人全血液的荧光光谱,研究了人血液荧光光谱随血液浓度的增加而红移的现象及其规律,结果表明:光谱峰值随血液浓度的增加按 e 指数规律向长波方向移动;从能量转移的角度,分析了血液中各荧光团之间在不同浓度下、不同荧光区域所具有的不同能量吸收机制;得出吸收是产生红移的主要原因的结论。

对波长为 457 nm 的 LED 光、波长为 457.9 nm 的 Ar⁺ 激光和波长为 632.8 nm 的 He-Ne 激光诱导下的人全血液荧光光谱的特性与机理进行了研究。指出用激光光源激发可以显现血液荧光光谱的部分精细结构,说明血细胞中的荧光团对激发光波长具有一定的选择性,这种选择是由其自身的能级结构和状态所决定的。

用 408nm 的 LED 偏振光诱导了不同浓度人全血液的静态荧光偏振光谱,讨论了其光谱的结构特征和红移现象并给出了机理解释;检测了荧光偏振光谱中各主要荧光区的偏振度并研究了偏振度随浓度的变化规律,用能量转移理论分析了在不同荧光区、不同浓度下,血液中各荧光团之间的不同能量转换机制及偏振度的变化现象。

本文的研究结果为研究光与血液相互作用的机理,借助血液自体荧光进行疾病的诊断和治疗,以及研究血液生物大分子的构象与结构特点提供实验和理论依据。

关键词: LED 全血 吸收光谱 荧光光谱 红移 偏振度

Abstract

The theoretical and experimental Investigation of Fluorescent Spectra from Human Blood Solution are reported. The Spectral Characteristics, the variation rule of Spectra with different conditions and the mechanism of light-blood interaction are also given in this paper. The main research results including:

The fluorescent spectra of human blood solution with different concentrations induced by 408nmLED are studied, including the investigation of the influence on fluorescent profile exerted by blood self-absorption. The phenomena that fluorescence spectral peaks are apparently red-shifted with the increment of blood concentration are analyzed and the mechanism is given a reasonable explanation. The viewpoint is put forward that 556nm spectrum is illusive owing to blood absorption but not a characteristic fluorescence emitted by a certain fluorophore. The reasons that the central wavelength of dispersion light departs the one of exciting-light are discussed.

The fluorescent spectra of human blood with different concentration induced by different wavelength LED light are investigated. The phenomenon that fluorescence peaks are apparently red-shifted with the increase of blood concentration is analyzed and the mechanism is given a reasonable explanation. The results indicate that the peak is shifted following the rule of e-exponent with the increase of the blood concentration. The mechanism of different energy transfer with different fluorescent areas is analyzed from the theory of energy transfer. The resonance energy transfer is the primary reason of the fluorescent spectra peaks.

Comparison researches of LED light ($\lambda=457$ nm), Ar⁺ laser ($\lambda=457.9$ nm) and He-Ne laser ($\lambda=632.8$ nm) induced whole blood fluorescence spectra indicate that using laser as excitation light can show partly fine structure of blood cell spectra, which suggests that depending on energy level structure and state of the fluorophores, the absorption of the fluorophores to the wavelength of exciting light has definite selectivity.

The static fluorescence polarization spectrum of Human's whole blood is analyzed when induced by polarized light of 408nm LED. The spectral characteristics and red-shifted phenomenon with different concentration sample solutions are discussed, and the mechanism of the red shift is also given in this paper. The polarized degree of key fluorescence emission

华中科技大学硕士学位论文

bands in polarization spectrum is measured, and the variation rule of the polarized degree with the different concentrations of whole blood is studied. The different energy transfer mechanism with different fluorescence areas and different concentrations of whole blood is studied by the theory of energy transfer as well as the variation of polarized degree.

The research consequences may offer a theoretical and experimental reference to study the mechanism of light-blood interaction, to process clinic treatment or diagnose technology in virtue of auto-fluorescence from blood and its components, and to investigate the conformation and structure characteristic of biological macromolecule.

Key words: LED whole blood absorption spectra fluorescence spectra
red-shifted polarized degree.

独创性声明

本人声明所呈交的学位论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除文中已经标明引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。本人完全意识到本声明的法律结果由本人承担。

学位论文作者签名：彭长德

日期：2006年4月30日

学位论文版权使用授权书

本学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，即：学校有权保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅和借阅。本人授权华中科技大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编本学位论文。

保密口， 在_____年解密后适用本授权书。

本论文属于 不保密。

(请在以上方框内打“√”)

学位论文作者签名：彭长德

日期：2006年4月30日

指导教师签名：[Signature]

日期：2006年4月30日

1 绪论

光谱学是通过物质对光的吸收和发射，来研究光与物质相互作用的一门科学。通过研究原子和分子光谱，可以对物质结构作出分析，因此在物理、化学、生物、地质、考古、天文等许多领域起着十分重要的作用。荧光光谱分析是光谱学的重要组成部分，由于荧光分析的灵敏度很高，并且在物质吸收光后发生荧光这很短的时间内会发生许多分子过程，会影响到荧光物质的光谱特征，所以荧光分析在生物化学、医学、工业和化学等研究中的应用越来越广。

1.1 课题的研究背景与意义

生命健康是人类永恒的话题，然而癌症作为人类生命的主要杀手之一，仍然在世界范围内威胁着许多人的生命健康。因此癌症的诊断和治疗成了全人类关心的话题。随着现代医疗技术的不断发展和进步，癌症可以得到一定的控制（必须是在早期发现并及时治疗），但是癌症的死亡率仍然很高。癌症的治疗效果与其早期诊断有很大的关系。依靠现有的治疗手段，大部分早期肿瘤能得到根治，而晚期肿瘤只能得到症状改善的姑息治疗效果^[1]。由于尚缺乏成熟有效的治疗手段，所以对癌症的治愈率还是很低的。资料表明，晚期癌症病人手术切除后的五年存活率在 10% 以下，而早期癌症病人手术切除后五年存活率在 80% 以上^[2,3]。因此，提高癌症患者的存活率的关键是早期的诊断和治疗。

现有的癌症诊断方法有很多^[4,5]，如采用肿瘤标志物、X 射线、CT、磁共振、放射性核素、超声等多种技术，它们多数都是利用组织的形态特性进行诊断，但是检查过程中接受的辐射和检查所需服用的药剂常常对身体有害，有些诊断费用还很高。而且对怀疑对象最终仍然需要取样活检通过最权威的病理学证实。活检是对取样活组织标本进行病理组织切片检查分析，具有较高的准确率。但活检存在许多不：一、克服的缺点，如：微小病变和较深层病变易被漏检；活检取样时主观随意性较大，往往因随机取位不准而误诊；需花费较长的时间和代价在体外进行，存在一定风险，不能“实时诊断”，易延误治疗；活检不准的问题也尤为突出。因此，人们一直在致力于寻找种能正确指导或辅助活检的诊断方法。但到目前为止，还没有一种非损伤性的、诊断率较高的早期癌症检

测手段应用于临床, 因此找到一种方便、快捷、有效的早期诊断方法无疑意义重大。

利用生物组织的光学特性来判别组织性质是许多应运而生的研究方法中最为突出的一类, 其中最有研究前景的就是利用人体组织受激辐射产生的荧光来进行辅助诊断。

人体内各种化学成分的含量及其变化能真实地反映新陈代谢的情况, 是评价人体健康状况的重要信息, 也是多种疾病诊断与疗效判定的重要指标。癌细胞和正常细胞一样, 也有自己特殊的代谢活动, 在血液、淋巴液及组织中必然潜藏着机体细胞开始癌变的信息。在人体组织细胞和体液内, 存在大量能够产生荧光的生物大分子, 如胶原、核黄素、色氨酸等, 被光激发后能够发射荧光^[6]。但是由于正常人和恶性肿瘤患者体内, 所含有的可发荧光的生物分子和有机大分子的种类和浓度可能存在差异, 而且细胞的功能和代谢状态, 化学结构和形态, 以及微观环境等因素的不同都可能对其荧光光谱的结构产生影响, 从而使健康人和癌症患者以及正常组织与肿瘤组织有完全不同的荧光光谱^[7], 根据这些差异, 就可能实现癌症的鉴别、筛查和诊断。该方法不需要服用光敏剂, 直接反映组织的内部结构以及物理、化学特性变化, 并能够由此发现识别肿瘤的特征光谱或数学判据。该方法的突出优点在于它无损伤、无副作用, 有实时快速的发现早期病变的潜力。

由于血液在人体内是无所不在的, 因而在研究光与人体组织相互作用时, 不可避免地要涉及到光与血细胞的相互作用问题。虽然关于血液的流变学和生物化学等性质的研究已很多, 但从物理学或光学的角度出发进行研究的报道并不多见。光谱学方法是研究光与血液相互作用过程的有效方法之一, 当光照射到血液, 会发生散射、吸收和发射等现象。通过检测和分析血液的散射光谱、吸收光谱和发射光谱, 能够获得一些反映血液状态和内部物质构成情况的信息^[8], 以及光子与血液相互作用过程的有关信息。它对于用光诱导人体组织荧光光谱进行早期癌症的诊断有着重要的参考价值, 同时对搞清诊断机理有着重要的意义。

1.2 荧光光谱学在医学中的应用

光谱技术用于癌症诊断的一种主要方式是使用适当波长的光激发被检测物的荧光, 根据其荧光光谱特征进行癌症的诊断。而根据被检测物的荧光物质的不同, 光谱检测技术用于癌症诊断可分为两类: “敏化荧光法”和“自体荧光法”。

1.2.1 敏化荧光法

由于大多数细胞的主要有机成分在可见光的波长范围内没有明显吸收,所以对可见光反应不敏感。但当有适当的光敏剂时,有机体、细胞及许多类型的在生物上有重要意义的分子都能受到光的破坏。由于在些生物系统中的光敏化过程大都有分子氧参加,使得这些生物系统为之所敏化,所以生物系统中的这种反应被称为“光动力学作用”或“光动力学反应”。光敏荧光法就是利用某些荧光物质在恶变组织中比在正常组织中滞留能力大,形成很大浓度反差的特性,通过对患者注射这种荧光物质,并用适当波长的光激发使其产生荧光,从而实现恶性肿瘤的定位和诊断的方法。

目前临床使用和研究中最常见的光敏剂主要有:血卟琳衍生物(HpD)、荧光素钠等光敏剂。

1960年, Lipson 和 Baldes 发现血卟琳衍生物(HpD)^[9],经 Dougherty 研究证明癌组织对 HpD 等光敏剂具有特殊的亲和作用,提出 HpD 可用于癌症的光谱诊断。1973年, Kyriazis, Balin 和 Lipson 用汞灯作光源,使用光纤束、滤光片,用肉眼观察 HpD 荧光,对 20 例宫颈病变患者做了宫颈癌检查,检查结果与病理切片结果比较,符合率为 80%^[10]。该方法能检测到较微小的病变和较深层病变,克服了活检的一些缺点,所以受到许多国家学者的关注,之后尤其是近年来,用敏化荧光法对肿瘤的诊断和定位方面的应用做了大量的研究,并取得了一些令人振奋的结果^[11-15]。

总的来说,敏化荧光法诊断癌症,灵敏度高,因为用来做肿瘤定位的荧光物质的荧光光谱是已知的且光谱特征好,容易识别,又有较高的荧光效率,容易检测。但由于被检测者必须注射光敏药物,而目前大多数光敏药物都有一定的副作用,如使用最多的血卟琳衍生物,接受注射的患者必须避光三周,否则将会使正常皮肤产生光敏性皮炎,所以学者们一直在寻找高效、低毒的光敏剂。但是在找到新的对癌细胞选择性强,对正常组织无毒副作用的光敏药物之前,此种方法难以成为一种癌症早期诊断和普查的方法。

1.2.2 自体荧光法

为了克服敏化荧光法在诊断中的缺点,不使用任何光敏物质,直接使用激光诱导组织自体荧光的“自体荧光法”开始受到人们的重视。自体荧光来源于生物组织中的某些生物分子被激发后产生的荧光。这些能够产生荧光的物质又叫荧光团或生荧团,研究表明,

华中科技大学硕士学位论文

它们广泛存在于人的组织和体液中。在恶变组织中，由于肿瘤在发生及代谢方面的特殊性，导致某些物质的变化，使所含的可发荧光的生物分子和有机大分子的种类和浓度与正常组织相比存在差异，这些因素可能对荧光产生影响，从而使其自体荧光光谱与正常组织的荧光光谱存在差异，主要表现在荧光强度和波形有改变^[16]。利用这些差异可与正常组织作出区别，提供了对诊断癌变有用的信息，所以人们能够用自体荧光光谱进行癌症诊断。

国外这方面的起步较早，1924年，Policard首次在实验室中观察到肿瘤组织的自体荧光，认为是受细菌感染在肿瘤中形成的内源性卟啉所致，并在特定光激发下产生^[17]。但自体荧光应用于癌症诊断却开始于二十世纪八十年代初。1980年，日本学者崎田隆夫用波长514nm的氢离子激光照射胃癌组织，经滤光片在570~580nm范围内观察到较强的黄色荧光，而良性组织中观察不到^[18]。1984年Okuda, Shigeru等成功的利用内窥镜拍摄了被488nm的激光激励的胃癌组织的自体荧光^[19]。R.R. Alfano等研究了人体正常和癌变的乳腺组织和肺组织的荧光光谱，发现与正常组织相比，肿瘤组织的荧光峰发生了蓝移，并且形状平坦，指出根据这一结果可以对乳癌和肺癌进行诊断^[20,21]。1990年，Palcic, B.等用蓝色激光诱导正常和癌组织的自体荧光，在两个不同的波长处用图像增强（image-intensified）CCD对其进行测量，测得的自体荧光数据用计算机进行处理后，能够在没有使用药物的情况下清晰地区分出早期肺癌。并用由此方法发展起来的检查仪器用于临床实验，发现了用常规方法不能定位的隐避癌变^[22]。德国人Sroka, Ronald等对恶性病变时的内卟啉进行了激光辅助检测^[23]，结果表明内卟啉的含量依赖于肿瘤的发展程度。

1991年，Das, B.B.等利用紫外荧光光谱技术进行了乳腺、卵巢、子宫和宫颈癌的诊断研究^[24]，指出在340nm到440nm波段对荧光强度进行比较的方法能够有效的从非癌组织中区分出癌组织来。Arendt, J.T.等用自体荧光和反射光谱研究了膀胱粘膜组织的早期癌变^[25]，在研究了370~400nm波段范围内的激励光后，发现400nm的激励光能将各组更好的区分开来。位于460nm的发射峰值随疾病的严重程度而减小。应用460nm的发射能将浸润性癌与良胜粘膜组织区分开来，而使用标准化了的635nm的发射峰能将浸润性癌与CIS（原发性癌）区分开来。同时指出，荧光团主要为胶原和卟啉。Kojiro

Onizawa 等使用 404nm 激发波长研究了口腔鳞状细胞癌(SCC)的红色荧光的光谱特性^[26],发现随着恶变程度的增加,光谱谱线的峰值在 634nm 和 672nm 处增加,在 520 和 582nm 处减少,其中 582nm 处荧光强度的减小和 634nm 处荧光强度增加在一般的实验和临床中均可被观察到,而 582nm 和 634nm 处荧光强度的比率在所有的标本中均存在。认为红色荧光是由卟琳发射的,并且随着恶变程度的增加,卟琳在 SCC 内部或癌组织表面积累量有所增加。Asima Pradhan 等使用平面偏振的 488nm 激光激发皮肤样品,研究了正常和病变皮肤组织的荧光^[27],发现癌变皮肤组织的偏振化的荧光光谱与正常人的有所不同,正常和癌变组织的光谱最大值分别大约位于 540nm 和 530nm 处,在不同波长处计算各向异性表明癌组织与正常的相应组织相比,其偏振度的值更高。

总之,二十多年来,人们用不同的激发波长,通过光谱或成像等方法,对动物和人体内、外肿瘤组织和体液受激产生的自体荧光进行了大量的研究和观察,初步发现了肿瘤患者与健康人荧光的不同特征,并对光谱差别的来源做了一些探索。然而,分析以上类似的光谱法研究,发现各研究得出的结论具有较大的差别,还不能形成一种共识和具体的诊断标准。这可能是由于各研究工作使用的仪器不同,提取的特征参数不同,判据的计算也各有不同,其结果造成诸多结果之间难以进行比较,更缺乏统一的诊断标准;尤其是对它们荧光差异产生的机制,现有的实验结果并没有在这个方面给出令人满意的证据,目前的荧光诊断技术仅仅反映了肿瘤的整体效应,还不能解释生物机体内在基本分子结构上的差异。这个现象一方面说明了通过荧光光谱法实现癌症诊断的可能性,另一方面也证明该方法尚未成熟,提示了应该从更多角度进行较大规模的试验与理论研究。

