

ФИЗИЧЕСКИЕ ПРИБОРЫ ДЛЯ ЭКОЛОГИИ, МЕДИЦИНЫ, БИОЛОГИИ

УДК 53.084:57.087

ЛЮМИНОМЕТР. ПРИНЦИП РАБОТЫ, УСТРОЙСТВО И РЕКОМЕНДАЦИИ ПРИ СБОРКЕ

© 2023 г. Р. В. Малышев^{а,*}, Е. В. Силина^{а,**}

^аИнститут биологии Коми научного центра УрО РАН
Россия, 167982, Сыктывкар, ул. Коммунистическая, 28

*e-mail: malrus@ib.komisc.ru

**e-mail: silina@ib.komisc.ru

Поступила в редакцию 13.07.2022 г.

После доработки 14.10.2022 г.

Принята к публикации 10.11.2022 г.

Описано устройство и принцип работы люминометра, предназначенного для определения концентрации пероксида водорода в водных растворах посредством измерения интенсивности светового потока. Обозначены ключевые моменты, на которые следует обратить внимание при изготовлении прибора. Описаны результаты лабораторных испытаний, согласно которым в диапазоне концентраций пероксида водорода от 0.12 до $1.95 \cdot 10^{-6}$ М сохраняется линейная зависимость ($r^2 = 0.97$) интенсивности сигнала от концентрации H_2O_2 . Представлены результаты измерения содержания пероксида водорода в листьях пшеницы в процессе деэтиоляции.

DOI: 10.31857/S0032816223020234, EDN: GTQJWI

ВВЕДЕНИЕ

Хемилюминесценция (Хл) – процесс излучения квантов света в видимом диапазоне при протекании химической реакции. В основе этого явления лежит образование продукта химического взаимодействия, один из электронов которого находится на более высоком энергетическом уровне и стремится вернуться на основной энергетический уровень, реализуя избыточную энергию в виде светового излучения. Процесс Хл имеет важное прикладное значение и используется для наблюдения за сложными химическими и биологическими процессами путем регистрации излучаемого света.

В 40-х годах XX столетия немецкие ученые В. Лангенбек и У. Руге впервые использовали процесс Хл для определения содержания пероксида водорода (H_2O_2) в водных растворах [1]. Метод основан на реакции взаимодействия люминола (5-амино-2,3-дигидро-1,4-фталазиндион) и H_2O_2 в присутствии катализатора. Авторы наблюдали свечение, которое оценивали визуально в темной комнате. В настоящее время регистрацию Хл проводят с помощью специальных приборов – люминометров. Данное оборудование применяется достаточно широко и характеризуется высокой чувствительностью и исключительной специфичностью [2–5].

На рынке представлен широкий ассортимент люминометров как узкоспециализированных:

3M Clean-Trace NG (3M PELTOR, Великобритания), EnSURE™ Touch (HYGIENA, Великобритания), Lumat LB 9508 (“Berthold technologies”, Германия), так и более универсальных, например Lum-100 (МГУ, Россия), AutoLumatPlus LB 953 (“Berthold Technologies”, Германия). Следует отметить, что данное оборудование относится к дорогостоящим. Например, цена люминометра Lumat LB 9508 находится в диапазоне от 0.5 до 1.3 млн рублей. Зачастую приобретение прибора из каталога является затруднительным, в результате исследователь лишается возможности получения оригинальных данных и вынужден применять менее селективные методы. Выходом из сложившейся ситуации является самостоятельное изготовление люминометра. Однако, кроме привлечения квалифицированных специалистов, необходима подробная информация об устройстве и изготовлении люминометра. К сожалению, в настоящее время в свободном доступе данная литература отсутствует.

В настоящей работе представлены рекомендации по изготовлению люминометра, описаны его конструкция и результаты лабораторных испытаний.

