

基于多波长 LED 阵列激发的三维荧光光谱系统的设计与实现

司马伟昌¹ 张玉钧¹ 王志刚² 李宏斌¹ 赵南京¹ 陆志贤¹ 刘文清¹
(¹ 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 230031)
(² 中国科学技术大学地球和空间科学学院 安徽 230026)

摘 要 设计了基于多波长 LED 阵列作为激发光源的三维荧光光谱系统,利用单片机 AT89C52 控制 LED 阵列和光谱仪的步进电机,实现了数据的实时采集和光谱的实时显示。通过对 3 种荧光物质的 12 个不同浓度的样品进行荧光光谱测量,并对所得的数据组成的 EEM 谱进行解析,计算出各样品的浓度与实际浓度相符,验证了本系统在多组分分析中的可行性,同时 LED 光源的应用将为分析仪器的小型化和便携式提供新的发展方向。

关键词 三维荧光光谱(3D-EEM);多组分分析;AT89C52;步进电机

中图分类号 TH744.16

Design and Realization of 3D-EEM System Based on Multi-wavelength LED Array as Exciting Light Source

Sima Weichang¹, Zhang Yujun¹, Wang Zhigang², Li Hongbin¹, Zhao Nanjing¹, Lu Zhixian¹, Liu Wenqing¹
(¹ Key Lab of Environmental Optics & Technology, Anhui Institute of Optics and Fine Mechanics, Chinese Academy of Sciences, Anhui, 230031, China; ² School of Earth and Space Sciences, University of Science and Technology of China, Anhui, 230026, China)

Abstract In this paper, a new excitation-emission matrix (EEM) system with multi-wavelength light emitting diode (LED) array as exciting light source is introduced. In this system the LED array and the step motor are controlled by MCU (AT89C52) and the data are acquired and displayed in real time. The performance of the system has been tested using 12 samples of different concentration with three fluorescent dyes. The resolved results are agreement with the actual ones, which shows its feasibility in multicomponent analysis, at the same time, the application of LED gives a new way of miniaturized, handheld analytic instrument.

Key words three-dimension excitation emission matrix fluorescence spectroscopy; multicomponent analysis; AT89C52; step motor

1 引言

荧光光谱技术已被广泛应用于生物、物理、化学以及材料等领域,利用荧光方法可以确定生物大分子的结构,诊断生物体组织中的肿瘤^[1];可以对环境和工作场所有害的生物气溶胶进行监测^[2];可以进行水质的分析,对水体进行实时监测^[3]等。但传统的荧光计大多采用氙灯、激光器、汞灯作激发光源,不仅需要高压供电,且体积大、成本高,尤其不适合便携式仪器的研制。近年来,随着新的发光材料的成功研制和生产工艺的不断提高,各种超高亮的发光二极管不断出现,使得 LED 的发射波长扩展到了远紫外波段(200nm)。这些 LED 光源发光强度大,驱动电压低,功耗小,体积小,并且价格低廉。基于上述特点,LED

光源正越来越多地被应用于各种仪器的研制和开发。而 LED 作为激发光源的可行性也已经被证明,清华大学何树荣等人对绿光 LED 激发荧光做过专门研究^[4],中科院杨世植等人用单波长超亮蓝 LED 检测水中叶绿素 a 的浓度^[5]。文中介绍了一个 5 种不同波长的 LED 阵列作为激发光源的三维荧光光谱系统的设计与实现,并通过实验验证其在实际应用中的可行性。

