

# 基于时域荧光寿命的水体溶解氧浓度检测方法

涂梦迪<sup>1,2\*\*</sup>, 殷高方<sup>1</sup>, 赵南京<sup>1\*</sup>, 覃志松<sup>3</sup>, 王翔<sup>1,2</sup>, 董鸣<sup>1</sup>, 刘建国<sup>1</sup>, 刘文清<sup>1</sup>

<sup>1</sup>中国科学院安徽光学精密机械研究所环境光学与技术重点实验室, 安徽 合肥 230031;

<sup>2</sup>中国科学技术大学, 安徽 合肥 230026;

<sup>3</sup>桂林电子科技大学计算机与信息安全学院, 广西 桂林 541004

**摘要** 依据氧气对物质荧光的猝灭作用, 研究了一种基于时域荧光寿命的水体溶解氧浓度检测方法, 根据荧光猝灭曲线上的两点计算荧光寿命, 并通过 Stern-Volmer 方程反演获得水体溶解氧浓度。结果表明: 相同溶解氧浓度下, 归一化处理后的荧光猝灭曲线不受激发光强度和激励持续时间等激发条件的影响; 不同溶解氧浓度下, 实测荧光寿命受系统延迟的影响, 补偿后荧光寿命理论曲线与修正曲线具有良好的一致性, 拟合相关系数达 0.9985。与 HQ30d 溶解氧分析仪对比, 测试结果表明, 0~20 mg·L<sup>-1</sup> 范围内溶解氧质量浓度测量误差小于 0.5 mg·L<sup>-1</sup>, 线性相关系数达 0.9992。

**关键词** 海洋光学; 水体溶解氧; 浓度检测; 荧光寿命; 时域

中图分类号 X832

文献标识码 A

doi: 10.3788/AOS201838.1001005

## Detection Method of Dissolved Oxygen Concentration in Water Based on Time-Domain Fluorescence Lifetime

Tu Mengdi<sup>1,2\*\*</sup>, Yin Gaofang<sup>1</sup>, Zhao Nanjing<sup>1\*</sup>, Qin Zhisong<sup>3</sup>,  
Wang Xiang<sup>1,2</sup>, Dong Ming<sup>1</sup>, Liu Jianguo<sup>1</sup>, Liu Wenqing<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Key Laboratory of Environmental Optics and Technology, Anhui Institute of Optics and Fine Mechanics, Chinese Academy of Sciences, Hefei, Anhui 230031, China;

<sup>2</sup>University of Science and Technology of China, Hefei, Anhui 230026, China;

<sup>3</sup>Institute of Computer and Information Security, Guilin University of Electronic Technology, Guilin, Guangxi 541004, China

**Abstract** On the basis of the quenching effect of oxygen on the material fluorescence, we developed an analytical method based on time-domain fluorescence lifetime to detect the concentration of dissolved oxygen in water. The fluorescence lifetime is calculated according to two points on the fluorescence quenching curve, and the dissolved oxygen concentration in water is then obtained by the inversion of Stern-Volmer equation. The results showed that under the same dissolved oxygen concentration, the normalized fluorescence quenching curve is not affected by the excitation conditions, such as the intensity of the excitation light and the duration of excitation. The measured fluorescence lifetime of different dissolved oxygen concentrations is affected by the system delay. The theoretical curve of the fluorescence lifetime after compensation is in good agreement with the modified curve with the fitting correlation coefficient of 0.9985. Compared with the HQ30d dissolved oxygen analyzer, the measurement error of the dissolved oxygen in the mass concentration range of 0-20 mg·L<sup>-1</sup> is less than 0.5 mg·L<sup>-1</sup> while the fitting correlation coefficient reach to 0.9992. These results showed that it could be an effective method for the measurement of dissolved oxygen concentration in water.