КОНСТРУКЦИЯ ПРИБОРА И РЕКОМЕНДАЦИИ ПО СБОРКЕ

Предлагаемая нами конструкция люминометра реализована в виде единого модуля (рис. 1), ра-

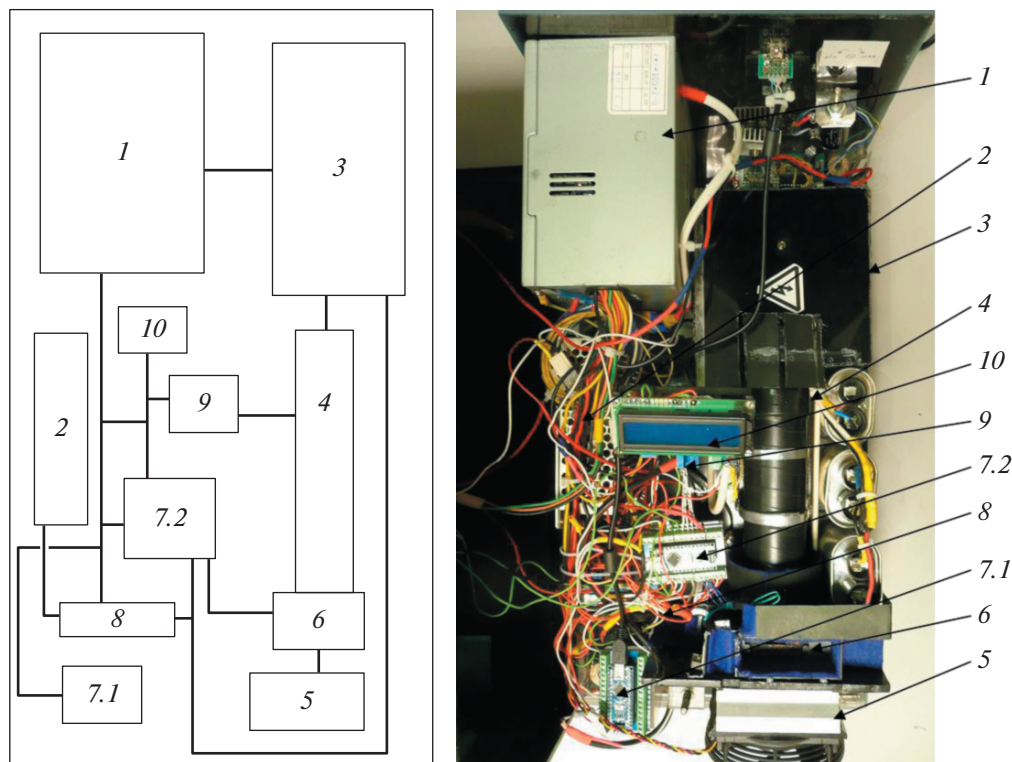


Рис. 1. Блок-схема и внутреннее расположение блоков люминометра (вид сверху). 1 – источник питания основных компонентов схемы; 2 – источник питания термостата; 3 – высоковольтный источник питания ФЭУ; 4 – ФЭУ; 5 – термостат; 6 – кюветодержатель; 7.1 – ведущий микроконтроллер (master); 7.2 – ведомый микроконтроллер (slave); 8 – блок реле; 9 – блок усилителя сигнала с ФЭУ; 10 – информационное табло (LCD-дисплей 1602).

бота которого обеспечивается следующими функционально объединенными блоками.

Детектор малых световых потоков. Ключевым элементом люминометра является детектор светового излучения – фотоэлектронный умножитель (ФЭУ), реализованный на основе ФЭУ-39А (Россия) и резисторного делителя (рис. 2). Выбор

данной модели ФЭУ связан с оптимальным сочетанием габаритных размеров, стабильности работы, высокой световой анодной чувствительности ($S_a = 1000 \text{ А/лм}$) и низкого соотношения шум/сигнал.

Высоковольтный источник питания ФЭУ. Для обеспечения работы ФЭУ нами выбран источник постоянного высокого напряжения, состоящий из

