

文章编号 1004-924X(2017)03-0591-06

发光染料罗丹明 B 的荧光传感特性

张巍巍*, 史凯兴, 赵小兵, 秦朝菲

(南昌航空大学 江西省光电检测技术工程实验室, 江西 南昌 330063)

摘要: 本文对有机染料罗丹明 B(RhB)的荧光光谱受温度、应力以及 pH 值等物理或化学量的影响进行了研究。实验采用波长为 405 nm 的激光激发 RhB/H610 胶黏剂复合材料或 RhB 水溶液, 得到其荧光发射谱, 用谱峰频移及新型表征方法“谱带重心频移法”分析了环境参数对谱带位置的影响, 并通过线性拟合得到了 RhB 荧光谱带重心 λ_B 传感温度、压应力以及 pH 值的传感方程。结果表明, 谱带重心频移法有效抑制了光强涨落的白噪声, 能够显著提高传感的精度和稳定性。在测量范围中间值附近, 重心法对温度、压应力以及 pH 值传感的相对灵敏度分别为 0.026%/°C, 0.09%/MPa 和 0.34%。由于 RhB 具有很高的发光效率和优异的生物相容性, 因此基于 RhB 荧光的传感方法在生物体系的检测表征方面具有较高的应用价值。

关键词: 荧光传感; 罗丹明 B; 频移; 温度; 应力; pH 值

中图分类号: O657.31 **文献标识码:** A **doi:** 10.3788/OPE.20172503.0591

Multi-functional fluorescent sensing properties of rhodamine B

ZHANG Wei-wei*, SHI Kai-xing, ZHAO Xiao-bing, QIN Chao-fei

(*Jiangxi Engineering Laboratory for Optoelectronics Testing Technology,
Nanchang Hangkong University, Nanchang 330063, China*)

* *Corresponding author, E-mail: zdw@ustc.edu*

Abstract: The influence of physical or chemical factors such as temperature, stress and pH value on the fluorescence spectrum of organic dye rhodamine B (RhB) was researched experimentally. An RhB/H610-resin composite and aqueous solutions of RhB were excited under a diode laser with a wavelength of 405 nm. Then, the fluorescence spectra were obtained. The peak shift and the newly proposed barycenter shift of the emission band were employed to characterize the effect of the environmental factors on the band location. The sensing functions of waveband barycenter λ_B with temperature, stress and pH value were respectively fitted linearly. The result shows that the barycenter method can effectively eliminate the random noise which mainly originated from the fluctuation of fluorescence intensity and light detector. Hence a finer precision was achieved in comparison with the peak shift method. The relative sensitivities of the barycentric method to the temperature, compressive stress and pH value are 0.026%/°C, 0.09%/MPa and 0.34% respectively. Taking the advantages of the high fluorescence efficiency and biological histocompatibility of RhB, the fluorescent sensing with RhB is a promising candidate for characterization of biological samples.

收稿日期: 2016-10-26; **修订日期:** 2016-12-13.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No. 61167007, No. 61665008); 航空科学基金项目(No. 2016ZD56006); 江西省青年科学家培养计划基金资助项目(No. 20153BCB23037)

Particularly, it is suitable for applications in the real-time monitoring of microwave treatment.

Key words: fluorescent sensing; rhodamine B; band shift; temperature; stress; pH value

1 引言

荧光光谱分析方法与吸收光谱、散射光谱等相比,能级选择性好、灵敏度高,相应地对荧光物质的环境变化也较敏感,因此在传感温度、应力、化学气氛等方面有较广泛的应用。例如,对于某些有机荧光材料,环境改变其荧光基团的物理、化学性质,其荧光信号的变化反映了环境参数的变化^[1]。这种荧光传感方法免疫电磁干扰、响应快速实时,适于非接触测量^[2-3],具有良好的应用前景和产业化价值。

罗丹明类染料是典型的有机发光材料,具有摩尔吸光系数高、光稳定性好、波长范围宽以及量子产率高等优点,是分析化学和生物医学等领域中常用的有机染料,广泛应用在分子生物学、细胞生物学、荧光标记、荧光探针等方面^[4]。作为一种常见的罗丹明类染料,罗丹明 B(RhB)衍生物材料廉价易得、毒性小,其荧光在可见光波段,便于探测,已知该材料对 pH^[5-6]、温度^[7-8]等物理或化学量变化非常敏感,但它受应力影响的光谱特性则未见相关报道。

