

Закотеев Юрий Александрович

Хемилюминесценция
Принципы и методики регистрации,
оборудование, задачи

Москва 2015г.

Содержание

Введение.....	3
План.....	4
Общий теоретический обзор.....	5
Принципы регистрации хемилюминесценции.....	8
Фотоэлектронные умножители.....	9
Классическая и современная модели установки для измерения хемилюминесценции.....	15
Режимы работы фотоэлектронных умножителей (ФЭУ) при регистрации сверхслабых и слабых свечений.....	17
Импульсные режимы.....	17
Токовый режим.....	19
Усилители.....	22
Принципиальная схема простейшего усилителя для подключения ФЭУ к АЦП (звуковой карте ПК).....	23
Источники питания ФЭУ.....	25
Принципиальная схема простейшего источника ФЭУ.....	25
Регистрирующие устройства.....	28
Компьютеризация и программное обеспечение.....	30
Пример создания простейшей программы для обработки сигналов с ФЭУ.....	31
Дополнение.....	41
Улучшаем интерфейс программы.....	41
Опрос игрового порта.....	43
Термостатирование.....	45
Градуировка, поверка и эталоны.....	53
Использование светодиодных эталонов для градуировки хемилюминометров.....	55
Цели и задачи создания светодиодных эталонов.....	55
Принцип метода.....	55
Конструкция устройства.....	57
Вспомогательные технические приспособления.....	60
Возможности компьютеризированных аппаратно-программных комплексов.....	62
Температурные зависимости хемилюминесценции.....	68
Аппроксимация данных.....	69
Экспоненциальные аппроксимации.....	69
Полиномиальные аппроксимации.....	71
Экстремумы на температурных кривых.....	74
Трёхмерные графики.....	76
Регистрация кинетики хемилюминесценции.....	77
Сонолюминесценция.....	78
Триболюминесценция.....	82
Обработка результатов.....	83
Методика замеров.....	83
Электронные таблицы.....	86
Программы анализа и визуализации данных.....	86
Системы компьютерной алгебры.....	88
Список рекомендуемой литературы.....	92

Введение

Данная работа является итогом десятилетнего труда автора в качестве инженера на кафедре биофизики МГАВМиБ по части ремонта обслуживания и модернизации технических систем для изучения биохемилюминесценции. Работа по данной тематике началась ещё в студенческие годы автора, во время летней практики в 2005 году, а затем продолжилась в процессе работы над дипломом в 2006 году. Далее, после прихода осенью того же 2006 года на работу на кафедру в качестве инженера, работа по данной тематике была одной из главных задач. За эти годы очень многое изменилось. Пройден большой путь от громоздких установок из массивных ламповых блоков, аналоговых самописцев и тетрадок для записи показаний до современных автоматизированных аппаратно-программных комплексов.

Данная работа посвящена практическим аспектам изучения хемилюминесценции. Теоретические аспекты даны очень кратко, в минимальном объёме, только для того, чтобы ввести читателя в курс дела. К сожалению, авторы очень многих научных публикаций, как правило, заостряют внимание именно на теории, практические методы их исследований описываются очень общо и скудно. Порой создаётся такое ощущение, что либо авторов этих публикаций, как профессиональных биологов, химиков, медиков и т. п., интересует исключительно их узкоспециализированная область и совсем не интересует методология исследований, с помощью которой они получают свои практические результаты, либо они просто некомпетентны в области технических аспектов методов научных и клинических исследований. Увы, как это не печально, но многие современные специалисты в области биологии и медицины искренне полагают, что рН-метр измеряет рН, не имея ни малейшего представления о разности потенциалов на электродной системе. Здесь же всё наоборот, практике посвящается основной материал, а теории — минимум. Если же кого-то интересует теория, то в конце этой книги приведён список рекомендуемой литературы, в которой читатель сможет найти много информации по вопросам теории биохемилюминесценции, и по вопросам прикладного применения хемилюминесцентных методов в тех или иных научных исследованиях.

Целью создания данной работы было дать максимально полную картину о практике исследований хемилюминесценции. Данный материал можно рассматривать как пособие на тему «как самостоятельно изготовить хемилюминометр». В тексте приведены простейшие примеры необходимых электронных схем, рассмотрен процесс создания компьютерных программ, рассмотрена методика работы и обработки результатов эксперимента. Книга рассчитана не на профессионального биолога, не на профессионального физика, не на профессионального химика, не на профессионального электронщика, не на профессионального программиста, не на профессионального математика или какого-либо другого узкого специалиста конкретной области, а рассчитана на разностороннего человека, широкопрофильного специалиста, который занимается научными изысканиями, но при этом не брезгает брать в руки паяльник, гаечный ключ и тому подобные инструменты, а также, возможно, иногда садиться за компьютер и писать какой-нибудь код. Возможно, в наши дни такие люди остались только в России, так как на западе давно наступила эпоха узких специалистов «по левой ноздре» (как говорил М. Задорнов), а на востоке привыкли жить по инструкциям, а не по интуиции, ибо в традиционном обществе всевозможные инструкции, правила и традиции имеют весьма большое значение, а ту смекалку, которую приходится проявлять широкопрофильному специалисту на все руки, никакими инструкциями не описать. Но и узкий специалист, возможно, заинтересуется отдельными главами этой книги.

План

БХЛ общий обзор

Принципы регистрации

ФЭУ

Режимы работы ФЭУ

-импульсные режимы

 классический импульсный режим

 импульсно-амплитудный режим

 интегрально-импульсный режим

-токовый режим

Классическая (устаревшая) модель

Современная модель

Усилители

Принципиальная схема простейшего усилителя

Источники питания ФЭУ

Принципиальная схема простейшего источника ФЭУ

Регистрирующие устройства

Компьютеризация и программное обеспечение

Пример создания простейшей программы для обработки сигналов с ФЭУ

Термостатирование и термодатчики

Градуировка и поверка, эталоны

ЖС-19

Светодиодные эталоны

Возможности компьютеризированных аппаратно-программных комплексов

Температурные зависимости ХЛ

Регистрация кинетики ХЛ

Проточные кюветы, инжекторы, мешалки

Сонолюминесценция

Обработка результатов

Список литературы

Общий теоретический обзор

Хемилюминесценция — это эффект свечения (излучения световой энергии), обусловленный протеканием химических реакций.

Хемилюминесценция биологических объектов обычно представляет собой излучение света от электронно-возбуждённых состояний (ЭВС), возникающих в процессе химических реакций свободнорадикального окисления.

Электронно-возбуждённое состояние — это такое состояние атома, при котором электрон находится не на своей типичной орбите, а на более высоких энергетических уровнях. При возвращении («падении») электрона с более высоких энергетических уровней на своё законное место (на свой «родной» энергетический уровень) выделяется квант света. Энергия этого кванта (от которой зависит его частота и длина волны) равна разности между этими энергетическими уровнями.

Считается, что среди *эндогенных* биохимических факторов свободнорадикальные процессы являются **единственными** источниками хемилюминесценции, ибо науке не известны какие-либо другие биохимические экзотермические процессы, при которых бы выделялось достаточное количество энергии, способное породить квант в видимой области спектра. Разумеется, это никак не относится к люминесценции, вызываемой *экзогенными* факторами, в том числе внешним химическим или физическим (например, ультразвук или ионизирующее излучение) воздействием на биологический объект.

Хемилюминесценцию биологических объектов часто называют *биохемилюминесценцией* (БХЛ), а нативную люминесценцию биологических объектов, проявляющуюся без каких-либо химических или физических воздействий на сам объект, называют *спонтанным сверхслабым свечением* (ССС). «Сверхслабыми» принято называть световые потоки порядка 10^3 и менее квантов на квадратный сантиметр в секунду.

Следует заметить, что самопроизвольное сверхслабое свечение свойственно многим объектам и веществам, например, стеклу, поэтому перед началом исследования обязательно измеряется фон кюветы. Разумеется, такое «небиологическое» свечение тоже не имеет никакого отношения к БХЛ.

Также следует заметить, что при измерении сверхслабого свечения каких-либо объектов может иметь место фосфоресценция — эффект относительно продолжительного свечения некоторых веществ после облучения внешним светом, за счёт так называемых «запрещённых» энергетических переходов. Поэтому, перед началом измерения исследуемые объекты следует выдерживать некоторое время в темноте. Для этого подходит, например, закрытая камера хемилуциметра. То есть после помещения исследуемого образца в прибор нужно подождать несколько минут, прежде чем начинать регистрацию показаний прибора. Работу с хемилуциметром рекомендуется проводить в затемнённом помещении, а также избегать попадания на исследуемые объекты прямых солнечных лучей, во избежание длительной и интенсивной фосфоресценции. Стоит сказать, что исследование фосфоресценции — отдельная большая тема, её измерение обычно осуществляется с помощью системы попеременно открывающихся затворов между источником света, исследуемым объектом и фоторегистрирующим устройством.

Условно в исследовании хемилюминесценции можно выделить два основных направления.

Первое направление — это исследование нативной биохемилюминесценции. Оно применяется при изучении процессов свободнорадикального окисления, а также явлений, прямо или косвенно связанных со свободнорадикальным окислением. Примером может служить сравнительное исследование БХЛ каких-либо биологических жидкостей или тканей при различных физиологических состояниях организма.

Второе направление — это исследование индуцированной хемилюминесценции. Суть такого подхода чаще всего сводится к тому, что в этом случае в исследуемый образец

добавляется некое вещество (или группа веществ), вызывающее чётко выраженный эффект хемилюминесценции при взаимодействии с неким определяемым веществом в исследуемом образце. К этому направлению относится большинство методов хемилюминесцентного анализа. В качестве достаточно распространённого примера можно привести качественно-количественный анализ на содержание АТФ при взаимодействии с люциферин-люциферазным комплексом. Люциферин под воздействием фермента люциферазы, при участии молекулы АТФ, окисляется кислородом, с образованием в конечном итоге оксилуциферина и АМФ, а оксилуциферин, переходя из возбуждённого в основное состояние, излучает квант света. Чувствительность метода зависит от используемого оборудования. При использовании хемилюминометра, способного регистрировать световые потоки порядка 10^3 квантов в секунду, чувствительность метода составляет примерно 10^{-15} моль/литр. В случае более чувствительного хемилюминометра пороговая чувствительность метода соответственно возрастёт.

Я также могу обозначить ещё и третье направление — исследование антиоксидантной активности различных веществ. В таких исследованиях могут применяться факторы как усиливающие, так и ослабляющие хемилюминесценцию.

Однако, независимо от направления, в котором ведутся исследования, в любом случае, одним из основных достоинств хемилюминесцентного метода является то, что он является индикатором скорости химической реакции **в реальном времени**, в то время как химические методы могут отслеживать скорость химических реакций лишь дискретно и опосредованно, анализируя количество продуктов реакции, образующихся за некий промежуток времени.

Классификация веществ, оказывающих влияние на хемилюминесценцию

Среди веществ, усиливающих хемилюминесценцию, по их механизму действия принято выделять следующие типы веществ:

Инициаторы — вещества, создающие первичные активные центры, поставляющие активные продукты, и увеличивающие квантовый выход возбуждения. Примером таких веществ могут служить перекиси или другие сильные окислители.

Катализаторы — какие-либо вещества увеличивающие скорость химической реакции, вызывающей эффект хемилюминесценции. При этом сами они в процессе этой реакции не расходуются.

Активаторы — вещества имеющие высокий квантовый выход излучения и усиливающие эффект хемилюминесценции за счёт физического процесса перехвата — миграции энергии электронно-возбуждённых состояний с первично-возбуждённых центров. Такие вещества усиливают квантовый выход излучения, но при этом никак не влияют ни на скорость самой химической реакции, ни на квантовый выход возбуждения.

Зонды — вещества, реагирующие с активными веществами (перекисями, радикалами), с образованием собственных перекисей и электронно-возбуждённых состояний, проявляющих сильный эффект хемилюминесценции. К таким веществам относятся люминол, люцигенин.

А среди веществ, ослабляющих хемилюминесценцию, по их механизму действия выделяют такие типы веществ:

Ингибиторы — химически активные вещества, тормозящие химическую реакцию, вызывающую эффект хемилюминесценции. К этой группе веществ относятся так называемые антиоксиданты.

Разбавители — инертные вещества, заменяющие собой энергетический субстрат реакции, вызывающей эффект хемилюминесценции, приводя к замедлению этой реакции, а следовательно и снижению хемилюминесценции.

Тушители — антагонисты активаторов, вещества с более низким квантовым выходом излучения, чем первичные электронно-возбуждённые состояния, перехватывающие на себя энергию этих первичных электронно возбуждённых состояний. К типичным тушителям можно отнести, например, витамин А.

Светофильтры — тёмные вещества, оптически поглощающие свет. Разумеется, они никак не влияют на химические процессы.

Если говорить о хемилюминесценции применительно к биологическим объектам, то следует обговорить также биологические факторы, влияющие на биохемилюминесценцию, это так называемые *триггеры* — физиологические агенты, запускающие естественные биолюминесцентные реакции, и *стимуляторы* — антигены, на которых фагоциты реагируют выбросом свободных радикалов.

Среди физических факторов, усиливающих люминесценцию, следует отметить нагревание (повышение температуры приводит к повышению скорости химической реакции, вызывающей хемилюминесценцию), воздействие ультразвука (сонолюминесценция), воздействие ионизирующего излучения (сцинтилляционный эффект).

В естественной биохимической среде «накачкой» для электронно-возбуждённых состояний, вызывающих эффект хемилюминесценции, служат акты распада перекисей. Это очень сильные (для биологической химии) экзотермические реакции с энергетическим выходом порядка пятидесяти килокалорий на моль.

Принципы регистрации хемилюминесценции

При исследовании хемилюминесценции приходится работать со световыми потоками, интенсивность которых намного слабее пороговой чувствительности человеческого глаза. Для исследования хемилюминесценции применяются специальные приборы — хемилюминометры.

Исследуемые объекты (вещества) помещаются в специальные кюветы. Как правило, кюветы представляют собой круглые короткие стеклянные пробирки с плоским дном. Кювета с исследуемым образцом устанавливается в термостатируемый кюветодержатель внутри кюветной камеры хемилюминометра. Термостатирование исследуемого образца имеет весьма важное значение, о чём подробно будет описано в соответствующей главе ниже. Камера хемилюминометра должна обеспечивать полнейшую светоизоляцию исследуемого образца в процессе работы прибора.

В качестве элемента, регистрирующего световые потоки, в хемилюминометрах используются фотоэлектронные умножители (ФЭУ). О них подробно речь пойдёт в следующей главе. ФЭУ — электно-оптическое устройство позволяющее регистрировать сверхслабые световые потоки, вплоть до отдельных фотонов (теоретически). ФЭУ обычно располагается под кюветой, поэтому кюветы и имеют плоское дно. Такое расположение, во-первых, максимально снижает теплообмен между ФЭУ и кюветой (ФЭУ не будет нагреваться от нагретой кюветы), а во-вторых, максимально увеличивает полезный светосбор даже при минимальном объёме исследуемого вещества.

Между кюветным отделением и ФЭУ расположен затвор. Открывать его можно лишь тогда, когда крышка (дверь) кюветной камеры плотно закрыта. В противном случае это может привести к засветке (порче) ФЭУ. В некоторых хемилюминометрах затвор может быть автоматический, он открывается лишь тогда, когда дверь кюветной камеры закрыта и заблокирована.

Сам ФЭУ должен располагаться в металлическом экранированном корпусе. Иногда применяется термостатирование (охлаждение) ФЭУ проточной водой. Для питания ФЭУ необходим высоковольтный источник питания постоянного тока (при этом плюс должен быть соединён с корпусом, а на ФЭУ должно подаваться питание от минус 500, до минус 2000 вольт). Сигналы с ФЭУ подаются на усилитель. В целях помехозащиты усилитель либо его первые каскады монтируются вблизи от ФЭУ.

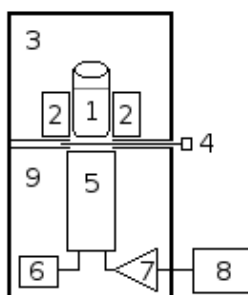


Схема хемилюминометра

- 1 — кювета с исследуемым объектом, 2 — термостатируемый кюветодержатель,
3 — кюветная камера, 4 — затвор, 5 — ФЭУ,
6 — высоковольтный источник питания для ФЭУ,
7 — усилитель, 8 — регистрирующее устройство.

Фотоэлектронные умножители

Фотоэлектронный умножитель (ФЭУ) — электровакуумный прибор, в котором поток электронов, излучаемый фотокатодом под действием оптического излучения (фототок), усиливается в умножительной системе в результате вторичной электронной эмиссии; ток в цепи анода (коллектора вторичных электронов) значительно превышает первоначальный фототок (обычно в 10^5 раз и выше). Впервые был предложен и разработан советским изобретателем Л. А. Кубецким в 1930—1934 гг.

Однако первые модели ФЭУ имели недостаточную чувствительность для того, чтобы была возможность их применения для исследования процессов хемилюминесценции в биологии. Мешали тепловые шумы — спонтанная термоэмиссия электронов заглушала слишком слабый сигнал. Для подавления тепловых шумов применяли охлаждение ФЭУ. В 1959 году группа учёных под руководством Владимиров Ю.А. придумала использовать для охлаждения ФЭУ жидкий азот: они помещали ФЭУ в сосуд Дюара (термос) с жидким азотом, при этом входное окно ФЭУ совмещалось со специальным прозрачным кварцевым окошком в стенке сосуда Дюара. Такая система могла регистрировать световые потоки интенсивностью порядка 10^5 квантов в секунду на квадратный сантиметр. Этого в принципе достаточно для химических исследований, но недостаточно для биологических исследований. В 1961 году группа учёных под руководством Тарусова Б.Н. придумала заменить сосуд Дюара сосудом из пенопласта с отверстием, плотно и герметично прилегающим к входному окошку ФЭУ. Это позволило уменьшить светопотери за счёт устранения двух стёкол (стенки сосуда Дюара) и слоя жидкого азота (между окошком ФЭУ и окошком в стенке сосуда Дюара). Такая система позволяла регистрировать световые потоки интенсивности порядка 10^3 квантов в секунду на квадратный сантиметр.¹ Этого было уже достаточно для начала масштабных биологических исследований с применением хемилюминесцентного анализа (для сравнения, современные ФЭУ с внешним фотокатодом могут без труда регистрировать световые потоки на 1 — 2 порядка слабее).

Современные ФЭУ имеют так называемый «внешний» фотокатод — сверхтонкое напыление металла на внутреннюю стенку входного окна, далее идёт система фокусирующих электродов и затем уже цепочка динодов. Система фотокатода и фокусирующих электродов образуют так называемую «катодную камеру». Главным образом, характеристики ФЭУ (спектральная чувствительность, температурный режим) определяются составом фотокатода. Одни ФЭУ могут обладать широкой спектральной чувствительностью, в том числе от дальнего ультрафиолета до ближней области инфракрасного спектра², другие — могут работать только в определённой части спектра, но зато иметь более высокую чувствительность в своей области спектра по сравнению с «широкополосными». Существуют ФЭУ, способные работать при высоких температурах. Большинство ФЭУ, используемых в хемилюминометрах, имеют рабочий спектральный диапазон 300 — 650 нм.

Рядом с ФЭУ монтируется делитель напряжения. Он состоит из последовательно подключённых резисторов. Он обеспечивает разность потенциалов между динодами порядка нескольких десятков вольт.

Квант света, поглощённый фотокатодом, выбивает из него один электрон, который летит к динодам, и выбивает уже несколько электронов из первого динода, которые летят ко второму диноду, выбивая из него ещё больше электронов, и так далее. Таким способом происходит электронное «умножение». В результате всего один электрон, выбитый из фотокатода, порождает на выходе импульс достаточной силы, чтобы быть зафиксированным.

1 По данным Журавлёва А.И.

2 Примером может служить японский ФЭУ Hamamatsu R636-10 с галлиево-мышьячным фотокатодом и спектральной чувствительностью 160 — 930 нм. А из отечественных — ФЭУ-100 с сурьмяно-натриево-калиево-цезиевым фотокатодом и спектральной чувствительностью 170 — 830 нм.

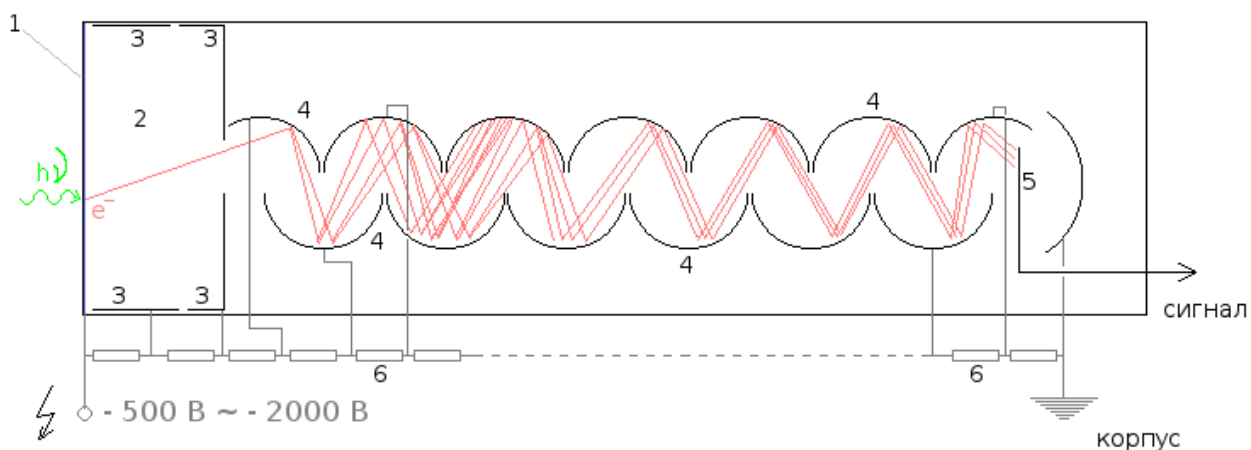
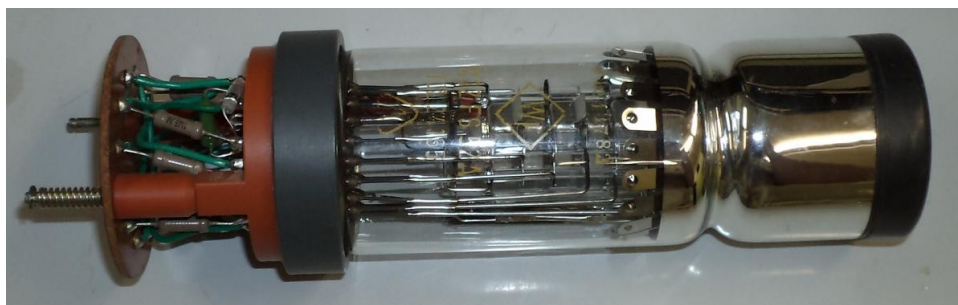


Схема современного ФЭУ

1 — фотокатод, 2 — катодная камера, 3 — фокусирующие электроды, 4 — диноды, 5 — анод, 6 — резисторы делителя напряжения.



ФЭУ с делителем напряжений

Первые модели ФЭУ не имели внешнего фотокатода, фотокатод у них был представлен сеточкой внутри баллона.



ФЭУ-17А



И его фотокатод

Также для некоторых ФЭУ было характерно наличие «соски» со специальным кварцевым окошком. Примером таких ФЭУ может служить ФЭУ-18А, на фото ниже.



Позже, настоящей революцией стало появление ФЭУ с внешним фотокатодом.

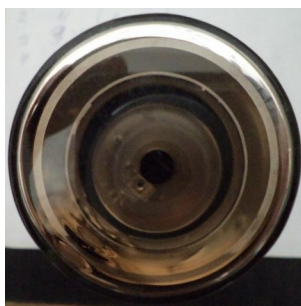
На рисунке ниже, представлен легендарный ФЭУ-42. Его применение, в своё время, позволило отказаться от весьма экстремального охлаждения жидким азотом, для него было вполне достаточным охлаждение с помощью термостатируемой рубашки, холодной проточной водой, для проведения точных измерений сверхслабых световых потоков. С помощью устройств и установок, на основе ФЭУ-42 было совершено немало научных открытий.



ФЭУ-42

Помимо основного цоколя с контактами, на корпусе ФЭУ ещё располагались три контакта — для фотокатода и двух фокусирующих электродов катодной камеры.

Катодная камера ФЭУ-42 представлена на фото ниже крупным планом, в двух ракурсах: вид со стороны контактов (сбоку) и вид со стороны фотокатода.



Стоит обратить внимание, что внешний фотокатод ФЭУ-42 выглядит достаточно прозрачным, это как бы не очень хорошо, ибо чем больше квантов света проходит насквозь, тем меньше квантов поглощается и соответственно выбивает электроны.

Позже, с развитием технологий, советская промышленность для специальных нужд стала выпускать миниатюрные ФЭУ. Примером может служить ФЭУ-86, размером с палец. Для питания ФЭУ-86 вполне достаточно напряжения порядка 700 вольт. Этот ФЭУ может обходиться без охлаждения. При этом чувствительности ФЭУ вполне хватало для измерения спонтанных сверхслабых свечений. Это сделало возможным изготавливать на основе ФЭУ-86 небольшие переносные (а с развитием микроэлектроники даже карманные) приборы. Однако, из моего личного опыта, могу сказать, что платой за такую «мобильность» была низкая стабильность работы данного ФЭУ. Если речь идёт об измерении хемилюминесценции, то необходима относительно частая калибровка.



ФЭУ-86

Следующим этапом было создание ФЭУ-130, а затем и ФЭУ-140. Эти ФЭУ отличаются высокой чувствительностью, не нуждаются в охлаждении, являются весьма стабильными, и при этом, имеют относительно компактные размеры.



ФЭУ-140

Внутри ФЭУ-140 имеется система из двенадцати динодов. Несмотря на небольшие размеры, эти ФЭУ требуют достаточно высокого напряжения для работы.

С развитием радиоэлектроники, происходило уменьшение размеров радиодеталей, но при этом увеличение их надёжности и ресурса. Это позволило конструктивно совместить ФЭУ и делитель напряжения. Такое конструктивное решение позволило отказаться от сложных разъёмов и цоколей ФЭУ с множеством контактов, и сократить число контактов до трёх: катод, земля и сигнал. Такой вариант стал гораздо более удобным для конструирования различных приборов (в том числе принципиально новых и экспериментальных) самими исследователями в кустарных условиях.

На фото ниже представлен ФЭУ «Фотон». Он похож на ФЭУ-140 (судя то всему и разработан на его основе), но имеет удлинённый корпус, с пластиковой частью на конце, из которой выходят три провода (катод, земля, сигнал).



ФЭУ «Фотон»

Помимо хемилюминометров, одной из основных областей применения ФЭУ являются сцинтилляционные счётчики радиоактивных частиц. В этих устройствах фотокатод ФЭУ совмещается со сцинтиллятором — веществом, активно испускающим свет при поглощении радиоактивных частиц. Такие счётчики обладают весьма высокой чувствительностью. Также важной особенностью таких устройств является пропорциональность, выраженная в большей или меньшей степени, в зависимости от типа сцинтиллятора. На фото ниже представлен пропорциональный сцинтилляционный зонд Robotron (производства ГДР). Внутри находятся, ФЭУ, делитель напряжения и предварительный усилитель, а спереди привинчена головка сцинтиллятора. Между сцинтиллятором и фотокатодом ФЭУ наносится специальная смазка, для уменьшения отражения света на границе раздела фаз.



Сцинтилляционный зонд
(общий вид)



Сцинтиллятор (головка зонда)
(крупным планом)

Иногда некоторые исследователи отвинчивают сцинтиллятор и используют готовый блок зонда с ФЭУ в других целях. Это очень дурной тон, так делать не нужно.

Цена ФЭУ зависит прежде всего от фотокатода. Так, розничная цена ФЭУ-100 широким диапазоном спектральной чувствительности в 4,5 раза превосходит цену ФЭУ-130 или ФЭУ-140 с обычной спектральной чувствительностью. Ниже представлена таблица спектральной чувствительности некоторых отечественных ФЭУ.