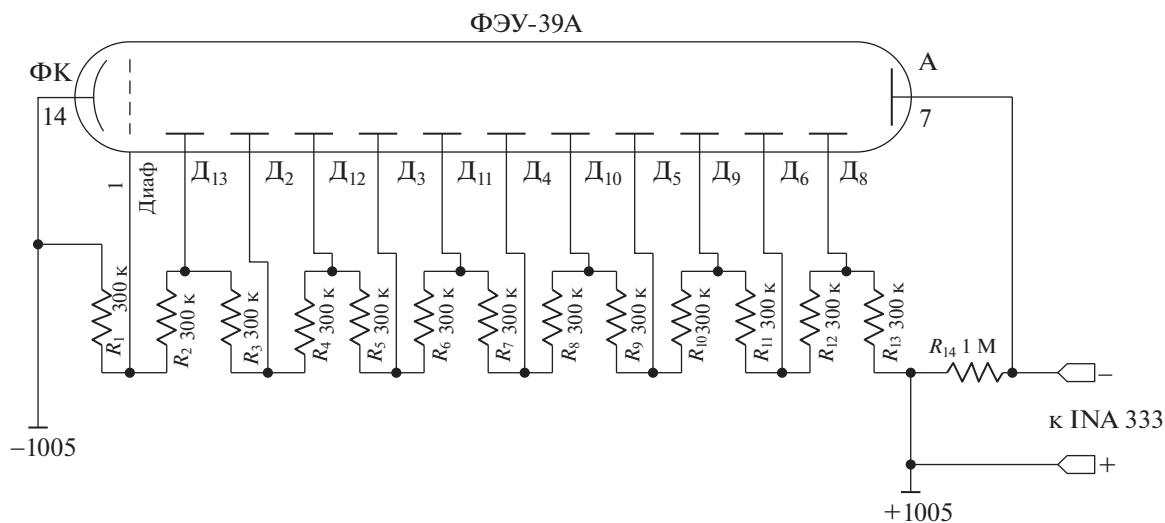


Рис. 2. Принципиальная схема подключения резисторного делителя к ФЭУ-39А. ФК – фотокатод, Д – диод, А – анод.

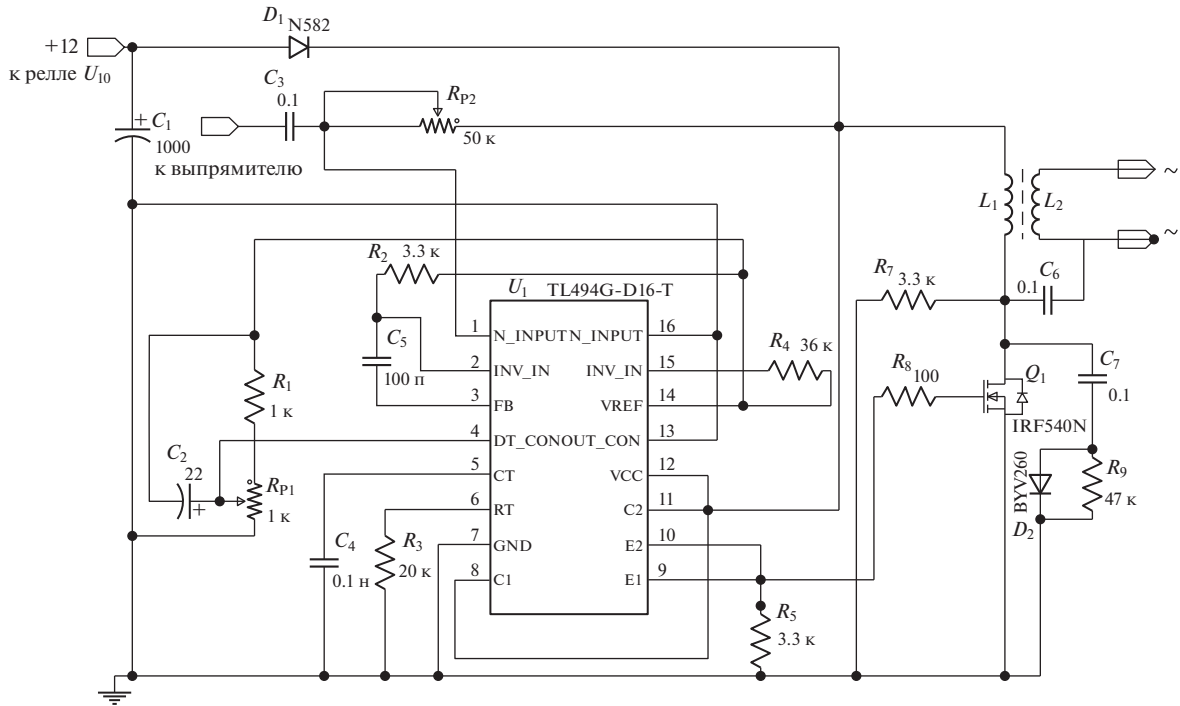


Рис. 3. Принципиальная схема высоковольтного источника питания.