1.3 血液光谱学的研究现状

光谱学方法是研究光与血液相互作用过程的有效方法之一,当光照射到血液,会发生散射、吸收和发射等现象。通过检测和分析血液的散射光谱、吸收光谱和发射光谱,能够获得一些反映血液状态和内部物质构成情况的信息^[28],以及光子与血液相互作用过程的有关信息。

血液的吸收光谱表示血液对于光的吸收随波长的变化情况,吸收曲线上各峰值的位置和相对强度能够反映血液中生物分子的部分能级结构^[29];血液的荧光光谱则可以部分

地反映血液分子吸收光子能量以后所发生的能量转移情况。分析研究这些谱线的结构，有助于进一步理解激光与血液的相互作用机理。

1.3.1 血液的散射光谱研究

血液是一种强散射介质。当一束光作用于血液时会发生散射现象，如 Rayleigh 散射、Mie 散射或 Tyndall 散射和 Raman 散射，其中 Rayleigh 散射、Mie 散射或 Tyndall 散射属弹性散射，散射光与入射光的频率相同；Raman 散射是非弹性碰撞，散射光的频率相对入射光的频率有位移^[30]。关于血液或血细胞的散射特性，国内外研究的已比较多^[31-33]，这方面的理论相对比较成熟。所以根据血细胞的散射特性理论制成的血细胞计数器^[34-35]已成功用于临床。

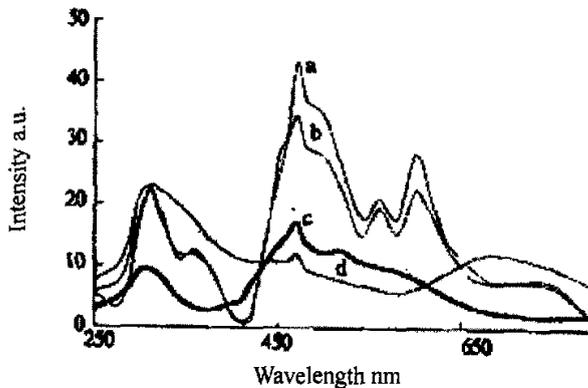


图 1.1 各种血液成分的共振散射光谱

- a. 全血稀释 400 倍； b. 红细胞稀释 500 倍
c. 白细胞稀释 500 倍； d. 血清稀释 100 倍

在血细胞的共振散射光谱研究方面，蒋治良等人利用 U-3400 型紫外—可见光分光光度计获得了人的血液、红细胞、白细胞和血清的共振散射光谱，如图 1.1 所示^[36]。由图可知全血和红细胞均在 310 nm、470 nm、560 nm、600 nm 处产生四个共振散射峰。白细胞和血清均在 310 nm、470 nm 处产生二个共振散射峰；但共振散射峰强度较弱。全血的共振散射谱图是由红细胞、白细胞、血清的共振散射光谱图组合而成， I_{RS} 值跟颗粒的大小和数量有关。其中 470 nm 处的共振峰主要是红细胞的贡献。而白细胞的贡献相对较小；560 nm 和 600 nm 处的共振峰可以认为是红细胞的特征峰。血清对图 1.1 各峰的贡献较小。

1.3.2 血液的吸收光谱研究

在生物组织中，主要的吸收光的生色团是水分子以及如蛋白质和色素的大分子。在红外波段的吸收主要是由水分子引起的，而蛋白质和色素主要吸收光谱在紫外和可见光范围。

国内外的研究均表明全血的吸收光谱曲线与红细胞的吸收光谱曲线分布情况基本上一致。陈祖林等人的实验(1994)表明^[37]，在波长为 240~800 nm 范围内，全血与红细胞均在波长为 342 nm，416 nm，540 nm 和 578 nm 处附近存在吸收峰，在波长为 416 nm

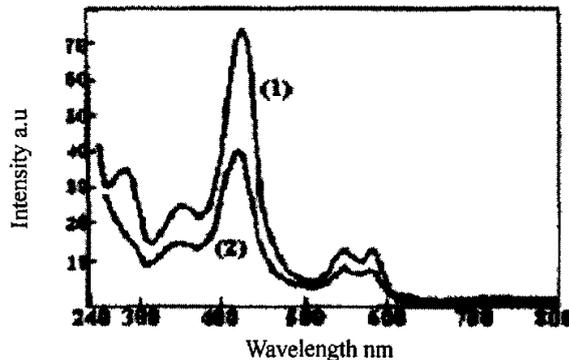


图 1.2 全血和红细胞的吸收光谱

(1) 全血, (2) 红细胞

附近的吸收最强，如图 1.2 所示。只是红细胞在波长为 278 nm 处未见吸收峰（如图 1.2 中 (2)）。全血与红细胞的吸收光谱曲线（图 1.2）又与 Boulnois (1986) 给出的血红蛋白的吸收光谱曲线（图 1.3）很相似^[38]。由此可见，血液的吸收光谱主要来源于血红蛋白的吸收。

根据 G.S.Thomas 等人对卟啉环作的光谱分析^[39]，其特征吸收峰位于波长为 415 nm，540 nm，578 nm 处。因为血液的主要成分是血红蛋白，其主要化学结构为血卟啉环，因此也可以认为血液吸收光谱中在这三个波长附近的峰是由血红蛋白中的血卟啉环所为。

S.B. Brown(1980)研究了血红蛋白在波长为 500~900 nm 所吸收光谱^[40]，如图 1.4 所示。其中，虚线是氧合血红蛋白 (HbO₂) 的吸收光谱曲线；实线是脱氧血红蛋白(Hb)的吸收光谱曲线。在波长为 540~580 nm 之间，两条曲线都有比较强的吸收峰。当波长大于波长为 600 nm 附近，两条曲线都迅速下降，但两条曲线的下降程度有所差别。HbO₂

曲线约在波长为 670 nm 处下降到最低点；而 Hb 曲线则在波长为 720 nm 处才下降到最低点。

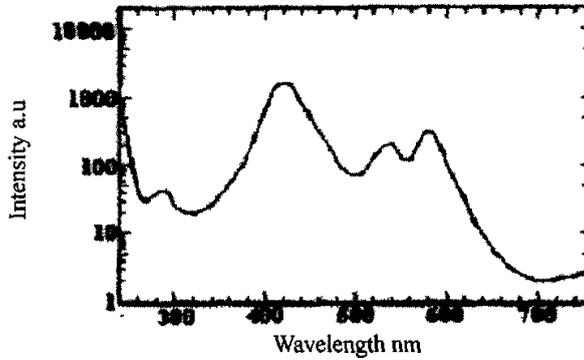


图 1.3 血液中的血红蛋白的吸收光谱

骆晓森等人的研究结果表明^[41]，在生理温度下，与周围环境达到平衡的生物分子按能量呈玻尔兹曼分布，即大多数生物分子都处于电子基态的最低振动能级，这些处于最低振动能级的大多数分子对吸收曲线的峰值部分做出主要贡献；而处于较高振动能级的少数分子则对吸收曲线的“斜坡”部分做出贡献。血液中，氧合血红蛋白与脱氧血红蛋白通常同时存在，并且静脉中脱氧血红蛋白的含量显著高于动脉中脱氧血红蛋白的含量。波长为 600~670 nm 的红色光波段正处于血红蛋白的一个吸收峰的“斜坡”区域（图 1.4），因此，当波长为 600~670 nm 的红色激光照射到血液，总会发生引起电子跃迁的吸收过程，尽管其吸收率比较小。通过吸收的累积作用，也能够产生可观的生物刺激效应。

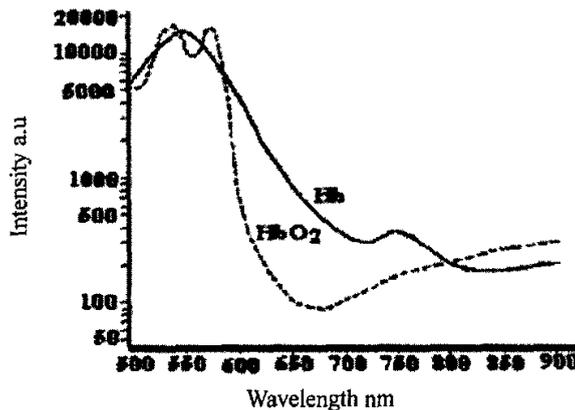


图 1.4 血红蛋白在波长为 500~900 nm 波段的吸收光谱

1.3.3 血液的荧光光谱研究

国外在对生物组织的荧光光谱的方面研究中间接地提到血液或血细胞的影响^[42,43], 且对血浆的研究报道略多些^[44]。相比之下, 国内学者对血液及其组分的荧光光谱研究较多一些。例如, 陈荣等人^[45]对用 He-Ne 激光激发血液产生的荧光光谱的初步分析后给出: A、B、O 和 AB 型血液在波长为 632.8 nm He-Ne 激光诱导下所产生的荧光光谱形状相似, 荧光光谱曲线都具 3 个峰值, 分别位于波长为 670 nm, 730 nm(有的血型出现的峰位在波长为 780 nm)和波长为 981 nm 处, 荧光强度的差异主要是由样品的浓度造成的。降雨强等人^[46]用波长为 532 nm 的激光作激发光源, 分别测量正常人血液及其组分(血浆、血小板、红细胞)的荧光光谱。结果显示, 全血在 630 nm 及 710 nm 附近出现荧光峰值, 其各组分的荧光光谱有明显差异, 其中血浆的荧光光谱最强, 且谱线较为丰富, 故而临床诊断应用时血浆的荧光光谱更为合适。另外, 比较正常人及已型肝炎患者血浆标本的荧光光谱发现, 其 738 nm 处的峰值强度有显著差异。

宋峰等人^[47]用 Ar^+ 激光诱导血液和红细胞与血清的混合体产生的荧光光谱, 并指出在人体动脉的 LIT 光谱中红细胞对荧光的吸收作用。在 500~700 nm 波段中, 这种吸收是不均匀的, 在 547 nm 和 581 nm 处有最强的吸收, 这样导致了凹陷的产生。此外, 在 530 nm 附近, 红细胞的吸收作用较大, 这样, 当血清中掺入红细胞时, 就出现了荧光光谱蓝移和变窄的现象。

骆晓森等人^[48,49]研究了中心波长为 502 nm 的高亮度发光二极管、溴钨灯经 DTB530 带通滤波片后的光以及波长为 632.8 nm 的 He-Ne 激光诱导下的 1% 的全血溶液的光谱。结果表明 530 nm 波长光照射血液会产生比较强的荧光发射, 这提示 530 nm 光对血液有比较强的生物学作用; 502 nm 波长光照射血液也会产生荧光发射, 但其荧光强度比 530 nm 波长光照射血液所产生的荧光弱很多, 这一结果与血液对 502 nm 波长光的吸收率小于对 530 nm 波长光的吸收率的情况相一致; He-Ne 激光(632.8 nm)照射血液, 在散射光中可观察到有波长不同于原激发光波长的光谱分布, 并且在原激发光波长两侧都有分布, 只是其强度很微弱。这表明, He-Ne 激光能在血液中引发一定程度的物理和化学的变化, 进一步研究这些变化, 有可能为理解激光血液疗法的治疗机理提供一定依据; 用上述三种波长光照射仅含肝素的生理盐水, 未观察到有不同于原激发光波长的发射光谱

出现。这表明，前面三种情况中所检测到的不同于原激发光波长的发射光谱是由血液发射的；光诱发的自由基和自由基反应在光照射血液所产生的生物效应中起重要作用，进一步研究光量子引发血液中的自由基反应过程及特点对于阐明激光血管内照射疗法的治疗机理具有一定意义。

然而以上学者对血液的荧光光谱的研究都只是某一特定的环境下进行的，而对影响荧光光谱产生的条件并未给予重视和系统研究，如浓度、激发光强度和波长以及样品的新鲜程度等，所以得到的结果差异较大，尚未得到明显的规律。

为了系统的研究地研究光与血液相互作用的光谱学特性，高淑梅等人^[50,51]在用可见光波段的、不同波长的 LED 光和 Ar⁺ 激光诱导实验小白鼠的全血、红细胞和血红蛋白荧光光谱实验研究基础上，对用不同波长的 LED 光和 Ar⁺ 激光诱导的血细胞荧光光谱随浓度的变化规律进行了实验研究和理论分析，并就上述两种光源激发的荧光光谱进行了比较研究。通过改变激发光波长和血细胞浓度，获得了 LED 光诱导全血、红细胞和血红蛋白产生的荧光光谱，其光谱覆盖了 430~700 nm 波段，且光谱强度和峰值位置均与溶液浓度有较强的依赖关系。

1.4 课题来源及关键技术

基于用光诱导人体组织荧光光谱进行早期癌症诊断的研究背景，在杨坤涛教授的指导下，本人主持申报了江苏省高等学校自然科学基金项目“光诱导人血液及其组分荧光光谱的机理和应用研究”和徐州师范大学自然科学基金重点项目“LED 诱导人血液荧光光谱研究”。在两项基金的资助下，进行了本课题的研究工作。

本文主要从实验和理论上研究人血液的荧光光谱，对荧光光谱的结构特征、变化规律及其发光机理进行探讨，关键技术如下：

(1) 研究 408nm 的 LED 光诱导不同浓度人全血溶液的荧光光谱，对荧光光谱的结构特征、变化规律及其发光机理进行探讨。

(2) 分别用 407nm、475 nm 和 508nm 的 LED 光诱导不同浓度的人全血溶液的荧光光谱，研究人血液荧光光谱随血液浓度的增加而红移的现象及其变化规律。

(3) 对波长为 457 nm 的 LED 光、波长为 457.9 nm 的 Ar⁺ 激光和波长为 632.8 nm 的 He-Ne 激光诱导下的人全血溶液荧光光谱的结构特征与机理进行研究。

华中科技大学硕士学位论文

(4) 用 408nm 的 LED 偏振光诱导不同浓度人全血溶液的静态荧光偏振光谱, 讨论其光谱的结构特征和红移现象并给出机理解释; 检测荧光偏振光谱中各主要荧光区的偏振度并研究偏振度随浓度的变化规律。

2 生物分子的荧光光谱

生物体内含有多种生物大分子,受到光照射时,会发射出荧光。不同的分子其能级结构不同,吸收光和发射的荧光也就不同,同一种物质当其含量不同,所处的物理、化学环境不同,发射的荧光也相应的会有差异。当人体发生病变时,体内的生物分子、代谢以及微环境就会发生相应的变化,进而导致其荧光光谱的变化,因此可以利用光谱仪器探测生物分子的光谱,通过对其光谱特征的分析实现对疾病的探测。本章对生物分子荧光涉及的基本理论进行简单的介绍。

2.1 分子荧光的产生

分子荧光是分子的较高能级对较低能级的自发跃迁辐射。分子的总能量可以表示为电子能量 E_e 、振动能量 E_{vib} 和转动能量 E_{rot} 三部分之和,其中振动能量和转动能量是迭加在电子能级之上的。因此,一个分子的激发态要具体考虑它的电子态、振动态和转动态。

处于激发态的分子是不稳定的,它可能通过辐射跃迁和非辐射跃迁等分子内的去活化过程或经由分子间的作用过程损失能量而返回基态。非辐射跃迁包括内转换(internal conversion)和交叉弛豫(cross relaxation),前一种过程指的是相同态体系之间的跃迁(如单重态间的跃迁和三重态间的跃迁),而后一种过程则指的是不同态体系间的跃迁(如单重态与三重态间的跃迁)。非辐射跃迁的去活化过程使电子激发能转化为振动能或转动能。辐射跃迁的去活化过程发生光子发射,并伴随着荧光或磷光现象。分子内部的光物理过程可由图 2-1 来说明^[28]:分子吸收辐射后被激发到单重态的第一电子激发态(S_1)或更高电子激发态(S_2 、 S_3 等)的振动能级上,处于较高振动能级上的分子,很快(约 10^{-12} – 10^{-14} s)发生振动弛豫,将多余的能量传递给介质而降落到该电子态的最低振动能级($V=0$)。对高于 S_1 的 S_2 、 S_3 等电子态,此后又经由内转换及振动弛豫而降落到 S_1 电子态的最低振动能级,如图 2-1 所示。处于 S_1 最低振动态的分子,其分子内的去活化作用有如下几种途径:(1)发生 $S_1 \rightarrow S_0$ 的辐射跃迁而伴随荧光现象;(2)发生 $S_1 \rightarrow S_0$ 的内转换过程;(3)发生 $S_1 \rightarrow T_1$ 的交叉弛豫。而处于 T_1 态的最低振动能级的分子,则可能发生 $T_1 \rightarrow S_0$ 的辐射跃迁而伴随磷光现象,也可能发生 $T_1 \rightarrow S_0$ 的交叉弛豫。

