

## СИСТЕМЫ АВТОМАТИЗАЦИИ ЭКСПЕРИМЕНТА

УДК 535.853.23 : 578.08

Л. А. АВРАМОВ, В. Н. ВЕРХОТУРОВ, В. В. ГОРОХОВ, А. И. КОМАРОВ,  
Б. Н. КОРВАТОВСКИЙ, А. А. ЛАЗАРЕВ, В. З. ПАЩЕНКО,  
А. Я. ПИКУЛЕНКО, А. Б. РУБИН

(Москва)

### АВТОМАТИЗИРОВАННЫЙ АБСОРБЦИОННЫЙ СПЕКТРОМЕТР ДЛЯ КИНЕТИЧЕСКИХ И СПЕКТРАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ В ПИКОСЕКУНДНОМ ВРЕМЕННОМ ДИАПАЗОНЕ

**Введение.** Метод пикосекундной спектроскопии процессов возникновения и исчезновения фотоиндуцированных изменений поглощения в среде позволил существенно углубить возможности прямых экспериментальных исследований быстротекающих процессов в фотобиологии. В частности, этот метод сыграл важную роль в изучении механизмов разделения и стабилизации электрических зарядов в фотосинтетических структурах (реакционных центрах) [1, 2], в которых за времена  $10^{-12}$  с под действием кванта света генерируется электрический потенциал (1,2—1,4) В. Дальнейшее развитие исследований фундаментальной биофизической проблемы молекулярных механизмов первичных стадий фотосинтеза на современном этапе ставит задачи существенного расширения экспериментальных возможностей методов абсорбционной пикосекундной спектроскопии в первую очередь в направлении повышения чувствительности и точности измерений, обеспечения регистрации кинетических параметров переходных процессов в широком спектральном диапазоне, внедрения математических методов анализа полученной информации.

К основным особенностям импульсных лазерных абсорбционных спектрометров пикосекундного диапазона следует отнести: а) высокую сложность управления работой большого числа модулей, входящих в состав прибора; б) необходимость контроля и отбора флуктуирующих по энергии, длительности и пространственной форме возбуждающих и зондирующих импульсов света; в) сложную зависимость между регистрируемой в эксперименте информацией и интересующими исследователя параметрами. Поэтому эффективное применение такой аппаратуры для исследования фотобиологических и фотохимических реакций требует решения задач оперативного, простого и гибкого управления установкой, предварительного отбора световых и электрических сигналов с заранее заданными характеристиками накопления, статистической обработки, восстановления и последующего математического анализа информации с целью получения достоверных количественных данных, характеризующих исследуемый процесс.

Очевидно, что комплексное решение этих вопросов возможно только в автоматизированных системах, включающих в свой состав средства автоматизации, вычислительной техники и аппаратуры импульсной спектроскопии.

Данная работа посвящена описанию пикосекундного абсорбционного спектрометра, автоматизированного с помощью ЭВМ «Электроника 60» и средств сопряжения в стандарте КАМАК.

