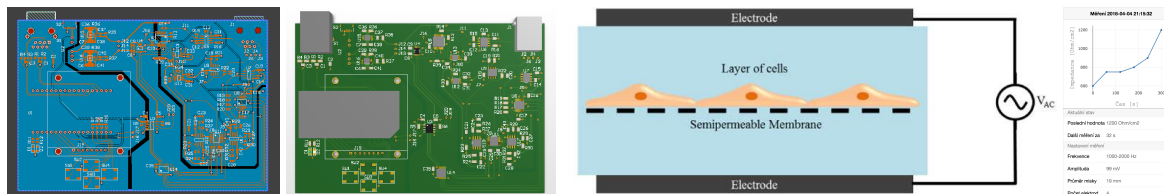


Autonomní měřič impedance biologických vzorků

Zbyšek Voda*



Abstrakt

Tato práce se zabývá návrhem zařízení schopného autonomně měřit impedanci biologických materiálů. Cílem je vytvoření prototypu, který zpřístupní jednoduché webové rozhraní pro sběr dat z měření impedance v čase. Zařízení by mělo být schopné měřit impedanci nejenom pro určité frekvence, ale v celém frekvenčním spektru, a to od desítek Hz do 100 kHz. Součástí práce je návrh PCB pro čtyřelektrodevé měření. Analogová část vychází z již existujícího řešení [1] založeného na čipu AD5933, který slouží k analýze impedance, a vhodně je upravuje. Tato část byla odsimulována pomocí simulátoru SPICE. K řízení je použit modul Linkit Smart 7688, který je vybaven WiFi. Ten slouží také jako server pro webové klienty.

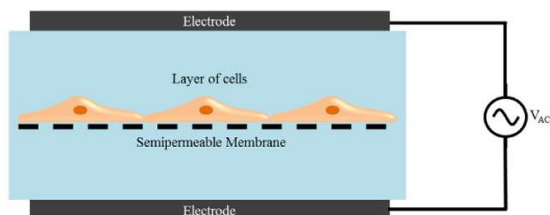
Klíčová slova: bioimpedance — autonomní měření — čtyřelektrodevé měření

Příložené materiály: [Schéma desky](#) — [SPICE simulace](#) — [Podklady PCB](#)

*xvodaz01@stud.fit.vutbr.cz, Fakulta informačních technologií VUT v Brně

1. Úvod

Měření impedance je jedna z metod, kterou je možné použít k určování vlastností materiálů, látek i tkání. Jejich impedance se totiž mění například s mírou koroze kovového povrchu, přítomností virů v krvi, nebo také s postupným zacelováním buněčné membrány. Budeme-li hodnotu impedance měřit v čase, můžeme sledovat i rychlost změn zkoumaných materiálů a díky tomu tyto materiály dále analyzovat.



Obrázek 1. Měření impedance buněčné membrány (obrázek z [2])

U biologických vzorků řešíme dva hlavní problémy. Prvním z nich je citlivost vzorků na napětí použité k je-

jich analýze. Toto je možné řešit zmenšením amplitudy signálu, který jimi prochází, což s sebou ale nese vyšší nároky na citlivost celého zařízení a co nejnižší šum. Napětí na vzorku dále musí mít nulovou hodnotu stejnosměrné složky, aby nedocházelo k elektrochemickým procesům na rozhraní elektrod a vodného prostředí, ve kterém se většinou biologické vzorky měří. Druhým z problémů je, že měřená impedance vzorků může být velice nízká a při použití dvou elektrod je pak měřená impedance výrazně ovlivněna impedancí rozhraní elektrod a vodného prostředí vzorku. Tento problém řeší použití čtyř elektrod. Dvě elektrody slouží k přivedení proudu na vzorek a zbylé dvě elektrody měří napětí na vzorku. Navrhované zařízení tyto problémy řeší a také umožňuje provádět měření v předem definovaných časových intervalech.

