

## БИОСЕНСОРИ

## BIOSENSORS

---

---

УДК 621.382

### ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЕ БИОСЕНСОРНЫЕ КОМПЛЕКСЫ НА ОСНОВЕ УНИФИЦИРОВАННЫХ ИМПЕДАНСОМЕТРИЧЕСКИХ СИСТЕМ. ФИЗИКО-ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

*В. Г. Мельник<sup>1</sup>, А. Н. Шмырева<sup>2</sup>, Н. Ф. Стародуб<sup>3</sup>*

<sup>1</sup> Институт электродинамики НАНУ, проспект Победы, 56, Киев-57, 03680, Украина

<sup>2</sup> Национальный технический университет Украины “КПИ”,  
проспект Победы, 37, Киев, 03062, Украина

<sup>3</sup> Институт биохимии им. А. В. Палладина НАНУ, ул. Леонтовича, 9, Киев, 01030, Украина

#### Аннотация

#### ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЕ БИОСЕНСОРНЫЕ КОМПЛЕКСЫ НА ОСНОВЕ УНИФИЦИРОВАННЫХ ИМПЕДАНСОМЕТРИЧЕСКИХ СИСТЕМ. ФИЗИКО-ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

*В. Г. Мельник, А. Н. Шмырева, Н. Ф. Стародуб*

Рассмотрены основные принципы построения биосенсорных комплексов на основе унифицированных импедансометрических систем. Особое внимание уделено электронному измерительному каналу, предназначенному для регистрации биолюминесценции с помощью фоторезисторных сенсоров.

**Ключевые слова:** датчик, фоторезистор, биолюминесценция, импедансометрия, микропроцессор, аналого-цифровое преобразование.

#### Анотація

#### ЛЮМІНЕСЦЕНТНІ БІОСЕНСОРНІ КОМПЛЕКСИ НА ОСНОВІ УНІФІКОВАНИХ ІМПЕДАНСОМЕТРИЧНИХ СИСТЕМ. ФІЗИКО-ТЕХНІЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

*В. Г. Мельник, О. М. Шмирева, М. Ф. Стародуб*

Розглянуто основні принципи побудови біосенсорних комплексів на основі уніфікованих імпедансометричних систем. Особлива увага приділена електронному вимірювальному каналу, призначеному для реєстрації біолюмінесценції за допомогою фоторезисторних сенсорів.

**Ключові слова:** давач, фоторезистор, біолюмінесценція, імпедансометрія, мікропроцесор, аналогово-цифровий перетворювач.

## Summary

### LUMINESCENT BIOSENSOR COMPLEXES BASED ON UNIFORMED IMPEDANCE METRY SYSTEMS. PHYSICAL-TECHNICAL CHARACTERISTICS

*V. G. Melnyk, O. M. Shmyryeva, N. F. Starodub*

The main principles of the creation of biosensor complexes based on uniformed impedancemetry systems were discussed. A special attention was paid to electronic measurement channel intended for the registration of bioluminescence with the help of photo resistive sensors.

**Keywords:** sensor, photoresistor, bioluminescence, impedancemetry, microprozessor, analogue-digital converter

## Введение

При избирательном взаимодействии биоселективного элемента биосенсорной системы с анализируемым веществом возникает физический эффект (оптический, тепловой, электрохимический и т.д.), который воспринимается и преобразуется в электрический сигнал, регистрируемый электронными устройствами. Носителем информации о величине произведенного эффекта является связанный с ним энергетический процесс, который наиболее часто представлен как изменение напряженности электрического и магнитного полей или как электромагнитное излучение в виде квантов энергии.

Воздействие активного параметра электромагнитного процесса на многие вещества приводит к существенному изменению их характеристик, представляемых пассивными электрическими величинами, например, удельной электропроводностью и диэлектрической проницаемостью. Они, в свою очередь, определяют параметры электрического импеданса (комплексного сопротивления) изделий, изготовленных из конкретного материала. К таким параметрам относятся активное сопротивление и обратная ему величина — электропроводность, а также реактивное сопротивление (электропроводность), представляемое емкостью или индуктивностью. Преобразование активной энергетической величины (как электромагнитной, так и другой природы) в пассивный электрический параметр лежит в основе принципа действия импедансных измерительных преобразователей (датчиков, сенсоров). Регистрацию многих видов физических эффектов удобно осуществлять с помощью именно таких устройств. Выходные сигналы датчиков в виде параметров электрического

импеданса могут быть измерены с очень высокой точностью с помощью унифицированных аппаратно-программных комплексов.

В ряде случаев физический эффект в объекте исследования приводит (посредством энергетического процесса) к изменению некоторых пассивных физических параметров объекта, включая удельную электропроводность, диэлектрическую проницаемость, геометрические размеры структурных неоднородностей (например, образование осадка, пленки и т. п.). Пассивные параметры часто могут быть преобразованы в активные электрические параметры с помощью воздействия тестового сигнала. В этих случаях измеритель величины импеданса может быть подключен непосредственно к объекту исследования с помощью электродов, выполняющих функции сенсора. Примером подобных измерений является кондуктометрия.

В результате многолетних исследований, выполненных в Институте электродинамики НАН Украины, разработаны эффективные импедансометрические средства, которые основаны на применении измерительных мостов переменного тока. Такие средства обладают очень высокой чувствительностью и простотой сопряжения, как со многими видами электронных датчиков, так и с компьютерными информационными системами [1-5]. В последнее время эти измерительные средства находят применение при создании биосенсоров разных типов и различного назначения [6-9].