Спектральные характеристики некоторых ФЭУ
(на основе табличных данных из различных источников³)

ФЭУ	Спектральная чувствительность
18А	220-600
22	400-1000
29	300-600
35 (А)	300-600
37	300-600
38	300-820
39А	160-600
42	300-700
51	300-820
62	400-1200
74	300-600
74А	185-650
85	300-650
86	300-600(650)
100	170-830
102	300-650
115М	300-850
115МУ	185-850
115МСУ	115-850
115МСС	112-350
127	300-600
130	200-650
140	200-650
181	112-830

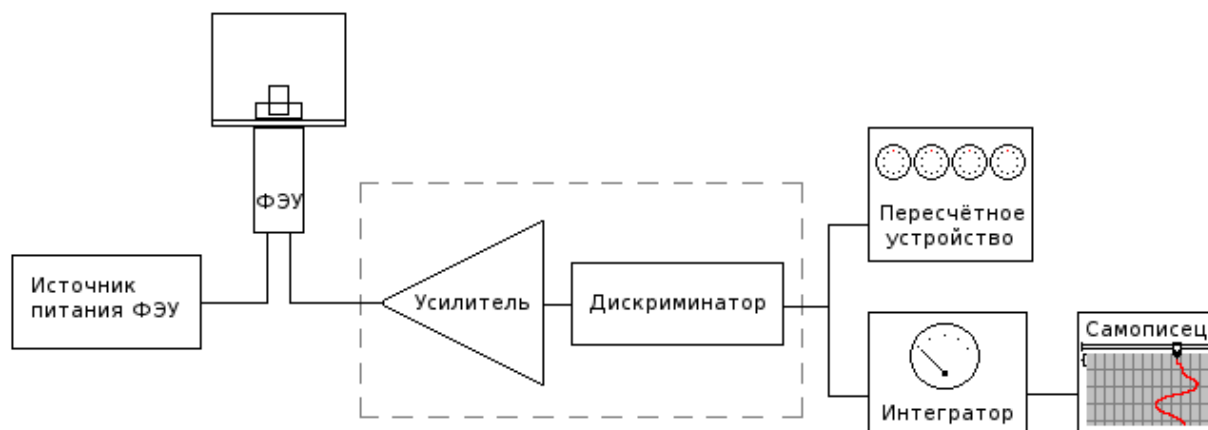
Иногда, при работе в импульсных режимах, на делитель напряжений, параллельно нескольким (как правило, трём) резисторам между последними диодами, подсоединяются ещё и конденсаторы.

Некоторые ФЭУ, например ФЭУ-127-2, помимо встроенного делителя имеют ещё и антимагнитный экран.

³ Имеются некоторые разночтения: в старых советских паспортах для ФЭУ-74А и ФЭУ-86 указывалась спектральная чувствительность 300-600 нм, однако в каталоге фирмы «Квадротех» (производителя ФЭУ в России после перестройки) указываются иные значения диапазона чувствительности: для ФЭУ-74А диапазон чувствительности 185-650 нм, а для ФЭУ-86 — 300-650 нм. Возможно, это связано с тем, что в более поздних модификациях этих ФЭУ диапазон спектральной чувствительности фотокатода был расширен в следствии усовершенствования, а возможно просто где-то закралась опечатка.

Классическая и современная модели установки для измерения хемилюминесценции

В классическом варианте высокочувствительная установка для исследования хемилюминесценции представляла собой громоздкую конструкцию, состоящую из нескольких блоков. К ФЭУ подключался высоковольтный источник питания, иногда он также назывался «выпрямитель стабилизированный». От ФЭУ сигнал поступал на усилитель. Усилители часто имели выносной блок, располагавшийся в непосредственной близости к ФЭУ, в целях снижения помех. К выходу усилителя подключался дискриминатор. Он выполнял роль фильтра сигнала, пропуская лишь полезные импульсы, амплитуда которых была выше некоего заданного порогового значения. Усилитель и дискриминатор часто монтировались в одном блоке. Примером такого решения может служить широкополосный импульсный усилитель УШ-2. После дискриминатора сигнал поступал на пересчётное устройство, которое считало импульсы за единицу времени. На самых первых пересчётных устройствах не было индикаторов с цифрами. Их заменяли так называемые декатроны — блоки из десяти лампочек, стоящих по кругу. По тому, какая из десяти лампочек горела, можно было прочесть показания прибора. Позже декатроны были заменены индикаторами с цифрами (дисплеями). Иногда параллельно со счётным устройством подключался интегратор, преобразующий частоту следования импульсов на входе в амплитуду постоянного сигнала на выходе, а к выходу интегратора подключался самописец, регистрирующий на бумажной ленте процесс изменения уровня сигнала во времени. Это было нужно для регистрации кинетики процессов, связанных с эффектом хемилюминесценции (см. главу «Регистрация кинетики хемилюминесценции»). Ниже представлена блок-схема установки для исследования хемилюминесценции в её классическом варианте.

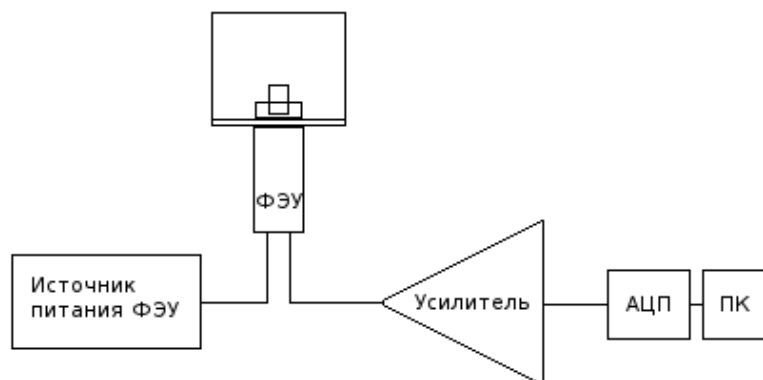


Классическая модель установки для исследования хемилюминесценции.

Если установка работала в токовом режиме, то использовался усилитель постоянного тока, выход которого подключался непосредственно к самописцу, без всяких дискриминаторов, интеграторов и пересчётных устройств.

В настоящее время все аналоговые дискриминаторы, пересчётные устройства, интеграторы и аналоговые самописцы ушли в прошлое. Сейчас, как правило, выход усилителя подключён к аналого-цифровому преобразователю (АЦП), далее оцифрованный сигнал передаётся на ПК и анализируется программно. Ну а применение полупроводниковой

электроники вместо ламповой позволило сильно уменьшить усилители и источники питания в размерах и весе, что позволило их монтировать в одном корпусе, порой в том же самом, где расположен ФЭУ.



Современная модель установки для исследования хемилюминесценции.

В последующих главах все узлы как классической, так и современной модели будут описаны подробно.

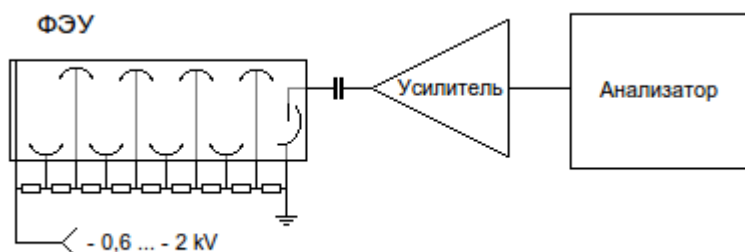
Теперь затронем немного тему терминологии и лингвистики. В наши дни довольно таки часто приходится иметь дело с технической документацией, статьями, а порой и каталогами товаров на иностранных языках. Так вот, основная часть хемилюминометра — ФЭУ, в англоязычной литературе и документации обозначается как Photomultiplier tube (PMT) — дословно «фотоумножительная трубка». А аналого-цифровой преобразователь обозначается как analog-to-digital converter (ADC), а цифро-аналоговый преобразователь (ЦАП) — соответственно DAC. В последнее время большинство поставляемой в нашу страну импортной электроники производится в КНР, в связи с чем уместно будет тут обозначить и китайские названия. ФЭУ по китайски будет — 光电倍增管 [Guāngdiàn bèizēng guǎn] (光电 — фотоэлектрический, 倍增管 — вторично-электронный умножитель, «увеличительная трубка»), а АЦП — 模拟数字转换器 [Mó nǐ shù zì zhuǎnhuàn qì] (模拟 — (здесь) аналоговый, 数字 — цифровой (цифра), 转换器 — преобразователь, конвертер и т. п.).

Режимы работы фотоэлектронных умножителей (ФЭУ) при регистрации сверхслабых и слабых свечений

Фотоэлектронные умножители (ФЭУ) могут работать в различных режимах. Изначально ФЭУ работали в токовом режиме, то есть в режиме измерения фототока, аналогично классическим электронно-вакуумным фотоэлементам. С появлением необходимости регистрировать сверхслабые световые потоки, а также с развитием счётно-импульсной техники, стал применяться импульсный режим, при этом один импульс соответствовал одному фотону, поглощённому фотокатодом, и выбившему электрон из него. Импульсный режим работы ФЭУ получил также очень широкое применение в радиометрии, при использовании ФЭУ совместно со сцинтиллирующим веществом, расположенным у фотокатода. В этом случае один импульс ФЭУ соответствовал одной радиоактивной частице, поглощенной сцинтиллятором. Причём при поглощении радиоактивной частицы выделялось большое количество квантов света одновременно — так как светился весь ионизационный трек, оставленный частицей. Причём, чем выше была энергия частицы, тем длиннее был ионизационный трек, тем больше квантов света выделялось и поглощалось фотокатодом ФЭУ (причём одновременно), тем выше была амплитуда импульса на выходе, и таким образом, манипулируя с дискриминатором, можно было получить представления не только о интенсивности потока радиоактивных частиц, но и об энергии этих частиц. В наши дни, применение компьютеров в качестве пересчётных устройств, позволило сильно разнообразить применение импульсных режимов. О них будет подробно описано ниже.

Импульсные режимы

Квант света, поглощённый фотокатодом и выбивший из него электрон, даёт на выходе ФЭУ один импульс. К выходу ФЭУ подключен линейный усилитель, после которого импульсы поступают на счётное устройство, либо на АЦП, с целью дальнейшего математического анализа.



В настоящее время в нашем распоряжении имеется несколько вариаций импульсного режима, выбор которых обычно зависит от поставленной задачи.

Классический импульсный режим (счёт импульсов).

Классический метод регистрации для установок по измерению спонтанного сверхслабого свечения. Иногда в литературе или технической документации этот режим назывался режимом счёта фотонов. Счётным устройством (аппаратным, либо программным) происходит регистрация импульсов, амплитуда которых превысила некоторое пороговое значение (уровень дискриминации). Метод заключается в счёте этих импульсов за определённый промежуток времени, либо измерении времени, за которое будет зафиксировано определённое количество импульсов. Общепринятая единица измерения — импульс в секунду (имп/сек). Соотношение между светимостью исследуемого объекта и

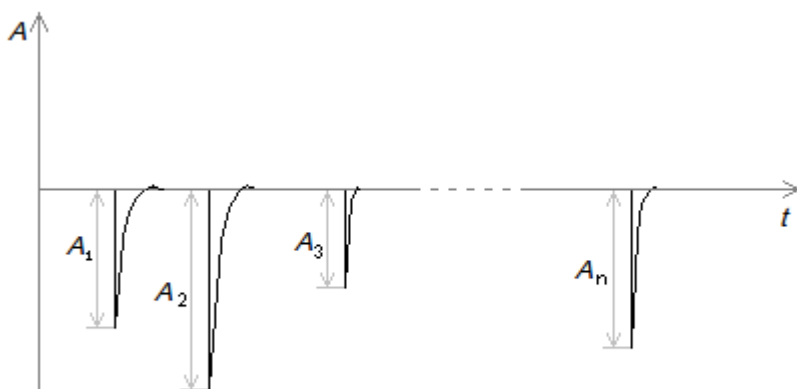
количеством импульсов, зафиксированных в единицу времени зависит в основном от светочувствительности установки. Данный метод хорош для измерения особо слабых свечений, дающих на выходе ФЭУ от 2 — 4 (обычный темновой фон) до 50 — 100 импульсов в секунду.

В докомпьютерную эпоху являлся единственным импульсным режимом регистрации сверхслабых свечений. В те далёкие времена типичная установка для регистрации сверхслабых свечений была устроена так: импульсы с ФЭУ усиливались с помощью импульсного усилителя (вроде УШ-2) и подвергались аналоговой дискриминации (блок дискриминатора был в том же УШ-2), после чего, поступали на счётное устройство (в качестве него зачастую использовался электронно-счётный частотомер).

С появлением компьютеров всё стало намного проще и удобнее. Сигналы с ФЭУ усиливаются любым усилителем переменного тока с достаточно чувствительным входом, после чего поступают на аналого-цифровой преобразователь (АЦП), в качестве которого целесообразно (просто и дёшево) использовать обычную звуковую карту компьютера. После оцифровки сигналы с ФЭУ подвергаются программной обработке в реальном времени, благодаря которой стало возможно не только производить счёт импульсов в единицу времени, но и при необходимости применять другие методы регистрации, требующие более сложного математического анализа каждого отдельного импульса. Речь об этих методах пойдёт ниже.

Импульсно-амплитудный режим

Заключается в измерении амплитуды каждого отдельного импульса, превысившего некий пороговый барьер (уровень дискриминации), с последующим сложением амплитуд всех импульсов, пришедших за некоторый определённый промежуток времени. Такой метод интересен тем, что даёт возможность учитывать кванты света, пришедшие на фотокатод одновременно либо с незначительно малым промежутком времени, дающим на выходе ФЭУ один большой импульс. Метод целесообразно применять при регистрации свечений, дающих на выходе ФЭУ более порядка 10^2 импульсов в секунду. Поскольку амплитуды импульсов зависят от коэффициента усиления и измеряются, как правило, в неких условных единицах, для представления данных о светимости чего-либо необходимо сравнение с эталоном, измерение светимости которого следует повторять после каких либо манипуляций с установкой.

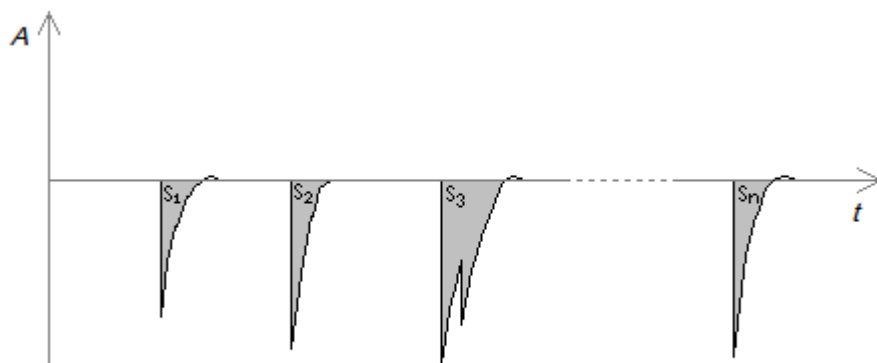


$$A_t = A_1 + A_2 + A_3 + \dots + A_n$$

Интегрально-импульсный режим.

Метод сводится к определению интегральной суммы криволинейных трапеций, ограниченных нулевой осью на осциллограмме (осью X, либо осью уровня дискриминатора) и волноформой импульсов, пришедших за определённый промежуток времени. Метод

отличается от остальных хорошей линейностью, независимо от величины светимости (величина интегральной суммы строго линейно пропорциональна интенсивности света, падающего на фотокатод) Это позволяет измерять светимость объектов, дающих на выходе ФЭУ аж до 10^4 — 10^5 имп/сек.

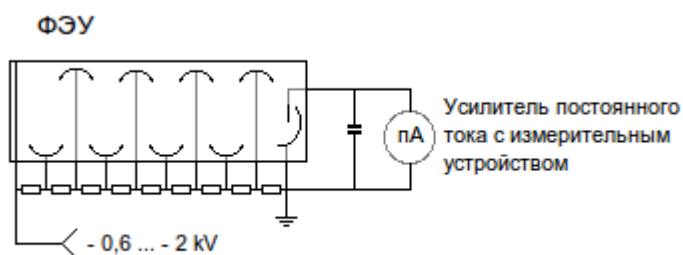


$$S_t = S_1 + S_2 + S_3 + \dots + S_n$$

Токовый режим.

К выходу с ФЭУ подключается усилитель постоянного тока с последующим измерительным устройством (например вольтметром). При необходимости, фон сглаживается конденсатором, подключённым параллельно. Часто в качестве измерительного устройства с усилителем применяются лабораторные потенциометры.

Токовый режим обладает меньшей пороговой светочувствительностью по сравнению с импульсными режимами, однако обладает большей стабильностью (случайная погрешность импульсных режимов обычно ± 2 — 3% , а при измерении особо слабых свечений до 5%), а также может регистрировать относительно большие светимости.



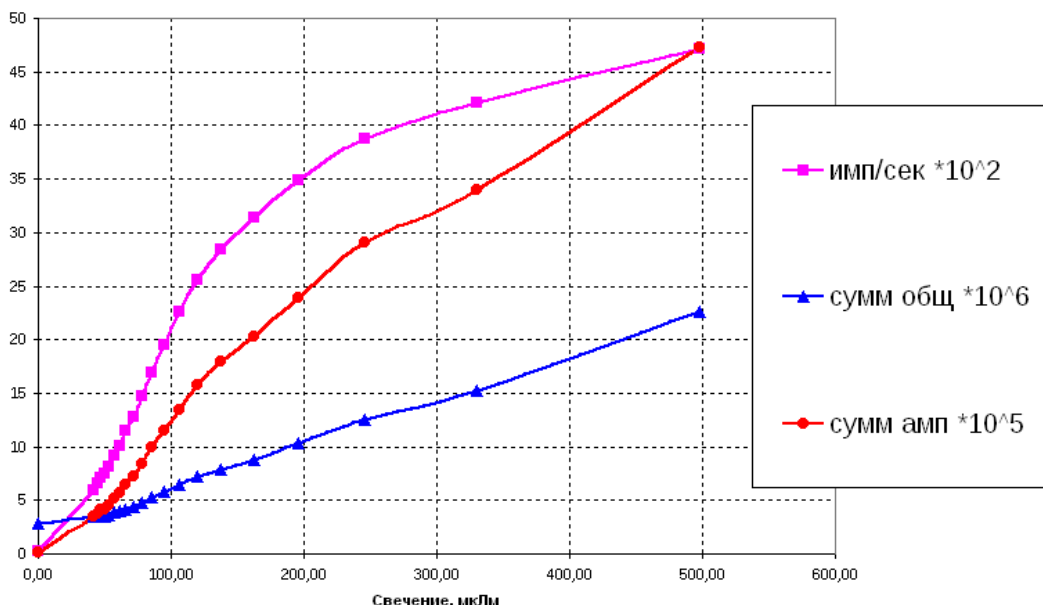
Токовый режим целесообразно применять при измерении свечений, дающих на выходе ФЭУ более 10^2 импульсов.

При исследовании биохемилюминесценции (БХЛ) обычно применяются импульсные режимы.

С помощью светодиодного эталона (описанного в соответствующей главе ниже) с магазином сопротивлений можно исследовать хемилюминометры на линейность в различных диапазонах и в различных режимах.

Ниже представлен пример графика, показывающего линейность показаний прибора в описанных выше трёх импульсных режимах, при различных интенсивностях свечения светодиодного эталона.

Чувствительность (линейность) установки Журавлёва-Закотеева



Чувствительность в разных режимах: в импульсном (розовая линия, «имп/сек * 10²»), в режиме интегральной светосуммы (синяя линия, «сумм. общ. * 10⁶»), в импульсно-амплитудном (красная линия, «сумм. ампл. * 10⁵»). График получен на основе светодиодного эталона с максимумом излучения в области 570 нм

Из графика видно, что режим счёта импульсов целесообразно использовать для исследования световых потоков до 2500 имп/сек, а режим интегральной светосуммы — для регистрации световых потоков свыше 1500 имп/сек. Импульсно-амплитудный режим проявляет среднюю линейность на всём исследуемом промежутке интенсивностей (от 0 до 500 мкЛм).

По сути, режим интегральной светосуммы (на графике — «сумм. общ.») представляет из себя «виртуальный» токовый режим. Как бы это не казалось странным, но фототок ФЭУ можно рассчитать математически.

$$I_{\phi} = -k * \frac{\int_0^{t_{сч}} A(t) dt}{t_{сч}}$$

где:

I_{ϕ} — фототок ФЭУ в амперах.

$t_{сч}$ — время счёта.

$A(t)$ — некая функция зависимости неположительной ($A \leq 0$) мгновенной амплитуды сигнала (в дискретах АЦП) от времени. Положительные значения амплитуды не учитываются. Дело в том, что импульсы с ФЭУ имеют отрицательную полярность, а заход волноформы в положительную область является результатом инерционности элементной базы входных каскадов звуковой карты, которые предназначены для регистрации переменного тока звуковой частоты.

k — коэффициент пропорциональности, равный электрическому заряду (в Кулонах), проходящему через входную (высокоомную) цепь первого каскада усилителя за интервал между опросами АЦП, при приложенной ЭДС соответствующей одной дискрете АЦП. Соответственно он зависит от входного сопротивления усилителя, коэффициента усиления и частоты опроса АЦП.

Знак минус стоит потому, что электрон, выбиваемый из фотокатода квантом света, имеет

отрицательный заряд, соответственно и импульсы на выходе ФЭУ имеют отрицательную полярность, и если перед формулой не поставить знак минус, то значения тока будут тоже отрицательными, то есть чем больше поток света, тем меньше значение тока. Чтобы это компенсировать, перед формулой ставится знак минус.

Ну а наш режим интегральной светосуммы фактически представляет собой часть этой формулы:

$$-\int_0^{t_{cy}} A(t)$$

И если учесть, что все остальные величины (k , t_{cy}) постоянные, то можно утверждать, что показатель интегральной светосуммы прямо пропорционален фототоку ФЭУ, если не принимать во внимание погрешности, привносимые в процессе усиления и оцифровке сигнала.

Ну а для нахождения истинного значения значения фототока в (общей формуле), мы делим светосумму на время счёта (количество секунд) и умножаем на коэффициент, связывающий дискреты АЦП с единицами электрического заряда, ибо единица измерения силы тока — Ампер — представляет собой ток, проводящий один Кулон электрического заряда за одну секунду.

Усилители

Весьма важную роль в регистрации сверхслабых свечений играют усилители сигнала. Мощность сигналов на выходе ФЭУ ничтожно мала, чтобы сигналы можно было обрабатывать и регистрировать. Поэтому выход с ФЭУ подаётся сначала на усилитель, а затем уже на регистрирующее устройство. Сигналы, поступающие с ФЭУ, настолько малы, что в целях защиты от помех усилители нередко конструируются из двух блоков — основного усилителя, на котором могут располагаться органы управления, и предварительного усилителя, который располагается в непосредственной близости от ФЭУ и подключается к ФЭУ максимально коротким проводом либо же располагается в корпусе самого блока ФЭУ, рядом с делителем напряжения.

В соответствии с используемым режимом работы ФЭУ — импульсным или токовым, применяются усилители разных типов. Для импульсного режима используются импульсные усилители, а также линейные усилители переменного тока.

Для токового режима достаточно тривиальным решением было использование в качестве усилителя, а заодно и устройства индикации лабораторные рН-метры, например ЛПУ-1. По сути, такие приборы представляли собой милливольтметры с очень высоким входным сопротивлением. С такого рН-метра выходной сигнал часто подавался на аналоговый самописец.



Лабораторный потенциометр универсальный ЛПУ-1
(рН-метр — милливольтметр)

Что же касается импульсного режима, то долгое время, в качестве импульсных усилителей использовались советские ламповые усилители УШ-2. Это был широкополосный импульсный усилитель с дискриминатором на выходе. Усилитель состоял из нескольких блоков: основной блок (собственно сам усилитель), блок питания (по размерам и весу примерно такой же, как и основной блок) и небольшой выносной блок предварительного усилителя, он подключался опционально, обычно располагался вблизи ФЭУ. «Широкополосным» усилитель назывался потому, что мог работать как с отдельно следующими импульсами, так и с импульсами, следующими с огромной частотой. Дискриминатор имел 100 фиксированных позиций и служил для фильтрации шума («дискриминации» импульсов, амплитуда которых была ниже заданной).

Также дискриминатор служил для статистических исследований амплитуд импульсов: постепенно прибавляя порог дискриминации на некоторое значение (одно или несколько

делений) и производя замеры после каждого прибавления, можно было составить статистическую гистограмму амплитуд импульсов. В измерении хемилюминесценции это обычно не использовалось, но широко использовалось в радиометрии, гамма-спектрометрии, в ядерной физике. Некая частица (например, гамма квант) поглощаясь неким сцинтиллирующим веществом (например, NaI), вызывала вспышку света, которая регистрировалась с помощью ФЭУ. Чем больше была энергия частицы (чем короче была длина волны гамма кванта), тем больше квантов света излучало сцинтиллирующее вещество. В свою очередь, кванты света, пришедшие на ФЭУ одновременно регистрировались как один большой импульс (с большой амплитудой). Таким образом, в докомпьютерную эпоху дискриминатор позволял получить представление о жесткости радиоактивного излучения, а следовательно идентифицировать радиоактивные изотопы, исследовать атомные реакции, проводить многие другие исследования.

К выходу дискриминатора УШ-2 подключалась пересчётная схема или интегратор.

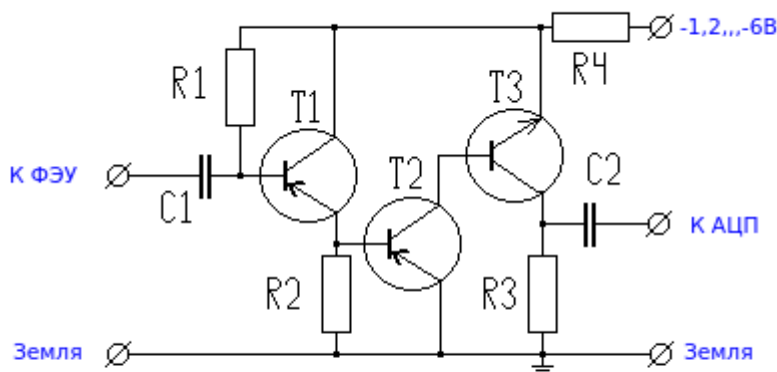
Позже, вместо УШ-2 стали использоваться более компактные приборы. Например, на кафедре биофизики и физики МГАВМиБ долгое время использовались блоки радиометра RFT (производства ГДР). Они объединяли в себе источник питания для ФЭУ (или другого электронно-вакуумного устройства), усилитель с хитрым дискриминатором и пересчётное устройство, с возможностью вывода показаний на печать при помощи специального дополнительного печатающего устройства (которое печатало показания на бумажную ленту, наподобие чековой в кассовом аппарате).

Позже, в эпоху компьютеризации, необходимость в сложных схемах усилителей с аналоговыми дискриминаторами отпала, в задачи усилителя стало входить лишь усиление сигналов с ФЭУ до такого уровня, чтобы с ними могли работать аналого-цифровые преобразователи (АЦП). А необходимость в аналоговых дискриминаторах отпала, потому что процессы дискриминации уже стали проходить на цифровом (программном) уровне.

Схема такого усилителя, способного усиливать сигналы с ФЭУ для регистрации его по средствам АЦП, будет подробно описана ниже.

Принципиальная схема простейшего усилителя для подключения ФЭУ к АЦП (звуковой карте ПК)

На рисунке ниже представлена простейшая принципиальная схема усилителя для ФЭУ.



В данной схеме основное усиление происходит за счёт транзисторов Т2 и Т3, а транзистор Т1 служит для получения высокого входного сопротивления для улавливания сигналов с фотокатода ФЭУ и усиления не даёт. В качестве транзисторов Т1 и Т2 могут использоваться отечественные транзисторы типов: МП39, МП40, МП41, МП42, а в качестве транзистора Т3 могут использоваться транзисторы типов МП35, МП36, МП37, МП38 (буквенные коды после типа транзистора, вроде МП40А, МП40Б, и т. п. в данном случае значения не имеют). Сопротивление резистора R1 должно быть 1 МОм, R2 — 2 кОм, R3 — порядка 1,5 — 3 кОм. Величина резистора R4 зависит от напряжения питания, при низком напряжении (1,2 — 1,5 В) он может и отсутствовать совсем. Конденсатор С1 должен быть экранирован, проще всего использовать конденсатор в металлическом корпусе, при этом корпус (экран) нужно заземлить. Ёмкость конденсатора С1 — порядка 1мкФ. В качестве конденсатора С2 можно использовать любой конденсатор ёмкостью не менее 10 мкФ.

В большинстве случаев такой схемы бывает вполне достаточно для усиления сигналов с ФЭУ до такого уровня, чтобы они могли быть зарегистрированы с помощью микрофонного входа звуковой карты компьютера. Если же уровень сигнала недостаточен для отчётливой регистрации (зависит от звуковой карты), то можно использовать две подобные схемы, подключённые последовательно, в этом случае во второй схеме (подключённой к выходу первой) конденсатор С1 уже не нужен.

Источники питания ФЭУ

Фото-электронные умножители (ФЭУ) требуют высоковольтного питания.