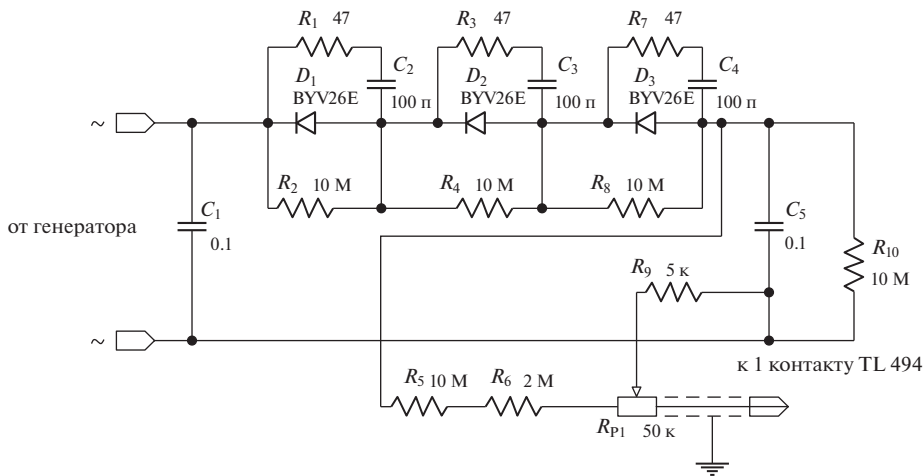


Рис. 4. Принципиальная схема высоковольтного выпрямителя.

источника высокого переменного напряжения, выпрямителя и удвоителя напряжения. Источник высокого переменного напряжения собран по схеме обратного импульсного источника питания с обратной связью на микросхеме TL494 (рис. 3). Высокочастотный трансформатор изготовлен на основе ферритового сердечника (ХЕРЕХ Е 140166 хРВ-5 class 130 (b)). Для повышения стабильности напряжения питания ФЭУ в высоковольтном блоке питания реализована обратная связь посредством контроля высокого напряжения на выходе высо-

ковольтного выпрямителя (рис. 4). Настройка обратной связи осуществляется подстроечными резисторами (R_{P2} на рис. 3 и R_{P1} , на рис. 4). Для снижения нагрузки на высокочастотный трансформатор и повышения надежности работы импульсного блока в схеме использован удвоитель напряжения, обеспечивающий питание ФЭУ (рис. 5). Данная конструкция высоковольтного источника питания позволяет поддерживать напряжение питания ФЭУ в заданных пределах 950 ± 10 В.

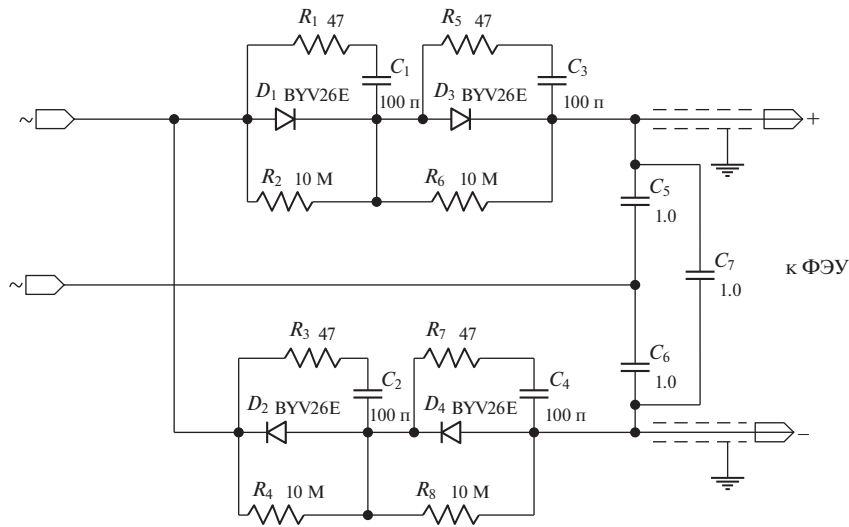


Рис. 5. Принципиальная схема высоковольтного удвоителя напряжения.

