

УДК 543.07+543.552.054.1

## ФЛУОРИМЕТРИЧНИЙ АНАЛІЗАТОР НА ОСНОВІ УЛЬТРАФІОЛЕТОВИХ СВІТЛОДІОДІВ

**І. Пацай, Д. Воробець**

*Львівський національний університет імені Івана Франка,  
вул. Кирила і Мефодія, 6, 79005 Львів, Україна  
e-mail: patsay@mail.ru*

Розроблено електронну схему та сконструйовано робочий прототип флуориметра на основі мікроконтролера C8051F350. Доведено, що звичайні малопотужні ультрафіолетові світлодіоди можна успішно використовувати як джерела збуджувального випромінювання у флуориметрії. Пристрій обладнано двома детекторами випромінювання – кремнієвим фотоелементом та фотодіодом BPW34. Флуориметр успішно апробовано на розчинах флуоресцеїну. Підтверджено хорошу лінійність залежності інтенсивності флуоресценції від концентрації флуоресцеїну до  $10^{-5}$  моль/л. Розроблено методику визначення флуоресцеїну з нижньою визначуваною концентрацією  $10^{-7}$  моль/л.

*Ключові слова:* флуориметр, люмінесценція, люмінесцентний аналіз, флуоресценція, флуориметрія, ультрафіолетовий світлодіод, флуоресцеїн, мікроконтролер C8051F350.

Явище флуоресценції широко використовують у біології, медицині криміналістиці, гідрології та екології. Зокрема, за допомогою флуоресцеїну фарбують води в річках для відстеження напрямку потоку. Це явище також активно застосовують для відстежень витоків трубопроводів. Флуоресцентні реагенти використовують для аналізу забруднення навколишнього середовища (виявлення витоків нафти, масляних плівок у морях і океанах). Сьогодні відомі флуоресцентні методи контролю якості природної і питної води [1], харчових продуктів [2], технологічних розчинів [3].

Стрімкий технічний прогрес у приладобудуванні привів до появи високоточного, надійного та зручного у використанні аналітичного устаткування. Однак для багатьох вітчизняних лабораторій – як промислових, так і навчальних, – воно недоступне через високу ціну, тому єдиною альтернативою є власноручне створення приладів з порівняно недорогих електронних компонентів. Наша мета – розробити схему, виготовити робочий прототип та апробувати флуориметр на основі УФ світлодіодів (як джерела збудження), кремнієвого фотодіода (як детектора) та мікроконтролера з системою аналого-цифрового перетворення (як ресстратора інтенсивності флуоресценції).

Для досягнення достатньої інтенсивності ультрафіолетового випромінювання прилад обладнано вісьмома УФ світлодіодами NT-333UPC [4] – по чотири з двох протилежних боків кюветотримача. Максимум емісії світлодіода простежується при 392 нм (табл. 1), чого достатньо для збудження флуоресценції багатьох реагентів, зокрема флуоресцеїну.

З метою одержання порівняльних характеристик ми вирішили обладнати флуориметр одночасно двома детекторами випромінювання – фотодіодом BPW34 та фотоелементом, який демонтовано з сонячної батареї на основі полікристалічного кремнію (рис. 1).

Таблиця 1

Номінальні характеристики світлодіода HT-333UPC

Характеристика	Значення
Матеріал напівпровідника	InGaN
Інтенсивність випромінювання	0,12 кд
$\lambda_{\text{max}}$	392 нм
Напруга	3,3 В
Струм	20 мА

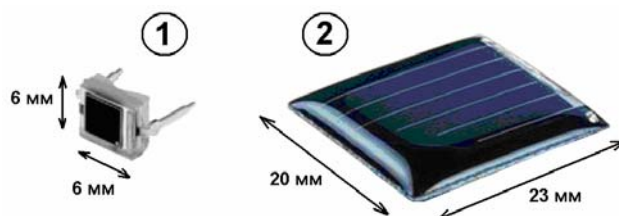


Рис. 1. Детектори випромінювання – фотодіод (1) та фотоелемент (2).

Детектори розташовано з протилежних боків кюветотримача під кутом  $90^\circ$  до напрямку опромінення кювети УФ випромінюванням (рис. 2). Геометрія кюветотримача унеможливує пряме потрапляння УФ випромінювання світлодіодів на фотоелементи. Вибір активного детектора виконують перемикачем на корпусі приладу.

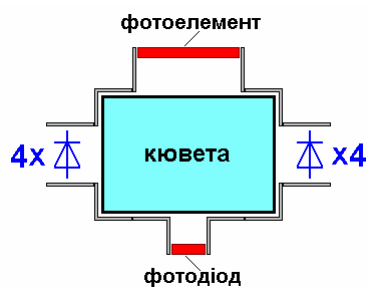


Рис. 2. Розташування детекторів та світлодіодів щодо кюветотримача.

