

【摘要】 室温磷光材料因荧光干扰导致量子产率难以准确测定。本文采用 HORIBA Fluorolog-QM™ 稳瞬态模块化荧光光谱仪的 SSTD 模式，结合时间门控测量与积分球，建立了 SSTD/PLQY 方法，可在强荧光背景下有效分离并准确测定室温磷光信号。通过衰减曲线外推校正，将时间门控数据转化为总量子产率。以人血清白蛋白脱氧溶液及硼氮取代咕吨衍生物晶体为验证样品，成功测得低至约 0.01% 的室温磷光量子产率，证明了该方法在弱发光体系中的高灵敏度与可靠性。

【关键词】 室温磷光；绝对量子产率；时间分辨发射光谱；SSTD；Fluorolog®-QM；积分球

引言

室温磷光（RTP）材料在医学诊疗、有机电子器件和生物成像等领域应用前景广阔，近年来备受关注。然而，该材料体系普遍存在显著的荧光干扰与光谱重叠问题，这一现象在有机材料中尤为突出，导致磷光光谱、量子产率等关键光物理参数难以准确测定。

本文采用时间分辨测试，使用配有闪烁氙灯与积分球的 HORIBA Fluorolog-QM™ 稳瞬态模块化荧光光谱仪，利用其单次瞬态数字采集（SSTD）模式，同步测试样品的磷光衰减曲线与门控磷光光谱。将门控开始时间设置在激发脉冲时间区间内，分别对样品和空白进行瑞利线扫描；通过室温磷光（RTP）衰减曲线拟合结果，将时间分辨磷光的积分强度外推至激发脉冲起始时刻，从而使量子产率计算的标准积分球公式可直接用于时间门控方法获取的数据。本文将 SSTD/PLQY 方法用于测定人血清白蛋白（HSA）的脱氧溶液以及 BN 取代咕吨衍生物晶体样品的室温磷光（RTP）量子产率。

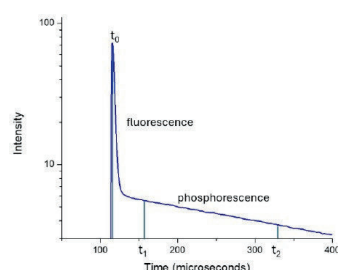


图 1. 当荧光和磷光发射光谱重叠时，通过门控技术过滤荧光并收集磷光信号。

方法

所有测试均在 Fluorolog-QM 软件 FelixFL 上完成。该软件可控制 Fluorolog-QM 的所有功能，并提供相应的数据分析工具。本实验以磷光闪烁氙灯（QM-400）作为激发光源，在 SSTD 模式下进行测试。在该模式下，每个脉冲触发后记录一条完整的衰减曲线，并按设定的脉冲次数对多条单次衰减信号进行平均。

在时间分辨发射光谱（TRES）模式下，系统可在采集完整发光衰减信号的同时完成发射单色仪的波长扫描，并针对每一波长在设定的时间窗口（ t_1 、 t_2 ）内完成信号积分（图 1）。

为测定存在荧光干扰效应样品的磷光量子产率，采用以下方案：

1. 测试样品磷光发射位置的衰减曲线，使用 Felix FL 中的 PowerFit 衰减分析工具，通过多指数尾部拟合确定 RTP 寿命和前置指数因子。拟合范围选择时应避开荧光成分。
2. 根据衰减曲线选择合适的时间门控范围（ t_1 、 t_2 ）（图 1）。
3. 将样品放置于积分球内，在对应的（ t_1 、 t_2 ）时间窗口内采集时间分辨发射光谱。
4. 选择包含仪器响应函数（IRF）的时间门控范围（ t_{ex1} 、 t_{ex2} ），在激发瑞利线端采集时间分辨发射光谱。实验中可使用已知透过率的中性密度滤光片（衰减片）避免信号饱和。
5. 将空白样品放入积分球中，重复步骤 3 和步骤 4。