本文针对未作任何改性处理的 RhB,研究了 RhB/胶粘剂复合材料或 RhB 水溶液的荧光光谱受温度、应力以及 pH 值等物理或化学量的影响。实验中测量不同形态样品的荧光发射谱,用谱峰频移以及所提出的“谱带重心频移法”^[9](以下简称重心法)分别分析各环境参数对谱带位置的影响,总结得到了荧光传感温度、压应力以及 pH 值的传感方程。实验结果表明,重心法能有效地消除光强信号涨落的白噪声,显著提高传感精度和稳定性^[10]。

2 敏感材料及传感系统

2.1 敏感材料的处理与制备

对应于不同的物理量或化学量,将 RhB 作为基础敏感材料直接使用或与 H610 胶黏剂混合固化为复合材料后构成不同的材料形态 A、B、C,如图 1 所示,分别用于温度、应力、pH 值的传感检

测。在测温实验中,取 0.05 g 的 RhB 粉末溶于 50 mL 乙醇,将所配醇溶液与 H610 胶黏剂按 5:1(V/V)配比均匀混合后涂覆在加热板上,在室温空气中静置 12 h 以上,待 H610 彻底固化,得到 RhB/H610 复合材料最终形态 A。在应力传感实验中,将相同成分比例的 RhB/H610 复合材料裁剪成片状(3 mm×3 mm×1 mm,材料形态 B)。在 pH 值传感实验中,则把 50 mg 的 RhB 粉末溶于 500 mL 蒸馏水,渐次向溶液中加入甘氨酸连续改变其 pH 值,用磁力搅拌器搅拌均匀并在恒温加热台上保持溶液温度稳定,即为溶液形态 C。

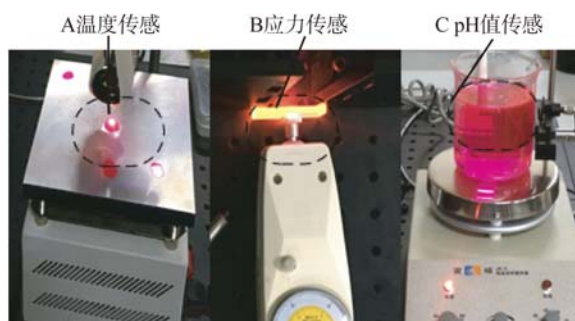


图 1 敏感材料的 3 种形态

Fig. 1 Active materials for fluorescent temperature sensing (A), compressive stress sensing (B), and pH sensing (C)

2.2 传感系统

2.2.1 温度传感

以中心波长为 405 nm 的半导体激光器激发敏感材料 A,探头发射的荧光经滤光片过滤掉散射及反射的激发光成份后,耦合进入光纤光谱仪(型号: AvaSpec-2048TEC-USB2)。在一块加热板上获得 25~65 °C 的温度变化,用一个精度为 0.1 °C 的 K 型热电偶温度计比对标定荧光温度敏感材料。

2.2.2 应力传感

以中心波长为 405 nm 的半导体激光器激发复合材料 B,保持原位测量荧光光谱,敏感材料夹持在推力计和 BK7 玻璃片之间。探头发射的荧光经滤光片过滤掉散射及反射的激发光成份后,耦合进入光纤光谱仪。在恒定温度(室温)下,渐

次增大样品的压应力,记录材料B随压应力变化的光谱。

2.2.3 pH 传感

溶液恒定在 25 °C,用中心波长为 405 nm 的半导体激光照射材料 C,溶液的荧光经滤光片过滤掉散射的激发光成份后,耦合进入光纤光谱仪。pH 值为 5.9~6.6,间隔 0.1 测试荧光光谱,用精度为 0.05 的 pH 计进行比对标定。

3 结果与分析

3.1 温度传感

如图 2 插图所示,随着温度的升高,复合材料的发射谱积分面积(即荧光强度)总体表现为先升高再下降,因此不能用单一的温度猝灭荧光现象来描述及解释。该现象的起因是有机物复合材料较显著的热膨胀效应,该效应导致 RhB 的分散程度随温度的升高而持续增大,RhB 分子间的能量传递相应地被弱化,客观上降低了能量传递过程中与猝灭中心发生作用的几率。当温度升高到一定程度,分子碰撞剧烈,温度猝灭效应的影响占据主流,荧光光强随之下降。

