

PtOEP 分子瞬态吸收光谱及其高特异性光声泵浦分子 成像应用研究*

黄幸¹⁾ 刘闰香¹⁾ 张占军¹⁾ 王波^{1)†}

1) (中南大学湘雅基础医学院生物医学工程系, 长沙 410083)

摘 要

光声成像兼具光学成像的高分子对比度和超声成像的高深穿透优势, 但其在复杂生物组织中易受血红蛋白等内源性吸收体的强背景干扰。为此, 利用具有长寿命三重态的外源性探针, 通过泵浦探测的方法来去除血液背景的影响, 已成为光声成像的重要发展方向。本文建立了一套高灵敏的纳秒级瞬态吸收光谱检测方法, 引入了参考光同步双通道监测机制, 从而有效减少激光能量波动引起的测量误差, 在 420 到 900 nm 的宽谱波段内, 实现了光敏剂探针分子铂八乙基卟啉 (PtOEP) 三重态吸收光谱的精确表征。在此基础上, 本文测试了 PtOEP 在不同探测光波长下的光声泵浦成像效果, 证实了其在 770 nm 的三重态吸收峰值处具有最佳的图像信噪比。仿体成像结果表明, 经探测光波长优化后的光声泵浦成像系统可以有效去除血红蛋白和墨水等强背景信号干扰, 实现对 PtOEP 分子的高特异性去背景成像。另外, 通过改变泵浦-探测光延时, 拟合获得实验体系下 PtOEP 样品激发态寿命为 1.87 μ s, 拟合优度 R^2 达 0.9879。本研究构建的从探针材料光物理机制表征到宏观成像系统优化的完整策略, 有望推动光声泵浦成像在生物医学中的应用。

关键词: 瞬态吸收光谱; 光声泵浦成像; PtOEP; 去背景; 激发态寿命

基金: 国家重点研发项目 (批准号: 2024YFC3405302) 和国家自然科学基金重大项目 (批准号: 62527821) 资助的课题。

† 通信作者. E-mail: wangbo0302@csu.edu.cn

第一作者. E-mail: 246506027@csu.edu.cn

1 引言

光声成像 (Photoacoustic tomography, PAT) 是近年来兴起的一种最具潜力的生物医学成像技术。它通过探测生物组织吸收脉冲激光后产生的超声信号进行成像, 能够以约 1: 200 的高空间分辨率/穿透深度比, 获得厘米级组织深度内的光吸收能量分布^[1]。由于不同的生物分子光吸收特性不同, 因此光声成像继承了纯光学成像的高分子对比度^[2]; 且其采用超声作为探测手段, 因此克服了组织中强光散射的影响, 突破了高分辨率光学成像深度的“软极限”, 兼具了超声成像的高穿透深度优势^[3]。

然而, 由于光在生物体内主要被血红蛋白、黑色素等分子吸收, 常规的光声成像主要用于血管网络成像或血氧饱和度的监测, 或需采用高浓度的造影剂, 否则微弱的目标分子信号将淹没在血液等强背景信号中, 难以进行有效的信号分离检测^[4,5]。为实现高灵敏、高特异性的光声分子成像, 光声泵浦成像 (Pump-Probe Photoacoustic Tomography, P³AT) 技术应运而生^[6-8]。在光声泵浦成像中, 当光敏剂分子被泵浦光脉冲激发后, 会通过自旋轨道耦合的作用, 经过系间窜越进入三重态(T₁ 态)。由于光辐射跃迁自旋禁制的影响, 其通常会具有微秒级的长寿命, 造成其探测光吸收谱的显著变化^[9]。相对的, 血液等背景组织通常激发态寿命仅有皮秒、纳秒量级, 因此在探测光到达时仍会处于基态^[10]。这样, 通过有无泵浦光存在时探测光光声信号的差分, 就可以获得 T₁ 态分子特异性的三重态差分 (transient triplet differential, TTD) 信号, 从而消除背景组织的影响, 实现高特异性的光敏剂分子成像^[11,12]。另外光敏剂 T₁ 态的寿命对组织内氧分压非常敏感。当 T₁ 态光敏剂周围的氧分子增多时, 两者发生荧光共振能量转移 (Förster Resonance Energy Transfer, FRET) 产生单线态氧的几率会急速升高, 从而造成其 T₁ 态寿命的迅速衰减^[13]。因此, 光声泵浦成像可以通过探测 TTD 的衰减寿命, 实现不依赖于组织入射光强以及光敏剂探针浓度的组织定量氧分压成像^[14]。

目前, 光声泵浦成像仍处于初始发展阶段。其中一个长期被忽视的痛点是: 由于缺乏对光敏剂分子 T₁ 态吸收光谱的精准刻画, 成像系统的探测波长往往与光敏剂瞬态吸收峰存在“光谱失配”^[15]。这种失配导致光声转换效率低下, 限制了成像系统的灵敏度极限^[16]。为此, 本文建立了一套高灵敏度的纳秒级瞬态吸收光

谱（Transient Absorption Spectroscopy, TAS）系统，从而为光声泵浦成像中探测光的波长优化提供指导。本文采用铂（II）八乙基卟啉（Platinum octaethylporphyrin, PtOEP）作为光敏剂。该分子凭借其巨大的 π 共轭体系、极高的系间窜越（Intersystem Crossing, ISC）效率以及长达微秒量级的激发三重态寿命^[17,18]，成为构建氧分压敏感型传感器的理想核心，也是光声泵浦成像常用的光敏剂之一^[19]。本文利用自主构建的瞬态吸收光谱系统，精确绘制了 PtOEP 在 420-900 nm 的宽谱范围内的瞬态吸收特性，获得了其 T1 态的最强吸收峰位^[20]，并通过光声泵浦成像进行了验证。实验结果证明，经过波长优化后的光声泵浦成像系统，能更好地消除血红蛋白等背景的干扰，实现了近乎零背景（Background-free）的目标分子特异性成像和激发态寿命检测^[21,22]。本研究将为高性能光声泵浦传感器的设计和成像系统的优化提供科学的判据与技术路径，有力地推动光声泵浦成像技术的发展。

2 研究方法

2.1 试剂与材料

高纯度的 PtOEP（纯度>95%）由 Macklin（上海，中国）提供。光谱纯度的四氢呋喃（THF）和甲苯（Sinopharm Chemical Reagent Co., Ltd）提供作为 PtOEP 溶剂，浓度 $\geq 99.5\%$ 。琼脂粉和脂质体（20%）由 Aladdin（上海，中国）提供用于仿体模型制作。去离子水（ $18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ ）在整个实验过程中均被使用。