Важнейшим достоинством импедансометрических информационно-измерительных систем (ИИС) является универсальность их возможностей, позволяющая реализовывать разнообразные способы измерений, в частности, применять дифференциальные методы для компенсации внешних воздействий на систе-

му и повышения точности измерений [9-12]. В то же время им присуща высокая степень унификации электронных (аппаратных и программных) средств, использование недорогих компонентов, а также стандартных технологий при изготовлении аппаратуры. Следствием этого является их невысокая стоимость, возможность серийного тиражирования. Обеспечиваются портативность оборудования и простота его эксплуатации, меньшая трудоемкость выполнения исследований по сравнению с общеизвестными методами биохимического анализа. Наличие надежного метрологического обеспечения для таких методов измерений гарантирует воспроизводимость характеристик создаваемых приборов.

В состав импедансометрического биосенсорного комплекса входит несколько блоков. Это, прежде всего, измерительная ячейка (биоэлектронный датчик), в состав которой входит биоселективный элемент, преобразующий физико-химические изменения биологического материала в сигнал электромагнитной природы. С биоселективным элементом интегрирован электронный чувствительный элемент (датчик), преобразующий этот сигнал в параметры электрического импеданса, представляемые активной и реактивной электропроводностью. Выходные параметры измерительной ячейки преобразуются электронным измерительным модулем (вторичным преобразователем) на основе уравновешиваемого моста переменного тока в электрическое напряжение и затем в цифровые коды. Микропроцессорный контроллер и/или персональный компьютер осуществляет обработку и регистрацию полученной информации.

Ниже будут изложены основные принципы построения электронного измерительного канала, предназначенного для регистрации биолюминесценции с помощью фоторезисторных сенсоров.

Основная задача при реализации биолюминесцентных сенсорных систем, пригодных для широкого практического применения, заключается в создании высокочувствительного люминометрического комплекса с небольшими размерами и массой, с автономным питанием при малом энергопотреблении, простого по конструкции и технологии изготовления. Важными требованиями являются также невысокая стоимость и простота эксплуатации приборов.

Оптимальный выбор типов фотоэлектронного и вторичного измерительного преобразователей является определяющим для успешной разработки.

В прецизионной фотометрии до настоящего времени применяются в основном фотоэлектронные умножители (ФЭУ) [13,14]. Однако их использование приводит к увеличению энергопотребления, стоимости и усложнению прибора. Существует довольно много видов полупроводниковых фоточувствительных сенсоров (фотодиоды, фототранзисторы, ПЗС-матрицы, кремниевые фотоэлементы) [15-18], однако все они в силу разных причин не позволяют выполнить указанные выше требования практики.

В последнее время получены материалы с существенной зависимостью их удельной электрической проводимости от величины освещения с максимумом спектральной характеристики в сине-зеленой области, характерной для биолюминесценции.

На основе таких материалов реализованы [19] фоторезисторные преобразователи для биосенсорных систем, обладающие спектральной избирательностью и высокой чувствительностью. Последняя является, отчасти, следствием простоты получения фотоприемника с любой формой воспринимающей поверхности, в том числе сферической или цилиндрической, что позволяет в несколько раз повысить эффективность регистрации энергетического эффекта исследуемого процесса. Эти достоинства новых фоторезисторов, а также возможность высокоточного измерения электропроводности дифференциальным методом с помощью импедансометрических средств обуславливают перспективность применения таких преобразователей для реализации биолюминесцентных сенсорных систем.

### 1. Базовый блок измерительного модуля

Обобщенная структура унифицированного канала ИИС приведена на рис. 1. Рассмотрим ее построение и основные операции алгоритма работы. Физические и химические процессы, которые происходят в объекте контроля, или статическое состояние этого объекта отображаются активными или пассивными параметрами (Р). Они воздействуют на специфические, чувствительные к ним элементы (S) (сенсоры), которые преобразуют их в пассивную или

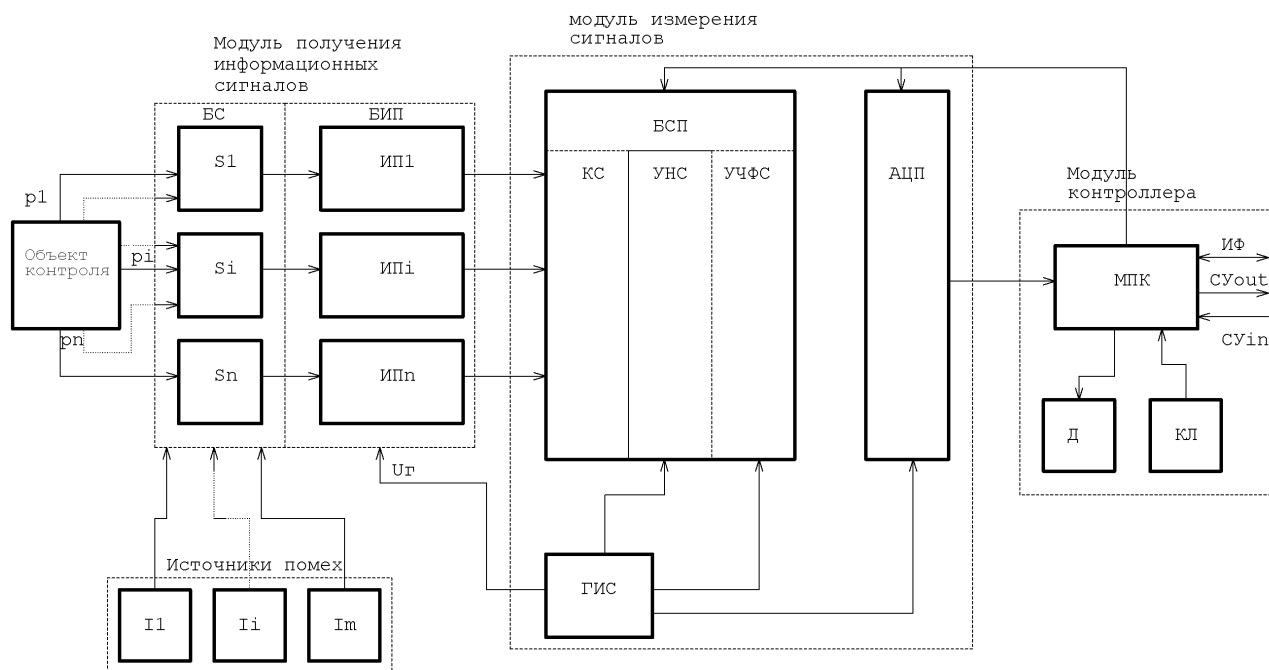


Рис. 1. Структура унифицированного канала ИИС.