**Key words** oceanic optics; water dissolved oxygen; concentration detection; fluorescence lifetime; time domain

**OCIS codes** 010.7340; 120.1880; 300.2530

收稿日期: 2018-03-27; 修回日期: 2018-04-27; 录用日期: 2018-05-21

基金项目: 国家重点研发计划项目(2016YFC1400604)、青岛海洋科学与技术国家实验室开放基金项目(QNLM2016ORP0312)、安徽省重点研发计划项目(1804a0802192)

\* E-mail: njzhao@aiofm.ac.cn; \*\* E-mail: mdtu@aiofm.ac.cn

## 1 引 言

水体溶解氧是指溶解于水体中分子态的氧气,是评价水生生态系统、水体环境污染的重要指标,准确快速获取溶解氧浓度信息,对评价水体环境状况、应对水体污染至关重要<sup>[1-2]</sup>。溶解氧浓度的检测方法主要有碘量法、电化学探头法和荧光传感器法<sup>[3-4]</sup>等。荧光传感器法是基于氧分子对荧光物质的猝灭效应,通过测量荧光强度或寿命变化得到溶解氧浓度的方法,这种方法具有检测迅速、操作简单、维护方便等优点<sup>[5]</sup>。由于荧光寿命是荧光信号的本征参量,与外界杂散光、光电器件性能无关,所以光传感器法大多采用测量荧光寿命的方式<sup>[6-8]</sup>。荧光寿命有多种测量方法<sup>[9]</sup>,McDonagh<sup>[10]</sup>和 Zhang<sup>[11]</sup>等采用基于频域的相移法对激发光和荧光之间的相位差进行检测,进而得到荧光寿命和溶解氧浓度。目前,国内外现有的荧光法溶解氧测量仪也大多采用该方法实现荧光寿命的测量,如美国 Hach 公司的溶解氧在线分析仪产品<sup>[12]</sup>,国内苏州禹山、山东东润等公司的溶氧仪产品,但荧光寿命的相移法在检测中涉及的信号锁相放大和脉冲整形过程对电路性能要求较高。

本文提出了一种基于时域荧光寿命的溶解氧检测方法,通过脉冲光信号激发产生荧光,测量荧光猝灭曲线上两点的信号强度,由强度之比直接计算得到荧光寿命,对寿命补偿后通过 Stern-Volmer 方程反演得到溶解氧浓度,对比分析结果验证了该方法的有效性。

## 2 原 理

荧光寿命溶解氧检测原理是基于氧气对荧光物质的猝灭效应:在荧光物质受激自发辐射产生荧光的过程中,激发态分子的部分能量将转移到氧气分子上,使得产生的荧光强度降低,寿命缩短<sup>[13]</sup>。该过程中的氧气质量浓度  $\rho(\text{O}_2)$  与荧光寿命  $\tau$  的关系满足 Stern-Volmer 方程:

$$\rho(\text{O}_2) = \frac{1}{K_{sv}} \left( \frac{\tau_0}{\tau} - 1 \right), \quad (1)$$

式中: $\tau_0$  为无氧气存在时的荧光寿命; $K_{sv}$  为 Stern-Volmer 猝灭常数。

理论上,冲激信号光源激发荧光物质时,激发产生的荧光信号  $I(t)$  与时间  $t$  的关系满足单一指数衰减形式<sup>[14]</sup>:

$$I(t) = A \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right), \quad (2)$$

式中: $A$  为激发光源停止激励时的荧光信号强度。

实际上,任何光源都有一定的强度和宽度,激发产生的荧光信号  $R(t)$  是激发光信号  $E(t)$  与冲激光信号响应  $I(t)$  的卷积<sup>[13]</sup>。设脉冲激发光的强度为  $B$ ,激励作用在  $[-t_0, 0]$  时间段内存在,则激发光信号可表示为  $E(t) = B[\epsilon(t+t_0) - \epsilon(t)]$ ,得到激发产生的荧光信号  $R(t)$  随时间变化的关系为

$$R(t) = E(t) * I(t) = AB\tau \left[ 1 - \exp\left(-\frac{t_0}{\tau}\right) \right] \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right), \quad (3)$$

式中:“\*”代表卷积。

提出了一种时域荧光寿命法,采用脉冲光信号作为激发光源,通过计算脉冲响应  $R(t)$  在时间  $t_1$ 、 $t_2$  的强度之比  $A_1/A_2$ ,可以直接得到荧光寿命,进而由(1)式的 Stern-Volmer 方程反演得到溶解氧浓度。 $R(t)$  在时间  $t_1$ 、 $t_2$  的强度之比  $A_1/A_2$  满足

$$\frac{A_1}{A_2} = \frac{R(t_1)}{R(t_2)} = \exp\left(-\frac{t_1 - t_2}{\tau}\right). \quad (4)$$