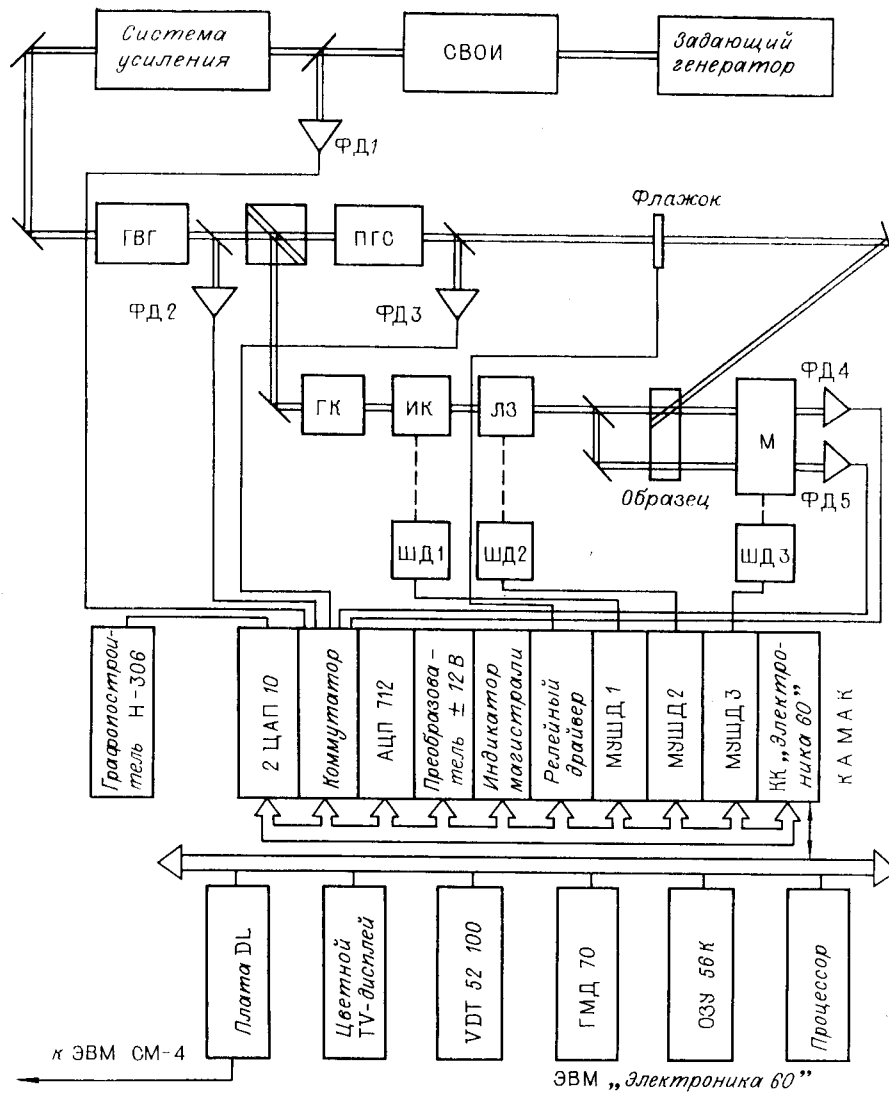


Рис. 1. Блок-схема автоматизированного абсорбционного спектрометра:  
 ФД1 — 5 — фотодиоды; ГВГ — генератор второй гармоники; ПГС — параметрический генератор света; ГК — генератор континуума; ИК — интерференционный клин; ЛЗ — линия задержки; ШД1 — 3 — шаговые двигатели; М — монохроматор; СВОИ — система выделения одиночного импульса

Основные параметры спектрометра: спектральный диапазон возбуждающего излучения 400—1600 нм, диапазон зондирования 500—900 нм, точность измерения вариаций оптической плотности  $10^{-3}$  ед. опт. плотности, временное разрешение 3 пс.

**Технические средства системы.** Функциональная схема установки приведена на рис. 1. Основные узлы спектрометра: генератор пикосекундных импульсов, усилительные каскады, преобразователи частоты света в каналах возбуждения и зондирования, регистрирующие датчики, комплекс автоматизированного управления и обработки экспериментальных данных.

Задающий источник импульсов света пикосекундной длительности — лазер на алюмоиттриевом гранате, резонатор которого длиной 1,3 м образован диэлектрическими зеркалами с коэффициентом отражения 99,8 и 10%. В контакте с «глухим» зеркалом находилась клиновидная кювета с раствором полиметинового красителя 3955 в изобутиловом спирте. Толщина кюветы 0,1 мм, раствор красителя прокачивался насосом перистальтического типа со скоростью 8 см/с. В качестве активного эле-

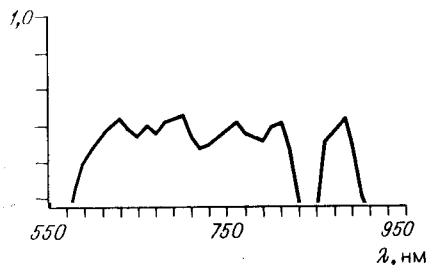


Рис. 2. Спектр излучения континуума, используемого для зондирования изменений поглощения в образце.

По оси ординат отложен логарифм интенсивности континуума

охлаждения лазерной головки позволяли работать с частотой вспышек до 5 Гц. Выходное излучение лазера представляло собой последовательность из 8—10 импульсов света длительностью 25—30 нс и суммарной энергией 20 мДж.