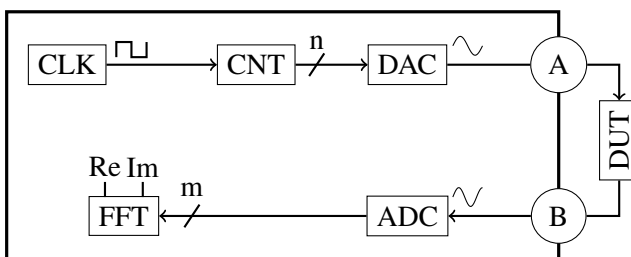
Pro měření impedance biologických vzorků existuje řada systémů, které řeší všechny podstatné věci, jako je napájení, sondy, apod. Často s jeho zakoupením získáme i všechno potřebné vybavení pro měření. Mezi

tyto systémy patří například přístroje řady xCELLigence od společnosti Roche Diagnostics [3]. Typickým příkladem použití xCELLigence je analýza rakovinných buněk, identifikace kmenových a normálních buněk, nebo zkoumání vlivu různých chemických látek na buňky. Dalším takovým systémem je Bionas Discovery 2500 od společnosti Bionas [4]. Inspirací může být přístroj pro laboratorní měření impedance tkání Millicell ERS-2 [5], jehož způsob připojení sond využívá i tato práce. Nevýhodou takovýchto systémů je jejich vysoká pořizovací cena a vazba na konkrétního výrobce. Typickou vlastností těchto zařízení je absence pokročilejšího ovládacího rozhraní, kde by uživatel mohl volit typ tkáně, velikost misky apod. Přístroje jako Millicell tak zobrazují pouze ohmy a uživatel je nucen si výsledky zapisovat a manuálně je přepočítávat na plochu misky, což je pro biologický výzkum často využívaný údaj.

Nabízí se tak otázka stavby vlastního zařízení, které by umožňovalo jednoduše měřit impedanci. S pestrou nabídkou různých platforem, umožňujících provozovat dokonce i Linux na malém čipu, se otevírá možnost realizace mnohem inteligentnějšího systému. Jednou z možností je postavit celý systém na bázi A-D a D-A převodníků a dalších částí (viz obrázek 2). Nevýhodou je však poměrně vysoká cena a vyšší nároky z pohledu množství a přesnosti zpracování dat. V dnešní době však existují integrované obvody s číslicovým rozhraním, které obsahují všechny potřebné součásti pro měření impedance. Takových čipů stále existuje poměrně málo. Příkladem může být čip AFE4300 od Texas Instruments, který je pomocí impedance schopný měřit tělesnou váhu a složení lidského těla. Ten s okolím komunikuje pomocí sběrnice SPI. Podobnou součástí je i AD5933 od společnosti Analog Devices. Ta patří mezi často používaná řešení pro měření impedance [6, 7, 8]. Čip AD5933 byl vybrán i pro účely navrhovaného zařízení.

Zařízení se skládá z analogové a digitální části. Jádrem analogové části je čip AD5933, který je schopný generovat sinusový signál s nastavitelnou frekvencí i amplitudou a analyzovat jeho změny po průchodu zkoumaným objektem. Jeho výstupem je reálná a imaginární složka impedance v podobě dvou šestnáctibitových vzorků. Analogová část navrhovaného řešení vychází z [1]. Funkční bloky (obrázek 3) zůstaly zachovány, ale některé komponenty byly nahrazeny za vhodnější, či dostupnější. Tato část je navržena tak, aby odstranila stejnosměrnou složku ze signálu a zmenšila jeho amplitudu. Také umožňuje čtyřelektrodové měření s čipem AD5933, který je původně určený pro dvuelektrodové měření. Digitální část tvoří modul

AD5933



Obrázek 2. Části systému pro měření impedance. Symbolicky je zakreslen i čip AD5933, který všechny potřebné části obsahuje.

Linkit Smart 7688, který se stará o řízení celého zařízení. Jedná se o modul obsahující systém na čipu MT7688, jenž umožňuje provozovat OS Linux. Komunikace mezi analogovou a digitální částí probíhá pomocí odizolované sběrnice I2C. Aby odpadly náklady na pořízení drahého zobrazovacího panelu, je zařízení navrženo tak, aby většina interakce s deskou probíhala pomocí webového rozhraní. Uživatel má možnost se připojit k zařízení prostřednictvím tabletu, či chytrého telefonu, a vidět historii měření, stáhnout naměřená data, provádět základní analýzu apod. Pro řešení situací, kdy není možné desku připojit k WiFi a ovládat ji přes web, je zařízení vybavené i malým grafickým displejem a tlačítky.