则荧光寿命可表示为

$$\tau = \frac{t_2 - t_1}{\ln(A_1/A_2)}. \quad (5)$$

## 3 实 验

基于时域荧光寿命法的溶解氧实验测量系统如图 1 所示,系统主要由光源激发模块、溶解氧发生器、荧光信号探测模块等部分构成。单片机(MCU)发出的脉冲信号控制发光二极管(LED)产生中心波长为 475 nm 的脉冲激发光,激发光经过带通滤光片和分束光纤后照射在荧光物质(LDO SENSOR CAP, HACH)上,产生中心波长为 650 nm 的荧光,荧光经过分束光纤后被信号探测电路检测放大,示波器记录的荧光信号数据最后被送入计算机处理。在光源激发模块中,通过改变脉冲信号占空比控制激发光激励持续时间,通过调节驱动电路输出电流大小控制激发光强度;实验中通过控制进入水溶液池的  $\text{O}_2$  和  $\text{N}_2$  体积实现不同溶解氧浓度水溶液调配;在荧光信号探测模块中,通过硅光电倍增管(MPPC)(S13360-3050CS, HAMATSU)将荧光信号转换为电信号,并通过放大电路和示波器实现对电信号的放大和采集。

在实际测量荧光寿命时,选用低电平时间(1500  $\mu\text{s}$ )远大于荧光寿命的周期脉冲信号,保证下一次激发产生荧光前上一次激发产生的荧光已完全消亡,并且示波器采用 128 次平均测量模式。计算

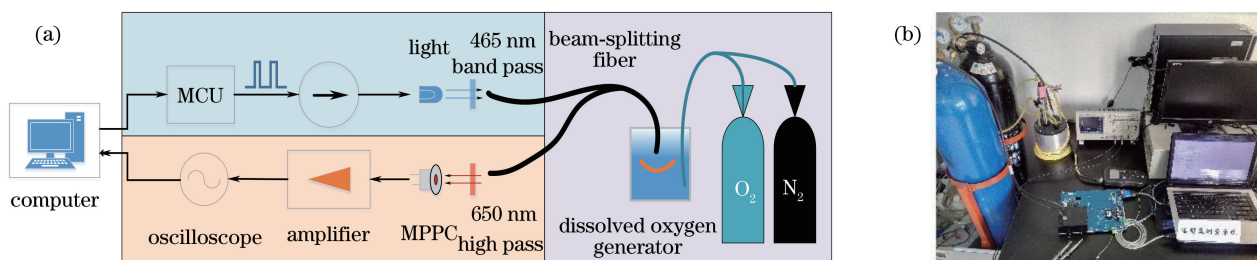


图 1 时域荧光寿命溶解氧实验测量系统。(a)示意图；(b)实物图

Fig. 1 Time-domain fluorescence lifetime dissolved oxygen measurement system. (a) Schematic diagram; (b) picture of real products

机处理示波器记录的荧光信号时,先对荧光信号进行多点移动平滑和除以最大值的归一化处理,得到归一化荧光猝灭曲线。在时刻  $t_1$  和  $t_2$  处,取得归一化曲线的值  $A'_1$  和  $A'_2$ ,以及  $t=1450 \mu\text{s}$  时(此时荧光已消亡)曲线的值  $A'_0$ ,以  $A_1 = A'_1 - A'_0$  和  $A_2 = A'_2 - A'_0$  分别作为  $t_1$  和  $t_2$  处的荧光信号强度,代入(5)式计算实测荧光寿命。

## 4 结果与讨论

### 4.1 激发条件对荧光寿命的影响

当激发光为有一定强度和宽度的脉冲光时,激发产生的荧光信号如(3)式所示,停止激发后,分析荧光强度受激发光强度  $B$  及激励持续时间  $t_0$  的影响。(5)式荧光寿命仅与两点荧光强度之比有关,因此利用荧光信号原始测量数据和归一化数据计算的结果相同。通过分析不同激发光强度和不同激励持续时间下的归一化荧光猝灭曲线,研究激发条件对荧光寿命的影响。