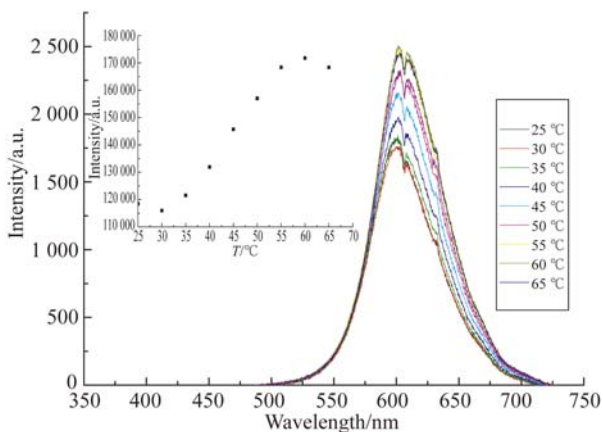


图 2 敏感材料 A 在不同温度下的发射光谱

Fig. 2 Temperature-dependent emission spectra of sample A

荧光强度直接用于温度传感的现有方案是稳态荧光强度法。该方法通过检测荧光发射强度相对于标准温度下参考光强的变化来反映温度变化^[7],其测量结果易受光源功率波动和光路稳定性的影响,精度不高。在本实验中,因为光强随温度的变化本身不是一个单调函数,所以 RhB/H610 复合材料不适于这种荧光强度式的温度传感。

从光谱图上计算的光强并不是荧光材料的固有特征,因为它一般是正比于激发光强度的。荧光材料的本征特征用于传感时具有更好的稳定性和重复性。荧光谱峰的(波长)位置是荧光材料的本征特性,它随温度的变化而频移。表征荧光谱峰的位置一般用峰值波长,即光谱上最大光强对应的波长位置。但相较于检测谱峰波长,谱带重心作为一种新的光谱定位特征,能更加精确地描述谱带的位置^[9-10]。这是因为宽带谱的峰值波长读取精度受限于光谱仪的分辨率和荧光谱的信噪比,而重心法的数据处理过程中包含有谱带面积计算过程,这种累加计算起到了类似于取样平均法降噪的效果,能有效地降低白噪声的影响、提高信噪比。重心定义为谱带面积的均分波长。特别地,当谱型对称时,谱峰波长两侧的半峰面积相等,此时谱带重心和谱带峰值波长重合。

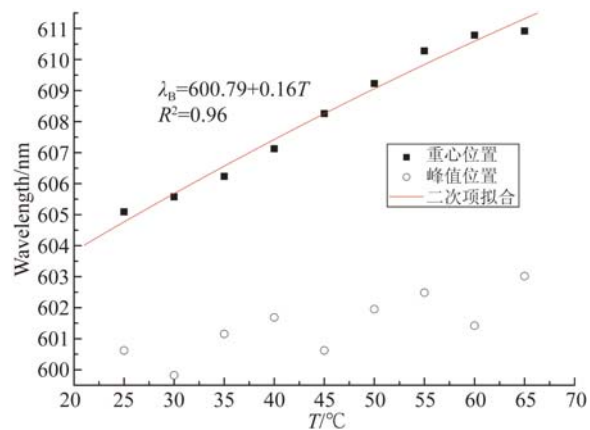


图 3 温度对发射谱带的重心及峰值位置的影响

Fig. 3 Effect of temperature on band center and peak of emission spectra of RhB/H610 fluorescence

图 3 展示了敏感材料荧光发射谱带的重心波长 λ_B 及峰值波长位置 λ_p 随温度 T 变化而移动的规律,分别拟合得出各自的温度传感方程为: $\lambda_B = 600.79 + 0.16T$, $\lambda_p = 598.6 + 0.06T$ 。很明显,重心法的数据点分布平滑、规律,而峰位法的数据较为离散。以 25 °C 的谱带重心及谱峰波长作参考,重心法与谱峰波长移动法的相对灵敏度分别为 0.026%/°C 和 0.01%/°C,差别不大。重心法的显著优势是拟合相对误差(6.7%)比谱峰波长传感灵敏度的相对误差(27.5%)小得多。重心法得到的温度传感方程的置信系数达 0.96,表明线性拟合的结果是正确的。

3.2 压应力传感

样品 B 的原位发射光谱如图 4 所示。当加载外力时,样品厚度减小,单位承压面积的样品含有的荧光分子数量减少、分子平均距离也减小,导致荧光强度下降。如前所述,荧光强度的变化不属于敏感材料的本征特性,因此图中对荧光发射谱进行了强度归一化处理,以便于观察谱峰移动、展宽等谱型参数变化。