Обычно напряжение на фотокатод ФЭУ составляет от 500 до 2000 вольт.

На практике в хемилуминометрии источники питания ФЭУ могут представлять собой как отдельный блок, так и могут быть встроенными в корпус основного прибора, либо быть совмещёнными с другими узлами, например, с усилителем.



Блок питания Б5-24А

В традиционном исполнении, блоки питания ФЭУ были представлены отдельными блоками, при этом достаточно универсальными, способными работать как с любыми модификациями ФЭУ, так и с другими устройствами, прежде всего, электронно-вакуумными приборами, такими как газоразрядные счётчики. Отчасти это было продиктовано весьма внушительными размерами и массой таких приборов.

Позже, с развитием транзисторной электроники, блоки питания сильно уменьшились в размерах, благодаря чему стали в основном монтироваться внутри основного устройства.

Принципиальная схема простейшего источника ФЭУ

Внимание! Высокое напряжение! Самостоятельная сборка схем питания ФЭУ требует наличия навыков в области электромонтажа и радиоэлектроники! Несоблюдение правил техники безопасности в процессе сборки и эксплуатации подобных устройств может стать причиной порчи оборудования, а также несчастных случаев (электротравма, пожар), влекущих за собой причинение вреда здоровью или смерть людей, а также серьёзный материальный ущерб.

Существует несколько способов получения высокого напряжения для питания ФЭУ.

Самый простой — непосредственное увеличение напряжения от бытовой электросети, с последующим выпрямлением (с умножением) и стабилизацией.

Достоинства такого подхода — достаточно простая сборка, не требующая специальных деталей, таких как ферритовые трансформаторы. Недостатки такого подхода — большая чувствительность к перепадам напряжения в сети.

Ниже представлена принципиальная схема такого решения.

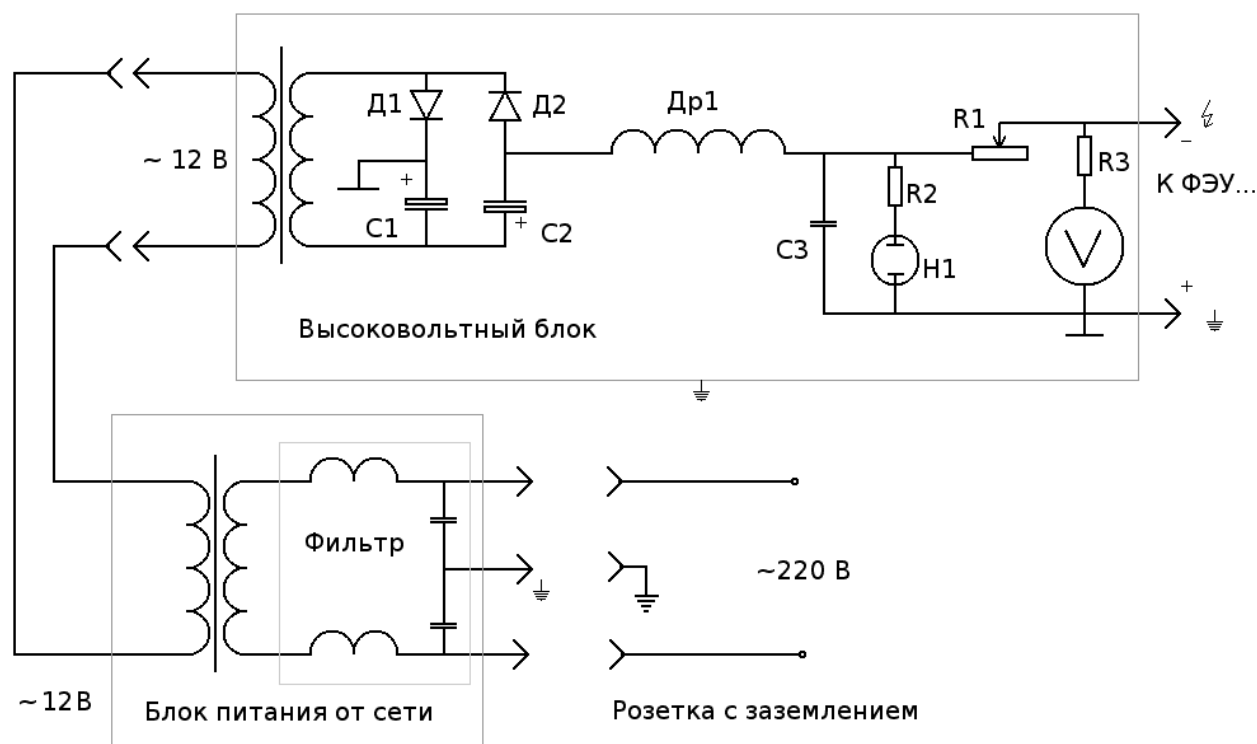


Схема состоит из двух блоков: блока питания хемилуминометра от сети переменного тока, выдающего на выходе напряжение ~12 Вольт (переменного тока), и высоковольтного блока, преобразующего 12 Вольт переменного тока в напряжение 600 — 2000 Вольт постоянного тока для питания ФЭУ.

Зачем нужны два блока? Почему бы просто не воспользоваться повышающим трансформатором? На это может быть несколько причин.

Во-первых, повышающие трансформаторы 1 : 2 или 1 : 4 — достаточно большая редкость, к тому же входная обмотка трансформатора должна быть пригодна для подключения к бытовой электросети 220В, в противном случае, использование трансформатора может быть небезопасным. В то время как трансформаторы 220 : 12 и 220 : 6 — достаточно распространены, это трансформаторы питания разнообразных бытовых электронных приборов, при этом их обмотки по своему сопротивлению и мощности уже рассчитаны на 220В осветительной сети.

Во-вторых, от блока питания ~12В, параллельно с высоковольтным блоком питания ФЭУ, могут питаться и другие узлы хемилуминометра, например усилитель сигналов с ФЭУ. Однако стоит заметить, что к одной и той же выходной обмотке трансформатора блока питания нельзя подключать высоковольтный источник питания ФЭУ и питание тэна термостата, так как включение и выключение тэна будет приводить к изменению нагрузки в низковольтной линии, а следовательно, вызывать перепады напряжения на ФЭУ, что крайне нежелательно.

В-третьих, такая конструкция может быть более эргономичной. Первый блок, блок питания хемилуминометра от осветительной сети, может быть выносным (как обычный

адаптер питания для бытовых электронных приборов), а второй, высоковольтный блок, в целях безопасности лучше монтировать внутри корпуса хемилуминометра. При этом, от блока питания к хемилуминометру будет идти провод под низким (~12В) напряжением, и на разъёмах хемилуминометра будут отсутствовать какие-либо контакты с высоким напряжением, что добавляет плюсов к электробезопасности.

Рассмотрим устройство схемы подробнее.

Блок питания от сети состоит из трансформатора (220 : 12 В) и сетевого фильтра. Сетевой фильтр может и отсутствовать, однако его присутствие снижает влияние помех в электросети на работу прибора. Фильтр состоит из высокочастотных ферритовых дросселей и конденсаторов. Стоит обратить внимание, что такое подключение, как показано на схеме, обязательно требует наличия розетки с заземлением. Если наличие такой розетки не гарантируется, то лучше обойтись вообще без такого фильтра или, по крайней мере, не подключать конденсаторы к контакту заземления или корпусу.

После преобразования напряжения в 12 Вольт переменного тока, оно подаётся на входную обмотку повышающего трансформатора. В качестве повышающего трансформатора используется также трансформатор питания от бытовых электронных приборов: 220:6, 220:5, 220:3 (в зависимости от требуемого напряжения на ФЭУ), только развёрнутый наоборот, то есть выходная обмотка используется в качестве входной. Если использовался трансформатор 220:6, то на выходе мы получим напряжение 440 Вольт. Далее следует выпрямитель с умножением, в простейшем варианте состоящим из 2-х диодов (Д1, Д2) и 2-х конденсаторов (С1, С2). В качестве диодов Д1 и Д2 целесообразно использовать высоковольтные столбики, или специальные высоковольтные диоды, но только ни в коем случае не обычные диоды, так как они могут быть не рассчитаны на высокие напряжения. В качестве конденсаторов С1 и С2 следует использовать электролитические конденсаторы напряжения не менее того, что на выходе повышающего трансформатора (лучше с некоторым запасом) и ёмкостью не менее 250 — 500 мкФ. В случае отсутствия конденсаторов на нужное напряжение можно использовать батареи из нескольких конденсаторов, соединённых последовательно.

В итоге, после выпрямления мы получаем напряжение в 2 раза выше, чем на выходе трансформатора. Плюсовой контакт можно сразу соединить с корпусом. Минусовой идёт на дроссель Др1. Здесь следует использовать низкочастотный дроссель. Он служит для записания помех. После дросселя идёт высоковольтный конденсатор, его ёмкость уже может быть не большой. Далее подключена неоновая лампочка Н1 через резистор R2. Она служит как для индикации работы высоковольтного источника, так и как некий стабилизатор.

Далее идёт потенциометр R1, он служит для регулировки напряжения на ФЭУ. После него — вольтметр — это необходимо для контроля за напряжением на ФЭУ. Поскольку высоковольтные вольтметрические головки — довольно большая редкость, то можно использовать низковольтные вольтметрические головки, подключая их через резистор R3, который подбирается таким образом, чтобы быть на 1, 2, или 3 порядка выше, чем внутреннее сопротивление самой головки. Таким образом, если, например, головка на 200 вольт, то резистор R3 берётся в 10 раз больше внутреннего сопротивления головки, в результате 1500 вольт на ФЭУ превратятся в 150 на измерительной головке. А если, например, у нас головка на 20 вольт и имеет внутреннее сопротивление 10 КОм, то резистор R3 берётся номиналом в 1 МОм, и 1500 вольт на ФЭУ превратятся в 15 на измерительной головке.

Следует отметить, что высоковольтный блок должен быть смонтирован внутри отдельного экранированного корпуса, даже если сконструирован внутри корпуса хемилуминометра.

Регистрирующие устройства

Интеграторы и самописцы

Такие устройства служат для аналоговой регистрации. Интеграторы работают по принципу «аналоговых частотомеров», которые преобразуют импульсные сигналы с ФЭУ, предварительно усиленные и отфильтрованные (т.е. прошедшие через дискриминатор), в постоянный электрический ток. Таким образом, частота импульсов превращается в амплитуду на выходе интегратора. Интеграторы обычно имели измерительную головку, для индикации показаний, а к их выходам могли подключаться аналоговые самописцы.

Аналоговые самописцы могут быть подключены к выходу усилителя постоянного тока при работе ФЭУ в токовом режиме, или к выходу интегратора при работе ФЭУ в импульсном режиме. Аналоговые самописцы представляли из себя устройства, рисующие график на движущейся с заданной скоростью ленте бумаги. Обычно такие самописцы использовались для регистрации кинетики какого-либо процесса во времени.



Самописец КСП-4
размах шкалы — 10 мВ
был весьма распространён в СССР



Самописец LKB 2210
размах шкалы — от 10 мВ до 1 В
типичный представитель эпохи конца 80-х — начала 90-х

Иногда встречались многоканальные самописцы, регистрирующие одновременно несколько показателей на один и тот же график. В исследовании хемилюминесценции такие решения могли использоваться, например, для одновременной регистрации хемилюминесценции и температуры.



Двухканальный самописец BBC SE 120
размах шкалы — от 1 В до 250 В

Пересчётные схемы

Под пересчётными схемами традиционно принято понимать устройства для счёта импульсов. Они используются при работе установки в импульсном режиме.

Принципы работы таких устройств могли быть следующими: либо счёт количества импульсов за установленный промежуток времени (использовался чаще всего), либо счёт времени, за которое будет зафиксировано установленное количество импульсов.

Иногда в качестве пересчётных схем использовались частотомеры.

Пересчётные схемы, начиная с эпохи 80-х годов, могли иметь цифровой выход на цифровое печатающее устройство (ЦПУ). При желании обычно можно сделать устройство, с помощью которого такой выход можно подключить и к ПК.



Частотомер ЧЗ-34

Аналого-цифровые преобразователи (АЦП)

В эпоху компьютеризации весьма важную роль стали занимать аналого-цифровые преобразователи.

В качестве АЦП для переменного тока, в том числе для импульсных сигналов можно использовать вход звуковой карты персонального компьютера. Данные устройства имеют разрешение 16 — 24 бит и частоту опроса до 192 КГц. Плюсами такого решения являются прежде всего высокая доступность и низкая себестоимость. А недостатком такого решения является в первую очередь относительно узкий частотный диапазон, обычно от 20 Гц до 22 КГц, что обусловлено элементной базой на входе звуковой карты, предназначенной для записи звука, частотного диапазона слышимого человеческим ухом. Также в некоторых случаях порой имеет место некоторая нестабильность по амплитуде (может медленно дрейфовать). Однако этого обычно можно избежать путём калибровки по эталону перед началом измерения.

Что же касается сравнительно узкого частотного диапазона, то для измерения хемилюминесценции это не принципиально, ибо при высокой плотности следования импульсов (более 2 тысяч в секунду) целесообразно использовать токовый режим работы с ФЭУ, как более стабильный.

Компьютеризация и программное обеспечение

В случае использования современного промышленного хемилуминометра, имеющего штатный выход для подключения к ПК, всё необходимое программное обеспечение уже поставляется вместе с устройством. В случае, если прибор подключается через последовательный порт (разъём RS-232), то обычно имеет документированный протокол, что делает возможным разработку своих собственных программ, заточенных под определённые конкретные задачи.

Если прибор не имеет выхода для подключения к ПК, но имеет выход на цифровое печатающее устройство, то его обычно можно подключить к параллельному порту компьютера, с помощью специального самодельного преобразователя.

Если прибор имеет выход на аналоговый самописец, то его можно подключить к лабораторному АЦП постоянного тока и использовать штатное либо созданное самостоятельно программное обеспечение к лабораторному АЦП.

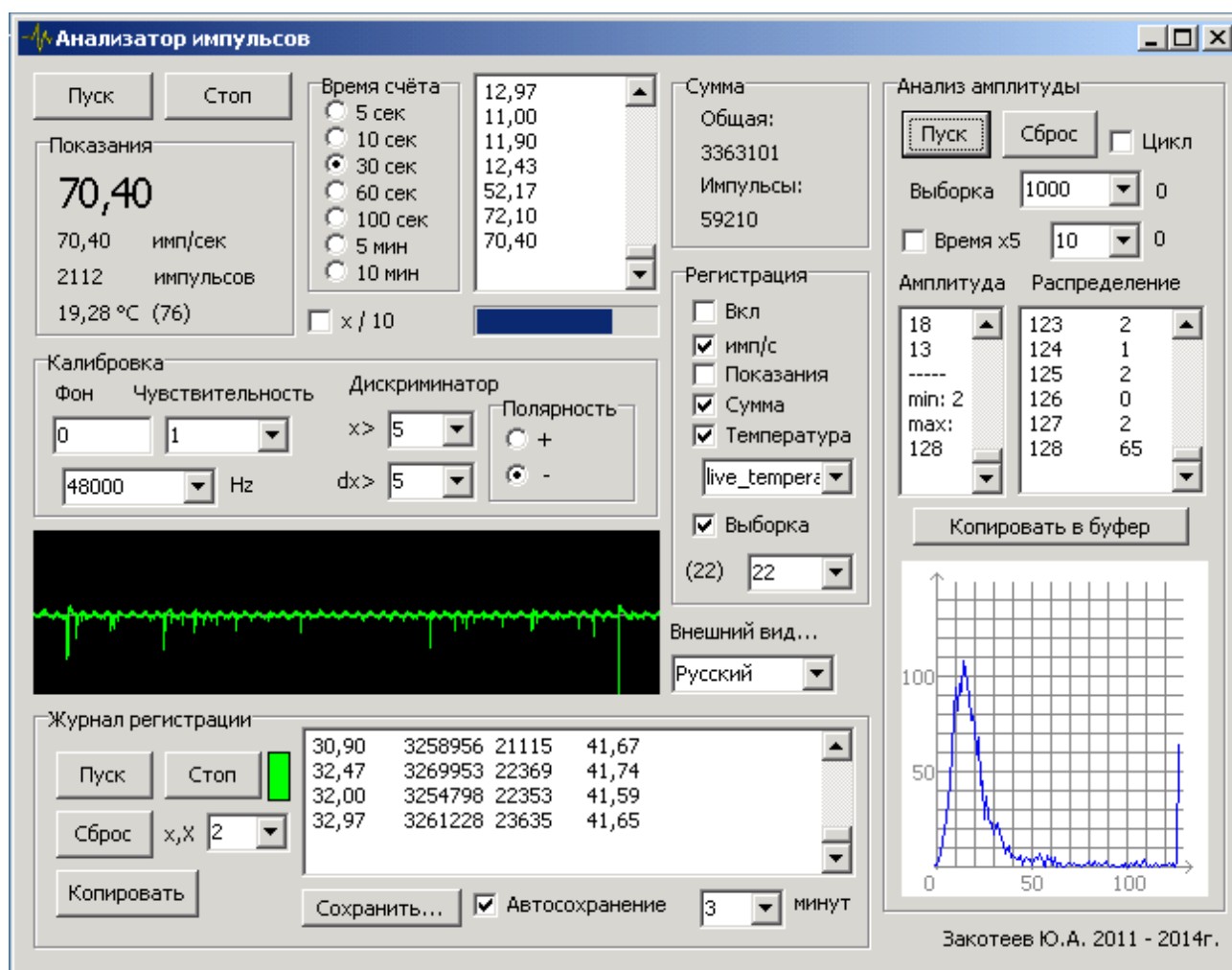
Если же прибор имеет выход на пересчётную схему, то возможно его подключение к звуковой карте ПК, с использованием её в качестве АЦП. Для этого случая было разработано много различных вариантов прикладного софта, от обычной пересчётки, до полноценного анализатора импульсов, способного не только считать импульсы в единицу времени, но и проводит статистический анализ амплитуд импульсов.

Изначально, на заре разработки, такие вот «программные» пересчётные схемы были порой перегружены лишним функционалом, например, множеством различных сложных алгоритмов работы дискриминатора, для возможности фильтрации различных помех, или с возможностью работы одновременно на два канала (правый и левый), с целью подключения к одному компьютеру нескольких установок. Это делало программы весьма тяжеловесными, неудобными и глючными, и поэтому вскоре от таких излишеств пришлось отказаться.

В настоящее же время, используется только два последовательных дискриминатора — по нарастанию (функции приращения амплитуды $dy(x)$ — переднему фронту нарастания импульса) и по амплитуде ($y(x)$).

Примером такого подхода может служить программа «Анализатор импульсов». Данная программа способна как вести обычный счёт импульсов, так и производить статистическую обработку амплитуд импульсов. Результаты статистического распределения заносятся в журнал регистрации, откуда могут быть скопированы в любую программу электронных таблиц для дальнейшей обработки. Визуально статистическое распределение отображается на маленьком графике в углу окна программы.

Показания, полученные в процессе счёта импульсов (импульсы в секунду) могут сразу пересчитываться в какие-либо другие единицы, с помощью вычитания фона и умножения на заданный коэффициент. Регистрация полученных показаний ведётся в 2 журнала регистрации. Один регистрирует только полученные пересчётные значения и работает непрерывно; другой — регистрирует заданные пользователем значения: количество импульсов в секунду, показания, полученные в результате пересчёта (вычитания фона и умножения на заданный коэффициент), светосумму, температуру (температура берётся из другой внешней программы — «Термостат», синхронная регистрация температуры важна для исследования температурных зависимостей). Регистрация во второй журнал может идти как непрерывно, так и по заданной выборке — максимальному количеству значений, после которых регистрация прекращается. Полученную таблицу значений можно также копировать в буфер обмена для последующей вставки и дальнейшей обработки в программе электронных таблиц, а можно и сохранить в текстовый файл. Предусмотрена функция автосохранения этого журнала регистрации через определённые промежутки времени, чтобы не допустить случайной потери важных экспериментальных данных, например, в случае внезапного отключения электроэнергии.



Окно программы «Анализатор импульсов»

Пример создания простейшей программы для обработки сигналов с ФЭУ

В качестве простейшего примера программного обеспечения для счёта и анализа импульсов (при использовании звуковой карты в качестве АЦП) рассмотрим создание простейшей программы в среде **Delphi**.

Почему именно Delphi? — Потому что эта среда традиционно считается наиболее понятной и дружелюбной, ориентированной не столько на профессиональных программистов, сколько на обычных пользователей, которым по тем или иным причинам пришлось заняться программированием. В принципе, жестко зависимыми от среды разработки и от платформы являются лишь операции непосредственной работы с АЦП — а именно комплекс приёмов, направленный на то, чтобы через некоторые промежутки времени получать содержимое буфера захвата, представляющего собой массив целочисленных данных, каждая ячейка которого представляет результат единичного опроса АЦП. Ну а алгоритмы дальнейшей работы с этим массивом в принципе универсальны, и их можно легко перенести и на другие среды разработки и платформы.

Для создания этого примера использовалась среда Delphi 2009, но это не так важно, по идее должна подойти любая версия среды Delphi. Полученная программа будет работать в операционной системе **Windows**, а также через среду **wine** в других операционных системах, например Linux.

Программный код приведённого ниже примера предоставляется на принципах копиленфта, под лицензией GNU GPL.

Для начала создадим проект типа «VCL Forms Application»

Элементы формы

Добавим на пустую форму необходимые элементы управления и отображения показаний.

Элементы управления:

Две кнопки — для запуска и останова АЦП.

Кнопка для запуска анализа амплитуд.

Переключатель `radiogroup1` (двухпозиционный) — для задания полярности.

Также настоятельно рекомендуется добавить какие-либо органы управления для задания уровней дискриминатора (смотри процедуру запуска АЦП). В данном примере они не рассматриваются, с целью упрощения программы.

Элементы индикации:

Надписи (Label):

Label1 — отображение числа посчитанных импульсов в процессе счёта

Label2 — отображение показаний импульсов в секунду

Label3 — отображение общей светосуммы

Label4 — отображение импульсной светосуммы

Label5 — отображение мгновенных показаний (импульсов в секунду)

Label6 — отображение количества обработанных импульсов (для анализа амплитуд)

Label7 — отображение количества обработанных буферов (для анализа амплитуд)

Ленты регистрации (memo):

memo1 — для вывода показаний,

memo2 — для вывода величин амплитуд,

memo3 — для вывода статистики амплитуд

PaintBox1 — для отображения осциллограммы, желательно сделать вытянутым.

Progressbar1 — аналоговый ползунок для вывода мгновенных показаний (заменяет стрелку)

Также при желании на форму можно добавить график распределения амплитуд (PaintBox2).

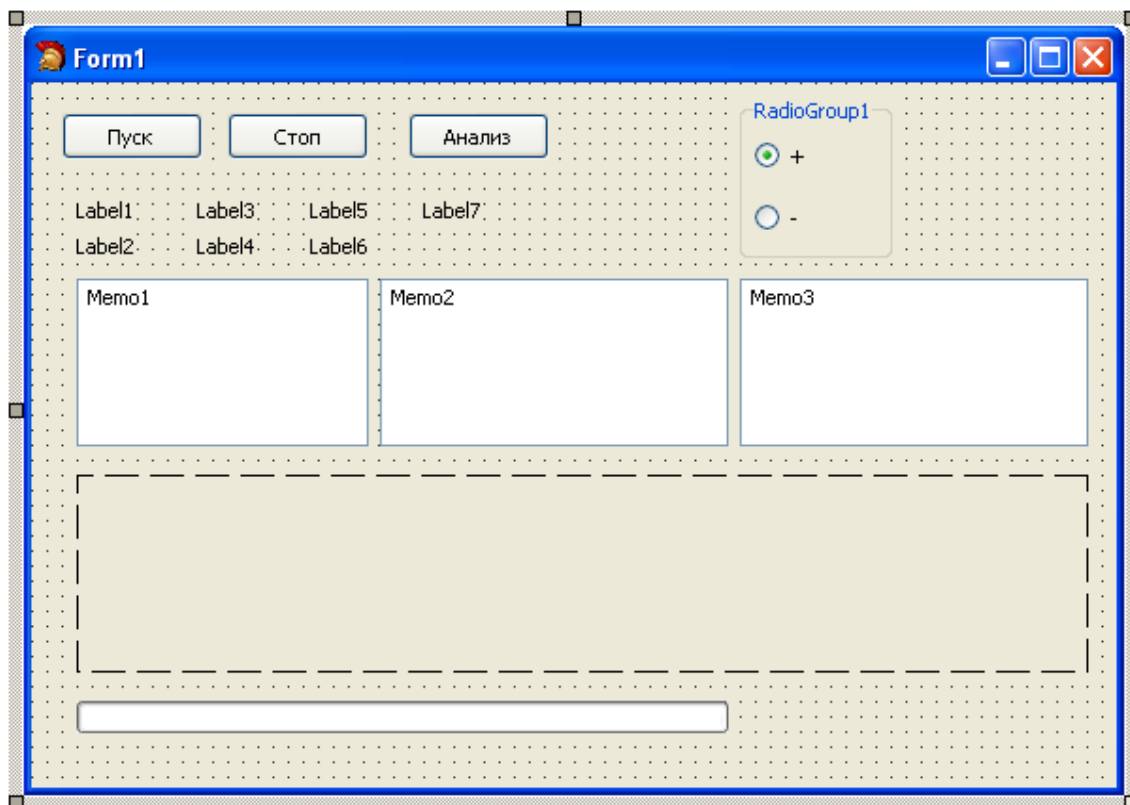
При этом нужно задать точку начала координат переменными `x0` и `y0`, в отсчёте от левого верхнего угла графика. Например, при размере графика 135 на 135 точек начало координат можно задать так:

`x0 := 5;`

`y0 := 125;`

Эти переменные можно задать, например, в процессе создания формы.

После добавления всех необходимых элементов, форма может выглядеть примерно так, как показано на рисунке ниже:



Под блоками лент регистрации (memo) находится экран отображения осциллограммы (PaintBox1), а под ним расположен аналоговый индикатор (ProgressBar1).

Модули

В начале нашей программы, в разделе **uses** нужно указать модуль **MMSystem**. То есть блок перечисления используемых модулей должен выглядеть примерно так:

uses

Windows, Messages, SysUtils, Variants, Classes, Graphics, Controls, Forms,
Dialogs, MMSystem, StdCtrls, ExtCtrls, ComCtrls;

Типы данных

Работа с АЦП требует специальных типов данных. В разделе **type** нужно задать описанные ниже типы данных.

type

```
TData8 = array [0..127] of byte;
PData8 = ^TData8;
TData16 = array [0..127] of smallint;
PData16 = ^TData16;
TPointArr = array [0..127] of TPoint;
PPointArr = ^TPointArr;
```

Объявления процедур

Нужно объявить специальную процедуру **OnWaveIn** в разделе **public** :

public

{ Public declarations }

procedure OnWaveIn(**var** Msg: TMessage); **message** MM_WIM_DATA;

Переменные

Для работы нам понадобится много особых переменных, их добавим в раздел **var** :

var

uoven, exuroven, exschet, schet, disc, l_disc, znak, fmode: integer;
amp_list, gdisd: boolean;
summ1, summ2, summ3, summ4, impsn, aimpsn, x0, y0, x1, y1, gdisc: integer;
otpr, otpn, inwavenow, inwavenow_l, inwavenow_r, okur: boolean;

frecizm, tchn, chnls, i: Integer;
impsec: real;

amp_live, amp_min, amp_max, amp_n, amp_n_max: integer;
analyse_amp : boolean;
dx_plus: boolean;
i_buf, max_buf: integer;
amp_spec: ARRAY[0..128] OF LongInt;
I1, i2, I1_max: integer;
gr_amp: array[0..128] of TPoint;
tmode: boolean;
c_n, c_max: integer;

//
header: TWaveFormatEx;
BufLen: word;
buf: pointer;
//
WaveIn: hWaveIn;
hBuf: THandle;
BufHead: TWaveHdr;
bufsize: integer;
Bits16: boolean;
p: PPointArr;
stop: boolean = false;
potok: boolean = false;
//

Подробно опишем значение некоторых важных переменных.

Для изменения значений этих переменных целесообразно добавить дополнительные элементы управления.

Логические переменные:

analyse_amp включает анализ амплитуд

amp_list включает вывод амплитуд зарегистрированных импульсов

gdisd включает рисование линии дискриминатора на осциллограмме

tmode режим статистического анализа, при котором анализируется не

фиксированное количество обработанных импульсов (соответствующее объёму выборки), а заданное количество буферов.

