ПРИБОРЫ И ТЕХНИКА ЭКСПЕРИМЕНТА, 2023, № 3, с. 108–115

ФИЗИЧЕСКИЕ ПРИБОРЫ ДЛЯ ЭКОЛОГИИ, МЕДИЦИНЫ, БИОЛОГИИ

УДК 53.084:57.087

ЛЮМИНОМЕТР. ПРИНЦИП РАБОТЫ, УСТРОЙСТВО И РЕКОМЕНДАЦИИ ПРИ СБОРКЕ

© 2023 г. Р. В. Малышев[a],*, Е. В. Силина[a],**

[a] *Институт 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-

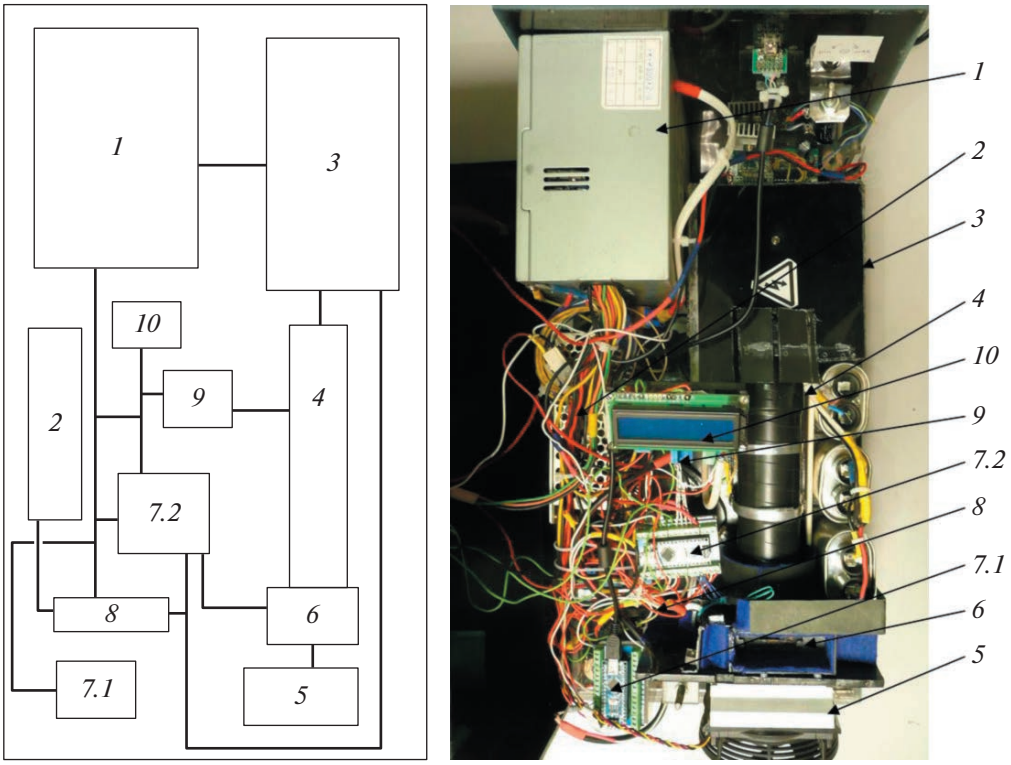

Рис. 1. Блок-схема и внутреннее расположение блоков люминометра (вид сверху). *1* – источник питания основных компонентов схемы; *2* – источник питания термостата; *3* – высоковольтный источник питания ФЭУ; *4* – ФЭУ; *5* – термостат; *6* – кюветодержатель; *7.1* – ведущий микроконтроллер (master); *7.2* – 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 А/лм) и низкого соотношения шум/сигнал.