Выделение одиночного импульса производилось во внешнерезонаторной схеме с помощью модулятора МЛ-102, фотоэлемента ФЭК-19 и схемы формирования импульса, управляющего модулятором МЛ-102. Для усилителя на алюмоиттриевом гранате с активными элементами  $6 \times 90$  и  $8 \times 100$  мм, один из которых скошен под углом  $87^\circ$  к оси, усиливают одиночный импульс света до энергии 15 мДж. Для подавления крупномасштабных нелинейных aberrаций и мелкомасштабной фокусировки пикосекундных импульсов в усилителях перед каждым каскадом помещалась пара софокусных линз — ретрансляторов. Это позволяло существенно улучшить структуру импульсов и получить коэффициент преобразования основного излучения во вторую гармонику 30 %.

С помощью поляризатора Арчарда — Тейлора излучение разделялось на два канала: зондирующий с длиной волны 1064 нм и излучением, поляризованным перпендикулярно плоскости рис. 1, и возбуждающий с длиной волны 532 нм и поляризацией в плоскости рисунка.

При измерении наведенного поглощения исследуемого образца необходима перестройка длины волны зондирующего импульса в широком спектральном диапазоне. В описываемом спектрометре сплошной спектр зондирующего излучения получается генерацией континуума при фокусировке основного излучения линзой с фокусным расстоянием 20 см в кювету длиной 10 см с тяжелой водой. Энергия континуума в области 400—900 нм равна 40 мкДж. Спектр излучения континуума приведен на рис. 2, гистограммы импульсов опорного сигнала канала зондирования ( $\lambda_{\text{зон}} = 870$  нм) и возбуждающего сигнала — на рис. 3, а, б соответственно. В зондирующем канале расположены устройство для выделения определенной части спектрального диапазона пикосекундного континуума (интерференционный клин), монохроматор, линия оптической задержки и шаговый двигатель. Оптическая линия задержки позволяла регистрировать кинетику изменения оптической плотности образца во временном интервале 0—12 нс с минимальным шагом 1 пс. В канале возбуждения для перестройки длины волны возбуждающего импульса использовался перестраиваемый параметрический генератор света (ППГС). Применена наиболее распространенная схема [3, 4] с последующим удвоением частоты пикосекундного импульса. В ППГС использовались два кристалла дигидрофосфата калия (ДКДР) длиной 4 см, разнесенные на расстояние 40 см. Излучение накачки подфокусировалось цилиндрической линзой с фокусным расстоянием 70 см. В результате ППГС позволял осуществить перестройку длины волны возбуждающего излучения в диапазоне 800—1600 нм. Для расширения спектрального диапазона частота излучения ППГС удваивалась с помощью кристалла

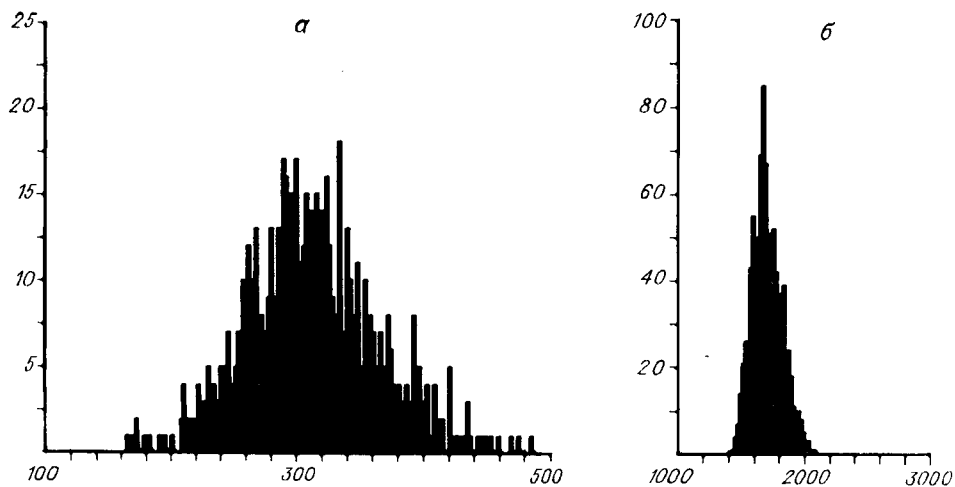


Рис. 3. Гистограммы энергии зондирующего (а) и возбуждающего (б) импульсов света.

По оси абсцисс отложена энергия импульсов в показаниях АЦП, по оси ординат — число импульсов, попавших в определенный энергетический интервал

иодата лития длиной 3 см. Таким образом, реальный диапазон перестройки длины волны возбуждающего света составлял 400—1600 нм.