2.2 PtOEP 基态吸收和荧光光谱表征

研究通过紫外-可见分光光度计（N4S, INESA）在 1 厘米光程的石英比色皿中测得了稳态紫外-可见吸收光谱。在 532 nm 激光激发下，使用便携式光谱仪（USB2000+, OceanOptics）测量了荧光发射光谱。

2.3 光声泵浦成像方法和系统

光声泵浦成像通过探测有无泵浦光下，探测光所激发的光声信号的差分，来获得 TTD 信号，消除背景组织的干扰。其常用具有长 T1 态寿命的光敏剂作为探针分子。该类分子被泵浦到 T1 态后，可以被随后的探测光激发到 T2 态，随后通过快速的非辐射跃迁产生光声信号。光声泵浦成像中 TTD 信号计算公式如下：

$$S_{\text{TTD}, t} = S_{(\text{Pump}+\text{Probe}), t} - S_{\text{Pump}, t} - S_{\text{Probe}, t} \quad (1)$$

其中， $S_{\text{TTD}, t}$ 是通过差分去除背景后得到的 TTD 信号， $S_{(\text{Pump}+\text{Probe}), t}$ 是泵浦

和探测光同时激发时的光声信号， $S_{\text{Pump},t}$ 是仅泵浦光激发产生的泵浦光声信号， $S_{\text{Probe},t}$ 是仅探测光激发产生的探测光声信号， t 表示探测激光相对于泵浦激光的延迟时间^[23]。

另外，T1 态分子可与氧分子相互作用并发生动态淬灭(分子氧得到能量变成单线态氧，T1 态分子失去能量返回基态 S0)，使处于 T1 态分子的寿命缩短^[24]。因此光声泵浦成像可通过光敏剂 T1 态的衰减寿命计算得到组织氧分压。TTD 信号随着延时时间的衰减公式如下：

$$A(t) = A_0 e^{(-t/T)} \quad (2)$$

其中， $A(t)$ 代表延迟时间为 t 时的 TTD 信号， A_0 代表 TTD 信号衰减前的幅度，而 T 则是拟合得到的 T1 态寿命。在得到目标分子 T1 态寿命后可通过寿命与氧浓度的关系（Stern-Volmer 方程）得到生物组织中的氧分压分布^[25]。

由于 PtOEP 的基态吸收峰处于 532 nm 附近，因此本文中光声泵浦系统采用一个二倍频 Nd:YAG 激光器（镭宝光电/DAWA-200，532 nm）作为泵浦光源，一台可调谐光学参量振荡器(OPO)激光系统(SpitLight OPO 600, 532 nm pumped)作为探测光源，如图 1（a）所示。OPO 激光波长可在 680 至 900 nm 之间调谐，以验证光声信号的波长依赖性。两束光都被耦合到一个多模光纤束中，以确保对样品进行均匀照明。产生的光声信号由一个 128 通道的线阵超声换能器（中心频率：8 MHz，焦距：20 mm，ULSO）检测，由 128 通道的光声数据采集设备 MarsonicsDAQ 采集。两台激光器之间的泵浦-探测延迟时间由一台多通道脉冲延迟发生器（DG645，Stanford Research Systems，CA）控制。

2.4 纳秒瞬态吸收光谱仪（TAS）系统

纳秒级瞬态吸收光谱系统用于表征光敏剂分子的激发态动力学并确定最佳探测波长。如图 1（b）所示，泵浦和探测光分别通过透镜耦合进入一个二合一多模光纤束，其中泵浦光和探测光的端口的光通量面积约为 20: 1，以允许更高的泵浦光激发能量。二合一光纤束出光口的光经准直后照射在比色皿上。比色皿内的 PtOEP 样品溶液浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ ，其前后（PD1 和 PD2）分别放置了一个高速硅光电探测器（300-1100 nm，Hamamatsu），并由高速采集卡（LD8174-1G14，Mysoow）采集高时间分辨的光电信号。其中 PD1 负责记录进入样品前的激光器能量，用于入射能量校准，PD2 记录透射样品后的激光能量。

通过高速采集卡同时监测 PD1 和 PD2 采集的光脉冲波形,对于每一次激光脉冲 i , 到达样品前的光脉冲与 PD1 记录的光脉冲呈固定系数比;在对 PD2 进行三者信号(泵浦+探测、仅泵浦、仅探测)差分前,以 PD1 采集的参考光脉冲能量 E_i^{ref} 为基准,对 PD2 的光能量信号进行幅值归一化调整:

$$I_{on}(i) = I(i) \times \frac{E_i^{ref}}{E_i} \quad (3)$$

其中 $I(i)$ 为在有泵浦光激发的条件下 PD2 接收到的探测光信号, E_i^{ref} 和 E_i 分别是有无泵浦光激发的条件下 PD1 接收到的参考探测光信号。

为实现宽谱的 PtOEP 瞬态吸收谱测量,本文选用两台分别由 355 和 532 nm 泵浦的 OPO 可调谐脉冲激光器 (SpitLight 600, Innolas, Germany) 作为探测光源。其中,前者负责 420 至 680 nm 的瞬态吸收谱测量,后者负责 680 到 900 nm 的谱段。泵浦光源采用二倍频 Nd:YAG 激光器 (DAWA-200, 镭宝光电)。泵浦和探测激光脉冲之间的延迟设为 0.2 μ s, 由 DG645 多通道脉冲延迟发生器控制实现。

实验采用自动交错采集模式,在有泵浦光激发的条件下,测量单个波长 λ 下探测光的穿透强度 $I_{on}(\lambda)$;在无泵浦光激发的条件下,测量同一波长探测光的穿透强度 $I_{off}(\lambda)$ 。系统每隔 2 nm 进行一次瞬态吸收测量,对每个波长重复 100 次采集,平均耗时 5 s。在经过能量校正和平均后,材料瞬态吸收光谱通过计算吸光度变化得出:

$$A(\lambda) = \frac{I_{off}(\lambda) - I_{on}(\lambda)}{I_{off}(\lambda)} \quad (4)$$

2.5 光声泵浦成像实验设置

本文首先对 400 μ mol/L 的 PtOEP 甲苯溶液封装在直径 3 mm 塑料管中,测量了不同波长下的光声泵浦成像效果,从而对先前所得瞬态吸收谱结果进行比较验证。在进一步的仿体实验中,本文在仿体顶部平行嵌入了 3 支塑料管进行成像,其分别含有 1% 的高浓度油性黑墨水、12% 的牛血红蛋白溶液 (Hemoglobin, Hb, 浓度约 100 mg/mL)、400 μ mol/L PtOEP 溶液。仿体采用琼脂 (2% w/v)、脂肪乳 (Intralipid, 1% v/v) 与去离子水均匀混合加热凝固制作,以模拟生物组织的高光学散射特性。墨水和牛血红蛋白溶液代表纯稳态吸收背景,其中牛血红蛋白溶液与人体血液浓度相近,以验证光声泵浦对 PtOEP 分子的高特异性去背景成像效