Целочисленные переменные

disc уровень дискриминации по нарастанию
l_disc уровень дискриминации по амплитуде
znak полярность импульсов (может принимать значения -1 или +1)
amp_n_max абсолютное значение объёма выборки статистического анализа амплитуд
c_max значение объёма выборки статистического анализа амплитуд в

обработанных буферах.

tchn количество знаков после запятой в показаниях импульсов в секунду

Для задания логических переменных целесообразно использовать флажки (CheckBox), а для задания целочисленных переменных — выпадающие списки (ComboBox) или ползунки.

Процедуры работы с АЦП

Процедура запуска АЦП

Эту процедуру следует положить под первую кнопку (кнопку «Пуск»).

begin

// Вначале зададим нужные переменные.

// Вместо фиксированных значений, можно задать другие

disc := 5; //Задаём дискриминатор по нарастанию (например, равный 5-и дискретам)

frecizm := 48000; //Задаём частоту опроса АЦП (например, 48 КГц)

L_disc := 5; //Задаём дискриминатор по амплитуде (например, равный 5-и дискретам)

gdisc := round((127 - **L_disc** * **znak**) * paintbox1.Height / (1 shl 8)); { задаём разметку уровня дискриминации на графике }

if radiogroup1.ItemIndex = 0 then **znak** := 1 **else** **znak** := -1; //Задаём знак

// Время счёта импульсов задаётся количеством буферов.

// При этом, у нас 1 буфер равен 0,5 секунд.

max_buf := 60; //Задаём время счёта, в количестве буферов (30 секунд — 60 буферов)

//Теперь переменные заданы и можно переходить к работе с АЦП

if potok = false then //Если АЦП не запущен, то...

begin //Запускаем АЦП...

potok := true; //отмечаем, что АЦП запущен

BufSize := round(**frecizm** / 2); { Размер буфера задаём равным 0,5 секунд }

Bits16 := false; //В данном случае нам хватит дискретности и 8 бит, 16 нам не нужно

with header **do**

begin

wFormatTag := WAVE_FORMAT_PCM;

nChannels := chnls; { количество каналов }

nSamplesPerSec := **frecizm**; { частота }

wBitsPerSample := integer(**Bits16**) * 8 + 8; { 8 / 16 бит }

nBlockAlign := **nChannels** * (**wBitsPerSample** div 8);

nAvgBytesPerSec := **nSamplesPerSec** * **nBlockAlign**;

cbSize := 0;

end;

WaveInOpen(Addr(**WaveIn**), WAVE_MAPPER, addr(header),

Form1.Handle, 0, CALLBACK_WINDOW);

BufLen := header.**nBlockAlign** * **BufSize**;

hBuf := **GlobalAlloc**(GMEM_MOVEABLE and GMEM_SHARE, **BufLen**);

Buf := **GlobalLock**(**hBuf**);

with **BufHead** **do**

begin

```
lpData := Buf;  
dwBufferLength := BufLen;  
dwFlags := WHDR_BEGINLOOP;
```

end;

```
WaveInPrepareHeader(WaveIn, Addr(BufHead), sizeof(BufHead));
```

```
WaveInAddBuffer(WaveIn, addr(BufHead), sizeof(BufHead));
```

```
GetMem(p, BufSize * sizeof(TPoint));
```

```
stop := true;
```

```
WaveInStart(WaveIn);
```

end;

end;

Процедура останова АЦП

Эту процедуру следует положить под вторую кнопку (кнопку «Стоп»).

begin

```
schet := 0;
```

```
potok := false;
```

```
if stop = false then
```

```
Exit;
```

```
stop := false;
```

```
while not stop do
```

```
Application.ProcessMessages;
```

```
stop := false;
```

```
WaveInReset(WaveIn);
```

```
WaveInUnPrepareHeader(WaveIn, addr(BufHead), sizeof(BufHead));
```

```
WaveInClose(WaveIn);
```

```
GlobalUnlock(hBuf);
```

```
GlobalFree(hBuf);
```

```
FreeMem(p, BufSize * sizeof(TPoint));
```

end;

Процедура по заполнению буфера

Эта процедура будет выполняться автоматически при заполнении буфера, в нашем случае каждые полсекунды.

procedure TForm1.OnWaveIn;

var

```
i: integer;
```

```
data8, data8_2 : PData8;
```

```
data16, data16_2 : PData16;
```

```
h: integer;
```

```
XScale, YScale: single;
```

begin

```
if (tmode = true) and (analyse_amp = true) then c_n := c_n + 1;
```

```
h := PaintBox1.Height;
```

```
XScale := PaintBox1.Width / BufSize;
```

begin

Data8 := PData8(PWaveHdr(Msg.lParam)^.lpData);

YScale := h / (1 shl 8);

for i := 0 to BufSize - 1 do

begin

uroven := round(data8^[i]);

if znak = +1 **then begin**

if uroven > 128 **then** summ1 := summ1 + uroven - 128; //светосумма

if (dx_plus = false) and (data8^[i] > (disc + exuroven)) **then** dx_plus := true;

if (dx_plus = true) and (data8^[i] < (disc + exuroven)) **then**

begin

dx_plus := false;

amp_live := exuroven - 128;

summ2 := summ2 + amp_live;

if amp_live >= L_disc **then** schet := schet + 1;

//далее анализируем амплитуды импульсов

if (analyse_amp = True) and (amp_live >= 0) **then begin**

//если включён анализ и импульс имеет положительную амплитуду, то....

if amp_list = True **then** memo2.Lines.Add(inttostr(exuroven - 128));

if (amp_live < 129) and (amp_live >= 0) **then** amp_spec[amp_live] := amp_spec[amp_live] + 1;

if amp_live < amp_min **then** amp_min := amp_live;

if amp_live > amp_max **then** amp_max := amp_live;

amp_n := amp_n + 1;

if amp_n >= amp_n_max **then** //если счётчик заполнен, то....

begin

analyse_amp := false;

//останавливаем анализ амплитуд

memo2.Lines.Add('-----');

memo2.Lines.Add('min: ' + inttostr(amp_min)); //выводим сведения о минимальной

memo2.Lines.Add('max: ' + inttostr(amp_max)); //и максимальной амплитуде.

if amp_max < 128 **then** i1_max := amp_max + 1 **else** i1_max := 128;

for I1 := 0 to i1_max do //от нуля до максимума

memo3.Lines.Add(inttostr(I1) + char(9) + inttostr(amp_spec[I1])); //выводим таблицу

//обрабатываем массив данных для рисования графика спектра амплитуд

for i2 := 0 to 128 **do begin**

gr_amp[i2].x := x0 + (i2-1);

gr_amp[i2].y := y0 - amp_spec[I2];

end;

// Мы получили массив точек (с координатами x и y) для построения графика спектра.

// Сбрасываем значения амплитуд

amp_min := 66000; //в качестве минимальной амплитуды задаём большое значение

amp_max := 0; //а в качестве максимальной — наоборот, нулевое.

amp_n := 0; //обнуляем счётчик обработанных амплитуд импульсов

for I1 := 0 to 128 **do** amp_spec[I1] := 0; //очищаем массив амплитуд

c_n:=0; //обнуляем счётчик обработанных буферов

end;

```

end;
end;
end else begin
  if uroven < 127 then summ1 := summ1 + 127 - uroven; //светосумма
  if (dx_plus = false) and (data8^[i] < (-disc + exuroven)) then dx_plus := true;
if (dx_plus = true) and (data8^[i] > (-disc + exuroven)) then
begin
  dx_plus := false;
  amp_live := 128 - exuroven;
  summ2 := summ2 + amp_live;
  if amp_live >= L_disc then schet := schet + 1;

  if (analise_amp = True) and (amp_live >= 0) then begin

if amp_list = True then memo2.Lines.Add(inttostr(amp_live));
if (amp_live < 129) and (amp_live >= 0) then amp_spec[amp_live] := amp_spec[amp_live] + 1;

  if amp_live < amp_min then amp_min := amp_live;
  if amp_live > amp_max then amp_max := amp_live;
  amp_n := amp_n + 1;
if ((amp_n >= amp_n_max) and (tmode = false)) or ((c_n >= c_max) and (tmode = true)) then
  //Если достигнут максимум выборки, то....
begin
  analise_amp := false; //Выключаем анализ амплитуд
  c_n := 0;
  // Выводим минимальное и максимальное значение амплитуды
  memo2.Lines.Add('-----');
  memo2.Lines.Add('min: ' + inttostr(amp_min));
  memo2.Lines.Add('max: ' + inttostr(amp_max));
  if amp_max < 128 then i1_max := amp_max + 1 else i1_max := 128;

  for I1 := 0 to i1_max do

    // Выводим таблицу частотного распределения амплитуд
    memo3.Lines.Add(inttostr(I1) + char(9) + inttostr(amp_spec[I1]));

    for i2 := 0 to 128 do begin
      gr_amp[i2].x := x0 + (i2-1);
      gr_amp[i2].y := y0 - amp_spec[I2]; //зависит от высоты графика
    end;

  // Сбрасываем значения амплитуд
  amp_min := 66000; //в качестве минимальной амплитуды задаём большое значение
  amp_max := 0; //а в качестве максимальной — наоборот, нулевое.
  amp_n := 0;
  for I1 := 0 to 128 do amp_spec[I1] := 0; //очищаем массив амплитуд
end;
end;
end;
end;

```

```

end;

exuroven := uroven;
// Конец добавления счёта

//создаём массив данных для графика-осциллограммы
p^[i] := Point(round(i * XScale),
round(h - data8^[i] * YScale));
end;
end;

//Рисуем осциллограмму
with PaintBox1.Canvas do
begin
Brush.Color := clBlack; // устанавливаем чёрный цвет
FillRect(ClipRect); // и заливаем фон
if gdisc = true then // если нужно отметить уровень дискриминации
begin
Pen.Color := clGray; // устанавливаем серый цвет
MoveTo(0,gdisc); LineTo(PaintBox1.Width,gdisc); //и чертим линию
end;
Pen.Color := clLime; //clYellow; //теперь устанавливаем зелёный (или желтый) цвет
Polyline(Slice(p^, BufSize)); //и рисуем саму осциллограмму.
end;
//Конец работы с осциллограммой

if stop then
WaveInAddBuffer(WaveIn, PWaveHdr(Msg.lParam), SizeOf(TWaveHdr))
else
stop := true;

//отображаем число сосчитанных импульсов
Label1.Caption := inttostr(schet);

//вычисляем мгновенные показания
if schet >= exschet then impdsn := (schet - exschet)*2;

//отображаем мгновенные показания
Label5.Caption := '(' + inttostr(impdsn) + ')';

//выводим их на аналоговый индикатор
if impdsn <= 100 then aimpsn := impdsn;
if (impdsn > 100) and (impdsn <= 1000) then aimpsn := round(impdsn/10);
if (impdsn > 1000) and (impdsn <= 10000) then aimpsn := round(impdsn/10);
if (impdsn > 1000) and (impdsn <= 10000) then aimpsn := round(impdsn/100);
if (impdsn > 10000) then aimpsn := round(impdsn/1000);
Progressbar1.Position := aimpsn; //отображаем аналоговый ползунок
exschet := schet;
//конец обработки мгновенных показаний

```

```

i_buf := i_buf + 1;      //Прибавляем к счётчику обработанных буферов
if i_buf >= max_buf then  //Если достигнут максимум обработанных буферов, то...
begin
impsec := schet/i_buf*2;    //рассчитываем число импульсов в секунду

label2.Caption := FloatToStrF(impsec,ffFixed,10,tchn); //Отображаем показания имп/сек

memo1.lines.add(label2.Caption);  // Добавляем показания в журнал регистрации

// теперь работаем со светосуммой
summ3 := summ1;      //Выводим общую светосумму в переменную summ3
summ1 := 0;          //Обнуляем текущую общую светосумму
summ4 := summ2;      //Выводим импульсную светосумму в переменную summ4
summ2 := 0;          //Обнуляем текущую импульсную светосумму
label3.Caption := inttostr(summ3);    //Выводим светосумму общую
label4.Caption := inttostr(summ4);    //Выводим светосумму импульсную

//обнуление счёта
schet := 0;
i_buf := 0;
end;

label6.Caption := inttostr(c_n);
label7.Caption := inttostr(amp_n);
end;

```

Вспомогательные процедуры, не связанные с АЦП

Процедура задания начальных переменных (при создании формы)

```

procedure TForm1.FormCreate(Sender: TObject);
begin
chnls := 1;          //у нас один канал (моно)
tchn := 2;           //2 знака после запятой в показаниях импульсов в секунду
schet := 0;          //обнуляем счёт
gdisd := true;       //отобразим уровень дискриминатора на графике
amp_n_max := 500;    //зададим объём выборки 500 импульсов
c_max := 10;         //или 10 буферов
end;

```

Процедура запуска анализа амплитуд

Эту процедуру следует положить под третью кнопку (кнопку «Анализ»).

```

begin
analyse_amp := true;
end;

```

Программа готова, можно её собрать и запустить, нажав на кнопку с зелёным треугольником (Run) или нажав клавишу F9. Если Вы всё сделали правильно, то программа должна быть собрана и запущена нормально, без каких-либо проблем.

Мы создали простейшую программу для обработки импульсов с ФЭУ.

Пока что эта программа — лишь учебный макет, цель которого — показать на примере возможности создания программного средства для счёта и анализа импульсов, поступающих на вход звуковой карты ПК от таких приборов, как ФЭУ, или тому подобных, например газоразрядных счётчиков Гейгера.

Дополнение.

Улучшаем интерфейс программы.

В приведённом выше примере мы создали простейшую программу для работы с ФЭУ, выход усилителя которого подключён с звуковой карте. Однако для практического применения в таком биде программа ещё не готова — в её интерфейсе не хватает важных элементов настройки, в первую очередь уровней дискриминации.

Давайте на нашей форме создадим элемент типа GroupBox — группирующую панель и назовём её «Дискриминатор». Для того, чтобы программой было удобно пользоваться, целесообразно группировать элементы интерфейса. Кстати, элемент нашей формы RadioGroup1, который мы создали в начале, давайте тоже как-нибудь назовём, например, «Знак» или «Полярность».

Теперь внутри нашего GroupBox создадим два элемента типа ComboBox — поле ввода с выпадающим списком. Настроим должным образом наши ComboBox. Для начала, для каждого из них в списке свойств найдём свойство «Text» и заменим значение вроде «ComboBox1» на цифру «5» — это наш уровень дискриминации по умолчанию. Теперь добавим варианты значений для нашего дискриминатора. Обычно в лабораторной практике оптимальное значение дискриминатора может быть от трёх до семи дискрет, около десяти, но почти всегда не более пятнадцати. Найдём свойство «Items», в значении этого свойства будет значится «(Tstrings)», жмём на кнопку с троеточием рядом — откроется редактор (String List Editor), в нём пишем в столбик значения:

3
4
5
6
7
10
15

После чего закрываем этот редактор, нажав кнопку «ОК».

Теперь немного подвинем наши ComboBox вправо, напротив каждого из них добавим по надписи (Label) и напомним соответственно «Нарастание» и «Амплитуда».

В итоге у нас должно получиться как-то так:

Теперь давайте подключим созданные новые органы управления к программному коду, то есть сделаем так, чтобы наши регуляторы уровня дискриминации работали.

Давайте вернёмся к процедуре запуска АЦП, которую мы положили под кнопку «Пуск».

В начале этой процедуры мы задавали важные переменные, среди которых были **disc** и **L_disc**

Найдите сточку

```
disc := 5;
```

и замените на

```
disc := strtoint(ComboBox1.Text);
```

Зтем найдите строчку

```
L_disc := 5;
```

и замените на

```
L_disc := strtoint(ComboBox2.Text);
```

Функция `strtoint` («string to integer») служит для перевода строковых значений в целочисленные.

Следует обратить внимание на то, что значения дискриминатора и полярности импульсов следует устанавливать до запуска АЦП. А если требуется их изменить в процессе работы, то сначала нужно остановить АЦП, потом настроить нужные значения, потом снова запустить.

Теперь давайте пересоберём программу, и посмотрим, что у нас получилось.

В новом варианте у нас уже есть элемент управления дискриминатором. В принципе, программа уже практически готова к использованию.

11	232	(0)	0
0,70	202	0	

Аналогичным образом можно добавить и элемент управления временем счёта.

Напомним, что время счёта у нас задаётся максимальным количеством буферов. В процедуре запуска АЦП нужно найти строку:

```
max_buf := 60;
```

и заменить «60» на что-то другое.

Для того чтобы наша программа имела совсем уж товарный вид, нужно было бы сделать подписи к надписям (Label), на которых отображаются показания, чтобы пользователю было понятно, что к чему.

Следует отметить, что при работе по исследованию хемилюминесценции часто приходится иметь дело с синхронной регистрацией свечения и температуры. Для того, чтобы этот процесс был наиболее удобным, свечение и температура должны регистрироваться в журнал параллельно, одной и той же программой. Для этого нам необходимо либо добавить в нашу программу функции для работы с АЦП термодатчика напрямую, либо реализовать работу с температурой в отдельной программе и обеспечить связь между двумя программами. В среде Windows это можно реализовать используя системный реестр или динамический обмен данными (DDE), а в среде Linux лучше всего в этой ситуации использовать D-bus, общий файл, или переменные среды (environment variables).

Опрос игрового порта

Если в качестве АЦП для термодатчика используется игровой порт звуковой карты (см. главу «Термостатирование»), то опрос термодатчика в среде Delphi может осуществляться следующим образом.

Как и в случае с программой для счёта импульсов со входа звуковой карты, при перечислении используемых модулей в начале программы (в поле uses), должен быть упомянут модуль MMSystem

uses

MMSYSTEM;

В разделе указания переменных (var) нужно задать специальные переменные, необходимые для работы с джойстиком.

var

//специальные переменные для опроса

MyJoy: TJoyInfo; //результат опроса (состояние джойстика)

ErrorResult: MMRESULT; //результат опроса (на предмет ошибок)

//переменные с результатами опроса

j1, j2: boolean; //состояние кнопок

x1, y1: integer; //положение осей

Переменные **MyJoy** и **ErrorResult** являются специальными переменными, используемыми в процессе опроса джойстика. Переменные **j1** и **j2** являются логическими переменными, возвращающими состояние кнопок джойстика, если кнопка нажата, то переменная приобретает значение «истина» («true»), а если не нажата, то «ложь» («false»). Ну а переменные **x1** и **y1** являются главными при использовании игрового порта, они возвращают положение осей джойстика, в виде целого числа от нуля до 65535, то есть всего условно размах АЦП 2^{16} дискрет (16 бит). Однако на практике разрядность АЦП бывает меньше, дело в том, что производители звуковых карт считали, что 16 бит — это слишком жирно, для того чтобы сообщить игре о положении рукоятки джойстика. Поэтому реальная разрядность может составлять, например, 11 бит, то есть при медленном изменении температуры, переменная x1 или y1 будет изменяться с шагом в 32 дискреты.

Ну а сама же процедура опроса буде выглядеть примерно вот так:

begin

ErrorResult := joyGetPos(joystickid1, @MyJoy); //проверяем на ошибки

if ErrorResult = JOYERR_NOERROR then //если ошибок нет, то...

begin

y1 := MyJoy.wypos; //ось Y

x1 := MyJoy.wxpos; //ось X

j1 := (MyJoy.wbuttons and joy_button1) > 0; //кнопка №1

j2 := (MyJoy.wbuttons and joy_button2) > 0; //кнопка №2

end

else

//а если ошибки есть, то

case ErrorResult of //выводим тип ошибки

MMSYSERR_NODRIVER: ShowMessage('Отсутствует драйвер джойстика');

MMSYSERR_INVALIDPARAM: ShowMessage('Недопустимые параметры джойстика');

JOYERR_UNPLUGGED: ShowMessage('Джойстик не подключён');

else

ShowMessage('Неизвестная ошибка джойстика');

end;

Эту процедуру нужно производить по таймеру. Для работы термодатчика интервал таймера, а следовательно интервал замера температуры, должен составлять от 1 до 0,1 секунды (то есть от 1000 до 100 миллисекунд). Чем чаще опрос, тем выше нагрузка на процессор, поэтому не стоит делать опросы с интервалом в одну миллисекунду, тем более, что в нашем случае это абсолютно ни к чему.

Термостатирование

Поскольку хемилюминесценция является физическим проявлением химических процессов, а скорость протекания химических реакций зависит от температуры, то немаловажным факторами являются термостатирование исследуемых образцов, а также постоянный контроль и регистрация температуры исследуемых образцов в процессе проведения измерений хемилюминесценции.

Температура часто регистрируется параллельно с хемилюминесценцией. Такая синхронная регистрация позволяет исследовать зависимости хемилюминесценции от температуры. Поскольку интенсивность хемилюминесценции пропорциональна скорости некой химической реакции (вызывающей эффект хемилюминесценции), то в большинстве случаев зависимость хемилюминесценции от температуры подчиняется уравнению Аррениуса:

$$k = Ae^{-\frac{E_a}{RT}}$$

где

k — константа скорости химической реакции

A характеризует частоту столкновения реагирующих молекул, и кстати, тоже немного зависит от температуры:

$$A = a \cdot \sqrt{T}$$

E_a — энергия активации

R — универсальная газовая постоянная (постоянная Менделеева),
равная 8,3144598(48) Джоуль/(моль/Кельвин)

Однако в ряде случаев, особенно при исследовании биологических объектов, такая чёткая зависимость может нарушаться. Это явление может быть связано с пиком активности различных ферментов, а также денатурацией, изменением структуры, или разрушением различных веществ при определённых температурах.

Серии экспериментов для сравнительного исследования нескольких образцов должны проводиться при строго определённой температуре.

Традиционно для термостатирования различных образцов внутри приборов было принято использовать водяные термостаты. Принцип действия такого устройства заключается в том, что термостатировался резервуар с водой, при этом вода перегонялась по шлангам, и проходила сквозь металлический (как правило медный, из-за хорошей теплопроводности меди) кюветодержатель, полый внутри. При этом нагретая в бачке термостата вода шла по трубкам, проходила сквозь кюветодержатель, кюветодержатель нагревался (подобно батареям центрального отопления) и в свою очередь грел кювету с исследуемым образцом. Следует отметить, что изначально система циркуляции воды по шлангам к кюветодержателю работала таким образом, что вода нагнеталась в выпускной шланг под положительным давлением. При этом в случае разгерметизации системы шлангов и патрубков вода вытекала наружу и могла залить прибор. Позднее систему циркуляции воды стали конструировать таким образом, что вода больше не нагнеталась в выходящий из резервуара термостата шланг, а наоборот, подсасывалась с другого конца, из шланга, входящего в резервуар термостата. При этом внутри системы шлангов создавалось отрицательное давление, и в случае разгерметизации утечек воды не происходило (а

происходил, наоборот, подсос воздуха в шланг). Такая система была гораздо более безопасна. Управление нагревательным элементом термостата осуществлялось с помощью термореле, или контактного термометра с реле, или термодатчика с системой моста сопротивлений, усилителя и реле. О принципах работы таких систем термостатирования будет подробно рассказано ниже.

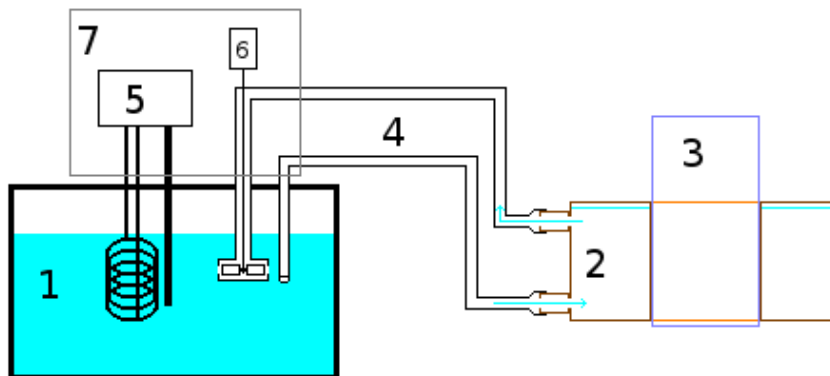


Схема работы водяного термостата

1 — бачок с водой, 2 — медный кюветодержатель, 3 — термостатируемая кювета,
4 — соединительные шланги, 5 — система термостатирования воды в баке термостата,
6 — турбинный насос для циркуляции воды по шлангам через кюветодержатель,
7 — корпус термостата.



Термостатируемые водой медные кюветодержатели

Такая система термостатирования была весьма стабильной, из-за большой теплоёмкости воды в резервуаре термостата (чем больше объем резервуара, тем больше теплоёмкость). Кроме того, такая система позволяла термостатировать не только образец, находящийся в кювете внутри прибора, но и несколько других образцов (как в кюветах, так и, например, в пробирках), погружённых непосредственно в резервуар термостата. Это позволяло уменьшить время готовности для проведения замеров с момента помещения образца в прибор, так как образцы уже были нагреты до нужных температур.

Недостатком же такого решения являлась его громоздкость, а также невозможность быстрого перевода режима измерения на другую температуру. Особенно если была необходимость температуру снизить — для этого приходилось менять воду в резервуаре термостата.

Более современным же решением является внедрение электрического нагревательного элемента непосредственно в кюветодержатель. А контроль температуры осуществляется с помощью термодатчика, который либо также монтируется в кюветодержатель (и контролирует нагрев кюветодержателя), либо погружается непосредственно в кювету (и контролирует температуру непосредственно исследуемого вещества). Погружение

термодатчика в кювету позволяет вести более точный температуру. Предпочтительнее использовать два термодатчика одновременно, при этом погруженный в кювету термодатчик контролирует актуальную температуру исследуемого образца, а вмонтированный в кюветодержатель предохраняет кюветодержатель от перегрева, снижает «инерционность» реагирования на нагрев. Синхронную работу термодатчиков можно организовать программно, при этом нагревательный элемент управляется по термодатчику, погружённому в кювету, а термодатчик, вмонтированный в кюветодержатель, не допускает нагрева кюветодержателя выше температуры на 0,5 — 1,5 градуса выше требуемой температуры для исследуемого образца.



Самодельный электротермостатируемый кюветодержатель.

Слева в стеклянном корпусе находится термодатчик, в таком положении он контролирует нагрев кюветодержателя, но может быть погружен в кювету.

Для подключения термодатчиков к ПК можно воспользоваться лабораторным АЦП, возможно, с использованием моста сопротивлений и дополнительного источника питания, если АЦП не предусматривает работу в режиме измерения сопротивления; а можно прибегнуть к нестандартным средствам, например, к использованию в качестве АЦП игрового порта звуковой карты ПК (там 4 канала на измерение сопротивления относительно линии питания +5В). А для управления нагревательным элементом термостата можно использовать параллельный LPT порт компьютера через реле.

Для программного доступа к параллельному порту в среде Windows используется системный драйвер LPTWDMIO.sys, обращение к которому происходит через функцию DeviceIoControl(), ну а доступ к параллельному порту в среде Linux осуществляется через файл /dev/port, обычно управление стандартными ногами LPT порта на выход осуществляется через запись байта \$378, а получение сведений о состоянии стандартных ног на вход осуществляется через чтение байта \$379 того же файла /dev/port. И чтение и запись в символьное устройство /dev/port должны осуществляться от имени суперпользователя (root).

Общие принципы работы системы термостатирования

Процесс работы системы термостатирования основан на принципах обратной связи. Если температура ниже заданной, то включается нагревательный элемент, а если температура выше заданной, нагревательный элемент выключается. Технически это можно реализовать различными способами, ниже рассмотрим некоторые из них.

Термостатирование с помощью термореле.

Простейшей системой термостатирования является система с использованием термореле. Работа термореле как правило основана на свойстве тел расширяться при нагревании, при этом расширение линейно пропорционально температуре.

Расширение некого тела при нагревании до нужной температуры вызывает размыкание контактов в цепи питания нагревательного элемента, а следовательно, прекращение нагрева. А при охлаждении этого тела ниже требуемой температуры, оно сжимается, что вызывает замыкание контактов и включение нагревательного элемента. Ниже представлена принципиальная схема такой системы.

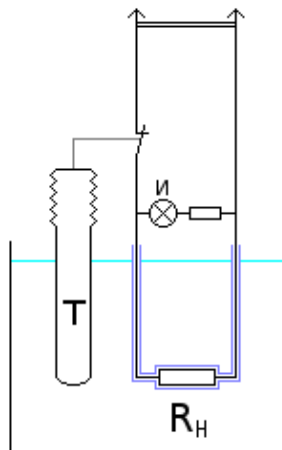


Схема термостата с термореле
 T — термореле, R_n — нагревательный элемент,
 I — индикатор работы нагревательного элемента.

Такая система термостатирования широко использовалась в советских системах поддержания температуры в аквариумах, но в лабораторных условиях используется редко из-за низкой точности.

Термостатирование с помощью контактного термометра.