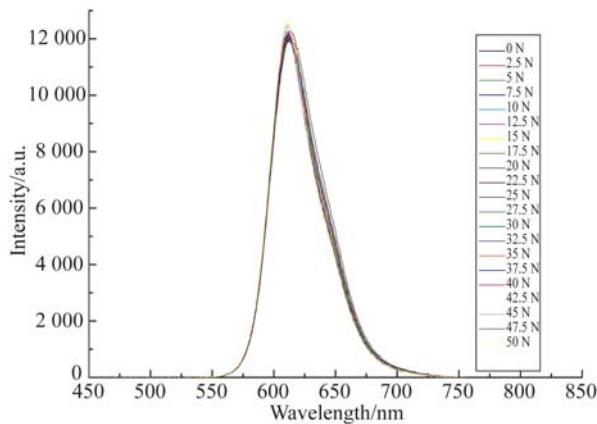


图 4 不同压应力下敏感材料 B 的发射光谱
(样品面积为 9 mm^2)

Fig. 4 Stress-dependent emission spectra of sample B with area of 9 mm^2

图 5 展示了敏感材料荧光发射谱带的位置(重心位置及谱峰波长位置)随压应力的移动。这种力敏频移通常被称为荧光压谱效应^[11-14]。谱带重心 λ_B 与压应力 σ 呈现单调的二次函数关系: $\lambda_B = 620.89 - 1.08\sigma + 0.1\sigma^2$ 。当正压力为 2.5 MPa 时,其灵敏度约为 0.58 nm/MPa,相对灵敏度为 0.09%/MPa。

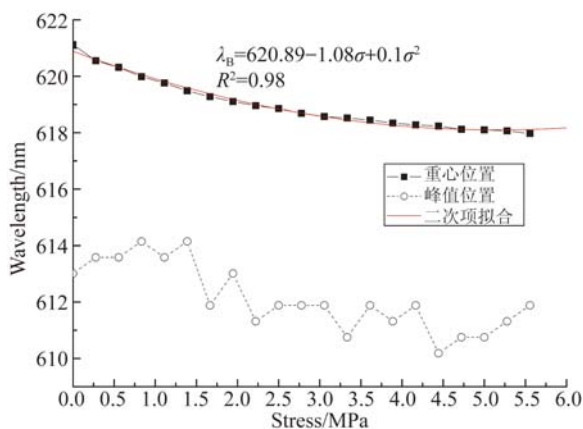


图 5 压应力对发射谱带的重心及峰值位置的影响
Fig. 5 Effect of stress on band center and peak of emission spectra of RhB/H610 fluorescence

由图 5 的重心传感曲线还可以看出,样品处于自由不受力状态的数据点与拟合曲线有一定偏离,这应为复合材料样品在制备过程中胶黏剂固化收缩产生的残余应力的影响。重心法传感与峰位法传感表现的差异与温度传感中相似,峰位变化数据点较离散,难以判定其规律。如果遵循其大致趋势采用线性拟合,拟合直线斜率的相对不确定度高达 16.4%、拟合置信系数仅为 0.8,由此表明这种传感方式的精度较低。谱带重心波长位置代替峰值位置用于传感,提高了传感精度和分辨力,不足 0.05 MPa 的微小应变变化也能被观测到。而荧光压谱技术中常用的标准物质红宝石的压谱系数仅为 $5.5 \text{ cm}^{-1}/\text{GPa}$ ^[11-12,15],本实验方案得到的传感灵敏度与之相比提高了近 3 个数量级。

3.3 pH 值传感

温度、应力等物理量能改变 RhB 分子的环境,从而影响其荧光峰的波长位置。除此之外,化学环境的变化也有类似效果。RhB 的荧光受环境介质的极性影响,在 RhB 水溶液中,pH 值影响 RhB 的荧光强度、峰位等发光性质。图 6 为激发光功率保持稳定时 RhB/甘氨酸水溶液的发射光谱。在实验条件稳定的情况下,荧光强度的变化可以反映 pH 值的变化,如图 6 插图所示,由此可以测量甘氨酸的浓度变化。这种传感方法在生物分析化学、细胞生物学(量度细胞内 pH 值)等方面具有潜在应用前景。不过这种以强度为基础的传感方式受光强涨落、环境变化等干扰较大,一般不适用于高精度传感。当测试稳定性要求较高时,仍然需要检测敏感材料荧光的本征参数,如峰位、线宽等。