果。

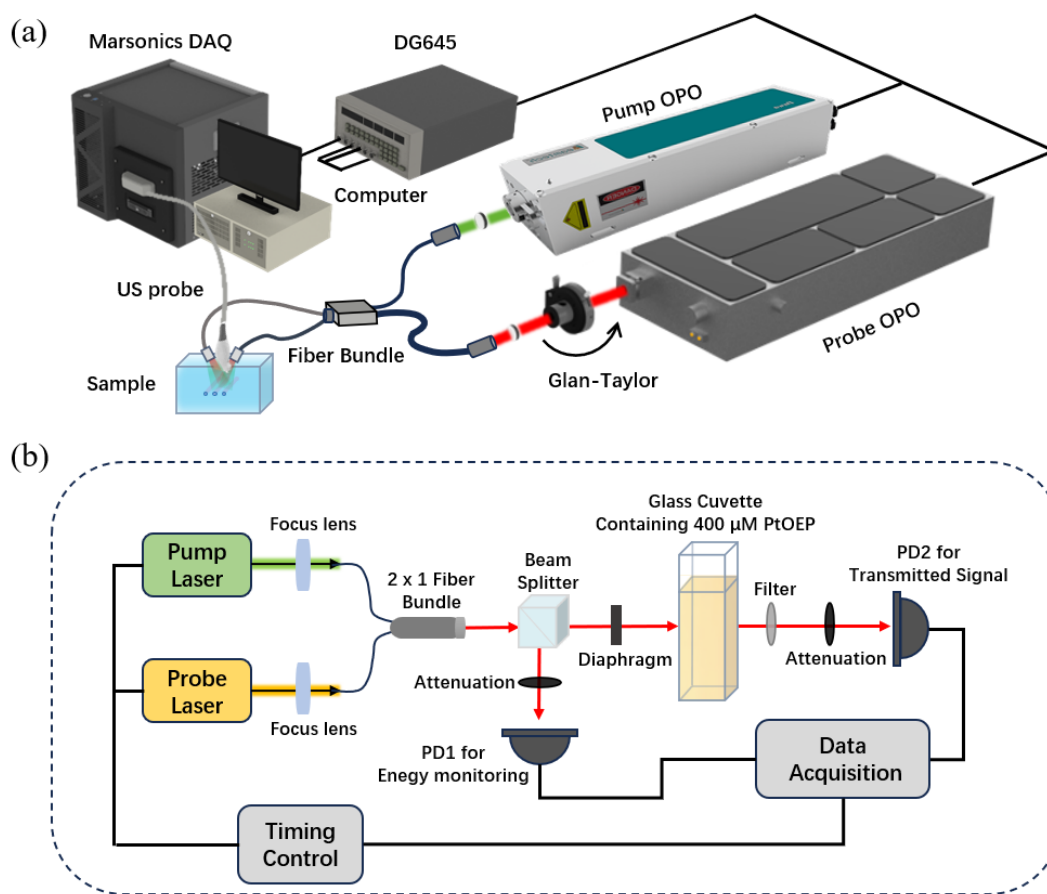


图 1 基于瞬态吸收谱优化的光声泵浦系统 (a) 光声泵浦成像系统图; (b) 纳秒瞬态吸收光谱仪系统示意图

Fig. 1. Pump-probe photoacoustic tomographic system optimized by a transient absorption spectroscopy: (a) Schematic of the pump-probe photoacoustic tomographic imaging system; (b) Schematic diagram of the nanosecond transient absorption spectrometer.

3 实验系统及测量结果

3.1. PtOEP瞬态吸收谱研究

PtOEP 分子的激发波长可由分光光度计获得, 如图 2 (a) 所示。PtOEP 在甲苯中的紫外-可见吸收光谱显示出位于 381 和 532 nm 处的强吸收带。该吸收谱图证实了样品的纯度, 并可选择 532 nm 作为其泵浦波长, 以实现 PtOEP 分子从基态 S_0 到第一三重激发态 T_1 的高效跃迁。同时测得样品的荧光发射谱如图 2(a)

橙线所示，可得其在 643 nm 左右的磷光发射峰，该发射源于激发三重态 (T_1) 向基态 (S_0) 的跃迁。

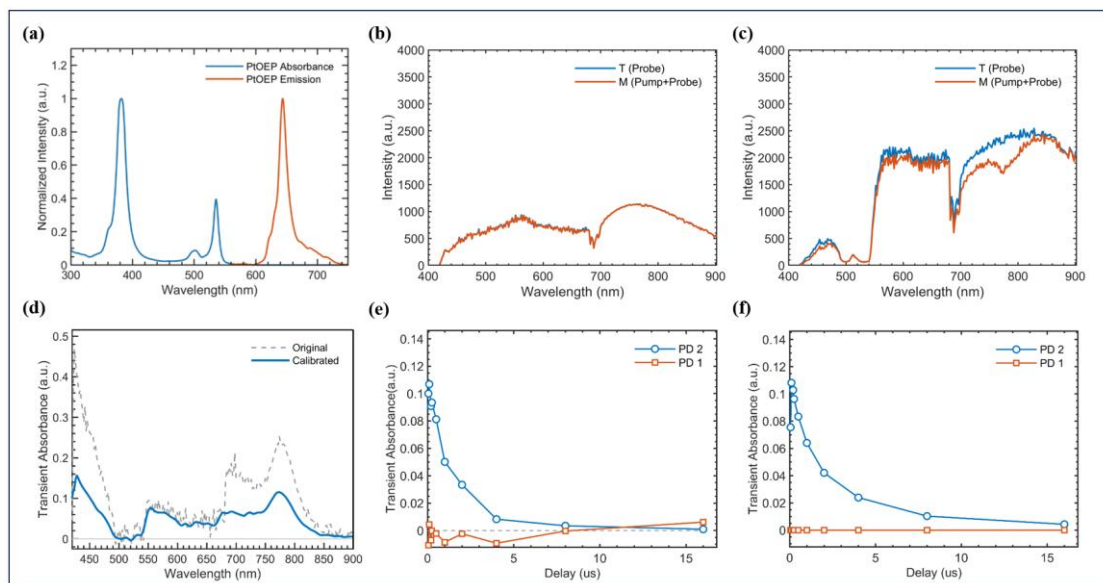


图 2 PtOEP 瞬态吸收谱测试结果 (a) PtOEP 稳态吸收谱和发射光谱; (b) PD1 在有
无泵浦光激发下接收到的原始探测光信号; (c) PD2 在有无泵浦光激发下接收的
原始探测光信号; (d) 校正前后的 PtOEP 瞬态吸收谱; (e) 设置 532 nm 激发光和
770 nm 探测光不同延时下的 PtOEP 瞬态吸收寿命曲线; (f) 校正后的 PtOEP 瞬态
吸收寿命曲线

Fig. 2. Transient absorption spectroscopy characterization of PtOEP: (a) Steady-state absorption and emission spectra of PtOEP; (b) Raw probe signals detected by PD1 with and without pump excitation; (c) Raw probe signals detected by PD2 with and without pump excitation; (d) Transient absorption spectra of PtOEP before and after correction; (e) Transient absorption decay curves of PtOEP at different delay times with 532 nm excitation and 770 nm probe light; (f) Corrected transient absorption decay curve of PtOEP.