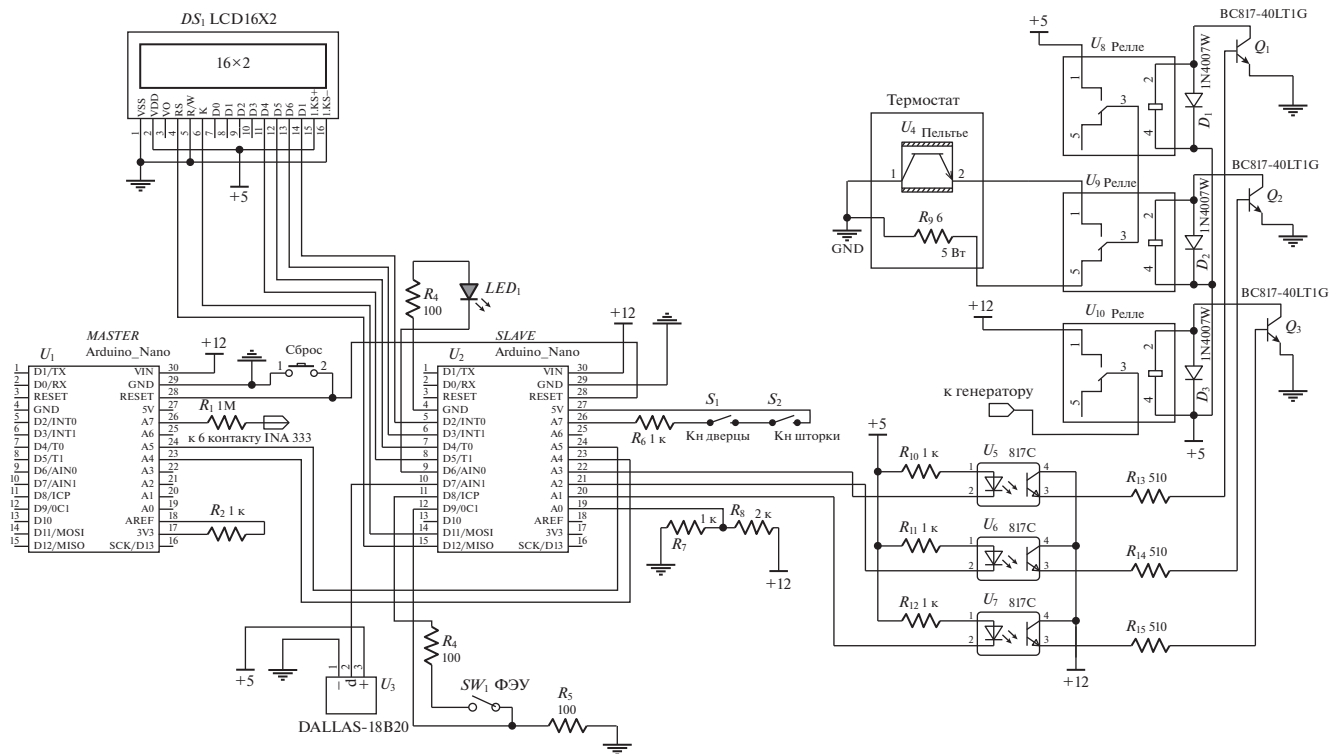


Рис. 6. Принципиальная схема блока микроконтроллеров, блока реле и термостата.

Источник питания основных компонентов схемы предназначен для обеспечения работы блока микроконтроллеров, блока усилителя сигнала, блока реле, LCD-дисплея и высоковольтного источника питания ФЭУ. Реализован данный источник питания на основе блока питания персонального компьютера (ПК) мощностью 300 Вт. Применение блока питания от ПК наиболее рационально, поскольку это решение удовлетворя-

ет таким требованиям, как компактность, мощность, наличие шин питания 5 и 12 В.

Источник питания термостата. В качестве источника питания термостата использован импульсный блок NES-50-5 (“Mean well”, Тайвань).

Кюветодержатель выполнен из медных пластин, к которым жестко прикреплены элемент Пельтье и керамический резистор.

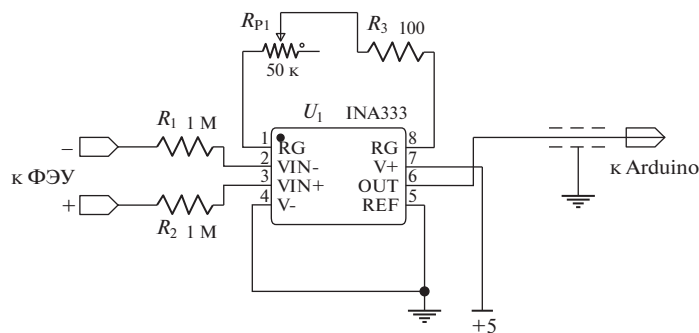


Рис. 7. Принципиальная схема усилителя сигнала ФЭУ на базе INA 333.

Блок микроконтроллеров состоит из двух плат “Arduino nano” (Китай) (рис. 6). Плата ведущего микроконтроллера (master) оцифровывает и передает поступивший сигнал в ПК по USB-интерфейсу. Кроме оцифровки и передачи сигнала, в задачи ведущего микроконтроллера входит прием от ПК и передача на ведомый микроконтроллер (slave) значений температуры термостата. Плата ведомого микроконтроллера отвечает за контроль параметров прибора и его аварийное отключение.