利用 Felix FL 软件中标准量子产率计算功能，可根据采集得到的时间分辨发射光谱（TRES）曲线计算出部分量子产率（ Φ_1 ）。

Φ_1 仅代表积分时间区间 (t_1, t_2) 范围内所包含的室温磷光 (RTP) 强度对应的量子产率占比。在已知室温磷光 (RTP) 寿命及前置指数因子的前提下, 可通过以下方式计算出室温磷光的总量子产率 Φ : 先对激发脉冲起始时刻 t_0 (由仪器响应函数 IRF 峰值确定) 至无穷大时间范围内的 RTP 衰减曲线进行积分, 再对积分时间门 (t_1, t_2) 内的 RTP 衰减曲线完成积分, 最终计算出两个积分区域的面积比值, 即:

$$(1) \quad R = \frac{\int_{t_0}^{\infty} D(t-t_0)dt}{\int_{t_1}^{t_2} D(t-t_0)dt}$$

其中 $D(t)$ 为基于步骤 1 中所得拟合参数的室温磷光衰减函数, 因此室温磷光总量子产率 Φ 可由下式表示:

$$(2) \quad \Phi = R\Phi_1$$

结果

仪器验证

使用罗丹明 101 标准样品和 75W 氙灯, 在稳态模式下对 Fluorolog-QM 及积分球进行验证测试。测试得标准样品的量子产率 Φ 为 0.92 ± 0.03 , 与参考值 0.93 ± 0.05 吻合, 证明积分球校准及发射校正因子均准确。

方法验证

以氯化铽水溶液 ($TbCl_3$) 为试样, 验证 SSTD/PLQY 方法的可靠性。 Tb^{3+} 水溶液的发光衰减为单指数型, 寿命约 430 μs , 说明其为单一发光物种, 且未检测到短寿命杂质 (图 2)。

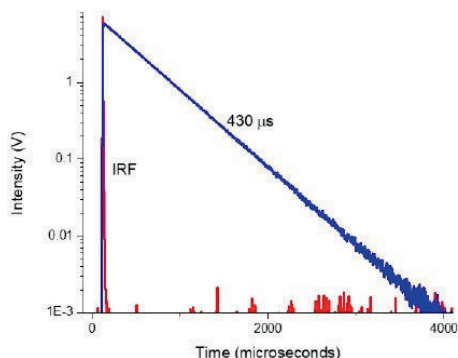


图 2. Tb^{3+} 寿命衰减曲线

因此, 通常将传统稳态测试装置测得的 Tb^{3+} 光致发光量子产率与脉冲氙灯激发的 SSTD/PLQY 所测结果进行比较, 以验证两种方法的等效性。

结果显示, 两种方法得到的量子产率结果非常相似, 分别为 $6.1 \pm 0.4\%$ (稳态) 和 $6.3 \pm 0.5\%$ (SSTD)。

SSTD 方法的量子产率结果是由 Tb^{3+} 时间分辨发射光谱积分结果 (图 3) 乘以 $R=1.217$ 得到, R 值根据方法部分所述, 通过将衰减曲线外推至 $t_0=115 \mu s$ 处仪器响应函数 (IRF) 峰值的校正过程获得。所得量子产率与 $5.3 \pm 0.6\%$ 的文献^[1]中 $5.3 \pm 0.6\%$ 的结果一致。

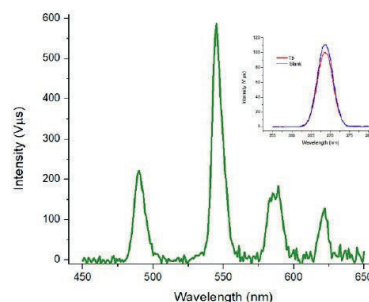


图 3. 采用 SSTD 法测得的 Tb^{3+} 时间门控发射光谱及激发峰区域门控扫描谱 (插图)

人血清白蛋白 (HSA) 的 RTP 量子产率



自 20 世纪 70 年代起, 蛋白质的室温磷光技术便被用于在微秒至秒的时间尺度上研究蛋白质的构象转变、折叠 - 解折叠过程, 以及色氨酸局部微环境的变化。人血清白蛋白 (HSA) 仅含一个色氨酸残基 (Trp-214), 该残基位于其刚性疏水核心区域, 能在一定程度上保护三重态免受溶剂分子与分子运动的猝灭。

检测室温磷光存在两大主要障碍: 一是三线态氧的猝灭效应, 二是色氨酸荧光的主导作用。后者会完全掩盖蛋白质的磷光光谱 (图 4), 尽管可通过向溶液中通入惰性气体除氧, 或使用化学除氧剂去除氧气, 但对蛋白质 RTP 的检测均需采用时间分辨法去除短寿命荧光信号。正因如此, 采用标准稳态法几乎无法测定蛋白质的 RTP 量子产率这一基础光物理性质。

