

doi: 10.3788/gzxb20164502.0212005

小球藻溶液浓度与吸收系数的同时测量

吴军¹, 桑明煌¹, 周行², 王贤平¹, 徐猛¹

(1 江西师范大学 物理与通信电子学院, 南昌 330022)

(2 南昌师范学院 物理系, 南昌 330022)

摘 要: 为得到高准确度的小球藻浓度, 利用空芯金属包覆波导作为测量腔对小球藻进行测量. 利用自由空间耦合技术激发含有小球藻溶液的空芯金属包覆波导中超高阶导模, 通过检测超高阶导模的衰减全反射吸收峰位置和反射极小值 R_{\min} 的变化, 实现了小球藻溶液浓度和吸收系数的同时测量. 该方法不仅可检测 10^{-9} mol 量级的小球藻浓度, 而且具有测量成本低、操作方便等优点.

关键词: 小球藻; 高阶导模; 空芯金属包覆波导; 吸收系数

中图分类号: S122

文献标识码: A

文章编号: 1004-4213(2016)02-0212005-5

Simultaneous Measurement of Chlorella Solution Concentration and Absorption Coefficient

WU Jun¹, SANG Ming-huang¹, ZHOU Hang², WANG Xian-ping¹, XU Meng¹

(1 College of Physics & Communication Electronics, Jiang Xi Normal University, Nanchang 330022, China)

(2 Department of Physics, Nanchang Normal University, Nanchang 330022, China)

Abstract: To achieve high accuracy of chlorella concentration measurement, using the hollow-core metal-cladding waveguide as the measuring chamber for chlorella measurement. Ultrahigh order modes was excited to detect the concentration of chlorella with the free space coupling technique, by monitoring the position and the reflection minimum R_{\min} of the attenuated total reflection peak of ultrahigh order mode, the concentrations and the absorption coefficients of chlorella solution for the different light wavelength were simultaneously detected. The novel technique is not only achieving detection to 10^{-9} mol chlorella solution, but also have the advantages of low measuring cost and easy operation, etc.

Key words: Chlorella; Ultrahigh order modes; Hollow-core metal-cladding waveguide; absorption coefficients

OCIS Codes: 230.7390; 280.1415; 300.7370

0 引言

小球藻是一种具有全面均衡营养价值的微生物, 在其体内含有大量的营养物质如蛋白质、脂肪、维生素等, 因此小球藻被广泛地应用于医药保健^[1]、动植物养殖、食品加工等与生活息息相关的领域. 对小球藻的培养和技术分析在日常生活和生产领域具有重要的应用价值. 在诸多研究中, 小球藻浓度的测量尤为重要, 因为小球藻的浓度过高会抑制它的代谢过程使得生长受到严重的影响^[2], 浓度过低达不到实际所需要的生产

价值^[3]. 所以在小球藻的养殖和分析过程中, 浓度测量是一个关键的因素.

目前, 对于小球藻浓度测量的方法一般分为球藻细胞计数的直接测量法和叶绿素 a 浓度测量的间接测量法. 直接测量方法主要用显微记数和流式细胞仪计数这两种^[4-5]. 间接测量法有分光光度法^[6]、高效液相色谱法 (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)^[7-8] 和荧光光谱法^[9]. 但这些方法存在着以下不足之处: 1) 测量时间长, 实时性差; 2) 步骤繁琐耗时; 3) 测量结果误差大和测量仪器造价高等. 在当前需要高