Гистограмма импульсов возбуждающего света ( $\lambda_{\text{воз}} = 650$  нм) приведена на рис. 3, б. Видно, что распределение импульсов возбуждающего и зондирующего излучений по энергии удовлетворительно описывается функцией Гаусса. Для селекции импульсов в каналах возбуждения и зондирования по энергии с учетом гистограмм давались границы автоматической выборки («ворота»), позволявшие отбирать в эксперименте только те импульсы возбуждающего и зондирующего света, энергия которых отличалась от средней в пределах определенной наперед заданной величины.

В основе метода абсорбционной спектроскопии лежит сравнение интенсивности пробного импульса, прошедшего через невозмущенную область образца и импульса сравнения, прошедшего через образец в месте облучения возбуждающим светом. Для получения пробного импульса и импульса сравнения зондирующий луч диаметром 0,7 мм делился светоделительным зеркалом на два, один из которых пересекал в образце толщиной 1 мм область действия возбуждающего лучка диаметром 2 мм (угол между лучами  $5^\circ$ ). В качестве приемников излучения использовались фотодиоды ФД-24К, ФД-21К и ФД-7Г. Развертка монохроматора МДР-4, стоявшего между образцом и приемником излучения, осуществлялась также с помощью шагового двигателя. При этом с помощью метода абсорбционной спектроскопии возможно изучение только достаточно слабо флуоресцирующих в заданной области объектов. Интенсивность флуоресценции, падающая на фотодиод, должна быть значительно меньше интенсивности пробного импульса или импульса сравнения. Это условие выполняется для большинства биологических объектов.

Часть системы, обеспечивающая управление установкой, сбор, математический анализ, оперативное отображение и документирование данных, собрана по типовой структуре [5] на основе микроЭВМ «Электроника 60» и средств сопряжения в стандарте КАМАК. Штатный комплекс ЭВМ с расширенной до 56 Кбайт оперативной памятью дополнялся накопителем на гибких магнитных дисках PLX-45, который был подключен по каналу ЭВМ с помощью специального контроллера. Через канал ЭВМ подключались также алфавитно-цифровой дисплей VDT-52100 и цветной графический дисплей (на базе бытового телевизионного приемника «Электроника Ц-401»). В качестве графопостроителя использо-

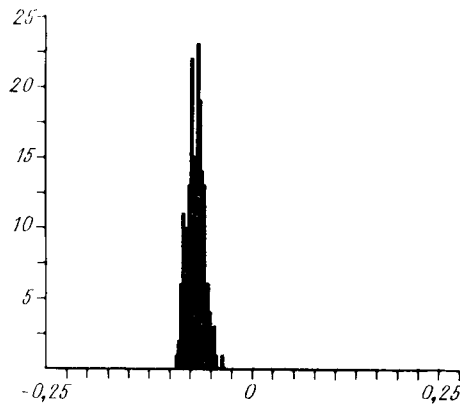


Рис. 4. Типичная гистограмма изменений оптической плотности образца, полученная в результате 200 измерений при задержке во времени прихода зондирующего импульса относительно возбуждающего 100 пс.

Среднее значение изменения оптической плотности для данного случая — 0,0626 ед., стандартное отклонение 0,015 ед. По оси абсцисс отложено изменение оптической плотности

вался двухкоординатный самописец Н306 (через модуль КАМАК 2ЦАП10). Прием и преобразование информации с фотодатчиков ФД1—ФД5, которые представляли собой пару фотодиод — операционный усилитель, осуществлялись посредством модулей «Коммутатор» и АЦП-14, управление устройством выбора необходимого спектрального интервала света и оптической линией задержки в зондирующем канале обеспечивалось модулями МУШД1—МУШД3, включение и выключение флажка в канале возбуждения производилось с помощью «релейного драйвера». С крейтом КАМАК ЭВМ соединялась через крейт-контроллер (КК) «Электроника 60».

**Программные средства системы.** Программное обеспечение установки разработано в рамках операционной системы РАФОС, в качестве языков программирования использовались Фортран и Макроассемблер. В основу программного обеспечения положен модульный принцип. Организующая программа, работающая в диалоговом режиме, имеет таблицу режимов работы. Для конкретного режима работы организующая программа обращается к соответствующим программным модулям, по окончании их работы управление снова передается организующей программе.