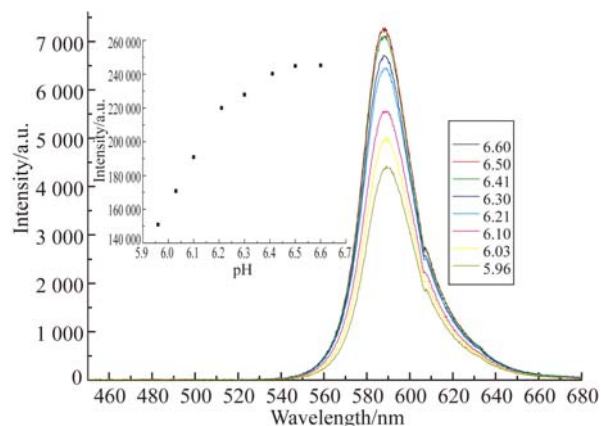


图 6 敏感材料 C 在不同 pH 值下的发射光谱
Fig. 6 pH-dependent emission spectra of sample C

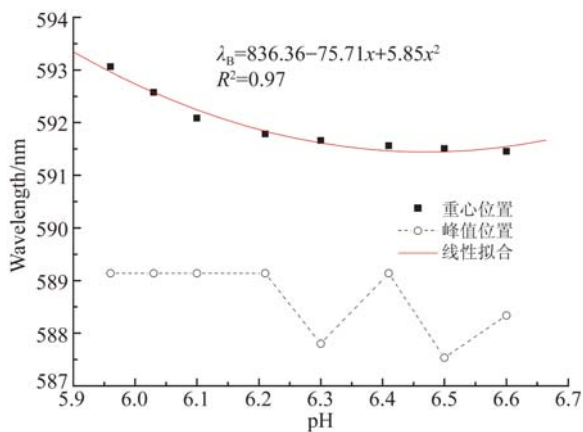


图7 pH值对发射谱带的重心及峰值位置(虚线)的影响
Fig.7 Effect of pH value on band center and peak of emission spectra of RhB fluorescence

图7中拟合给出了实验pH值范围内RhB荧光谱带重心传感pH值的经验传感方程。pH值为6.3时,重心法传感的相对灵敏度为0.34%。而峰位法几乎不能有效地观察到荧光峰值波长位置的变化,这与经验是吻合的,弱酸性环境中pH值的微小变化并不显著改变谱型。由此

参考文献:

- [1] 王忠东, 闫铁, 王宝辉. 适于土壤中农药检测的荧光光纤系统[J]. 光学精密工程, 2008, 16(7): 1208-1212.
WANG ZH D, YAN T, WANG B H. Fiber-optic fluorescence measuring suitable for pesticides in soil [J]. *Opt. Precision Eng.*, 2008, 16(7): 1208-1212. (in Chinese)
- [2] 赵恩铭, 雒莘梓, 苑立波, 等. 光纤O₂敏感探头的制备与性能测试[J]. 光学精密工程, 2012, 20(11): 2411-2415.
ZHAO E M, LUO SH Z, YUAN L B, *et al.*. Preparation and performance testing of fiber-optic O₂ sensitive probe [J]. *Opt. Precision Eng.*, 2012, 20(11): 2411-2415. (in Chinese)
- [3] 赵恩铭, 李恩涛, 滕平平, 等. 基于表面开孔光纤的集成式亚硝酸盐微流荧光传感器[J]. 光学精密工程, 2015, 23(8): 2158-2163.
ZHAO E M, LI E T, TENG P P, *et al.*. Integrated microfluidic nitrite fluorescence optical fiber sensor based on optical with microholes on surface [J]. *Opt. Precision Eng.*, 2015, 23(8): 2158-2163. (in Chinese)

再次验证了与峰位法传感相比,谱带重心法用于表征谱带位置能极大改善传感精度、提高分辨力。

4 结论

本文以RhB为基础敏感材料,直接使用或与H610贴片胶形成复合材料使用,分别用于温度、应力以及pH值的传感,其荧光谱带的重心均表现出规律性的频移,而峰值波长位置的频移规律并不明显。实验结果表明,重心法基于RhB荧光的25~65℃温度传感的经验方程为 $\lambda_B = 600.79 + 0.16T$; 0~5.5 MPa压应力传感的经验方程为 $\lambda_B = 620.89 - 1.08\sigma + 0.1\sigma^2$; 5.9~6.6 pH传感的经验方程为: $\lambda_B = 836.36 - 75.71x + 5.85x^2$ 。基于谱带重心频移法的荧光材料传感系统具有精度优、灵活性高、免疫电磁干扰、本征安全等特点,能够以非接触方式进行温度、pH值或微小应力的测量,能较好地满足不同的生理、自然环境温区的测试需求,适用于油气罐/管等易燃易爆品安全监测、微波设备监控及环境水质检验等领域。