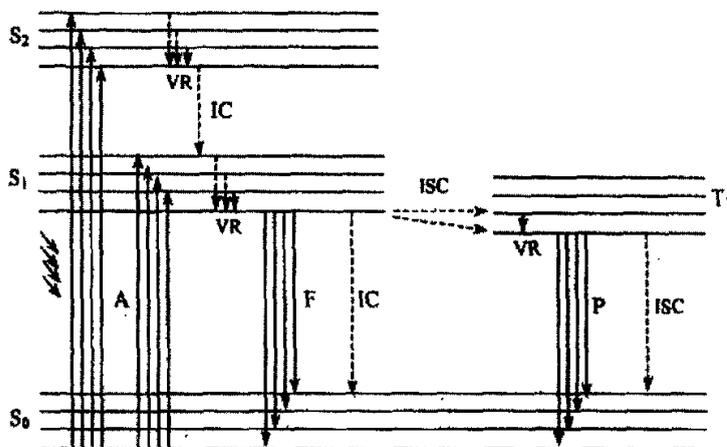


图 2.1 分子内的光物理过程

(A: 吸收 F: 荧光 P: 磷光 IC: 内转换 ISC: 交叉弛豫 VR: 振动弛豫)

2.2 荧光的激发光谱和发射光谱

任何荧光化合物，都具有两种特征的光谱：激发光谱和发射光谱。

2.2.1 荧光激发光谱

荧光激发光谱，就是通过测量荧光体的发光通量随激发光波长变化而获得的光谱，它反映了不同波长激发光引起荧光的相对效率。激发光谱的具体测绘办法，是通过扫描激发单色器以使不同波长的入射光激发荧光体，然后让所产生的荧光通过固定波长的发射单色器而照射到检测器上，由检测器检测相应的荧光强度，最后通过记录仪记录荧光强度相对应激发光波长的关系曲线，即为激发光谱。激发光谱可供鉴别荧光物质，在进行荧光测定时供选择适宜的激发波长。

2.2.2 荧光发射光谱

荧光发射光谱，又称荧光光谱。如使激发光的波长和强度保持不变，而让荧光物质所产生的荧光通过发射单色器后照射于检测器上，扫描发射单色器并检测各种波长下相应的荧光强度，然后通过记录仪记录荧光强度对发射波长的关系曲线，所得到的谱图称为荧光光谱。荧光光谱表示在所发射的荧光中各波长组分的相对强度。荧光光谱可供鉴别荧光物质，并作为在荧光测定时选择适当的测定波长或滤光片的根据。它具有如下特

征^[28]

(1) 斯托克斯位移

相对于吸收光谱, 荧光光谱向光波长区方向移动, 从能量的观点来看, 斯托克斯位移反映了激发光子和发射光子之间存在一定的能量损失。这种能量损失是激发态的部分能量通过非辐射弛豫变为分子的振动动能, 在溶液情况下, 溶剂分子与受激分子之间的碰撞也会引起能量的流失。

(2) 发射光谱的形状与激发波长无关

不论用何种波长激发, 荧光光谱均不会发生变化。因为荧光发射是从第一电子激发态的基振动态向基电子态的跃迁, 不论最初分子被激发到哪个电子态, 随着内转换和振动弛豫过程, 它们都将迅速弛豫到第一电子激发态的基振动态。所以分子中很难出现共振荧光。

(3) 吸收光谱的镜像关系

荧光光谱和它的吸收光谱之间存在着镜像关系。分子荧光光谱和吸收光谱都是分子内部能级结构和特征的反映, 但荧光光谱是激发分子从第一电子激发单重态的最低振动能级辐射跃迁到基态的各个不同振动能级所形成的, 其形状与基态中振动能级的分布有关; 而吸收光谱中第一吸收带的形成是由于基态分子被激发到第一电子激发单重态的各个不同振动能级所引起的, 由于基态分子在通常情况下处于最低振动能级, 因而第一吸收带的形状与第一电子激发单重态中振动能级的分布情况有关。而一般情况下, 基态和第一电子激发单重态中振动能级的分布情况是相似的, 所以分子荧光光谱和吸收光谱常常互为镜像。

2.2.3 荧光与分子结构

能够产生荧光的有机分子很少, 只有具有如下结构的体系的分子才能产生强荧光^[28,53] :

(1) 荧光物质分子都具有较大的共扼双键 (π 键)。共扼关系越大, 离域 π 电子越容易激发, 荧光越易产生。因此大部分荧光物质都有芳环或者杂环, 芳环越大, 荧光峰越向长波方向移动, 且荧光强度也较强。

(2) 荧光物质分子多为平面构型且具有一定刚性。

(3) 具有最低的单线电子激发态 S_1 为 $\pi-\pi_1^*$ 型, 即 $\pi \rightarrow \pi_1^*$ 跃迁, 它属于电子自旋允许的跃迁, 荧光强度大。

(4) 取代基团为给电子取代基, 如 $-\text{NH}_2$, $-\text{NHR}$, $-\text{OH}$ 等, 且取代基的位置为邻位和对位时可增强荧光。

2.3 荧光偏振光谱

偏振光谱指的是粘性溶液中荧光体的偏振度 P (或各向异性 γ) 对激发波长所作的谱图。荧光的偏振也是荧光的一种参量, 用荧光的偏振可以反应分子的结构状况, 以及分子的运动状况。

光是一种电磁波, 而电磁场的振动方向互相垂直。若只考虑电场, 则自然光中含有各方向的电场, 分布均匀。经过一块偏振片后, 只有某一平面内的电场可以通过, 故称为平面偏振光 (或线偏振光, 迎着光线前进方向观察, 电场变化方向在一直线内)。若某一平面内光强度占优势, 其它方向较弱, 则称为部分偏振光。用平面偏振光激发分子后, 若分子在发射前方向不变, 则所发射荧光是偏振的; 若分子有转动, 则测出的荧光是部分偏振光。因此荧光偏振也称为荧光去偏振。

荧光偏振程度的大小用荧光偏振度 P 表示, 其定义为

$$P = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}} \quad (2.1)$$

式中: I_{\parallel} 为起偏器与检偏器平行时测出的荧光强度, 这时入射光和荧光的振动方向都与这两束光线所在的水平面垂直; I_{\perp} 则为检偏器转动 90° 后即与起偏器垂直时测得的荧光强度。

P 值和分子排列的有序性及分子在介质中旋转运动有关, 因而可通过测定 P 值来了解这一性质。

荧光偏振的另一表述是各向异性, 用 γ 表示, 则有

$$\gamma = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} \quad (2.2)$$

通常是在稳定条件下测量偏振度及各向异性, 即入射光是恒定的, 这时观察到的 P 与 γ 是体系的平均运动。若光源用 ns 脉冲偏振光, 则可测量随时间变化的 I_{\parallel} 与 I_{\perp} , 这

样就可探测不同时间的运动，称为时间分辨技术。

2.4 能量转移的基本理论

能量从已激发的粒子向未激发的粒子转移，或在激发的粒子间转移的过程称为能量转移过程，这里指的粒子可以是原子、离子、基团或分子。

能量转移可发生在分子间和分子内。对分子间能量转移来说，它既可以发生在不同的分子间，也可以发生在相同的分子间。而分子内能量转移则是指同一分子中的两个或几个发色团间的能量转移。同样，这些发色团既可以是相同的，也可以是不同的。

能量转移可分为两大类，即辐射转移和无辐射转移^[52]。

(1) 辐射能量转移

辐射能量转移是一个两步过程，可简单表示为：



即第一步为被激发的给体 D^* 发射一个光子($h\nu$)，第二步是受体 A 吸收光子而处于激发态 A^* 。

辐射型能量转移的另一个特点是它不涉及给体与受体间的直接相互作用。由于这种转移的几率随给体—受体的距离变化较其他机理的转移(如无辐射转移)的变化慢，因而在稀溶液中它可能占主导地位。一般说来，居于这种转移的给体—受体间距离约为50~100Å左右。

辐射型转移的第三个特点是转移的几率与激发态给体 D^* 发射的量子产率、受体 A 的浓度和吸收系数、以及 D^* 的发射光谱与 A 的吸收光谱的重叠程度有关。

此外，通过辐射机理发生的能量转移，给体发射寿命不改变，而且与介质的黏度无关。

(2) 无辐射能量转移

相对作为两步过程的辐射型能量转移来说可简单表示为：无辐射能量转移过程是



无辐射能量转移必须遵循体系总能量守恒定律，这就要求 $D^* \rightarrow D$ 和 $A \rightarrow A^*$ 的能量相同。

华中科技大学硕士学位论文

其次、自旋守恒与否是能量转移速率的重要决定因素。根据 Wigner-Witmer 自旋守恒定则，在反应体系中，体系的总自旋必须守恒。但由于选择定则与能量守恒定律不同，在它推导过程中已采用一系列近似。因而选择定则只是在这些近似成立的条件下才遵循，也即它本身不是严格的。就拿自旋守恒定则来说，它是以自旋多重度对状态分类成立为前提的。但严格说，自旋角动量及其分量在非线性分子中不是运动常量。因此，这种分类本身就是一种近似。自旋—轨道偶合的存在，使体系所有的电子状态均不是纯自旋态，因而违背自旋守恒定则的能量转移过程仍有可能发生，只是几率大小不同。再进一步说，由于能量转移过程效率取决于转移速率与给体分子内去活的速率之比，因此受体自旋守恒比给体的更重要。

无辐射能量转移过程是受不同的机理支配的。它们是：库仑转移机理、交换转移和通过键的超交换转移机理、以及激子转移机理。

对于一个两电子体系，在给体与受体间相互作用很弱的条件下，设体系的总 Hamiltonian 为：

$$H = H_0 + V \quad (2.6)$$

式中， H_0 为未扰动的 Hamiltonian，并有：

$$H_0 \psi_I = E_I \psi_I \quad (2.7)$$

$$H_0 \psi_F = E_F \psi_F$$

其中， ψ_I 和 ψ_F 为体系的始态和终态波函数。考虑到电子是费米子，因此波函数应是反对称的。由此得出方程 (2.7) 的解为：

$$\psi_I = \frac{1}{\sqrt{2}} [\psi_{D^*}(1) \psi_A(2) - \psi_{D^*}(2) \psi_A(1)] \quad (2.8)$$

$$\psi_F = \frac{1}{\sqrt{2}} [\psi_D(1) \psi_{A^*}(2) - \psi_D(2) \psi_{A^*}(1)]$$

式中 ψ_D 和 ψ_{D^*} 分别为给体分子基态和激发态波函数， ψ_A 和 ψ_{A^*} 分别为受体分子基态和激发态波函数。对应的能量为：

$$E_I = E_{D^*} + E_A \quad (2.9)$$

$$E_F = E_D + E_{A^*}$$

华中科技大学硕士学位论文

其中 E_i 满足: $H_0\psi_i = E_i\psi_i$ ($i = D^*, D, A^*, A$)

(2.6) 式中的 V 代表给体 (D) 与受体 (A) 间的电子相互作用能。并有:

$$V = e^2/\epsilon R_{12} \quad (2.10)$$

其中, R_{12} 为两个电子间的距离, ϵ 为介质的介电常数。正是由于这种相互作用导致体系与 Born-Oppenheimer 近似的偏离和无辐射跃迁的产生。

根据量子力学的微扰理论可知, 跃迁几率与跃迁矩阵元 V_{ET} 的平方成正比。跃迁矩阵元表示为:

$$V_{ET} = \langle \psi_D | V | \psi_A \rangle \quad (2.11)$$

将 (2.8) 式代入 (2.11) 式得到:

$$V_{ET} = V_{ET}^c + V_{ET}^e \quad (2.12)$$

其中

$$V_{ET}^c = \langle \psi_{D^*}(1)\psi_A(2) | V | \psi_D(1)\psi_{A^*}(2) \rangle \quad (2.13)$$

即库仑相互作用能。

$$V_{ET}^e = \langle \psi_{D^*}(1)\psi_A(2) | V | \psi_D(2)\psi_{A^*}(1) \rangle \quad (2.14)$$

即交换相互作用能。

这两种相互作用构成了两种不同的无辐射能量转移机理, 常称之为库仑机理和交换机理。

能量转移问题的研究也像其他科学问题的研究一样, 可分成实验和理论研究两大类, 它们相辅相成, 共同促进我们对能量转移这一动力学过程的中心问题的认识。实验是研究的基础, 而理论则有助于揭示实验现象的本质, 并可作为实验研究的一种补充, 提供某些实验无法提供的信息。

能量转移的实验研究方法包括: 稳态光谱法和时间分辨光谱法, 而稳态光谱法是能量转移定性研究的重要手段。常用的有: 吸收光谱、荧光发射和偏振光谱、线二色及圆二色谱等。

能量转移现象最初就是从荧光敏化实验中发现的, 能量转移的结果是作为能量给体的发射被作为能量受体的发射所取代, 所以说荧光光谱实验是获得能量转移信息的最直观方法之一。

华中科技大学硕士学位论文

另一种简便而直观的能量转移实验研究手段是荧光偏振光谱,众所周知,随机取向分子于体系的一股偏振度公式为:

$$P = \frac{3\cos^2\theta - 1}{\cos^2\theta + 3} \quad (2.15)$$

式中 θ 是吸收与发射偶极矩间的夹角。由(2.15)式可知, P 值的范围是 $-1/3$ 到 $+1/2$ 。当吸收与发射偶极矩互相平行时($\theta = 0$), P 值最大($=1/2$);而互相垂直时($\theta = 90$), P 值最小($-1/3$)。由于发生能量转移的激发分子与获得能量的分子有不同的空间位置,它们的振子轴成一定角度,因而能量转移必与偏振度降低相伴随,偏振度变化是体系中存在能量转移的直观表现。

当两发色团均能吸收与发射时,并经能量转移而交换激发的体系 Demidov 导出了荧光偏振度的修正公式,对稳定激发:

$$P = \frac{3\cos^2\theta - 1 + 2A}{\cos^2\theta + 3 + 4A} \quad (2.16)$$

式中

$$A = \frac{\tau_2^{-1} + k_{21} + (\tau_1^{-1} + k_{12})\alpha\gamma}{\alpha k_{21} + \gamma k_{12}}$$

$$\alpha = \sigma_2(\lambda_{ex}) / \sigma_1(\lambda_{ex})$$

$$\gamma = \eta_2 f_2(\lambda_n) \tau_1 / \eta_1 f_1(\lambda_n) \tau_2$$

其中, τ_i 是孤立发射团的荧光寿命, k_{ij} 是从发射团 i 到 j 的能量转移速率, σ_i 和 f_i 分别是发射团 i 的吸收和荧光光谱, λ_{ex} 和 λ_n 分别是激发和荧光波长, η 是荧光量子产率, θ 为两发射团偶极矩之间的夹角。

比较这两种 P 的计算公式可知,(2.16)式显含能量转移速率参数,而当 $\sigma_2(\lambda_{ex}) = 0$, $\eta_1 = 0$ 时,即当第一个发射团只吸收光,第二个发射团只发射光时, $A = 0$,两式等同。

对含有多个发色团的复合体系,除了要确定体系中是否存在能量转移外,常常还希望具体指定各发色团在能量转移过程中的作用及能量转移的历程。而这时整个体系的稳态光谱往往由于谱线间的重叠而形成无结构的宽谱。如要对这种复合光谱进行分解,解析出属于各发色团的谱带,则要采用解卷积(deconvolution)技术。

2.5 生物体内的发光源

荧光物质广泛存在于人体的组织和体液中。在生物大分子中存在着大量不同能量量子态的分裂现象。结合在一起的原子中的电子可以相互作用，同时和一个以上的原子核发生作用，如果使原来的能级劈裂成大量的亚能级，原子间的相对运动、振动和转动能使亚能级进一步劈裂而形成能带，能带反映了生物组织内部相互作用的详尽而复杂的信息。

生物医学中比较重要的天然荧光分子（荧光团）常常是分子庞大而机构复杂的有机化合物，多数具有共扼双键的系统，如维生素、核酸、氨基酸、蛋白质、胺类、酶、辅酶和卟琳等生物大分子以及许多有机芳香族化合物，在一定波长光的激发下，生荧光团能发射特定波段范围内的荧光。