активную электрическую величину (сопротивление, емкость, индуктивность, ток или напряжение). В общем случае на каждый сенсор воздействует информативный и неинформативные параметры контролируемого объекта. Последние влияют на результат преобразования информативного параметра, также как и разнообразные внешние помехи ( $I$ ). Выходной параметр сенсора далее превращается в унифицированный активный информационный сигнал в виде тока или напряжения с помощью вторичных измерительных преобразователей (ИП). В ряде случаев для работы сенсора и преобразователя необходима подача тестового сигнала ( $U_{\text{г}}$ ). Дальнейшие преобразования информационных сигналов состоят в их управляемой селекции и нормировании диапазонов изменения значений соответственно диапазону вариаций контролируемого параметра, а также в частотно-фазовой обработке, которая обеспечивает подавление влияния неинформативных параметров объекта и внешних помех. Эти операции осуществляются блоком селекции и подготовки сигнала (БСП), который состоит из узлов коммутации (КС), нормирования (УНС) и частотно-фазовой селекции (УЧФС). Пронормированные и отфильтрованные от помех информативные сигналы превращаются в цифровую форму с помощью аналого-цифрового преобразователя (АЦП), а затем передаются в

микропроцессорный контроллер для последующей цифровой обработки. Для создания тестового измерительного сигнала, необходимого для преобразования измеряемых пассивных параметров в активные электрические величины, в структуре устройства предусмотрен генератор измерительного сигнала (ГИС), который синхронизируется с тактовым генератором (АЦП).

Микропроцессорный контроллер осуществляет управление работой других блоков измерительного канала (по шине управления — ШУ), представляет результаты измерений на дисплее (Д), принимает логические сигналы управления от внешних устройств ( $СУ_{\text{in}}$ ) и от клавиатуры (Кл), выдает сигналы управления внешними устройствами ( $СУ_{\text{out}}$ ), а также обменивается информацией с персональным компьютером или контроллером верхнего уровня.

Вышеперечисленные функции аппаратуры измерительного канала можно разделить на такие группы: преобразование специфичных для каждого конкретного вида измерений сигналов; преобразование общих для многих видов измерений сигналов; аналого-цифровое преобразование сигналов; цифровая обработка результатов преобразований сигналов; управление блоками измерительного канала; ввод/вывод сигналов управления внешних устройств; обмен данными с аппаратно-программными средствами верхних уровней.

Соответственно этому делению в структуре измерительного канала могут быть выделены три больших модуля: один из них предназначен для получения информационных сигналов; второй — для их измерения и, наконец, третий — модуль контроллера.

Анализ возможных аппаратных и программных средств реализации рассмотренных выше функций показывает, что на основе использования компенсационных измерительных структур, способных работать как на постоянном, так и на переменном токе, обеспечивается унификация второго и третьего из упомянутых модулей, на которые приходится около 80% общей стоимости измерительного канала.

В то же время в модуле получения информационных сигналов сосредоточены преобразования, специфические для каждого конкретного вида измерений. Они зависят от характера измеряемых параметров, наличия перекрестных влияний этих параметров на сопредельные сенсоры, от характера внешних помех, диапазонов измеряемых величин и других факторов. Поэтому построение данного модуля всегда является индивидуальной задачей.

Следует отметить, что предложенное структурирование модулей измерительного тракта обеспечивает сравнительно простую калибровку и метрологическую аттестацию разрабатываемых средств измерения, что также очень существенно для их технико-экономической эффективности.

Изложенные выше подходы были использованы при разработке базового измерительного терминала ИИС, предназначенного для решения очень широкого круга задач. Функциональные возможности этого устройства делают его унифицированным средством для построения как многопараметрических сетевых измерительных систем, так и автономных приборов разнообразного назначения. Важнейшими преимуществами таких приборов является возможность подключения подавляющего большинства известных типов датчиков, а также нестандартных преобразователей, высокая помехоустойчивость и точность измерения, возможность выборочного подавления разных влияющих факторов.

В конце необходимо указать, что базовое программное обеспечение микроконтроллера, кроме упомянутых выше функций управления процессом измерения, дает возможность авто-

матически калибровать измерительный канал. Для этого предусмотрены служебные режимы, которые позволяют: 1) находить и фиксировать в памяти нули функций преобразования для всех датчиков; 2) устанавливать крутизну характеристики преобразования сигналов каждого датчика по образцовому значению измеряемого параметра; 3) осуществлять кусочно-линейную аппроксимацию нелинейных характеристик датчиков и корректировать соответствующие погрешности, а также 4) определять влияние изменений температуры на крутизну характеристики преобразования и корректировать возникающую при этом погрешность.

В прикладных разработках указанные базовые функции обработки результатов преобразования сигналов могут быть дополнены за счет специального программного обеспечения, при потребности инсталлированного в специальном служебном режиме.