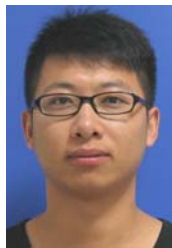
- [4] 翟晓宇, 潘靓靓, 丁玉凤, 等. 非晶CS/RB纳米薄膜的荧光性质[J]. 发光学报, 2016, 37(11): 1353-1359.
ZHAI X Y, PAN L L, DING Y F, *et al.*. Fluorescence property of non-crystal CS/RB nano-films [J]. *Chinese Journal of Luminescence*, 2016, 37(11): 1353-1359. (in Chinese)
- [5] SHI X L, MAO G J, ZHANG X B, *et al.*. Rhodamine-based fluorescent probe for direct bio-imaging of lysosomal pH changes [J]. *Talanta*, 2014, 130: 356-362.
- [6] LIU L J, GUO P, CHAI L, *et al.*. Fluorescent and colorimetric detection of pH by a rhodamine-based probe [J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2014, 194: 498-502.
- [7] CHAUHAN V M, HOPPER R H, ALI S Z, *et al.*. Thermo-optical characterization of fluorescent rhodamine B based temperature-sensitive nanosensors using a CMOS MEMS micro-hotplate [J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2014, 192: 126-133.
- [8] AL-KADHEMY M F, ALSHARUEE I F, AL-ZUKY A A D. Analysis of the effect of the concentration of rhodamine B in ethanol on the fluorescence spectrum u-

- sing the “Gauss Mod” function [J]. *Journal of Physical Science*, 2011, 22(2): 77-86.
- [9] 张巍巍, 王国耀, 高益庆, 等. 一种宽带荧光光谱测温方法: 中国, 201510570556.9[P]. 2015-09-10. ZHANG W W, WANG G Y, GAO Y Q, *et al.*. Temperature measurement method of broadband fluorescence spectra: China, 201510570556.9 [P]. 2015-09-10. (in Chinese)
- [10] 张巍巍, 王国耀, 张志敏, 等. (Ba, Sr)₂SiO₄: Eu²⁺ 荧光的多功能温度传感特性[J]. 激光与光电子学进展, 2016, 53(5): 053001. ZHANG W W, WANG G Y, ZHANG ZH M, *et al.*. Multi-functional temperature sensing with the fluorescence of (Ba, Sr)₂SiO₄: Eu²⁺ [J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2016, 53(5): 053001. (in Chinese)
- [11] MA Q, CLARKE D R. Stress measurement in single-crystal and polycrystalline ceramics using their optical fluorescence [J]. *Journal of the American Ceramic Society*, 1993, 76 (6): 1433-1440.
- [12] LIPKIN D M, CLARKE D R. Measurement of the stress in oxide scales formed by oxidation of alumina-forming alloys [J]. *Oxidation of Metals*, 1996, 45(3-4): 267-280.
- [13] BOUVET G, DOUMINGE L, FEAUGAS X, *et al.*. Fluorescence spectroscopy applied to study cyclic creep behaviour and internal stresses of semi-crystalline high-density polyethylene [J]. *Journal of Applied Physics*, 2013, 113(2): 024901.
- [14] ZHANG W, LI Z, BAXTER G W, *et al.*. Stress- and temperature-dependent wideband fluorescence of a phosphor composite for sensing applications [J]. *Experimental Mechanics*, 2017, 57 (1): 57-63.
- [15] 岳俊昕, 张巍巍. 荧光方法测量应力[J]. 失效分析与预防, 2012, 7(1): 63-68. YUE J X, ZHANG W W. Stress measurement by fluorescent analysis [J]. *Failure Analysis and Prevention*, 2012, 7(1): 63-68. (in Chinese)

作者简介:



张巍巍(1974—),男,湖北黄梅人,副教授,研究生导师,1996年、2001年于中国科学技术大学分别获得学士、博士学位,主要研究方向为荧光传感技术及光纤传感技术,并涉猎压电式传感器件产品、半导体传感器件产品的开发。E-mail: zdw@ustc.edu



史凯兴(1990—),男,山东济宁人,硕士研究生,2013年于青岛滨海学院获得学士学位,主要研究方向为多功能传感器的研发与应用。E-mail: 553558501@qq.com