Для здешевлення флуориметра ми вирішили не використовувати окрему мікросхему аналого-цифрового перетворювача (АЦП) для вимірювання фотоструму, а вибрали мікроконтролер, який, окрім цифрових компонентів, містить високоточний дельта-сигма АЦП на 24 двійкові розряди – С8051F350 американської компанії Silabs [5].

Індикацію числового значення інтенсивності флуоресценції виконано за допомогою двох семисегментних трирозрядних індикаторів FУТ-3631BD-21 [6] зі спільними анодами. Восьмий сегмент (розділювач цілої та дробової частини числа) у схемі не використовують, оскільки шестирозрядний діапазон умовних одиниць інтенсивності флуоресценції, який становить 0...999999, цілком достатній для забезпечення високої точності індикації результату вимірювання.

Стабілізатор струму УФ світлодіодів виготовлено на основі мікросхеми LM317 [7]. Ця схема забезпечує близько 125 мА сумарного струму для живлення восьми світлодіодів НТ-333UPC – близько 15 мА на кожен (рис. 3). Ми спеціально знизили струм світлодіодів (номінальне значення – 20 мА) для досягнення вищої стабільності і довготривалості їхньої роботи.

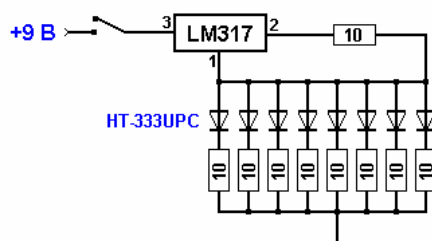


Рис. 3. Схема стабілізатора струму УФ світлодіодів.

Мікроконтролерна частина схеми флуориметра показана на рис. 4. Більшість портів P0 та P1 мікроконтролера задіяно для динамічної індикації інтенсивності флуоресценції. Обмеження струму всіх сегментів індикатора реалізовано за допомогою резисторів 200 Ом. Для підвищення точності аналого-цифрового перетворення ми вирішили відмовитись від внутрішнього джерела опорної напруги, а натомість увели в схему прецизійне джерело 2,5 В на мікросхемі LT1009 [8]. Для усунення високочастотних шумів на вході АЦП встановили фільтр нижніх частот на основі резистора 1 кОм та керамічного конденсатора 0,1 мкФ. Захист входу АЦП від перевищення напруги понад допустимий максимум (3,3 В) реалізовано за допомогою білого світлодіода.

Перетворення та підсилення фотоструму детекторів виконано на основі перетворювача струм–напруга за допомогою прецизійного операційного підсилювача ОР07. Коефіцієнт перетворення становить 47 мВ/мкА (див. рис. 4). Вибір потрібного фотодетектора (фотоелемент чи фотодіод) відбувається за допомогою двопозиційного перемикача. Тактування мікроконтролера реалізовано на основі внутрішнього тактового генератора на 24,5 МГц.

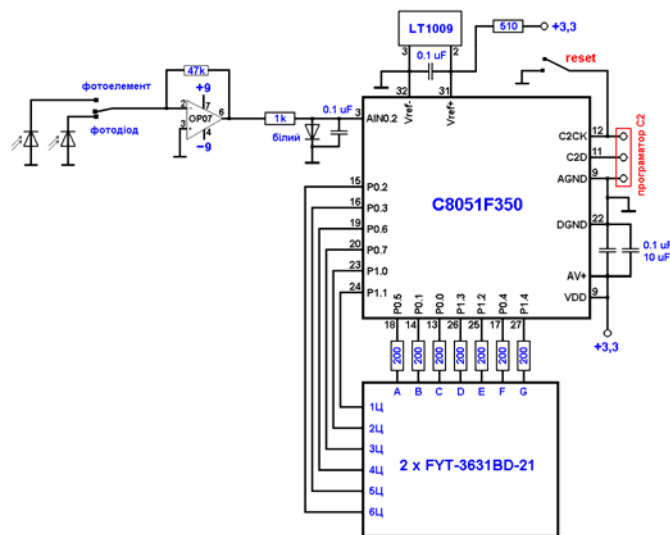


Рис. 4. Мікроконтролерна частина схеми флуориметра.

Більшість електронних компонентів, які використано в схемі флуориметра, є в мініатюрних SMD корпусах для поверхневого монтажу. Вибір таких компонентів дав змогу суттєво мінімізувати розміри друкованої плати та корпусу приладу. Мережевий трансформатор разом зі схемою блока живлення вмонтовано в окремому корпусі з вишкою під розетку 220 В. Кюветотримач виготовлено з чорного пластику під стандартну скляну кювету із зовнішніми розмірами 36×24 мм. Усі компоненти флуориметра змонтовано у пластиковому корпусі розміром 130×130 мм з металевою кришкою. На передній панелі приладу розташовано індикатор і кнопку reset, якою задають команду виміряти інтенсивність флуоресценції. На бічній панелі розташовано роз'єм живлення та вмикач УФ джерела, а на задній – перемикач для вибору детектора (фотоелемент/фотодіод). Щоб уникнути потрапляння світла від семисегментного індикатора на фотодетектори, ми встановили пластикову перегородку між друкованою платою та кюветотримачем приладу.