（1）蛋白质的荧光

蛋白质的荧光来源于色氨酸、络氨酸和苯丙氨酸。它们的相对荧光强度为 100:9:5。当蛋白溶液为中性时，采用波长为 280nm 的光激发，发射波长范围位于 340nm~350nm 波段。如果蛋白质中不含色氨酸，只含络氨酸和苯丙氨酸，则荧光光谱主要表现络氨酸的特征，最大发射波长约为 340nm。对于含有色氨酸的蛋白质，荧光光谱则主要表现色氨酸的特征，最大荧光发射波长位于 320nm~350nm 之间。

（2）天然色素的荧光

维生素大多含有芳香环结构，本身具有较强的荧光。植物、藻类或光和细菌中含有各种色素和辅助色素分子，它们都含有荧光团。根据它们的荧光激发谱和荧光发射谱可以用来鉴定色素的存在及含量，也可以用来分析光合作用过程中能量的吸收与传递。

（3）生物体的自体荧光

生物组织中的胆红素、核黄素、卟琳、VB₆等均为内源性荧光物质。其中卟琳是一类广泛存在于自然界的天然色素。广泛存在于血红蛋白、细胞色素、植物叶绿素等生物组织中。

自体荧光光谱能反映分子的化学结构和所处的微观环境的状态信息，可以直接通过测量其荧光来确定其存在、分布及数量，从而在生物分子、医药和临床分析中具有广泛的应用

不同生物组织由于分子结构不同,相对于正常组织而言,肿瘤组织在发展过程中由于代谢等生理活动的特殊性,会导致某些荧光物质相对量的变化,从而导致光诱导荧光光谱的变化,可表现为荧光强度和谱线形状的改变。因此利用组织自体荧光光谱的改变在相当程度上可表现肿瘤组织与正常组织的生化构成差异。又由于光谱分析法具有高灵敏度,能够灵敏的反映一般组织学不能反映的特点,达到诊断的目的。

但是在人体与动物组织中能发射荧光的物质很多。每一种荧光物质存在一定的浓度和特定的吸收光谱及荧光发射光谱,组织荧光来源于组织中多种荧光物质的组合。对于某一波长的激光,能被直接激发的生物分子是很多的,由于生物系统的复杂性,激发能的转移方式也是多种多样的,每一荧光物质的发射光谱都具有一定的宽度,多种荧光物质的光谱组合后,彼此会有重叠,因此生物荧光光谱也相当复杂,难以独立的反应组织中某一类物质组分的特征,目前还没有研究出能够将各种成分的含量对荧光光谱的分量贡献建立直接的数学关系,这也是荧光技术在组织诊断应用中的局限性。

2.6 环境因素对荧光光谱的影响

通常荧光参数很容易受到环境因素的影响^[53],如溶剂、温度、PH 值等,了解和利用这些因素,可以提高荧光分析的灵敏度和选择性,以下讨论一些较重要的环境因素对荧光光谱的影响。

(1) 溶剂的影响

同一种荧光体在不同的溶剂中,其荧光光谱的位置和强度都可能会有显著的差别。许多荧光体,尤其是那些在芳环上含有极性取代基的荧光体,它们的荧光光谱易受到溶剂的影响。溶剂的影响可以分为一般的溶剂效应和特殊的溶剂效应两类,前者指的是溶剂的折射率 n 和介电常数 ϵ 的影响,是普遍存在的。后者指的是荧光体和溶剂分子间的特殊化学作用,如氢键的生成和配合作用,决定于溶剂和荧光体的化学结构。特殊的溶剂效应所引起荧光光谱的移动值,往往大于一般的溶剂效应所引起的。

折射率 n 和介电常数 ϵ 对斯托克斯位移的影响是相对立的,增大 n 值将使能量的损失减小,由于折射率增大,溶剂分子内部电子的运动使荧光体的基态和激发态瞬即稳定,这种电子的重排导致基态和激发态之间能量差减小。介电常数增大也将导致基态和激发态的稳定作用,不过,激发态的能量下降,只发生于溶剂的偶极重新定向之后,这一过

程需要整个溶剂分子发生运动。结果，与介电常数有关的荧光体的基态和激发态的稳定作用与时间有关，其速率与溶剂的温度及粘度有关。所以，在溶剂的重新定向的时间范围内，激发态移到更低的能量。

荧光强度也随溶剂发生变化，不过情况非常复杂，规律性不明显。

(2) 温度的影响

温度对于溶液的荧光强度有着显著的影响，通常随着温度降低，荧光物质的荧光量子产率和荧光强度将增大。这是因为，随着溶液温度的增加，介质的粘度减小，从而使荧光分子与溶剂分子的碰撞碎灭机会增大；温度上升导致荧光强度下降的另一个主要原因是分子的内部能量发生了转化，当激发分子接受到额外热能时，激发能转换为基态的振动能量，随后又通过振动弛豫而丧失振动能量。

(3) pH 值的影响

当荧光物质是一种弱酸或弱碱时，溶液的 pH 值的改变将对荧光光谱和荧光的强弱产生很大的影响。大多数含有酸性或碱性基团的芳族化合物的荧光光谱，对于溶剂的 pH 值和氢键能力是非常敏感的。

当分子由基态被激发到较高的电子激发态时，其偶极矩也将发生变化。由于激发态与基态两者的电荷分布情况不同，因而它们的化学性质也会有所差别，溶液的 pH 值改变将会影响到基态分子或激发态分子的酸碱性质。

(4) 氢键的影响

荧光物质和溶剂或其它溶质之间发生的氢键作用，对于荧光物质的荧光光谱和荧光强度有着显著的影响。荧光物质与溶剂或其它溶质之间所发生的分子间氢键可能有两种情况：一种是在激发之前基态的荧光物质便与溶剂或其它溶质分子产生氢键配合物。这种情况下荧光物质的吸收光谱和荧光光谱都将由于与溶剂或其它溶质分子形成氢键配合物而受到影响；另一种是在激发之后由激发态的荧光物质与溶剂或其它溶质分子产生的激发态的氢键配合物。这种情况下，由于只在激发之后才形成激发态的氢键配合物，因而只有荧光光谱才受到氢键作用的影响。

(5) 重原子效应

有一类溶剂效应可能影响到溶质的荧光强度和磷光强度，但对跃迁的频率没有可见

察的影响。这一类溶剂效应，既不是由于溶剂的极性，也不是由于溶剂的氢键性质所引起的，而是由于溶剂分子中含有高原子序的原子所造成的。这种效应称为“外重原子效应”。

芳族化合物分子中的重原子取代基团，同样会引起荧光强度减弱、磷光强度增强的现象，这种重原子效应通常称为“内重原子效应”。

(6) 表面活性剂的影响

表面活性剂是一种两性分子，由极性的首基连接着长链的尾部所组成，具有明显的亲水部和疏水部。根据首基的性质，表面活性剂可分为阳离子、阴离子、非离子和两性的表面活性剂。

在低浓度的水溶液中，表面活性剂绝大部分被分散为单体，也可能有少数的二聚体和三聚体等形式存在。当表面活性剂的浓度达到临界胶束浓度时，表面活性剂分子便会动态地缔合形成聚集体——胶束。胶束在荧光测定中的主要应用是：提高测定的灵敏度；在胶束溶液中会增强某些有机荧光化合物的荧光强度；在胶束溶液中进行荧光测定时，可减小干扰离子的影响；胶束对荧光质点有保护作用，减小了淬灭效应，延长了荧光寿命。

(7) 光解作用

当激发光为强紫外光或可见光时，会引起某些光化合物发生光化学变化（如光解作用）而受到破坏，结果使荧光强度的测量信号随着光照时间的而逐渐下降。这种光化分解作用所造成的影响，对于某些光活性物质及在稀溶液情况下尤为严重。在实际工作中应采取适当的措施来减小光分解作用的影响，如：在可能的情况下尽量使用长波长的激发光；尽量缩短激发光的照射时间；适当降低入射光的强度，并提高检测器的灵敏度等。

(8) 光互变异构现象

在某些具有多功能团的分子中，尤其那些至少含一个碱性的质子受体基团和一个酸性的质子供体基团的分子，在激发后，可能使受体基团的碱性和供体基团的酸性都变得足够强，以致在供体基团丧失质子的同时为受体基团所获得，这种现象就是激发态时的互变异构现象，即光互变异构现象。光互变异构对荧光光谱有着显著的影响，光互变异构现象是在吸收过程之后才发生的，在荧光光谱中很容易观察出来。如果光互变异构作用包含某个质子受体基团的质子化作用和某个供体基团的离解作用，那么由其引起的荧

光峰向长波方向的移动接近于由质子化作用和离解作用个别引起的频率移动的总和。

(9) 散射光和拉曼光的影响

在荧光分析中，常遇到溶剂的瑞利散射光、容器表面的散射光、胶料的散射光（丁铎尔效应）及溶剂的拉曼光的干扰。前三种散射光的波长与激发光的波长一致，只要选取适当的测定波长，便可排除或大大降低其干扰。

产生拉曼光的激发光并不限定一定的波长，而拉曼光也不具有固定的波长，其波长随激发光的波长而改变。拉曼光发生的时间比荧光发生的时间约快一千万倍，但拉曼光的强度很弱，仅及荧光强度的数千分之一。拉曼散射光虽没有固定的波长，但它的频率与激发光频率的频差是一定的，相当于分子的振动——转动频率，对于给定的物质，其值固定，与激发光的频率无关。检测时，可采用改变激发波长的方法使拉曼峰与荧光峰分离，或采用适当的激发波长检测出拉曼峰，然后对荧光光谱进行修正的方法来减小拉曼峰的干扰。当采用前种方法时，应注意，当激发波长离开荧光物质的最佳激发波长时，荧光强度会大大下降。

(10) 其它溶质的影响

有机分子的荧光，不仅由于溶剂效应而受到影响，也会因为与其它溶质的相互作用而受到影响。这主要包括芳族配位体与金属离子发生配合作用之后对配位体的荧光光谱和强度的影响。至于荧光体可能与其它溶质发生的化学反应、能量转移、电荷转移或碰撞作用等等过程，通常会导致荧光体的荧光淬灭现象，这些作用的大小同时还和温度等因素有关。

3 LED 光诱导人血液荧光光谱特性

利用光诱导荧光光谱技术 (LIFST) 了解生物大分子的结构或诊断生物组织病变, 近十多年来一直是国内外光子生物医学工程领域的研究热点。特别是激光诱导生物组织自体荧光 (LIAF) 诊断技术^[8,54], 以其快速、无损被广泛应用在早期癌等病症的诊断和治疗上, 发展前景十分看好。另一方面, 低功率激光照射疗法 (LLLT) 的疗效也已得到众多专家的认可, LIFST、LIAF 和 LLLT 所对应的物理机理也一直是国内外学者关注的热点问题, 已有学者从不同的方面进行了相关的研究, 但是至今为止尚未得到较为完善的理论体系。因此而严重地影响该治疗方法的推广应用。目前, 国内外学者在血液的流变学和生物化学等性质方面的研究较多, 而在物理学、光学方面研究较少。

由于人体组织的复杂性, 即使是同一个健康组织, 在不同的物化条件下发出的荧光光谱结构特征也会有较大变化, 使得我们实际所测的荧光光谱, 并不能真实地反映组织内部荧光团的内源性荧光光谱的结构特征。然而, 目前多数都是根据对有限数量的正常与病变组织样品进行荧光光谱测定, 从光谱图上找出它们结构特征差异进行诊断^[55,56]。因此, 对于荧光光谱的结构特征及其变化规律的深入研究, 可为正确区分正常与病变组织的荧光光谱提供理论依据。

由于激光的线宽极窄, 它对生物组织中的荧光团有较强的选择性, 造成荧光强度太弱。作为探索实验研究, 我们选用了发光二极管 (LED) 作为激励光源。LED 的线宽虽有几十纳米, 但仍可视为单色光源, 因而可使血液中更多的荧光团产生荧光, 获得较强的荧光光谱, 从而提高荧光测定的灵敏度。

由于 LED 是自发辐射非相干光的固体发光器, 与其它发光器相比, 它具有体积小、功耗低、响应速度快、发光单色性好、可靠性高、易集成、寿命长等优点, 探索它在生物领域中的应用具有重要的意义。

为了提高荧光效率, LED 中心波长选在血液强吸收区域, 其波长为 408nm 处。根据我们以此波段的 LED 光激励鼠血的研究结果显示^[51,57]: 此时所产生的荧光光谱强度大, 特征结构明显。因此, 本章主要研究 408nm 的 LED 光诱导不同浓度人全血液的荧光光谱。

3.1 血液的吸收光谱与荧光光谱

3.1.1 实验器材

日本津岛公司生产的 UV-2201 紫外可见分光光度计。天津港东公司生产的 WGD-8 型多功能光栅光谱仪，其中的光电转换器是日本 Hamamatsu 公司生产的 R955 型光电倍增管，由计算机控制光谱扫描及光信号的处理。激发光源采用峰值波长为 408nm ($\Delta\lambda_{1/2}\approx 18\text{nm}$)、功率为 5mW 的 LED。

3.1.2 实验样品

取 30 岁健康男子的鲜血 2ml，加 5% 的肝素抗凝获得全血溶液，再加适量的 NaCl 溶液，配制成浓度分别为 0.3%~10% 全血溶液作为实验用样品。

3.1.3 获得光谱的方法

将配制好的 2ml 全血溶液样品装入一个石英比色皿内，在另一相同的比色皿内装入同量的 NaCl 溶液作为空白，用 UV-2201 分光光度计描绘出 230~800nm 的全血溶液的吸收光谱。

用 WGD-8 型光栅光谱仪扫描装入比色皿内的全血溶液，激发光源系波长为 408nm 的 LED，扫描步长 0.1nm、扫描范围 350nm~800nm，得到相应的全血溶液荧光光谱。整个实验过程均在室温下进行。

3.1.4 血液的吸收光谱

图 3.1 是浓度分别为 0.3%、0.5%、0.8% 的全血溶液在 230nm~800 nm 波段间吸收光谱的实验结果。在这一波长范围内吸收光谱有五个明显的吸收峰，分别位于波长为 272nm、340nm、417nm、540nm 和 576 nm。它们的位置与血液浓度没有关系，但吸收峰强度却随浓度的增加而增加。从整个吸收光谱来看，在短波区吸收较强，尤其是位于波长 417 nm 处的吸收峰很大，在长波

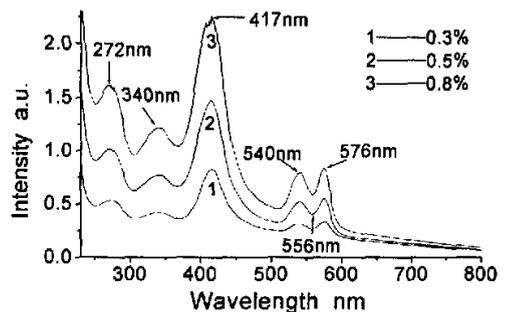


图 3.1 不同浓度全血溶液的吸收光谱

区吸收较弱，在波长大于 600 nm 的区域吸收很小。

3.1.5 血液的荧光光谱

图 3.2 是波长为 408nm 的 LED 激发不同浓度的全血溶液位于 350nm~800nm 波段的荧光光谱。谱线似乎以 556nm 为中心的 W 底分成了大致相等的两个荧光区域，W 的两个底位置几乎不随浓度发生变化，分别位于 540nm 和 576nm 处。整个荧光光谱呈现出一种宽谱带的结构特征。我们曾对不同年龄和性别健康人血液做了该项实验，实验结果基本相同，图 3.2 的荧光光谱曲线具有代表性。

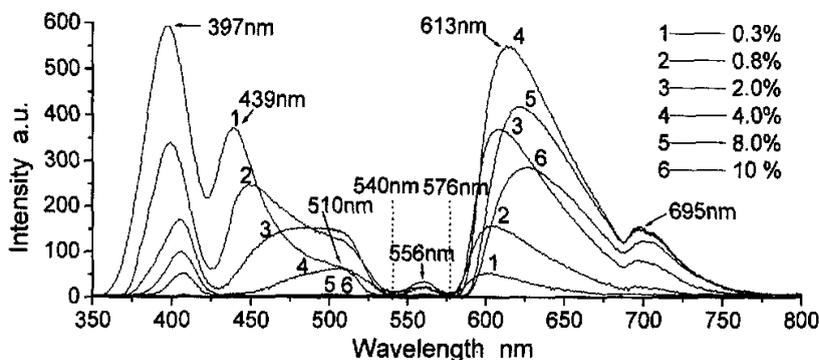


图 3.2 不同浓度全血溶液的荧光光谱

3.2 血液荧光光谱的结构及其机理

(1) 为了单纯的获得 400nm~800nm 区域内的荧光光谱，最好选择远离 400nm 的紫外光作为激励光，以避免激励光散射对该区域荧光光谱产生的影响。我们之所以选择 408nm 作为激励光，是基于三点考虑：一是血液在 417 nm 处有强吸收，在该处附近选择激励光，血液吸收强，荧光效率高；二是 408nm 几乎是 LED 中最短的可见光，由于 LED 是自发辐射非相干光的固体发光器，与其它发光器相比，它具有体积小、功耗低、响应速度快、发光单色性好、可靠性高、易集成、寿命长等优点，探索它在生物领域中的应用具有重要的意义；三是由于在光谱中出现了 408nm 激励光的散射光谱，进行这种由散射光和荧光构成的光谱研究，对于象光谱中含有激励光的二级衍射光谱的研究，以及现在盛行的共振散射光谱的研究都有一定的参考价值。