Блок усилителя сигнала. В качестве усилителя использован инструментальный усилитель INA 333 (“Texas Instruments”, США, рис. 7).

Блок реле состоит из трех нормально замкнутых 1-канальных модулей реле “Arduino” (U8, U9, U10 на рис. 6) и необходим как коммуникационное устройство для управления нагрузкой (блок питания термостата, термостат, высоковольтный источник питания).

Информационное табло. Использован LCD-дисплей (модель 1602, Китай), основная функция которого – информирование оператора о параметрах работы прибора.

Термостат используется для поддержания заданного температурного режима в кювете. Он содержит следующие компоненты: кюветодержатель, охладитель – элемент Пельтье (U4 на рис. 6), нагреватель – керамический резистор (R_9 на рис. 6).

В процессе разработки конструкции и принятия решения о расположении блоков следует, в первую очередь, отталкиваться от расположения центральной части прибора: термостата, кюветодержателя, детектора. В нашем случае данные компоненты расположены горизонтально в одну линию. Такое расположение блоков позволяет улучшить эргономику прибора (отсутствие выступающих частей), торцевое расположение ФЭУ по отношению к позиции кюветы в кюветодержателе нивелирует риск попадания рабочих растворов на высоковольтную часть детектора.

Близкое расположение блоков неминуемо повышает их взаимовлияние, в связи с этим важно

обеспечить защиту от помех. Реализация помехозащищенности заключается в экранировке проводников цифровых и аналоговых сигналов, а также в светозащите детектора. Дополнительно для защиты ФЭУ в приборе необходимо применять механическую “шторку”, с помощью которой оператор закрывает торцевую фотоприемную часть ФЭУ перед открытием дверцы. Шторка является важным элементом схемы прибора, благодаря которому обеспечивается непрерывность работы ФЭУ.



Рис. 8. Внешний вид люминметра (вид сверху). 1 – кнопка включения прибора, 2 – кнопка перезагрузки микроконтроллеров, 3 – переключатель включения ФЭУ, 4 – информационное табло (LCD-дисплей), 5 – крышка блока кюветодержателя и термостата, 6 – отверстие для внесения растворов, 7 – рукоятка управления шторкой.

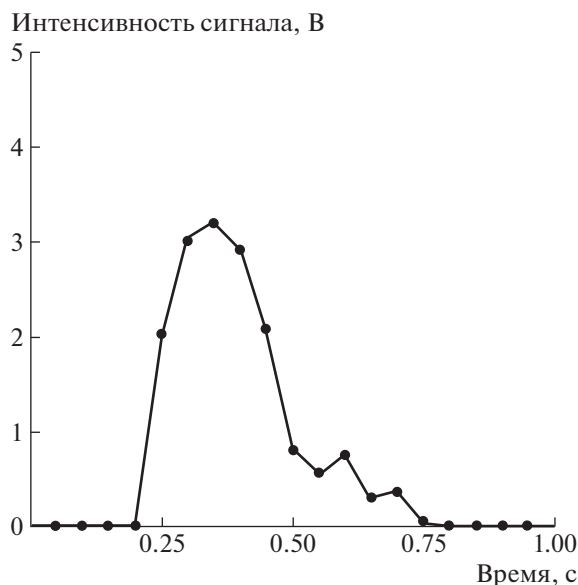


Рис. 9. Изменение интенсивности сигнала в процессе хемилюминесцентной реакции.

Для снижения влияния скачков напряжения на работу ФЭУ питание детектора осуществляется от отдельного источника. При сопряжении низковольтных и высоковольтных блоков для исключения высоковольтного пробоя следует использовать высокоомные сопротивления (R_1 на рис. 6 и R_1, R_2 на рис. 7).

Применение в приборе двух микроконтроллеров, работающих в режиме master-slaver, позволяет разгрузить ведущий микроконтроллер и увеличить скорость передачи информации в ПК.

Для повышения стабильности работы необходимо обеспечить выравнивание потенциалов между блоками прибора посредством использования для питания общего отрицательного контакта, что уже реализовано в источнике питания основных компонентов схемы. Выравнивание потенциалов между высоковольтными и низковольтными блоками осуществляется посредством высоковольтного конденсатора C_5 (см. рис. 3).