瞬态吸收光谱测试用的 PtOEP 溶液浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 。该浓度可以使得在相当的 PtOEP 分子检测灵敏度下，大部分探测光仍能透过样品溶液到达探测器 PD2，来实现瞬态吸收谱的有效测量。泵浦光脉冲由于相对探测光脉冲有 0.2 μs 的时间提前，因此可以在 PD1 和 PD2 所得脉冲波形上完好的分离。通过测量探测光脉冲的面积，即可获得有无泵浦光存在时，不同波长下的探测光能量数据。PD1 由于放置于样品前端，因此在有无泵浦光照射时，其各波长下能量基本相等

(图 2 (b))。PD1 的作用是对探测光脉冲的能量波动进行校正, 从而对得到的瞬态吸收谱进行校准, 提高测量准确度。而从图 2 (b) 看出, 经过样品后测得 PD2 的原始信号清晰的显示了在一定的波长范围内, 在泵浦光存在时, 透射的探测光能量显著下降, 表明样品在该波长段存在正瞬态吸收。系统最终测得的 PtOEP 瞬态吸收差分光谱图如图 2 (d) 所示。其中, 灰色虚线为校正前的瞬态吸收光谱, 蓝色实线为经过 PD2 校正后的结果。在该吸收谱上, 可观察到了一个显著、宽谱的正吸收带, 中心波长位于 770 nm, 代表 T1 态的 PtOEP 分子在该光谱段吸收最强。值得注意的是, 虽然在 450 nm 左右也会有高强度的正瞬态吸收波段, 但是由于该波长很短, 组织穿透深度浅, 不利于光声泵浦成像。通过监测调节激发后不同延时下瞬态吸收峰 (770 nm) 处样品瞬态吸收信号的衰减, 如图 2 (e) 和 (f) 所示。其中可以看出, 经过 PD2 能量校正后的衰减 (图 2 (f)) 相对于校正前 (图 2 (e)), 具有更好的平滑度和拟合优度。结果显示, 在空气环境中 PtOEP 溶液的 T1 态寿命约为 2 μ s, 远长于常规生物背景组织的皮秒级激发态寿命, 以及常规荧光成像的纳秒级荧光寿命, 因此可以用于光声泵浦成像。该寿命检测结果也证实, 本文所搭建的瞬态吸收光谱系统可以对 PtOEP 分子的激发态动力学进行精确的表征。

3.2 多波长光声泵浦成像验证

(1) 单样品管成像

本文基于瞬态吸收谱得到了 PtOEP 的 T1 态最优吸收波长范围, 随后通过光声泵浦成像对其进行验证。在光声泵浦成像中, 本文采用 400 μ mol/L 的 PtOEP 浓度, 从而保证光声泵浦成像的信号强度。本文在 450 到 850 nm 的宽谱段内测试了 10 个不同的探测光波长, 其中图 3 (a) 显示了 5 个代表性的 TTD 成像结果。如图所示, 结果证实在 770 nm 处的 TTD 信号最强, 与前述瞬态吸收谱结果 (图 2 (d)) 一致。值得注意的是, 该结果考虑了泵浦和探测光能量的影响。图 3 (b) 给出了不同波长探测光的能量分布, 图 3 (c) 为相应探测光波长下的泵浦光能量分布。其中, 由于泵浦光一直采用 532 nm, 所以在测试不同波长探测光时, 泵浦光的能量近乎不变, 如图 3 (c) 所示。结合最终 TTD 幅值分布 (图 3 (d)), 以及光学瞬态吸收谱测量结果 (图 2 (d)) 可知, 450 nm 处有正向的瞬态吸收, 且探测光入射能量较大, 所以其 TTD 幅值较大。532 nm 附近的波长虽然探测光入

射能量较大，但是其 TTD 幅值较低，与其瞬态吸收强度低的结果一致。值得注意的是，450 到 550 nm 处 TTD 幅值较高，其中一个重要的原因也在于探测光能量波动较大，因此造成光声差分信号波动幅度的增大，造成的 TTD 假阳性升高。而 630 到 850 nm 处的 TTD 成像结果表明，在此波段内 770 nm 具有更高的 TTD 幅值，与该波段瞬态吸收测试结果一致。850 nm 已经脱离了其瞬态吸收谱段，因此几乎无 TTD 信号。图 3 (e) 显示了 630 nm、770 nm、850 nm 处样品管上边缘的 TTD 重建轮廓，更清晰的说明 770 nm 是最优的光声泵浦成像波长，其 TTD 重建图像具有相对最高的信噪比，达到了 48.5 dB。总之，由于 TTD 信号的探测波长依赖性主要来自于 T1 态分子对不同波长的吸收差异，此波长分布与图 2 (d) 瞬态吸收谱结果高度匹配，从光声泵浦成像的角度印证了所得瞬态吸收谱的有效性，为后续光声泵浦探测波长的优化提供了证据。