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

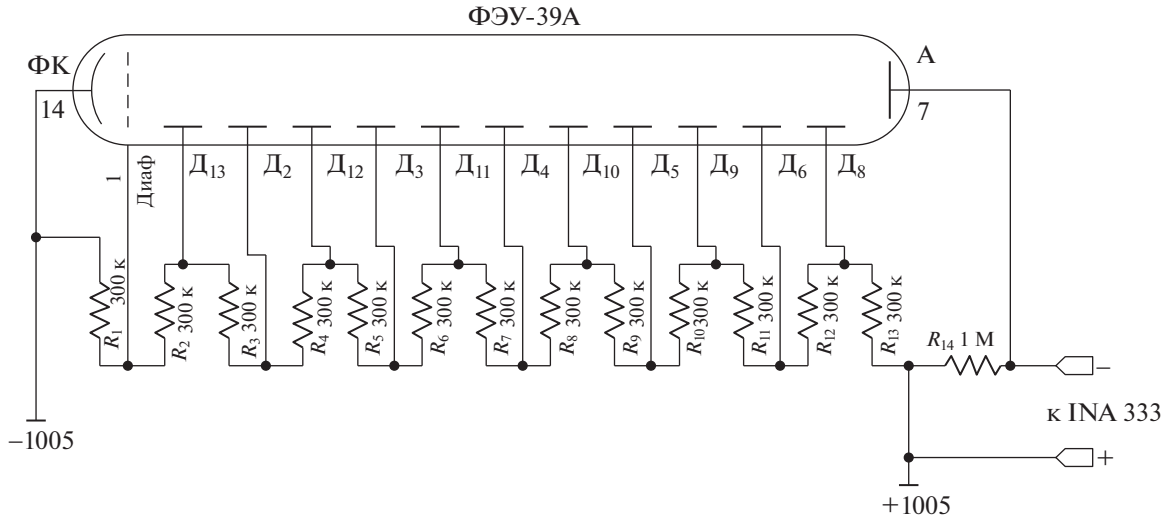

Рис. 2. Принципиальная схема подключения резисторного делителя к ФЭУ-39А. ФК – фотокатод, Д – динод, А – анод.

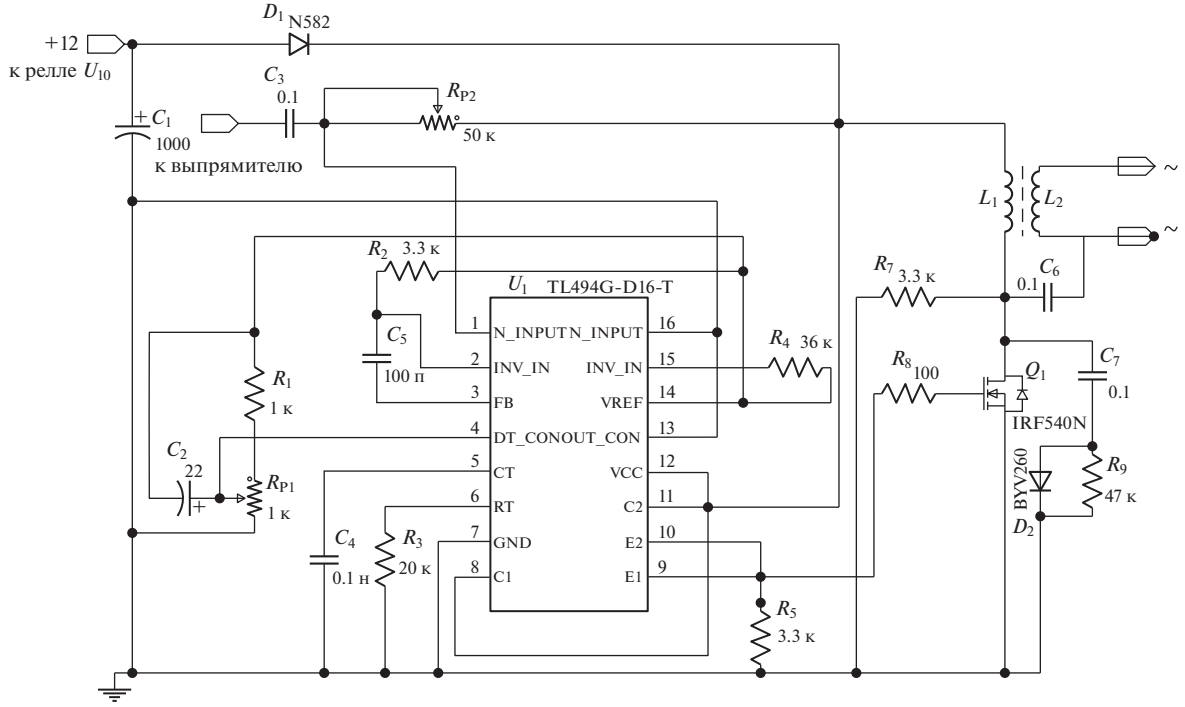

Рис. 3. Принципиальная схема высоковольтного источника питания.

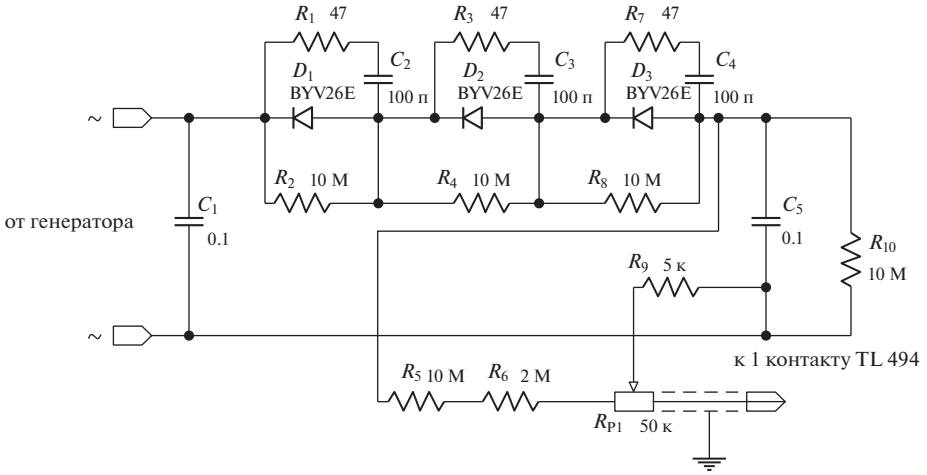

Рис. 4. Принципиальная схема высоковольтного выпрямителя.

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

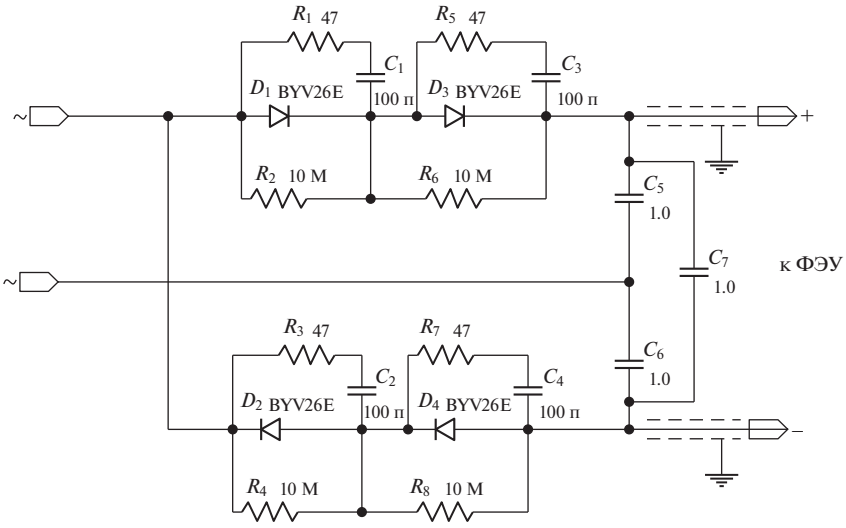

Рис. 5. Принципиальная схема высоковольтного удвоителя напряжения.