#### 4.1.1 激发光强度

在荧光寿命测量系统中,固定 LED 激励信号脉宽为  $5 \mu\text{s}$ ,通过改变驱动电路输出电流大小控制 LED 发光强度分别为  $1714, 2044, 2360, 2690 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-2}$ ,在溶解氧质量浓度为  $0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时,测量得到荧光信号随时间变化关系如图 2(a)所示,图 2(b)为停止激发后( $t > 0$ )各曲线的归一化结果。

从图 2 可以看出,同一溶解氧浓度下荧光信号随激发光强度增大而增大,在停止激发时刻( $t=0$ )荧光强度均达到最大值。对不同激发强度光下的荧光猝灭曲线进行归一化处理,各曲线吻合度良好。进一步对激发光强度为  $2044, 2360, 2690 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-2}$  时的归一化猝灭曲线与强度为  $1714 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-2}$  时的归一化猝灭曲线分别进行余弦相似度计算,结果表明,三种强度下的余弦相似度均大于  $95\%$ ,说明各激发光强度作用下归一化荧光猝灭曲线有较好的一致性,利用(5)式计算的荧光寿命保持不变。

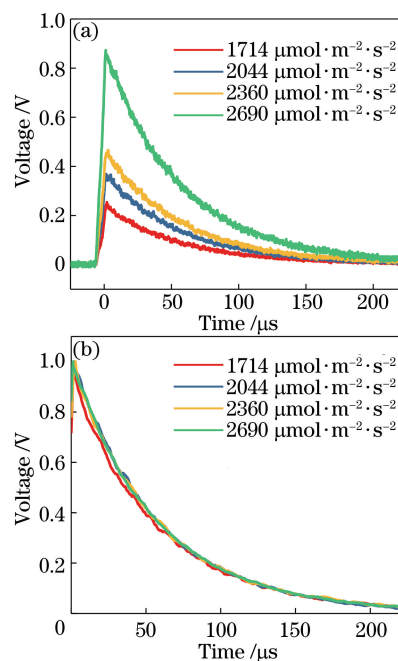


图 2 不同激发光强下的荧光信号。(a)荧光信号原始测量曲线；(b)归一化荧光猝灭曲线

Fig. 2 Fluorescent signals under different excitation light intensities. (a) Original fluorescence measurement curve; (b) normalized fluorescence quenching curve

#### 4.1.2 激励持续时间

固定光源激发光强度为  $1714 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-2}$ ,通过改变 LED 激励信号脉宽,控制激发光激励持续时间分别为  $5, 10, 15, 20 \mu\text{s}$ 。在溶解氧质量浓度为  $0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时,测量得到不同激励持续时间下荧光信号原始测量曲线,如图 3(a)所示,图 3(b)为停止激发后( $t > 0$ )荧光猝灭曲线的归一化结果。

从图 3 可以看出,溶解氧质量浓度一定时,荧光信号随激励持续时间增加而增加,在停止激发时刻( $t=0$ ),荧光强度均达到最大值。对不同激励持续时间下荧光猝灭曲线进行归一化处理,各曲线吻合程度良好。进一步对激励持续时间为  $10, 15, 20 \mu\text{s}$  的归一化猝灭曲线与持续时间为  $5 \mu\text{s}$  的归一化猝灭曲线分别进行余弦相似度计算,结果表明,三种激

励持续时间下的余弦相似度均大于 95%，说明各种激励持续时间作用下归一化荧光猝灭曲线有较好的一致性。

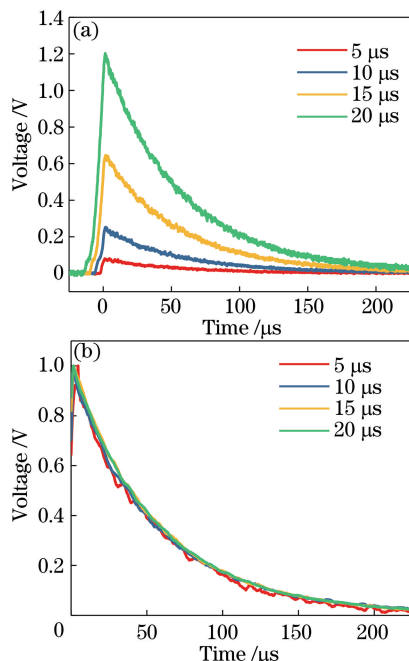


图 3 不同激励持续时间下荧光信号。(a) 荧光强度信号原始测量曲线；(b) 荧光猝灭曲线归一化结果  
Fig. 3 Fluorescent signals at different excitation durations. (a) Original fluorescence measurement curve; (b) normalized fluorescence quenching curve