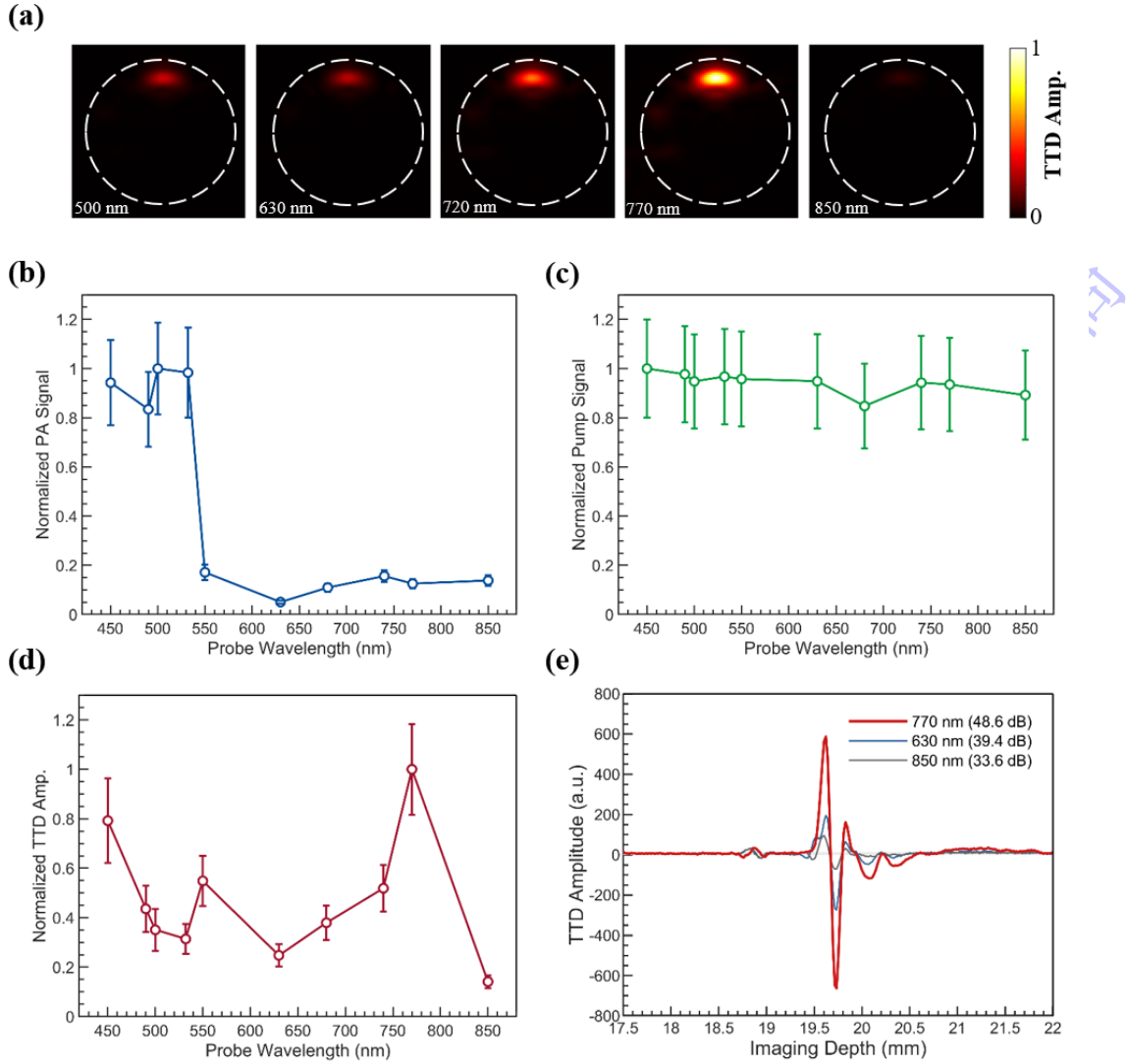


图 3 单样品管光声泵浦结果 (a) 仿体管在几种常用探测波长下的光声泵浦成像

结果；(b) PtOEP 在不同波长下的探测光声信号对比；(c) 在采集不同波长探测光下 TTD 时 532 nm 泵浦光的光声信号波动；(d) PtOEP 在不同探测波长下的 TTD 信号对比；(e) 几种探测波长下同一通道 A₂-line 的 TTD 信号对比；

Fig. 3. Pump-probe photoacoustic imaging results of a single sample tube: (a) Imaging results of the tube at several probe wavelengths; (b) Comparison of photoacoustic signals of PtOEP at different probe wavelengths; (c) Fluctuations of 532 nm pump photoacoustic signal during TTD acquisition at different probe wavelengths; (d) TTD signal comparison of PtOEP at varied probe wavelengths; (e) Comparison of TTD signal for a single-channel A-line across different probe wavelengths.

(2) 多样品管仿体成像

本文通过仿体实验，进一步验证探测光波长优化的效果。其中，仅泵浦光、仅探测光，以及泵浦光和探测光同时存在时，所采集到的光声信号重建后的代表性图像如图 4 (a) 所示。其中三根 3 mm 直径的样品管从左到右依次为：1%墨水溶液，12%的牛血红蛋白溶液以及 400 $\mu\text{mol/L}$ 的 PtOEP 甲苯溶液。图 4 (a) 所示，传统的光声成像（如仅泵浦和探测光照射时）中，由于所有吸收体都会产生光声信号，所以当光敏剂目标分子浓度较低时，其信号就会被淹没于血液、墨水等强吸收背景中。图 4 (b) 是不同波长下 TTD 成像结果，为方便比较，这些 TTD 图像的幅值做了归一化处理。从中明显的看到，在 710 到 800 nm 的波长范围内（对应于图 2 (d) 中 PtOEP 分子的瞬态吸收范围），光声泵浦成像可以通过三重态信号差分，极大的压制来自于墨水和血红蛋白的背景信号，仅保留了 PtOEP 样品管的信号，这体现了光声泵浦成像对 PtOEP 分子的高灵敏度与高特异性去背景成像能力。其中，770 nm 处的 TTD 幅值最强，再次证实了瞬态吸收测试结果在光声泵浦探测波长的优化方面的指导价值。