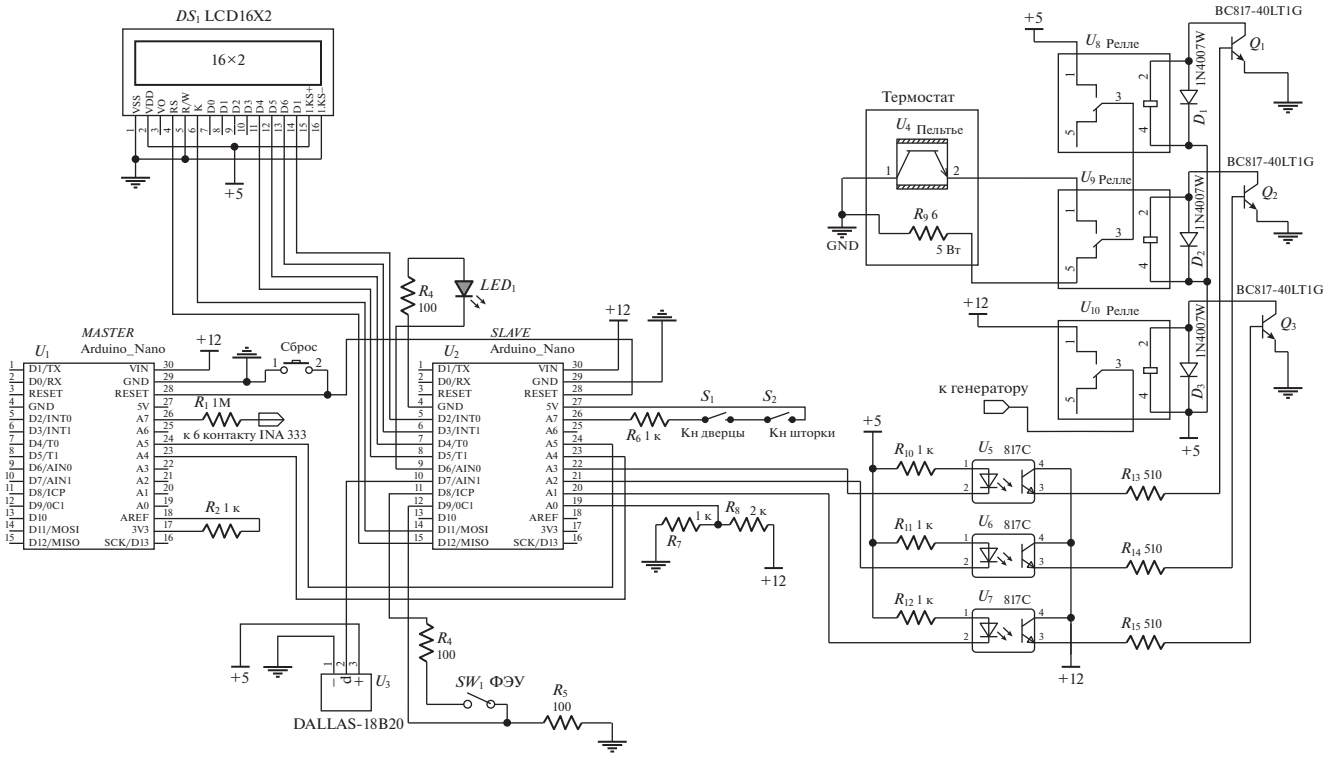

Рис. 6. Принципиальная схема блока микроконтроллеров, блока реле и термостата.

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 удовлетворяет 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.

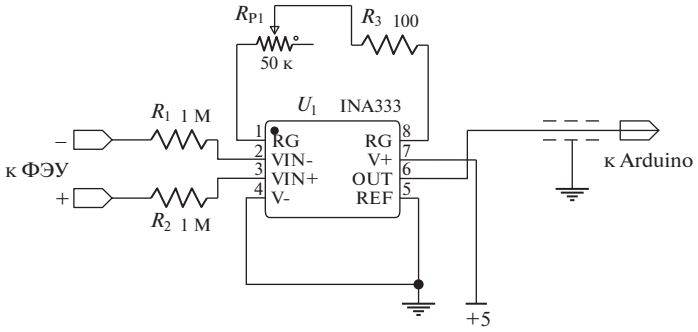

Рис. 7. Принципиальная схема усилителя сигнала ФЭУ на базе INA 333.

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.

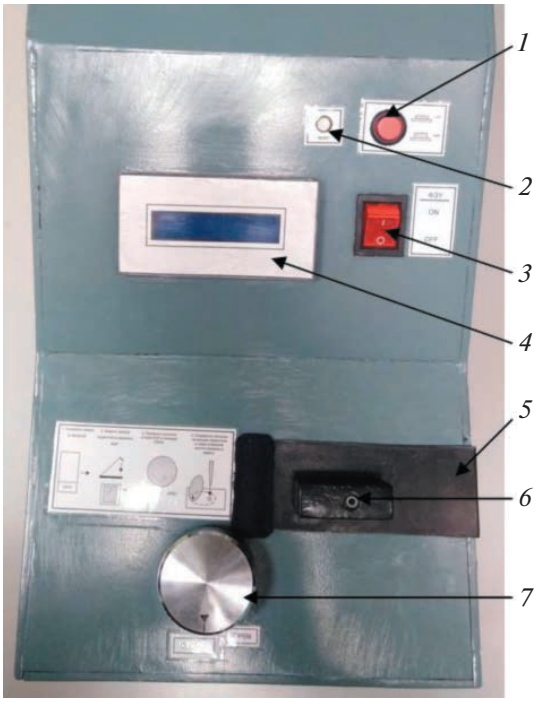

Рис. 8. Внешний вид люминометра (вид сверху). *1* – кнопка включения прибора, *2* – кнопка перезагрузки микроконтроллеров, *3* – переключатель включения ФЭУ, *4* – информационное табло (LCD-дисплей), *5* – крышка блока кюветодержателя и термостата, *6* – отверстие для внесения растворов, *7* – рукоятка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

