

文章编号: 1007-5461(2005)02-0169-04

# 叶绿素荧光仪中微弱荧光信号的探测

张玉平, 杨世植, 洪津, 张彪, 孟凡刚, 龚平, 张玉亮

(中国科学院安徽光学精密机械研究所, 安徽 合肥 230031)

**摘要:** 简要叙述了叶绿素荧光仪的物理机理, 详细介绍了将微弱荧光信号转换为具有较高信噪比的电压信号的电路设计。

**关键词:** 光谱学; 微弱信号检测; 锁相放大器; 荧光仪

**中图分类号:** O646.54      **文献标识码:** A

## 1 引言

水体中叶绿素的浓度反映了浮游植物的含量, 是环境保护部门监测水质状况的重要指标之一, 同时通过叶绿素浓度来估算海洋初级生产力也是海洋生态系统研究的重要内容。因此定量测量水体中叶绿素的浓度具有重要的现实意义。

由叶绿素的荧光特性知: 叶绿素在吸收特定波长 (440nm) 的激发光后会发射出比激发光波长更长 (685nm) 的荧光, 由 Lambert-Beer 定律, 可得

$$F = 2.3Y_F I_0 \epsilon c l, \quad (1)$$

其中:  $Y_F$  是荧光量子产率,  $I_0$  是入射光强,  $\epsilon$  是摩尔吸光系数,  $c$  是摩尔浓度,  $l$  是水体中光的吸收程长。可见辐射量  $F$  与叶绿素浓度  $c$  之间存在着一定的关系 (实际中我们利用实验室定标的方法来确定两者之间的关系)。叶绿素荧光仪 (以下简称“荧光仪”) 就是基于这个原理, 通过探测荧光的绝对辐射量来获得水体中叶绿素的浓度。

在非富营养化的水体中叶绿素的含量一般在  $1 \sim 10 \mu\text{g/L}$  范围内。荧光仪中的激发光源为 KS-430 超高亮蓝紫发光二极管 (light emitting diodes, 简称 LED), 其输出辐射量为  $1200 \mu\text{W}$ , 荧光信号小激发光 4 个数量级, 可见相对背景来说, 荧光信号是很微弱的。微弱信号检测 (weak signal detection, 简称 WSD) 可从两方面入手: 一方面是降低传感器及放大器的固有噪声。另一方面是分析噪声及信号规律, 通过各种手段从噪声中提取信号。我们主要从后一方面入手, 利用窄带化及相干检测技术实现 WSD。

## 2 探测电路的设计

将微弱的荧光信号转换为具有较高信噪比的电压信号是荧光仪设计中首要也是关键的工作, 探测电路要达到高灵敏度、低噪声、窄带宽的设计要求。根据这个要求, 电路设计原理框图如图 1 所示。我们采用调制技术来实现强背景光下对荧光信号的检测。振荡电路对激发光进行电调制, 同时产生锁相部分的参考信号。探测器 PMT 将荧光信号转换为电流信号, 经前置放大, 电流信号转换成电压信号, 再经锁相放大检出与调制光同频同相的有用信号并将其转换为直流电压信号, 通过后继处理电路加以分析, 得出结果。

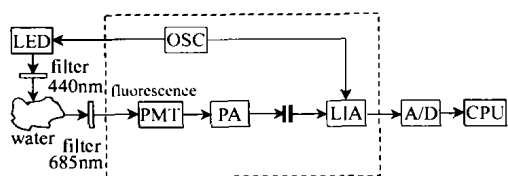


Fig.1 The block diagram of circuit design in fluorometer

探测电路主要由光电探测器、振荡电路、前置放大电路、锁相放大电路组成。下面重点介绍各部分的实现方法。

### 2.1 探测器的选择

选择一个适当的探测器是 WSD 的首要任务。光电倍增管 (PMT) 是最灵敏的光学辐射探测器, 这里我们选用南京电子管厂的 GDB-239 PMT 作为探测器, 其主要参数及阴极光谱响应曲线如图 2 所示: 可见其对荧光波长 (685nm) 有很好的响应, 其噪声等效功率  $NEP$  为  $5.7 \times 10^{-13}W$ 、归一化探测率  $D^*$  为  $9.83 \times 10^{11}cmHz^{1/2}W^{-1}$ , 具有较高的性价比。

主要参数:

阴极	光照灵敏度 ( $\mu A/lm$ )	Min.	10
		Typ.	30
阳极	光照灵敏度 (A/lm)	10	
	阳极电压 (V)	Typ.	1500
		Max.	1900
	暗电流 (nA)	Typ.	2000
	Max.	10000	
极	电流增益	$3.3 \times 10^5$	