Řešení odstraňuje zmíněné problémy, kterými čip AD5933 trpí a umožňuje autonomní měření impedance biologických vzorků. Přináší také možnost analýzy impedance v průběhu času.

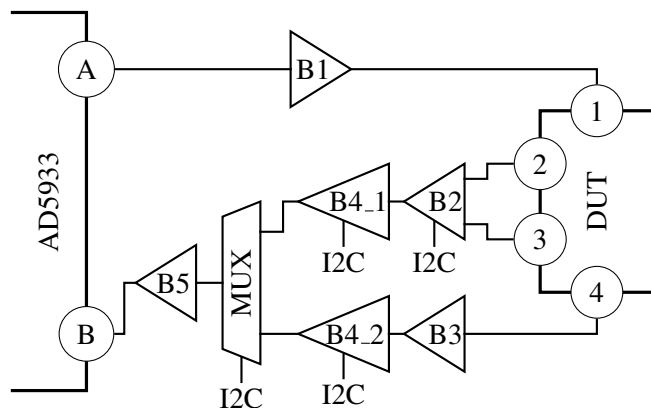
2. Měření impedance v číslicových systémech

Hlavní části číslicového systému pro měření impedance zobrazuje obrázek 2. Na vstup n -bitového čítače CNT je připojen zdroj hodinového signálu s nastavitelnou frekvencí. Výstup tohoto čítače je připojen na vstup digitálně-analogového převodníku (DAC), který generuje sinusový signál. Tento signál je přivedený na zkoumaný objekt (DUT), který může způsobit změnu jeho parametrů. Výsledný signál je pomocí analogově-digitálního převodníku (ADC) převeden opět do číslicové podoby, navzorkován a pomocí algoritmu diskrétní fourierovy transformace FFT z něj získáme reálnou a imaginární složku impedance, popřípadě její absolutní hodnotu a fázový posuv.

3. Implementace pomocí AD5933

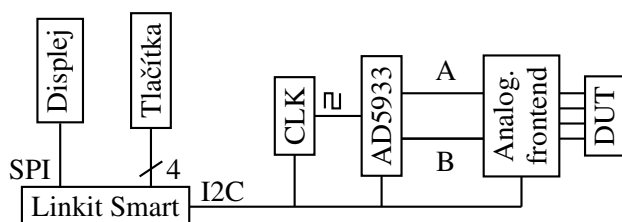
Čip AD5933 v sobě kombinuje části CLK, CNT, DAC, ADC i FFT. Na obrázku 2 je symbolicky zakreslen vzhledem ke zkoumanému objektu. Ten připojujeme

mezi dva piny čipu, označené A a B. Jak již bylo zmíněno výše, není výstupní signál AD5933 vhodný ke zkoumání biologických vzorků. Mezi čip a DUT tak jsou ještě vloženy obvody, které signál vhodně upravují. Tato část je dále nazvaná *analogový frontend*.



Obrázek 3. Blokové schéma obvodu pro úpravu signálu z AD5933 pro účely měření impedance biologických vzorků pomocí čtyř elektrod.

Obrázek 3 zobrazuje blokové schéma navrhovaného obvodu. Blok B1 odstraňuje stejnosměrnou složku signálu a zmenšuje jeho amplitudu. Bloky B2 a B4_1 tvoří napěťovou větev, bloky B3 a B4_2 tvoří proudovou větev. Multiplexor MUX vybírá z těchto větví a B5 k vybranému signálu přidává stejnosměrnou složku. Blok B5 slouží k opětovnému přidání stejnosměrné složky k analyzovanému signálu, neboť AD5933 neumí analyzovat záporný signál. Také zde dochází k zesílení signálu.