2 系统介绍

2.1 系统基本结构

LED 阵列激发的三维荧光光谱系统的结构如图 1 所示。主要有(1)PC 机,(2)单片微控制器 AT89C52,

收稿日期:2006-08-30

基金项目:中国科学院知识创新工程重大项目(KGCX2-SW-111)和安徽省人才培养及科研带头人专项基金资助。

作者简介:司马伟昌,硕士研究生,主要从事光谱学和信号采集与处理研究。

(3)5 波长 LED 阵列,(4)聚焦透镜 I($f=30\text{mm}$),(5)样品池,(6)聚焦透镜 II($f=30\text{mm}$),(7)光谱仪,(8)PMT,(9)12 位 AD 采集卡(转换速率 800kHz)9 部分组成。系统中,激发光源为 5 个不同发射波长超高亮 LED(其中括号内为 LED 的中心波长和发射光强),蓝色 LED (453nm , 4600mcd),绿色 LED (525nm , 25000mcd),黄色 LED (581.5nm , 4100mcd),橙色 LED (593nm , 11000mcd),红色 LED (608.5nm , 9800mcd),直径均为 5mm ,5 个 LED 被紧凑的固化在圆形电路板上,样品池大小为 $30\text{mm} \times 30\text{mm} \times 60\text{mm}$ 。激发光通过聚焦透镜 I 聚焦在样品池上,在垂直 90° 方向上以另一个聚焦透镜 II 来收集荧光,将荧光聚焦到光谱仪狭缝入口,用光电倍增管探测进入狭缝的信号,通过 A/D 采集卡转化为数字信号,在 PC 机内有软件来实时显示。

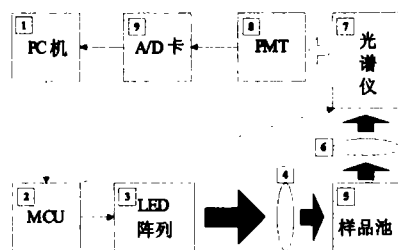


图1 三维荧光光谱系统的结构

2.2 系统的控制电路

系统的控制电路如图 2。

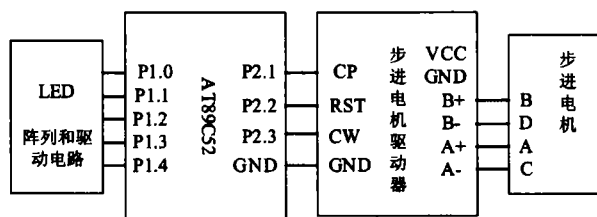


图2 系统的控制电路

2.2.1 LED 阵列的控制

由于 LED 在电压变化时主发射波长会有一定的漂移,这里选用厂家提供的参数,正向测试电流 $I_F = 20\text{mA}$,通过精密电阻分压得到相应的前向驱动电压,并对 5 个 LED 的实际发射波长和线宽作了重新测定。实验时利用软件通过串口发送命令给单片机 AT89C52 来切换 LED。对于每种样品,分别利用 5 个 LED 作为激发光源,通过光谱仪扫描每一个 LED 激发时的荧光发射谱。

2.2.2 光谱仪中步进电机的控制

光谱仪中光栅的转动需要步进电机来带动,步进电机是一种将电脉冲转化为角位移的部件。当步进

驱动器接收到一个脉冲信号,它就驱动步进电机按设定的方向转动一个固定的角度(及步进角)^[6]。可以通过控制脉冲个数来控制角位移量,从而达到准确定位的目的;同时可以通过控制脉冲频率来控制电机的转速和加速度,从而达到调速的目的。为了采集发射荧光的光谱信号,光谱仪中光栅的转动需要步进电机来带动,这里选用二相混合式步进电机(17HS001)和相应的步进电机驱动器(BQS-021)。步进电机驱动器在单片机控制下,为电机提供合适的输入脉冲,带动电机转动。由图 2 可以看出,步进电机驱动器的输入信号有(1)CP:时钟脉冲输入端(上升沿有效);(2)RST:急停复位;(3)CW:电机运转方向控制,通过控制该端子电平可改变电机运行方向;(4)HALF/FULL:电机运行方式选择,高电平时,电机半步运行;低电平时,电机整步运行;(5)GND,这里把 HALF/FULL 接 GND,电机整步运行。