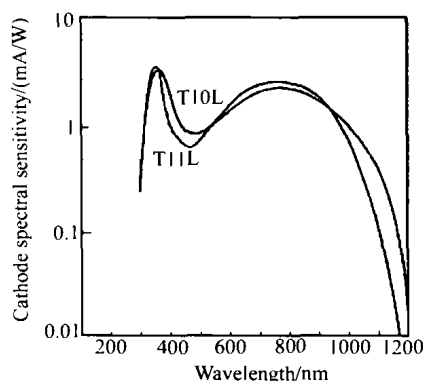


Fig.2 The primary parameter and cathode's spectral response of PMT.

### 2.2 振荡电路

由于背景光一般为慢变化的噪声可近似为直流, 为了从强噪声背景中可靠得检测出微弱的荧光信号, 我们首先采用调制技术, 用固定频率的方波对激发光进行调制, 由于叶绿素本身的荧光寿命很短 (约  $10^{-9}S$ ), 可将其看做同步激发, 因而荧光信号也为固定频率的交流信号, 从而在频域上区分荧光信号与背景噪声。

振荡电路用 CD4046 来实现, 振荡频率可调。电路有两路输出, 一路经 CMOS 管 IRF530 驱动后对激发光源进行调制, 另一路作为锁相放大电路的参考信号。

### 2.3 前置放大电路

PMT 将调制后的荧光信号转换为电流信号。前置放大电路应考虑噪声及稳定性以确保噪声小, 漂移小, 同时要满足增益、带宽要求。电路用 ICL7650 运放来实现, 避免了用负载电阻所引起的 PMT 线性偏差, 原理框图如图 3 所示: 该电路将信号进一步放大, 并实现  $I/V$  转换, 同时满足对噪声、带宽及增益的设计要求。

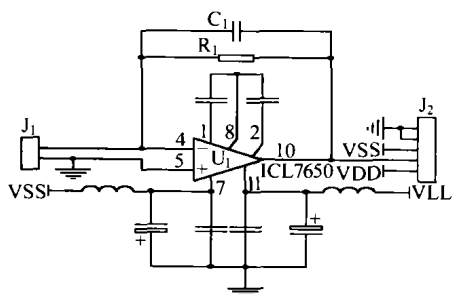


Fig.3 The block diagram of pre-amplifier.

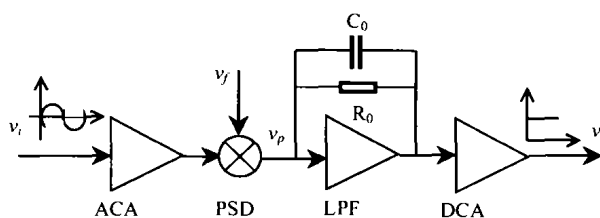


Fig.4 The block diagram of LIA.

输出电压  $U = -IR_1.$

加大反馈电阻  $R_1$ , 可提高前放的增益, 但  $R_1$  太大, 会影响电路的频率响应

$$U = \frac{I}{\frac{1}{R_1} + j\omega C_1} = \frac{IR_1}{1 + j\omega C_1 R_1}. \quad (3)$$

可见前放为一低通滤波器, 其信号截止频率

$$f = \frac{1}{2\pi R_1 C_1}. \quad (4)$$

$R_1$ 、 $C_1$  越大截止频率越低, 考虑到调制信号频率 660 Hz, 我们选择  $R_1$  为 70 k $\Omega$ 、 $C_1$  为 1000 pF。

#### 2.4 锁相放大电路

在光学中, 对频率和相位都进行区分的方法称为相干法, 这种检测叫相干检测。锁相放大器 (Lock-in amplifier, LIA) 是一种完成信号窄带化处理的相干检测系统, 是弱信号检测的成熟技术, 也正是该探测电路的核心。原理框图如图 4 所示。输入信号隔直后经交流放大再经相敏检波器 (Phase sensitive detector, PSD) 与参考信号混频后输出直流, 经低通滤波 (Low pass filter, LPF) 和直流放大后输出具有较高信噪比的电压信号。PSD 是 LIA 的心脏部件, 可看成为一个模拟乘法器, 设

$$v_i = V_i \cos(\omega t + \theta), \quad (5)$$

$$v_f = V_f \cos(\omega t), \quad (6)$$

$$\text{则输出: } v_p = v_i v_f = \frac{1}{2} v_i v_f \cos(\theta) + \frac{1}{2} v_i v_f \cos(2\omega t + \theta). \quad (7)$$