Obrázek 4. Blokové schéma celého navrhovaného systému

3.1 Frekvence signálu

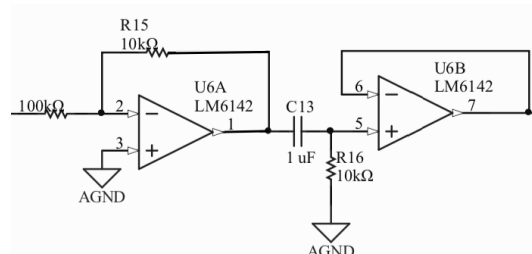
Frekvenci generovaného signálu je bez přídavného obvodu hodin možné volit mezi 5 kHz a 100 kHz. Pro analýzu impedance při nižších frekvencích je nutné vnitřní zdroj hodinového signálu 16 MHz nahradit vnějším zdrojem o nižší frekvenci. K tomu je v zařízení použit programovatelný oscilátor LTC6904, který umožňuje měření frekvencí od desítek Hz výše (blok CLK v obrázku 4).

Tabulka 1. Čtyři možné rozsahy signálu a jejich amplituda před a po úpravě pomocí bloku B1 z obrázku 3.

Rozsah	Amp. před B1	Amp. po B1
1	990 mV	99 mV
2	485 mV	48,5 mV
3	191,5 mV	19,15 mV
4	99 mV	9,9 mV

3.2 Amplituda signálu

Amplitudu napětí výstupního signálu z AD5933 je možné zvolit ze čtyř rozsahů, přičemž každému rozsahu navíc odpovídá různá stejnosměrná složka, kterou napětí obsahuje. Blok B1 na obrázku 3 tuto stejnosměrnou složku odstraňuje a desetkrát zmenšuje amplitudu signálu. Tabulka 1 ukazuje možné amplitudy signálu před a po úpravě pomocí B1.



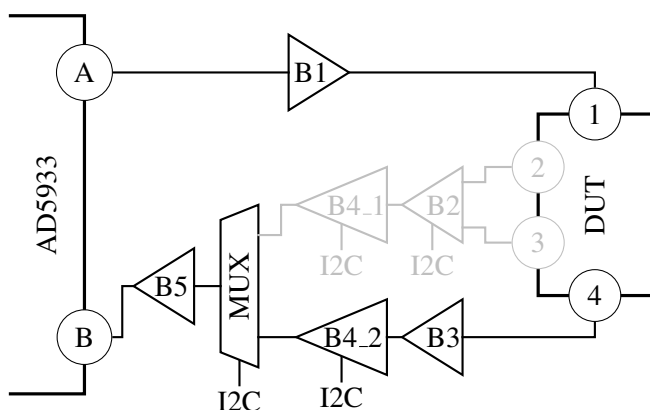
Obrázek 5. Blok B1 tvoří dva operační zesilovače, mezi které je zapojena horní propust. Zesilovač U6A zeslabí procházející signál a horní propust z něj odstraní stejnosměrnou složku. Zesilovač U6B slouží k impedance oddělení U6A od DUT, aby nedocházelo k ovlivňování zdroje signálu analyzovanou impedancí.

3.3 Měření objekt – DUT

Na obrázku 3 je zkoumaný objekt symbolicky zakreslen jako DUT. Na navržené desce tomuto odpovídá konektor RJ12, který slouží k připojení měřících sond. Typicky se jedná o sondy s AgCl peletami. Tyto sondy mohou být dvoelektrodové i čtyřelektrodové.

3.4 Čtyřelektrodové měření

Bloky B2, B3, B4_1 a B4_2 umožňují čtyřelektrodové měření. Na elektrodu 1 DUT přivádíme proud, který měříme na elektrodě 4. Tento signál pomocí B3 zesílujeme. Blok B2 slouží k měření napětí mezi elektrodami 2 a 3. Bloky B4_1 a B4_2 jsou identické. Je možné díky nim zesílit napěťovou, či proudovou větev 5,7x, nebo 32x. Multiplexorem potom střídavě dochází k výběru napěťové a proudové větve a je tak z těchto dvou naměřených hodnot možné vypočítat výslednou impedanci. Zesílení v blocích B4_1, B4_2 a multiplexor jsou řízené přes I2C.