## 2. Мостовой импедансометрический канал

Рассмотрим более детально структуру импедансометрического канала с измерительным преобразователем на основе моста переменного тока, которая представлена на рис. 2. Данное устройство позволяет определять значения пассивных комплексных электрических величин, являющихся выходными параметрами различных видов импедансных датчиков, либо пассивными параметрами исследуемых объектов. Такие параметры определяются удельной электропроводностью ( $\sigma$ ) и относительной диэлектрической проницаемостью ( $\epsilon$ ) материала сенсора или непосредственно вещества объекта контроля. Кроме основных контролируемых параметров, данное устройство позволяет определять значение еще одной физической величины другого характера, которое может влиять на измеренное значение основного параметра или необходимо для его оценки. Таким влияющим параметром часто является температура.

Измерительный мост состоит из датчика контролируемого параметра (ДКП), управляемого делителя напряжения (УДН), образцовой меры ( $Z_0$ ), схемы сравнения (СС) и канала определения сигнала неравновесия. Образцовая мера имеет такой же характер импеданса, как и чувствительный элемент датчика. Например, для определения  $\epsilon$  материала используется

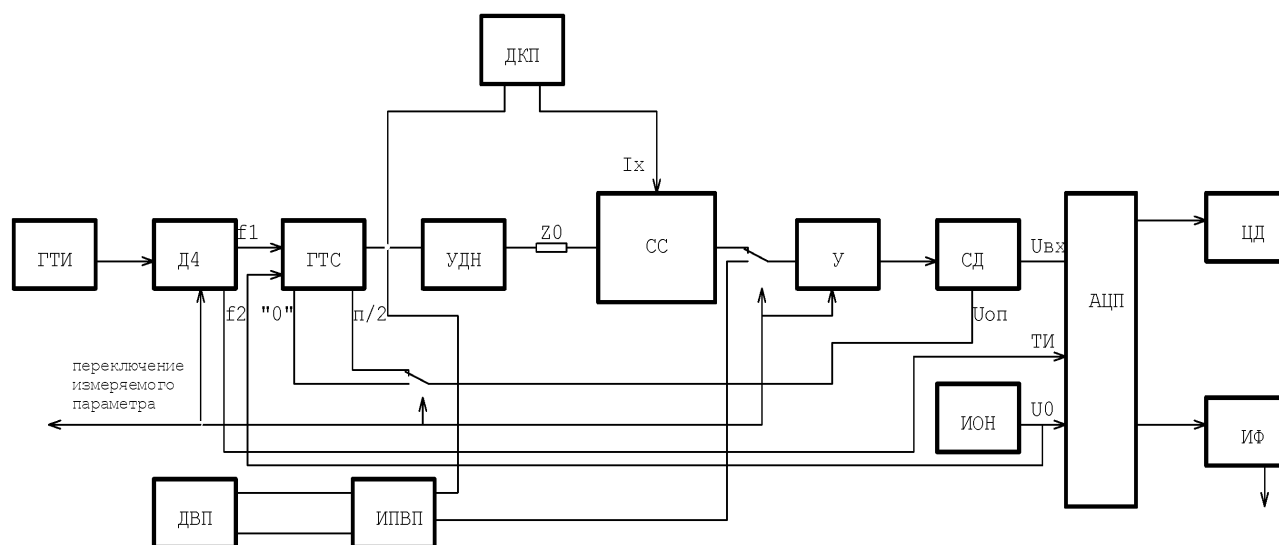


Рис. 2. Структура импедансометрического канала с измерительным преобразователем на основе моста переменного тока.

емкостный датчик и, соответственно, образцовый конденсатор, в качестве  $Z_0$ . Если измеряется электропроводность, образцовой мерой является резистор. Изменяя коэффициент передачи УДН, можно уравновесить ток ( $I_x$ ), протекающий через ДКП (или одну из его квадратурных составляющих) калиброванным током, протекающим через  $Z_0$ . Состояние равновесия определяется по нулевому сигналу на выходе СС. Коэффициент передачи УДН при достижении баланса моста соответствует соотношению модуля проводимости  $Z_0$  и однородной с ней составляющей проводимости ДКП. Если последняя является информативным выходным параметром датчика, который связан со значением воздействующей на него измеряемой физической величины, то равновесный коэффициент передачи отражает абсолютное значение этой физической величины. Если уравнивание производится при отсутствии воздействия на датчик, то равновесный коэффициент передачи УДН соответствует нулевой точке характеристики преобразования ДКП. При появлении такого воздействия изменяется ток  $I_x$  и, соответственно, появляется сигнал неравновесия на выходе СС. Выходной сигнал СС может быть использован для доуравнивания моста за счет изменения коэффициента передачи УДН. Это изменение функционально связано с измеряемой физической величиной и может использоваться для определения последней. Если изменение  $I_x$  относительно невелико, что часто бывает на практике, то для

обеспечения достаточной дискретности уравнивания УДН должен иметь очень высокую дискретность регулирования. Такой узел является весьма сложным и дорогим, поэтому во многих случаях целесообразнее определять искомую величину методом прямого преобразования выходного сигнала СС в канале обработки сигнала неравновесия.

Как уже указывалось, импедансометрические средства позволяют определить активный и реактивный параметры выходного сигнала датчика. Во многих случаях, (в частности, при использовании высокочувствительных высокоомных фоторезисторов) эти параметры соизмеримы. Для того, чтобы измерить малые приращения информативного параметра, в данном случае необходимо уравновесить также и неинформативный (квадратурный) параметр. Для этого мостовая цепь должна содержать два УДН и, соответственно, две образцовые меры: резистор  $R_0$  и конденсатор  $C_0$ .

Если измерение осуществляется дифференциальным методом, то вместо  $Z_0$  может быть включен референсный сенсор дифференциальной пары. При регистрации светового потока рабочий сенсор пары используется как ДКП, а затемненный — как  $Z_0$ . В этом случае, при идентичности обоих сенсоров, мост может быть предварительно уравнивается по модулю комплексного сопротивления одним УДН, а информативное приращение активной составляющей электропроводности рабочего сенсора при биохимической реакции может определяться мето-

дом прямого преобразования с использованием канала определения сигнала неравновесия. Достоинством такого способа измерения является упрощение аппаратуры и минимизация влияния на результат измерения дестабилизирующих факторов. Остановимся подробнее на работе схемы, представленной на рис. 2.