基金项目: 国家自然科学基金 (No. 61265001) 和江西省教育厅科技项目 (No. GJJ13237) 资助

第一作者: 吴军 (1989-), 男, 硕士研究生, 主要研究方向为导波光学. Email: wujun_email@sina.cn

导师 (通讯作者): 桑明煌 (1965-), 男, 教授, 主要研究方向为导波光学. Email: sangqdli@aliyun.com

收稿日期: 2015-04-20; 录用日期: 2015-11-24

<http://www.photon.ac.cn>

检测灵敏度及短时间测试的严格要求下,这些方法的应用变得很有限,因此需要研制一些新的测量技术克服这些不利因素.近年来,基于光学等离子体共振(Optics Plasmon Resonance, OPR)的应用检测液体浓度的方法被越来越多的人所关注,它们的灵敏度较非共振技术高、反应快、尺寸小,而且重复稳定性高.据报道的方法包括表面等离子体共振(Surface Plasmon Resonance, SPR)^[10],长程表面等离子体(Long-range Surface Plasmon Resonance, LRSR)^[11],这些技术的共同特征就是受检测样品均处于衰减波传送区域内,所在的区域是一种平面共振结构,样品通过处理才能种植在金属表面上.然而,基于灵敏度分析^[12-13]的研究结果表明,大部分光学衰减波传感器依然因各种原因而使灵敏度受到极大的限制.这些原因包括:1)样品所在区域内光功率密度的受限;2)待测样品的折射率总是低于共振模的有效折射率;3)迅衰场的穿透深度短使得大的被测物超出感知区域,导致系统灵敏度进一步不足;4)对于微米量级的生物体的测量,迅衰场就显得无能为力了,因此利用迅衰场测量的局限很突出.

超高阶导模(Ultrahigh-Order Modes, UOM)是一种对环境变化非常灵敏的共振波^[14],特别对环境的折射率和消光系数的变化非常的灵敏^[15],然而折射率和消光系数与物质的浓度有着密不可分的关系,物质浓度的改变会导致折射率和消光系数发生改变.在空芯金属包覆波导(Hollow-Core Metal-cladding Waveguide, HCMW)中,由于有效折射率可存在于 $0 < N < 1$ 区域,所以能够利用自由空间耦合技术激发超高阶导模.利用空芯金属包覆波导中的超高阶导模已经对饮用水中六价铬离子和草甘膦农药作了检测,结果都已达到 10^{-9} mol量级^[16-17].本文把小球藻溶液注入空芯金属包覆波导管体里,随着小球藻浓度的改变,可以明显地观察到超高阶导模的变化.由于超高阶导模的衰减全反射吸收峰(Attenuated Total Reflection, ATR)的位置和 R_{\min} 的变化,直接对应溶液的折射率和消光系数的变化.因此,根据这些数据可以精确测量小球藻溶液的浓度.利用空芯金属包覆波导中的超高阶导模测量小球藻溶液的浓度,是一种纯液相,不需要复杂的固相偶联工艺和大型仪器,并且具有极高的灵敏度.利用空芯金属包覆波导中的超高阶导模测量小球藻溶液的浓度将在食品安全、环境保护和生命医学等领域得到应用.

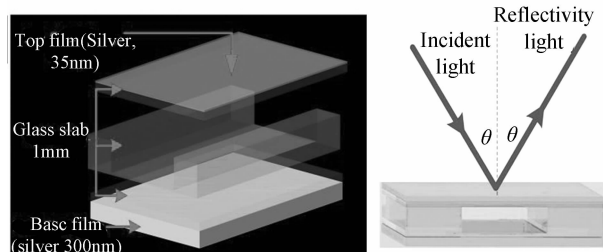
1 材料与实验方法

1.1 实验材料和主要芯片

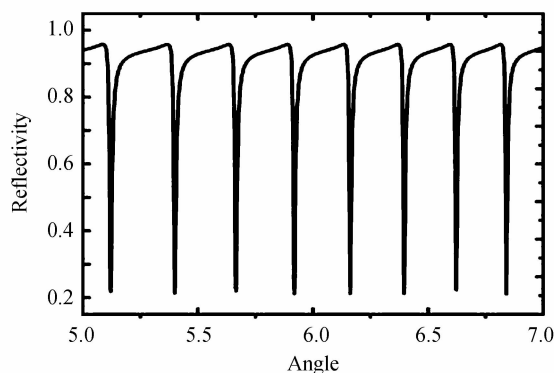
实验所需材料有小球藻,离子水等.