В конструкции прибора предусмотрена возможность внесения жидких сред в кювету в процессе измерения (рис. 8, отверстие для внесения растворов). Канал для внесения растворов выполнен из пластикового капилляра, изогнутого в форме колена. Коленчатая форма канала предотвращает засветку ФЭУ в момент внесения раствора в кювету.

АЛГОРИТМ РАБОТЫ ПРИБОРА

Рассмотренная конструкция прибора, внешний вид которого представлен на рис. 8, предполагает следующий алгоритм работы. Запуск источника пи-

тания основных компонентов обеспечивает включение ведущего и ведомого микроконтроллеров и усилителя сигнала с ФЭУ. На этапе инициализации микроконтроллеров проходит самотестирование прибора, и при обнаружении ошибки микроконтроллер (slave) останавливает запуск прибора и информирует оператора об ошибке на экране LCD-дисплея. В случае положительного результата самотестирования блок микроконтроллеров через блок реле дает разрешение на запуск источника питания термостата и выполнение программы термостатирования, подается питание на ФЭУ, осуществляется передача данных в порт "mini-usb" и на информационное табло. Ведомый микроконтроллер включает реле питания высоковольтного источника, подающего напряжение на ФЭУ. Образованная на контактах ФЭУ разность потенциалов фиксируется блоком усилителя сигнала с ФЭУ и передается на ведущий микроконтроллер, который в свою очередь оцифровывает сигнал и отправляет его в порт USB ПК. Выходной сигнал ФЭУ является конечной величиной измерения потока фотонов и выражается в вольтах. Для визуализации и фиксации поступающих данных от прибора, а также для установки температуры термостата и временного периода приема данных используется оригинальное программное обеспечение.

На рис. 9 представлен типичный вид изменения интенсивности сигнала на экране ПК при взаимодействии H_2O_2 и люминола. Интенсивность сигнала резко возрастает на начальной фазе и, достигнув максимума, медленно снижается. Площадь фигуры, ограниченная функцией, описывающей сигнал, и осью абсцисс, равна сумме дискретных величин сигнала (точки на графике) и пропорциональна концентрации H_2O_2 .

ЛАБОРАТОРНЫЕ ИСПЫТАНИЯ

Для оценки пределов обнаружения H_2O_2 была получена градуировочная зависимость площади фигуры под графиком функции сигнала от концентрации H_2O_2 (рис. 10). Градуировочные концентрации H_2O_2 (0.12, 0.24, 0.48, 0.97, $1.95 \cdot 10^{-6}$ М) были выбраны нами по результатам ранее проведенных тестовых измерений. Растворы H_2O_2 известной концентрации вносили в кварцевую кювету, которую устанавливали в кюветодержатель. Далее в кювету через отверстие для внесения растворов вливали 1 см^3 смеси люминола ($2.26 \cdot 10^{-4}$ М) и пероксидазы ($1 \cdot 10^{-6}$ М). Измерения проводили в шестикратной аналитической повторности. Рассчитанные значения площадей усредняли и использовали для построения градуировочной зависимости (см. рис. 10). Методом наименьших квадратов была рассчитана линейная регрессия, описываемая уравнением $y = 255.74x - 32.907$, ко-

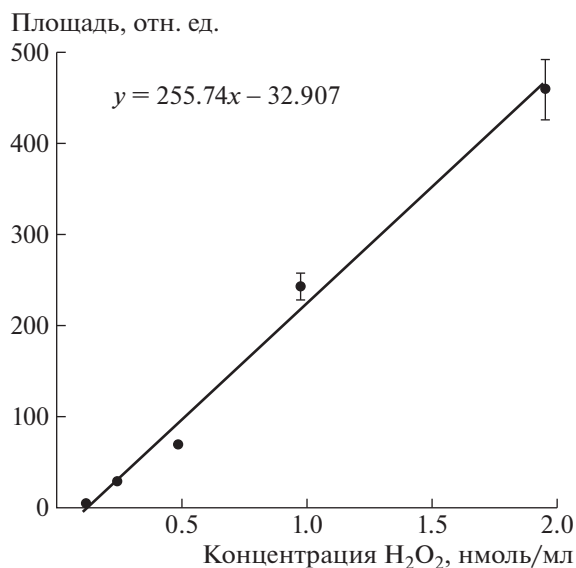


Рис. 10. Градуировочная зависимость площади фигуры под графиком функции сигнала от концентрации H₂O₂ (измерения проведены при 20°C).