Питание моста осуществляется генератором тестового сигнала, который формирует квазисинусоидальное напряжение ( $U_{г}$ ) с необходимой рабочей частотой  $\omega$  и связанные с ним опорные напряжения ( $U_{оп}$ ), необходимые для работы синхронного детектора (СД) в канале определения сигнала неравновесия. Одно из этих напряжений совпадает по фазе с  $U_{г}$ , а другое — квадратурное последнему. Амплитуда  $U_{г}$  задается источником образцового напряжения (ИОН), которое является также опорным для АЦП прибора. Благодаря этому обеспечивается инвариантность результатов измерений к нестабильности напряжений питания. Задание рабочей частоты ГТС, а также тактовой частоты АЦП осуществляется от одной последовательности тактовых импульсов, которые формируются генератором тактовых импульсов (ГТИ). Из этой последовательности управляемым делителем частоты (ДЧ) получают частоты  $f_1$  и  $f_2$ , которые тактируют работу соответственно ГТС и АЦП. Частоты  $f_1$  и  $f_2$  зависят от режима измерения, типов используемых датчиков ДКП и ДВП (ДВП — датчик параметра, который влияет на результат измерения), а также от необходимых параметров режима работы АЦП.

Так, при использовании интегрирующих АЦП частота  $f_2$  составляет десятки кГц. Частота  $f_1$  составляет  $nf$ , где  $f = \omega/2\pi$ , а  $n$  является числом ступеней аппроксимации квазисинусоидального сигнала. При измерении параметров фоторезисторов  $f$  составляет величину порядка 10 Гц (см. ниже), а  $n$ , соответственно, до нескольких десятков. При измерении влияющего параметра (температуры) термометром сопротивления  $f$  должна иметь значения порядка 100 — 200 Гц, а  $f_1$  — несколько килогерц. Управление частотами  $f_1$  и  $f_2$  осуществляется переключателем измеряемого параметра.

Канал определения сигнала неравновесия моста состоит из усилителя (У), синхронного детектора (СД) и АЦП. Усиленный сигнал с выхода СС подается на СД, где из него выделяется напряжение информативной составля-

ющей. Это напряжение превращается в цифровую форму с помощью АЦП и отображается на цифровом дисплее (ЦД). Кроме того, формируется кодовый сигнал, который через интерфейсный узел (ИФ) может передаваться для обработки в микропроцессорный контроллер прибора.

Как уже указывалось, унифицированная мостовая цепь устройства может работать в разных режимах в зависимости от параметра, который измеряется, в частности с предварительным уравниванием моста и определением приращения измеряемого параметра методом прямого преобразования. Если исходная характеристика ДКП имеет нуль, совпадающий с нулем измеряемой величины, то УДН устанавливается на нулевой коэффициент передачи, а СС работает в режиме преобразования выходного тока ( $I_x$ ) ДКП в напряжение, которое дальше измеряется каналом определения сигнала неравновесия. Если нуль измеряемой величины не совпадает с нулем выходного сигнала ДКП, то с помощью УДН устанавливается нулевое значение напряжения на выходе СС при нулевом значении измеряемого параметра. При изменении этого параметра прибором измеряется приращение выходного напряжения СС. Для определения исследуемых величин через дополнительный (миноритарный) параметр импеданса датчика мост уравнивают с помощью УДН по основному параметру ДКП до получения нулевого значения соответствующей составляющей выходного напряжения СС. Потом, изменением фазы  $U_{оп}$ , получают на выходе СД информативную составляющую сигнала ДКП, которую и превращают в цифровой код.

Для получения прямого отсчета измеряемых параметров необходимо нормировать выходной сигнал моста в канале определения сигнала неравновесия. Для этого предусмотрено регулирование коэффициента усиления усилителя (У) при переключении измеряемого параметра.

Кроме указанных блоков в состав прибора входят измерительный преобразователь влияющего параметра (ИПВП) с датчиком этого параметра ДВП. Как правило, этот канал также построен по мостовой схеме. Переключателем измеряемого параметра вход канала определения сигнала неравновесия может быть подключен к ИПВП для измерения выходного сигнала

последнего. Частота  $\omega$  при этом устанавливается оптимальной для работы ДВП.

### 3. Портативный биолюминометр с кондуктометрическим электронным каналом

Функционирование фоторезисторного преобразователя, как указывалось, основано на зависимости изменения удельной электропроводности его светочувствительного материала от интенсивности светового потока. Наиболее простым способом определения этого параметра является кондуктометрический метод, который обеспечивает высокую чувствительность и точность аппаратуры при ее низкой стоимости [20]. Кондуктометрический метод является частным случаем импедансометрии, когда исследуемая физическая величина связана с активной составляющей комплексной электропроводности. Следует сказать, что понятие кондуктометрии принято употреблять в отношении измерений электропроводности жидких электролитов. Однако, по содержанию задачи измерения это отличие в данном случае несущественно и, напротив, имеется схожесть схемы замещения объектов, их информативных и дополнительных параметров, влияния внешних факторов.

Метрологической основой кондуктометрического метода являются следующие виды преобразований:

- удельной электропроводности материала в измеренное сопротивление (электропроводность) между выводными электродами датчика, которое характеризуется его коэффициентом (постоянной) преобразования;

- выходного сопротивления (электропроводности) датчика в электрический сигнал в виде напряжения или цифрового кода, которое определяется коэффициентом преобразования вторичного измерительного преобразователя;

- величины электрического сигнала в значение уровня светового потока, которое выполняется путем масштабирования или иного функционального преобразования информативного сигнала в зависимости от вида характеристик датчика и вторичного преобразователя.