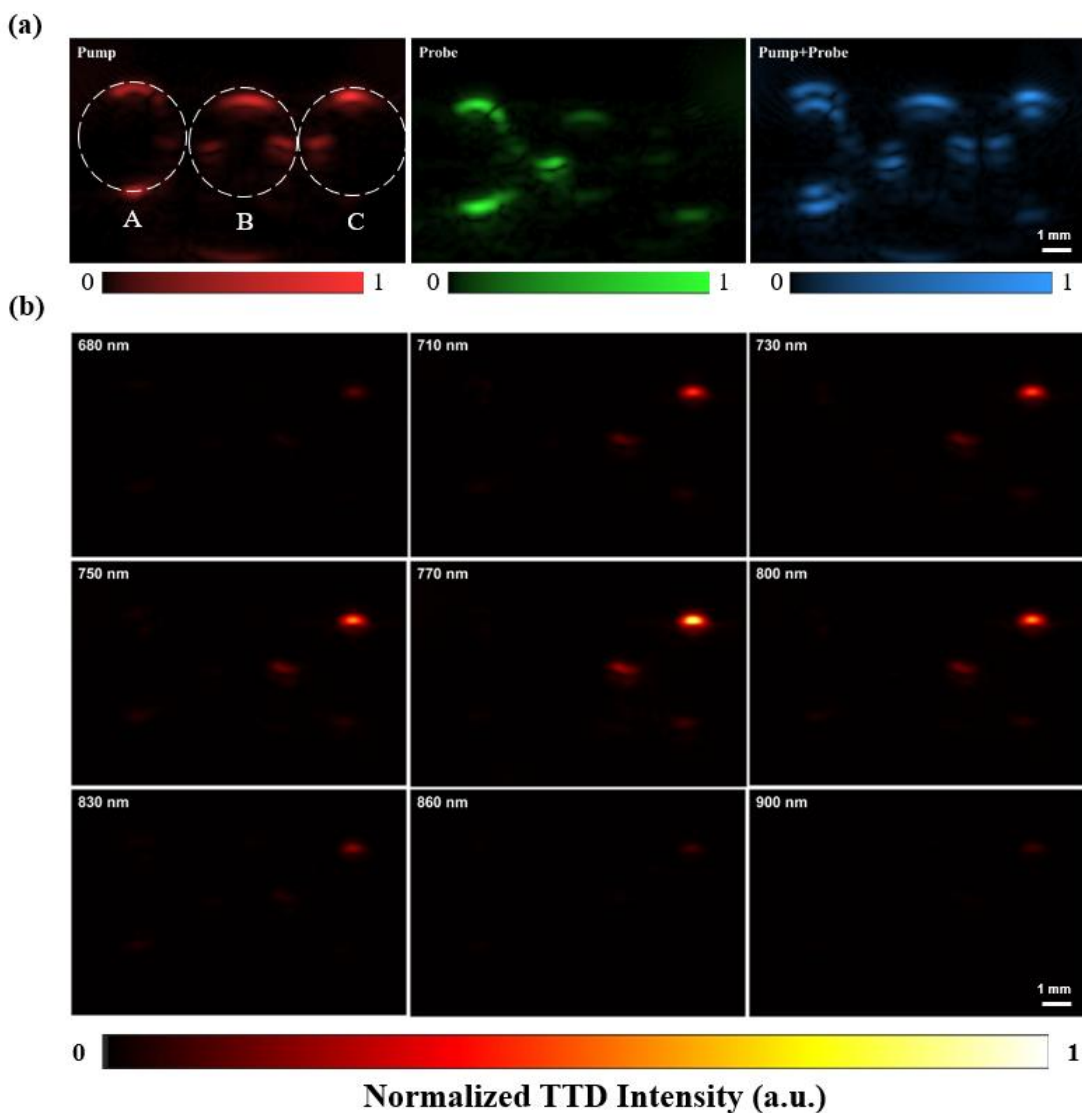


图 4 多样品管仿体光声成像结果 (a) 三根样品管分别在泵浦光 (532nm)、探测光 (770 nm)、泵浦光加探测光下的光声成像结果，其中 A、B 和 C 分别对应 1% 油性墨水溶液、12% 的牛血红蛋白溶液以及 400 $\mu\text{mol/L}$ 的 PtOEP 溶液；(b) 不同探测波长得到的 TTD 图像。

Fig. 4. Photoacoustic imaging results of a multi-tube phantom. (a) Photoacoustic images of three sample tubes under pump light (532 nm), probe light (770 nm), and combined pump-probe excitation, where A, B and C denote 1% oily ink solution, 12% bovine hemoglobin (Hb) solution, and 400 $\mu\text{mol/L}$ PtOEP solution, respectively; (b) TTD images obtained at various probe wavelengths.

本研究根据测得的瞬态吸收谱选择 532 nm 作为 PtOEP 样品的泵浦光波长，

将 770 nm 作为探测光波长。在验证其光声泵浦去背景效果后，通过精确调节泵浦光与探测光之间相对延时，获取了图 4 中多样品管仿体在不同 TTD 衰减阶段的光声泵浦图像。归一化处理后图 5 (a) 显示了最右侧的 400 $\mu\text{mol/L}$ 的 PtOEP 溶液样品管随着延时增大而 TTD 逐渐衰减的过程。通过公式 (2) 拟合不同延时下的 TTD 图像可得到同位置下的寿命分布图像，如图 5 (b) 所示。图 5 (c) 显示了成像区域内的 P1 像素点的 TTD 衰减曲线。拟合结果显示该点处的寿命为 1.87 μs ，该曲线的拟合优度 R^2 达到 0.9879。其寿命测量结果与 3.1 节光学瞬态吸收测量结果 (2 μs) 相一致，表明成像结果的可靠性。

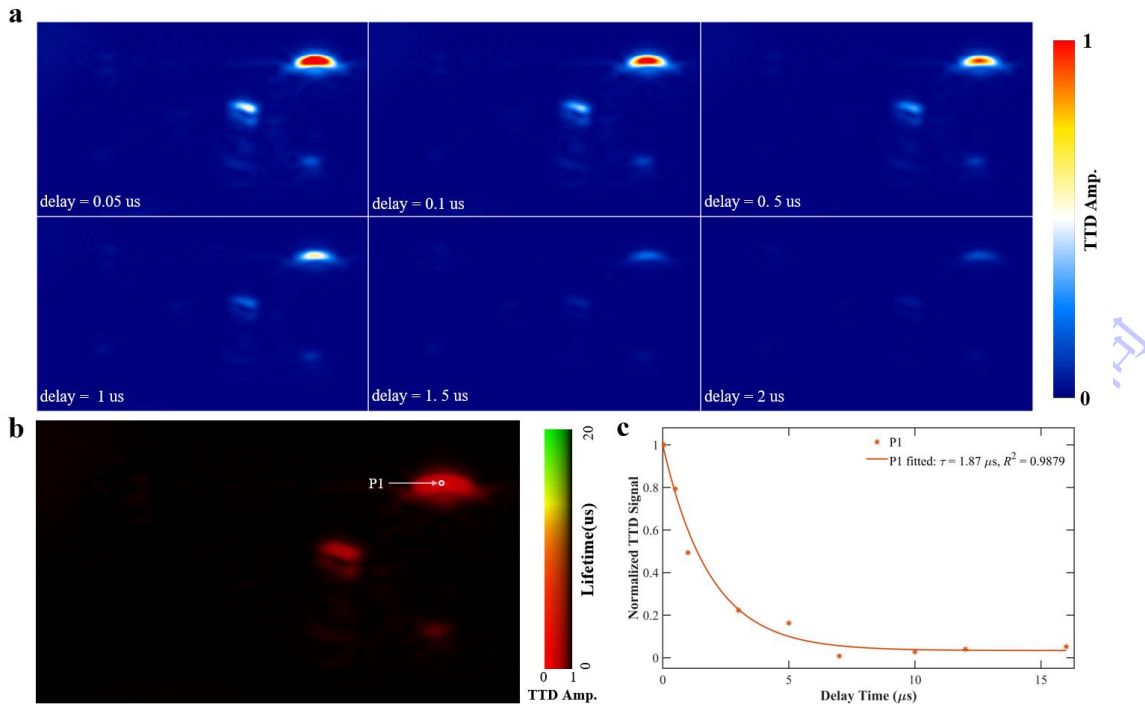


图 5 多样品管仿体经波长优化后的光声寿命成像结果 (a) 6 组不同泵浦光和探测光延时设置下的 TTD 图像; (b) 根据不同延时拟合出的光声寿命分布图像; (c) 图 (b) 中示意像素点 P1 拟合得到的寿命衰减曲线。

Fig. 5. Photoacoustic lifetime imaging results of a multi-tube phantom sample with optimized wavelength. (a) TTD images under 6 groups of pump-probe delay settings; (b) photoacoustic lifetime image fitted from the delay series; (c) Fitted lifetime decay

curve of the representative pixel P1 shown in (b).