Для визначення фонових сигналів та з'ясування рівня бічної “засвітки” фотодетекторів унаслідок розсіювання УФ випромінювання світлодіодів ми виконали серію замірів (по десять паралельних значень) без флуоресцентної речовини (табл. 2).

Таблиця 2

Значення сигналу фотодетекторів без флуоресцентної речовини (за десятьма паралельними вимірюваннями)

Умови	Сигнал фотодетектора, умовн. од. (відносна похибка)	
	Фотоелемент	Фотодіод
Без кювети	965±5 (0,52%)	1265±5 (0,40%)
Порожня кювета	4815±23 (0,48%)	2260±9 (0,40%)
Кювета з дистильованою водою	2001±10 (0,50%)	447±2 (0,45%)

Джерела УФ випромінювання розташовані у флуориметрі так, щоб уникнути прямого потрапляння світла на фотодетектори. Ненульовий сигнал без кювети, імовірно, зумовлений відбиттям випромінювання світлодіодів від стінок кюветотримача. Доволі суттєвий сигнал у випадку встановленої порожньої кювети, мабуть, спричинений заломленням/відбиттям світла на межі скло–повітря. Однак, цей сигнал значно зменшується, коли кювету заповнено водою – у 2,4 раза для фотоелемента і в понад 5 разів для фотодіода. Загалом відтворюваність результатів вимірювання інтенсивності є високою, що зумовлює незначну відносну похибку 0,4–0,5%.

Для апробації розробленого флуориметра ми вимірювали інтенсивність флуоресценції розчинів флуоресцеїну. З'ясовано, що в межах концентрації цієї речовини до  $5 \cdot 10^{-6}$  М простежується хороша лінійність залежності аналітичного сигналу (рис. 5). Нижня визначувана концентрація флуоресцеїну, яку розраховано за статистичною формулою згідно з [9], становить  $1,3 \cdot 10^{-7}$  і  $1,0 \cdot 10^{-7}$  моль/л для фотоелемента та фотодіода, відповідно.

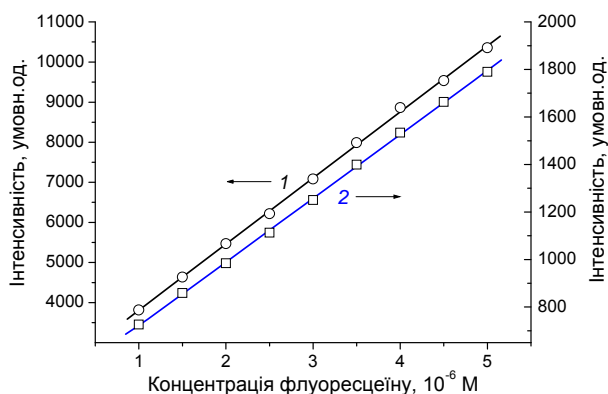


Рис. 5. Залежність інтенсивності флуоресценції від концентрації флуоресцеїну. Детектори: 1 – фотоелемент; 2 – фотодіод.

У нижчому діапазоні концентрацій ( $< 5 \cdot 10^{-7}$  М) відтворюваність аналітичного сигналу значно гірша, що, імовірно, зумовлено недостатньою чутливістю фотодетекторів. Якщо концентрація флуоресцеїну перевищує  $5 \cdot 10^{-5}$  М, то простежується концентраційне гасіння флуоресценції, що призводить до погіршення лінійності залежностей інтенсивності від концентрації (рис. 6).

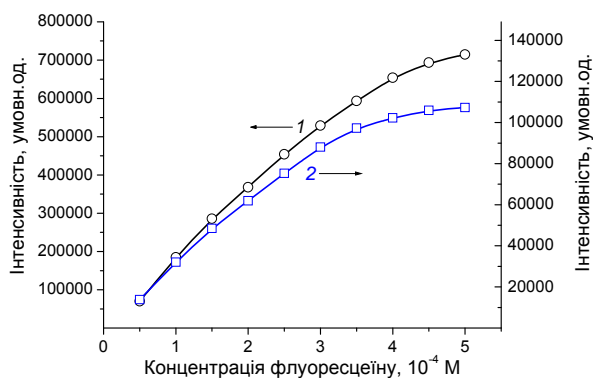


Рис. 6. Залежність інтенсивності флуоресценції від концентрації флуоресцеїну. Детектори: 1 – фотоелемент; 2 – фотодіод.