Процесс регистрации экспериментальных данных начинается с диалога экспериментатора с управляющей ЭВМ. Экспериментатор задает ЭВМ начальные положения линии задержки зондирующего импульса относительно возбуждающего, длину волны монохроматора и обуславливает режим работы установки: определение кинетики изменения оптической плотности при заданной длине волны или снятие спектра наведенного поглощения при заданной величине задержки. При этом в случае измерения спектра задается приращение шагового двигателя, управляющего монохроматором при переходе к следующей длине волны, а при измерении кинетики — приращение шагового двигателя, управляющего линией задержки. Задается также область изменения соответствующих величин — по горизонтальной оси шкала времени в пикосекундах при измерении кинетики или длины волны при регистрации спектра. Кроме того, задается экспериментальная точность, с которой необходимо измерять вариацию оптической плотности в ходе эксперимента.

Исследование гистограмм распределения измеряемой оптической плотности, полученных при различных величинах задержки, длинах волн, оптических плотностях, показывает, что оно является гауссовым со стандартным отклонением  $S = 0,015$  ед. оп. плотности (рис. 4). Отсюда следует, что распределение измеряемого среднего значения оптической плотности при  $N$  накоплениях тоже является гауссовым со стандартным отклонением  $SM = S/\sqrt{N}$ . Число накоплений определяется ЭВМ так, чтобы стандартное отклонение измеряемого результата от среднего с вероятностью 68 % не превышало заданную точность определения оптической плотности [6]. На рис. 5 представлена блок-схема части про-