主要芯片为双面金属包覆波导,如图1(a)所示,双面金属包覆波导是一个毫米级别大小的三层结构,从

上到下依次是:上层金属覆盖层,厚度约为20 nm,中间为毫米量级的导波层,下层为金属衬底,厚度约为300 nm,厚度薄的一面作为耦合层.当入射光照射在耦合层上,达到耦合角时,光耦合进入波导腔中^[18-19],光场强度和分布出现明显的增强和重新按照一定结构排列.



(a) Hollow-core metal-cladding waveguide experimental system



(b) The ultrahigh-order modes simulation graphic between incidence angle and refractive

图1 空芯金属包覆波导原理图和所得到的高阶导模
Fig. 1 Hollow-core Metal-cladding waveguide experimental system and experiment result

光波导的一些参量与高阶导模的形成的关系,可以根据波导的色散方程^[20]进行描述,该色散方程根据电磁场的边界条件获得

$$k_0 h \sqrt{n^2 - N^2} = m\pi \quad (1)$$

式中, $k_0 = 2\pi/\lambda$ 为真空中的波数, h 和 n 分别是覆盖层的厚度和波导层中的折射率. $N = \beta/k_0$ 是有效折射率, β 是传播系数, m 是模式序数.

光场限制在金属与介质间的正反射界面之间,从而导致有效折射率小于自由空间耦合的折射.有效折射率小于1甚至接近0,因此在1 mm厚的波导管内通常可以形成了 $10^2 \sim 10^3$ 模式的高阶导模,如图1(b)所示,其中传播过程中的相移是很小的量,这里可以忽略.对于高阶导模,不仅对折射率的微小变化有很显著的反应,而且对消光系数的变化也是有很高的灵敏度.

1.2 灵敏性分析

根据光波导特性,反射率可以表示为^[21]

$$R_{\min} \propto \left\{ 1 - \frac{4\text{Im}(\beta^0)\text{Im}(\Delta\beta^0)}{[\text{Im}(\beta^0) + \text{Im}(\Delta\beta^0)]^2} \right\} \quad (2)$$

式中 $\text{Im}(\beta^0)$ 表示的是本征损耗, $\text{Im}(\Delta\beta^0)$ 表示的是辐

射损耗. $\beta^0 = k_0 N = k_0 n_0 \sin \theta$, β_0 是导模的传播常量, N 为有效折射率, θ 为入射角, $k_0 = 2\pi/\lambda$ 是真空中波数. 当波导的本征损耗与辐射损耗相等时, 即

$$\text{Im}(\beta^0) = \text{Im}(\Delta\beta^0) \quad (3)$$

由式(3)可以得到 $R_{\min} = 0^{[22]}$.

由波导的微扰方程和本征方程可以得到传播常量的变化为^[23]

$$\Delta\beta^0 \propto i \frac{k_0^2 n_{1r} n_{1i}}{\beta} \quad (4)$$

式(4)中 n_{1r} 是导波层中的折射率, n_{1i} 是导波层中的消光系数.

当样品中的浓度发生改变时, 样本溶液的折射率

也随之发生改变, 衰减全反射峰的位置和高度发生了改变. 所以可以根据衰减全反射峰的变化来得到样本溶液浓度的变化.

图2为实验过程的原理. 从装有不同浓度的小球藻的烧杯中, 分别用不同的注射器抽出小球藻样品, 并做好浓度标记. 把装有不同浓度的小球藻溶液的注射器依次注入到样品腔中, 样品腔由导管联通, 有入口和出口组成, 小球藻溶液从入口注入, 出口处流出. 然后通过含有空芯金属包覆波导传感芯片的检测装置, 检测出不同浓度的衰减全反射峰的位置, 进而分析出小球藻溶液的浓度, 实现对于不同浓度的小球藻的浓度测量.