上述分析结果表明，在溶解氧质量浓度一定的条件下，改变激发光强度与激励持续时间，荧光信号归一化猝灭曲线仍然有较好的一致性，利用(5)式计算荧光寿命不受激发光强度和激励持续时间的影响。

选取激发条件为激发光强度为  $1714 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-2}$ ，激励时间为  $5 \mu\text{s}$ ，控制溶解氧发生器产生不同溶解氧浓度的水溶液环境，测量不同浓度下荧光猝灭曲线归一化结果如图 4 所示。可以看出，随着溶解氧质量浓度的增加，归一化荧光猝灭曲线衰减迅速，荧光寿命随溶解氧质量浓度的增加而减小。溶解氧质量浓度从  $0.03 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  上升到  $20.50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时，归一化荧光猝灭曲线下落到  $e^{-1}$  所需的时间约从  $56.3 \mu\text{s}$  下降到  $11.9 \mu\text{s}$ ，这为利用(5)式计算荧光寿命时对  $t_1$ 、 $t_2$  取值提供了参考。

#### 4.2 溶解氧浓度反演方法

在溶解氧质量浓度不同的条件下，停止脉冲光激励后，测量  $t_1 = 15 \mu\text{s}$ 、 $t_2 = 35 \mu\text{s}$  时去掉噪声后的荧光强度信号，利用(5)式计算得到荧光寿命，溶解氧质量

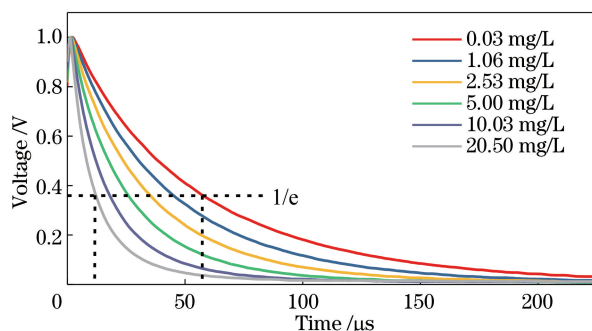


图 4 不同质量浓度下荧光猝灭曲线归一化结果  
Fig. 4 Normalized fluorescence quenching curves at different mass concentrations

浓度  $\rho(\text{O}_2)$  与实测荧光寿命  $\tau$  的关系如图 5 所示。可以看出，随着溶解氧浓度在  $0 \sim 20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  范围内逐渐增加，实测荧光寿命逐渐减小。对溶解氧质量浓度与实测荧光寿命曲线进行 Stern-Volmer 方程拟合，结果如图 6(a)所示，相关系数  $R^2$  为 0.9463。

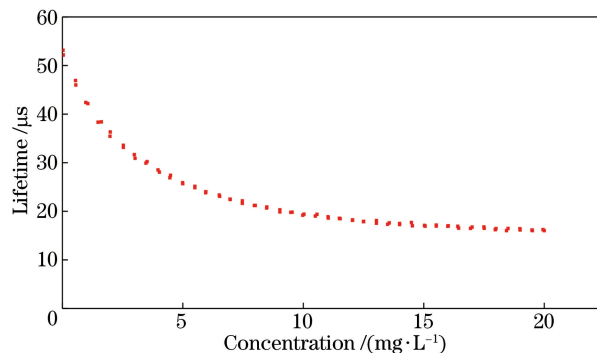


图 5 荧光寿命与溶解氧质量浓度的关系  
Fig. 5 Relationship between fluorescence lifetime and dissolved oxygen mass concentration