Obrázek 6. Dvouelektrodotvé měření. Napěťová větev (B2, B4_1) je nevyužita.

3.5 Dvouelektrodotvé měření

I když je zařízení koncipováno primárně pro čtyř-elektrodotvé měření, je navrženo univerzálně tak, aby umožnilo i méně přesné dvouelektrodotvé měření. Potom není napěťová větev využita. Tuto situaci zobrazuje obrázek 6.

4. Digitální část

Řídicí část je realizována pomocí modulu Linkit Smart 7688. K němu je po sběrnici SPI připojen černobílý grafický displej, který slouží pro zobrazení informací v případě, že se nedaří připojit k WiFi, popřípadě zobrazuje instrukce pro připojení.

Deska řídí analogovou část prostřednictvím sběrnice I2C, která je odizolovaná čipem SI8602. Přes ni je možné softwarově volit zesílení některých operačních zesilovačů, ovládat multiplexor, čip AD5933 a také zdroj hodinového signálu pro AD5933.

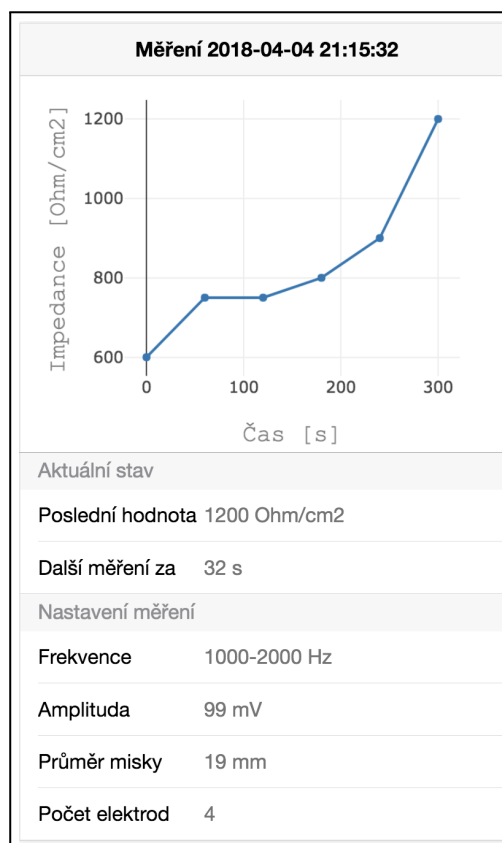
Na desce běží server NodeJS, který se stará o řízení samotné desky a také poskytuje webové rozhraní pro ovládání celého zařízení a zobrazení výsledků. Webová část je napsána pomocí JavaScript knihovny React a využívá grafické prvky z HTML frameworku Framework7, který sjednocuje vzhled webu a nativních aplikací na systémech iOS a Android. Komunikace mezi frontendem a backendem je implementována pomocí knihovny socket.io.

Po připojení k serveru, který na zařízení běží, je uživateli zobrazeno rozhraní, ze kterého je možné nastavit vše potřebné. Při prvním spuštění je uživatel vyzván ke kalibraci zařízení, díky které je možné z měřených hodnot odstranit vliv analogového frontendu. Jedná se o sérii kroků, kterými uživatele rozhraní postupně provádí. Poté může nastavit parametry měření (viz obrázek 7) a spustit jej. Po spuštění je přesměrován na stránku s aktuálními výsledky měření, které se také zaznamenávají na SD kartu. Uživatel si může zobrazit

aktuálně probíhající měření i starší měření z SD karty. Obrázek 8 ukazuje zobrazení probíhajícího měření.