单片机的整个控制程序利用 C51 语言编写,控制电路的流程如图 3。

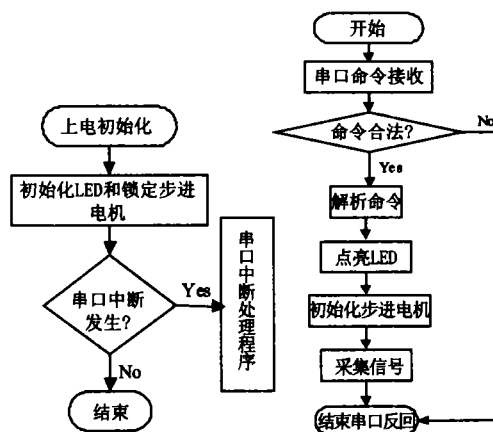


图3 主程序流程和串口中断处理

电源接通后先初始化 LED 阵列,锁定步进电机。当上位机与单片机通过 RS232 串口通讯协议发出指令,单片机串口中断接收指令点亮所需的 LED,同时判断电机正反转并计算出转动步数。执行转动过程中,步进电机每转动一步触发采集卡进行数据采集。采集完成以后 PC 机发指令给单片机,遮掩周而复始,连续测量时,上位机循环发送。

2.2.3 数据采集

为了使光电倍增管输出的模拟信号转化为数字信号并送往计算机进一步处理和实时显示,需要进行 A/D 转换和编写数据采集软件。系统选择精度为 12 位,采样速率为 800ksps 的数据采集卡 AC1820,光谱采集软件由 Delphi7.0 编写。在获取光谱时,上位机通过软件发送命令给 MCU 来切换 LED 和设置步进

电机的起始位置、停止位置、采样步长,同时设置采集卡的采样长度、采样速率等,通过 MCU 控制步进电机和软件触发数据采集卡得到光谱,图形化界面实时显示测量的原始光谱,并可保存为文件格式,便于数据的分析和处理。

3 实际应用

三维荧光光谱,也称为激发-发射矩阵谱(EEM谱)^[7],近年来被广泛应用在多组分分析中。本文用5个不同波长的LED作为光源,通过切换LED来改变激发波长,用光谱仪来获得不同激发波长激发分析物的发射荧光谱,得到三维的EEM谱,借鉴平行因子算法来解析各个组分的浓度^[8-9]。

实验中配制了3种荧光物质Fluorescein(激发波长494nm/发射波长512nm),Rhodamine 6G(526nm/555nm)和Rhodamine B(540nm/578nm)的12种不同浓度的样品,光谱仪测定400-699nm的荧光发射谱,步长为1nm,每一种样品在不同LED照亮下重复测量3次发射谱,取其平均值,用去离子水测量每一个LED点亮时的背景谱。两者相减来消除激发光散射的影响。通过对这12种样品进行测量,收集到一个5×300×12的三维数组(EEM谱),利用平行因子算法来反演。选取因子N(N为被分析混合物中所含物质的种类)的值,这里选N=3,解析结果与实际相符合,得到的3种物质的激发光谱,发射光谱和浓度轮廓,见图4。

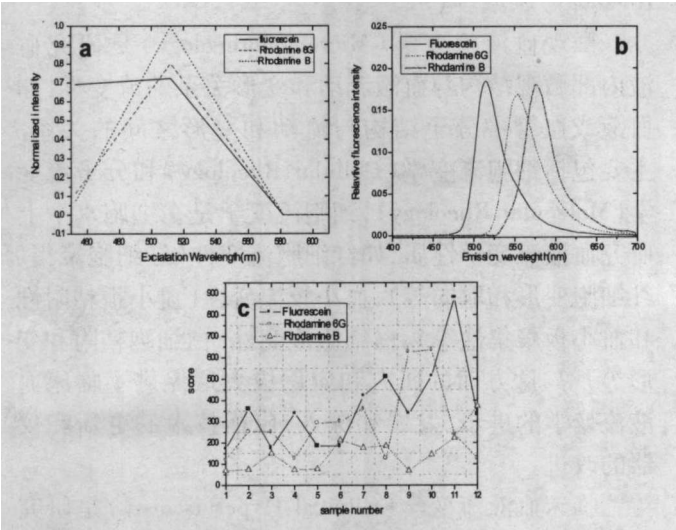


图4 利用3个因子的平行因子模型计算出的Fluorescein, Rhodamine 6G和Rhodamine B的(a)激发(b)发射和(c)浓度轮廓图

从图4(a)中可以看出三种分析物在蓝,绿LED所

在波长处激发效率比较高,这与三种荧光物质实际激发波长Fluorescein(494nm),Rhodamine 6G(526nm)和Rhodamine B(540nm)相吻合;图4(b)解析出的发射光谱与3种荧光物质的实际发射波长Fluorescein(512nm),Rhodamine 6G(555nm)和Rhodamine B(578nm)完全一致;图4(c)为12个样品中三种分析物的得分值曲线(浓度轮廓)。经过计算所得到的各种物质的浓度与实际浓度如下表1所示。

表1 计算浓度与实际浓度的比较

样品	Fluorescein		Rhodamine 6G		Rhodamine B	
	真实浓度 (μg/L)	计算浓度 (μg/L)	真实浓度 (μg/L)	计算浓度 (μg/L)	真实浓度 (μg/L)	计算浓度 (μg/L)
1	4	4.09	4	3.66	4	3.96
2	8	8.41	4	3.78	8	8.02
3	4	3.94	8	8.01	8	7.96
4	8	7.73	4	3.52	4	3.48
5	4	4.01	4	3.72	10	9.17
6	4	3.65	12	11.41	10	9.41
7	10	9.56	10	9.49	12	11.43
8	12	11.60	10	9.93	4	3.90
9	8	7.66	4	3.69	20	19.68
10	12	11.68	8	8.04	20	20.01
11	20	20.01	12	11.91	8	7.51
12	8	7.58	20	20.01	4	3.97

从上表可以看出Fluorescein, Rhodamine 6G和Rhodamine B计算浓度与实际浓度较吻合,说明多波长LED作为激发光源的三维荧光光谱系统在实际应用于多组分分析的可行性。实际应用大多具有目的性,可以通过多点采样,并对多个样品进行测试和分析,通过改变N值来解析具有不同N值的激发谱,发射谱和浓度值轮廓。由于根据激发和发射轮廓可以确定物质的种类,所以选择合理的N值,对应的浓度轮廓,即为各个采样点各个组分的浓度分布,所以此系统可望用于对大面积的水域进行水质分析和监测。

4 总结

本文主要介绍了基于多波长LED阵列作为激发光源的三维荧光光谱系统的设计与实现,并通过对3种荧光染料所配置的不同浓度的溶液进行测量,结合平行因子算法对各个组分的浓度进行解析,解析出的浓度令人满意。这证明了多波长LED组成的阵列完全可以和市售以脉冲氙灯,汞等作为光源的荧光分光光度计一样,在多组分分析中达到同样的效果,这对以后开发能耗低、小型化和便携式的分析仪器指明了方向。但系统还有待进一步优化,一方面(下接81页)

还对海藻、梅肉、大麦等食物对微血流的影响进行了研究,建议人们经常和有目的的服用健康食品。

利用血液流动性可视化装置可将高脂血症、高血压、脂肪肝等患者的微血流状况录像剪辑,对人们的生活方式进行健康引导,通过对患者的微血流状况的可视化直接观察,形象的引导人们;进行医学普及工作,建议人们保持健康的生活方式;进行健康饮食的引导,多食用如鱼类、豆类、茶、水果等食物^[10]。

血液流变学的可视化等新技术被广泛应用于临床和基础研究中,并得到不断发展,已不在是单独测定血液粘度、红细胞聚集等流变学指标。通过液晶显示屏观察并计算血流动态通过模拟毛细血管的时间,可直观观察红细胞变形能力、白细胞的黏附状况、血小板聚集等血液细胞形态,以及血流和模拟血管的关系。血液流动性可视化测定装置(MC-FAN)在日本已广泛用于预防医学、药物研究、疾病诊断和健康教育等领域,为大众健康咨询和健康教育提供了形象直观的影像,期待着血液流动性可视化测定装置在中国得到推广和应用。

参考文献

- [1] 刘剑刚,史大卓. 影响血液流变学的活血化瘀中药药物研究[J].