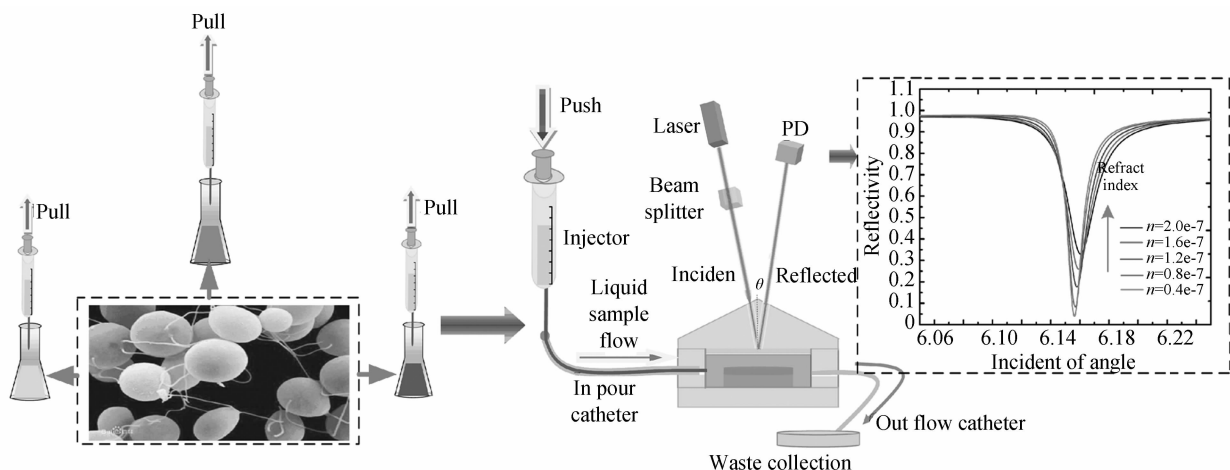


图2 不同浓度小球藻的测量过程

Fig. 2 The measurement of different concentrations of chlorella

1.3 实验装置

图3为实验装置图. 为激发空芯金属包覆波导的超高阶导模, 利用固体激光器中的激光束以特定光学角度射入顶部银薄膜. 实验期间, 为使被测物稳定性的温度保持在室温状态, 在激光前面增加了一个衰减器, 以降低单元室内的热效应. 样品试剂通过注射器注入单元室并由出口管从单元室内抽出. 使用计算机控制 $\theta/2\theta$ 角度仪进行角度扫描. 光电二极管检测反射光束强度, 然后根据光束射入角记录衰减全反射峰的变化.

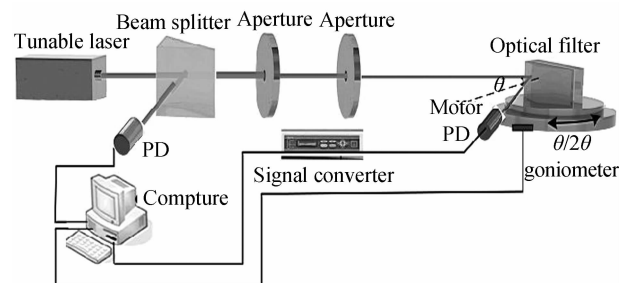
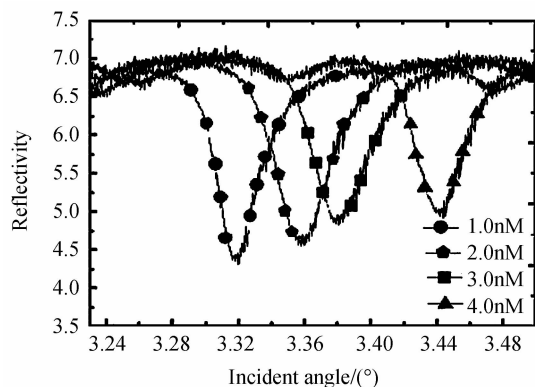


图3 利用 650 nm 激光作为探测光所得到的实验结果

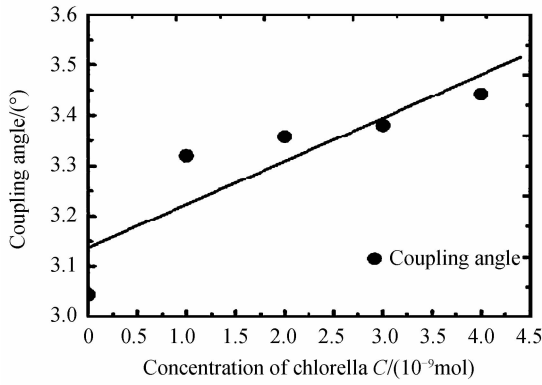
Fig. 3 The result of the experiment in case of 650 nm laser