(2) 图 3.2 中以小峰 556nm 为中心的 W 的两个底, 恰好对应吸收光谱 (图 3.1) 的两个吸收峰 540 nm 和 576 nm, 显然 556nm 的谱峰主要是由于其两边的光谱被吸收而形成的。因此可以说: 峰值位置在 556nm 处的波峰并不是由荧光团所产生的特征峰, 而是因吸收造成的假象。

(3) 在波长为 350nm~540nm 区域内有两个明显的谱峰, 对于浓度为 0.3% 的谱线 1 而言, 这两个峰值位置分别位于 397nm 和 439nm 处, 且最大峰值位置 λ_{\max} 随浓度的增加出现红移, 而两峰的强度均随着血液浓度的增加而减小。

400 nm 附近近似正态曲线的大谱峰, 主要是由 408nm 的激励光的散射形成的。随着血液浓度的增加, 溶液对激励光的吸收增大, 致使散射光强度随着血液浓度的增加而减小。从图 3.2 中我们还可以看出, 只有血液浓度为 10% 的散射波峰位恰为激励光的中心波长 408nm, 其它各峰位均随着血液浓度的减小出现了不同程度的蓝移。对浓度为 0.3% 的谱线 1 而言, 峰值位置竟蓝移了 11 nm, 这显然是因血液在 417 nm 处有一个强吸收造成的, 此吸收中心恰在 408nm 散射峰右侧的斜面上, 吸收使右侧斜面深度下凹, 将峰的最高点推向左侧而形成蓝移。

在 510nm 附近有一小峰, 由于该峰和 439nm 峰 (谱线 1 的峰值位置) 的强度对血液浓度的敏感程度不同, 在低浓度时它几乎显现不出来, 随着血液浓度的增加 439nm 峰的强度迅速减小, 510nm 峰明显地表现出来, 之后又随浓度的进一步增加开始减小, 直至为零。

(4) 在 576nm~800nm 波段内有两个荧光峰, 其中在波长为 613nm 附近波峰的强度较强; 相比较而言, 在波长为 695nm 附近的波峰强度要小得多。而在血液浓度小于 4% 时, 荧光强度随浓度的增加而增加; 在浓度大于 4% 时, 荧光强度随浓度的增加而减小。两谱峰的峰值位置 λ_{\max} 均随着浓度的增加而出现红移。大峰的红移较明显, 小峰的红移很小。

血液的荧光光谱的峰值位置 λ_{\max} 随浓度的增加而出现红移的现象, 可以从血液吸收的角度给予解释: 从图 3.2 中可以看出, 由于 576nm 处的吸收使各种浓度的血液都在该点产生荧光猝灭, 对于峰值位置位于 600nm~630nm 区域内的大荧光峰, 峰的左侧相对右侧要陡峭的多, 致使曲线 1、2、3、4 的峰顶依次随着血液浓度的增加, 几乎沿着同

一左侧面向上延升，峰顶越高， λ_{\max} 越往长波方向移动。我们认为，血液对波长为 576nm 的光强吸收是造成 λ_{\max} 随浓度的增加出现了红移的主要原因，至少对于 4% 以下浓度是这样。对于血液浓度大于 4% 的荧光曲线 5、6 的 λ_{\max} 的红移可以这样理解：设想将曲线 5、6 向上平移，使它们的左侧面近可能地与曲线 4 的左侧面重合，曲线 5、6 的峰顶与曲线 4 相比会依次增高，实际的曲线 5、6 由于高浓度出现的宽区域的背底强吸收，使它们的曲线基底减去了厚厚的一层（层厚随浓度的增加而增加），结果它们的强度反而减小了，但 λ_{\max} 的红移并不会受到影响。由此可见，576nm 处的吸收峰所产生的荧光猝灭，以及其长波区域近似均匀的背底吸收，是造成 600nm~630nm 区域内的 λ_{\max} 随浓度的增加出现红移的主要原因。

(5) 在人的血液中存在大量的血卟啉（原卟啉和锌卟啉）。原卟啉吸收光子后，发射 630nm 和 690nm 的荧光，相应的能级跃迁为 $^1S_{1,0} \rightarrow ^0S_{0,0}$ 和 $^1S_{1,0} \rightarrow ^0S_{1,0}$ ，锌卟啉吸收光子后，发射 590nm 的荧光，相应的能级跃迁为 $^1S_{1,0} \rightarrow ^0S_{0,0}$ [8,58]。由于在电子的能级态上存在着不同的振动能级，这些荧光的波长和强度又会因血液所处的物理、化学环境而有所变化，且在血液生物大分子中存在着多种荧光团，这样就形成了荧光光谱的宽谱带结构特征。图 3.2 中 613nm 附近的大峰主要是锌卟啉发射的 590nm 荧光和原卟啉发射 630nm 的荧光二者叠加形成的。695nm 的小峰主要是原卟啉 $^1S_{1,0} \rightarrow ^0S_{1,0}$ 能级跃迁所产生。

3.3 血液荧光光谱的红移规律

图 3.3 是浓度为 0.8% 的全血溶液位于 350nm~800nm 波段的荧光光谱和吸收光谱。其中曲线 1 是波长为 407 nm 的 LED 光激发的荧光光谱，曲线 2 是该溶液的吸收光谱。

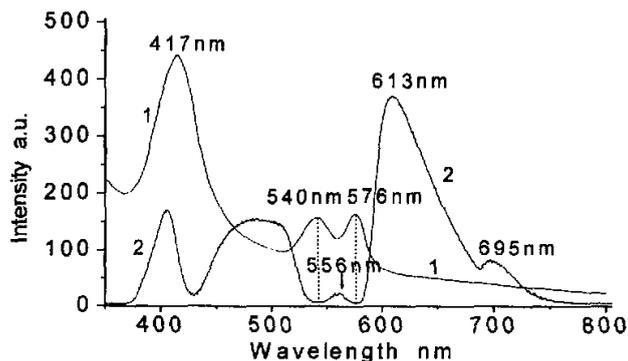


图 3.3 全血溶液的吸收光谱和荧光光谱

图 3.4 是波长为 407nm 的 LED 光激发的不同浓度的全血溶液位于 570nm~800nm 波段的荧光光谱。

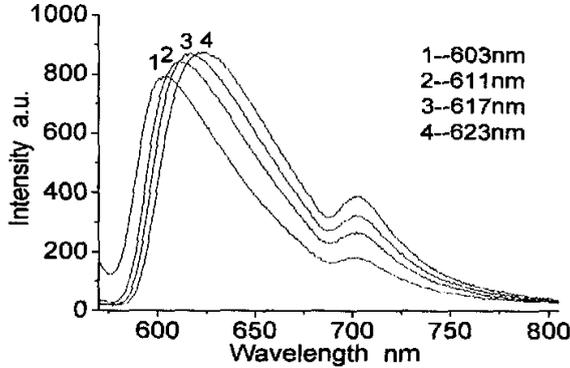


图 3.4 不同浓度全血溶液荧光光谱的红移现象

从实验结果图 3.4 中可以看出，对于同一激发光激发的不同浓度的血液荧光光谱，在位于 570nm~800nm 波段间的荧光主峰的位置会随着血液浓度的增加而向长波方向移动，即红移。通过对同一波长的 LED 光激发的不同浓度的全血溶液的荧光光谱峰位的多次测定，利用曲线拟合的方法可以得出：荧光光谱峰位随血液浓度的增加按照 e 指数规律向长波方向移动，曲线方程为 $y = y_0 + A_1 \exp\left(\frac{x - x_0}{t_1}\right)$ 。实验表明：改变激发光的波长，荧光光谱峰位随血液浓度的增加仍按照 e 指数规律向长波方向移动，只是曲线方程的参数有所变化。

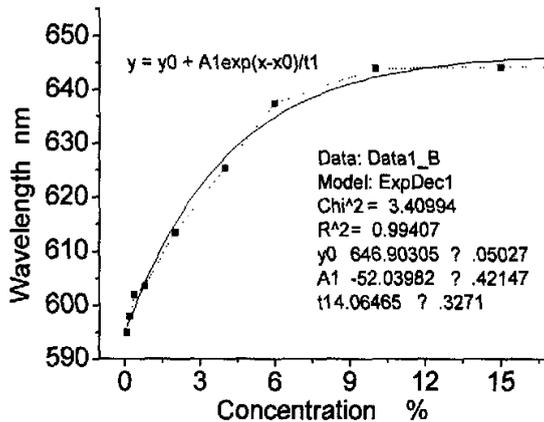


图 3.5 407nm 光激发的荧光光谱峰位随浓度的变化规律

图 3.5 给出了 407nm 的 LED 光激发的浓度从 0.3%—15% 荧光光谱峰位随浓度的变

化规律。

图 3.6 给出了 570nm 的 LED 光激发的浓度从 0.3%—15% 荧光光谱峰位随浓度的变化规律。从两个图中可以看出，尽管两条曲线的方程均为 e 指数方程，但方程的参数并不一样。

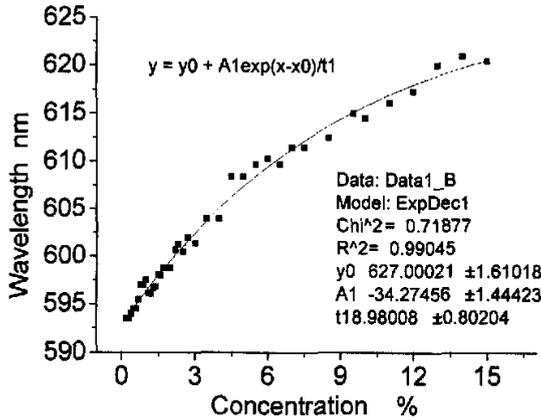


图 3.6 570nm 光激发的荧光光谱峰位随浓度的变化规律

图 3.7 是波长为 407nm 的 LED 光激发的浓度从 0.3%—50% 全血溶液的荧光光谱的主峰位与血液浓度的关系。可以看出，当血液浓度达到 15% 左右时，随着血液浓度的增加红移现象基本消失，我们不妨用 C_e 表示该浓度值。进一步的实验结果表明，对于不同的激发光激发的荧光光谱这样一个浓度值 C_e 是不同的，激发光的波长约短 C_e 的值小；激发光的波长约大 C_e 的值大，从图 3.5 和图 3.6 也可以看出这一特点。

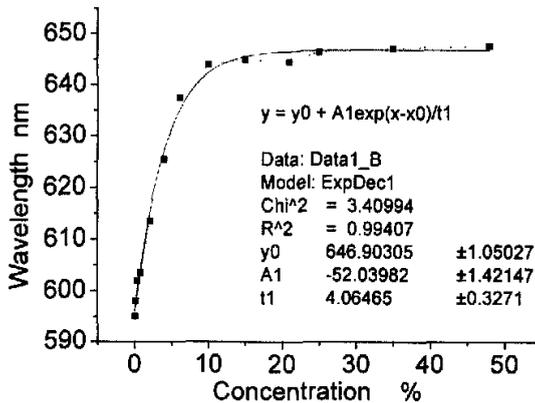


图 3.7 血液浓度达到某一值附近红移现象基本消失

3.4 血液荧光光谱的红移机理

血液的荧光光谱的峰值位置随血液浓度的增加而出现红移的现象，可以从血液吸收的角度给予解释^[59]。从图 3.3 可以看出，吸收光谱（曲线 1）在短波区吸收较强，尤其是位于波长 417 nm 处的吸收峰很大，在长波区吸收较弱，在波长大于 600 nm 的区域吸收很小。血液的吸收光谱与荧光光谱在较大范围内是重叠的，由于血液内存在多种荧光团，各荧光团之间的能量转移就不可避免，有一部分的荧光会被它自身的基态分子所吸收，这是一种能量由激发态分子转移到同一种物质的基态分子的辐射能量转移过程。随着血液浓度的增加，自吸收现象会加剧。当血液浓度较小时，吸收小，荧光峰位偏向短波；当血液浓度较大时，吸收大，荧光峰位偏向长波^[59]；当血液浓度达到或超过一值 C_e 时，吸收达到饱和，因此，荧光峰位基本不再向长波方向移动。

从图 3.8 的实验结果显示，当用 407nm、475 nm 和 508nm 的 LED 光分别激发浓度为 3% 的全血溶液时，主荧光光谱的峰位是不同的。激发波长越短，荧光峰位偏向长波；激发波长越长，荧光峰位偏向短波。出现这一现象的原因是：当激发光较短时，在大于激发光波长区域形成的荧光被二次吸收，相当于一个线宽很宽的光源再次激发，形成二次荧光。因此提高了荧光效率，这与增加血液浓度来提高荧光效率是等价的。也就是说，当激发光波长一定时，增加血液浓度荧光峰位会出现红移；当血液浓度一定时，减小激发光的波长荧光峰位同样会出现红移。这进一步证明了：吸收是产生红移的主要原因。

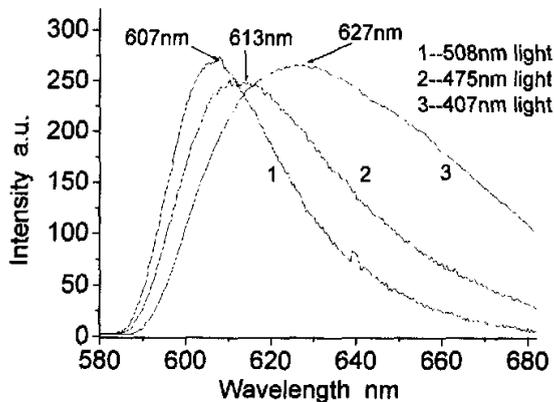


图 3.8 用不同波长的激发光激发同一浓度的血液其荧光光谱的峰位变化

4 不同光诱导人血液荧光光谱特性

4.1 实验材料与方法

4.1.1 实验装置

实验装置如图 4.1 所示。采用天津港东公司生产的 WGD-3 型多功能光栅光谱仪得到血液的荧光光谱，其中的分光元件采用每毫米 1200 刻线的闪耀光栅。光电转换器件是日本 Hamamatsu 公司生产的 R955 型光电倍增管(PM)，其输出端与计算机连接。

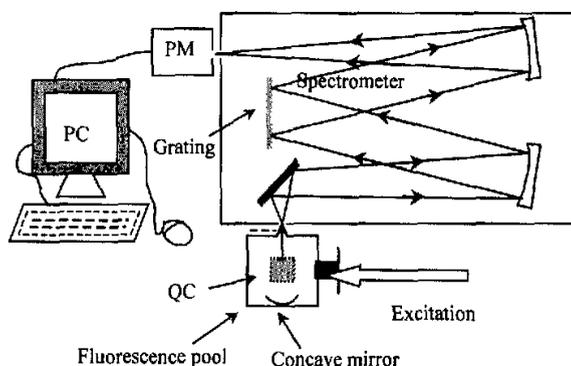


图 4.1 获得荧光光谱的实验装置示意图

仪器的波长扫描范围为 160~900 nm，由于本节实验所涉及的光谱在波长为 160~430 nm 和 750~900 nm 范围内未见任何光谱峰，为了突出重点和便于比较，仅给出了 430~750 nm 波段的光谱图。实验中选择的仪器参数为每一采集点采集 500 个数据进行平均，作为该数据点的测量值，也即 500 次/点。但为了将每一波长激发的荧光能显示出来，同时又不使荧光光谱处于饱和状态，每一项的测量光栅光谱仪参数是不确定的。

4.1.2 样品制备

实验所用的人的全血血液样品取自 30 岁健康男子，静脉取血，5%的肝素抗凝，再加适量的生理盐水，配制成浓度分别为 10%，8%，4%，2%，0.8%，0.4%的全血溶液