Точность определения измеряемого параметра прибором зависит от точности каждого из указанных преобразований. При этом точность первого из них тесно связана с соблюдением геометрических размеров датчика и ве-

личинами его паразитных параметров, а также паразитных параметров соединительных кабелей. Точность второго преобразования определяется принципом работы и качеством компонентов электронной измерительной схемы. Точность третьего — зависит от установления соответствия между удельной электропроводностью и уровнем светового потока. Последнее является предметом отдельного изучения, содержанием которого должно быть выполнение очень большого объема экспериментальных исследований характеристик светочувствительных материалов в широком диапазоне значений световых потоков и рабочих температур. Результатом такой работы, в частности, должны стать таблицы соответствия освещенности и выходной электропроводности для разработанных типов датчиков. При данной разработке выполнялась сквозная калибровка измерительного канала по образцовому прибору на базе ФЭУ.

Структура разработанного биосенсорного комплекса и электрическая схема подключения фоторезисторных датчиков представлены на рис. 3 и 4. Этот комплекс предназначен для оценки интегральной токсичности среды с помощью измерения интенсивности хемилюминесценции метаболитов жизнедеятельности дафний или же определения уровня биолюминесценции некоторых штаммов бактерий.

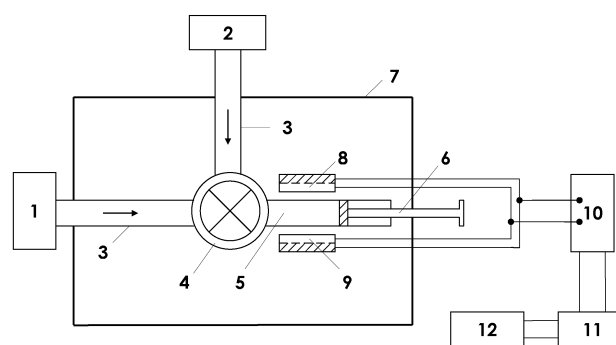


Рис. 3. Структурная схема биолюминесцентного комплекса: 1 — резервуар с раствором люминола и  $H_2O_2$ ; 2 — резервуар с раствором метаболита дафний; 3 — соединительная трубка; 4 — трехпозиционный вентиль; 5 — рабочая камера; 6 — поршень; 7 — защитный корпус; 8, 9 — спаренные, внутренний (рабочий) и внешний (референсный) фото чувствительные датчики; 10 — дифференциальный измерительный преобразователь на основе уравновешиваемой мостовой цепи; 11 — блок обработки аналоговых сигналов; 12 — блок цифровой обработки и регистрации данных.



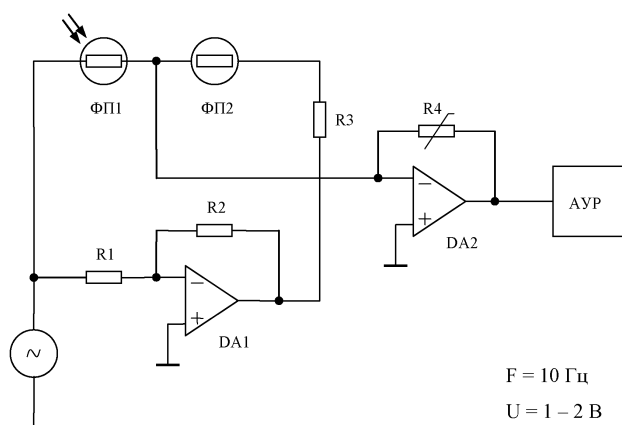


Рис. 4. Электрическая схема люминесцентного биосенсора

Основной принцип функционирования измерительной системы основан на регистрации биолюминесценции с помощью двух дифференциально включенных фоточувствительных элементов (8 и 9), которые выполнены в виде двухслойной трубки и охватывают всю поверхность рабочей камеры. Из резервуара (2) анализируемый раствор метаболитов дафний при соответствующем положении вентиля (4) и работе поршня (6) поступает в рабочую камеру (5). Затем после переключения вентиля (4) из резервуара (1) в камеру вводится раствор люминола и пероксида водорода. В результате взаимодействия этих растворов происходит биохимическая реакция и появляется люминесцентное свечение. В исходном состоянии (до начала реакции) мостовая цепь преобразователя 10 сбалансирована. Люминесцентное свечение воспринимается рабочим фоточувствительным элементом, изменяя его электропроводность по отношению к образцовому датчику. При этом нарушается баланс моста, и электрический сигнал с выхода последнего поступает в электронный блок обработки (11). В зависимости от концентрации анализируемого вещества изменяется амплитуда выходного сигнала вторичного преобразователя 10, что отображается изменением цифрового кода на выходе блока обработки и регистрации (12). Калибровку люминесцентного биосенсора можно осуществлять, используя тестовые растворы.

Для повышения точности измерения и устранения влияния внешних факторов, прежде всего, температуры, фоточувствительные элементы включены по мостовой схеме, которая в упрощенном виде представлена на рис. 4.

Кроме фоторезисторов ФП1 и ФП2 мостовая цепь включает операционный усилитель (DA1) и резистор R3 для начальной балансировки. Питание моста осуществляется генератором переменного напряжения. Электрический ток, который появляется в результате разбалансировки моста при возникновении в рабочей камере люминесценции, преобразуется в нормированное напряжение операционным усилителем (DA2), а затем поступает в модуль АЦП и устройства регистрации данных (AUP).