коэффициент корреляции регрессионной зависимости составил 0.97. Статистическая значимость уравнения проверена с помощью коэффициента детерминации и критерия Фишера. Установлено, что параметры модели статистически значимы. Полученная оценка уравнения регрессии позволяет использовать его для расчета концентрации H₂O₂ в водных растворах.

В качестве модельного объекта для тестирования люминометра использовали этиолированные листья мягкой пшеницы сорта Иргина (*Triticum aestivum* L.) в процессе деэтиоляции на непрерывном свете. Измерения концентрации H₂O₂ показали, что четырехчасовое воздействие света интенсивностью 190 мкмоль/(м² · с) на этиолированные листья стимулировало повышение концентрации H₂O₂ в 1.5 раза – до 15 · 10⁻⁶ моль/г сухой массы (рис. 11). По мере формирования фотосинтетического аппарата листа на свету содержание H₂O₂ снижалось, и спустя сутки уровень содержания H₂O₂ составлял 7 · 10⁻⁶ моль/г сухой массы. Полученные значения и динамика изменения концентрации H₂O₂ в процессе деэтиоляции листа пшеницы сопоставимы с имеющимися в литературе данными [6].

Проверку на специфичность проводили путем предварительного инкубирования растительного образца с каталазой (“Sigma”, США) – ферментом, разлагающим H₂O₂ до воды. Последующее введение в кювету раствора люминола не вызвало хемилюминесцентную реакцию.

Таким образом, нами представлена информация о конструкции люминометра, даны рекоменда-

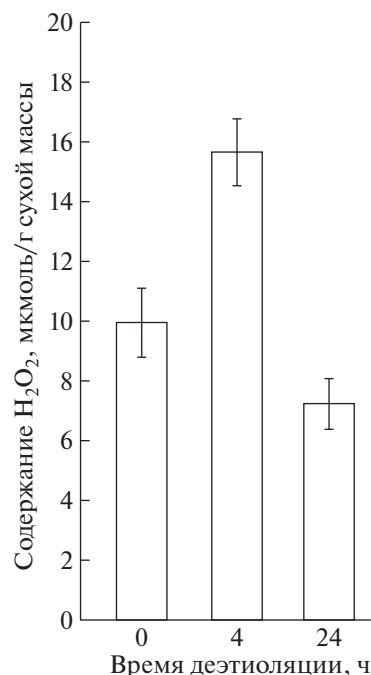


Рис. 11. Изменение содержания пероксида водорода в листьях пшеницы в процессе деэтиоляции (измерения проведены при 20°C).

ции по самостоятельной сборке прибора и приведены результаты лабораторных испытаний. Установлено, что изготовленный люминометр применим для измерения содержания H₂O₂ в водных растворах в диапазоне от 0.1 до 2 · 10⁻⁶ М. Технические характеристики прибора позволяют оценивать содержание H₂O₂ в растительных образцах, полученные значения сопоставимы с данными, имеющимися в литературе.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках темы госбюджетных НИОКТР “Фотосинтез, дыхание и биоэнергетика растений и фототрофных организмов: физиолого-биохимические, молекулярно-генетические и экологические аспекты” (№ 122040600021- 4).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Цаплев Ю.В.* Хемилюминесцентное определение пероксида водорода // В кн. Люминесцентный анализ. М.: Наука, 2015. Глава 8. С. 228–244.
2. *Бабко А.К., Дубовенко Л.И., Луковская Н.М.* Хемилюминесцентный анализ. Киев: Киевская книжная фабрика Октябрь, 1966.
3. МУК 4.1.966-99* Методы контроля. Химические факторы. Определение общего железа в питьевой и пресной воде хемилюминесцентным методом. Дата введения 2000-06-01.
4. *Образцов И.В., Годков М.А.* // Молекулярная медицина. 2013. № 4. С. 3.
5. *Ибрагимова Д.А., Камиль О.М., Янькова Т.В., Яштулов Н.А., Зайцев Н.К.* // Химия и технология органических веществ. 2017. Т. 12. № 6. С. 71.
<https://doi.org/10.32362/2410-6593-2017-12-6-71-76>
6. *Garmash E.V., Velegzhaninov I.O., Grabelnych O.I., Borovik O.A., Silina E.V., Voinikov V.K., Golovko T.K.* // Journal of Plant Physiology. 2017. V. 215. P. 110.
<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2017.05.023>