对不同质量浓度下归一化荧光猝灭曲线进行分析可知，零时刻附近猝灭曲线均有一小段上升，这说明停止激发光激励后，荧光强度先短暂增加到最大值，接着再降低为零，产生这种结果的原因可能与实验系统对荧光信号的检测延迟有关，因此通过(5)式得到的实测荧光寿命  $\tau$  是理论荧光寿命  $\tau'$  与检测系统延迟  $\tau_0$  共同作用的结果，即  $\tau = \tau' + \tau_0$ 。这样，通过实测荧光寿命反演得到溶解氧浓度时，应将检测系统影响因素考虑在内。对实测荧光寿命进行系统延迟补偿，溶解氧浓度与实测荧光寿命的关系为

$$\rho(\text{O}_2) = \frac{1}{K_{sv}} \left( \frac{\tau_0}{\tau - \tau_0} - 1 \right). \quad (6)$$

对图 5 中溶解氧质量浓度与实测荧光寿命进行如(6)式的曲线拟合，拟合结果如图 6(b)所示，此时拟合相关系数  $R^2$  提高到 0.9985，说明寿命修正拟

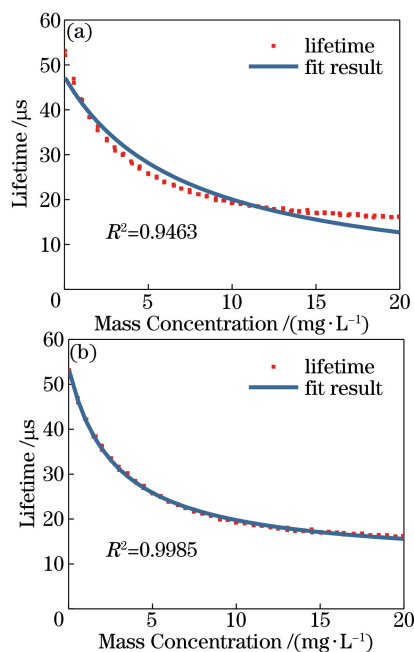


图6 荧光寿命与溶解氧浓度的拟合结果。(a) Stern-Volmer 方程直接拟合; (b)寿命修正拟合  
Fig. 6 Fitting results of fluorescence lifetime with dissolved oxygen mass concentration. (a) Stern-Volmer equation direct fit; (b) lifetime correction fit

合可显著提高溶解氧浓度反演效果,此时(6)式的相关参数为  $\tau_- = 10.3801 \mu\text{s}$ 、 $\tau_0 = 44.7430 \mu\text{s}$ 、 $K_{sv} = 0.3635 \mu\text{s}$ 。

### 4.3 对比分析实验

利用图1所示的实验测量系统和美国哈希公司的HQ30d溶解氧分析仪同步检测水体溶解氧浓度,质量浓度在 $0 \sim 20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内时,实验测量系统与HQ30d分析仪对比测试结果如图7所示。

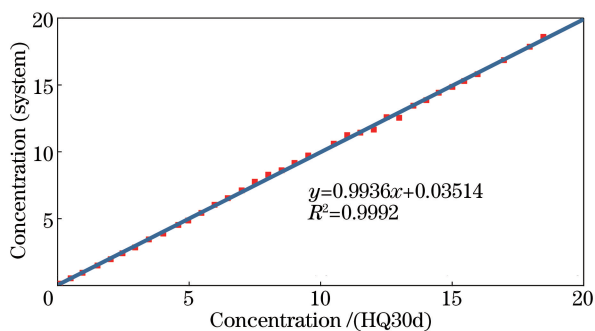


图7 实验测量系统与HQ30d分析仪对比测试结果  
Fig. 7 Comparison test results between experimental measurement system and HQ30d analyzer

从图7可以看出,在 $0 \sim 20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内,实验系统测得溶解氧质量浓度与HQ30d测量结果具有较好的一致性,线性相关系数  $R^2$  为 0.9992,最大误差不超过  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