2 分析

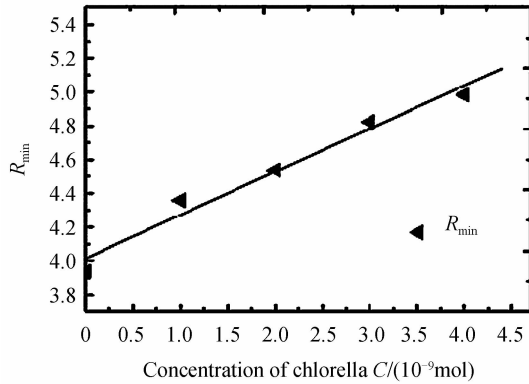
实验发现, 采用不同波长的激光将会得到不一样的折射率和消光系数. 图4(a)是利用 650 nm 激光作为探测光, 得到小球藻浓度在 $1.0 \times 10^{-9} \sim 4.0 \times 10^{-9}$ mol/L 范围内的衰减全反射吸收图像. 其中, 耦合角的变化范围为 $3.13 \sim 3.53^\circ$, 最小折射率



(a) The ATR absorption peaks of different concentrations of chlorella



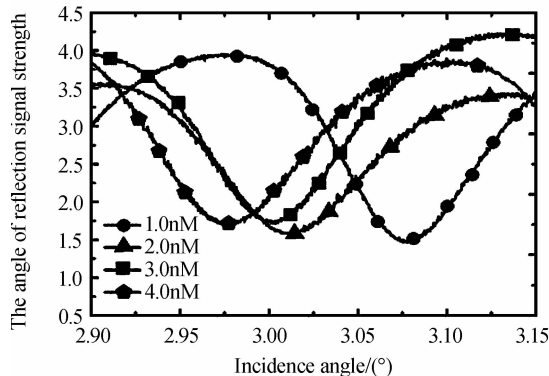
(b) The fitting figure of coupling angle and chlorella concentration



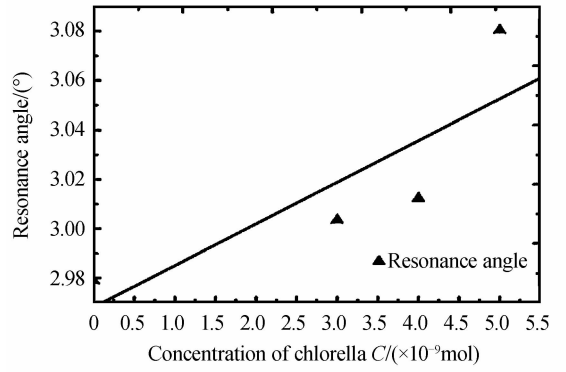
(c) The fitting figure of R_{min} and chlorella concentration

图4 利用650 nm激光作为探测光所得到的实验结果
 Fig. 4 The result of the experiment in case of 460 nm laser
 衰减全反射峰变化范围为4.01~5.10.从衰减全反射峰的左右移动可以测得折射率的变化,如图4(b)所示,折射率的变化函数为 $y = (3.13808 \pm 0.06618) + (0.08549 \pm 0.02702)C$.由衰减全反射最小峰的上下移动可知消光系数的变化图.图4(c)反映了衰减全反射峰和小球藻浓度之间的关系,由图可知消光系数的函数是 $y = (4.0172 \pm 0.06618) + (0.08549 \pm 0.02702)C$.