中国血液流变学杂志,2004,14(1):133-137

- [2] 刘剑刚,王丹巧. 第十二届日本血液流变学学术会议概要[J]. 中国血液流变学杂志,2006,16(3):495-496
- [3] 栗原毅,出口祥子,柳迟明子,等. 血液レオロジー測定装置 MC-FANの臨床應用. 日本ヘモレオロジー研究会誌. 2001,4:43-52
- [4] 高橋洋一,加藤順一,本間宏之,等. 脳血管障害患者における赤血球変形能. 日本ヘモレオロジー研究会誌. 1998,1(1):13-17
- [5] 井澤弘美,羽鳥有香,中山満美子等. 血液流動性と動脈硬化度、狭窄度および酸化ストレス度、抗酸化力の關係. 日本ヘモレオロジー研究会誌. 2005,12(12):60
- [6] 西嶋すき江,川合山恵子,井木和子. 緑黄色野菜、その他の野菜の攝取方法と血液レオロジーに関する研究. 日本ヘモレオロジー研究会誌. 2005,12(12):47
- [7] 川合山恵子,西嶋すき江,小泉幸道,等. ゴマおよび脱脂ゴマ粉末の微生物培養物にみられる血液機能改善効果について. 日本ヘモレオロジー研究会誌. 2005,12(12):46
- [8] 山浦由郎,盐入公子,风間悦子,等. プルーン果實による血液流動性の改善作用. 日本ヘモレオロジー研究会誌. 2005,12(12):65
- [9] 山本直人,菊池佑二. 茶類の血液流動性に及ぼす影響. 日本ヘモレオロジー研究会誌. 2000,3(12):109-111
- [10] 刘剑刚,何良志,王丹巧,等. 血液流变性的可视化测定方法及临床应用[J]. 微循环学杂志,2005,15(4):74-75

(上接77页)激发波长略显不足,可以增加波长不同 LED 的数量,弥补波长的不足,同时也可增加紫外 LED,因为在短波长能够被激发的物质很多;另一方面 LED 发散角有较大能量损失,为了减少能量损失,考虑利用光纤传输。

参考文献

- [1] 高淑梅,刘莹,骆晓森等,可见光诱导血液荧光光谱特性的研究,激光杂志,2002,23(5):71-72
- [2] Yong Le Pan, Patrick J. Cobler, Scott A. Rhodes et. al., Separating hazardous aerosols from ambient aerosols: role of fluorescence-spectral determination, aerodynamic deflector and pulse aerodynamic localizer, 2005, Proc. of SPIE Vol. 5990, 59900Y-1
- [3] 李宏斌,刘文清,张玉钧等,三维荧光光谱技术在水质监测中的应用,

光学技术,2006,32(1):27-30

- [4] 何树荣,徐洪峰,绿光 LED 激发荧光的研究. 光学技术,2002,28(1),9-10
- [5] 张彪,储焰南,杨世植等,发光二极管作为现场叶绿素荧光仪激发光源实验研究,量子电子学报,2003,20(4):472-476
- [6] 曹辉,张锁怀,基于可编程芯片的步进电机控制系统,机械设计与制造,2005,12:103-104
- [7] Chen Guochen, Huang Xianzhi et al. Fluorescence Analytical Method, Beijing: Science Press 1990
- [8] Sean J et al. Light emitting diode excitation emission matrix fluorescence spectroscopy, Analyst, 2002, 127:1693-1699
- [9] Michelle L. Nahorniak and Karl S. Booksh, Optimizing the implementation of the PARAFAC method for near-real time calibration of excitation-emission fluorescence analysis, Journal Of Chemometrics, 2003, 17:200-215