## 5 结 论

提出了一种在脉冲光激发下,通过时域上两点荧光信号强度之比直接计算荧光寿命,并由 Stern-Volmer 方程反演得到溶解氧浓度的方法。实验结果表明,在激发光强度和激励持续时间变化时,归一化荧光猝灭曲线有很好的 consistency,不同激发条件下的归一化荧光猝灭曲线之间的余弦相似度大于 95%。实测荧光寿命与溶解氧浓度的曲线拟合结果表明,直接由 Stern-Volmer 方程拟合的相关系数  $R^2$  为 0.9463,实测荧光寿命经过延迟修正后拟合的相关系数  $R^2$  提高到 0.9985。溶解氧质量浓度在  $0 \sim 20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  范围内,实验测量系统与 HQ30d 分析仪检测结果有较好的一致性,线性相关系数  $R^2$  为 0.9992,最大测量误差不超过  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。该研究结果为水体溶解氧的现场快速监测提供了一种有效手段。

## 参 考 文 献

- [1] Wang J, Zhang F, Wang X P, *et al.* Three-dimensional fluorescence characteristics by parallel factor method coupled with self-organizing map and its relationship with water quality [J]. *Acta Optica Sinica*, 2017, 37(7): 0730003.  
王娟, 张飞, 王小平, 等. 平行因子法结合自组织映射神经网络的三维荧光特征及其与水质的关系 [J]. *光学学报*, 2017, 37(7): 0730003.
- [2] Zhang Y Y, Zhang J, Wu Y, *et al.* Characteristics of dissolved oxygen and its affecting factors in the Yangtze Estuary [J]. *Environmental Science*, 2007, 28(8): 1649-1654.  
张莹莹, 张经, 吴莹, 等. 长江口溶解氧的分布特征及影响因素研究 [J]. *环境科学*, 2007, 28(8): 1649-1654.
- [3] Hitchman M L. *Measurement of dissolved oxygen* [M]. Geneva: Orbisphere Lab., 1978: 255.
- [4] *Standard Test Methods for Dissolved Oxygen in Water: Designation: D 888-92* [S]. Pennsylvania: ASTM, 1996.
- [5] Wang X D, Wolfbeis O S. Optical methods for sensing and imaging oxygen: materials, spectroscopies and applications [J]. *Chemical Society Reviews*, 2014, 43(10): 3666-3761.
- [6] Wolfbeis O S. Luminescent sensing and imaging of oxygen: fierce competition to the Clark electrode [J]. *Bioessays*, 2015, 37(8): 921-928.
- [7] Pensieri S, Bozzano R, Schiano M E, *et al.* Methods and best practice to intercompare dissolved oxygen

- sensors and fluorometers/turbidimeters for oceanographic applications [J]. *Sensors*, 2016, 16(5): 702.
- [8] Feng W W, Zhou N, Chen L X, *et al.* An optical sensor for monitoring of dissolved oxygen based on phase detection[J]. *Journal of Optics*, 2013, 15(5): 055502.
- [9] Liu C, Zhou Y, Wang X W, *et al.* Fluorescence lifetime imaging microscopy and its research progress [J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2011, 48(11): 111102.  
刘超, 周燕, 王新伟, 等. 荧光寿命成像技术及其研究进展[J]. *激光与光电子学进展*, 2011, 48(11): 111102.
- [10] McDonagh C, Kollé C, McEvoy A K, *et al.* Phase fluorometric dissolved oxygen sensor[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2001, 74(1/2/3): 124-130.
- [11] Zhang T. Design of a *in-situ* dissolved oxygen detector using fluorescence quenching[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2013.  
张涛. 海洋原位溶解氧检测仪设计与开发[D]. 杭州: 浙江大学, 2013.
- [12] Danielson S J D, Baltz N T. Phase shift measurement for luminescent light: US20070029505[P]. 2007-08-01.
- [13] Xu J G, Wang Z B. Fluorescence analysis[M]. 3<sup>rd</sup> ed. Beijing: Science Press, 2006: 64-86.  
许金钩, 王尊本. 荧光分析法[M]. 3 版. 北京: 科学出版社, 2006: 64-86.
- [14] Li D X, Xu X, Li N, *et al.* Time-resolved fluorescence technique and fluorescence lifetime measurement[J]. *University Chemistry*, 2008, 23(4): 1-11.  
李东旭, 许潇, 李娜, 等. 时间分辨荧光技术与荧光寿命测量[J]. *大学化学*, 2008, 23(4): 1-11.