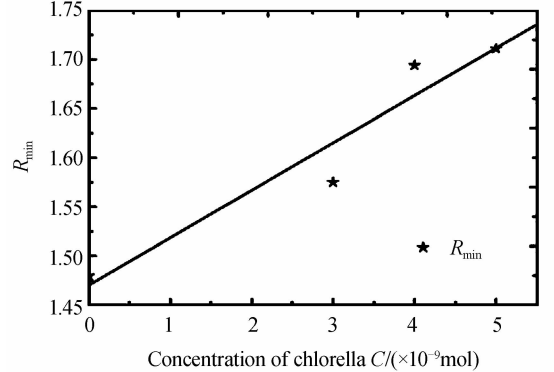
图5是利用473 nm激光作为探测光所得到的实验结果.从图5中可以得出,所测小球藻浓度同样可达到 10^{-9} mol 浓度级别.不同波长的激光下折射率和消光系数都发生了变化,对于得出小球藻浓度结果是相同.由图5(b)、(c)可知用473 nm激光作为探测光实验



(a) The ATR absorption peaks of different concentrations of chlorella



(b) The fitting figure of coupling angle and chlorella concentration



(c) The fitting figure of R_{min} and chlorella concentration

图5 利用473 nm激光作为探测光所得到的实验结果
 Fig. 5 The result of the experiment in case of 473 nm laser
 所得到的小球藻浓度结果和用650 nm激光做为探测光的所得到小球藻浓度结果是一致的.

3 结论

本文给出了一种简单方便又灵敏的测量小球藻浓度的方法.空芯金属包覆波导作为传感器利用其超高阶导模的特性来提高检测的灵敏度,通过同时测量折射率和消光系数的变化从而测出小球藻浓度的变化.此方法对于测量低浓度的微生物提供了更精确的方法,可达到 10^{-9} mol 浓度级别,对于小球藻的培养和研究都有一定的价值,这种方法也适用于其他低浓度微生物溶液的测量.

参考文献

- [1] KONG Wei-bao, LI Long-nan, ZHANG Ji, *et al.* Healthcare functions and applications in food industry of chlorella[J]. *Food Science*, 2010, **31**(09): 323-329.
孔维宝,李龙困,张继,等.小球藻的营养保健功能及其在食品工业中的应用[J]. *食品科学*, 2010, **31**(09): 323-329.
- [2] FABREGAS J, OTERO A, MORALES E D. Modification of the nutritive value of phaeodactylum triocumtum for Artemia sp. in semicontinuous cultures[J]. *Aquaculture*, 1998, **169**(3): 167-176.
- [3] WANG Chang-hai, SUN Ying-ying. Effect of fed-batch culture on growth and biological compounds contents of isochrysis galbana[J]. *Transactions of Tianjin University*, 2008, **41**(2): 142-146.
王长海,孙颖颖.流加培养对球等鞭藻生长和生化成分的影响[J]. *天津大学学报*, 2008, **41**(2): 142-146.