Весьма распространённой в лабораторной практике в своё время являлась система термостатирования с использованием контактного термометра. Принцип работы этой системы также основан на расширении тел при нагревании, только тут в качестве такого тела используется ртуть внутри термометра. Внутрь капилляра ртутного столбика термометра погружается тоненькая проволочка, до отметки нужной температуры. В основание ртутного столбика также вживлён электрический контакт. При поднятии ртутного столбика до нужной температуры, ртуть касается погруженной в капилляр проволочки, электрическая цепь замыкается, что приводит к срабатыванию электромагнитного реле, размыкающего контакты цепи питания нагревательного элемента, а следовательно, приостановке нагрева.

Ниже представлена принципиальная схема термостата с контактным термометром.

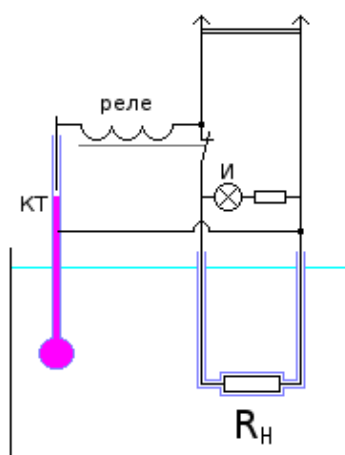


Схема термостата с контактным термометром
 КТ — контактный термометр, R_n — нагревательный элемент,
 И — индикатор работы нагревательного элемента.

Следует заметить, что весьма значимым достоинством такой системы является отсутствие необходимости калибровки. Термометр тут служит одновременно и индикатором температуры, и управляющим элементом термостата.

Для специальных случаев бывают особые контактные термометры, с точностью до десятых долей градуса.

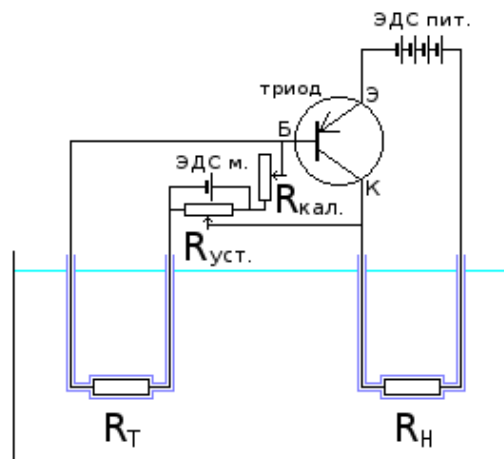
Недостатком же такой системы, является ограниченность применения. Она обычно применяется для термостатирования сравнительно больших объёмов воды или воздуха.

Термостатирование с помощью терморезисторов.

Терморезисторы (термисторы, термодатчики) применяются в электронных системах термостатирования. Принцип работы термодатчика обычно заключается в том, что некое вещество меняет своё удельное сопротивление при изменении температуры. Реже (обычно при измерении высоких температур) применяется принцип измерения прямо пропорциональной температуре ЭДС, возникающей у границы контакта двух различных веществ (термопара). Термодатчик обычно включён в сложную систему мостов и усилителей, далее к аналоговому устройству обратной связи с нагревательным элементом, либо к АЦП, в случае цифрового контроля температуры.

«Умные» электронные системы термостатирования могут обеспечивать более гладкое поддержания температуры, сводя к минимуму её колебания, за счёт управления мощностью нагревательного элемента. Так, например, на водяных термостатах эпохи 80-х годов производства ГДР, при подходе температуры к требуемой индикатор нагрева начинает мигать, что свидетельствует о том, что нагревательный элемент переходит в менее мощный режим. Также в «умных» системах термостатирования обычно предусмотрена защита от перегрева, автоматическое отключение при недостаточном уровне воды (для водяных термостатов), звуковая сигнализация в случае внештатных ситуаций.

Ниже представлена сильно упрощённая принципиальная схема термостата с плавной регулировкой мощности нагревательного элемента. Сильно упрощённая схема является прежде всего потому, что мощности цепи с одним триодом будет скорее всего недостаточно для нагрева чего либо, разве что содержимого одной кюветы.



Упрощённая схема электронного термостата с терморезистором и мостом сопротивлений.

R_T — терморезистор, R_H — нагревательный элемент,
 $R_{уст.}$ — потенциометр установки требуемой температуры,
 $R_{кал.}$ — переменный резистор грубой калибровки,
 ЭДС м. — ЭДС питания моста сопротивлений,
 ЭДС пит. — ЭДС питания нагревательного элемента,

В данной схеме терморезистор (R_T), переменный резистор калибровки ($R_{кал.}$) и потенциометр установки требуемой температуры ($R_{уст.}$) образуют классический мост сопротивлений. Сопротивление переменного резистора грубой калибровки ($R_{кал.}$) подбирается таким образом, чтобы примерно соответствовать сопротивлению терморезистора. А общее номинальное сопротивление потенциометра установки требуемой температуры ($R_{уст.}$) должно быть примерно вдвое выше среднего сопротивления терморезистора. В случае, если температура ниже требуемой, мост сопротивлений разбалансирован, и в управляющей цепи триода (на картинке триод подключён с общим коллектором, управляющая цепь — база - коллектор, а управляемая — эмиттер - коллектор, но это в принципе не особо важно) возникает прямой ток, триод открывается и подаёт ток на нагревательный элемент (R_H). Если температура выше требуемой — мост также разбалансирован, но в другую сторону, и в управляющей цепи триода возникает обратный ток, триод запирается и прекращает подачу тока на нагревательный элемент. В процессе нагрева, по мере приближения температуры к требуемому значению, прямой ток в управляющей цепи триода постепенно снижается, снижая ток и в цепи питания нагревательного элемента (управляемой цепи). В какой то момент возникнет такое равновесное состояние, когда ток в цепи питания нагревательного элемента станет таким, что температура уже не будет повышаться, а будет поддерживаться на определённом уровне. Стоит заметить, что в отличие от приведённых выше способов термостатирования, в данном случае температура будет реально поддерживаться на одном уровне, без колебаний «нагрев-остывание-нагрев-остывание....».

Компьютерные системы термостатирования.

В лабораторной практике возможно термостатирование чего-либо с помощью ПК. В этом случае термодатчик подключается к ПК через АЦП, а нагревательный элемент управляется программно. Подключение термодатчика к АЦП зависит от типа термодатчика (термистор или термопара) и типа АЦП — может ли АЦП работать в режиме измерения сопротивления, или же только в режиме измерения напряжения.

Если АЦП может работать в режиме измерения сопротивления, то подключение терморезистора к АЦП производится по простой схеме: терморезистор непосредственно подключается к входу АЦП. При этом для максимально эффективной работы диапазон измерения сопротивлений на АЦП должен примерно соответствовать порядку сопротивления

терморезистора. То есть будет весьма нерациональным к АЦП с пределом измерения 1 МОм подключать терморезистор, сопротивление которого находится в пределах 200 — 300 Ом.

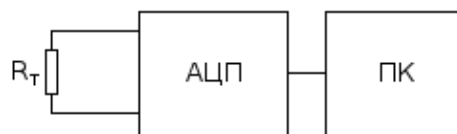


Схема подключения терморезистора к АЦП в режиме измерения сопротивления.

Практическим примером такого подключения может служить конструктивное решение с использованием в качестве АЦП цифрового мультиметра, подключаемого к ПК. Достоинство такого решения в том, что на мультиметре имеется возможность выбора диапазона измерений и достаточно высокая точность, а недостатком такого решения является дороговизна мультиметров с возможностью подключения к ПК.

Другим, более «радиоловительским» конструктивным решением может быть использование в качестве АЦП игрового порта звуковой карты.

Игровой порт представляет собой 4-х канальный АЦП постоянного тока, работающий в режиме измерения сопротивления. Дело в том, что в былые времена АЦП стоили довольно дорого, и подключаемые игровые контроллеры были чисто аналоговыми, содержащими лишь кнопки и переменники, которые меняли своё сопротивление при нажатии на оси джойстика. А вся цифровая электронная часть находилась внутри компьютера (на звуковой карте) и была достаточно универсальна.

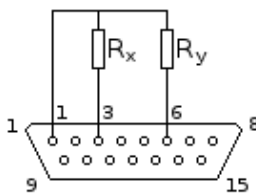


Схема подключения резисторов к игровому порту

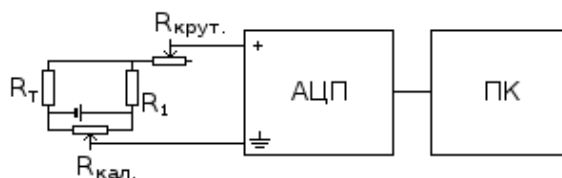
На первой ноге игрового порта находится линия питания +5 В. Минимум два резистора нужно подключить между линией +5 В и контактами №3 и №6 соответственно. Терморезистор должен быть порядка нескольких десятков кОм и может быть использован в качестве любого из резисторов R_x или R_y , а могут быть и два терморезистора одновременно (например, один закреплён на кюветодержателе, а другой погружен в кювету).

Внимание, схема должна быть отвязана от земли! Замыкание линии + 5 В на корпус (контакты №4 и №5) может испортить звуковую карту или весь ПК! Линия +5 В помимо контакта №1, может быть на контактах №8 и №9.

Далее нужно сделать необходимые настройки в системе, добавив новый джойстик «2 оси, 2 кнопки». В случае если соединения резисторов не нарушены, состояние джойстика должно быть «ОК», а если цепь хотя бы одного из резисторов нарушена, со система выдаст ошибку, что джойстик «не подключён». «Калибровать» этот «джойстик» не нужно.

Опрос оси X джойстика вернёт целое число, пропорциональное сопротивлению R_x , а опрос оси Y вернёт целое число, пропорциональное сопротивлению R_y .

Более профессиональным конструктивным решением является использование лабораторных АЦП. Как правило, лабораторные АЦП работают в режиме измерения напряжения. Поэтому тут схема подключения будет посложнее. Придётся делать мост сопротивлений. Тут опять может быть несколько вариантов. Наиболее правильным но более сложным решением является схема с классическим равноплечным мостом сопротивлений. Она представлена на рисунке ниже.

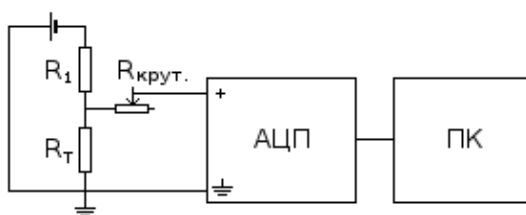


**Схема подключения терморезистора к АЦП
через равноплечный мост сопротивлений**

В данной схеме, R_1 — сопротивление, уравнивающее терморезистор R_T , оно должно примерно соответствовать среднему сопротивлению терморезистора. Потенциометр калибровки $R_{\text{кал.}}$ служит для балансировки моста, если АЦП однополярный, то этот потенциометр выставляется таким образом, чтобы при минимальной допустимой температуре мост был сбалансирован (то есть имел на выходе ноль вольт). Переменник $R_{\text{крут.}}$ служит для регулировки крутизны, с его помощью можно откалибровать цену одной дискреты АЦП, например так, чтобы одна дискрета АЦП соответствовала 0,1 градусу.

Такое решение позволяет наиболее полно использовать весь размах АЦП.

Существует также упрощённое решение, с неравноплечным мостом сопротивлений.



**Упрощённая схема подключения терморезистора к АЦП
через неравноплечный мост сопротивлений**

Также как и в предыдущей схеме, сопротивление R_1 должно примерно соответствовать среднему сопротивлению терморезистора. Переменник $R_{\text{крут.}}$ также служит для регулировки крутизны.



**Четырёхканальный лабораторный АЦП (справа)
и мост сопротивлений термодатчика (слева)**

Градуировка, поверка и эталоны

Абсолютная градуировка хемилуминометрической аппаратуры для регистрации сверхслабых световых потоков от биологических объектов **принципиально невозможна**, хотя бы по тому, что чувствительность ФЭУ при разных длинах волн крайне неравномерна (смотри рисунок ниже), а в большинстве задач мы не можем точно знать спектр свечения исследуемого объекта.

Возможна лишь *условная* градуировка по эталонам, светимость и спектр излучения которых заранее известны.

Эталоны бывают «*первичные*» и «*вторичные*».

Светимость первичных эталонов определяется, как правило, расчётным путём. Светимость вторичных эталонов определяется по их сравнению с первичными.

Примером первичного эталона может служить радиолуминесцентный источник Гастингса-Вебера. Однако его достаточно трудно достать, к тому же он практически непригоден для калибровки высокочувствительных люминометров по причине высокой интенсивности свечения. Стандартный источник Гастингса-Вебера (жидкий) излучает с интенсивностью $1,26 \cdot 10^7$ квант/с мл — для чувствительного хемилуминомерта это означает зашкал.

Примером вторичного эталона может служить урановое стекло ЖС-19.

Спектр излучения эталонов определяется по эталонам того же типа, но более мощной светимости, достаточной для регистрации спектральными установками.

Урановое стекло ЖС-19

Изначально это стекло использовалось для светофильтров. Также одно время использовалось для изготовления посуды и предметов декора. В темноте светится само по себе. Также весьма хорошо флуоресцирует. Также обладает способностью аккумулировать свет, поэтому эталоны из этого стекла следует хранить в темноте, и для достижения точных результатов, измерения начинать только через несколько минут после помещения в камеру хемилуминометра.

Максимум излучения находится в области 535 нм.

Удельная светимость в разных партиях уранового стекла может немного отличаться, но составляет примерно $2 (+/-1) \cdot 10^3$ квант/с мг * 4л.

Поэтому для определения светимости каждого конкретного кусочка ЖС-19 следует сравнивать его со светимостью какого-либо другого куска ЖС-19. Предварительно измеренного относительно первичного эталона. В своё время выпуском поверенных эталонов ЖС-19 занимался Пирязев Алексей Павлович. Каждый эталон сопровождался паспортом. Урановое стекло из той партии, что использовалась для первых эталонов, имело удельную светимость $1,45 \cdot 10^3$ квант/с мг * 4л. Эталоны назывались «СФХМ-1».



Эталон ЖС-19

Часто в качестве эталонов ЖС-19 используются осколки от светофильтров.

Калибровка хемилюминометра по эталонам на основе ЖС-19 даёт возможность соотнести единицы показания прибора, например, импульсы в секунду, с количеством квантов, испускаемых исследуемым объектом во все стороны за единицу времени. На основе экспериментальных данных можно сказать, что обычно один импульс в секунду, зарегистрированный хемилюминометром, соответствует от 1,6 до 2,3 тысяч квантов в секунду.

$$1 \text{ имп/с} = 2 (+/- 0,4) * 10^3 \text{ квант/сек} * 4\pi$$

Использование светодиодных эталонов для градуировки хемилюминометров.

Цели и задачи создания светодиодных эталонов.

Хемилюминометры, как правило, выдают показания в некоторых относительных единицах, например, импульсах в секунду (в импульсном режиме), или милливольтмах (в токовом режиме), или единицах светосуммы. Всё это условные единицы, которые применимы лишь в сравнении хемилюминесценции различных объектов, причём область их применения ограничивается лишь данным прибором. Так, например, распространённая (в том числе в литературе) единица - импульс в секунду (имп/сек). Но соотношение между реальным световым потоком, испускаемым исследуемым объектом, и регистрируемыми импульсами в секунду зависит от многих факторов, например, коэффициента светосбора, который уникален для каждой модели/модификации прибора (в среднем, около 4%), квантового выхода ФЭУ, который уникален не только для каждой модели ФЭУ, но и, в некоторых пределах, для каждого конкретного ФЭУ (поэтому для особо чувствительных установок использовался отбор ФЭУ), ну и от конкретного режима работы (напряжения на ФЭУ, температуры ФЭУ (наличия охлаждения ФЭУ), и так далее). В связи с этим, особенно важно наличие некоторых стандартизованных эталонов, позволяющих соотнести условные единицы измерения с физическими. Также важно иметь доступный набор эталонов различной интенсивности, для проверки линейности и чувствительности приборов в различных диапазонах измерений. На данный момент, традиционными эталонами для хемилюминометров являются образцы уранового стекла ЖС-19, но эти «эталон» требуют собственной градуировки (паспортизации), и в связи с этим весьма недешёвы, особенно если требуется несколько эталонов различной светимости. К тому же они не позволяют производить градуировку прибора в различных областях спектра.

Предлагаемый метод использования светодиодных эталонов вполне решает поставленные задачи, и при этом доступен для всех и имеет весьма низкую себестоимость.

Все исходные материалы — прозрачные светодиоды разных цветов и высокоомные резисторы (для магазина сопротивлений). Эти материалы гораздо доступнее образцов уранового стекла. При этом, каждый светодиод представляет собой не один эталон, а как бы целую серию эталонов разной интенсивности. При этом размеры этой «серии» определяются дискретностью магазина сопротивлений (см. далее).

Принцип метода.

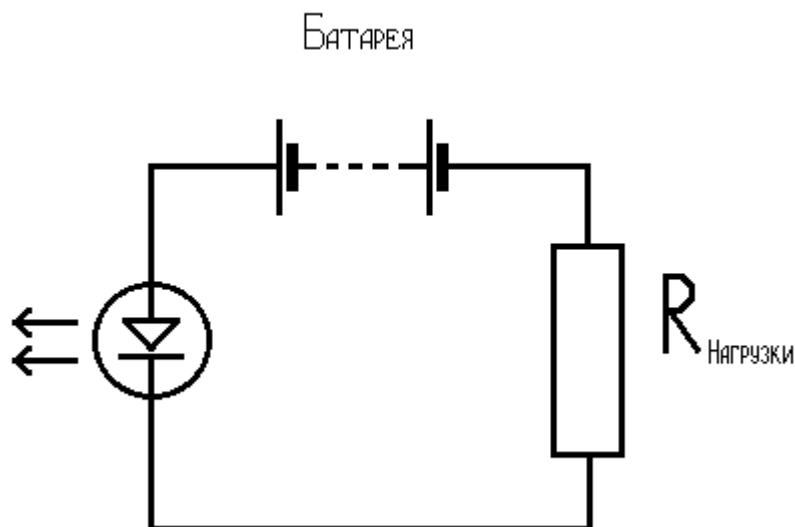
Светимость (световая отдача) светодиодов — величина хорошо известная, это одна из основных паспортных характеристик светодиодов. Дешёвые светодиоды имеют светимость 80 — 110 Лм/Вт⁴, более дорогие до 150 Лм/Вт, отдельные, эксклюзивные современные дорогие образцы — до 200 Лм/Вт⁵.

Включая светодиоды в электрические цепи со слабыми токами, можно имитировать сверхслабые свечения (исходящие от светодиодов), по своей интенсивности соизмеримые со свечениями различных исследуемых веществ и объектов, в том числе спонтанных сверхслабых свечений.

4 Средние показатели световой отдачи приведены по материалам Википедии, статьи «Светодиодное освещение».

5 Лабораторные образцы светодиодов с отдачей 200 Лм/Вт были представлены фирмой «Cree inc» в 2010 году.

Схема устройства в общем виде выглядит так:



В качестве батареи, используется любой электрохимический источник питания, ЭДС которого достаточна для открытия светодиода. В нашем случае использовалась стандартная девятивольтовая батарея, с ЭДС равной 10,02 вольт.

В качестве сопротивления нагрузки ($R_{\text{нагрузки}}$) используется магазин сопротивлений, с переменным номиналом в пределах от нескольких МОм до нескольких ГОм. Такой диапазон даёт возможность имитировать свечения различных интенсивностей, в том числе слабые и сверхслабые свечения. В случае градуировки установок для регистрации спонтанных сверхслабых свечений, работающих в импульсном режиме, сопротивление нагрузки должно быть не менее 100 МОм.

Рассчитать свечение такого эталона можно следующим образом:

$$J = \eta \cdot \frac{U}{R} \cdot U = \frac{\eta \cdot U^2}{R}$$

Где:

J — испускаемый свет (Лм)

η — светимость светодиода (Лм/Вт)

U — ЭДС источника электрического тока (Вольт)

R — сопротивление цепи (Ом)

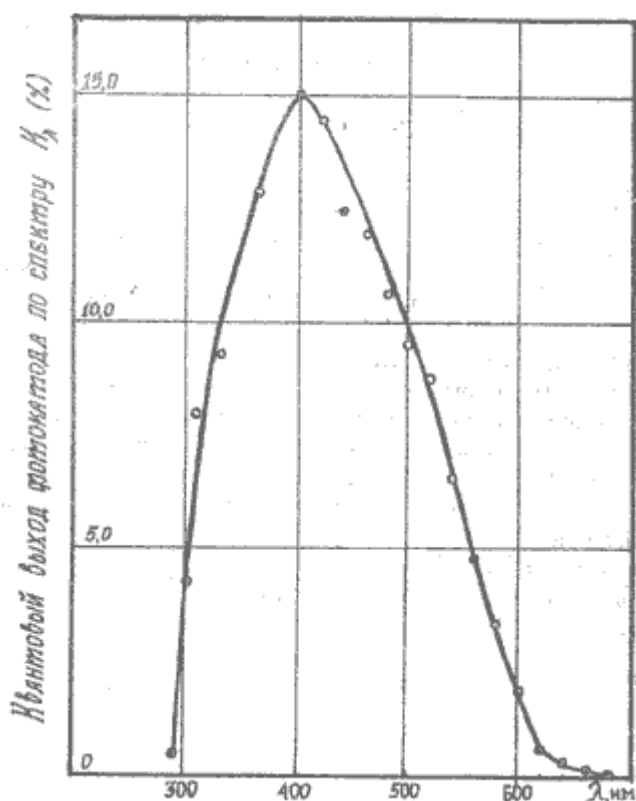
Поскольку сопротивление нагрузки на несколько порядков больше сопротивлений всех остальных элементов цепи (сопротивления светодиода и внутреннего сопротивления батареи), то этими сопротивлениями можно пренебречь, и считать сопротивление цепи равным сопротивлению нагрузки.

Например, если световая отдача светодиода равна 100 Лм/Вт, ЭДС источника 10,02 В, а сопротивление нагрузки 100 МОм, то устройство будет имитировать люминесценцию 100,4 мкЛм. А если сопротивление нагрузки увеличить до 1 ГОм, то будет имитироваться люминесценция 10 мкЛм.

Используя светодиоды различных цветов, можно производить градуировки чувствительности хемилуминометров в различных областях спектра. Это весьма важно, учитывая то что квантовый выход различных ФЭУ весьма неоднороден в различных областях спектра.

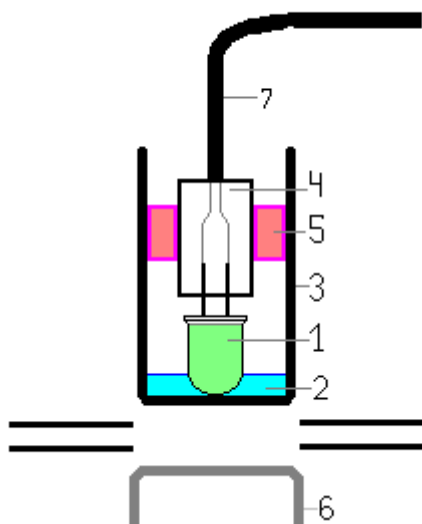
Вот например, график спектральной чувствительности ФЭУ с сурьмяноцезиевым фотокатодом (по А. И. Журавлёву⁶)

6 А. И. Журавлёв, «Квантовая биофизика животных и человека», Москва 2009 год.



Конструкция устройства

Для использования в хемилюминометрах, в которых ФЭУ находится снизу, измерения светодиодного эталона проходят следующим образом. Измерения проводятся в кюветах, в которых обычно измеряют объекты на данном хемилюминометре. На дно кюветы наливается иммерсионная среда, например дистиллированная вода, слоем около 1 — 1,5 мм. Прозрачный светодиод, закреплённый в держателе, погружается в кювету так, чтобы иммерсионная среда покрывала сферическую поверхность светодиода, но ни в коем случае вода (или другие электропроводящие жидкости, используемые в качестве иммерсионной среды) не должна контактировать с ножками светодиода, иначе устройство работать не будет. На держателе светодиода находится уплотнитель, который фиксирует конструкцию так, чтобы светодиод находился ровно по центру кюветы. Иммерсионная жидкость используется для оптической компенсации сферических (или других) торцевых поверхностей светодиода и лучшего оптического контакта.

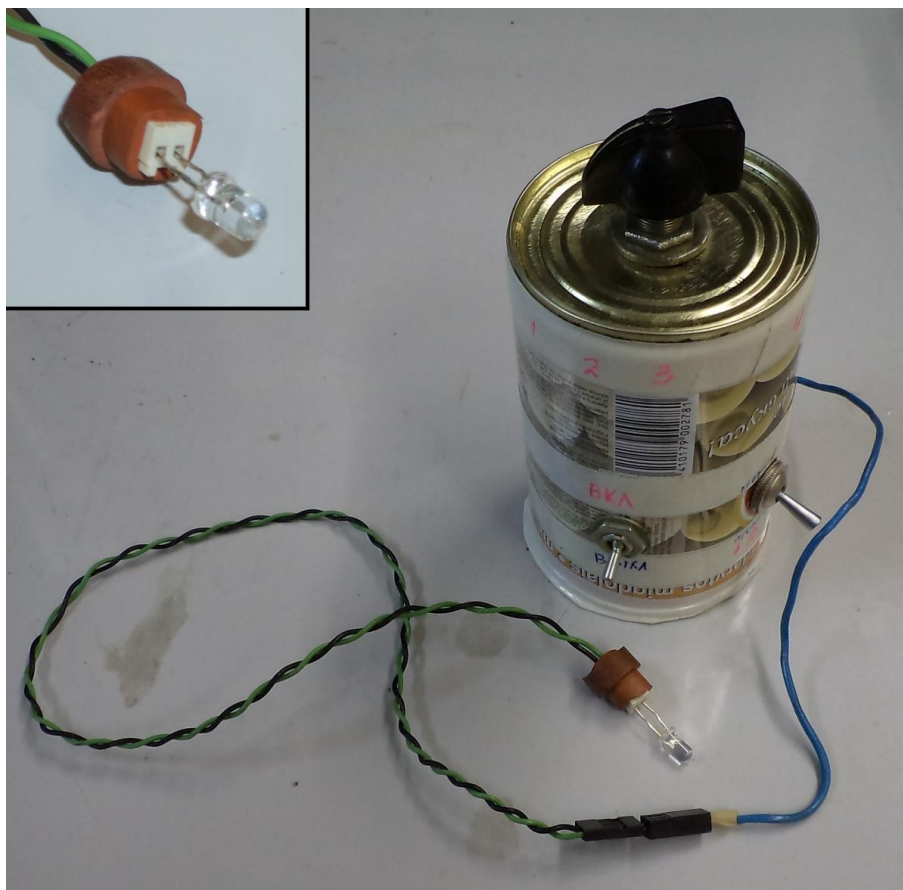


Типовая схема светодиодного эталона

1 — светодиод, 2 — иммерсионная среда, 3 — кювета, 4 — держатель светодиода, 5 — уплотнитель, фиксирующий светодиод по центру кюветы, 6 — ФЭУ, 7 — провод, питающий светодиод.

Провод, питающий светодиод, целесообразно выводить из кюветной камеры хемилюминометра, чтобы магазин сопротивлений и питающий элемент располагались снаружи. Это позволит включать и выключать светодиод, а также изменять сопротивление нагрузки без необходимости открывать кюветную камеру хемилюминометра. Если же вывести провод наружу не возможно, то можно разместить питающий элемент и миниатюрный магазин сопротивлений непосредственно в кюветной камере. Если и это затруднительно, то возможен миниатюрный монтаж полностью внутри кюветы, правда при этом мало возможен монтаж полноценного магазина сопротивлений.

На рисунке ниже представлен прототип системы светодиодного эталона с магазином сопротивлений от 10 до 200 МОм, с шагом в 10 МОм.



Светодиодный эталон с магазином сопротивлений

Стоит заметить, что если калибровка по эталонам ЖС-19 давала возможность соотнести показания прибора с квантами в секунду, то калибровка по светодиодным эталонам даёт возможность соотнести показания прибора с единицами, в которых указаны характеристики светодиода (люмены, канделы).

Вспомогательные технические приспособления

При практических научных и клинических исследованиях, связанных с измерением интенсивности хемилюминесценции, можно столкнуться с различными не вполне стандартными задачами, связанными с особенностями конкретного метода исследования. Для решения подобных задач приходится применять разнообразные дополнительные технические средства. Некоторые из них мы рассмотрим ниже.

Проточные кюветы

В некоторых ситуациях необходимо непрерывно (или почти непрерывно) измерять какие-либо параметры потока жидкости. Для случаев, когда таким параметром является интенсивность хемилюминесценции, можно использовать проточные кюветы.