4 讨 论

光声成像融合了光学成像的高对比度特性与超声成像的深穿透优势。然而，在复杂的生理环境中，血红蛋白、黑色素等强背景吸收严重限制深层组织探测的信噪比与特异性。光声泵浦成像利用 PtOEP 等外源性探针在激发态下的能量衰减动力学（即寿命）作为成像对比机制，通过时间分辨探测光敏剂的差分信号，实现深层组织中特定分子和氧分压的高特异性成像。选择合适的泵浦光和探测光波长是提高光声泵浦成像性能的关键，泵浦光可以根据基态吸收谱较易获得，而探测波长往往依靠经验选择或者逐波长扫描。尽管超快光谱技术在物理化学领域已趋成熟，但其多聚焦于飞秒瞬态吸收光谱研究方面，虽然具有极高的时间分辨率，但不便对 PtOEP 等光敏分子达微秒量级的长时间弛豫过程进行测量。目前仍缺乏对探针激发态吸收分析手段，用以优化探测波长提升光声泵浦成像准确性和信噪比。

光声泵浦成像以对激发后的 T1 态分子的探测为基础，在探测光的波长选择中，本文建立了一套高灵敏度的纳秒级瞬态吸收光谱测量系统。显然，经过样品后的 PD2 信号在泵浦光激发下对探测波长存在一个显著、宽谱的正吸收带，中心波长位于 770 nm，体现 T1 态的 PtOEP 分子在该光谱段的最强吸收。同时，考虑到激光器的能量波动影响，本研究采用 PD1 作为参考对 PD2 采集的探测光能量进行校正，经校正的吸收谱抑制了系统抖动造成的假阳性瞬态吸收。通过能量校正后得到的瞬态吸收寿命衰减曲线具有更好的平滑度和拟合优度，拟合出 PtOEP 激发态寿命在 2 μ s 左右。值得注意的是，系统通过增加一定的平均次数来抑制噪声，但这以牺牲一部分检测速度为代价，使得采集单波长瞬态吸收时间为 5 s。实际检测中，样品照射时间过长也会影响后续瞬态吸收测量结果。如果需要提高系统的时间分辨率，需要优化激光器性能，或者降低对系统检测精度的要求。

由于光声泵浦成像中的差分信号强度基于光敏剂激发态分子对探测光的瞬态吸收，因此本研究通过仿体实验对测得的瞬态吸收谱进行验证。从光声结果可以看出，PtOEP 分子的基态吸收主要在 532 nm 及以下，而 TTD 信号表现出其在 450 nm、550 nm 以及 770 nm 附近具有较强信号，与瞬态吸收谱结果基本一致。而从同通道的 TTD 信号看出，770 nm 相对其他波长具有相对最高的信噪比，达到了 48.5 dB。值得注意的是，单管实验中探测波长部分间隔较大，部分波长范

围在后续实验中进行了细化分析。本文通过模拟背景信号进一步确定优化的探测波长提升光声泵浦成像性能的效果。从中明显的看到，在 710 到 800 nm 的波长范围内，光声泵浦成像可以极大的压制墨水和血红蛋白的背景信号，仅保留了 PtOEP 样品信号。其中 770 nm 处的 TTD 幅值最强，再次证实了瞬态吸收系统在光声泵浦探测波长的优化方面的指导价值。另外，本研究通过调节泵浦-探测光延时，获得了 PtOEP 样品管的激发态光声寿命图像，其数值（1.87 μ s）与光学瞬态吸收结果高度一致。实测寿命值相较理想空气饱和溶液理论寿命值略长^[26]，可能由溶剂纯度、环境温度以及样品内局部耗氧效应造成。这一结果验证了 770 nm 波长优化对提升 TTD 信号信噪比和拟合可靠性的有效作用，为光声寿命传感技术的开发和应用奠定了坚实的基础。

本文的研究结果将有助于光敏剂分子的瞬态特性研究，并为光声泵浦成像的性能优化和应用设计提供指导。然而，为进一步推进光声泵浦成像临床转化的目标，本工作所涉及系统与研究方案仍存在一些尚待完善的改进空间。目前瞬态吸收光谱系统的探测光采用 OPO 激光器逐波长扫描，未来可采用超连续谱白光宽带脉冲光源^[27]，从而显著减少扫描时间。另外，PtOEP 波长较短，因此需测更多长波长的近红外分子材料，提升光声泵浦成像的穿透能力^[28]。同时，还需结合现代纳米探针分子技术，利用光敏分子进行更多的靶向探针设计合成以及活体成像测试工作，推动光声泵浦成像在目标蛋白成像、深层肿瘤缺氧评估、微环境代谢监测等方面的应用。

5 结 论

针对当前光声泵浦成像中对光敏剂探针分子的动力学表征研究方面的局限，本文建立了一套高灵敏度的纳秒级瞬态吸收光谱测量系统。该瞬态吸收系统采用与光声泵浦成像通用的高功率纳秒泵浦光源与 OPO 宽带可调谐激光器，同时引入参考光同步双通道监测机制，从而有效降低 OPO 激光器能量波动造成的测量误差，实现了高精度的瞬态吸收谱测量。本研究测量了 PtOEP 分子从 420 到 900 nm 宽谱波段的瞬态吸收，精确定位出其位于 770 nm 处的最大瞬态吸收峰，并用光声泵浦成像对所得结果进行了交互验证，摆脱了光声泵浦成像中常凭经验盲目设定探测波长的短板，并实现了光声寿命成像检测。本文构建了一套从材料微观光物理机制表征到宏观成像系统优化的完整方法论，为光声泵浦成像中高性能光敏探针的精准设计与临床转化提供了科学的判据与技术路径。

参考文献

- [1] Wang L V, Yao J 2016 *Nat. Methods* **13** 627
- [2] Weber J, Beard P C, Bohndiek S E 2016 *Nat. Methods* **13** 639
- [3] Riksen J J M, Nikolaev A V, van Soest G 2023 *J. Biomed. Opt.* **28** 121205
- [4] Xia J, Yao J, Wang L V 2014 *Electromagn Waves (Camb)* **147** 1
- [5] Huynh N T, Zhang E, Francies O, Kuklis F, Allen T, Zhu J, Abeyakoon O, Lucka F, Betcke M, Jaros J, Arridge S, Cox B, Plumb A A, Beard P 2025 *Nat. Biomed. Eng.* **9** 638
- [6] Ashkenazi S 2010 *J. Biomed. Opt.* **15** 040501
- [7] Shao Q, Morgounova E, Jiang C, Choi J, Bischof J, Ashkenazi S 2013 *J. Biomed. Opt.* **18** 076019
- [8] Tsang V T C, Li X, Wong T T W 2020 *Sensors (Basel)* **20** 5595
- [9] Shao Q, Ashkenazi S 2015 *J. Biomed. Opt.* **20** 036004
- [10] Xie Y, Wu H, Chen Z, Sun Q, Liu X, Jiang J, Wang B, Chen Z 2023 *Photoacoustics* **32** 100530
- [11] Zhao J, Wu W, Sun J, Guo S 2013 *Chem. Soc. Rev.* **42** 5323
- [12] Tan J W Y, Lee C H, Kopelman R, Wang X 2018 *Sci. Rep.* **8** 9290
- [13] Jo J, Lee C H, Folz J, Tan J W Y, Wang X, Kopelman R 2019 *ACS Nano* **13** 14024
- [14] Xiao J, He X, Xie Z, Wang B 2024 *Opt. Lett.* **49** 1369
- [15] Berera R, van Grondelle R, Kennis J T M 2009 *Photosynth. Res.* **101** 105
- [16] Duffy M J, Planas O, Faust A, Vogl T, Hermann S, Schäfers M, Nonell S, Strassert C A 2018 *Photoacoustics* **9** 49
- [17] Ji S, Wu W, Wu Y, Zhao T, Zhou F, Yang Y, Zhang X, Liang X, Wu W, Chi L 2009 *Analyst* **134** 958
- [18] Wang B, Xie Y, He X, Jiang J, Xiao J, Chen Z 2022 *Opt. Express* **30** 39129
- [19] Hinke J A, Pundsack T J, Luhman W A, Holmes R J, Blank D A 2013 *J. Chem. Phys.* **139**
- [20] Huang S W, Eary J F, Jia C, Huang L, Ashkenazi S, O'Donnell M 2009 *Opt. Lett.* **34** 2393
- [21] Wang G, Wang B, Ye T, Wang C, Guo L, Xiao J, Chen Z 2021 *Front. Mater.* **8** 699433
- [22] He C, Zhu J, Zhang H, Qiao R, Zhang R 2022 *Biosens.-Basel* **12** 947
- [23] He X, Xiao X Z, He B, Xue P, Xiao J Y 2023 *Acta Phys. Sin.* **72** 218101(in Chinese) [何霄, 肖小舟, 何滨, 薛平, 肖嘉莹 2023 物理学报 **72** 218101]
- [24] Penso C M, Rocha J L, Martins M S, Sousa P J, Pinto V C, Minas G, Silva M M, Goncalves L M 2021 *Sensors* **21** 5645
- [25] Witthauer L, Roussakis E, Cascales J P, Goss A, Li X, Cralley A, Yoeli D, Moore H B, Wang Z, Wang Y 2023 *Sci. Rep.* **13** 14782
- [26] Bansal A K, Holzer W, Penzkofer A, Tsuboi T 2006 *Chem. Phys.* **330** 118
- [27] Younesi A T, Ulbricht R 2022 *Opt. Express* **30** 38896
- [28] Sun C, Li B, Zhao M, Wang S, Lei Z, Lu L, Zhang H, Feng L, Dou C, Yin D, Xu H, Cheng Y, Zhang F 2019 *J. Am. Chem. Soc.* **141** 19221

Transient Absorption Spectrum of PtOEP and its Application in Pump-Probe Photoacoustic Tomography for high-specific molecular imaging^{*}

HUANG Xing¹⁾ LIU Runxiang¹⁾ ZHANG Zhanjun¹⁾ WANG Bo¹⁾†

1) (Department of Biomedical Engineering, Xiangya School of Basic Medical Science,
Central South University, Changsha 410083, China)

Abstract

Photoacoustic tomography (PAT) combines the high molecular contrast of optical imaging with the deep penetration depth of ultrasound imaging, making it a powerful tool for biomedical applications. However, in complex biological tissues, PAT often suffers from strong background interference arising from endogenous absorbers such as hemoglobin, which severely compromises the detection specificity and image contrast. To address this challenge, the use of exogenous probes with long-lived triplet states in conjunction with pump-probe detection strategies has emerged as a promising approach to eliminate the blood-induced background and enable selective imaging of targeted molecules.

In this work, we developed a highly sensitive nanosecond transient absorption spectroscopy system incorporating a reference-light synchronized dual-channel monitoring scheme, which effectively compensates for pulse-to-pulse laser energy fluctuations and significantly reduces measurement uncertainties. Using 532 nm as the excitation wavelength to populate the triplet state (T1) of the photosensitizer probe platinum octaethylporphyrin (PtOEP), and applying a 0.2 μ s pump-probe delay, we systematically characterized the triplet-state absorption spectrum of PtOEP across a broad spectral range from 420 to 900 nm. Based on the spectroscopic characterization, we further evaluated the pump-probe PAT (P³AT) performance of PtOEP at various probe wavelengths. The results demonstrate that the optimal signal-to-noise ratio is achieved at the triplet-state absorption peak of 770 nm, consistent with the transient absorption measurements.

Phantom imaging experiments confirm that the P³AT system with the optimized probe wavelength (770 nm) effectively suppresses strong background signals from hemoglobin and ink, enabling highly specific background-free imaging of PtOEP. In addition, by varying the pump-probe time delay, we acquired the triplet-state lifetime decay curve of PtOEP. The derived triplet lifetime was 1.87 μ s ($R^2 = 0.9879$), consistent with the transient absorption spectroscopy measurements. Collectively, this study establishes a complete workflow that bridges the photophysical characterization of probe materials at the molecular level and the optimization of macroscopic P³AT imaging. The proposed strategy provides not only scientific guidelines for the rational design of high-performance pump-probe contrast agents but also a practical technical pathway toward the clinical translation of P³AT.

Keywords: Transient absorption spectroscopy, pump-probe photoacoustic

tomography, PtOEP, background-free, excited-state lifetime

* Project supported by the National Key Research and Development Program of China (Grant No. 2024YFC3405302) and the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 62527821).

† Corresponding author.E-mail: wangbo0302@csu.edu.cn

The first author.E-mail: 246506027@csu.edu.cn

录用稿件，非最终出版稿