

УДК 621.315.592:539.213

Б.С. Вус

Національний університет "Львівська політехніка",
кафедра електронних засобів інформаційно-комп'ютерних технологій

МІКРОПРОЦЕСОРНА СИСТЕМА ДЛЯ БІОСЕНСОРНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ФОРМАЛЬДЕГІДУ

© Вус Б.С., 2013

B. Vus

MICROCOMPUTER-BASED BIOSENSOR SYSTEM FOR FORMALDEHYDE MEASUREMENT

© Vus B., 2013

Розроблено мікропроцесорну систему для амперометричного біосенсорного визначення формальдегіду. Вона має зручний інтерфейс користувача. Етапи експериментальних операцій управляються і контролюються в інтерактивному режимі. Мікропроцесорна програма створює візуальні і звукові інструкції, щоб уникнути неправильних дій під час експериментів. Систему можна адаптовувати для визначення інших реагентів. Одержані наукові та технічні результати можуть бути використані для розроблення комерційних серійних біосенсорних аналізаторів.

Ключові слова: мікропроцесорна система, амперометричний біосенсор, потенціостат.

A microcomputer-based system with amperometric biosensor for measurement of formaldehyde was developed. It has a user friendly interface. The interface provides visual and audible feedback so improper actions by the operator can be avoided. Operator can interactively control experimental phases. The system can be extended for measurement of other reagents. The scientific and technical output from the research could be used for development of commercially produced biosensor analysis systems.

Key words: computer-based system, amperometric biosensor, potentiostat.

Вступ

З моменту появи першого біосенсорного аналізатора, який випущено на фірмі Yelow Spring Instrument (Ohio, USA) у 1973 р. [1], відбувся стрімкий розвиток наукових досліджень у галузі біосенсорного аналізу та мікропроцесорної техніки. За цей час розроблено нові біоселективні матеріали [2,6], на основі яких можуть бути виготовлені амперометричні біосенсори для практичного використання в галузі біотехнології та медицини.

За визначенням, амперометричний біосенсор (біосенсорний аналізатор) – інтегральний автономний аналітичний прилад для кількісного або напівкількісного аналізу, з використанням біологічного розпізнавального елемента, який перебуває у прямому контакті з фізичним перетворювачем [3]. Зазвичай біологічний розпізнавальний елемент, нанесений на електроди електрохімічного перетворювача, являє собою автономну частину біосенсора – біоселективний електрохімічний перетворювач. Другою частиною

біосенсора є електронна схема – мікропроцесорна система (МС), яка забезпечує умови біосенсорного аналізу. Сьогодні використовують три типи електрохімічних перетворювачів. У перетворювачах першого типу проводиться моніторинг електрохімічної реакції субстрату або продукту; перетворювачі другого типу містять медіатори – редокс речовини, які полегшують перенесення електронів від фермента до поверхні електрода; в перетворювачах третього типу здійснюється пряме перенесення електронів від фермента на електрод і на субстрат/аналіт (і навпаки). Такі перетворювачі є безреагентними (не потребують для проведення аналізу додаткових хімічних речовин) і є перспективними для використання у амперометричних біосенсорних системах [4].

У роботі запропоновано електронну частину біосенсора, виготовлену у вигляді МС для амперометричного біосенсорного визначення формальдегіду, який є токсичною сполукою. Формальдегід (ФА) використовують у промисловості для виробництва пластмас, як стерилізуючий агент у фармакології, медицині та сільському господарстві. Тривале використання ФА спричинило забруднення довкілля та харчових продуктів. ФА шкідливо впливає на здоров'я людини: на центральну нервову систему, кров, імунну систему, може стати причиною сліпоти та респіраторних захворювань, спричиняє алергічні реакції та порушення росту [2].

МС створює умови для надійного селективного виявлення ФА та його кількісного аналізу. Вона має зручний інтерфейс користувача. Управління та контроль етапів експериментальних операцій відбувається в інтерактивному режимі. Мікропроцесорна програма створює візуальні і звукові інструкції, щоб уникнути неправильних дій під час експериментів. Також програма задає попередні умови для проведення аналізу, здійснює математичне оброблення та інтерпретацію одержаної інформації. МС може використовуватися не тільки для визначення формальдегіду, а також бути адаптованою для амперометричного біосенсорного визначення інших реагентів. Одержано підтвердження її функціональної придатності для вимірювання концентрації формальдегіду з використанням біоселективного амперометричного перетворювача.

Під час розроблення МС проводилися наукові дослідження з метою оптимізації її функціональних частин: біосенсорного перетворювача [2, 5, 6], електронної схеми та мікропроцесорних програм для задач біосенсорного аналізу.

Функціональна схема біосенсорного аналізатора

Функціональна схема біосенсорного аналізатора показана на рис. 1.

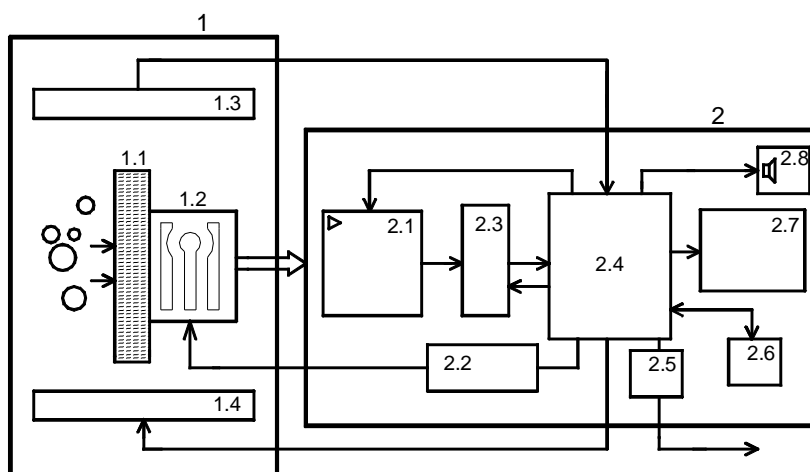


Рис. 1. Функціональна схема біосенсорного аналізатора

Біосенсорний аналізатор має дві основні складові частини: 1 – *амперометричний перетворювач*; 2 – *мікропроцесорна система*.

Амперометричний перетворювач складається з біоматриці 1.1 та електродної системи 1.2.

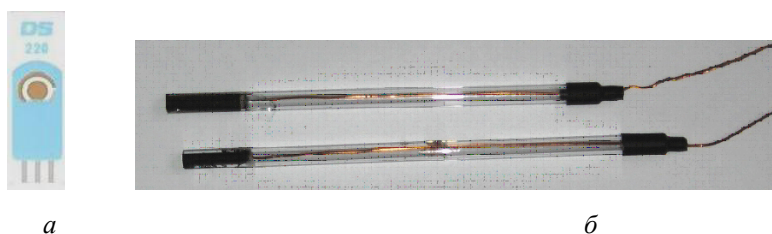
Біоматриця 1.1 являє собою детектувальний шар (мембрану) іммобілізованого біоматеріалу. Біоматриця може бути виготовлена з ферментів, антитіл, рецепторів, органел або мікроорганізмів.

Електродна система 1.2 – електрохімічний перетворювач, на виході якого можна одержати електричний сигнал, пов'язаний певною функціональною або кореляційною залежністю з концентрацією досліджуваної речовини. Такий електричний сигнал надходить на вхідний підсилювач мікропроцесорної системи 2.

Основними складовими частинами МС є: мікрокомп'ютер 2.4, вхідний підсилювач 2.1, формувач потенціалу 2.2, аналого-цифровий перетворювач 2.3, мікрокомп'ютер 2.4, дисплей 2.7. Допоміжні частини: 2.5 – модуль узгодження з електромеханічним вузлом аналізатора; 2.6 – інтерфейс користувача (органи керування з світлодіодною індикацією; 2.8 – модуль звукової сигналізації).

Амперометричний перетворювач

Дослідження та оптимізація амперометричного перетворювача проводили сумісно з МС біосенсорного аналізатора. Використовували різні конструкції перетворювачів (рис. 2) та різні біоселективні матеріали.



a

б

Рис. 2. Комерційний 4 мм золотий планарний електрод C220 «DropSens» (а). Сконструйовані 3,05 мм графітові торцеві електроди (б)

Враховували величину та характеристику вихідного струму перетворювача при зміні концентрації формальдегіду і тривалості етапів вимірювання амперометричного струму. На основі одержаних результатів було встановлено межі задавання необхідних параметрів: паузи, тривалості вимірювання, потенціалу та підсилення. Ці дані були використані під час

розроблення електронних модулів та програмного забезпечення для МС. Типові залежності амперометричного струму від концентрації формальдегіду, одержані в попередніх дослідженнях [5], показано на рис. 3, *а, б*.

Хроноамперометрична крива (рис. 3, *а*) використовувалася під час розроблення алгоритму формування паузи та тривалості вимірювання. Як видно з рис. 3, після додавання розчину формальдегіду спочатку відбувається швидка зміна вихідного струму біосенсорного перетворювача, а потім його значення стабілізується. Ця закономірність зберігалася для амперометричних біосенсорів, виготовлених з різних матеріалів.

На рис. 3, *б* показано калібрувальні криві залежності вихідного струму перетворювачів, у яких біоселективний матеріал нанесений на електроди, виготовлені з різних матеріалів (платини, золота та графіту). Для всіх перетворювачів має місце ділянка лінійної залежності вихідного струму від величини концентрації, але його величина може змінюватися у різних діапазонах: від 1мкА до 2 мкА; від 4 мкА до 25 мкА.

Для створення амперометричних зразків, придатних для практичного використання, проводили дослідження [2] операційної стабільності під час вимірювання концентрації формальдегіду, а також у разі його тривалого зберігання. Для цього використовувався амперометричний перетворювач, де біочутливим елементом був ензим ФдДГ або генно-інженерні клітини його надпродуцента. Досліджувалася стабільність чутливості упродовж 35 год. Протягом цього часу, через кожних 5 хв, до вимірювальної комірки вносили 5 мл 1 мМ розчину формальдегіду і вимірювали приріст вихідного струму біосенсора. Протягом 20 год він не змінювався, проте на 35 год вимірювання сигнал знизився в 2,1 разу. Крім цього стабільність біосенсорного перетворювача вивчали шляхом повторних вимірів сенсорного відгуку

стосовно 7,7 мМ ФА протягом 18 діб. Падіння сигналу простежувалося тільки в 1,3 разу, що свідчить про високу стабільність біоелектродів перетворювача при зберіганні. Одержані результати підтвердили можливість використання амперометричних біосенсорних перетворювачів разом з макетом мікропроцесорної системи для визначення формальдегіду.

Мікропроцесорна система

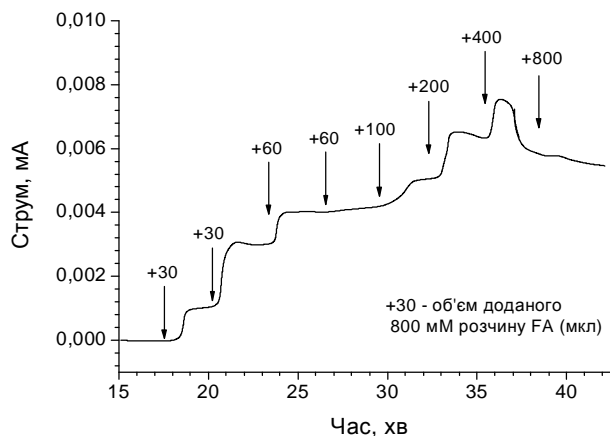
Оптимізація електронних схем МС проводилася для конкретних зразків амперометричних біосенсорних перетворювачів на всіх етапах розроблення. Для цього виконувалися дослідження з метою виконання таких основних завдань: узгодження електричних параметрів перетворювача та МС; задавання часових параметрів етапів аналізу; потенціалу; підсилення; умов оброблення та подання результатів визначення ФА.

Дослідження проводили на основі використання, як макетів окремих функціональних частин, так і зібраного макета біосенсорного аналізатора. При цьому були розроблені та налагоджені мікропроцесорні програми для управління і контролю етапів експериментальних операцій в інтерактивному режимі. Виконувалися такі вимоги: забезпечення умов аналізу; формування візуальних та звукових вказівок, з метою уникнення неправильних дій під час експериментів. Встановлено, що в поставленій задачі мікропроцесорну систему доцільно виготовляти на основі використання двох мікрокомп'ютерів (наприклад, мікросхем AT89C55WD). Структура відповідної МС показана на рис. 6.

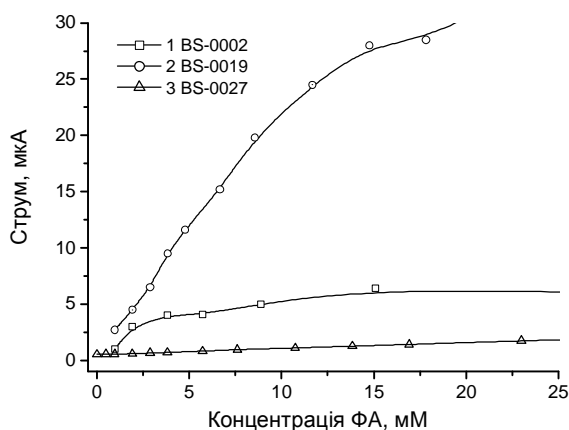
Обидва мікрокомп'ютери мають розподілені функції: перший (головний) керує роботою аналого-цифрового перетворювача, математично обробляє результати вимірювання і виводить інформацію на графічний дисплей; другий (підпорядкований) проводить опитування кнопок, керує роботою крокового двигуна, формує сигнали світлової та звукової індикації і задає підсилення вихідного сигналу біосенсорного перетворювача. Вхідна електронна частина виконана у вигляді окремого модуля з функцією потенціостата.

Вибір режимів роботи

МС аналізатора повинна бути простою у користуванні та захищена від помилок, які спричинив обслуговуючий персонал. Це забезпечує її роботу в інтерактивному режимі. Під час досліджень розроблено зручний для задач біосенсорного аналізу інтерфейс користувача з відповідною візуальною та звуковою підтримкою.



a



б

Рис. 3. Хроноамперометрична крива (а) та калібрувальні криві (б) визначення формальдегіду за допомогою амперометричного сенсора. Матеріал робочого електрода: (а) золото; б). 1 – платина, 2 – золото, 3 – графіт. Потенціал електрода +0,4 В

Інформація на екран дисплея виводиться у вигляді графічного «вікна». Вигляд «вікна» для загального режиму MENU показано на рис.5.

Для задавання початкових умов проведення біосенсорного вимірювання активують опцію TIMER, якою задають необхідні часові проміжки для етапів аналізу, а також опцію POTENTIAL, з метою задавання потенціалу допоміжного електрода.

Електронна частина біосенсора може працювати у режимі CURRENT – вимірювання амперометричного сигналу, що аналогічно роботі у режимі потенціостата, або режимі CONCENTRACION. Останній передбачає виконання всіх етапів аналізу з необхідними вимірюваннями та математичним опрацюванням результатів і подальшим представленням у вигляді значення концентрації досліджуваної речовини у розчині.

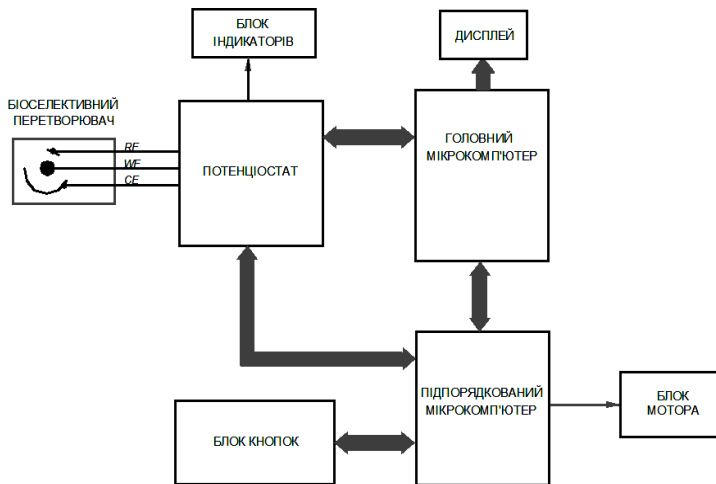


Рис. 4. Структурна схема МС біосенсорного аналізатора

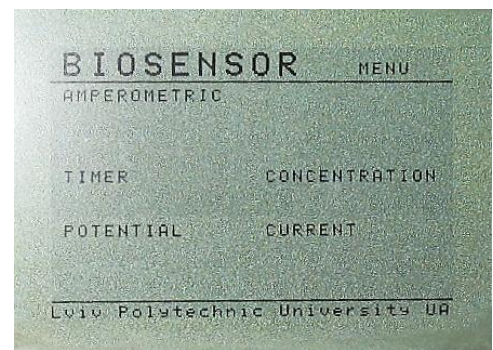


Рис. 5. Графічне вікно дисплея для загального режиму MENU

Задавання часових параметрів етапів біосенсорного аналізу

Вимірювання амперометричного сигналу повинно виконуватись у режимі реального часу. Для цього МС формує необхідні часові затримки. На рис.6 показано хронометричну залежність амперометричного струму, який вимірюється під час аналізу.

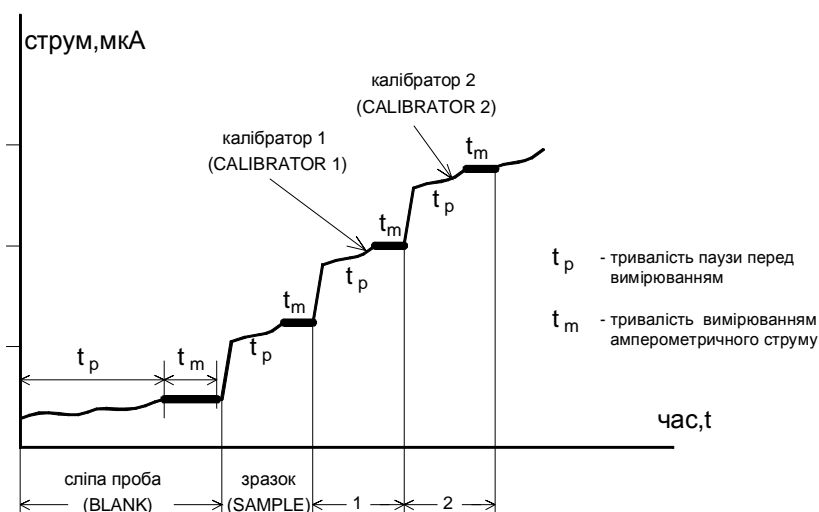


Рис. 6. Графік хронометричної залежності вихідного струму біосенсорного перетворювача

Після внесення у кювету дистильованої води (сліпої проби), досліджуваного зразка або калібраторів, електроди біосенсора занурюються у внесений розчин і відбувається перехідний процес стабілізації стану системи. Цей час відповідає паузі перед вимірюванням, t_p . Оптимальне значення паузи для всіх етапів аналізу встановлюється експериментальним способом і використовується для подальших аналізів концентрації. Тривалість паузи для сліпої проби є більшою від пауз для зразка та калібратора. Тривалість пауз зразка та калібраторів задається однаковою для забезпечення однакових умов проведення етапів аналізу.

Після завершення паузи проводиться вимірювання амперометричного струму протягом заданого часу t_m . Тривалість вимірювань струму сліпої проби перевищує тривалість вимірювань зразка та калібраторів, а також аналогічно до попереднього, вона є однаковою для зразка та калібраторів. Виміряні значення амперометричного струму за період t_m осереднюють. Осереднене значення струму сліпої проби заноситься і зберігається у пам'яті МС. Після вимірювання та осереднення амперометричного сигналу зразка або калібратора, від одержаного значення віднімається осереднене значення струму сліпої проби і це значення заноситься у відповідну комірку пам'яті приладу. Результати досліджень зберігаються на весь період проведення вимірювань амперометричного сигналу для визначення концентрації. Наприкінці аналізу проводиться розрахунок концентрації і результат виводиться на екран дисплея.

Згідно з графіком (рис.6) під час аналізу необхідно задавати такі часові затримки:

- паузу перед вимірюванням сліпої проби (BLANK PAUSE);
- тривалість вимірювання амперометричного струму сліпої проби (BLANK MEASURING TIME);
- паузу перед вимірюванням зразка або калібратора (SAMPLE PAUSE);
- тривалість вимірювання амперометричного струму зразка або калібратора (SAMPLE MEASURING TIME);

Часові затримки можна задавати, перебуваючи у вікні TIMER (рис.7).

Всього доступними є чотири таймери. Таймери формують вказані вище відповідні часові затримки для проведення аналізу.

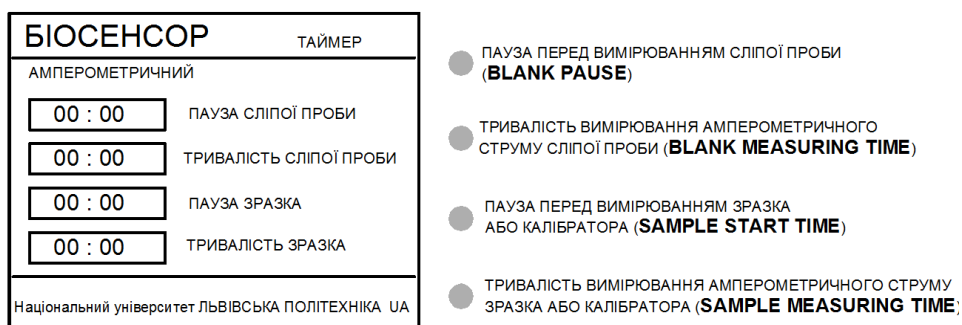


Рис. 7. Вікно ТАЙМЕР (алгоритм задавання часових затримок)

При переході у вікно ТАЙМЕР всі таймери перебувають у неактивованому стані (без підсвічування). Цифри у рамці для кожного таймера відповідають значенням часових затримок, які будуть забезпечуватись під час роботи таймерів у процесі біосенсорного аналізу. Ці часові затримки можуть бути попередньо заданими за замовчуванням або зміненими у вікні таймера.

Програмно задаються параметри «за замовчуванням»: пауза сліпої проби – 1 хв; тривалість вимірювання сліпої проби – 10 с; пауза та тривалість вимірювання зразка або калібратора – 12 с.

Часові затримки може змінити користувач у межах: пауза сліпої проби – 1–99 хв; пауза та тривалість вимірювання зразка або калібратора – 1–254 с.

Для задавання режиму та параметрів використовують відповідні кнопки на панелі керування (рис. 8).

Всі змінені значення часових затримок заносяться у пам'ять і зберігаються та використовуються на весь період проведення аналізу.

Задавання потенціалу

Потенціал задається у вигляді констант. За замовчуванням встановлено потенціал 0.

Основою для вибору констант під час амперометричних вимірювань слугували деякі рідкокс потенціали[3]. Задане значення та полярність потенціалу контролюється за допомогою світлодіодного та стрілкового індикатора, а також за допомогою цифрових значень, виведених на графічний дисплей. Схематичне відображення вікна для режиму POTENTIAL наведено на рис. 9.

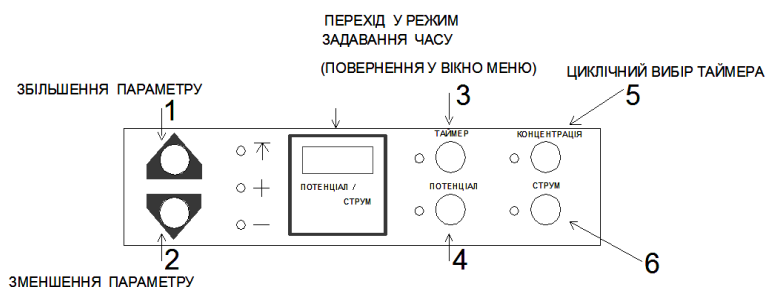


Рис. 8. Функціональне призначення кнопок на панелі керування для режиму задавання часу таймерів

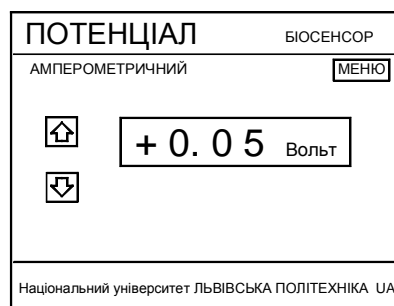


Рис. 9. Схематичне відображення вікна мікропроцесорної системи у режимі задавання потенціалу

Напруга потенціалу задається покроково у бік збільшення або зменшення, від мінус 1 В до +1 В, при натисканні відповідних функціональних кнопок. Задане значення заноситься у оперативну пам'ять мікрокомп'ютера і зберігається там на весь період досліджень.

Вибір діапазону вимірювання амперометричного струму

Попередньо заданий (за замовчуванням) діапазон – 1000. Він відповідає найбільшому значенню діапазону вимірювань 0–1000 мка і, відповідно, найменшому підсиленню потенціостата. На дисплей виводиться число з п'яти розрядів, яке має поточне значення струму, наприклад, 0,0000.



Рис. 11. Вигляд вікна для режиму вимірювання амперометричного струму

Якщо є необхідність змінити діапазон вимірювання, потрібно активувати та підтвердити вибране значення діапазону, після чого воно заноситься і зберігається в пам'яті мікропроцесорної системи на весь період вимірювань. Після цього на екран дисплея виводиться вікно для режиму вимірювання амперометричного струму (рис. 11).

У МС покази дисплея становлять 5 розрядів. З врахуванням похибки, до уваги можна брати чотири розряди. При цьому динамічний діапазон вимірювань знаходиться у межах 1–1000 вимірюваних величин струму.

Інструкції для етапів аналізу

Безпосередньо перед проведенням серії вимірювань концентрації формальдегіду в різних зразках розчинів необхідно проводити калібровку біосенсора. Процес калібровки та подальших визначень концентрації повинен проводитись в інтерактивному режимі, щоб не допустити помилок

під час проведення етапів експериментальних операцій. Для цього формуються звукові та візуальні вказівки, вигляд яких показано на рис. 13.

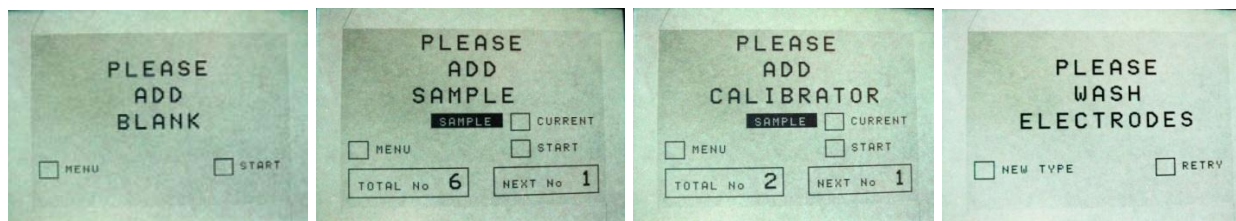


Рис. 13. Вигляд візуальних вказівок для етапів експериментальних операцій (зліва направо): внести сліпу пробу; додати досліджуваний зразок; додати калібратор; промити електроди після аналізу

Аналіз складається з двох етапів: калібровки та вимірювання. На першому етапі виконується повний цикл вимірювань: сліпої проби, зразка та заданої кількості калібраторів. На другому етапі використовуються дані, одержані під час проведення калібровки. Перед вимірюванням промиваються електроди і комірка для внесення досліджуваних розчинів, вноситься сліпа проба та досліджуваний зразок. Проводиться визначення концентрації формальдегіду у зразку.

Вимірювання струму і розрахунок концентрації

Для вимірювання струму та розрахунку концентрації мікропроцесорна програма забезпечує такий алгоритм аналізу: оптимізація електричних умов (підсилення сигналу перетворювача, потенціал електрода, аналого-цифрове перетворення амперометричного сигналу); проведення циклів вимірювань та осереднень значень амперометричного сигналу для сліпої проби, зразка та калібраторів; зберігання одержаних значень в пам'яті МС і використання для математичної обробки з метою визначення концентрації ФА.

Осереднені значення амперометричного струму у зручному вигляді (рис. 14) виводять на екран дисплея.

У верхній лівій частині екрана вказується назва етапу: BLANK (сліпа проба); SAMPLE (досліджуваний зразок); CALIBRATOR (калібратор). По завершенні паузи (START PAUSE) починається вимірювання протягом заданого часу (WORK INTERVAL) з кроком 0,5 с, одержані результати осереднюються і через кожну 1 с виводяться на екран. Вказується полярність амперометричного струму та його величина.

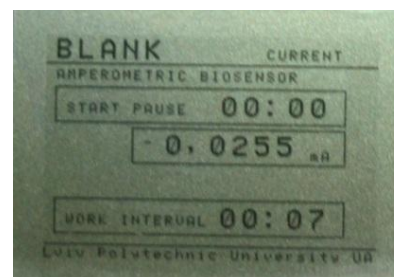


Рис. 14. Графічне вікно режиму вимірювання амперометричного струму

Практична реалізація мікропроцесорної системи біосенсора

Розроблена МС була виготовлена у вигляді макета біосенсорного аналізатора (рис. 15) і проходила апробацію в Інституті біології клітини Національної академії наук України. Її використовували під час проведення наукових досліджень у галузі біосенсорних технологій.

Для дослідження достовірності результатів, отриманих за допомогою розробленої МС, було проведено порівняння результатів аналізу ФА за допомогою макета біосенсорного аналізатора та комерційного амперометричного аналізатора «CHI 1200A» (IJ Cambria Scientific Ltd, Bury Port, UK) http://www.ijcambria.com/model_1200A_series_hand.htm, в якості контрольного приладу.

Для тестування обидвох приладів було використано хемосенсорні електроди на основі комерційних золотих планарних електродів C220AT «DropSens» (рис. 2), модифікованих платиновою черню в якості каталізатора.

Дослідження меж лінійності розробленого макета біосенсорного аналізатора проводили під час роботи аналізатора в режимі потенціостата (рис. 16).

Із рис. 16 видно, що 4 мм платинізований золотий планарний перетворювач C220 «DropSens» забезпечує верхню межу лінійності під час визначення концентрації ФА у розчині на рівні 5 мМ, що в два рази перевищує аналогічне значення для комерційного приладу «СНІ 1200А». Відзначене підвищення лінійності забезпечується схемотехнічними та програмними вирішеннями, які використовуються в МС. Дослідження підтверджують функціональну придатність МС для точнішого аналізу ФА в реальних зразках.

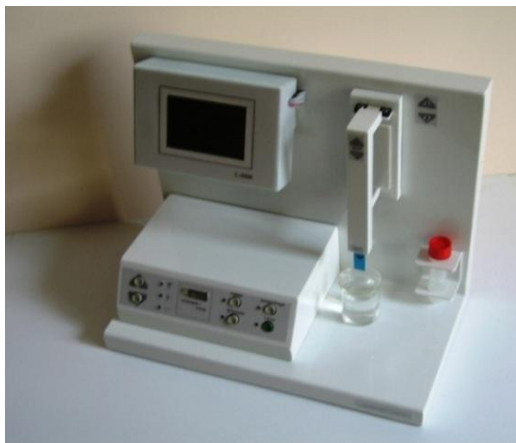


Рис. 15. Зовнішній вигляд макета біосенсорного аналізатора

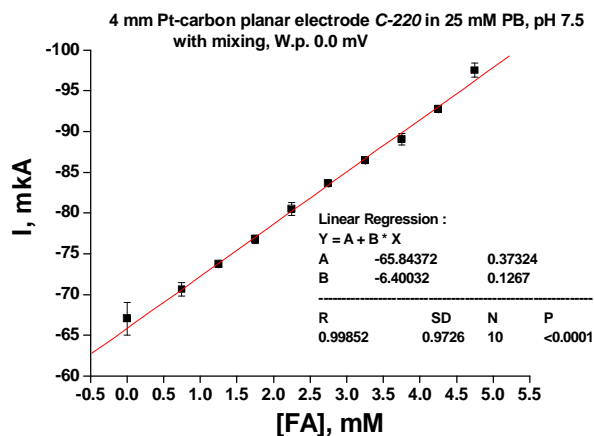


Рис. 16. Дослідження меж лінійності для біоселективного до ФА 4 мм планарного перетворювача C220 «DropSens», з використанням розробленого макета біосенсорного аналізатора (0.0 мВ vs Ag/AgCl у 25 мМ фосфатному буфері рН 7,5)

Апробацію розробленого макета біосенсорного аналізатора проводили на базі потенційного споживача – ТзОВ «ДезоМарк» – виробника дезінфікувальних засобів на основі ФА (Львівська обл., Яворівський р-н, м. Новояворівськ). Для дослідження було відібрано серійний зразок дезінфекційного препарату «Санодез Форте» із зазначеним виробником вмістом ФА на рівні 2,59 мМ (7,6 г ФА на 100 г препарату; густина – 1,05 г/см³) (рис. 17).

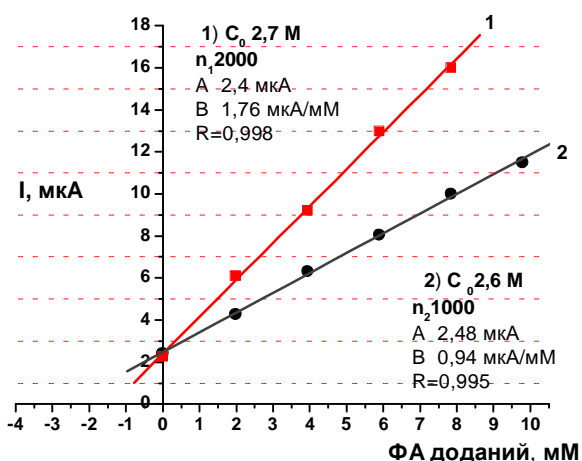


Рис. 17. Аналіз вмісту ФА в препараті «Санодез Форте» хемосенсорним методом у варіанті множинних додавань стандарту (калібратора). Над лінією регресії подано параметри А і В лінії регресії та коефіцієнт кореляції R; n – розбавлення зразка

Тестування розробленого макета біосенсорного аналізатора під час аналізу концентрації ФА в дезінфікувальному засобі «Санодез Форте» показало хорошу відповідність аналітичних результатів до даних виробника (різниця +2,3 %).

Висновки

Запропонована мікропроцесорна система виготовлена у вигляді макета біосенсорного аналізатора і має практичну цінність під час проведення наукових та прикладних досліджень в галузі біосенсорних технологій. Показано, що розроблений аналізатор порівняно із комерційним приладом «СНІ 1200А» демонструє вдвічі ширший діапазон лінійності визначення ФА, що дає можливість точніше проводити його аналіз в реальних зразках. Проведено тестування розробленого макета біосенсорного аналізатора під час аналізу концентрації ФА в комерційному дезінфікувальному засобі «Санодез Форте» і показано хорошу відповідність отриманих результатів до даних виробника (різниця +2,3 %) Одержані наукові та технічні результати можна використовувати для розроблення комерційних серійних біосенсорних аналізаторів.

1. Turner A. *Biosensors: Past, Presents and Future*. (Cranfield University, 1996) [Електронний ресурс]. – Режим доступу до статті: <http://www.cranfield.ac.uk/health/researchareas/biosensorsdiagnostics/page18795.html>.
2. Демків О. Амперометричні сенсори для визначення формальдегіду/ Демків О., Вус Б., Гончар М. // *Праці Наукового товариства ім. Шевченка*. – 2007. – Т. XVIII, Хемія і біохемія – С. 219–227.
3. Дзядевич С.В. *Наукові та технологічні засади створення мініатюрних електрохімічних біосенсорів: Наук. видання /С.В.Дзядевич, О.П. Солдаткін*. – К.: Наук. думка, 2006. – 256 с.
4. Гончар М., Вус Б. Біосенсори: Сучасний стан розвитку і перспекиви // *Вісник НТШ*, число 41, 2009 р. – С. 35–37.
5. Ковалишин Я. Вплив природи електродів на біоаналітичні характеристики біосенсора для визначення формальдегіду/ Ковалишин Я., Парижак С., Остапович Б., Вус Б. // *Вісник Львівського університету. Серія хімічна*. – 2008. – Вип. 49, ч. 2. – С. 173–178.
6. Stasyuk N. *Bi-enzyme L-arginine-selective amperometric biosensor based on ammonium-sensing polyaniline-modified electrode/ Nataliya Stasyuk, Oleh Smutok, Galina Gayda, Bohdan Vus, Yevgen Koval'chuk, Mykhailo Gonchar*// *ELSEVIER, Biosensors and Bioelectronics*, Vol.37 (2012), pp. 46–52.