Ниже приведена схема такой кюветы

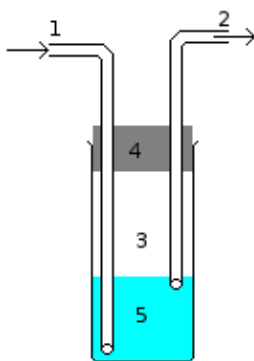


Схема проточной кюветы

1 — вводной сифон, 2 — выводной сифон, 3 — стеклянная кювета,
4 — пробка, 5 — исследуемая жидкость

Стеклянная кювета (3) герметично заткнута пробкой (4), в которой имеются два отверстия, через которых в кювету заведены две трубки. Одна из этих трубок (1) служит вводным сифоном, через который жидкость поступает в кювету. Конец этой трубки почти касается самого дна. Другая трубка (2) служит выводным сифоном, через который жидкость уходит из кюветы. Эта трубка заведена в кювету менее глубоко, её конец находится на некотором расстоянии от дна, причём регулируя глубину введения этой трубки (расстояния торца этой трубки до дна) можно регулировать рабочий объём кюветы.

Поступая в кювету через вводной сифон (1), жидкость сначала заполняет нижнюю часть кюветы, затем, после того как уровень жидкости достигнет торца выводного сифона (2) и торец выводного сифона окажется полностью погружён в жидкость, эта жидкость начнёт вытекать через выводной сифон (разумеется, при условии что пробка закрыта герметично).

Шланги, подсоединяемые к сифонам кюветы должны быть предварительно заведены в кюветную камеру хемилюминометра, причём так, чтобы при этом было исключено проникновение постороннего света в кюветную камеру.

Такая проточная кювета позволяет использовать хемилюминесцентный метод для детектирования особых фракций на выходе хроматографической колонки.



Проточная кювета для хроматографии

Инжекторы

Инжекторы служат для введения в кювету различных веществ прямо во время проведения измерения. Инжекторы представляют собой тонкие трубочки (капилляры) заведённые в кюветную камеру хемилуминометра (разумеется, заведённые таким образом, чтобы при их использовании в кюветную камеру не проникал посторонний свет).

Конец такой трубочки опущен в кювету с исследуемым веществом. А снаружи кюветной камеры, эта трубочка подсоединяется к шприцу, автодозатору, инфузому и тому подобному устройству, с помощью которого осуществляется ввод дополнительного вещества в кювету.

Такие приспособления хорошо использовать совместно с регистрацией динамики изменения хемилуминесценции (см. главу «Регистрация кинетики хемилуминесценции»), при этом от вводимого вещества, как правило, ожидают влияния на интенсивность хемилуминесценции (см. главу «Общий теоретический обзор», пункт «Классификация веществ, оказывающих влияние на хемилуминесценцию»).

При использовании таких приспособлений, необходимо помнить, что суммарный объём жидкости, находившейся в кювете заранее, и жидкости, введённой в кювету в процессе эксперимента, не должен превышать объёма самой кюветы! В противном случае произойдёт проливание жидкости через край кюветы, что может вызвать порчу оборудования.

Также инжектор может служить для продувания исследуемой жидкости каким-либо газом или газовой смесью непосредственно в процессе измерения хемилуминесценции.

Мешалки

В некоторых ситуациях бывает необходимо перемешивание исследуемой жидкости во время измерения. В этом случае применяются специальные мешалки.

Как правило, мешалки представляют собой миниатюрный маломощный электромотор, возможно с редуктором, с лопаткой для перемешивания жидкости. Всё приспособление надевается сверху на кювету, как крышка. Лопатка не должна вращаться слишком быстро, иначе это может привести к расплёскиванию жидкости. Лучше всего, если имеется возможность регулировать частоту вращения лопатки мешалки, это может быть полезно для подгона измерительного процесса под конкретную исследовательскую задачу.

Возможности компьютеризированных аппаратно-программных комплексов

На сегодняшний день, исследования в областях, где востребовано измерение хемилюминесценции — довольно большая редкость, а следовательно, промышленное производство хемилюминометров особого развития не получило. Отсюда вытекает то следствие, что все имеющиеся образцы хемилюминометров производятся либо полукустарно (небольшим количеством экземпляров), либо вообще являются самодельными. Сразу хочется отметить то, что нет абсолютно ничего предосудительного, если какое либо оборудование исследователь не приобретает за астрономическую сумму денег, а проектирует и изготавливает сам, либо оно изготавливается по его индивидуальному заказу. Наоборот, такое оборудование служит не только подручным инструментом для проведения исследований, но и представляет собой уникальное воплощение идеи своего создателя (подобно картине художника), и в связи с этим приобретает дополнительную ценность.

Примером такого вот воплощения авторских идей может служить установка для измерения спонтанного сверхслабого свечения, сконструированная на кафедре Биофизики Московской Государственной Академии Ветеринарной Медицины и Биотехнологии имени К.И. Скрябина.

Установка неоднократно подвергалась различным модернизациям, последнюю из которых (на момент написания этого материала) можно датировать 2014 годом

В течение долгого времени данная установка являлась самой чувствительной в мире (по данным профессора А.И. Журавлёва).

Среди основных особенностей этой установки можно отметить следующие:

Во-первых, установка собрана на основе отборного ФЭУ, то есть из партии ФЭУ был отобран один, обладающий наибольшей чувствительностью.

Во-вторых, в установке задействовано термостатирование ФЭУ для более стабильной работы и подавления тепловых шумов. Такая конструкция позволяет проводить измерения образцов при температурах до 80 градусов, при этом температура ФЭУ будет оставаться постоянной. Это позволяет получать точные температурные зависимости хемилюминесценции.

В-третьих, после современных модернизаций, на установке стал использоваться специальный, помехозащищенный усилитель, изготовленный специально для этой установки, а также точная система температурного контроля с использованием погружаемого в кювету термодатчика.



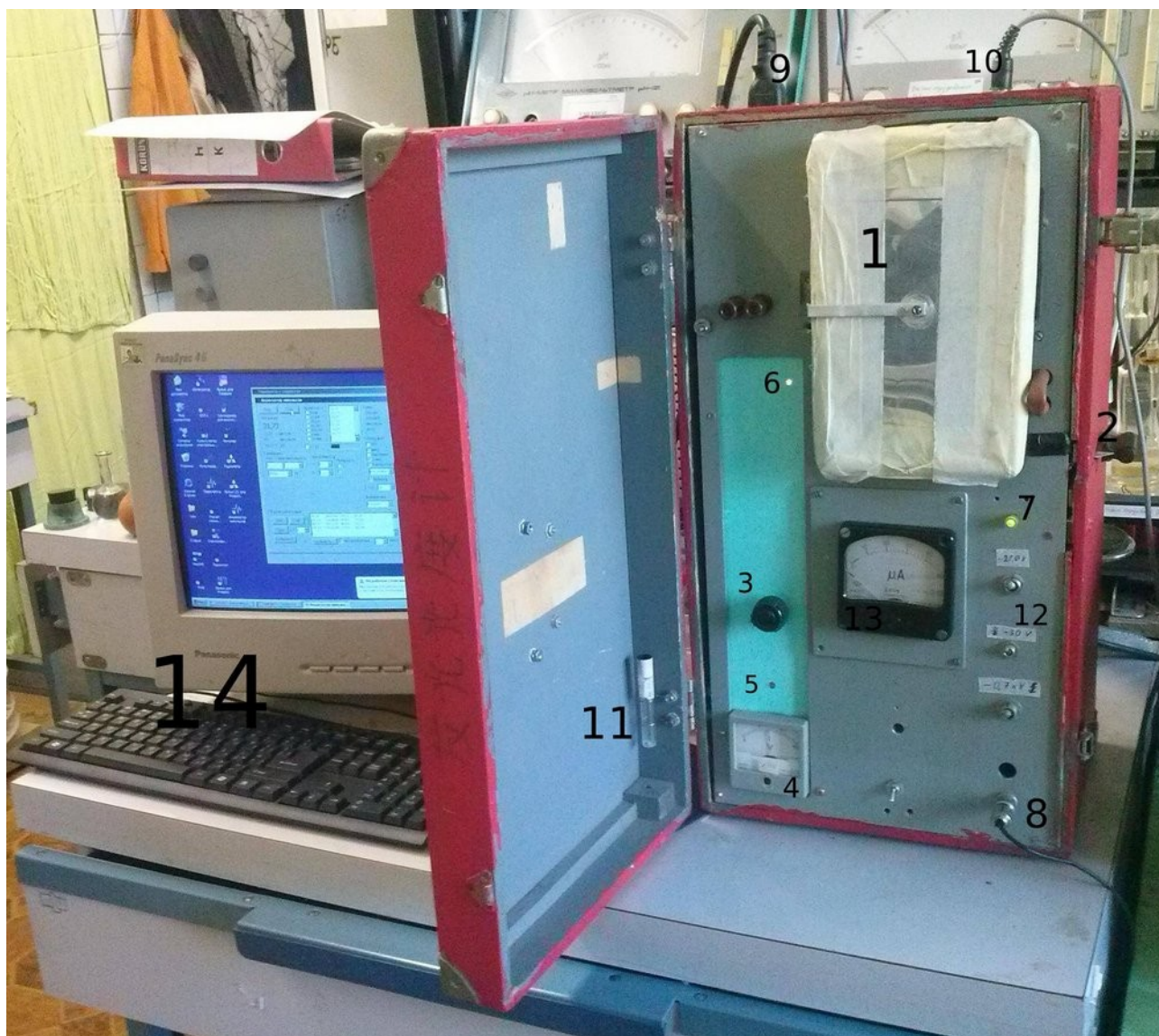
Установка Журавлёва-Закотеева

1 — высоковольтный источник питания ФЭУ, 2 — камера для исследуемого образца, 3 — корпус ФЭУ (с гидротермостатированием), 4 — гидротермостат для термостатирования кюветы с образцом, 5 — гидротермостат для термостатирования (охлаждения) ФЭУ, 6 — мост сопротивлений для калибровки термодатчика, 7 — АЦП для термодатчика, 8 — ПК для работы с установкой.

Примером более компактного и полностью самодельного хемилуминометра может служить хемилуминометр Закотеева.

Этот прибор представляет собой небольшой чемоданчик, подключающийся к ПК. Для работы прибора не требуется никаких внешних водяных термостатов или высоковольтных источников, всё уже смонтировано внутри прибора, однако опционально допускается и применение внешнего источника питания ФЭУ (через специальный разъём), и предусмотрена возможность использования внешнего гидротермостата. Выход усилителя подключается к звуковой карте, вывод термодатчика — к игровому порту, а система управления нагревом — к параллельному LPT порту. Прибор интересен тем, что в нём задействованы и схема питания ФЭУ, и схема усилителя, описанные выше в тексте.

Этот прибор может работать как в вертикальном, так и горизонтальном положении. В вертикальном положении представляет из себя классический хемилуминометр — ФЭУ снизу, под кюветой с образцом. В горизонтальном положении — ФЭУ сбоку от исследуемого образца. Это может применяться, например для исследования свечения жидкостей под воздействием ультразвука (сонолюминесценция). Также напротив ФЭУ имеется свинчивающаяся крышка, позволяющая использовать прибор в качестве регистрирующего блока в более сложных составных системах, а также использовать прибор для исследования сверхслабых свечений макрообъектов.



Установка Закотеева

1 — камера для исследуемого образца, 2 — ручка затвора, 3 — регулятор напряжения на ФЭУ, 4 — вольтметр для контроля напряжения на ФЭУ, 5 — индикатор питания ФЭУ, 6 — индикатор нагревательного элемента термостата, 7 — индикатор питания хемилуминометра, 8 — разъём выхода усилителя для подключения к звуковой карте, 9 — разъём для подключения питания хемилуминометра (220 В), 10 — разъём для подключения управления термостатом (на другом конце кабель имеет 2 разъёма и подключён к игровому порту и параллельному порту ПК), 11 — пробирка с калибровочным эталоном (кусочек ЖС-19), закреплённая в специальном держателе на внутренней стороне крышки хемилуминометра, 12 — органы управления (включение и выключение питания хемилуминометра, питания термостата, питания ФЭУ), 13 — индикаторная головка интегратора, 14 — ПК для работы с хемилуминометром.

Примером хемилуминометра, предназначенного для проведения учебных лабораторно-практических занятий со студентами, может служить установка Макарова. Эта хемилуминометрическая установка была создана на кафедре биофизики МГАВМиБ в конце XX века. Она обладает повышенной антивандальной защитой.

Установка состоит из нескольких блоков. В главном блоке смонтирована кюветная камера и блок ФЭУ с предварительным усилителем. Этот блок подключается к

универсальному блоку радиометра RFT (производства ГДР), в котором реализованы Высоковольтный источник питания для ФЭУ, усилитель, дискриминатор и пересчётное устройство. Показания счёта отображаются на дисплее. Также возможна автоматическая печать показаний на бумажную ленту, с помощью цифрового печатающего устройства (ЦПУ), идущего в комплекте к радиометру RFT.

Внутри кюветной камеры находится термостатируемый водой медный кюветодержатель с защитой от проливания — при случайном пролипании жидкости, она не попадёт ни в блок ФЭУ, ни в механизм затвора, так как кюветодержатель снизу заклеен прозрачным целлулоидом.



Установка Макарова

1 — кюветная камера, 2 — камера ФЭУ, 3 — ручка затвора, 4 — блок радиометра RFT, 5 — цифровое печатающее устройство, 6 — термостатируемый кюветодержатель, 7 — дверь кюветного отделения, 8 — утяжелённое устойчивое основание прибора.

Существуют и другие, весьма разнообразные варианты самодельных хемилуминометров, создаваемых под различные исследовательские задачи.

Достаточно оригинальным примером может служить установка Виктора Эммануиловича Новикова. Установка интересна оригинальным конструктивным решением, с использованием вертикальной загрузки исследуемого образца, полностью автономно работающим электронным термостатом, автоматическим затвором ФЭУ, достаточно высокой точностью работы, несмотря на то, что работает в токовом режиме. ФЭУ в этой установке имеет водяное охлаждение проточной холодной водопроводной водой.



Установка Новикова с вертикальной загрузкой.

Промышленные хемилюминометры

Поскольку исследования хемилюминесценции достаточно редкое явление и мало кто этим занимается, то промышленное производство хемилюминометров широкого распространения не получило. Те же, что всё же выпускались — выпускались очень ограниченными партиями.



Хемилюминометр ХЛ-003

Температурные зависимости хемилюминесценции

Важным направлением в изучении хемилюминесценции является исследование температурных зависимостей хемилюминесценции.

Температурная зависимость хемилюминесценции — это зависимость интенсивности хемилюминесценции от температуры, при которой проводится измерение.

Методики получения температурных зависимостей хемилюминесценции могут быть две. Первая — это дискретное получение температурных зависимостей по точкам. Устанавливаем на термостате начальную температуру, затем проводим несколько измерений, находим среднее значение и доверительный интервал, далее поднимаем температуру термостата на один градус (или на полградуса, если это возможно) и снова проводим несколько замеров, находим среднее значение и доверительный интервал и снова приподнимаем температуру термостата, и так далее. Вторая методика значительно проще. Она предполагает медленное непрерывное нагревание исследуемого образца, при этом ведётся регистрация хемилюминесценции параллельно с регистрацией температуры. После достижения максимальной температуры медленный нагрев отключается, и начинается остывание образца. При остывании тоже можно продолжать регистрацию хемилюминесценции параллельно с регистрацией температуры. Порой хемилюминесценция, зарегистрированная в процессе остывания, бывает значительно сильнее хемилюминесценции, зарегистрированной в процессе нагревания при одних и тех же температурах.

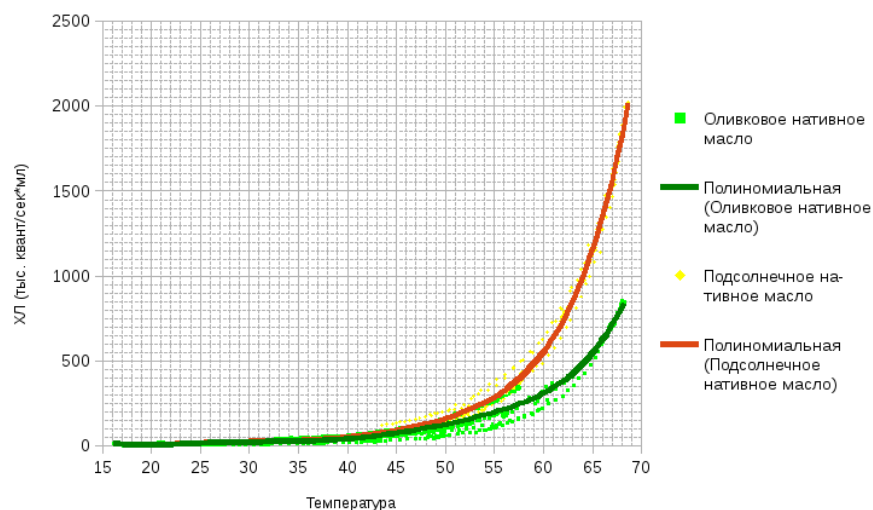
Далее, на основании полученных данных строится точечная диаграмма (x, y). В качестве значений по оси X берутся значения температуры, а в качестве значений по оси Y — соответствующие значения интенсивности хемилюминесценции. На полученном графике точки выстраиваются в кривую; если велась регистрация как при нагревании, так и при остывании, то, возможно, получится две отчётливые кривые: одна — та, что отображает процесс нагревания, обычно она ниже, другая — та, что отображает процесс остывания, обычно она выше, и порой более гладкая. Обе эти кривые смыкаются в точке максимальной температуры, там, где нагрев отключили, и пошёл процесс остывания. Явление спонтанной хемилюминесценции является результатом нескольких последовательных химических реакций (энергию для ЭВС поставляют акты распада перекисей, которые должны сначала образоваться), поэтому во влиянии температуры на интенсивность хемилюминесценции прослеживается некая инерционность.

Для более аккуратного графического представления можно построить линию тренда.

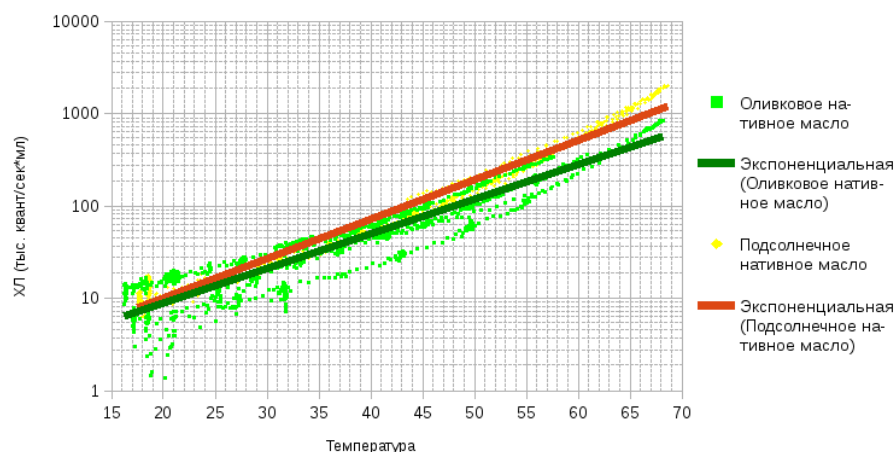
Ось Y на графике (ось значений интенсивности хемилюминесценции) может быть как линейной так и логарифмической. Последнее более актуально для графиков температурных зависимостей с большим размахом температур, где образец нагревается выше 50°C .

Ниже представлены примеры линейного и логарифмического графика одних и тех же температурных зависимостей (на основе экспериментальных данных за 2015г.).

Сравнение нативных масел - температурная зависимость



Сравнение нативных масел - температурная зависимость (логарифмический график)



Аппроксимация данных

В приведённых выше графиках, линии тренда построены на основе аппроксимации данных. Её алгоритмы могут быть различны, в том числе, экспоненциальная и полиномиальная, а также со скользящим средним значением для случаев с наличием экстремумов на температурных кривых.

Экспоненциальные аппроксимации

В большинстве случаев, химические реакции, вызывающие эффект хемилюминесценции, подчиняются стандартным законам химической кинетики (см. главу «Термостатирование»). В этом случае, при отсутствии сторонних факторов, влияющих на интенсивность хемилюминесценции, возможна экспоненциальная аппроксимация кривых температурной зависимости. Хотя в оригинальном уравнении Аррениуса в показателе степени находится отрицательная дробь $(-E_a/RT)$ с температурой в градусах Кельвина, применительно к эффекту хемилюминесценции, для конкретного участка температур допустимо представить показатель степени как температуру в градусах Цельсия, умноженную на некий коэффициент. Да и не стоит забывать, что явление хемилюминесценции — сложный физико-химический процесс, который не обязан подчиняться каноническим законам химии, так логарифмический график $y=e^{-k/x}$ на участке от $x=273$ до $x=283$ — почти прямая, немного выгнутая вверх, в то время как на практике всё наоборот (если судить по точкам, то

небольшой прогиб вниз).

В случае экспоненциальной аппроксимации кривых температурной зависимости, функцию зависимости интенсивности свечения от температуры можно представить так:

$$I_{lum} = b * e^{(k * t)}$$

где

I_{lum} — интенсивность хемилюминесценции.

b — коэффициент, выражающий светимость объекта без нагревания, его численное значение также зависит от используемых единиц хемилюминесценции. Кстати, в коэффициент b по идее также входит и влияние температуры на вероятность соударения реагирующих молекул, поставляющих энергию для ЭВС, однако на небольшом диапазоне температур этим фактором можно пренебречь.

k — коэффициент, выражающий крутизну температурной зависимости — увеличение светимости объекта при нагревании. Для биологических объектов он обычно составляет величину порядка 0,1(+/- 0,08).

t — температура исследуемого объекта в градусах Цельсия.

Так, температурные зависимости нативных масел на графиках, представленных выше, можно путём экспоненциальной аппроксимации представить так:

для подсолнечного масла:

$$I_{lum} = 1,4411 * e^{(0,098 * t)} * 10^3 \text{ квант/сек}$$

для оливкового масла:

$$I_{lum} = 1,5554 * e^{(0,087 * t)} * 10^3 \text{ квант/сек}$$

Подсолнечное масло при нагревании светит сильнее (что наглядно видно на графике), его коэффициент k больше на 0,011 (0,098 против 0,087).

В процессе рафинирования растительные масла теряют свои полезные антиоксидантные свойства, поэтому коэффициент k у них больше: 0,107 — оливковое, 0,115 — подсолнечное (на основании экспериментальных данных 2015 года).

Теперь давайте немного усложним задачу.

В приведённой выше формуле мы не учитывали влияние температуры на коэффициент b . Это не имеет большого значения на коротких диапазонах температур, но на больших приносит погрешность.

Чтобы этого избежать, давайте немного усложним нашу формулу, разложив подробно коэффициент b на составные части:

$$I_{lum} = A * t^c * e^{(k * t)}$$

А для упрощения расчётов, представим коэффициент A как e^a :

$$I_{lum} = e^a * t^c * e^{(k * t)}$$

Дело в том, что для того, чтобы избавиться от нелинейности, проще с самого начала придать нашей формуле логарифмический вид:

$$\ln(I_{lum}) = a + c * \ln(t) + k * t$$

где

I_{lum} — интенсивность хемилюминесценции.

a — коэффициент, выражающий светимость объекта без нагревания, его численное значение также зависит от используемых единиц хемилюминесценции.

c — коэффициент, выражающий степенное влияние температуры (например, влияние температуры на вероятность соударения реагирующих молекул, поставляющих энергию для ЭВС)

k — коэффициент, выражающий основную крутизну температурной зависимости — увеличение светимости объекта при нагревании. В данной формуле он будет немного выше, чем в предыдущей.

t — температура исследуемого объекта в градусах Цельсия.

Теперь попробуем рассчитать по этой формуле уравнение для температурной зависимости нативного подсолнечного масла, с учётом влияния температуры на вероятность соударения реагирующих молекул:

$$I_{lum} = e^{7,64391} * t^{-2,90725} * e^{(0,17668 * t)} * 10^3 \text{ квант/сек}$$

И то же самое для оливкового масла:

$$I_{lum} = e^{4,39777} * t^{-1,56971} * e^{(0,13001 * t)} * 10^3 \text{ квант/сек}$$

Как видим, для оливкового масла все коэффициенты ниже.

Однако для подобных расчётов требуется специальное программное обеспечение, такое как **Octave**, например (см. раздел «Обработка результатов»). Ибо использование обычных программ электронных таблиц не очень удобно.

Полиномиальные аппроксимации

Помимо экспоненциальной аппроксимации, возможна также и полиномиальная аппроксимация кривых температурной зависимости. Для температурных кривых обычно требуется полиномиальная аппроксимация шестой, пятой или хотя бы четвёртой степени. Уравнение функции в этом случае выглядит как такой многочлен:

$$I_{lum} = a_1 * t^5 + a_2 * t^4 + a_3 * t^3 + a_4 * t^2 + a_5 * t + b$$

где

I_{lum} — интенсивность хемилюминесценции.

t — температура исследуемого объекта в градусах Цельсия.

Множители a_1 , a_2 , a_3 , a_4 , a_5 , а также коэффициент b — подбираются расчётным путём. Причём каждый второй множитель будет иметь отрицательный знак.

Таким образом, уравнение температурной зависимости для нативного подсолнечного масла будет выглядеть так:

$$I_{lum} = 1,59 * 10^{-6} * t^6 - 3,52 * 10^{-4} * t^5 + 3,199 * 10^{-2} * t^4 - 1,51 * t^3 + 38,937 * t^2 - 516,869 * t + 2763$$

А для оливкового так:

$$I_{lum} = 1,177 * 10^{-6} * t^6 - 2,756 * 10^{-4} * t^5 + 2,614 * 10^{-2} * t^4 - 1,2742 * t^3 + 33,568 * t^2 - 451,27 * t + 2423$$

где

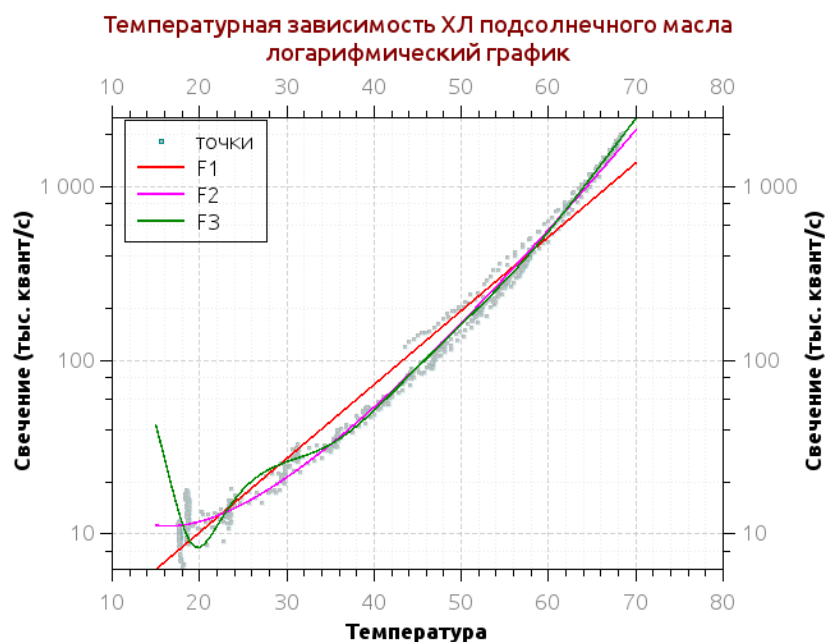
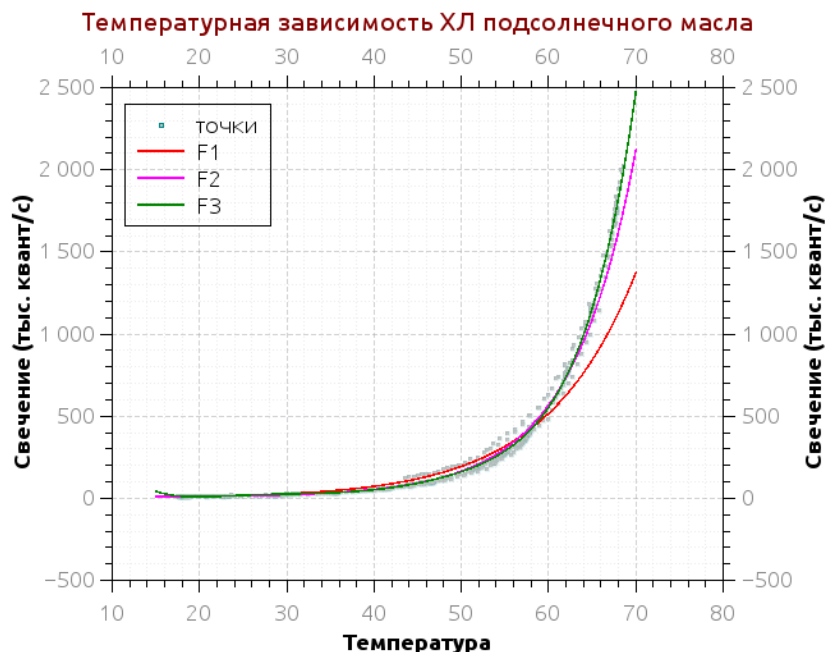
I_{lum} — интенсивность хемилюминесценции (в тысячах квантов в секунду на миллилитр масла).

t — температура исследуемого объекта в градусах Цельсия.