Эквивалентная схема замещения высокоимпедансных фотоприемников представляет собой параллельно-последовательную резистивно-емкостную структуру с нелинейной зависимостью параметров от напряжения и сложной зависимостью от частоты измеряемых сигналов. Установлено, что фотозависимый компонент эквивалентной схемы достигает максимальной чувствительности при частотах ниже 100 Гц, а влияние емкостной составляющей импеданса сенсора на его чувствительность тоже уменьшается со снижением частоты. В то же время, измерения на очень низких частотах и постоянном токе связаны с влиянием специфических помех (дрейфы, нестабильные потенциалы), которые существенно ограничивают достоверность результатов измерений. Исходя из полученных экспериментальных результатов, определено, что оптимальная частота измерительного сигнала составляет 10-20 Гц, а напряжение на сенсоре — 1...1,5В. Такая рабочая частота обеспечивает достаточное быстродействие прибора (около 1 измерения за 1 с), а указанное напряжение не приводит к большим нелинейным искажениям сигналов.

Для биолюминесцентного комплекса разработан достаточно простой кондуктометрический прибор МС2001Ф, предназначенный для работы с высокоомными дифференциальными фотоприемниками. Блок-схема этого прибора изображена на рис. 5.

Основой прибора является АЦП интегрирующего типа (КР572ПВ5 или аналогичный). Результат преобразования сигнала, измеренного с помощью АЦП, отображается на жидкокристаллическом индикаторе (ЖКИ). Измерительный сигнал формируется с помощью цифрового генератора квазисинусоидального напряжения (Г). Кроме этого сигнала, генератор также формирует когерентный опорный

сигнал, необходимый для работы синхронного детектора (СД). Тактирование генератора осуществляется тактовыми импульсами АЦП. Измерительный сигнал подается на мостовую цепь, образованную  $R1$ ,  $R2$ , ФП1, ФП2 и операционным усилителем (А1). При наличии люминесценции под влиянием этого сигнала на выходе моста протекает ток  $I_x$ , который преобразуется в напряжение  $U_x$  с помощью преобразователя П. Далее  $U_x$  выпрямляется синхронным детектором и подается на вход АЦП. После преобразования напряжения  $U_x$  в

цифровую форму на табло прибора можно получить значение разности электропроводности рабочего и образцового фоторезисторов, которое функционально связано с интенсивностью светового потока из рабочей камеры. Так как электропроводность фоторезисторов, в зависимости от их типов и освещенности, может изменяться в пределах от нескольких десятков кОм до сотен МОм, преобразователь П снабжен переключателем, который изменяет его коэффициент передачи в 10, 100, 1000, 10000 и 100000 раз.

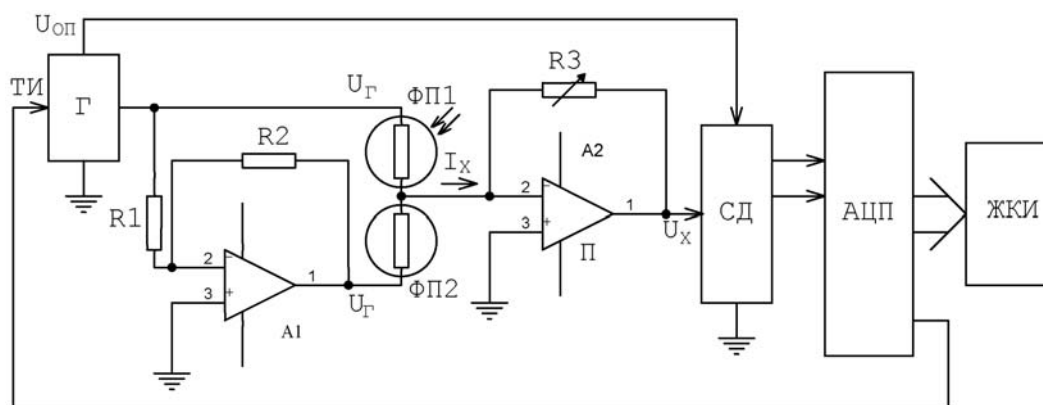


Рис. 5. Блок-схема кондуктометрического прибора МС2001Ф, предназначенного для работы с высокоомными дифференциальными фотосенсорами.

На самом чувствительном диапазоне измерения (переключатель преобразователя П находится в положении Х1) измеряемая проводимость считывается с табло прибора в пикосименсах. На других диапазонах полученное на табло цифровое значение  $N$  должно быть умножено на соответствующий множитель для получения действительного значения электропроводности  $G$ .

С помощью переводной таблицы показания по электропроводности могут быть переведены в значения светового потока. Для простоты использования переводная таблица может быть нанесена на лицевую панель прибора, что сводит к минимуму неудобства, связанные с отсутствием прямого отсчета измеряемого параметра непосредственно с табло.

Для прибора более высокого класса целесообразно применить микропроцессорный контроллер, который автоматически выбирает диапазон измерения (положение переключателя в преобразователе П), переводит значение электропроводности в интенсивность светового потока, осуществляет коррекцию функции

преобразования по индивидуальным характеристикам фотоприемников, по температуре образца и т.п. Однако микропроцессорный прибор будет существенно более дорогим и более сложным в эксплуатации.

Еще одним важным аспектом, на котором необходимо остановиться, является проверка метрологических характеристик прибора. Проверка правильности измерения электрической проводимости (сопротивления) электронным блоком осуществляется с помощью образцовых резисторов. Для экспериментального определения уровня чувствительности измерительного канала по отношению к биолюминесценции реальных объектов создан калибратор светового потока (имитатор уровня биолюминесценции). Он базируется на светоизлучающих диодах с необходимым спектром. Реальный уровень светового потока от этого имитатора определяли стационарным высокочувствительным люминометром на основе ФЭУ. Исследования показали возможность регистрации типичных уровней биолюминесценции с соотношением сигнал/шум не менее 3...5.

Практическим результатом выполненных исследований является разработка портативного биолюминесцентного комплекса, состо-

ящего из реакторного блока и кондуктометрического электронного модуля, фотография которого представлена на рис. 6.



Рис. 6. Экспериментальный образец портативного биолюминесцентного комплекса.

Разработанный малогабаритный (150x90x30 мм) прибор потребляет ток порядка 3 мА при напряжении питания 9 В и может эксплуатироваться даже на космических аппаратах.

### Выводы

1. Параметры комплексного электрического сопротивления (импеданса) могут служить универсальными промежуточными величинами при регистрации энергетических эффектов широкого класса биохимических реакций.

2. Перспективным путем построения высокочувствительных и помехоустойчивых биосенсорных систем является применение уравновешиваемых мостов переменного тока с импедансными преобразователями активных (энергетических) информативных параметров биоселективных элементов, в частности, благодаря простоте реализации дифференциальных методов измерений.

3. Разработанные структуры электронных импедансометрических каналов легко поддаются унификации, позволяют компенсировать влияния различных неинформативных параметров объекта измерения и внешних факторов, а также обеспечивают простую калибровку и метрологическую аттестацию средств измерения.

4. Разработанная конструкция измерительной ячейки на базе дифференциального фоторезисторного преобразователя обеспечивает

эффективное использование энергетического выхода биохимической реакции и простое согласование с электронным импедансометрическим каналом.

5. Использование предложенных в данной работе принципов построения сенсорных систем и конкретных технических решений позволяет создавать недорогие, портативные люминесцентные биосенсорные комплексы, пригодные для оперативного контроля состояния окружающей среды.

### Литература

1. Гриневич Ф.Б., Автоматические мосты переменного тока. — Новосибирск, Изд. Сибирского отд. АН СССР, 1964. — 216 с.
2. Гриневич Ф.Б., Сурду М.Н. Высокоточные вариационные измерительные системы переменного тока. — Киев, Наукова думка, 1989. — 192 с.
3. Новик А.И. Системы автоматического уравновешивания цифровых экстремальных мостов переменного тока. — Киев: Наукова думка, 1983. — 224 с.
4. Мельник В.Г., Сурду М.Н., Журавлев Ж. П., Могилевский В.М. Структура и алгоритм работы универсального экстремального микропроцессорного моста переменного тока P5084 //Техническая электродинамика. — 1985. — № 5. — С.100-105.
5. Гриневич Ф.Б., Мельник В.Г., Борщев П.И. Василенко А.Д. Аппаратные и программные средства распределенных сетевых импедансометрических систем //Технічна електродинаміка. Тематичний

- випуск: “Проблеми сучасної електротехніки”. — 2000. — Ч.2. — С. 82-85.
6. Starodub N.F., Shmyryeva A.N. Microelectron thin film temperature sensor for glucose determination in blood // Prog. of the Seventh World Congress on Biosensors, Kyoto, Japan. — 2002. — P. 269.
  7. Шмырева О.М. Біосенсорні мікроелектронні системи // Електроніка і зв'язь — 2003. — № 19. — С.116-120.
  8. Мельник В.Г., Стародуб Н.Ф., Василенко А.Д., Шмырева А.Н. Биотермосенсорные системы // Электроника и связь. — 2003. — №20. — С.132-135.
  9. Мельник В.Г., Василенко А.Д., Медведенко М.П. и др. Исследование информативных параметров дифференциальных кондуктометрических биосенсоров //Технічна електродинаміка. Тематичний випуск: “Проблеми сучасної електротехніки”. — 2006. — Ч.3. — С. 119-124.
  10. Мельник В.Г. Унифицированные импедансометрические средства информационно — измерительных систем / Праці Інституту електродинаміки Національної академії наук України. — 2004. — Ч.2, №2. — С. 189 — 190.
  11. Мельник В.Г. Построение высокочувствительных термоизмерительных систем на основе мостовых схем с дифференциальными импедансными сенсорами /Праці Інституту електродинаміки Національної академії наук України. 2005. — №2. — С. 102 — 103.
  12. Мельник В.Г., Стародуб М.Ф., Василенко А.Д., Медведенко М.П. Високочутливі термометричні системи для біомедичних та технологічних вимірювань //Технічна електродинаміка, Тематичний випуск: “Проблеми сучасної електротехніки”. — 2006. — Ч.3. — С. 125 — 128.
  13. Ганшин В.М. Данилов В.С. Бактериальные биосенсоры с биолюминесцентным выводом информации // Сенсорные системы. — 1998. — Том 12, Вып.1. — С. 56 — 68.
  14. Дерябин Д.Г., Поляков Е.Г. Особенности использования биолюминесцентных тест-систем при исследовании абиотических сред и биологических жидкостей //Вестник ОГУ. — 2004. — Вып.5. — С. 101 — 104.
  15. Алферов В.А., Понаморева О.Н., Решетилов А.Н. и др. Биосенсоры. Медицинские, биотехнологические и экологические аспекты //Вестник новых медицинских технологий. — 1999. — Том 6. — Вып. 3 — 4. — С. 45 — 47.
  16. Белобров П.И. Биосенсоры и биочипы// [http:// nano.torins.ru/articles](http://nano.torins.ru/articles).
  17. Ганшин В.М., Данилов В.С. Клеточные сенсоры на основе бактериальной биолюминесценции // Сенсорные системы. — 1997. — Том11. — Вып.3. — С.245 — 255.
  18. Ермаков О.Н. Прикладная оптоэлектроника . — М.: Техносфера. — 2004. — 414с.
  19. Шмырева А.Н. Микроэлектронные сенсорные системы // Электроника и связь. — 2005. — №29. — С.5-15.
  20. Лопатин Б. В. Кондуктометрия. — Новосибирск: Сиб. отд. АН СССР, 1964. — 295 с.