За оптимальних концентраційних умов розроблено методику флуориметричного визначення флуоресцеїну. Аналітичні характеристики методики наведено у табл. 3.

Методику перевірено способом уведено–знайдено. Одержано хорошу відповідність між уведеними та знайденими значеннями концентрації флуоресцеїну, що свідчить про правильність методики.

Таблиця 3

Характеристики	Значення для різних фотодетекторів	
	фотоелемент	фотодіод
Рівняння графіка	$I = a + b \cdot C_{\text{фл}}$ , де $C_{\text{фл}}$ , $10^{-6}$ моль/л	
Параметр $a$	2165	452
Надійний інтервал $\Delta a$	120	15
Параметр $b$	1648	268
Надійний інтервал $\Delta b$	36	4,5
Коефіцієнт кореляції $R$	0,99971	0,99982
Нижня межа визначення, М	$1,3 \cdot 10^{-7}$	$1,0 \cdot 10^{-7}$
Межі лінійності, М	$1 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-5}$	

Оскільки сумарне споживання приладу є доволі низьким (до 200 мА), то його можна легко переробити у портативний варіант із автономним живленням від акумуляторів чи одноразових гальванічних елементів. З огляду на простоту конструкції та низьку собівартість розробленого флуориметра можна стверджувати, що це доволі простий і ефективний спосіб апаратного забезпечення для реалізації флуориметричних аналізів, які не потребують надто високої чутливості та точності. Зокрема, такий прилад можна успішно використовувати для визначення флуоресцеїну у природних, особливо підземних, водах, де його широко застосовують як флуоресцентний індикатор у разі вивчення напрямів поширення таких вод та їхніх динамічних показників.

1. *Кобылянский В. Я.* Флуориметрический биосигнализатор токсичности воды // Вестн. Харьков. политехн. ун-та. 1998. Вып. 25. С. 153–156.
2. *Коцеев А. К., Лившиц О. Д., Добросердова И. И.* Люминесцентный анализ пищевых продуктов. Пермь: ПКИ, 1974.
3. *Гришаева Т. И.* Методы люминесцентного анализа. СПб.: НПО “Профессионал”, 2003.
4. [http://www.e-voron.dp.ua/files/pdf/led/Harvateck/HT-333UPC\(1\).pdf](http://www.e-voron.dp.ua/files/pdf/led/Harvateck/HT-333UPC(1).pdf)
5. <http://www.alldatasheet.com/view.jsp?Searchword=C8051F350>.
6. <http://www.alldatasheet.com/view.jsp?Searchword=FYT-3631>.
7. <http://www.alldatasheet.com/view.jsp?Searchword=LM317>.
8. <http://www.alldatasheet.com/view.jsp?Searchword=LT1009>.
9. *Дёрффель К.* Статистика в аналитической химии. М.: Мир, 1994.

## FLUORESCENT ANALYZER BASED ON ULTRAVIOLET LEDS

**I. Patsay, D. Vorobec'**

*Ivan Franko National University of Lviv,  
Kyryla & Mephodiya Str., 6, 79005 Lviv, Ukraine  
e-mail: patsay@mail.ru*

Fluorescent analyzer based on ultraviolet leds have been designed. The device contains eight LEDs with a peak emission at 392 nm and two detectors – silicon photodiode and photocell with polycrystalline silicon. The light from an excitation source strikes the sample solution in glass cuvette. The fluorescent light reaches a detectors, which are placed at 90° to the incident light beam to minimize the risk of transmitted or reflected incident light reaching the detectors.

For fluorescence measurements we have developed schematic and prototype based on microcontroller C8051F350 which contains a 24-bit delta-sigma analog-to-digital converter. Also this microcontroller contains programmable gain amplifier and internal reference voltage source at 2.5 V. The internal reference voltage source thermal stability has not high accuracy so we decided to use external reference voltage source LT1009.

First, the current from the detector is converted by “current-to-voltage” converter based on operational amplifier OP07 and is input to the ADC of the microcontroller. The coefficient of “current-to-voltage” converter is 47 mV/1 uA and is based on 47 kOhm resistor.

The fluorometer displays of measurement results of the fluorescence intensity by two 3-digits 7-segment LED displays which are connected directly to the microcontroller ports through the 200 Ohm resistors.

The fluorometer was successfully tested on determination of fluoresceine in aqueous solutions. The detection limit is  $1.0 \cdot 10^{-7}$  mol/L.

*Key words:* fluorescence, fluorometer, analytical signal, measuring, determination, C8051F350 chip, fluoresceine.

Стаття надійшла до редколегії 02.11.2015

Прийнята до друку 12.01.2016