По этим уравнениям построены линии тренда в линейном графике температурной зависимости масла, приведённом выше. Такая аппроксимация достаточно точная и легко доступная из штатных средств программ электронных таблиц. Однако на момент написания данного текста у меня нет никаких сведений относительно каких-либо связей между коэффициентами многочлена и свойствами исследуемого объекта.

Следует заметить, что такая аппроксимация будет справедлива лишь для того диапазона температур, для которого имеются точки!

А теперь давайте сравним рассмотренные выше способы аппроксимации экспериментальных данных. Ниже приведены линейный и логарифмический графики для температурной зависимости не рафинированного подсолнечного масла, на которых отмечены исходные данные и линии тренда, построенные на основе описанных выше способов аппроксимации.

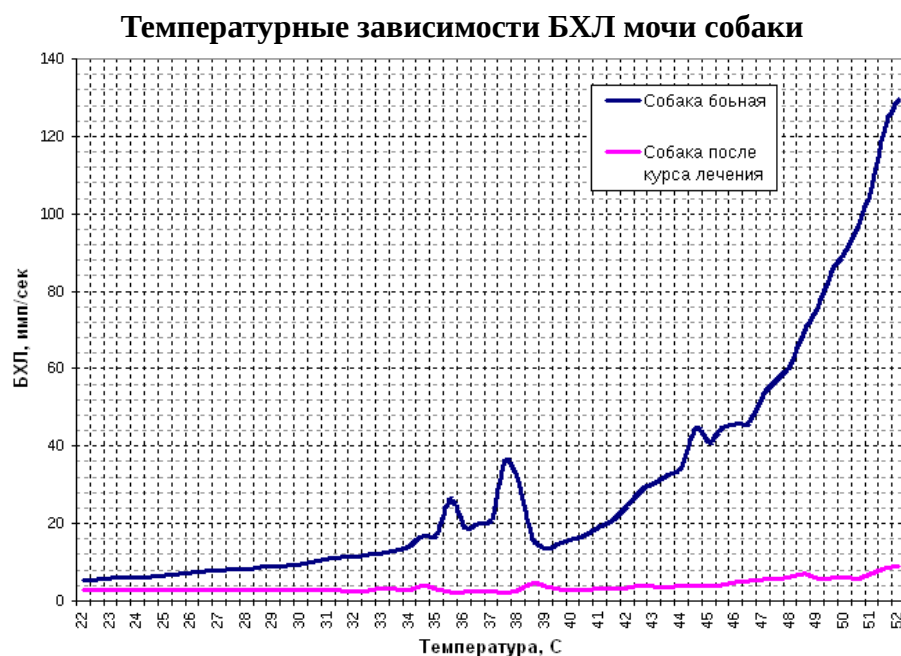


- F1 (красная линия) — простая экспоненциальная кривая.
- F2 (розовая линия) — экспоненциально-степенная кривая.
- F3 (зелёная линия) — полиномиальная кривая.

Экстремумы на температурных кривых

Важной особенностью температурных зависимостей биологических объектов является возможное наличие минимумов и максимумов на графике температурной зависимости. Природа этого явления в настоящий момент ещё почти не изучена, однако можно предположить, что подобное явление связано с пиком активности различных ферментов в точке их температурного оптимума, а также с возможной денатурацией, изменением структуры или разрушением некоторых органических веществ при определённых температурах.

В 2011 году на кафедре биофизики МГАВМиБ Закотеевым Ю.А. проводились исследования мочи больных собак. Ниже представлен график температурной зависимости одной из этих собак. Синяя линия (сверху) характеризует температурную зависимость мочи больного животного, а розовая линия (снизу) характеризует температурную зависимость этой же собаки, но снятую повторно, после курса лечения и клинического выздоровления животного.

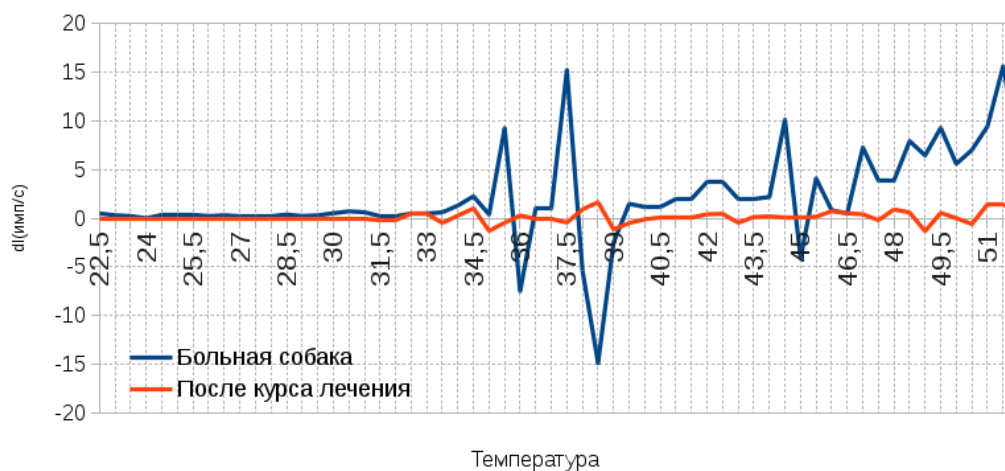


У мочи больной собаки наблюдаются максимумы свечения при температурах 38° С и 35,5° С. Стоит отметить, что в среднем температура тела здоровой взрослой собаки средних размеров составляет 37,5 — 38,5° С, то есть наибольший максимум соответствует нормальной физиологической температуре, а следовательно точке оптимума многих физиологических процессов.

Для наглядной демонстрации и сравнения экстремумов на графиках температурных зависимостей можно пользоваться дифференциальными графиками. По оси абсцисс, как и прежде, откладывается температура, а по оси ординат — первая производная от функции температурной зависимости. В таком представлении все экстремумы очень хорошо заметны. На приведённом ниже дифференциальном графике (на основании всё тех же экспериментальных данных за 2011 год) хорошо заметно, что в одни из температурных экстремумов, например, при 34,5 °С, у больного и у здорового животного совпадают, а другие, например, при 38,5 °С, у больного и у здорового животного диаметрально противоположны.

Дифференциальный график

температурной зависимости ХЛ мочи собаки



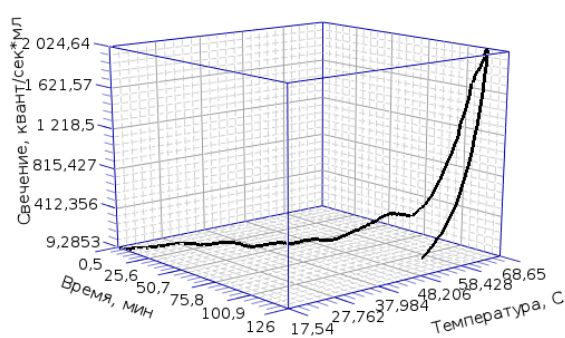
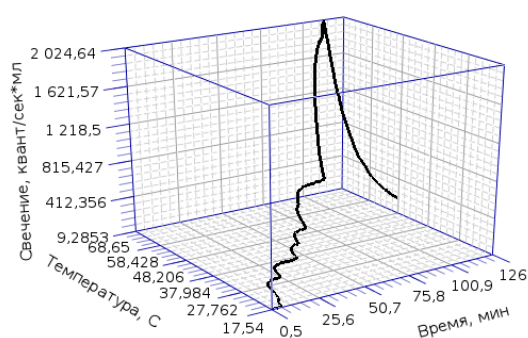
Двумя годами ранее, проводилось исследование хемилюминесценции сыворотки крови коров, больных лейкозом КРС в сравнении с сыворотками здоровых (контрольных) животных, так вот, результаты, полученные при исследовании хемилюминесценции при температуре, соответствующей физиологической норме, диаметрально противоположено отличались от результатов, полученных при более низкой температуре.

Из вышесказанного можно сделать вывод, что исследование температурных зависимостей БХЛ (а не только интенсивности БХЛ при постоянной температуре) может быть использовано в клинической диагностике.

Трёхмерные графики

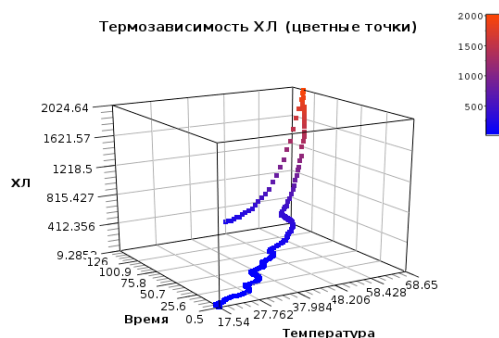
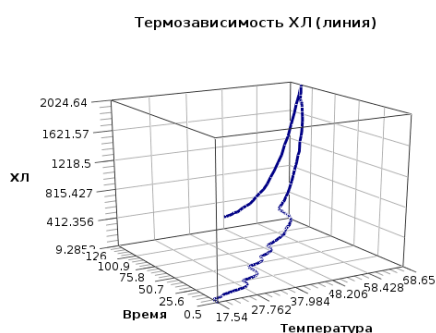
С помощью специальных компьютерных программ, таких как программы анализа и визуализации научных данных (говоря по-русски, построения графиков) **Qtiplot** или **SciDAVis** (обе программы являются открытыми и кроссплатформенными и имеют русскую локализацию, на момент написания этого текста у SciDAVis русификация не полная), можно также построить трёхмерные графики температурных зависимостей. Такие графики могут хорошо смотреться на презентациях, где можно наглядно показать анимацию их вращения, но не очень хорошо смотрятся при печати на бумагу.

Ниже представлены трёхмерный график, построенный в программе Qtiplot на основе исследования температурной зависимости не рафинированного подсолнечного масла, повернутый в двух разных ракурсах.



По осям куба отложены интенсивность хемилюминесценции в тысячах квантов, испускаемых одним миллилитром масла во все стороны за одну секунду, температура в градусах Цельсия и время в минутах. Ступенчатость линии нагрева обусловлена тем, что нагревание велось путём периодического поднятия требуемой температуры в водяном термостате. Линия остывания — гладкая.

Тот же самый график можно построить и с помощью программы SciDAVis.



На одном графике представлена линия (траектория), а на другом — точки, цвет которых зависит от интенсивности хемилюминесценции.

Регистрация кинетики хемилюминесценции

Ещё одним важным моментом в исследовании хемилюминесценции является регистрация кинетики хемилюминесценции. Регистрация кинетики хемилюминесценции подразумевает регистрацию значений интенсивности хемилюминесценции и дальнейшее построение графиков для наглядного анализа изменений интенсивности хемилюминесценции.

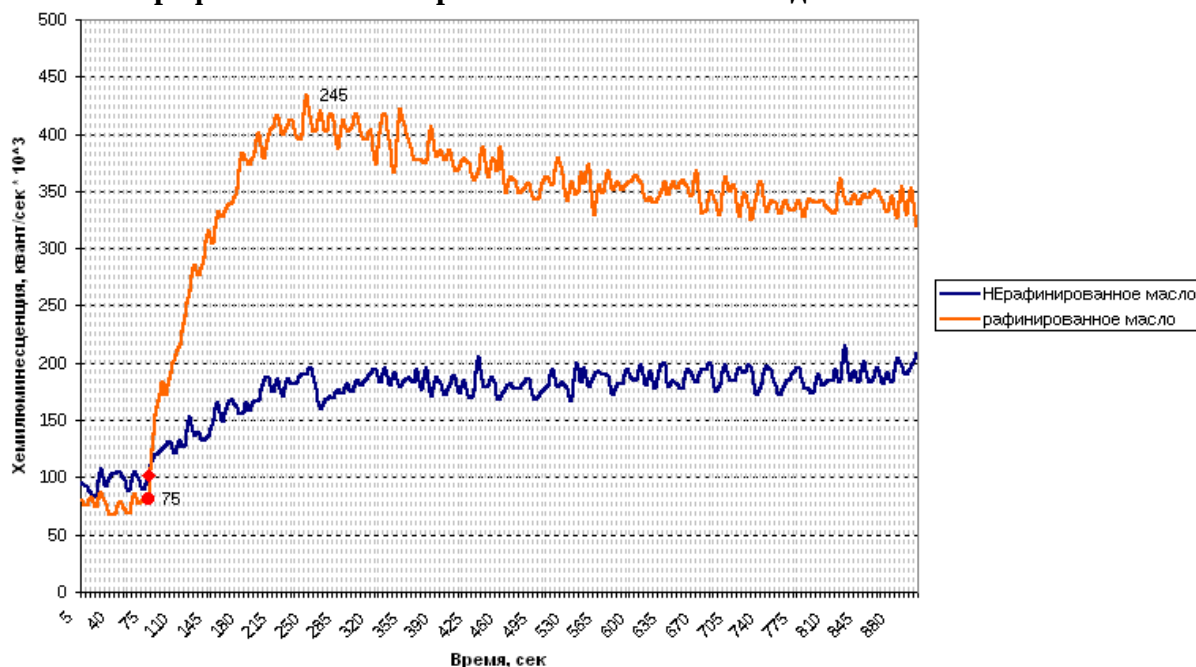
Исследование кинетики хемилюминесценции даёт представление о динамике химических процессов, вызывающих эффект хемилюминесценции.

Важным параметром, отличающим процесс исследования кинетики хемилюминесценции от обычного измерения хемилюминесценции, является выбор времени счёта импульсов. Если при обычном измерении хемилюминесценции время счёта импульсов обычно составляет от 30 до 100 секунд, то при регистрации кинетики хемилюминесценции время счёта импульсов берётся меньше. Для относительно медленно меняющихся процессов можно брать время счёта 10 — 5 секунд, для более быстро меняющихся процессов — от 5 до 1 секунды. Программное обеспечение, используемое нами, в настоящий момент позволяет задать минимальное время счёта — 0,5 секунды.

С уменьшением времени счёта импульсов увеличивается разрешение графика по шкале времени, но в то же время увеличивается «шум» (флуктуации зарегистрированных значений) и уменьшается статистическая точность каждого отдельного измерения.

Ниже представлен пример графика кинетики хемилюминесценции.

График кинетики перекисного окисления подсолнечного масла.



На 75-й секунде измерения (красная точка на графике) в кювету вводится 1 мл 3%-ного раствора перекиси водорода (H_2O_2). Пик хемилюминесценции достигается на 245-й секунде (через 2 минуты 50 секунд после введения перекиси). Сравнение графиков кинетики для рафинированного и не рафинированного масла наглядно показывает значительно большую антиокислительную активность не рафинированного масла, за счёт входящих в его состав природных антиоксидантов, которые удаляются в процессе очистки (рафинирования) масла.

Сонолюминесценция

Сонолюминесценция, или ультразвуковое свечение — это физическое явление испускания света жидкостями под воздействием механических колебаний с частотой примерно порядка 10^6 Гц.

Существует несколько теорий относительно природы этого явления, мы их здесь рассматривать не будем.

Зависимость интенсивности свечения от интенсивности ультразвука и от температуры — важные характеристические свойства, которые могут быть весьма информативными для изучения свойств тех или иных жидкостей.

При высоких интенсивностях ультразвука, график температурной зависимости сонолюминесценции обычно гладкий, часто с тенденцией понижения свечения с увеличением температуры. При низких интенсивностях ультразвука, на графике температурной зависимости появляются отчётливые минимумы и максимумы, которые зависят от свойств той или иной жидкости.

Другим важным информативным фактором является минимальная пороговая интенсивность возбуждающего ультразвука, необходимая для проявления эффекта сонолюминесценции, она зависит от многих факторов, в том числе от вязкости и поверхностного натяжения жидкости, а также от её состава (наличия растворённых примесей).

Исследование сонолюминесценции биологических жидкостей и тканей (большой частью состоящих из воды) может быть применено в биологических исследованиях и клинической диагностике.

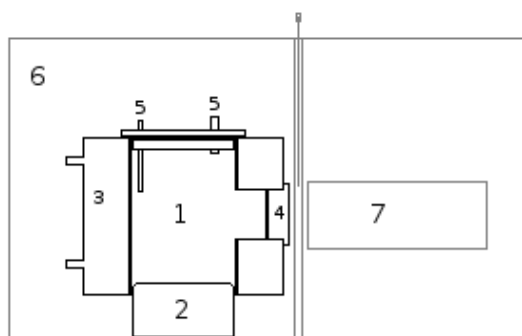
При больших интенсивностях ультразвука (более 1 Вт/см^2) сонолюминесценция проявляется практически независимо от акустических параметров, а при малых интенсивностях, для уверенного проявления сонолюминесценции необходимо добиться акустического резонанса, получения стоячей волны.

Классическое приспособление для проведения исследования ультразвукового свечения жидкостей представляет собой вертикальный цилиндр, с боковым прозрачным окном и гидротермостатируемой рубашкой. Снизу находится пьезоэлектрический источник ультразвука — он выполняет роль дна цилиндра. Цилиндр наполняется исследуемой жидкостью так, чтобы она покрывала прозрачное окно сбоку. Эффект стоячей волны достигается регулированием уровня исследуемой жидкости. Сверху цилиндр герметично закрывается крышкой с отверстиями для регулирования уровня жидкости, введения различных добавок, откачки воздуха или закачки специальных газов, внедрения термодатчиков, датчиков интенсивности ультразвука и т. п.

Всё это приспособление помещалось в камеру люминометра, при этом прозрачное окошко сбоку совмещалось с окном, за которым находился ФЭУ люминометра, ФЭУ должен был находиться сбоку.

Среди прочих факторов, информативное значение имеет и спектр сонолюминесценции. Спектральные исследования проводятся по точкам с применением светофильтров, помещаемых между окошком описанного выше приспособления и ФЭУ, поскольку использование монохроматоров весьма затруднено ввиду значительных светопотерь.

Достоинства такого классического приспособления заключались в высокой стабильности его работы, возможностью производить различные манипуляции с исследуемой жидкостью прямо в процессе измерения. А главным его недостатком является большой объём исследуемой жидкости. Также можно отметить его громоздкость, сложность в изготовлении, необходимости извлекать и промывать после каждого измерения, что затрудняет проведение серий экспериментов.



Классический вариант устройства для исследования сонолюминесценции

1 — резервуар для исследуемой жидкости,
 2 — пьезоэлектрический источник ультразвука, 3 — гидротермостатируемая рубашка,
 4 — боковое прозрачное окно, 5 отверстия и патрубки на крышке резервуара с исследуемой жидкостью, 6 — камера хемилуминометра, 7 — ФЭУ.

Ниже представлены фотографии классической камеры для исследования сонолюминесценции жидкостей.



Фото: вид сбоку

Рядом стоит крышка от камеры



Фото: вид сверху

На дне камеры расположен излучатель

Другим конструктивным решением, применяемым для исследования малых объёмов жидкости, в своё время являлся термостатируемый пьезоэлектрический излучатель, на который сверху наносилась капля (0,25мл) исследуемой жидкости. Разумеется, в этом случае можно было забыть о получении стоячей волны, не говоря уж про что-то ещё. К тому же капля жидкости быстро испарялась. Всё это делало данный метод весьма неточным. Но зато этот метод позволял работать с сериями исследований биологических объектов малых, например, с кровью, ибо весьма проблематично добыть 100 — 150 мл крови для анализа, если речь идёт о живом человеке или тем более мелком животном.

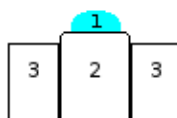
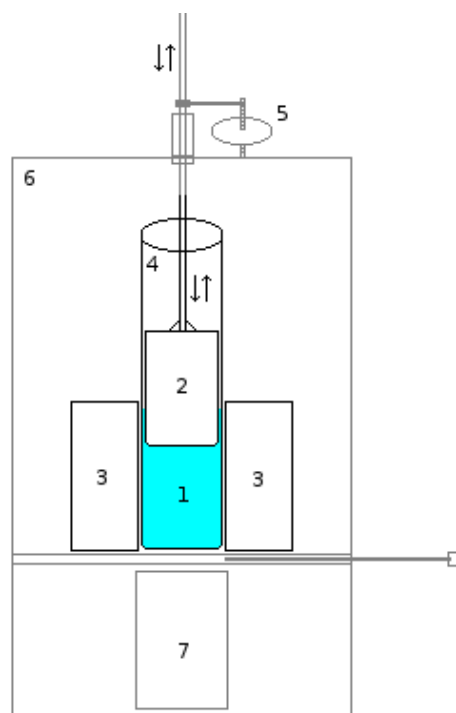


Схема капельной сонолюминесценции

1 — капля жидкости, 2 — пьезоэлектрический излучатель ультразвука,
 3 — гидротермостатирующее кольцо для термостатирования излучателя.

В наше время, на кафедре Биофизики МГАВМиБ, было разработано ещё одно решение — метод Закотеева. В этом конструктивном решении применялась типичная конструкция хемилуминометра (ФЭУ снизу). В термостатируемый кюветодержатель помещается широкая пробирка (лучше плоскодонная) с небольшим объёмом исследуемой жидкости. Сверху в пробирку погружается миниатюрный пьезоэлектрический источник ультразвука (так, чтобы он был немного погружен в исследуемую жидкость). Путем регулировки погружения источника ультразвука можно добиться получения стоячей волны. Регулировка погружения осуществляется специальным механизмом с микровинтом, ручка которого располагается снаружи камеры хемилуминометра, это даёт возможность регулировать глубину погружения излучателя в процессе работы хемилуминометра.



Принцип исследования сонолюминесценции по методу Закотеева

- 1 — исследуемая жидкость, 2 — пьезоэлектрический источник,
 3 — термостатируемый кюветодержатель, 4 — пробирка-кювета,
 5 — микровинт, регулирующий глубину погружения источника ультразвука,
 6 — камера хемилуминометра, 7 — ФЭУ.

По сравнению с классическим методом, метод Закотеева требует для исследования лишь несколько миллилитров исследуемой жидкости (или даже 1мл), что позволяет работать с биологическими пробами объектов, также данный метод позволяет быстро проводить серии замеров просто меняя стеклянные пробирки и омывая погружаемый источник ультразвука. А в отличие от «капельного» метода, данный метод позволяет стабильно получать стоячую волну.

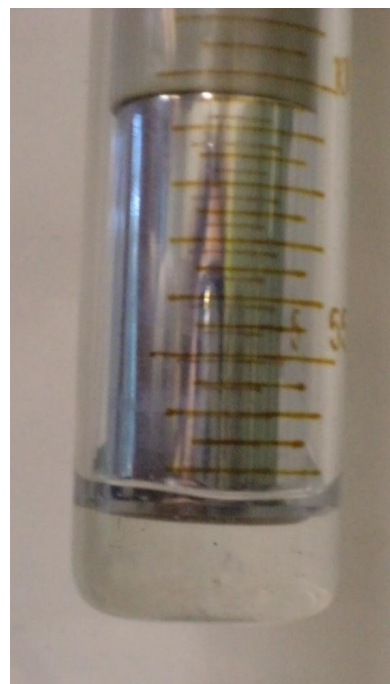
Ниже представлены фотографии прототипов таких приспособлений.



Излучатель в пробирке
(общий вид)



Система пробирки
с излучателем
установленная в
хемилюминесцентр



Головка излучателя,
погруженная в жидкость
(крупный план)

Также возможна работа и с круглодонными пробирками и специальным излучателем:



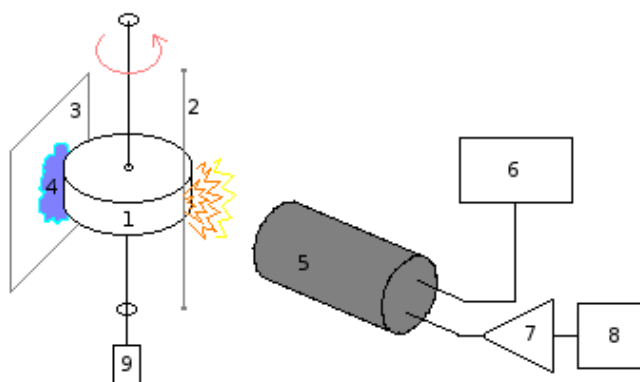
Излучатель в круглодонной пробирке
(общий вид)



Головка излучателя, погруженная
в жидкость (крупный план)

Триболюминесценция

Ещё одним дополнением и практическим приложением принципа люминесценции является так называемая триболюминесценция. В словарях этот термин обычно трактуется, как явление люминесценции при разрушении кристаллов, однако в сфере хемилюминесцентного анализа этот термин имеет другое значение, а именно свечение, возникающее при механическом трении (с участием исследуемого вещества). Приборы для подобного анализа называют триболюминометрами. Одним из возможных вариантов конструктивных решений для исследования триболюминесценции может являться приспособление, в котором вращающийся тефлоновый валик с нанесённым на него исследуемым веществом трётся о натянутую металлическую проволочку. На рисунке ниже представлена схема такого триболюминометра.



Блок-схема триболюминометра

- 1 — тефлоновый валик, 2 — металлическая проволочка,
3 — подложка с нанесённым на неё исследуемым веществом,
4 — исследуемое вещество, 5 — ФЭУ,
6 — высоковольтный источник питания для ФЭУ,
7 — усилитель, 8 — регистрирующее устройство.

Исследуемое вещество (4) вначале наносится на подложку (3), например, из плёнки или фильтровальной бумаги, которая вставляется в триболюминометр. Тефлоновый валик (1) приводится в движение электродвигателем (9). При трении валика о подложку на него попадают частицы исследуемого вещества. С другой стороны валик трётся о натянутую металлическую проволочку, а рядом установлен ФЭУ, который регистрирует свечение, исходящее при трении валика с нанесёнными на него частицами исследуемого вещества о металлическую проволочку.

Измерение ведётся в течении нескольких секунд, при этом идёт регистрация интегральной светосуммы, после чего подложка с исследуемым веществом удаляется, а валик и проволочка оmyваются дистиллированной водой и очищаются, как правило, с помощью специального механизма автоматической очистки.

В 80-е годы имел место промышленный выпуск триболюминометров, способных проводить исследования серий образцов в автоматическом режиме, с печатью результатов на бумажную ленту. В качестве рамок для подложки них использовались стандартные рамки для 35-миллиметровых слайдов, а в качестве кассет для серии исследуемых образцов использовались стандартные кассеты от советских автоматических диапроекторов. Это сильно упрощало процесс исследования.

Однако какими-либо сведениями о дальнейшем развитии этого направления я на данный момент не располагаю. Широкого применения эта тематика не получила.

Обработка результатов

Весьма важную роль при любом исследовании является процесс обработки результатов.

Далее мы рассмотрим детально процесс обработки результатов при проведении исследований хемилюминесценции.

Методика замеров

Для проведения статических измерений, для начала нужно настроить используемую программу анализа импульсов с ФЭУ. Время счёта лучше выбрать 30 секунд, а размер выборки — 22 значения.

Далее запускается процесс счёта. По окончании процесса счёта (через 12 минут — 22 раза по 30 секунд), мы получим 22 показания. Эти показания необходимо скопировать в программу работы с электронными таблицами, на новый (пустой) лист. Самое первое измерение копируем в ячейку B11, это не случайно, десяти строк хватит для того чтобы создать шапку к таблице, первый столбец (A) занимать не стоит — он пригодится для подписей к полученным значениям, например, «Среднее:», «Стандартное отклонение:», «+/-», номеров измерений, и так далее. Далее визуально находим наибольшее и наименьшее значение и удаляем их, например путём удаления строк.

Мы получили 20 значений. Предположим, они занимают у нас диапазон ячеек B11:B30, теперь приступим к статистической обработке.

Для начала находим среднее арифметическое значение в ячейке под столбцом с цифрами. Для русской версии программы MS Excel, формула будет выглядеть так:

=СРЗНАЧ(B11:B30)

а для программы LibreOffice Calc вот так:

=AVERAGE(B11:B30)

Далее, в ячейке ниже, вычисляем стандартное отклонение, в MS Excel, формула будет выглядеть так:

=СТАНДОТКЛОН(B11:B30)

а в LibreOffice Calc, соответственно так:

=STDEV(B11:B30)

Далее вычисляем доверительный интервал. В ветеринарии принято использовать вероятность 95%, а в гуманитарной медицине — 99%. В случае, если используется вероятность 95%, то формула доверительного интервала будет выглядеть следующим образом.

Для MS Excel:

=ДОВЕРИТ(0,05;B32;20)

и для LibreOffice Calc:

=CONFIDENCE(0,05;B32;20)

В данной формуле:

0,05 — это 1 за вычетом 95%. В случае, если мы примем вероятность 99%, то вместо «0,05» надо будет указать «0,01».

B32 — адрес ячейки, в которой у нас находится стандартное отклонение.

20 — объём нашей выборки, 20 значений.

Далее вычисляем относительную погрешность в процентах, независимо от используемой программы формула будет выглядеть так:

$$=B33/B31*100$$

Здесь:

B33 — адрес ячейки, где у нас находится доверительный интервал

B31 — адрес ячейки, где у нас находится среднее значение

При исследовании хемилюминесценции считается нормальным, если относительная погрешность не превышает 3%.

Далее нужно привести нашу таблицу в порядок, Написать, что именно мы измеряем, озаглавить столбцы (особенно если помимо импульсов в секунду регистрируются и другие параметры), сделать подписи в столбце A.

В итоге должно получиться как-то так:

	A	B	C	D	E	F
7						
8						
9		Фон пустой кюветы (в начале эксперимента)				
10		имп/сек	сумм общ	сумм амп	темп	
11	1	16,23	2821586	11076	39,41	
12	2	16,83	2822345	11256	39,36	
13	3	16,4	2841019	10989	39,78	
14	4	16,73	2836692	11702	39,5	
15	5	16,03	2833967	10600	39,5	
16	6	17,23	2831693	11213	39,79	
17	7	18,9	2832444	13362	39,63	
18	8	16,87	2817746	11410	39,54	
19	9	16,43	2803478	10980	39,53	
20	10	16,23	2813926	11162	39,59	
21	11	18,03	2797184	11974	39,63	
22	12	17,17	2814784	11510	39,79	
23	13	18,07	2808789	12258	39,75	
24	14	18,27	2809682	12031	39,67	
25	15	16,87	2816420	11040	39,65	
26	16	17,2	2814931	11929	39,61	
27	17	18,03	2823037	12363	39,6	
28	18	16,13	2818513	11176	39,67	
29	19	16,13	2815367	11198	39,62	
30	20	17,7	2819312	12433	39,63	
31	Среднее:	17,1	2819645,75	11583,1	39,61	
32	Ст. откл.	0,841455	11190,552	666,63577	0,117378	
33	+/- (95%)	0,4	4904	292	0,05	
34	Отн. Погрешн.	2,2	0,17	2,52	0,13	
35						

В этом примере (что на картинке) параллельно с импульсами в секунду регистрируются и другие параметры хемилюминесценции: общая светосумма («сумм общ») и сумма амплитуд всех зарегистрированных импульсов («сумм амп»). При низких интенсивностях хемилюминесценции общая светосумма абсолютно неинформативна (см. главу «Режимы работы ФЭУ»), однако в данном случае она входит в стандартный шаблон для расчётной таблицы. Также параллельно регистрируется и температура. Мы видим, что относительная погрешность хемилюминесценции не превышает трёх процентов (2,2% для импульсов в секунду, 2,52 для суммы амплитуд импульсов), в то время как погрешность температуры менее одного процента, что говорит о стабильной работе водяного термостата.

Теперь поговорим о порядке проведения измерений.

Сначала, после включения прибора (и всех узлов установки), прибору надо дать «прогреться», обычно на это нужно от 30 минут до часа. Если исследования проводятся при определённой температуре, то нужно включить термостат, и вывести его на требуемую температуру.

Вначале измеряется фон при закрытой шторке затвора, затем фон пустой кюветы.

Полученное значение фона пустой кюветы будет впоследствии вычитаться из других полученных показаний для кюветы с исследуемым объектом.

Далее, для повышения точности получаемых результатов, в начале эксперимента, после измерения фона пустой кюветы, проводится измерение фона эталона. Это позволяет связать показания прибора с физическими единицами.

Если в качестве эталона используется ЖС-19, лежащий в кювете, то для него сначала рассчитывается истинное свечение в импульсах в секунду (сигнал минус фон кюветы), а затем, учитывая светимость данного эталона (в квантах в секунду на 4 пи), рассчитывается коэффициент между импульсами в секунду и квантами в секунду для данного конкретного прибора в данный конкретный момент. Для этого нужно паспортную или расчётную светимость эталона разделить на показания прибора за вычетом фона пустой кюветы.

Предположим, некий эталон имеет светимость 859 тысяч квантов в секунду, и высвечивает 520 импульсов в секунду, при этом фон кюветы — 25 импульсов в секунду.

Рассчитываем коэффициент:

$$k = \frac{859}{(520 - 25)} = \frac{859}{495} = 1,7353....$$

Это значит, что в данный момент 1 импульс в секунду, зафиксированный установкой, соответствует примерно $1,74 * 10^3$ квантов в секунду, исходящих от исследуемого объекта во все стороны.

Много это или мало? Давайте попробуем посчитать. Если фон кюветы составляет 25 имп/сек, а погрешность измерения не более 3%, то можно утверждать, что изменения регистрируемого сигнала на 0,75 имп/сек (т.е. $25 * 0,03$) являются статистически достоверными. Следовательно, данное оборудование способно улавливать $1,3 * 10^3$ квантов в секунду, испускаемых объектом во все стороны ($1,74 * 10^3 * 0,75$). Вспоминаем, что один квант образуется из-за разрядки одного ЭВС. При этом, объём исследуемого вещества у нас как правило, от одного до трёх миллилитров. Следовательно, чувствительность нашего оборудования такова, что оно способно улавливать порядка 10^{-17} — 10^{-18} моль/литр актов разрядки ЭВС в секунду, при условии что раствор абсолютно прозрачен, и не содержит веществ, препятствующих проявлению хемилюминесценции. Если быть точнее, то при объёме исследуемого вещества в 1 мл, чувствительность будет составлять:

$$1,3 * 10^3 \text{ (квант/с)} * 1000 \text{ (мл в 1л)} / 6,02 * 10^{23} \text{ (число Авогадро)} = 2,16 * 10^{-18} \text{ (моль/л*сек)}$$

Опять же следует повториться, что это справедливо для случая если раствор абсолютно прозрачен и не содержит никаких веществ, препятствующих проявлению хемилюминесценции.

Результаты последующих измерений исследуемых объектов надо будет умножать на этот коэффициент, в результате мы будем получать результаты не в условных единицах, а в физических, вполне пригодных для публикаций. В принципе, если нет возможности должной градуировки, можно публиковать результаты и в условных единицах, но только в контексте параллельного сравнения хемилюминесценции различных объектов в ходе одной серии экспериментов. Да и то, обычно некомпетентные критики и рецензенты такого не любят.

Какой компьютер нужен для работы с хемилуминометром? На установке Журавлёва-Закотеева используется компьютер следующей конфигурации: Pentium (первый), 64 МБ ОЗУ, операционная система Windows 2000. Возможно многим такая конфигурация покажется весьма устаревшей, но на самом деле, для поставленных задач этого вполне хватает. В качестве программы для первичной обработки данных там используется MS Excel 2000. Стоит сказать, что во всей истории версий MS Excel, версии 2000 и 2003 были самыми удачными. Дальнейшая эволюция MS Excel сводилась к тому, чтобы превратить серьёзный инструмент для серьёзной работы в некую утилиту для малообразованных офисных клерков, которым требуется как можно быстрее сдать отчёт своему шефу. Однако описанный выше компьютер используется именно как часть аппаратно программного комплекса.

Для более серьёзной обработки данных я рекомендую использовать более-менее современный компьютер с установленным любым современным дистрибутивом Linux (лучше всего, основанном на Debian, но не обязательно). Дело в том, что репозитории современных дистрибутивов Linux содержат весьма большое количество разнообразных открытых и свободных программ для обработки, анализа, визуализации и публикации научных данных.

Электронные таблицы

Среди открытых программных продуктов, хочется отметить такие вещи, как например, программа электронных таблиц **Gnumeric**. Среди особенностей этой программы можно отметить интересный подход к построению графиков, возможность построения трёхмерного графика поверхности, хороший пакет статистического анализа и достаточно сильную математику. При этом Gnumeric не потребляет много ресурсов, и может работать с большими массивами данных без «подвисаний» даже на не очень мощных ПК, в отличие от более популярного **LibreOffice Calc**. Однако, надо отдать должное, что LibreOffice Calc в последнее время активно развивается, с версии 5.2 в LibreOffice Calc появился «мастер статистики» — альтернатива «пакету анализа» в MS Excel, он находится в меню «Данные» - «Статистика»

Если требуется простое создание гистограммы частотного распределения выборки, то можно воспользоваться функцией FREQUENCY в LibreOffice Calc (или ЧАСТОТА в MS Excel). Синтаксис формулы такой: (диапазон_данных;диапазон_карманов) Следует помнить, что функция возвращает массив чисел, причём на одно значение больше, чем количество карманов — в последнее поле вводится частота значений больше максимального кармана. Для вывода результата в виде массива, нужно выделить целевой диапазон ячеек, ввести формулу (она окажется в первой ячейке) и нажать сочетание клавиш **Control + Shift + Enter**.

«OpenOffice» или «LibreOffice»? — Дело в том, что по бюрократическим причинам в 2010 году произошел конфликт между тогдашним владельцем бренда «OpenOffice» компанией «Oracle», и командой разработчиков. В результате образовалось ответвление от основного проекта, получившее названием «LibreOffice» («свободный офис»), где поначалу было абсолютно всё то же самое, только без пагубного влияния «Oracle». Позже LibreOffice получил активное развитие, и продолжает активно развиваться и по сей день (на момент написания этого текста, разрабатывается некоммерческим сообществом примерно из пятиста программистов), в то время как в развитии OpenOffice наметился серьёзный застой. Потерпев фиаско, Oracle продали в 2012 году свой гиблый проект компании Apache. Через год Apache выпустили свою, четвертую версию OpenOffice, за счёт привнесения новшеств из ушедшего на тот момент уже далеко вперёд LibreOffice, но активного развития OpenOffice всё равно не получил.

Следует заметить, что LibreOffice, как и его предшественник OpenOffice, использует в качестве основного формата сохранения файлов формат ODF (Open Document Format), принятый в России государственным стандартом ГОСТ Р ИСО/МЭК 26300-2010 (идентичен международному стандарту ISO/IEC 26300:2006).

Программы анализа и визуализации данных

Также не стоит забывать и об упомянутых в главе «Температурные зависимости

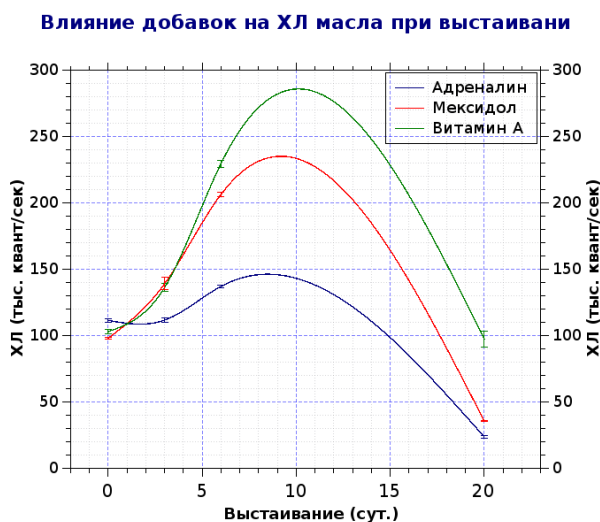
хемилюминесценции» программы анализа, визуализации и подготовки к печати научных данных — **Qtplot** и **SciDAVis**. Они могут быть полезны для построения качественных трёхмерных и двумерных графиков, статистического анализа, аппроксимации и т. п. SciDAVis в своё время возник как более свободное и некоммерческое ответвление от проекта Qtplot, разработку которого жёстко курирует коммерческая компания, оказывающая платную техническую поддержку Qtplot.

При запуске Qtplot пользователь видит таблицу из двух столбцов, в которую можно вставить любой массив данных, при этом размеры таблицы (количество столбцов и строк) автоматически увеличится. Также возможен гибкий импорт данных из файлов **xls** (формат MS Excel) или **ods** (формат Calc). Для каждого столбца нужно правильно указать тип: X, Y, Z (для трёхмерных графиков), погрешности по X, погрешности по Y... Столбцы с погрешностями должны располагаться рядом со столбцами с данными, к которым они относятся. Для построения обычных графиков нужно выбрать один или несколько столбцов Y, а для построения трёхмерных — Z. Также возможно построение графиков (или наложение на уже имеющийся график) различных функций, по заданным уравнениям (это может быть полезно, например, при аппроксимации данных каким-либо «нестандартным» способом). Возможно интегрирование и дифференцирование полученных графиков. Ну а создание пользовательских шаблонов и макросов на языке Python может существенно упростить и автоматизировать работу при выполнении типовых (для какой-то работы) операций.

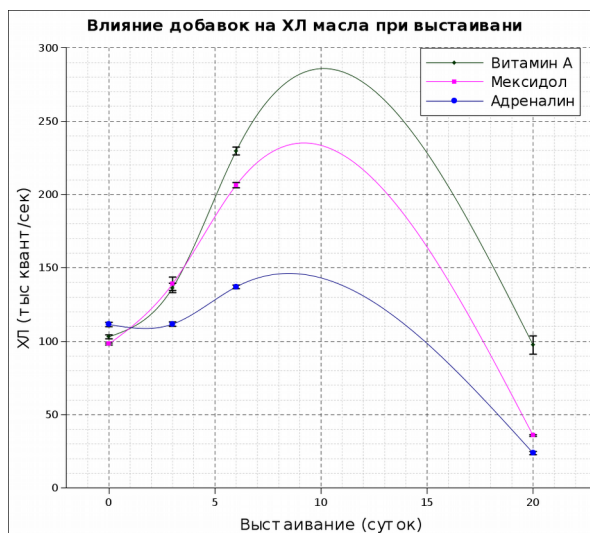
В общих случаях, строить графики можно и в программах работы с электронными таблицами. Ниже приведены примеры одного и того же графика, построенного в разных программах: в программе анализа и визуализации научных данных Qtplot (версии 0.9.8.9), в программе электронных таблиц Gnumeric (версии 1.12.9), в программе электронных таблиц LibreOffice Calc (версии 5.1.3) в программе электронных таблиц Microsoft Excel (2003). Также представлена и исходная таблица данных с указанием погрешностей. Следует заметить, что все вышеупомянутые программы работы с электронными таблицами поддерживают построение графиков по точкам (x, y) с обозначением погрешностей для каждой точки.

Влияние добавок на хемилюминесценцию масла при выстаивании						
Выстаивание (сут.)	Витамин А	Мексидол	Адреналин	Погрешность (+/- 95%) Витамин А	Погрешность (+/- 95%) Мексидол	Погрешность (+/- 95%) Адреналин
Исходно	103,0	98,1	111,4	1,4	0,7	1,5
3	136,3	139,1	111,7	3,2	4,6	1,5
6	229,6	206,4	137,1	2,7	1,8	1,2
20	97,4	35,7	23,8	6,2	0,6	1,1

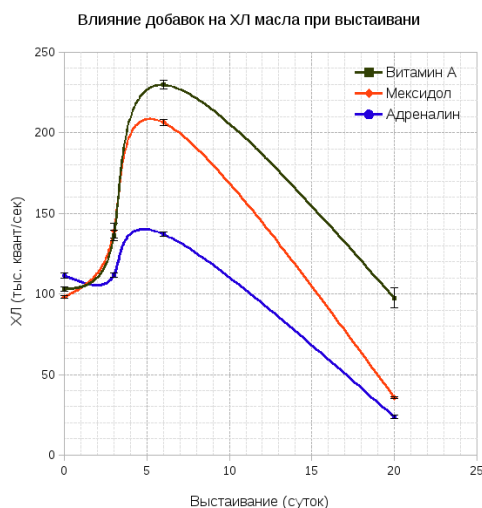
(Данные таблицы получены на основе экспериментов 2015 — 2016 гг.)



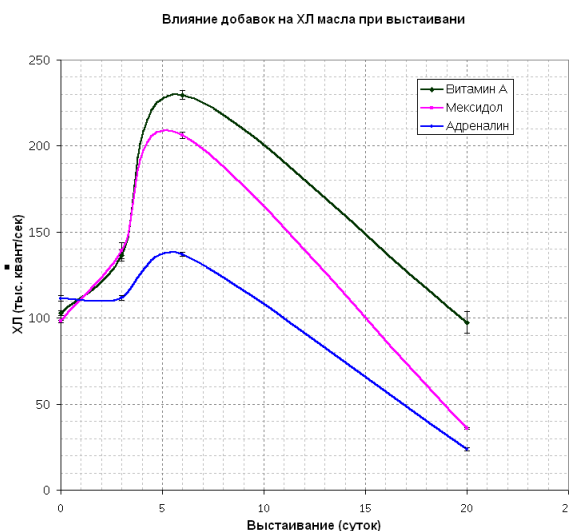
График, построенный в Qtplot



График, построенный в Gnumeric



График, построенный в LO Calc



График, построенный в MS Excel

Можно заметить, что графики Qtiplot и Gnumeric немного похожи между собой. Также между собой похожи графики LO Calc и MS Excel. Это можно объяснить тем, что у Gnumeric значительно шире возможности построения графиков, в частности доступно несколько алгоритмов сглаживания линий (а у Calc всего два), при этом для каждой линии можно выбрать свой отдельный тип сглаживания. Ну а разработчики LibreOffice Calc, судя по всему, пытались максимально продублировать известный продукт от Microsoft, поэтому графики Calc и Excel выглядят очень похоже.

Системы компьютерной алгебры

В случае возникновения необходимости проведения сложных математических расчётов можно воспользоваться открытой, свободной и кроссплатформенной математической системой **Octave**. Предположим, нам нужно рассчитать некую математическую функцию $y = f(x)$ на основе множества точек $(x_1 y_1; x_2 y_2; x_3 y_3; \dots x_n y_n)$. В случае, если функция линейная ($y = kx + b$) или логарифмическая ($y = b * m^x$), то можно просто воспользоваться встроенными функциями программ электронных таблиц (например, LINEST и соответственно LOGEST в LibreOffice Calc). Но если функция более сложная (в том числе даже полиномиальная), то может очень выручить Octave.

Одна из особенностей Octave в том, что она представляет из себя мощный математический движок, представленный специальным интерпретатором команд, с неким специальным «языком программирования». С этой программой можно работать путём непосредственного ввода команд, но чаще всего, используются заранее написанные сценарии (их также иногда называют «программы» или «макросы»). Можно использовать заранее подготовленный шаблон, вставляя в него свои экспериментальные данные. Существуют и разнообразные графические оболочки для Octave, вроде qtOctave, но они не русифицированы, и следовательно не могут сделать работу более удобной.

В языке Octave комментарии обозначаются знаком процента «%» (сточки, начинающиеся с %, интерпретатором обрабатываться не будут. Если требуется вынужденный разрыв строки (строка не влезает в экран), то ставится многоточие (следующая строка будет считаться продолжением предыдущей), а чтобы произвести какую-либо операцию без немедленного вывода результата на экран, в конце строки ставится точка с запятой «;». Массивы чисел задаются в квадратных скобках, через пробел, например, $x = [1\ 2\ 3\ 5\ 10\ 15\ 25]$. Сам файл сценария (макроса) имеет расширение «.m».

В качестве примера, ниже представлен готовый сценарий, используемый для расчёта коэффициентов уравнения температурной зависимости хемилюминесценции с учётом влияния температуры на вероятность столкновения реагирующих молекул (см. главу

«Температурные зависимости хеиллюминесценции»).

```
% Описываем функцию обчёта наименьших квадратов
function s=f_mnk ( c )
% Объявляем глобальные переменные (для функции)
global x ;
global y ;
s=0;
for i =1: length(x)
    s=s+(log(y(i))-c(1)-c(2)*log(x(i))-c(3)*x(i))^2;
end
end
% Описание функции окончено
% Переходим к самой программе
% Снова объявим глобальные переменные (основной для программы)
global x ;
global y ;
% Далее задаём массив температур (ось x)
x=[16.35 16.38 16.38 16.25 16.38 16.21 и так далее Ваши значения через пробел]
% и массив соответствующих значений ХЛ (ось y)
y=[9.7983 10.3113 10.8243 8.6013 9.5247 14.1417 и так далее Ваши значения]
% Составляю систему линейных уравнений
A=[length(x) sum(log(x)) sum(x); sum(log(x)) sum(log(x).*log(x))...
sum(x.*log(x)); sum(x) sum(x.*log(x)) sum(x.*x)];
B=[sum(log(y)) ; sum(log(y).*log(x)) ; sum(log(y).*x)];
% И решаем её по методу Гаусса
C=rref([A B]) ; n=size(C) ; c=C(:,n(2))
% Здесь наши искомые коэффициенты будут представлены как массив "c" из трёх чисел
% Если требуется, вычисляем значение суммарной квадратичной ошибки
% для подобранной температурной зависимости
sum1=f_mnk(c)
```

Решение будет выведено на экран примерно в таком виде:

```
c =
    4.39777
   -1.56971
    0.13001

sum1 = 209.22
```

Три числа в столбик — это и есть коэффициенты для искомого уравнения температурной зависимости:

$$I_{lum} = e^{4.39777} * t^{-1.56971} * e^{(0.13001*t)}$$

Одним из серьёзных недостатков Octave является то, что независимо от региональных стандартов, в качестве разделителя целой и дробной части используется точка.

Чтобы выполнить файл сценария, достаточно ввести команду octave и путь к файлу сценария.

Выводить получаемые результаты можно тоже в файл. Для этого добавим в конец нашего сценария следующие строки:

```
% Создадим файловую переменную f1 для файла log.txt в режиме записи в конец
f1=fopen('log.txt','at+');
% Озаглавим наш вывод результатов
fprintf(f1,'Результаты\n');
% Выведем в столбик наши коэффициенты
fprintf(f1,'%f\n',c);
% И добавим отступ в одну пустую строку
fprintf(f1,'\n');
% И закроем файл
fclose(f1);
```

Если бы нам было нужно выводить искомые коэффициенты не в столбик, а в строчку через табуляции, например, для последующей работы в программе электронных таблиц, то выводить переменную *c* нужно было бы командой:

```
fprintf(f1,'%ft',c);
```

ну и не забывать переход на следующую строку:

```
fprintf(f1,'\n');
```

А вот никаких заглавий писать уже не нужно, если мы хотим получить на выходе таблицу.

Поскольку мы открыли файл в режиме записи в конец ('at+'), то при повторных вызовах программы имеющиеся в файле данные будут сохранены, а в конец файла будут добавляться новые строки. Знак «Плюс» в поле режима указывает на то, что если файл не существует, то он будет создан автоматически.

Также можно организовать чтение данных из файла, с помощью функции **fscanf**. Таким образом, можно сделать работу Octave максимально автоматизированной.

Помимо систем численной математики существуют ещё и системы символьной алгебры. Примером таких систем может служить система **Maxima**. Эта программа может быть использована для алгебраических преобразований и решения функций. Следует заметить, что данная программа может похвастаться «древнейшей» историей своего развития, ибо происходит от другого проекта, основанного ещё в 60-х годах двадцатого века (и по сути является продолжением того проекта). Как и Octave, Maxima представляет собой консольный интерпретатор команд. Есть, конечно, и графические оболочки (xmaxima, wxmaxima), но на мой субъективный взгляд, это уже излишества.

Предположим, на нужно продифференцировать приведённое выше уравнение температурной зависимости:

$$I_{lum} = e^{4.39777} * t^{-1.56971} * e^{(0.13001 * t)}$$

Дифференцирование уравнений «нормальных» температурных зависимостей может быть полезно, например, для сопоставления их с дифференциальными графиками температурных зависимостей хемилюминесценции биологических объектов, на которых имеются пики (см. главу («Температурные зависимости хемилюминесценции», раздел «Экстремумы на температурных кривых»).

Для этого в консоли запустим интерпретатор команд `maxima`, и введём команду:

```
diff(exp(7.64391) * t^(-2.90725) * exp(0.17668 * t),t);
```

Maxima выдаст ответ:

```
(%o1)      0.17668 t      0.17668 t
      368.8886761034637 %e      6070.022660186749 %e
      -----      -----
      2.90725      3.90725
      t      t
```

Обратите внимание, в каком формате Maxima выводит ответ. Фактически, несмотря на текстовый консольный режим, это представление алгебраического выражения в привычном человеку виде. Обозначение «(%o1)» в начале строки обозначает ответ на первое задание (которое мы задали).

Это будет означать:

$$I'_{lum} = \frac{368,8886761034637 * e^{(0.17668 * t)}}{t^{2,90725}} - \frac{6070,022660186749 * e^{(0.17668 * t)}}{t^{3,90725}}$$

Аналогичным способом можно проводить и другие виды алгебраических преобразований и вычислений.

Ну а для конечного представления результатов работы в виде текста для печати (статьи, монографии и т. п.) хорошо подходит редактор LibreOffice Writer. С точки зрения публикации каких либо научных трудов он имеет весомые преимущества перед коммерческим редактором MS Word, хотя бы потому, что имеет встроенный толковый редактор формул. Этот текст набирался именно в LibreOffice Writer.

Список рекомендуемой литературы

По тематике спонтанной биохемилюминесценции

Журавлёв Александр Иванович — **Квантовая биофизика животных и человека.**

Москва 2009г. (на данный момент, наиболее актуальный материал по тематике БХЛ, подробно описаны биологические механизмы, вызывающие ССС, а также применение хемилюминесцентных методов в биологии, химии, медицине. Основной упор сделан именно на спонтанную биохемилюминесценцию, как на один из главных методов исследования свободнорадикальных процессов в биологии.)

По тематике сонолюминесценции

А.И. Журавлёв, В.Б. Акопян, В.С. Вербанов — **Ультразвуковое свечение.** Москва 2005г.

(в книге подробно описаны теоретические аспекты сонолюминесценции как в области теоретической физики, так и применительно к биологическим системам, описаны закономерности сонолюминесценции при низких интенсивностях, а также применение в биологии и медицине.)

По тематике наведённой, индуцированной люминесценции

Ю.А. Владимиров, М.П. Шерстнев — **Хемилюминесценция клеток животных.**

Серия «Итоги науки и техники. Биофизика» Том 24, Москва 1989г. (книга написана с позиций типичного биолога, клинициста. Значительная часть книги посвящена клиническим приложениям хемилюминесценции, как правило, наведённую зондами, вроде люминола).

По тематике хемилюминесцентного анализа

А.К. Бабко, Л.И. Дубовенко, Н.М. Луковская — **Хемилюминесцентный анализ.**

Киев 1966г. (книжка, конечно, уже старовата, издавалась в 60-е годы, в ней Вы, разумеется, не найдёте ни слова ни о каком люциферин-люциферазном анализе на АТФ, и уж тем более ни о каком иммуно-хемилюминесцентном анализе тут не может быть и речи, но зато Вы узнаете о способах определения меди, кобальта, осмия, марганца, ванадия, циркония, озона, феррицианида, перекиси водорода, гипохлорита, свободного хлора и других веществ, с помощью таких нехитрых индикаторов как люминол или люцигенин.)

По тематике компьютерной обработки результатов эксперимента

Дмитрий Мажарцев — **Краткое руководство по табличному процессору LibreOffice**

Calc. (небольшая книга, даёт базовые навыки с программой электронных таблиц LibreOffice Calc — достойной свободной альтернативе коммерческому продукту MS Excel. Для знакомства с остальными программами из пакета LibreOffice можно воспользоваться книгой **Краткое руководство по LibreOffice** того же автора)

Власов — **OpenOffice Calc - практические занятия.** (хотя книга и рассчитана на «технарей»,

она весьма примечательна тем, что в ней используется подход с точки зрения научного сотрудника, а не с точки зрения офисного клерка, которому нужно вовремя сдать отчёт)

Е. Р. Алексеев, О. В. Чеснокова — **Введение в Octave для инженеров и математиков.**

Москва, издательство «ALT Linux», 2012г. (в книге описаны основные приёмы и методы работы с системой Octave, даны различные примеры использования в различных областях прикладной алгебры).

Стахин Н.А. — **Основы работы с системой аналитических (символьных)**

вычислений Maxima. Москва 2008 (в книге подробно описывается система компьютерной символьной алгебры «Maxima»)