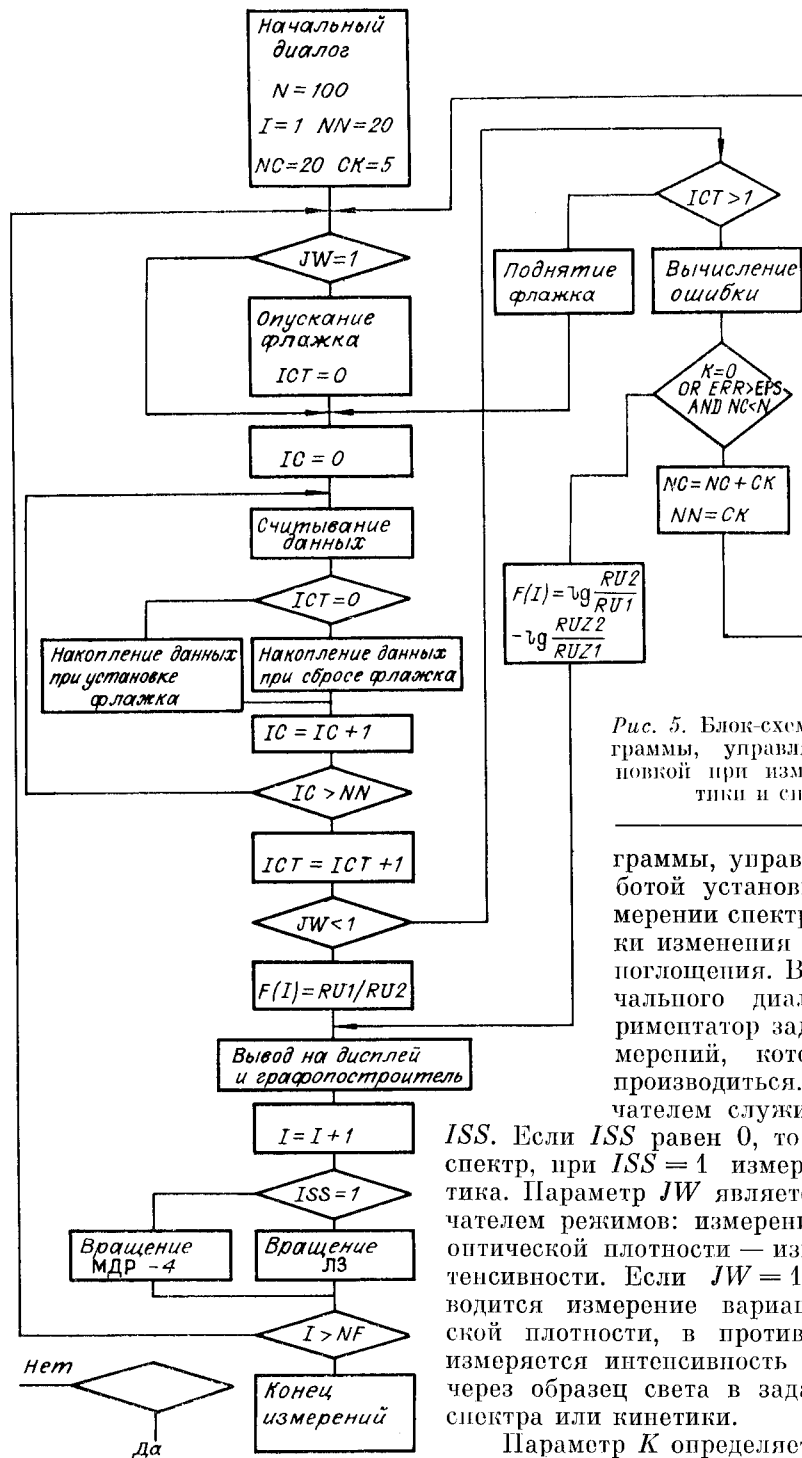


Рис. 5. Блок-схема части программы, управляющей установкой при измерении кинетики и спектров

граммы, управляющей работой установки при измерении спектра и кинетики изменения оптического поглощения. Во время начального диалога экспериментатор задает тип измерений, который будет производиться. Переключателем служит параметр *ISS*. Если *ISS* равен 0, то измеряется спектр, при *ISS* = 1 измеряется кинетика. Параметр *JW* является переключателем режимов: измерение вариации оптической плотности — измерение интенсивности. Если *JW* = 1, то производится измерение вариации оптической плотности, в противном случае измеряется интенсивность прошедшего через образец света в заданной точке спектра или кинетики.

Параметр *K* определяет режим накоплений. Если он равен 0, то производится измерение заданного числа лазерных импульсов.

При регистрации экспериментальных данных для каждой точки производится необходимое число накоплений лазерных импульсов сначала при опущенном флажке, который не позволяет возбуждению попадать на образец, затем такое же число накоплений при поднятом флажке. При этом, когда измерения производятся до достижения заданной точности, осуществляется начальное накопление 20 импульсов. Это

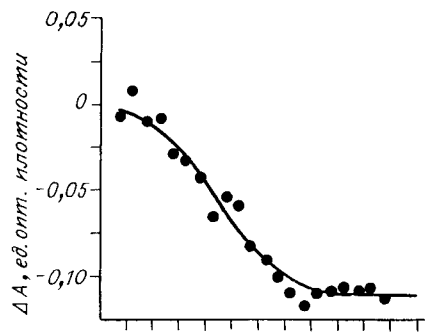


Рис. 6. Кинетика изменения оптической плотности поглощения бактериородопсина

После достижения заданной точности вычисляется измерение оптической плотности по формуле

$$\Delta A = \lg \left( \frac{U_1^* U_2}{U_1 U_2^*} \right),$$

где  $U_1, U_2, U_1^*, U_2^*$  — средние показания фотодиодов измеряющего и опорного сигналов за цикл накоплений при поднятом ( $U_1, U_2$ ) и опущенном ( $U_1^*, U_2^*$ ) флажке соответственно.

После измерения очередной экспериментальной точки дается команда соответствующему шаговому двигателю и происходит переход либо к следующей величине временной задержки (при регистрации кинетики), либо к следующей длине волны (при регистрации спектра). Очередная экспериментальная точка выводится на графический дисплей. Экспериментальные данные запоминаются в памяти ЭВМ, и после измерения они могут быть записаны на гибкий магнитный диск, а также выведены на графопостроитель. Записанные на диске данные затем считываются, они также могут передаваться по линии связи через плату *DL* на ЭВМ *СМ-4* для дальнейшей обработки. Пакет программ по обработке экспериментальных данных включает следующие операции: цифровую фильтрацию (сглаживание) экспериментальных данных, численное интегрирование и дифференцирование, разложение спектров на сумму гауссовых компонентов, апализ и приближение кинетик переходных процессов с учетом аппаратной функции по нелинейному методу наименьших квадратов [7] с использованием алгоритма быстрого преобразования Фурье (БПФ).