备用。

4.1.3 激励光源

(1) LED 光：中心波长为 457 nm ($\Delta\lambda_{1/2}=39$ nm)；功率密度约为 4.3 mW/cm²

(2) Ar⁺ 激光：由美国 Spectra-Physics Lasers 公司生产，型号为 BeamLok 2060~5S。实验中所选择 Ar⁺ 激光中心波长为 457.9 nm，功率密度为 25.7 mW/cm²

(3) He-Ne 激光：由北京大学物理系生产，型号为 HN-120。中心波长为 632.8 nm，输出功率约为 30 mW

4.1.4 样品配制

实验所用的人的全血样品取自 30 岁健康男子，静脉取血，5%的肝素抗凝，加适量的生理盐水配制成浓度为 6%的全血溶液备用。

4.2 实验结果

不同类型的激励光诱导下的浓度为 6%的人全血荧光光谱如图 4.2 所示。

由图 4.2a 可知，波长为 457 nm 的 LED 光激励下，人全血能够发射出较强的荧光，其荧光光谱范围主要为 550~900 nm；其主要的荧光宽峰范围为 580~873 nm，中心波长位于 620 nm 处。在此荧光宽峰的下降沿，有一荧光次峰，中心波长位于 704 nm 处。此外，在波长 540~580 nm 范围内有一弱峰，其中心波长位于 556 nm。

由图 4.2b 可知，在波长为 457.9 nm 的 Ar⁺ 激光激发下，人全血的荧光光谱范围与 LED 光诱导下的荧光光谱范围相同，主要为 550~900 nm，但谱峰形状相对比较复杂，存在诸多较为细锐的谱峰，其中心波长分别位于 616 nm, 666 nm, 706 nm, 739 nm, 752 nm, 764 nm, 800 nm, 812 nm, 829 nm, 和 842 nm 处。其中以波长为 666 nm 的荧光峰最强。

由图 4.2c 可知，在波长为 632.8 nm 的 He-Ne 激光激发下，人全血的荧光光谱范围为 700~900 nm，其光谱主要有波长范围为 786~885 nm 的荧光宽峰和两个相对细锐的荧光峰组成，中心波长分别位于 833 nm、746 nm 和 894 nm。与 LED 光和 Ar⁺ 激光诱导的荧光光谱相比较，He-Ne 激光激发的全血的荧光强度最弱。

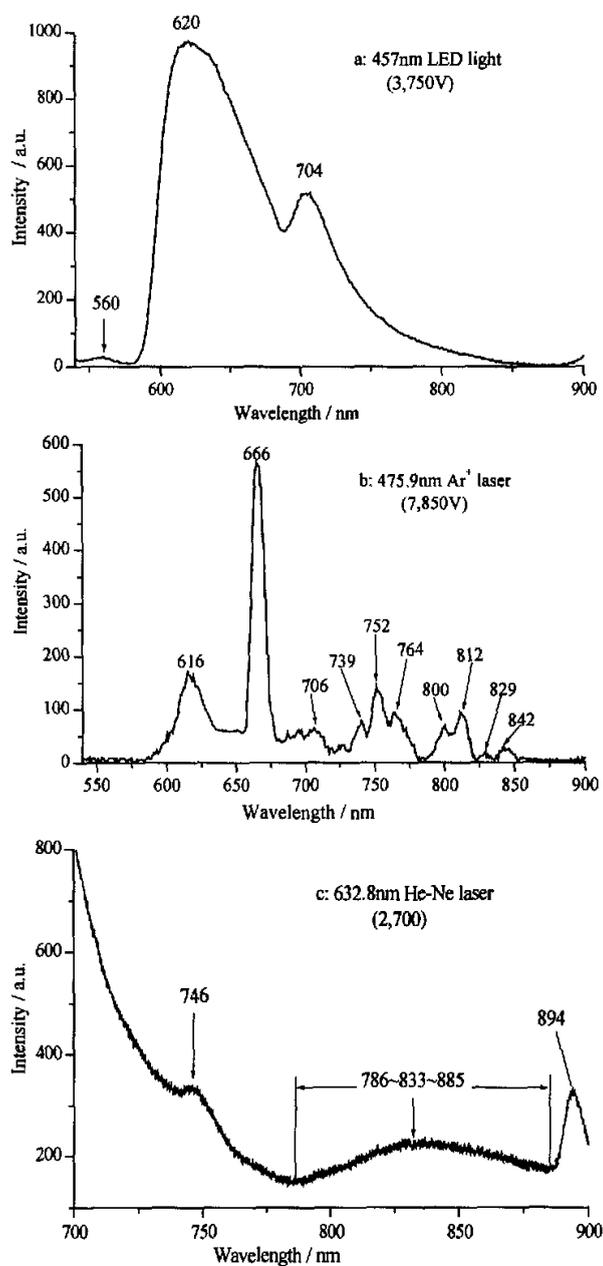


图 4.2 不同激励光诱导下的全血荧光光谱图

- (a) 中心波长为 457 nm 的 LED 光;
- (b) 中心波长为 475.9 nm Ar⁺ 激光;
- (c) 中心波长为 632.8 nm He-Ne 激光

4.3 分析与讨论

通过比较波长 LED 光 Ar^+ 激光和 He-Ne 激光诱导下的浓度为 6% 的人全血荧光光谱, 并对荧光特性与产生机理进行分析, 我们可以得到以下结论:

(1) 中心波长相近的 LED 光和 Ar^+ 激光所激发的血液荧光光谱范围相似, 主要为 550~900 nm, 但两者的荧光光谱谱线形状差异很大: LED 光激发的血液荧光光谱是连续的、宽阔的谱线; 而 Ar^+ 激光所激发的荧光光谱相对复杂, 存在诸多较为细锐的谱峰。

我们认为这是因为血细胞中存在众多的可发射波长长于 540 nm 荧光的荧光团, 但其是否能在外来光的激励下产生能级间的跃迁尚具有不确定性。影响这一过程的首要因素是血细胞对激发光的波长有一定的选择性, 这种选择是由其自生的能级结构和状态 (如荧光团的极性) 所决定的。每一个荧光团都有它特有的能级结构, 只有在其能级中存在可以与激发光波长相对应的能级, 且从基态到该能级又是允许的跃迁时, 入射光波中的光子才可能被其吸收, 并跃迁到激发态。因吸收了光子而处于激发态的荧光团, 总要从较高的能级返回到第一激发态的最低振动能级上, 再从该能级跃迁回到基态各振动能级, 并发出荧光。所以说, 粒子从基态跃迁到某一激发态的概率越大, 与此能级对应的荧光越强。当然, 这里的荧光转换效率还与其他因素如溶液中其它物质的猝灭特性有关。而激光光源的谱带宽度比 LED 窄得多, 所以激光比 LED 所能激发的荧光团相对较少, 因而形成了较为锐利的谱峰。因此可以说, 用激光激发的血液荧光光谱, 可在一定程度上将一些混杂在一起的荧光团各自发出的特征荧光光谱分开。同时, 这也说明了性能优异的激光光源可将其激发的相关光谱中精细结构显现出来^[60]。

尽管激光激发的荧光光谱谱峰较多, 但几乎被 LED 激发的荧光光谱所包络。这是激光与 LED 激发血液荧光光谱的共同之处。我们认为其原因也与激发光源的线宽有关。

(2) LED 光激励的峰值位于 620 nm 的荧光峰和 Ar^+ 激光激励的峰值位于 616 nm 和 666 nm 的荧光峰应该是来源于同类的卟啉类荧光团。

由于卟啉类光敏性物质通常具有在 600~700 nm 波长范围内发射荧光的特性, 如原卟啉吸收光子后发射 630 nm 和 690 nm 的荧光, 相应的能级跃迁为 $^1S_{1,0} \rightarrow ^0S_{0,0}$, 和 $^1S_{1,0} \rightarrow ^0S_{1,0}$, 而锌卟啉的最大荧光发射峰位于 594 nm, 相应的能级跃迁为

$^1S_{1,0} \rightarrow ^0S_{0,0}$ [61,62]。由于在电子能级态上存在着不同的振动能级，这些荧光的波长和强度又会因血液所处的物理、化学环境而有所变化，据此我们认为 LED 光激励的峰值位于 620 nm 的荧光峰和 Ar^+ 激光激励的峰值位于 616 nm 和 666 nm 的荧光峰应该是来源于同类的卟啉类荧光团，但是否来源于同一荧光团尚待研究。

(3) He-Ne 激光激励下的荧光光谱范围主要在 730~900 nm，包含有一个宽峰和两个相对细锐的谱峰。与 LED 光和 Ar^+ 激光所激发的血液荧光光谱相比，该荧光光谱强度要弱得多。由国内外学者研究报道的全血、红细胞和血红蛋白等的吸收光谱曲线（如图 1.2, 1.3 所示）可知，波长为 400~500 nm 的范围是血液的一个强吸收波段，而当波长大于 600 nm，血液的吸收率迅速下降，据此我们认为造成 He-Ne 激光激励下的荧光强度比 LED 光和 Ar^+ 激光所激发的血液荧光强度弱的主要原因是由于血液在波长为 632.8 nm 处的吸收率比波长为 457 nm 处的要小得多，荧光转化率也相应的少得多。因此在弱激光血管内照射治疗（ILLIT）的临床应用中，He-Ne 激光引起的光生物效应较小。由于弱激光的生物效应具有双相性和可累积性等特点，因此用红色激光做血管内照射治疗，比较容易控制其照射剂量与作用效果，更为安全可靠。

5 LED 光诱导人血液静态荧光偏振光谱特性

1926年 Perrin 首次提出了荧光偏振理论（简称 TFP），1953年 Weber 成功地将该理论的应用范围由最初的球形分子拓展到非球形分子，此后，荧光偏振分析方法的基础研究与实际应用均取得了进展。对于有机大分子或生物分子如蛋白质、核酸、碳水化合物、类脂和药物等均能提供快速、可靠的成键平衡分析、分子降解测定等^[63]。近年荧光偏振分析方法在分析化学、生物化学、分子生物学、药物化学和医学(特别是诊断学)等领域的应用得到了快速发展。在 LIAF 诊断技术中，荧光光谱一般为偏振光谱，通过对其偏振性的研究可以了解血液内各荧光团之间的能量转移情况，借助内源或外源性的发光与发光分子的能级结构分析，阐明溶液状态下生物大分子的构象以及相应的生物活性，从而搞清荧光团的发光机理，并对血液内生物大分子进行荧光标识，为最终搞清 LIAF 诊断和治疗机理提供依据。然而，国内外对血液荧光偏振性的研究少见报道，本文给出了我们在这方面研究的初步成果。

在 LIAF 诊断技术中，依据的是组织自体荧光光谱的本征特性，但由于激光的线宽极窄，它对生物组织中的荧光团有较强的选择性，造成荧光强度太弱。作为探索实验研究，我们选用了发光二极管（LED）与偏振器作为激励偏振光源。LED 的线宽虽有几十纳米，但仍可视为单色光源，因而可使血液中更多的荧光团产生荧光，从而获得较强的荧光光谱。为了提高荧光效率，LED 中心波长选在血液强吸收区域的波长为 408nm 处。

5.1 实验器材与方法

5.1.1 实验器材

日本津岛公司生产的 UV-2201 紫外可见分光光度计，英国爱丁堡公司生产的 FLS920 多功能稳态、时间分辨荧光光谱仪，激发光源采用峰值波长为 408nm ($\Delta\lambda_{1/2}\approx 18\text{nm}$)、功率为 5mW 的 LED。

5.1.2 实验样品

取 30 岁健康男子的鲜血 2ml，加 5% 的肝素抗凝获得全血溶液，再加适量的 NaCl
取 30 岁健康男子的鲜血 2ml，加 5% 的肝素抗凝获得全血溶液，再加适量的 NaCl

溶液，配制成不同浓度的全血溶液作为实验用样品。

5.1.3 实验方法

将配制好的 2ml 全血溶液样品装入一个石英比色皿内，在另一相同的比色皿内装入相应的 NaCl 溶液作为空白，在二比色皿与光源之间各放一个偏振片，使它们的偏振方向相同，用 UV-2201 分光光度计描绘出 230~800nm 的全血溶液的吸收光谱。

用 FLS920 多功能稳态、时间分辨荧光光谱仪，分别扫描装入比色皿内的不同浓度的全血溶液样品，在样品与光源间放一偏振器作为起偏器，激发光波长为 408nm 的 LED，扫描步长 0.1nm、范围 350nm~800nm，扫描得到相应的全血溶液的静态荧光偏振光谱。再在样品与光谱仪间放入另一偏振器作为检偏器，分别选择检偏器与起偏器相互平行与垂直，扫描获得平行静态荧光偏振光谱和垂直静态荧光偏振光谱。整个实验过程均在室温下进行。

5.2 血液对偏振光的吸收光谱及荧光偏振光谱

图 5.1 是浓度分别为 0.3%、0.5%、0.8% 的全血溶液在 230nm~800 nm 波段间对偏振光的吸收光谱。在这一波长范围内吸收光谱有五个明显的吸收峰，分别位于波长为 272nm、340nm、417nm、540nm 和 576 nm。它们的位置与血液浓度没有关系，但吸收峰强度却随浓度的增加而增加。从整个吸收光谱来看，在短波区吸收较强，尤其是位于波长 417 nm 处的吸收峰很大，在长波区吸收较弱，在波长大于 600 nm 的区域吸收很小。

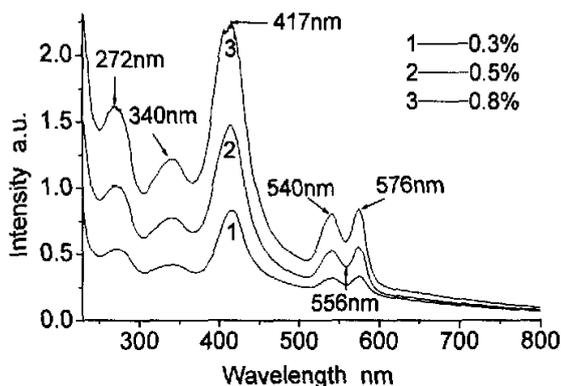


图 5.1 不同浓度全血溶液对偏振光的吸收光谱

由于血液在 417nm 处有较强吸收，我们在该处附近选择 408nm 的激励光，有较高

华中科技大学硕士学位论文

的荧光效率。图 5.2 是波长为 408nm 的 LED 偏振光激发不同浓度的全血溶液位于 350nm~800nm 波段的荧光偏振光谱。谱线似乎以 556nm 为中心的 W 底分成了大致相等的两个荧光区域，W 的两个底位置几乎不随浓度发生变化，分别位于 540nm 和 576nm 处。整个荧光偏振光谱呈现出一种宽谱带的结构特征。我们曾对不同年龄和性别健康人血液做了该项实验，实验结果基本相同，图 5.2 的荧光偏振光谱具有代表性。

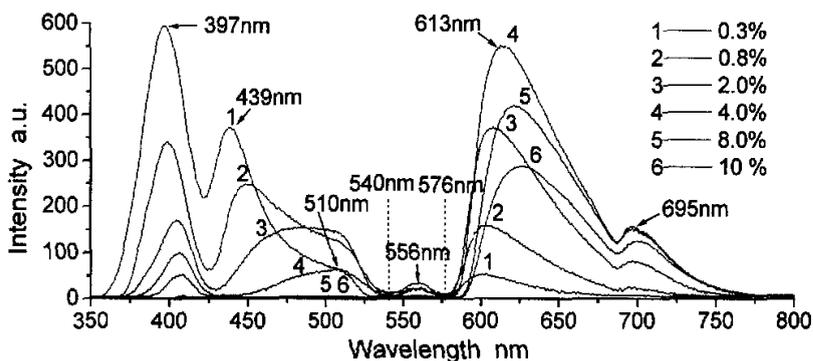


图 5.2 不同浓度全血溶液的荧光偏振光谱

(1) 图 5.2 中以小峰 556nm 为中心的 W 的两个底，恰好对应吸收光谱（图 5.1）的两个吸收峰 540 nm 和 576 nm，显然 556nm 的谱峰主要是由于其两边的光谱被吸收而形成的。因此可以说：峰值位置在 556nm 处的波峰并不是由荧光团所产生的特征峰，而是因吸收造成的假象。

(2) 在波长为 350nm~540nm 区域内有两个明显的谱峰，对于浓度为 0.3% 的谱线 1 而言，这两个峰值位置分别位于 397nm 和 439nm 处，且最大峰值位置 λ_{\max} 随浓度的增加出现红移，而两峰强度均随着血液浓度的增加而减小。

400nm 附近近似正态曲线的大谱峰，主要是由 408nm 的激励光的散射形成的。随着血液浓度的增加，溶液对激励光的吸收增大，致使散射光强度随着血液浓度的增加而减小。从图 5.2 中我们还可以看出，只有血液浓度为 10% 的散射波峰位恰为激励光的中心波长 408nm，其它各峰位均随着血液浓度的减小出现了不同程度的蓝移。对浓度为 0.3% 的谱线 1 而言，峰值位置竟蓝移了 11 nm，这显然是因血液在 417 nm 处有一个强吸收造成的，此吸收中心恰在 408nm 散射峰右侧的斜面上，吸收使右侧斜面深度下凹，

将峰的最高点推向左侧而形成蓝移。

在 510nm 附近有一小峰，由于该峰和 439nm 峰（谱线 1 的峰值位置）的强度对血液浓度的敏感程度不同，在低浓度时它几乎显现不出来，随着血液浓度的增加 439nm 峰的强度迅速减小，510nm 峰明显地表现出来，之后又随浓度的进一步增加开始减小，直至为零

(3) 在 576nm~800nm 波段内有两个荧光峰，其中在波长为 613nm 附近波峰的强度较强；相比较而言，在波长为 695nm 附近的波峰强度要小得多。而在血液浓度小于 4% 时，荧光强度随浓度的增加而增加；在浓度大于 4% 时，荧光强度随浓度的增加而减小。两谱峰的峰值位置 λ_{\max} 均随着浓度的增加而出现红移。大峰的红移较明显，小峰的红移很小。

(4) 在人的血液中存在大量的血卟啉（原卟啉和锌卟啉）。原卟啉吸收光子后，发射 630nm 和 690nm 的荧光，相应的能级跃迁为 $^1S_{1,0} \rightarrow ^0S_{0,0}$ 和 $^1S_{1,0} \rightarrow ^0S_{1,0}$ ，锌卟啉吸收光子后，发射 590nm 的荧光，相应的能级跃迁为 $^1S_{1,0} \rightarrow ^0S_{0,0}$ [8]。由于在电子的能级态上存在着不同的振动能级，这些荧光的波长和强度又会因血液所处的物理、化学环境而有所变化，且在血液生物大分子中存在着多种荧光团，这样就形成了荧光偏振光谱的宽带结构特征。图 5.2 中 613nm 附近的大峰主要是锌卟啉发射的 590nm 荧光和原卟啉发射 630nm 的荧光二者叠加形成的。695nm 的小峰主要是原卟啉 $^1S_{1,0} \rightarrow ^0S_{1,0}$ 能级跃迁所产生。

5.3 血液荧光偏振光谱的偏振度

图 5.3 是浓度为 1.3% 的全血溶液荧光偏振光谱。曲线 1 为仅有起偏器时由偏振光激发的血液荧光光谱 f_p ，曲线 2 为起偏器与检偏器都存在且二者偏振方向相同时血液的荧光光谱 f_{\parallel} ，曲线 3 为起偏器与检偏器相互垂直时的血液荧光光谱 f_{\perp} 。显然，它们在 I、II 的荧光强度发生了明显的变化，不难看出曲线 1 的两个荧光区域 I 和 II（以下简称荧光峰 I 和荧光峰 II）具有不同的偏振度。根据所测的荧光强度 I_{\parallel} 、 I_{\perp} ，利用偏振度公式

$$p = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}} \quad (5.1)$$

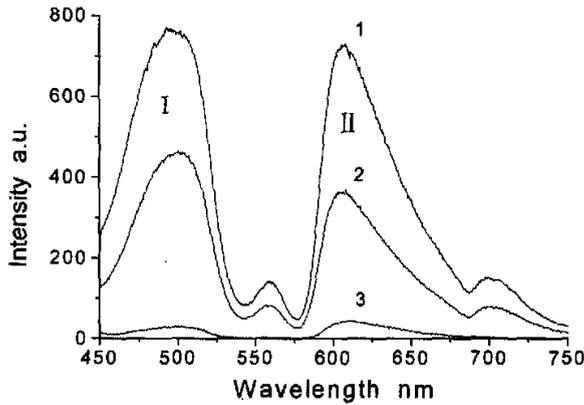


图 5.3 1 偏振光激发的荧光光谱 2 平行检偏的荧光光谱 3 垂直检偏荧光光谱

可计算出曲线 1 的荧光峰 I 和峰 II 的荧光偏振度分别为 0.4731 和 0.4023。

(1) 当用偏振光激发荧光系统时, 样品发射的荧光也是偏振的, 这是由于分子的荧光发色团按它与激发光偏振方向的相对取向进行光选择的结果。在如图 5.4 所示的实验

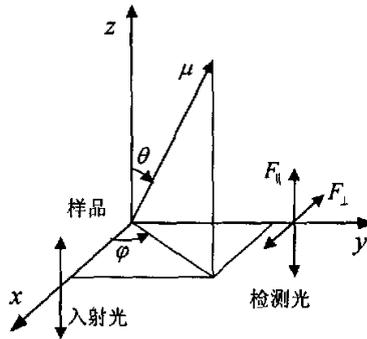


图 5.4 荧光偏振光谱的 $I_{||}$ 和 I_{\perp} 检测光路

装置中, 偏振光沿 z 轴偏振, 从 x 轴入射并在 y 轴检测 $I_{||}$ 和 I_{\perp} , 分子取向以吸收跃迁偶极矩与发射跃迁偶极矩描述。经分析计算可得到激发分子取向在 $\theta + d\theta$ 及 $\varphi + d\varphi$ 之间的几率为

$$w(\theta, \varphi) d\theta d\varphi = (3/4\pi) \cos^2 \theta \sin \theta d\theta d\varphi$$

发射团发射的沿 z 轴方向偏振的荧光几率正比于 $|\mu \cdot k|^2$, μ 为发射团吸收跃迁偶极矩矢量, k 为 z 轴的单位矢量, 于是发射几率正比于 $\cos^2 \theta$ 。将激发分子的取向分布 $w(\theta, \varphi)$ 乘

华中科技大学硕士学位论文

以发射几率并对所有的方向积分, 得沿 z 轴偏振的荧光相对强度 I_{\parallel}

$$I_{\parallel} \propto \int_0^{2\pi} d\varphi \int_0^{\pi} d\theta \cos^2 \theta w(\theta, \varphi) = (3/4\pi) \int_0^{2\pi} d\varphi \int_0^{\pi} d\theta \cos^4 \theta \sin \theta = 3/5 \quad (5.2)$$

发射团发射的沿 x 轴方向偏振的荧光几率正比于 $|\mu \cdot i|^2$, i 为 x 轴的单位矢量, 因而发射几率正比于 $(\sin \theta \cos \varphi)^2$, 得沿 x 轴偏振的荧光相对强度 I_{\perp}

$$I_{\perp} \propto \int_0^{2\pi} d\varphi \int_0^{\pi} d\theta \sin^2 \theta \cos^2 \varphi w(\theta, \varphi) = (3/4)\pi \int_0^{2\pi} d\varphi \cos^2 \varphi \int_0^{\pi} d\theta \cos^2 \theta \sin^3 \theta = 1/5 \quad (5.3)$$

将 I_{\parallel} 和 I_{\perp} 代入偏振度公式得偏振度 $P = 0.5$ 。可见对于随机取向分子的样品被偏振光激发时, 所发射荧光偏振度的最大值只有激发光偏振度 ($P = 1$) 的一半, 我们的试验结果较接近这一理论值, 显然, 这种偏振主要是发射荧光团记忆了激发光的偏振信息的结果。

(2) 荧光的偏振度 $P = 0.5$, 是当荧光体的分子不发生旋转以及分子间无能量转移的情况下的极限偏振值。当处在激发态的分子受到旋转布朗运动的影响, 改变了受激发时的原有方位时, 它将部分地丧失记忆能力, 表现出去偏振的结果。荧光的偏振度与分子的旋转驰豫时间 τ 成正比^[63]

$$\tau = 3\eta V / RT \quad (5.4)$$

其中 η 为粘度, V 为分子体积, R 为普适常量, T 为绝对温度。若 η 、 V 、 T 均为常数, 则分子的旋转驰豫时间与其分子体积成正比, 分子体积越大, 分子的旋转驰豫时间便越长, 因而分子的荧光偏光就越大。当考虑旋转时荧光的偏振度为^[64]

$$P = \frac{3 \cos^2 \xi - 1}{\cos^2 \xi + \tau_f / \tau + 3} \quad (5.5)$$

其中, ξ 为发射跃迁偶极矩与吸收跃迁偶极矩之间的夹角, τ_f 为观察的荧光衰变时间。显然, 当 $\xi = 0$, $\tau_f \ll \tau$ 时, $P = 0.5$ 。对于我们所研究的血液生物大分子可估算出 τ 约为几个 ns, 而血液中的主要发光物质血卟啉的荧光衰变时间 τ_f 约在 ps 的数量级, 因此分子因旋转布朗运动所产生的去偏振可以忽略不计。

荧光峰 I 的波长较接近激发光波长, 吸收跃迁与发射跃迁在相同能级间进行的几率较大, 吸收跃迁偶极矩与发射跃迁偶极矩可以近似看作平行, $\xi \rightarrow 0$, ξ 的去偏振效果也就不明显了。荧光峰 II 相对荧光峰 I 远离激发光波长, 不同能级之间的吸收跃迁几率

增大, ξ 不再为零, 其去偏振的效果将部分地表现出来, 因此, 我们认为这是造成荧光峰 II 的偏振度小于荧光峰 I 的偏振度的主要原因之一。

(3) 血液的吸收光谱与发射光谱在较大范围内是重叠的, 由于血液内存在多种荧光团, 各荧光团之间的能量转移不可避免, 能量转移必伴随着偏振度的降低。Demidov 研究了两个发射团均能吸收与发射, 并经能量转移而交换激发的体系, 给出了荧光偏振度的计算公式^[52]

$$P = \frac{3 \cos^2 \xi - 1 + 2A}{\cos^2 \xi + 3 + 4A} \quad (5.6)$$

式中

$$A = \frac{\tau_2^{-1} + k_{21} + (\tau_1^{-1} + k_{12})\alpha\gamma}{\alpha k_{21} + \gamma k_{12}}$$

$$\alpha = \sigma_2(\lambda_{ex}) / \sigma_1(\lambda_{ex})$$

$$\gamma = \phi_2 f_2(\lambda_{fl}) \tau_1 / \phi_1 f_1(\lambda_{fl}) \tau_2$$

其中, τ_i 是孤立发射团的荧光寿命, k_{ij} 是从发射团 i 到 j 的能量转移速率, σ_i 和 f_j 分别是发射团 i 的吸收和荧光光谱, λ_{ex} 和 λ_{fl} 分别是激发和荧光波长, ϕ 是荧光量子产率, ξ 为两发射团偶极矩之间的夹角。显然, 当 $\xi = 0$, $\sigma_2(\lambda_{ex}) = 0$, $\phi_1 = 0$ 时, 即当第一个发射团只吸收光, 第二个发射团只发射光时, $A = 0$, 荧光偏振度 $P = 0.5$, 只要不是这样, 当两发射团有能量转移时必导致荧光偏振度的减小, 我们的试验就属于这种情况, 即, 发射荧光峰 II 的荧光团部分的吸收了荧光峰 I 的荧光, 形成激发再发射 (也有可能无辐射的能量转移), 由于荧光峰 I 的荧光的偏振度已降到 0.5 以下, 由它所激发的二次荧光其偏振度会更小, 这是造成荧光 II 的偏振度小于荧光峰 I 的偏振度的另一重要原因。

5.4 血液荧光偏振光谱的偏振度随其浓度的变化

表 5.1 给出了不同浓度的血液荧光偏振光谱的荧光峰 I 和荧光峰 II 的偏振度的实验值, 同时给出了同一浓度下荧光峰 II 的偏振度与荧光的偏振度之比。

华中科技大学硕士学位论文

表 5.1 不同浓度的血液荧光偏振光谱的荧光峰 I 和荧光峰 II 的偏振度

血液浓度	1.0%	1.3%	1.6%	2.0%	3.0%	4.0%	8.0%
偏振度 $P_{\uparrow\uparrow}$	0.4796	0.4731	0.3748	0.3006	0.2718	0.2492	0.2064
偏振度 $P_{\downarrow\downarrow}$	0.4344	0.4023	0.2528	0.1398	0.1016	0.0726	0.0538
$P_{\downarrow\downarrow}/P_{\uparrow\uparrow}$	0.9058	0.8503	0.6744	0.4651	0.3739	0.2914	0.2607

从表中可以看出：荧光的偏振度随血液浓度的增加而减小，在相同浓度下荧光峰 II 的偏振度总是小于荧光峰 I 的偏振度，并且，荧光峰 II 的偏振度与荧光峰 I 的偏振度之比 $P_{\downarrow\downarrow}/P_{\uparrow\uparrow}$ 随血液浓度的增加而减小，也就是说荧光峰 II 的偏振度比荧光峰 I 的偏振度随浓度的增加衰减的更快。

结合图 5.2 中荧光偏振光谱强度随浓度的变化规律，我们发现，尽管两荧光的偏振度均随浓度增加而减小，但它们的荧光强度随浓度的变化却有很大不同，荧光峰 I 的强度随浓度增加而单调减小，荧光峰 II 的强度却随浓度增加出现先增加然后再减小的现象。可见，两荧光峰偏振度减小的机理可能不同。

对于荧光峰 I 来讲，由于血液的吸收光谱和发射光谱有较大的重叠，有一部分的荧光会被它自身的基态分子所吸收，这是一种能量由激发态分子转移到同一种物质的基态分子的辐射能量转移过程。随着血液浓度的增加，自吸收现象的加剧，荧光峰 I 中部分地吸收偏振度较低的荧光而再发射的二次荧光比例加大，导致了其偏振度随浓度增加而减小。由于荧光效率通常小于 1，基态分子吸收荧光后不可能百分之百地再发射，所以自吸收的结果使荧光峰 I 的强度随浓度增加而单调减小。

对于荧光峰 II 来讲，由于其荧光团的发射能级小于荧光峰 I 的荧光团的发射能级，荧光团 II 会作为受体接受来自于荧光团 I 供体的能量，出现共振能量转移。当浓度较低时，两荧光团之间的分子间距 r 大于临界转移距离 R_0 ，由于在 R_0 的距离下，从供体到受体的能量转移几率，等于供体的衰变几率，在 $r > R_0$ 时，共振能量转移效率很低，去偏振能力较差，荧光有较大的偏振度。这时的荧光峰 II 主要是靠荧光团直接吸收激励光而产生的，这一效率也很低，因此荧光强度较弱。随着血液浓度的增加，两种荧光团之间的分子距离在减小，共振能量转移效率提高，特别是当 $r < R_0$ 时，荧光团 II 的能量大

华中科技大学硕士学位论文

部分来自于荧光峰 I 发射的荧光，导致荧光峰 II 偏振度减小，荧光强度增大，荧光峰 I 的强度减小。随着血液浓度的进一步增加，荧光峰 I 的荧光几乎被荧光团 II 全部吸收，其强度几乎为零，荧光峰 II 的强度达到最大。血液浓度再增加，荧光团 II 来自于荧光峰 I 发射的荧光达到吸收饱和，荧光峰 II 的强度不再增大，与此同时，荧光峰 II 的自吸收机制开始出现，导致进一步的去偏振以及降低荧光强度。

6 总结

6.1 总结

本文主要从实验和理论上研究了 LED 光诱导下的人血液的荧光光谱,对荧光光谱的结构特征、变化规律及其发光机理进行了探讨,主要研究成果包括以下几个方面。

(1) 基于 LED 的体积小、功耗低、寿命长、响应速度快、发光单色性好、可靠性高、成本低、易集成等优点,探索了它在生光诱导人体组织荧光光谱进行早期癌症诊断方面的应用。实验结果表明:LED 光诱导的人全血液的荧光光谱灵敏度、结构特明显,可以预见它在生物领域中的应用价值。

(2) 用峰值波长为 408nm ($\Delta\lambda_{1/2}\approx 18\text{nm}$ 、 $P=5\text{mW}$) 的 LED 光,诱导了浓度分别为 0.3%~10% 人全血液在 350nm~800nm 波段的荧光光谱;分析了它们的结构特征;研究了血液的自吸收对其荧光光谱结构产生的影响;解释了血液的荧光光谱随其浓度增加出现红移的现象;提出了 556nm 谱峰不是某一荧光团所产生的特征峰,而是由吸收所造成的假峰的观点;讨论了激励光散射中心波长偏离激励光中心波长现象的原因。

(3) 分别用 407nm 和 470 nm 的 LED 光诱导了不同浓度的人全血液的荧光光谱;研究了人血液荧光光谱随血液浓度的增加而红移的现象及其规律,得出了光谱峰值随血液浓度的增加按照 e 指数方程 $y = y_0 + A_1 \exp\left(\frac{x - x_0}{t_1}\right)$ 向长波方向移动的规律;从能量转移的角度,分析了血液中各荧光团之间在不同浓度下、不同荧光区域所具有的不同能量吸收机制;得出吸收是产生红移的主要原因的结论。

(4) 实验研究了波长为 457 nm 的 LED 光、波长为 457.9 nm 的 Ar⁺ 激光和波长为 632.8 nm 的 He-Ne 激光诱导下的人全血液的荧光光谱,对它们结构特性与形成机理进行了研究。指出用激光光源激发可以显现血液荧光光谱的部分精细结构,说明血细胞中的荧光团对激发光波长具有一定的选择性,这种选择是由其自身的能级结构和状态所决定的。

(5) 用 408nm 的 LED 偏振光诱导了不同浓度人全血液在 350nm~800nm 波段的静态荧光偏振光谱,讨论了其光谱的结构特征和红移现象并给出了机理解释;检测了荧光偏振光谱中各主要荧光区的偏振度并研究了偏振度随浓度的变化规律,用能量转移理论

分析了在不同荧光区、不同浓度下, 血液中各荧光团之间的不同能量转换机制及偏振度的变化现象。

本文的研究结果对研究光与血液相互作用的机理, 借助血液自体荧光进行疾病的诊断和治疗, 以及研究血液生物大分子的构象与结构特点提供实验和理论依据。

6.2 展望

光与生物组织相互作用涉及内容极其广泛, 本文只是针对其中的一小部分进行了基础性理论与实验的探讨, 而这几部分也尚有许多问题和研究工作需要进一步的探讨、分析和解决。这里只列出一些亟待解决问题和研究内容, 其中也包括作者及其所在课题组今后将要进行的研究工作。

(1) 目前, 我们所研究的是健康人全血溶液的荧光光谱, 如果要真正搞清光谱机理, 必须对血液中各组分的荧光光谱进行研究。

(2) 我们所研究的是离体健康血液的荧光光谱, 离体与在体血液荧光光谱是否存在差异, 有待于进一步的研究。

(3) 进一步研究健康血液与不同病变血液的荧光光谱的差异, 这对于利用血液自体荧光进行疾病的诊断无疑是非常重要的。

(4) 选用不同的激励光源实验研究以上内容, 从理论上对其结果进行分析将有助于搞清光诊断疾病的机理。

华中科技大学硕士学位论文

致 谢

首先要感谢我的导师杨坤涛教授，他在百忙之中给了我很多指导和建议。他以学术上的丰富理论知识、实践经验、敏锐的洞察力、以及开拓创新的意识，给予了我多方面的指导，特别是对论文提出了许多卓有见地的指导意见，使得我的工作得以按时顺利完成，受益非浅。

感谢在求学过程中给我诸多有益指导的廖兆曙、陈海清、李红、吴裕斌、曾延安和李汉菊等老师，在本人几年的学习过程中，老师们认真负责、严谨治学的态度、高度的敬业精神深深感染了我，是他们谆谆教导和帮助，才使得我不断进步。

在本论文完成过程中，我还要特别感谢徐州师范大学教师刘莹博士、南京航空航天大学教师兰秀风博士，她们对我论文的完成给予了很大的帮助。

还要感谢我的妻子、女儿和我的父母，由于他们大力的支持和关心，我的论文才得以顺利完成。

感谢一切关心和支持我的人，但愿今后能以此为起点作出点成绩，以告慰每一个关爱我的人。

参考文献

- [1] 林其榕. 计算机图像处理技术在激光—荧光法肺癌定位中的作用. 激光与光电子进展, 1996, (4): 36~38
- [2] A. Edward Profio. Laser Excited Fluorescence of Hematoporphyrin Derivative for Diagnosis of Cancer. IEEE J Quantum Electronics, 1984, 20(12): 1502~1506
- [3] O. J. Balchum, et al. Fluorescence Bronchoscopy for Localizing Early Bronchial Cancer and Carcinoma in Situ. Results in Cancer Research, 1982, 82: 97~120
- [4] 宋家明, 郝建军. 癌症的早期发现与早期诊断. 北京: 中国中医药出版社, 1995, 3
- [5] 高忠显, 许树旭. 现代肿瘤诊断治疗学. 北京: 科学技术文献出版社, 1997, 3
- [6] J. R. Lakowicz. Principle of Fluorescence Spectroscopy. Plenum Press, 1983
- [7] B. Chance. Cell Structure and Function by Microspectrofluorometry. Academic Press, 1989, 53~69
- [8] Markolf H. Niemz. Laser-Tissue Interactions Fundamentals and Applications. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1996
- [9] Richard L. Lipson, Hematoporphyrin derivative: a new aid for endoscopic detection of malignant disease. J Thoracic and Cardiovas Surg, 1962, 42: 623~629
- [10] G. A. Kyriazis, H. Balin and R. L. Lipson, Am. J. Obstet. Gynecol, 1973, 117(5): 375
- [11] Shuichi KINOSHITA, Tianfu Liu, Takahiro SEKI, Takashi KUSHIDA. Fluorescent Properties of Hematoporphyrin Derivative in Solutions and Biological Cells. Journal of Luminescence, 1988, 40: 581~582
- [12] M. Sinaasappel, Sterenborg, H. J. C. M. Quantification of the hematoporphyrin derivative by fluorescence measurement using dual wavelength excitation and dualwavelength detection. Applied Optics, 1993, 32(4): 541~548
- [13] V. Sokolov, Victor, et al. Clinical fluorescence diagnostics in the course of photodynamic therapy of cancer with the photosensitizer PHOTOGEM. Proceedings of SPIE-The International Society for Optical Engineering Photodynamic Therapy of Cancer II, 2325, 1995
- [14] a.f. Klinteberg, F. Claes, et al. Laser-induced fluorescence diagnostics of basal cell carcinomas of the skin following topical ALA application. Proceedings of SPIE-The

华中科技大学硕士学位论文

- International Society for Optical Biopsies and Microscopic Techniques, 2926, 1996
- [15] 朱普, 徐键, 杨远龙等. 小剂量血叶琳 OMA 系统荧光诊断肿瘤. 中国激光, 2000, 27(6): 572~575
- [16] 刘蔚东, 张阳德, 唐贵林等. 结肠癌自体荧光内镜诊断系统研究 II: 肿瘤组织与正常组织自体荧光机制研究. 中国内镜杂志, 2000, 6(2): 1~4
- [17] A. Policard, A. Leulier. Etude sur les aspects offerts par des tumeurs experimentales examinees a la lumiere de Wood. CR Acad. Sci. Soc. Biol. 1924, 91: 1423~1424
- [18] 奇田隆夫. 激光照射胃癌组织光谱研究. 科学朝日, 1980, 10: 25
- [19] Okuda Shigeru, Mimura Seishiro, Ichii Makoto. Diagnosis and Treatment Utilizing Laser in Gastrointestinal Cancer. Japanese Journal of Medical Electronics and Biological Engineering, 1984, 22: 40~41
- [20] R. R. Alfano, G. C. Tang, A. Pradhan. Fluorescence Spectra from Cancer and Normal Human Breast and Lung Tissue. IEEE Journal of Quantum Electronics, 1987, 23(10): 806~811
- [21] R. R. Alfano, A. Pradhan, G. C. Tang. Optical Spectroscopic Diagnosis of Cancer in Normal and Breast Tissue. J Optic Soc Am B, 1989, 6: 1015~1023
- [22] Palcic, B. Jaggi, B. Pon, Alfred Fengler, John Lam, S. Development of a lung imaging fluorescence endoscope. Proceedings of the Annual Conference on Engineering in Medicine and Biology pt I, 1990, 1: 196~197
- [23] Sroka Ronald, R. Baumgartner, A. Buser, et al. Laser-assisted detection of endogenous porphyrins in malignant diseases. SPIE, 1992, 1641: 99~106
- [24] B. B. Das, Glassman, W. Sha, et al. UV fluorescence spectroscopic technique in the diagnosis of breast, ovarian, uterus and cervix cancer. SPIE. 1991, 1427: 368~373
- [25] J. T. Arendt, H. S. Levin, E. A. Klein, et al. Investigation of early cancerous changes in bladder tissue by autofluorescence. Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology-Proceedings, 1997, 5: 2290~2293
- [26] Kojiro Onizawa, Naomichi Okamura, Hideo Saginoya, Hiroshi Yusa, Toru Yanagawa, Hiroshi Yoshida Analysis of Fluorescence in oral squamous cell carcinoma. Oral Oncology, 2002, 38: 343~348
- [27] Asima Pradhan, Sidhartha S. Jena, B. V. Laxmi, et al. Fluorescence depolarization of
-

华中科技大学硕士学位论文

- normal and diseased skin tissues. SPIE, 1998. 3250: 78~82
- [28] 陈国珍等. 荧光分析方法. 第2版. 北京: 科学出版社, 1990
- [29] S. Xu, S. Lin, R. Chen. Absorption Spectrum of Blood Components in Human and Rabbit. SPIE, 1998, 3344: 212~220
- [30] 程光煦编著. 拉曼·布里渊散射—原理及应用. 北京: 科学出版社, 2001
- [31] Pedersen, G. D., McCormick, N. J., Reynolds, L. O. Transport calculations for light scattering in blood. Biophys. J. 1976, 16: 199~207
- [32] Reynolds, L. O., Fohnson, C. C. Ishimaru, et al. Diffuse reflectance from a finite blood medium: applications to the modeling of fiber optice catheters. Appl. Opt. 1976, 15: 2059~2067
- [33] 杨明媚, 蒋治良. 兔红细胞的共振散射光谱研究. 光谱学与光谱分析, 2002, 22(2): 204~208
- [34] 杨晔, 张镇西, 蒋大宗. 激光散射技术在血细胞计数及分类中的应用. 激光技术, 1997, 21(4): 231~236
- [35] 杨晔, 张镇西, 蒋大宗. 血细胞计数分类的弹性光散射. 生物医学工程学杂志, 1997, 14(2): 170~175
- [36] 谢济运, 蒋治良, 钟福新, 冯忠伟, 郭秀娇. 血细胞的光谱特性研究. 分析测试技术与仪器, 2000, 6(3)
- [37] 陈祖林, 续正瑞, 聂慧芳. 血液成分对光吸收规律的实验研究. 中国激光. 1994, A21(1): 77~80
- [38] H. L. Boulnois, et al. Photophysical processes in recent medical laser developments: a review. Lasers med. sci. 1, 1986: 47~66
- [39] Thomas G. Spiro, J. Michael Burke. Protein control of porphyrin conformation. Comparison of resonance raman spectra of heme proteins with mesoporphyrin analogues. Journal of the American Chemical Society. 1976, 98(18): 5482~5489
- [40] S. B. Brown. An Introduction to Spectroscopy for Biochemists. London: Academic Press, 1980
- [41] 骆晓森. 弱激光照射疗法治疗机理与过程研究:[博士学位论文]. 南京:南京理工大学, 2002. 58~61
- [42] Yu. P. Sinichkin, S. R. Utz, A. H. Mavliutov, et al. In vivo fluorescence spectroscopy of
-

华中科技大学硕士学位论文

- the human skin: experiments and models. *Journal of Biomedical Optics*, 1998, 3(2): 201~211
- [43] Yuri P. Sinichkin, Utz R. M. D. Sergei, Pavel M. Yudin, et al. Investigation of formation and dynamics of human skin erythema and pigmentation by in vivo fluorescence spectroscopy. *SPIE*, 1995, 2324: 259~268
- [44] S. S. Ganesan, Madhuri, P. S. Aruna, et al. Native fluorescence characterization of human liver abnormalities. *SPIE*, 1999, 3599: 20~24
- [45] 陈荣, 杨艳娇, 杨文琴等. 激光照射血液荧光光谱的初步研究. *激光生物学报*. 1999, 8(1): 6265
- [46] 降雨强, 李昌勇, 周源等. 人血液及其组分的荧光光谱研究. *激光与光电子学进展*, 2001, (5): 23~26
- [47] 宋峰, 王振亚, 姜芸芸等. 血液对人体动脉组织的 Ar⁺激光诱导荧光光谱的影响. *中国科学院研究生院学报*, 1994, 11(2): 183~186
- [48] 骆晓森, 倪晓武, 陆建等. 不同波长光照射血液诱发的荧光光谱研究. *中国激光*, 2003, 30(1): 93~36
- [49] Xiaosen. Luo, Chunkan Tao, Shumei Gao, et al. Investigation on fluorescent spectra of blood induced by lights of different wavelengths. *SPIE*, 2003, 5254: 399~401
- [50] Gao Shumei, Liu Ying, Lu Jian, Ni Xiaowu. Analysis of 407nm light-induced erythrocyte fluorescence spectra red shifted mechanism with the concentration increase. *光子学报*, 32(3): 261~263, 2003
- [51] Shumei Gao, Xiufeng Lan, Ying Liu, et al. characteristics of blood fluorescence spectra using low-level, 457.9 nm excitation from Ar⁺ laser. *Chines Optics Letters*, 2004, 2(3): 161~162
- [52] 樊美公等. *光化学基本原理与光子学材料科学*. 北京: 科学出版社, 2001
- [53] 陆同兴, 陆佚群. *激光光谱技术原理及应用*. 安徽: 中国科学技术大学, 1999
- [54] Rochkind S, Nissan M, Shamir M et al. Effects of laser irradiation on the spinal cord for the regeneration of crushed peripheral nerve in rats. *Lasers Surg Med*, 2001, 28(3): 216~219
- [55] R. R. Alfano, D. B. Tata, J. Cordero, et al. Laser Induced Fluorescence Spectroscopy from Native Cancerous and Normal Tissue. *IEEE Journal of Quantum Electronics*, 1984,
-

华中科技大学硕士学位论文

- 20(12): 1507~1511
- [56] Wang Wei, Sun Yu-e, Zhou Na-kang, et al. Laser-induced Autofluorescence Spectroscopy of Normal Lung, Normal bronchus and Lung Cancer. *Chin J Laser Med Surg*, 2000, 9(3): 137~140
- [57] Shumei Gao, Xiaosen Luo, et al. Analyzing LED-induced haemal fluorescent spectra on laboratory small albino rat. *SPIE*, 2001, 4536: 119~122
- [58] Chen Li-na, Gao Zhi-wen, Li Kong-ning. Study on the Fluorescence Spectrum of Hematoporphyrin in Human's Whole Blood. *Journal of Harbin Med University*, 1995, 29(1): 1~3
- [59] Peng Chang-de, et al. Investigation of LED-induced Fluorescent Spectra from Human Blood Solution. *Applied Laser*. 2003, (4): 232~235
- [60] 丘冠英, 彭银祥. 生物物理学. 第1版. 武汉: 武汉大学出版社, 2000
- [61] D. Kessel, T. J. Dougherty. Porphyrin photosensitization. Plenum Press: New York, 1983
- [62] 彭长德, 高淑梅, 刘莹等. LED 诱导人血液荧光光谱研究. *应用激光*, 2003, 23(4): 232~234
- [63] 宋乐新, 柯晓康, 郭子建. 荧光标识的环糊精二聚体与小肽衍生物之间的包合行为研究. *化学学报*, 2002, 60(8): 1419~142
- [64] 李庆国. 分子生物物理学. 北京: 高等教育出版社, 1992

附录 1 攻读学位期间发表的论文目录

- [1] Peng Changde, Liu Ying, et al. The mechanism researching on the red-shifted rule of human blood fluorescent spectra. SPIE, 2004, 5630: 926~931 (已被 EI 收录)
- [2] 彭长德, 刘莹等. 血液静态荧光偏振光谱研究. 光学学报, 2006, 11 (EI 源期刊)
- [3] Gao Shumei, Peng Changde, Liu Ying. Study on ultraviolet light-excitated blood fluorescence spectra characteristics. SPIE, 2004, 5630: 553~557 (已被 EI 收录)
- [4] 刘莹, 彭长德等. 乙醇和水分子形成配合物与荧光光谱特性研究. 物理学报, 2005, 54(11): 5455~5461 (已被 SCI 收录)

附录 2 攻读学位期间主持的科研项目

- [1] 主持江苏省高校自然科学基金项目：光诱导人血液及其组分荧光光谱的机理和应用研究，04KJD140197, 2004~2006
- [2] 主持完成徐州师范大学自然科学基金重点项目：LED 诱导人血液荧光光谱研究，03XLA05, 2003~2005
- [3] 主持完成徐州师范大学教学研究项目：基于提高物理系学生实践与创新能力的实验教学方案与实施，E04088, 2004~2005