- [4] SUN Shu-cun, LU Jian-jian, ZHANG Li-hua. Applications of flow cytometer in ecological studies of nano- and pico-phytoplankton[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2000, **19**(01): 72-78.
孙书存, 陆健健, 张利华. 流式细胞仪在微型浮游植物生态学中的应用[J]. *生态学杂志*, 2000, **19**(01): 72-78.
- [5] BODDY L, MORRIS C W, WILKINS M F, *et al.* Identification of 72 Phytoplankton species by radial basis function neural network analysis of flow cytometric data [J]. *Marine Ecology-Progress Series*, 2000, **195**: 47-59
- [6] PAN Jing-yang, ZHAO Zhi-xu, *et al.* Concentration prediction of chlorella vulgaris beij by visible spectrophotometer [J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2014, **42**(25): 8504-8505.
潘竞洋, 赵之旭, 吴良柏, 等. 用分光光度计预测小球藻藻液浓度的研究[J]. *安徽农业科学*, 2014, **42**(25): 8504-8505.
- [7] GUI Lin, SHI Xian-ming. Determination of Lutein in chlorella pyrenoidosa by high performance Liquid chromatography[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2005, **31**(11): 95-97.
桂林, 史贤明. 高效液相色谱法测定蛋白核小球藻中的叶黄素[J]. *食品与发酵工业*, 2005, **31**(11): 95-97.
- [8] ZAPATA M, RODRIGUEZ F, GARRIDO J L. Separation of chlorophylls and carotenoids from Marine Phytoplankton : a new HPLC method using a reversed phase C8 column and Pyridine-containing mobile phases[J]. *Marine Ecology-Progress Series*, 2000, **195**: 29-45.
- [9] WANG Zhi-gang, LIU Wen-qing, ZHANG Yu-jun, *et al.* The phytoplankton classified measure based excitation fluorescence spectra technique[J]. *China Environmental Science*, 2008, **28**(4): 329-333.
王志刚, 刘文清, 张玉钧, 等. 基于激发荧光光谱的浮游植物分类测量方法[J]. *中国环境科学*, 2008, **28**(4): 329-333.
- [10] NYLANDER C, LIEDBERG B, LIND T. Gas detection by means of surface plasmon resonance[J]. *Sensors and Actuators*, 1982, **3**: 79-88.
- [11] HUANG C J, DOSTALEK J, SESSITSCH A, *et al.* Long-range surface plasmon-enhanced fluorescence spectroscopy biosensor for ultrasensitive detection of e. coli O157:H7[J]. *Analytical Chemistry*, 2011, **83**(3): 674-677.
- [12] YEATMAN E M. Resolution and sensitivity in surface plasmon microscopy and sensing[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 1996, **11**(6-7): 635-649.
- [13] CHIEN F C, CHEN S J. A sensitivity comparison of optical biosensors based on four different surface plasmon resonance modes[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2004, **20**(3): 633-642.
- [14] XIAO Ping-ping, WANG Xian-ping, SUN Jin-jin, *et al.* Biosensor based on hollow-core metal-cladding waveguide[J]. *Sensors and Actuators A:Physical*, 2012, **183**: 22-27.
- [15] LU Hai-feng, CAO Zhuang-qi, LI Hong-gen, *et al.* Study of ultrahigh-order modes in a symmetrical metal-cladding optical waveguide[J]. *Applied Physics Letters*, 2004, **85**: 45-49.
- [16] WANG Yang, HUANG Mei-zhen, GUAN Xiang-yu, *et al.* Determination of trace chromium (VI) using a hollow-core metal-cladding optical waveguide sensor[J]. *Optics Express*, 2013, **21**(25): 31130-31137.
- [17] DAI Hai-lang, SANG Ming-huang, *et al.* Determination of trace glyphosate in water with a prism coupling optical waveguide configuration[J]. *Sensors and Actuators A: Physical*, 2014, **218**: 88-89.
- [18] XIAO Ping-ping, QI Min, HU Hong-wu, *et al.* Wavelength sensing research base on Goos-Hanchen displacement effect [J]. *Acta Photonica Sinica*, 2011, **40**(10): 1595-1598.
肖平平, 戚珉, 胡红武, 等. 基于古斯-汉欣位移效应的波长传感研究[J]. *光子学报*, 2011, **40**(10): 1595-1598.
- [19] LI Hong-gen, SHEN Qi-shun, CAO Zhuang-qi, *et al.* Direct coupling for double metal-cladding waveguides[J]. *Acta Optica Sinica*, 2002, **22**(6): 665-669.
李红根, 沈启顺, 曹庄琪, 等. 双面金属包覆介质波导的直接耦合方法[J]. *光学学报*, 2002, **22**(6): 665-669
- [20] CAO Zhuang-qi. Dispersion equation of inhomogeneous planar optical waveguides[J]. *Acta Optica Sinica*, 1994, **14**(11): 1223-1226.
曹庄琪. 非均匀平板波导的色散方程[J]. *光学学报*, 1994, **14**(11): 1223-1226.
- [21] WANG Yi, CAO Zhuang-qi, YU Tian-yi, *et al.* Enhancement of the superprism effect based on the strong dispersion effect of ultrahigh-order modes[J]. *Optics Letters*, 2008, **33**(11): 1276-1278.
- [22] LI Xiang, CAO Zhuang-qi, SHEN Qi-shun, *et al.* Anisotropy in thermo-optic coefficient of different polymer systems by attenuated total reflection configuration [J]. *Chinese Physics Letters*, 2006, **23**(4): 998-1001.
- [23] 曹庄琪. 《导波光学》[M]. 北京: 科学出版社, 2007, 103-105.