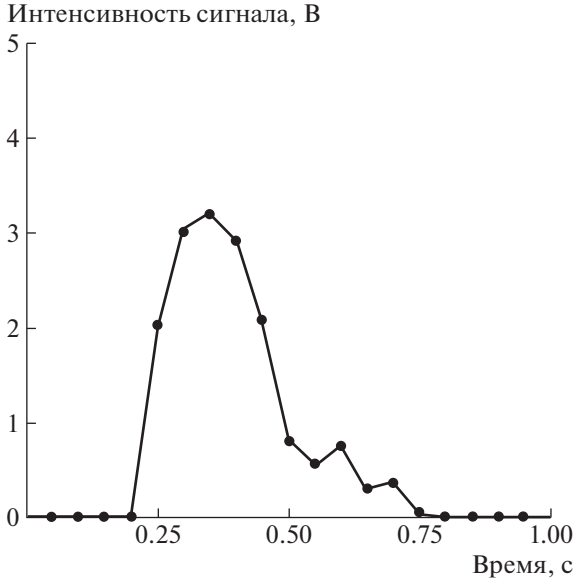

Рис. 9. Изменение интенсивности сигнала в процессе хемилюминесцентной реакции.

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 питания 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. Образуемая 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-

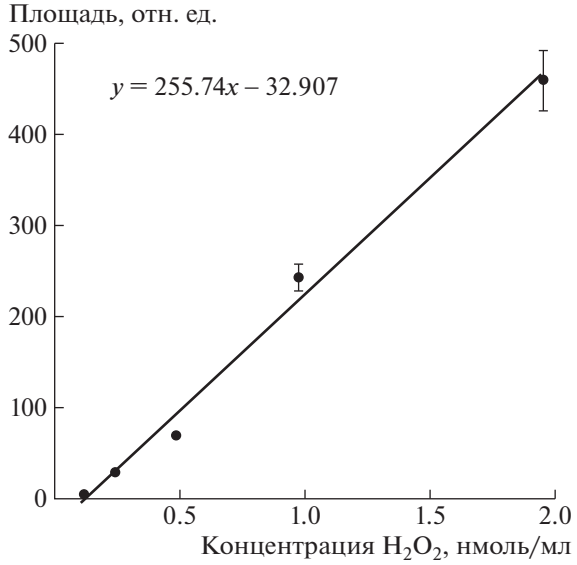

Рис. 10. Градуировочная зависимость площади фигуры под графиком функции сигнала от концентрации H_2O_2 (измерения проведены при 20°C).

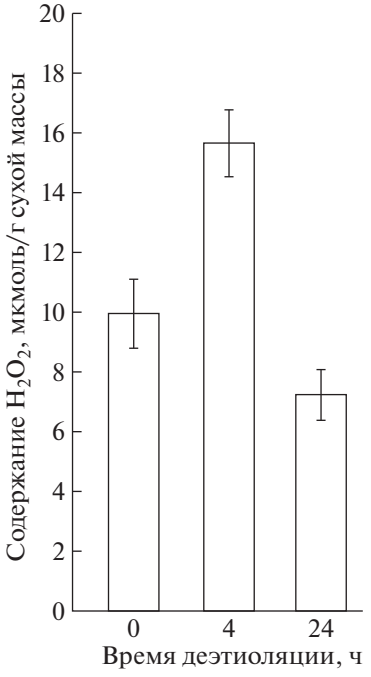

Рис. 11. Изменение содержания пероксида водорода в листьях пшеницы в процессе деэтиоляции (измерения проведены при 20°C).

эффициент 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 H_2O_2 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 свету. Измерения концентрации H_2O_2 показали, что четырехчасовое воздействие света интенсивностью 190 мкмоль/(м^2 · с) на этиолированные листья стимулировало повышение концентрации H_2O_2 в 1.5 раза – до $15 \cdot 10^{-6}$ моль/г сухой массы (рис. 11). По мере формирования фотосинтетического аппарата листа на свету содержание H_2O_2 снижалось, и спустя сутки уровень содержания H_2O_2 составлял $7 \cdot 10^{-6}$ моль/г сухой массы. Полученные значения и динамика изменения концентрации H_2O_2 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 H_2O_2 до воды. Последующее введение в кювету раствора люминола не вызвало хемилюминесцентную реакцию.

Таким образом, нами представлена информация о конструкции люминометра, даны рекомендации по самостоятельной сборке прибора и приведены результаты лабораторных испытаний. Установлено, что изготовленный люминометр применим для измерения содержания H_2O_2 в водных растворах в диапазоне от 0.1 до $2 \cdot 10^{-6}$ М. Технические характеристики прибора позволяют оценивать содержание H_2O_2 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