

АВТОМАТИЗИРОВАННАЯ СИСТЕМА ОБРАБОТКИ АНАЛИТИЧЕСКОЙ ОПТИЧЕСКОЙ ИНФОРМАЦИИ ОПТОХЕМОТРОННЫХ СЕНСОРОВ

Исследование биологических жидкостей (кровь, моча и др.) с целью диагностики ряда заболеваний является сложной задачей из-за потенциально большого числа определяемых компонентов, присутствующих в пробе, и их весьма малых концентраций c_a , т.е. низких уровней аналитического сигнала $I=f(c_a)$ и, соответственно, малых отношений сигнал/шум, затрудняющих получение достоверных результатов. Поэтому данная актуальная проблема требует использования различных физических и физико-химических методов анализа и соответствующей аппаратуры, как правило, малодоступной и дорогостоящей. Отсюда следует, что не менее актуальной является разработка достаточно селективных, высокочувствительных и экспрессных методов анализа био жидкостей, что можно достичь с использованием новых физических и химических явлений и автоматизированной (компьютеризированной) аппаратуры их методического обеспечения.

В Харьковском национальном университете радиозлектроники на кафедре БМЭ предложена новая технология исследования биологических жидкостей, использующая электрохимическую люминесценцию (ЭХЛ) [1, 2]. Последняя испускается жидкими пробами, которые помещаются в специальную ЭХЛ-ячейку или оптохемотронный сенсор¹ и подвергаются фарадеевскому электролизу, причем интенсивность аналитического сигнала $I_{ЭХЛ}$ однозначно связана с содержанием определяемого компонента в биожидкости. Измерение $I_{ЭХЛ}$ в приготовленной пробе проводится электролизом по одному из методов, реализованных в модернизированном комплексе «ЭЛАН-2м» для проведения ЭХЛ-анализа, который разработан на кафедре БМЕ [1-4].

Комплекс позволяет проводить ЭХЛ- и электрохимический анализ растворов неорганических и органических веществ, а также исследовать ЭХЛ с помощью основных методов электрохимии – циклической вольтамперометрии (ЦВАМ), ВДЭ, ВДЭК² и др. в условиях регистрации аналитического сигнала в токовом режиме [1, 2].

На рис. 1 приведена структурная схема приборного комплекса «ЭЛАН-2м» в токовом режиме регистрации, который состоит из блока программаторов – ПГИ-3 или ЭХП-3 со встроенным бипотенциостатом (1), блока анализатора ЭХЛА-2 с кюветным модулем (2), регистраторов аналитических сигналов (3).

Программатор ПГИ-3 предназначен для возбуждения ЭХЛ путём поочередной генерации ионорадикалов люминофора на поверхности электрода при подаче на него прямоугольных биполярных импульсов напряжения, изменяющихся по заданной программе. В приборе предусмотрены отдельные регулировки амплитуд в диапазоне 0 ± 10 В и длительностей положительных и отрицательных импульсов, а также пауз между импульсами в диапазоне $10^{-6} \div 1$ с.

Программатор ЭХП-3 предназначен для генерирования напряжений, поляризующих неподвижные и вращающиеся электроды. В режиме ВДЭК с помощью бипотенциостата прибор обеспечивает

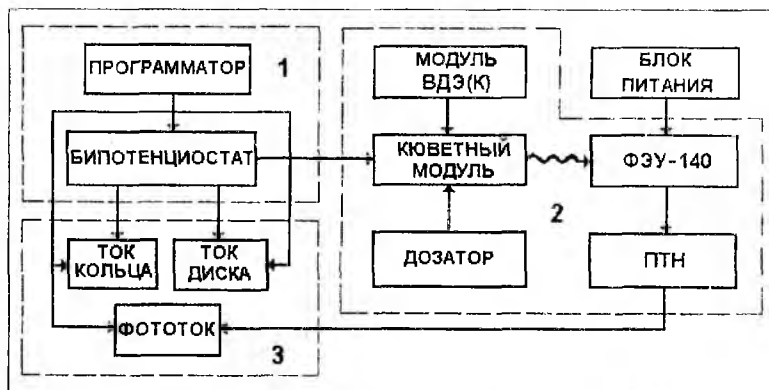


Рис. 1

¹ Под оптохемотронным сенсором, основанным на эффекте ЭХЛ, понимается оптически прозрачный сосуд (ячейка) необходимой конфигурации с введенными во внутрь электродами - рабочим(и), вспомогательным, сравнения и жидкой пробой, содержащей определяемое вещество. Рабочий электрод обычно изготавливают с помощью микро- или нанотехнологий, и, размещаясь на одной из внутренних стенок ячейки, он выполняет функции и электрода, и датчика сенсора. Данная конструкция позволяет сопряжение с оптико-волоконными линиями передачи данных, что существенно при проведении дистанционного анализа.

² ВДЭ – вращающийся дисковый электрод, ВДЭК – вращающийся дисковый электрод с кольцом.

поляризацию одного из электродов линейно меняющимся потенциалом и поддержание потенциала второго на заданном уровне.

Анализатор ЭХЛА-2 совместно с одним из программаторов предназначен для проведения прямого и косвенного ЭХЛ-анализа растворов в ячейке с неподвижными или вращающимися электродами. Конструктивно ЭХЛА-2 состоит из двух модулей – электронно-механического модуля вращения и оптико-механического кюветного модуля. Модуль вращения с помощью специального электронно-механического привода обеспечивает вращение рабочего(их) электрода(ов). Одновременно с измерениями ЭХЛ прибор позволяет проводить электрохимический анализ методами, реализуемыми входящими в состав «ЭЛАН-2м» программаторами.

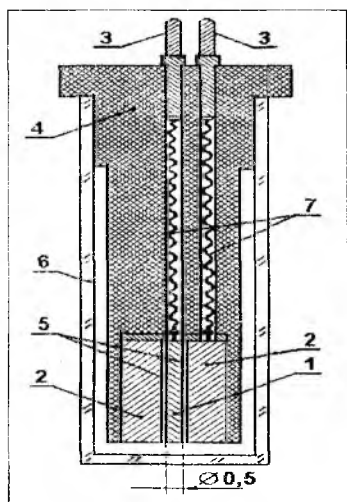


Рис. 2

Основным узлом оптико-механического кюветного модуля является ЭХЛ-ячейка (сенсор). В качестве примера на рис. 2 представлена одна из конструкций электрожемилюминесцентной ячейки, входящей в состав комплекса «ЭЛАН-2м», с несимметричной системой электродов с торцевым (через дно) выводом излучения. (1 - рабочий электрод, Pt-стержень $\varnothing 0,5 \pm 1$ мм; 2 - вспомогательный электрод, сплошной цилиндр из Pt $\varnothing 4$ мм с коаксиальным каналом для рабочего электрода; 3 - разъемные контакты для подсоединения электродов к источнику напряжения; 4,5 - фторопластовые цокольные пробки и изоляторы электродов; 6 - кювета, объем ≈ 5 см³, цилиндр или прямоугольный параллелепипед, оптически прозрачное стекло; 7 - пружинные проводники, обеспечивающие электрическое соединение электродов с программатором).

Фотоэлектронная регистрация аналитического сигнала $I_{ЭХЛ}$ во всем видимом спектре производится обладающими широким динамическим диапазоном высокочувствительными фотоэлектронными умножителями типа ФЭУ-84-2, ФЭУ-140 и др., расположенными непосредственно под дном ЭХЛ-ячейки. Фототок детектируется аналоговым способом. В этом случае используют, например, стандартные двухкоординатные графопостроители Н-306. Данный способ применим при высоких уровнях аналитического сигнала, что далеко не всегда имеет место при ЭХЛ-диагностике биожидкостей и других жидких проб. Это диктует необходимость создания автоматизированной аппаратуры регистрации аналитического сигнала в режиме счета квантов.

Учитывая вышесказанное в настоящей работе поставлена и решена задача разработки автоматизированной системы для ЭХЛ-анализа жидких проб, включая биопробы и водные пробы, с использованием цифровой регистрации аналитического сигнала в режиме счета квантов света, т.е. при малых уровнях $I_{ЭХЛ}$. Необходимость такой разработки вытекает из того, что световые аналитические сигналы оптохемотронного сенсора изменяются по своим характеристикам и параметрам от пробы к пробе, во время анализа данной пробы и, обычно, малоинтенсивны. При этом учитывается, что такая система обработки медико-биологической информации, получаемой с помощью оптохемотронных сенсоров в условиях аналитической, научно-исследовательской и других лабораторий, должна обладать высокими метрологическими характеристиками и, в тоже время, иметь доступную стоимость, обладать способностью к выдаче статистически достоверной информации и возможностью передачи данных в режиме "real-time".

Ниже рассмотрена автоматизированная установка для исследования биологических жидкостей с

помощью оптохемотронного сенсора. Измерение аналитического сигнала – интенсивности ЭХЛ – осуществляется путем преобразования излучения в аналоговый электрический сигнал, который трансформируется в цифровую форму модулем сопряжения с дальнейшей его обработкой персональным компьютером. Модуль сопряжения оптохемотронного сенсора с ЭВМ содержит преобразователь светового излучения в электрический сигнал, аналогово-цифровой преобразователь и блок интерфейсного адаптера. Структурная схема модуля сопряжения оптохемотронного сенсора приведена на рис. 3 (1 – сенсор с устройствами возбуждения ЭХЛ и фоторегистрации аналитическо-

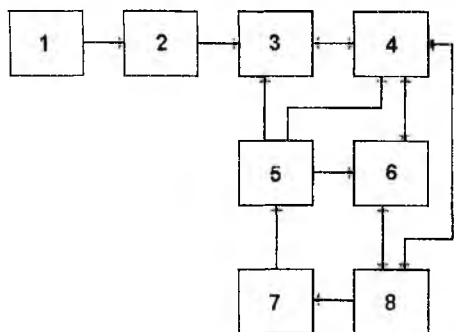


Рис. 3

го сигнала; 2 – преобразователь «ток-напряжение»; 3 – аналого-цифровой преобразователь; 4 – буферный элемент; 5 – схема управления; 6 – регистр управляющих последовательностей; 7 – селектор адреса; 8 – ЭВМ).

Схема включает в себя блок предварительной обработки светового сигнала сенсора и блок интерфейсного адаптера. Назначением блока предварительной обработки является преобразование выходного люминесцентного излучения сенсора в аналоговый электрический сигнал, усиление и дальнейшее аналого-цифровое преобразование. Назначением блока интерфейсного адаптера является электрическое и информационное согласование цифрового сигнала с выбранным интерфейсом ЭВМ.

Для дальнейшей обработки аналитического сигнала при помощи ЭВМ необходимо перевести мгновенное значение аналогового сигнала в цифровой код. Это преобразование осуществляется с помощью аналого-цифрового преобразователя (АЦП). В качестве АЦП выбрана микросхема КР572ПВ3. Эта микросхема представляет собой сопрягаемый с микропроцессором АЦП последовательного приближения, выполненный по технологии КМОП. Компактно интегральная схема (ИС) размещена в герметичном керамическом корпусе с 18 выводами.

АЦП построен таким образом, что обеспечивает основные условия согласования с микропроцессором, а именно:

- длина цифрового слова (количество разрядов) на выходе АЦП равна 8-ми битам;
- управление его работой может осуществляться непосредственно сигналами от микропроцессора с минимальными аппаратными и программными затратами;
- временные характеристики вполне удовлетворяют применению данного АЦП для асинхронного обмена через системную шину или порт ЭВМ.

Функциональная электрическая схема АЦП приведена на рис. 4.

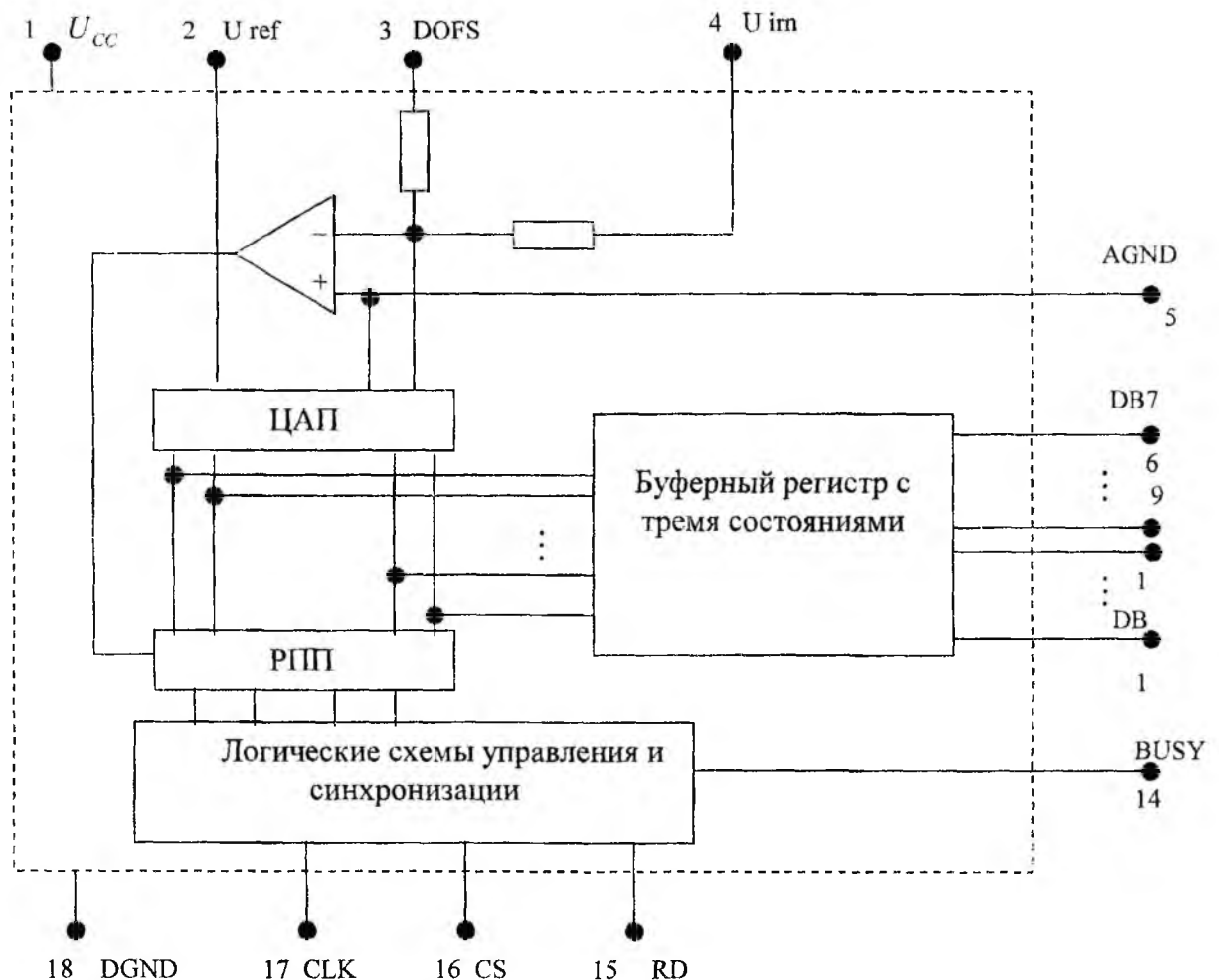


Рис. 4

Нумерация и назначение выводов микросхемы следующие:

1 – напряжение питания +5В (U_{cc});

- 2 – напряжение смещения -10В (U_{ref});
- 3 – управление смещением характеристики (DOFS);
- 4 – аналоговый вход (U_{in});
- 5 – общий (аналоговая земля) (AGND);
- 6 – цифровой выход 8 (старший разряд);
- 7-12 – цифровые выходы разрядов 7-2, соответственно;
- 13 – цифровой выход (младший разряд);
- 14 – выход состояния (вход сигнала готовности АЦП-BUSY);
- 15 – вход сигнала управления чтением из АЦП (RD);
- 16 – вход сигнала адресации (CS);
- 17 – вход тактирования (выход тактового генератора CLK);
- 18 – цифровая земля (DDNG).

Основные электрические параметры ИС АЦП КР572ПВ3 представлены в табл. 1.

Таблица 1

Число разрядов	8
Напряжение источника питания U_{cc} , В	+5
Опорное напряжение U_{REF} , В	-10
Выходное напряжение низкого уровня U_{OL} , В	$\leq 0,4$
Выходное напряжение высокого уровня U_{OH} , В	≥ 4
Ток потребления, мА	≤ 5
Потребляемая мощность, мВт	≤ 25
Время преобразования, мкс	$\leq 7,5$
Частота тактового генератора, задаваемая внешними элементами, кГц	500
Абсолютная погрешность преобразования, МЗР	± 3

Значение входного сопротивления ИС по аналоговому входу U_{in} (вывод 4) находится в пределах $3 \div 6$ кОм.

Помимо времени преобразования ИС характеризуется и другими динамическими показателями: временем установки АЦП в начальное состояние (2 мкс), временем задержки считывания данных (120 нс), временем задержки сброса данных (80 нс).

Алгоритм преобразования АЦП реализуется с помощью регистра последовательных приближений (РПП), который включает в себя сдвигающий регистр и регистр памяти на RS-триггере. В РПП выполняется операция поразрядного сдвига логической единицы в направлении от старших разрядов к младшим, хранение результатов преобразования и поразрядной записи состояний компаратора напряжений (КН) при сравнении входного аналогового напряжения АЦП и напряжения на выходе ЦАП.

Логические схемы управления и синхронизации регламентируют весь процесс преобразования и согласования АЦП с внешними устройствами. С их помощью при появлении внешних сигналов RD и CS формируются сигналы внутреннего управления: сброс, начало преобразования, управление буферным регистром и выходным сигналом BUSY.

При подаче на входы CS и RD АЦП логической единицы выходы микросхемы будут находиться в высокоимпедансном состоянии. Это состояние будет продолжаться до тех пор, пока не произойдет отрицательный перепад уровня сигнала на этих входах. С этого момента АЦП начинает преобразовывать данные, причем сигнал на управляющих входах должен удерживаться низким в течение всего времени преобразования. Далее происходит обращение к порту, который присвоен устройству, и в компьютер поступает преобразованный байт данных, находящийся к этому времени на выходах АЦП. После считывания данных сигнал управления переводится из низкого уровня в высокий, и АЦП переходит в Z-состояние. По сигналу сброса АЦП устанавливается в исходное состояние, при котором в РПП записан код 10...00. По сигналу начала преобразования запускается внутренний генератор тактовых импульсов (ГТИ), обслуживающий процесс преобразования и обмена данными. Внутренний ГТИ построен так, что по сигналу запуска первый же отрицательный переход тактового импульса устанавливает старший разряд в соответствующее состояние, после чего начинается обра-

ботка информации во втором разряде. Рабочая тактовая частота генератора 500 кГц задается внешними RC-элементами.

При временном совпадении сигналов RD, CS и BUSY формируется сигнал управления регистром с логикой на три состояния. Помехозащищенность АЦП повышена за счет применения стробирующего компаратора напряжений.

В процессе эксплуатации АЦП необходимо соблюдать установленный порядок подачи электрических напряжений. Первым подключается потенциал «земли», далее подается потенциал источника питания +5 В, затем подается потенциал -10 В, являющийся опорным для АЦП.

К персональному компьютеру типа IBM PC устройства сопряжения (УС) могут быть подключены тремя путями, соответствующим трем типам стандартных внешних интерфейсов, средства которых входят в стандартную конфигурацию компьютера:

- через системную магистраль (шину, канал) ISA;
- через параллельный интерфейс Centronics;
- через последовательный интерфейс RS-232C.

Каждый из указанных методов имеет свои преимущества и недостатки. В табл. 2 приведено сравнение этих методов подключения по восьми параметрам, которые необходимо учитывать при выборе одного из них. Из табл. 2 видно, что выбор системной магистрали обеспечивает наибольшую скорость обмена. Данные передаются байтами (по 8 бит) или словами (по 16 бит). Внешний источник питания не нужен, дополнительный конструктив также отсутствует. Учитывая эти обстоятельства, а также то, что интерфейс ISA имеет гибкую систему команд, для подключения устройства сопряжения выбрана системная магистраль ISA.

Таблица 2

	Системная магистраль ISA	Интерфейс Centronics	Интерфейс RS232C
Скорость обмена	Высокая (≥ 5 Мбайт/с)	Средняя (до 100 Кбайт/с)	Низкая
Длина и тип линии связи с компьютером	Встроенные УС (линия связи отсутствует)	До 2 м, многопроводный кабель	До 15 м, одиночный провод
Допустимая сложность УС	От малой до средней	Любая	Любая
Сложность узлов сопряжения с интерфейсом	От малой до средней	От малой до средней	От средней до высокой
Дополнительный конструктив	Не нужен	Нужен	Нужен
Внешний источник питания	Не нужен	Нужен	Нужен
Формат и разрядность данных	Параллельный, 8 или 16 разрядов	Параллельный, 8 разрядов	Последовательный
Количество УС, подключаемых к компьютеру	До 6	1	1

Разработанный интерфейсный адаптер решает задачу сопряжения устройства предварительной обработки ЭХЛ-сигнала оптохемотронного сенсора с персональным компьютером через выбранный интерфейс-магистраль ISA. При этом обеспечивается информационная и электрическая совместимость. Информационная совместимость предполагает точное выполнение протоколов обмена и правильное использование сигналов магистрали. Это значит, что осуществляется прием и выдача данных, т.е. осуществляется двунаправленный обмен данными с компьютером и с соответствующими линиями связи. Также обеспечивается возможность программного управления скоростью обмена данными, программное регулирование длительности управляющих импульсов и управление работой аналого-цифрового преобразователя. Электрическая совместимость подразумевает согласование уровней входных, выходных и питающих напряжений и токов.

Разработанная автоматизированная система обработки аналитической оптической информации оптохемотронного сенсора, сопряженного с ЭВМ, апробирована при проведении экспериментальных исследований. Продемонстрирована возможность ЭХЛ-определения оксалата $C_2O_4^{2-}$ в водной пробе

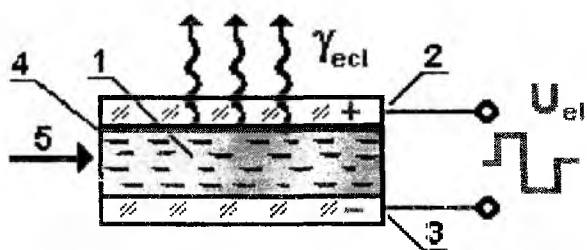


Рис. 5

с помощью реагента 2,2'-бипиридила рутения, что существенно для биомедицинской диагностики [5,6]. На рис. 5 представлена конструкция оптохемотронного сенсора (1 – активная среда - жидкая проба; 2 – оптически прозрачный рабочий, 3 – вспомогательный электроды; 4 – слой люминофора-реагента; 5 – ввод пробы. U_{el} – входное напряжение, γ_{ecl} – кванты ЭХЛ - аналитический сигнал).

Повышенные в сравнении с нормой концен-

трации $C_2O_4^{2-}$, входящие в состав двухосновной щавелевой кислоты $H_2C_2O_4$, возникают в биожидкостях (кровь, моча) при целом ряде патологий - заболеваниях кишечника, почек, авитаминозе, гипертонии и др. Избыточное концентрирование щавелевой кислоты в моче является ключевым фактором в формировании камней в почках (это вызвано осаждением щавелево-кислого кальция CaC_2O_4) и развитии такого урологического заболевания, как мочекаменная болезнь. При ее лечении используют диету с пониженным содержанием $C_2O_4^{2-}$, что требует, помимо прочего, количественного определения оксалата в пищевых продуктах.

В настоящее время диагностика болезни осуществляется только по факту ее осложнения, а именно – по наличию камня в мочевых путях, выявляемому с помощью рентгенологического или ультразвукового исследования, или при непосредственном выделении камня (через мочевые пути, при хирургическом удалении). Наиболее информативное и безопасное исследование для обнаружения камней почек и мочевого пузыря – ультразвук. При этом исследовании можно увидеть любые конкременты размером больше 2÷3 мм. Если камень опустился в мочеточник, то обнаружить его можно только при рентгене живота, после введения в вену специального контрастного вещества. Оксалаты и фосфаты хорошо видны на рентгенограммах, ураты не всегда выявляются на обзорных снимках, так как плохо задерживают рентгеновские лучи. Конкременты также диагностируют и по анализу мочи.

Исходя из изложенного, очевидна необходимость и актуальность разработки надежных, эффективных, неинвазивных и экономичных тестов на содержание собственно оксалата в биожидкостях как средство ранней диагностики мочекаменной болезни и других патологий. При их разработке необходимо учитывать достаточно малый уровень содержания этих дианионов в крови и моче в норме: $1,7 \div 3,9 \cdot 10^{-5}$ моль/л – в крови и $1,6 \div 5,5 \cdot 10^{-4}$ моль/л – в моче [7]. Это накладывает серьезные ограничения на использование известных методов определения оксалата, таких, как волнометрия, вольтамперометрия, радионуклидный. Анализ показывает, что данные методы имеют недостаточно низкие пределы обнаружения и требуют предварительного выделения $C_2O_4^{2-}$ из биопробы, это усложняет анализ.

Разработанная методика ЭХЛ-определения дианионов оксалата, присутствующих в норме и патологии в биожидкостях (кровь, моча), реализуемая с помощью рассмотренной автоматизированной системы обработки медико-биологической информации, получаемой оптохемотронным сенсором, позволяет достичь весьма низких пределов обнаружения (< 1 мкмоль/л), проводить экспресс-анализ образцов при достаточно малой его стоимости, что выгодно отличает данную разработку от известных.

Программное обеспечение, которое входит в состав автоматизированной системы, используя пакет Mathcad 2000 Professional, позволяет осуществлять не только запись и хранение данных, но и проводить их статистическую обработку:

- рассчитывает среднее арифметическое результатов параллельных измерений;
- проводит оценку среднеквадратичного стандартного отклонения результата единичного измерения;
- проводит проверку однородности оценок дисперсий по всему массиву экспериментальных данных, оставшихся после исключения аномальных результатов измерений (по всем градуировочным растворам);
- по полученным коэффициентам находит расчетные значения для аналитического сигнала (отклика) для соответствующих значений;

- находит дисперсию между экспериментальными значениями и вычисленными по уравнению регрессии;
- находит дисперсию «разброса средних значений»;
- рассчитывает дисперсию «разброса внутри параллельных определений»;
- проверяет гипотезу линейности градуировочного графика по критерию Фишера;
- рассчитывает погрешность построения градуировочного графика или погрешность аппроксимации в зависимости от расчетного значения аналитического сигнала.

На рисунке 6 приведен градуировочный график (концентрационная анодная люменодиграмма) ЭХЛ-определения $C_2O_4^{2-}$ в водном растворе с ацетатным буфером CH_3COOH/CH_3COO^- pH=6 с ЭХЛ-реагентом $Ru(bpy)_3^{2+}$ в ячейке (см. рис. 2). Регистрация ЭХЛ при потенциале рабочего электрода (Pt Ø2 мм) +1,0 В отн. насыщенного каломельного электрода. Фототок i_{ec1} в пКА, c_a – моль/л, относительное стандартно отклонение $s=3,6$.

Данный градуировочный график можно использовать при определении оксалата в реальных пробах с использованием разработанной автоматизированной системы регистрации медико-биологической информации на базе малогабаритного оптохемотронного сенсора.

Результаты проведенных разработок и модельных исследований дают возможность рассчитывать на достаточно широкое использование метода ЭХЛ-анализа при проведении исследовательских и клинических работ, связанных с определением качественного и количественного состава биологических жидкостей, включая диагностику онкологических и воспалительных патологий.

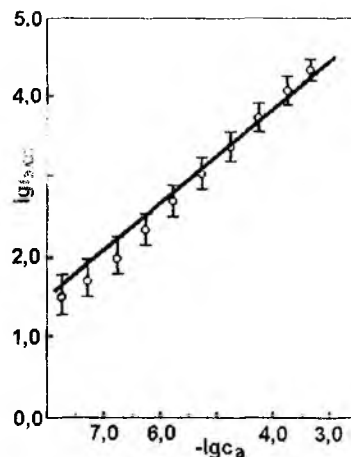


Рис. 6

Список литературы: 1. Рожницкий Н. Н. Электрохемилюминесцентный анализ растворов // Журн. аналит. химии. 1992. Т. 47, вып. 10-11. С. 1765-1793. 2. Рожницкий Н. Н., Бых А. И., Красноголовец М. А. Электрохимическая люминесценция. Харьков: ХТУРЭ, 2000. 320 с. 3. Рожницкий Н. Н., Кукоба А. В., Белаиш Е. М., Бых А. И. Аппаратура «ЭЛАН-2» для гомогенного и гетерогенного ЭХЛ-анализа // Журн. аналит. химии. 1994. Т. 49, №9. С. 1029-1031. 4. Белаиш Е. М., Кукоба А. В., Рожницкий Н. Н. Аппаратура электрохемилюминесцентного анализа «ЭЛАН-2м» // Междунар. конф. «Теория и техника передачи, приёма и обработки информации». Сб. науч. трудов. – Харьков. 1995. С. 205. 5. Белаиш Е. М., Хрусталева К. Л., Рожницкий Н. Н. Электрохимическая люминесценция (ЭХЛ) в биомедицинских аналитических исследованиях / Электроника и связь. 2000. № 8, Т. 1. С. 168-172. 6. Хрусталева К. Л., Хоменко В. Ю., Хомик В. И. Оптохемотронный сенсор на основе структуры Ленгмюра-Блоджетт для определения оксалата в биожидкостях // Радиоэлектроника и молодежь в XXI в. -5-й междунар. молодежн. форум. Сб. науч. трудов. – Харьков. 2001. С.214-216. 7. Hodgkinson A. Oxalic Acid in Biology and Medicine. N. Y.: Academic Press. P. 173-174.

Харьковский национальный университет радиоэлектроники

Поступила в редколлегию 08.10.2001