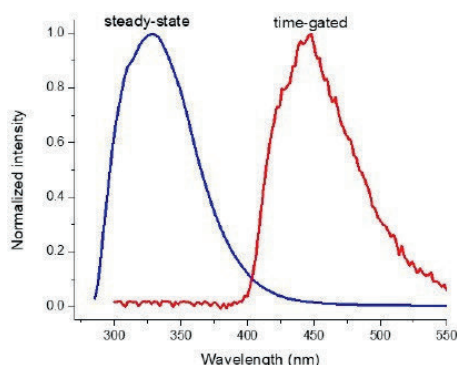


图 4. 脱氧人血清白蛋白的稳态及时间门控 (0.3~10 ms) 发射光谱 (激发波长=280nm)

图 4 对比了 HSA 在荧光与磷光重叠光谱范围内的稳态发射光谱和时间门控发射光谱。稳态光谱中未检测到明显的磷光信号，而经脉冲氙灯激发，及 0.3~10 ms 时间门控的时间分辨测试，可清晰观察到长寿命的 RTP 效应，且无任何荧光干扰。该时间门控的选取依据为 450 nm 波长下测得的 HSA 磷光衰减曲线（图 5）。结果显示其存在 3 个差异显著的磷光寿命，表明该蛋白质的构象多样性。

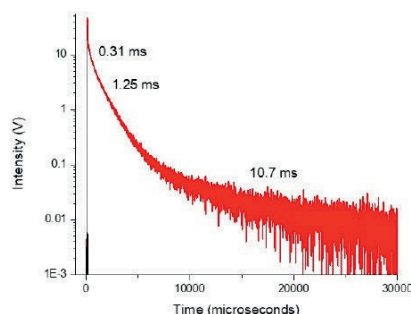


图 5. 脱氧 HSA (激发波长为 280 纳米) 的磷光衰减呈现出 3 个寿命: 0.31 ms (51.6%)、1.25ms (47.7%) 和 10.7ms(0.7%)

为确定 HSA 的 RTP 量子产率，将积分时间门控范围设置为 0.3~10 ms，并在 QuantaPhi-2 积分球中测试时间分辨发射光谱（图 6）。

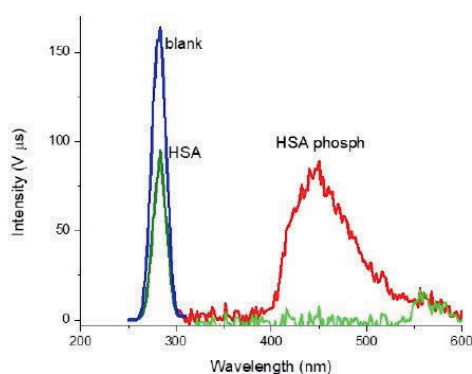


图 6. 0.3~10 ms 时间门控磷光发射扫描谱及 100~150 μs 时间门控激发峰区域扫描谱 (激发峰区域扫描时使用了中性密度滤光片)

随后将时间门控调整至 100~150 μs 范围，对 HSA 及空白样品在激发峰区域进行时间分辨发射光谱采集。

根据测试结果，计算得部分量子产率 Φ_1 为 $(7.3 \pm 0.3) \times 10^{-3} \%$ 。结合公式 1 及 HSA 室温磷光的衰减分析结果，计算出折算因子 $R=1.28$ ，将其代入公式 2 后，最终求得总量子产率 Φ 为 $(9.4 \pm 0.4) \times 10^{-3} \%$ 。

BN 取代咕吨衍生物的 RTP 量子产率

有机室温磷光的产生取决于两大关键因素：一是实现三重态的高效布居（高系间窜跃速率常数 K_{ISC} ），二是抑制三重态的非辐射衰减（低非辐射衰减速率常数 K_{nr} ）。本研究设计的三种 BN 取代咕吨衍生物 A、B、C 的分子结构^[2]，可同时解决这两大难题。



首先，依据经典的 El-Sayed 系间窜越选择定则，含孤对电子的杂原子（O、F）可提高激发三重态的 n 轨道特征，导致自旋-轨道耦合增强，进而提升系间窜越速率常数 K_{ISC} 。此外， BF_2 官能团可在各衍生物中形成多重 C-H...F 相互作用，增强分子在三重态下的刚性，从而降低热运动引发的猝灭。

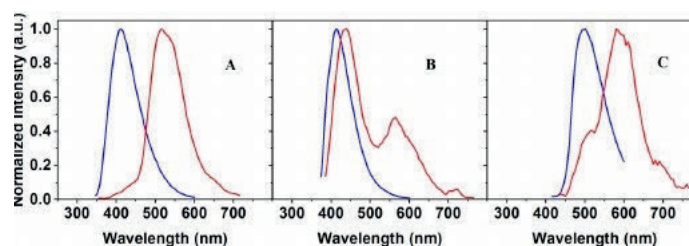


图 7. 衍生物的稳态光致发光 (蓝色) 和 3 ms 时间延迟下的时间分辨发射光谱 (红色)。

稳态光致发光 (PL) 数据未显示出磷光信号，而 3 ms 时间门控延迟发射光谱显示三种咕吨类样品均在 500~700 nm 范围内出现明显的磷光信号（图 7）。此外，样品 B 在 440 nm 处存在长寿命发射带，该信号极有可能为延迟荧光。

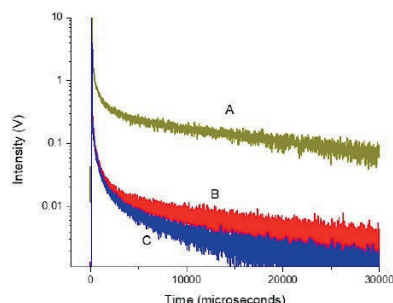


图 8. 晶体衍生物的寿命衰减曲线

寿命衰减曲线分析结果见表 1。所有样品均采用双指数拟合。量子产率的测量和计算均按照方法部分所述进行，积分时间门限设置在脉冲后 3 ms。最终 RTP 量子产率结果见表 1。结果表明， π 电子环结构的扩大显著降低了 RTP 效率。这可能是由于较大结构中存在更多的振动模式，从而增强了从激发单线态到基态的非辐射弛豫过程，并与系间窜越过程形成竞争。

样本	τ_1 , 毫秒	τ_2 , 毫秒	Φ (%)
A	2.87 (21.9%)	24.5 (78.1%)	1.3
B	2.83 (34.4%)	27.8 (65.6%)	0.32
C	2.73 (54.2%)	192 (45.3%)	0.15

表 1. RTP 寿命和量子产率结果与讨论

结论

Fluorolog QM 是测定室温磷光 (RTP) 绝对量子产率极为实用且功能强大的平台。SSTD 模式是 Fluorolog QM 的一项独特功能：它可在每一次激发脉冲下采集样品完整的衰减信号，并能够快速对多条衰减曲线进行累积与平均；同时支持时间门控光谱的直接测量，彻底消除样品荧光、背景荧光以及杂散光带来的干扰。这一抗干扰能力在搭配积分球时尤为关键，因为积分球会捕获全部散射与杂散光，若采用标准稳态模式，往往无法完成较低量子产率的测试。在本应用报告中，研究人员借助 SSTD/PLQY 技术，成功测得低至约 0.01% 的室温磷光量子产率。

致谢

这项工作是在与加拿大安大略省伦敦市西安大略大学的 A.E.R. Watson 博士、S.Y. Tao 博士、P.D. Boyle 博士、P.J. Ragnogna 教授和 J.B. Gilroy 教授的合作下完成。

参考文献

- [1] Kofod, N., & Sørensen, T. J. (2022). Tb3+ Photophysics: Mapping the Radiative and Non-Radiative Transition Probabilities of [Tb (H2O) 9] 3+ Using MolecularPhotophysics.
- [2] Watson, A. E., Tao, S. Y., Siemiarzczuk, A., Boyle, P. D., Ragnogna, P. J., & Gilroy, J. B. (2025). Organic Room Temperature Phosphorescence from BN Substituted Xanthene Derivatives. Angewandte Chemie International Edition, 64(2), e202414534.
- [3] Lower, S. K., & El-Sayed, M. A. (1966). The Triplet State and Molecular Electronic Processes in Organic Molecules. Chemical Reviews, 66(2), 199-241.



获取样册



咨询产品



官方公众号

HORIBA

400-888-0287

info-corp.cn@horiba.com

www.horiba.com/chn