经 LPF 后, 第二项被滤除, 使输出为直流

$$v_0 = \frac{1}{2} V_i V_f \cos(\theta). \quad (8)$$

当  $\theta$  为零时, 即输入信号与参考信号没有相位差时, 此时输出幅值最大。实际应用中多为  $v_f$  为方波,  $v_i$  为正弦波的情况 (荧光信号经调制后为方波, 但经相当于 LPF 的前放后只剩下基波频率处的正弦波, 因此这里用正弦波信号代替), 相干检波原理分析同上, 经 LPF 后, 输出仍由式 (8) 表示。其基波频率  $f_R$  处的等效噪声 (半) 带宽

$$\Delta f_{N1} = \frac{1}{2R_0 C_0} = \frac{1}{2T_C}. \quad (9)$$

等效噪声带宽

$$B_N = \frac{1}{T_C} = \frac{f_R}{N}. \quad (10)$$

其中:  $T_C = R_0 C_0$ —LPF 的积分时间,  $N = R_0 C_0 f_R - T_C$  内的  $f_R$  周期数。其总带宽为各奇次谐波等效噪声带宽之和:

$$\Delta f_{NO} = \sum_{n=1}^1 \Delta f(2n+1) = \frac{\pi^2}{8} \Delta f_{N1} \approx 1.11 \Delta f_{N1}, \quad (11)$$

$$B_{NO} \approx \frac{1.11}{N} f_R. \quad (12)$$

系统的噪声抑制能力体现为信噪改善比 SNIR, 其定义为

$$SNIR = \frac{SNR_O}{SNR_I}. \quad (13)$$

即输出信噪比与输入信噪比的比值

$$SNIR = \sqrt{\frac{\Delta f_{NI}}{\Delta f_{NO}}} \quad (14)$$

$f_{NO}$  决定了仪器的信噪比。

电路中的 LPF 用 MAX270 来实现。PSD 用 MAX351 和 HA-OP27 来实现, 利用 MAX351 中四个单刀单掷模拟开关 (SPST) 实现数字同步检波, 放大电路用两块 AD526 实现。该电路的主要参数有: 电压放大倍数: 256, 带宽: 约 10 Hz, 输出直流电压幅值: 0~9 V。

### 3 结 束

对系统的信噪比进行估算, 由探测器感光面接收到的荧光功率与噪声等效功率的比值计算得:  $S/N=632$ ,  $20 \log(S/N)=56$  dB, 即使在叶绿素浓度 ( $0.1 \mu\text{g/L}$ ) 很低时, 系统仍具有较高的信噪比。多次实验结果表明, 该探测电路成功地检测出荧光信号, 稳定可行, 具有信噪比高、噪声低、带宽窄、测量精度高的优点, 满足设计要求, 完成了荧光仪中首要也是关键部分的设计工作。

#### 参考文献:

- [1] Zhang Biao, et al. Experimental study on LED as the Excitation resource of fluorometer for the in situ measurement of chlorophyll-a concentration in water [J]. *Chinese Journal of Quantum Electronics*(量子电子学报), 2003, 20(4): 472-476 (in Chinese).
- [2] Lin Lizhong, Song Min. *Introduction of Weak Signal Detection*(微弱信号检测学导论) [M]. Beijing: China Measure Press, 1996. 11-86 (in Chinese).
- [3] 比尤迪 W. *Applied Detector of Ray Radiation*(光辐射实用探测器) [M]. Beijing: Mechanical Industry Press, 1988. 152-193.
- [4] Hong Jin. The application of new techniques in near infrared field spectrometer [J]. *Anhui Geology*(安徽地质), 1979, 7(1): 34-38 (in Chinese).

## Detection of weak fluorescence signal in the chlorophyll fluorometer

ZHANG Yu-ping, YANG Shi-zhi, HONG Jin, ZHANG Biao,  
MENG Fan-gang, GONG Ping, ZHANG Yu-liang

( Anhui Institute of Optics and Fine Mechanics, Chinese Academy of Sciences, Hefei 230031, China )

**Abstract:** The physical mechanism of the chlorophyll fluorometer is simply introduced, and the electric circuit design for the conversion from weak fluorescence signal to voltage signal with high signal-to-noise ratio is described in detail.

**Key words:** spectroscopy; weak signal detection; lock-in amplifier; fluorometer

**作者简介:** 张玉平 (1979-) 女, 工学学士。现工作于中国科学院安徽光机所遥感研究室。