Для демонстрации экспериментальных возможностей на рис. 6 приведена кинетика изменения поглощения бактериородопсина при возбуждении образца импульсами света с  $\lambda = 532$  нм и зондировании в точке спектра  $\lambda = 652$  нм. Исходная плотность образца на длине волны возбуждения составляла 0,7 ед. опт. пл., на длине волны зондирования — 0,5 ед. опт. пл. Нулевой момент времени соответствует нулевой задержке максимума зондирующего импульса относительно максимума возбуждающего. Кривая на рис. 6 снята при числе накоплений  $N = 25$ , что обеспечивает точность определения изменения оптической плотности 0,7 % и точность построения кинетики 3 пс. Аппроксимация экспериментальной кинетики получена теоретической кривой  $A(1 - \exp(-t/\tau))$ , свернутой с аппаратной функцией. Аппаратная функция регистрирующей системы аппроксимировалась гауссовой функцией с полушириной 30 пс. Обработка экспериментальной кривой на рисунке дала следующие результаты:  $A = -0,112 \pm 0,007$ ,  $\tau = 5,1 \pm 1,5$  пс.

Авторы выражают глубокую признательность д-ру физ.-мат. наук А. П. Пискаркасу и сотрудникам руководимой им кафедры квантовой радиофизики и астрономии Вильнюсского государственного университета за консультацию на этапе проектирования автоматизированного лазерного абсорбционного спектрометра.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Dutton P. L., Prince R. C., Tiede D. M. e. a. Electron transfer in the photosynthetic reaction center // Brookhaven Symposia in Biology.— 1976.— V. 28.— P. 213.
2. Netzel T. L. Electron transfer reactions in reaction centers of photosynthetic bacteria and in reaction center models // II Biological Events Probed by Ultrafast Laser Spectroscopy.— N. Y.; Paris: Academic Press, 1982.
3. Кабелка В., Кутка А., Пискаркас А. и др. Параметрическая генерация наносекундных импульсов света с преобразованием энергии света 50 % // Квантовая электрон.— 1979.— Т. 6, № 8.
4. Крюков П. Г., Матвеец Ю. А., Никогосян Д. И., Шарков А. В. Перестраиваемый по частоте двухканальный генератор ультракоротких импульсов света // Там же.— 1987.— Т. 5, № 11.
5. Верхотуров В. П. Многомашинная локальная система автоматизации биофизических исследований в СКП ЭВМ. Структура, технические средства и организация систем автоматизации биофизических исследований.— Л.: ЛИЯФ АН СССР, 1982.
6. Худсон Д. Статистика для физиков.— М.: Мир, 1967.
7. Ортега Дж., Рейнболдт В. Итерационные методы решения нелинейных систем уравнений со многими неизвестными.— М.: Мир, 1975.

*Поступила в редакцию 31 мая 1984 г.*

УДК 681.3 : 519.246.8

**Д. Н. ЗАБИЯКА, А. А. ПРЕДТЕЧЕНСКИЙ, А. И. ЧЕРНЫХ**

*(Новосибирск)*

#### **АНАЛИЗАТОР СПЕКТРА НА МИКРОЭВМ «ЭЛЕКТРОНИКА 60»**

**Введение.** Преобразование временных сигналов в частотную область — спектральный анализ — является мощным средством исследования самых разнообразных физических объектов: радиотехнических устройств, каналов связи, акустических и сейсмических волн, волн на воде, гидродинамической турбулентности, вибраций аппаратов и т. д.

В настоящее время в звуковом диапазоне частот (до 20—40 кГц) традиционные аналоговые методы спектрального анализа полностью уступили место цифровым методам, таким как рекурсивная цифровая фильтрация, и методам с использованием различных вариантов быстрого преобразования Фурье (БПФ). Эти методы совершенно незаменимы при спектральном анализе инфранизких частот и по точности анализа превосходят цифроаналоговый метод временной компрессии сигнала.

Регистрация спектра мощности не всегда является самоцелью: часто требуются дальнейшая, порой весьма сложная обработка и анализ полученных спектрограмм. Рекурсивная цифровая фильтрация эффективно реализуется только для логарифмической шкалы частот, что сильно затрудняет последующую обработку, особенно в случае многоканального анализа. Поэтому ниже ограничимся рассмотрением устройств, работающих на основе алгоритма БПФ. Можно выделить четыре подхода в реализации БПФ-анализа.

1. *Традиционный приборный подход.* В связи с многочисленностью параметров анализа соответствующие приборы — спектроанализаторы — становятся все более сложными в управлении и должны иметь большие специализированные панели с десятками разнообразных кнопок и ручек, часто функционирующих под управлением отдельного микропроцессора. Изделия рассматриваемого типа выпускаются многими изготовителями: