

УДК 551.46.0+53.082.56

ФЛУОРИМЕТР НА ОСНОВЕ МОЩНЫХ СВЕТОДИОДОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ ХЛОРОФИЛЛА “а”

© 2014 г. В. В. Поважный^{1,2}¹Южный научный центр РАН, Ростов-на-Дону²Институт аридных зон ЮНЦ РАН, Ростов-на-Дону

e-mail: povazhnyi@ssc-ras.ru

Поступила в редакцию 12.12.2012 г., после доработки 18.04.2013 г.

Описан простейший флуориметр для определения концентрации хлорофилла “а” в экстракте на основе светодиодов высокой яркости синего и ИК-спектра, использованных в качестве непрерывного источника излучения и приемника сигнала соответственно. Приведены результаты калибровки и валидации показаний системы по экстрактам с различной концентрацией хлорофилла “а”.

DOI: 10.7868/S0030157414030101

ВВЕДЕНИЕ

Флуоресцентный метод определения хлорофилла “а” (хл “а”) широко применяется в биоокеанологии и детально разработан [2, 5] с момента своего описания в 1963 г. [14]. Большинство флуориметров для определения хл “а” *in situ* используют для возбуждения флуоресценции широкополосный источник излучения (газоразрядную лампу) с первичным светофильтром (длина волны $\lambda_{\max} \sim 430$ нм), а для регистрации сигнала – чувствительный фотоумножитель, оснащенный вторичным светофильтром ($\lambda_{\max} \geq 660$ нм) [2]. Использование светофильтров приводит к ослаблению возбуждающего и регистрируемого излучения, требует наличия в составе устройства электронной схемы усиления сигнала. Малогабаритные датчики флуоресценции фитопланктона *in vivo* в составе зондов вертикального и горизонтального профилирования устроены похожим образом [2, 9].

Быстрое развитие современной элементной базы электронных систем, в частности, твердотельных источников излучения – светодиодов высокой яркости, позволяет по-новому подойти к вопросам проектирования и эксплуатации многих измерительных приборов, в том числе датчиков флуоресценции хл “а”. Массовое производство мощных светодиодов и снижение их стоимости в последние годы сделало данные устройства привлекательными для создания высокоточных и доступных аналогов фотометров и флуориметров классических схем [6].

Малая полуширина спектрального интервала излучения современных монохроматических светодиодов нашла широкое применение при создании на их основе коммерческих образцов фотометров, лишенных светофильтров или дифракци-

онной решетки [10]. Приемником сигнала проходящего излучения в приборах данной схемы чаще всего служит фотодиод, фотоумножитель или фотосопротивление. При этом в научном приборостроении практически неиспользованным остается другое свойство светодиодов, лишенных слоя люминофора – возможность их использования в режиме фотодиода с узкой полосой поглощения. Фотоэффект светодиода при облучении светом меньшей, по сравнению с излучаемой, длиной волны, а также возможность его практического использования были описаны достаточно давно [8, 10], однако до последнего времени использовались слабо в силу низкой мощности имевшихся устройств. Измерительные устройства, включающие светодиод в качестве датчика излучения, рассмотрены в недавнем обзоре [11].

Определение концентрации бактериохлорофилла пурпурных бактерий путем измерения светодиодом оптической плотности культуры в красной области спектра было предложено Цыганковым [4]. Конструкция фотометра-флуориметра для определения интенсивно флуоресцирующего хинина на основе трех светодиодов без дополнительных оптоэлектронных компонентов была разработана в [12], область применения схемы была расширена и детально описана в [13]. Комбинация светодиодов для возбуждения и регистрации сигнала флуоресценции позволяет предельно упростить схему флуориметра, избавив ее от первичного и вторичного светофильтров, снижающих интенсивность возбуждающего и измеряемого сигналов, уменьшить ее габариты, сделать возможным самостоятельное изготовление датчика [13]. Вместе с тем, использование маломощных (100–200 мВт) светодиодов для возбуж-

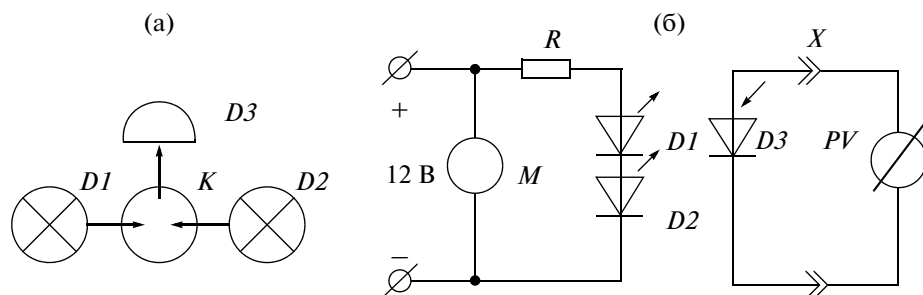


Рис. 1. Оптическая (а) и принципиальная электрическая схема (б) разработанного флуориметра (пояснения см. в тексте).

дения и регистрации сигнала позволяло определять лишь интенсивно флуоресцирующие вещества (хинин, рибофлавин) в высоких концентрациях.

При определении хл “а” малые физические размеры источника и приёмника излучения позволяют значительно снизить объем измеряемого экстракта и дополнительно уменьшить объем профильтрованной пробы по сравнению со стандартным флуориметрическим методом определения хл “а” в природных водах [5]. Использование в конструкции флуориметра современных светодиодов с заявленной мощностью 3–5 Вт позволяет потенциально достичь нижнего предела определения хл “а” *in vitro* (0.02 мкг/мл экстракта), характерного для большинства современных коммерческих образцов флуориметров при минимальной стоимости устройства.

Целями настоящей работы стали создание, калибровка и валидация показаний рабочего макета малогабаритного датчика флуоресценции хл “а” *in vitro* на основе мощных светодиодов. В ходе работы также решалась задача снижения объемов

пробы и экстракта при определениях хл “а” в морских водах.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Оптическая схема разработанного макета флуориметра показана на рис. 1а.

В качестве двух монохроматических источников возбуждения флуориметра *D1* и *D2* были использованы синие светодиоды заявленной мощностью 3 Вт ($\lambda_{\max} = 465$ нм, $\Delta\lambda/2 = 15$ нм, $I_{\text{пр}} = 700$ мА, $U_{\text{пр}} = 5$ В, Edison Opto corp., Тайвань). Для стабилизации температурного режима и характеристик излучения светодиодов к их штатным радиаторам типа “звезда” с использованием теплопроводящей пасты крепились отрезки алюминиевого радиатора для компьютерных процессоров массой ~5 г. Диоды соединялись последовательно и подключались через батарею из шести резисторов МЛТ-2 *R* (16 Ом, 12 Вт) к источнику питания постоянного тока ($U_{\text{вых}} = 12$ В, $I_{\text{вых}} = 1.5$ А, ONK, КНР). В качестве приемника излучения *D3* использовался ИК-светодиод заявленной мощностью 1 Вт ($\lambda_{\max} = 850$ нм, $I_{\text{пр}} = 350$ мА, $U_{\text{пр}} = 5$ В, Edison Opto corp., Тайвань). Спектральная характеристика ИК-светодиода в режиме фотодиода, показанная на рис. 2, была измерена на фотометре UNICO 1200 (США) непосредственной регистрацией напряжения (мВ) на выводах диода для различных длин волн при облучении штатным источником света фотометра и нормализована по мощности излучения лампы фотометра.

Для охлаждения радиаторов светодиодов возбуждения к источнику питания параллельно светодиодам был подключен вентилятор *M* ($D = 25$ мм, $U = 12$ В, $I = 90$ мА, КНР). Линзы светодиодов крепились согласно оптической схеме в кюветодержателе, изготовленном из пенопласта высокой плотности. В качестве кюветы *K* была использована пробирка прозрачного стекла для автоанализатора ($L = 32$ мм, $D = 12$ мм, Wheaton, США) объемом 2 мл. Для эффективного охлаждения радиаторов светодиодов вентилятором собранная конструкция была помещена в корпус с га-

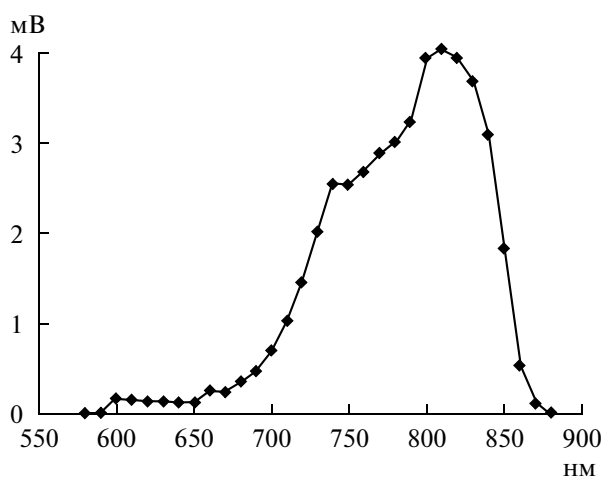


Рис. 2. Спектральная характеристика светочувствительности ИК-светодиода, использованного в приборе. По оси ординат – напряжение на выходах диода при различных длинах волн λ .

баритами (длина × ширина × высота) 90 × 90 × 35 мм. Для измерения сигнала флуоресценции Φ (мВ) к ИК-светодиоду через разъем X подключался малогабаритный мультиметр PV (DT 182, КНР). Принципиальная электрическая схема разработанного прибора показана на рис. 1б.

Световой поток светодиода зависит от силы протекающего через него тока, который для полупроводниковых приборов зависит от температуры. В макете была использована простейшая схема стабилизации температурного режима устройства принудительным воздушным охлаждением. Все измерения на макете выполнялись в лабораторных условиях при комнатной температуре (20 ~ 24°C). Предварительные измерения температурного режима устройства показали рост и стабилизацию температуры источника возбуждения и приемника излучения на седьмой минуте прогрева ($\Delta t = +13$ и $+5^\circ\text{C}$ соответственно). Все измерения на макете выполнялись через 15 минут после включения прибора. При использовании светодиодов в качестве источника излучения общепринятым является включение в цепь питания стабилизатора тока, что в данном случае может быть реализовано включением в схему соответствующей микросхемы с навесным прецизионным резистором. Для уменьшения случайной составляющей погрешности фиксировалось не менее 11 значений измерений. Объем экстракта в кювете во всех случаях составлял 1.5 мл. Перед каждой серией измерений регистрировался сигнал холостой пробы U_0 (чистый 90% ацетон). Φ рассчитывалась как:

$$\Phi = \frac{\sum_{i=1}^{11} (U_i - U_0)}{11}, \quad (1)$$

где U_i – сигнал измеряемого экстракта, мВ.

Для калибровки показаний прибора использовались результаты стандартных определений концентрации хл “а” ($C_{\text{хл}} \text{“а”}$, мкг/мл), полученные на двулучевом спектрофотометре Evolution 300 (Thermo, США) по методике [1] с использованием формулы Джеффри и Хамфри [7] без подкисления.

Пробы хл “а” для калибровки показаний прибора отбирались в апреле 2011 и августе 2012 гг. в поверхностном слое Азовского моря. Пробы фильтровались под вакуумом с использованием стекломикроволоконных фильтров MGF (Sartorius, $D = 47$ мм, средний размер пор – 0.7 мкм).

С целью снижения объема пробы воды и трудозатрат для определения хл “а” в полевых условиях, была модифицирована методика отбора и экстрагирования проб. Для валидации показаний флуориметра одновременно с пробами хл “а”, отобранными в соответствии с рекомендациями [1],

были использованы пробы, отобранные на стекломикроволоконные фильтры MGF диаметром 13 мм. Объем профильтрованной воды изменялся в зависимости от концентрации взвеси от 10 мл (Таганрогский залив Азовского моря) до 300 мл (Черное море). Фильтры с взвесью высушивались и хранились в соответствии с рекомендациями [1]. Экстрагирование хл “а” с фильтров малого диаметра проводилось в пластиковых пробирках с крышечкой объемом 2 мл в течение суток при температуре 5°C. Фильтр со взвесью измельчался в пробирке стеклянной палочкой после добавления 0.5 мл 90% ацетона, стеклянная палочка промывалась тремя последующими порциями (0.5 мл) ацетона, добавляемыми дозатором в пробирку, таким образом, начальный объем экстракта составлял 2 мл. Одноразовые пробирки различаются скоростью испарения ацетона через закрытую крышку при экстракции (0.2–2% объема/сут), для учета данной составляющей погрешности пробирки были предварительно откалиброваны с использованием чистого 90% ацетона весовым методом. Экстракция хл “а” в течение длительного времени при пониженной температуре с растиранием рекомендуется в иностранных [5] и отечественных источниках [3]. После центрифугирования (5 мин, 10000 g, Eppendorf Minispin) 1.5 мл экстракта использовались для определения Φ .

Для валидации показаний прибора были использованы данные 38-ми параллельных определений концентрации хл “а” в пробах, отобранных в Азовском, Черном и Каспийском морях в летний период.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Среднее стандартное отклонение сигнала холостой пробы для 18-ти серий определений составило 0.36 ± 0.048 мВ или $0.55 \pm 0.068\%$ (здесь и далее указана ошибка среднего $\pm m_x$), таким образом, нижняя граница чувствительности прибора (сигнал, втрое превышающий стандартное отклонение сигнала холостой пробы в соответствии с [5]), составила 1.1 мВ.

Результаты 27-ми параллельных определений Φ и $C_{\text{хл}} \text{“а”}$ в одном экстракте, использованные для калибровки показаний прибора при $\Phi \geq 1.1$ мВ, показаны на рис. 3а. Концентрация хл “а” в некоторых экстрактах (4.3 мкг/мл), оказалась выше предела (~1 мкг/мл), при котором нарушалось линейное соотношение между $C_{\text{хл}} \text{“а”}$ и Φ по [5] (точки не показаны на рис. 3а). Для экстрактов с $C_{\text{хл}} \text{“а”}$ менее 1 мкг/мл был рассчитан коэффициент, связывающий Φ и $C_{\text{хл}} \text{“а”}$, составивший $0.0114 \pm \pm 0.00037$ ($n = 27$, $R^2 = 0.97$), который был использован в дальнейшем для валидации показаний прибора. Таким образом, минимальную концентрацию хл “а” в экстракте, определяемую прибором,

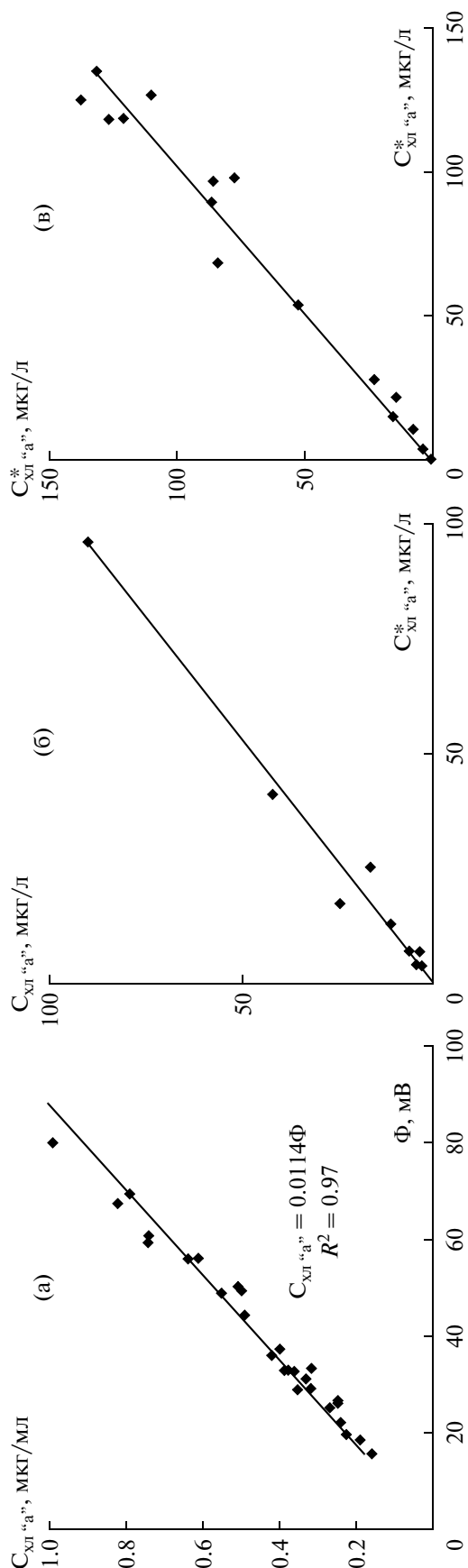


Рис. 3. Результаты калибровки (а) и валидации показаний флуориметра по данным экспедиций в Каспийское (б), Азовское и Черное моря (в) ($C_{\text{хл}}^* \text{ "a"}$ — результаты измерений хл "а" стандартным методом; $C_{\text{хл}}^* \text{ "a"}$ — результаты измерений хл "а" модифицированной методикой на флуориметре).

можно оценить в 0.012 мкг/мл, что соответствует нижней границе чувствительности коммерческих образцов флуориметров.

Большинство доступных вольтметров в составе малогабаритных мультиметров позволяют измерять постоянное напряжение с точностью до 100 мкВ, что потенциально дает возможность улучшить чувствительность использованной схемы до 300 мкВ только за счет стабилизации сигнала холостой пробы. Основным источником погрешности в данном случае могут служить колебания напряжения источника питания схемы, подключенного к бытовой сети, простейшим способом снижения которых может служить использование бытового стабилизатора напряжения для питания прибора.

Альтернативой использованному в схеме мультиметру может служить лабораторный рН-метр в режиме измерения постоянного напряжения (мВ) при подключении измерительного светодиода через соответствующий разъем.

Валидация коэффициента, связывающего Φ и $C_{\text{хл}}^* \text{ "a"}$, а также модифицированной методики отбора и экстракции хл "а" проводилась по результатам параллельных определений хл "а" в Каспийском, Азовском и Черном морях ($n = 38$). Для каждой из двух серий определений методом наименьших квадратов рассчитывалось уравнение регрессии вида

$$y = ax, \quad (2)$$

где y — концентрация хл "а" в воде по данным стандартных определений, a — множитель, x — концентрация пигмента, определенная модифицированной методикой отбора и экстракции проб, рассчитанная с использованием полученного в ходе калибровки коэффициента. Соответствие полученных данных друг другу определялась по близости к единице множителя a и коэффициента детерминации R^2 уравнения (2). Полученные расчетные данные приведены в таблице.

Результаты валидации показаний флуориметра приведены на рис. 3б и 3в.

При обработке проб, отобранных в Каспийском море, не учитывалась поправка на испарение экстракта из пластиковых пробирок, что привело к отличию в результатах валидации модифицированной методики по данным двух экспедиций.

Приведенные в таблице значения стандартной ошибки определения хл "а" (измерения выполня-

лись одним специалистом) сравнимы с ошибкой, возникающей при определении хл “а” фотометрическим методом на двух идентичных фильтрах двумя специалистами. Так, для проб, отобранных в Таганрогском заливе Азовского моря, были получены следующие результаты: $C_{\text{хл}} \text{ “а”} = 42\text{--}168$ мкг/л, $n = 16$, $m_x = 9.01$ мкг/л.

При использовании мощных светодиодов при небольшом объеме экстракта отмечалось снижение сигнала флуоресценции пробы со скоростью $\sim 0.45\%$ /с, что говорило об избыточной мощности возбуждающего излучения и позволяло выполнять измерения с требуемой точностью лишь при немедленной регистрации сигнала флуоресценции в течение 7–10 с после начала измерений. Вместе с тем, отмеченный эффект “тушения” флуоресценции наиболее ярко был выражен при $C_{\text{хл}} \text{ “а”}$, превышающей верхнюю границу определения флуориметра. Конструкция прибора может быть оптимизирована путем снижения мощности источника возбуждения до 3 Вт при одновременном увеличении чувствительности приемника сигнала за счет использования в схеме более мощного ИК-светодиода (например, заявленной мощностью 5 Вт). Другим способом снижения погрешности выполняемых измерений может служить включение в измерительную схему простейшего пикового детектора.

Увеличение чувствительности приемника излучения, а также импульсное возбуждение флуоресценции, легко реализуемое при использовании светодиодов, позволит модифицировать описанную схему для измерения флуоресценции хл “а” *in vivo* при сохранении ее основных достоинств — предельно низкой стоимости и доступности для самостоятельного изготовления. К примеру, известная в настоящий момент схема теряемого флуориметра-кондуктометра T-Flap, включающая измерительную ячейку на основе синих светодиодов и фотодиода, оснащенного светофильтром [9], может быть модифицирована описанным способом для упрощения конструкции и повышения чувствительности устройства.

Таким образом, разработанная конструкция флуориметра для определения хл “а” *in situ* и модифицированная техника отбора и экстракции проб позволяют расширить область применения флуориметрического метода за счет доступности и предельной простоты конструкции устройства без снижения чувствительности и точности определений, а также уменьшить объем пробы, требующийся для измерения хл “а”. Схема датчика может быть рекомендована для самостоятельного изготовления и эксплуатации.

Автор благодарит анонимного рецензента, д.б.н. А.А. Цыганкова (ИФПБ РАН), д.г.н. С.В. Бердникова и к.ф.-м. н. П.С. Пляку (ЮНЦ РАН) за поддержку и конструктивную критику работы.

Параметры уравнения (2), рассчитанные в ходе валидации показаний флуориметра

Водоем	a	R^2	m_x , мкг/л	n
Каспийское море, 2011 г.	0.94 ± 0.053	0.97	4.45	9
Азовское и Черное моря, 2012 г.	0.98 ± 0.026	0.98	7.07	29

Работа выполнялась при финансовой поддержке проекта “Взаимосвязь циклов углерода, азота и фосфора в Азовском море в современный период” (программа Президиума РАН № 23 “Фундаментальные проблемы океанологии: физика, геология, биология, экология”) и гранта РФФИ № 11-05-90439 Укр_ф_а.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- ГОСТ 17.1.04.02.-90 Государственный контроль качества воды. М.: Изд-во стандартов, 2001. 688 с.
- Карабашев Г.С. Флуоресценция в океане. Л.: Гидрометеиздат, 1987. 199 с.
- Руководство по химическому анализу морских и пресных вод при экологическом мониторинге рыбохозяйственных водоемов и перспективных для промысла районов Мирового океана / Под ред. Сапожникова В.В. М.: Изд-во ВНИРО, 2003. 202 с.
- Патрушева Е.В., Фёдоров А.С., Белера В.В. и др. Синтез бактериохлорофилла а пурпурной несерной бактерией *Rhodobacter capsulatus* // Прикладная биохимия и микробиология. 2007. Т. 43. № 2. С. 208–214.
- Arar E.J., Collins G.B. *In Vitro* Determination of Chlorophyll *a* and Pheophytin *a* in Marine and Freshwater Algae by Fluorescence US EPA Method 445.0 // Methods for the Determination of Chemical Substances in Marine and Estuarine Environmental Matrices, 1997. P. 132–154.
- Dasgupta P.K., Eom I.-Y., Morris K.J., Li J. Light emitting diode-based detectors Absorbance, fluorescence and spectroelectrical measurements in a planar flow-through cell // Analytica Chimica Acta. 2003. V. 500. P. 337–364.
- Jeffrey S.W., Humphrey G.F. New Spectrophotometric equations for determining chlorophylls *a*, *b*, c_1 and c_2 in higher plants, algae, and natural phytoplankton // Biochem. Physiol. Pflanz. 1975. V. 167. P. 191–194.
- Lindsay R.H., Paton B.E. Inexpensive photometer using light-emitting diodes // Am. J. of Physics. 1976. V. 44. № 2. P. 188.
- Marcelli M., Di Maio A., Donis D. et al. Development of a new expendable probe for the study of pelagic eco-

- systems from voluntary observing ships // *Ocean Sci.* 2007. V. 3. P. 311–320.
10. *Mims III F.M.* Sun photometer with light emitting diode as spectrally selected detectors // *Applied Optics.* 1992. V. 31. P. 6965–6967.
11. *O'Toole M., Diamond D.* Absorbance based light emitting diode optical sensors and sensing devices // *Sensors.* 2008. V. 8. P. 2453–2479.
12. *Pokrzywnicka M., Koncki R., Tymecki L.* A concept of dual optical detection using three light emitting diodes // *Talanta.* 2010. V. 82. P. 422–425.
13. *Tymecki L., Rejnis M., Pokrzywnicka M. et al.* Fluorometric detector and sensor for flow analysis made of light emitting diodes // *Analytica Chimica Acta,* 2012. V. 721. P. 92–96.
14. *Yentsch C.S., Menzel D.W.* A method for the determination of phytoplankton chlorophyll and pheophytin by fluorescence // *Deep-Sea Res.* 1963. V. 10. P. 221–231.

A Fluorometer Based on Powerful Light Emitting Diodes for Determining Chlorophyll “a” Concentration

V. V. Povazhnyi

A simple fluorometer for chlorophyll “a” (chl “a”) measurements in extracts, based on bright blue and IR-LEDs, that was used as an excitation source and detector, respectively, is described. Calibration and validation results of the instrumental data obtained in the extracts of different chl “a” concentration, are shown.