Nastavení měření	
Obecné	
Název	Název
Parametry	
Od	30 Hz
Do	300 Hz
Amplituda	99 mV
Sběr dat	
Opakování	Počet opakování
Perioda měření	Perioda měření
Vybavení	
Elektrody	2
Průměr misky	10 mm
Spustit měření >	

Obrázek 7. Nastavení měření



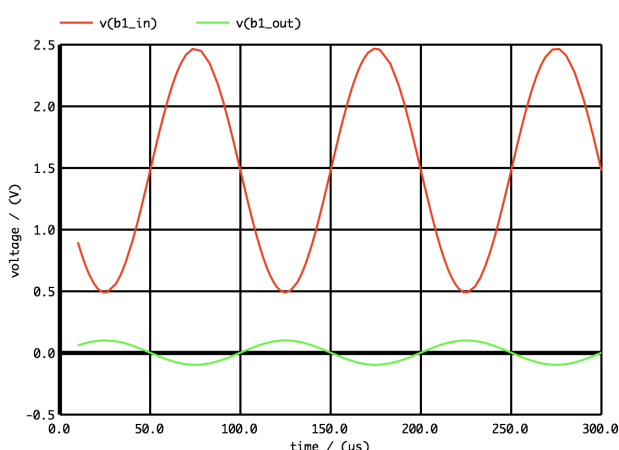
Obrázek 8. Zobrazení výsledků měření

5. Požadavky na bezpečnost

Protože se jedná o zařízení, které bude používáno v laboratoři, je třeba pamatovat i na bezpečnost. Měření biologických vzorků totiž často probíhá ve vodných roztocích, a v případě poruchy zde hrozí zvýšené riziko úrazu elektrickým proudem. Napájení analogové části i I2C sběrnice jsou proto od zbytku zařízení zcela odizolovány, a to až do 3000 V.

6. Verifikace analogového frontendu

Jednotlivé bloky analogového frontendu byly odsimulovány pomocí simulátoru SPICE a poté spojeny do celého systému, který byl opět odsimulován. Cílem simulací bylo ověření funkčnosti analogové části pro požadované frekvence procházejícího signálu a také hodnoty měřené impedance. Na základě simulací byl ověřen teoretický návrh a poté vyrobena deska plošných spojů. Zdrojové kódy simulací jsou dostupné v příložených materiálech.

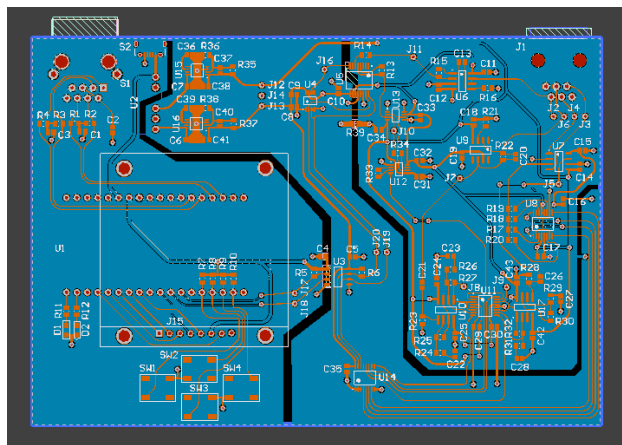


Obrázek 9. Výsledek simulace bloku B1. Červeně je zakreslen signál před úpravou blokem B1, zeleně signál po úpravě.

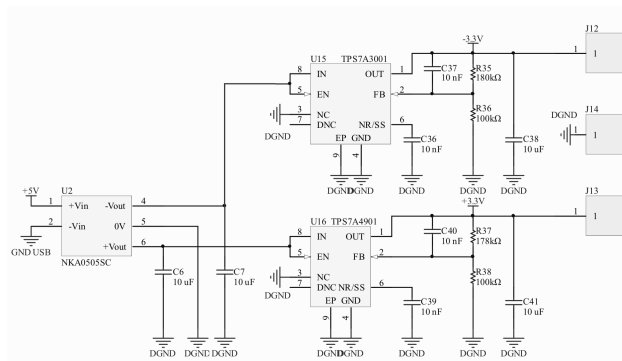
7. Deska

Schéma celé desky, včetně návrhu PCB je dostupné v příložených materiálech. Deska je napájena pomocí konektoru microUSB a je tak možné ji napájet i z powerbanky. Na desce nalezneme celkem tři země. První je země USB konektoru, ke které jsou připojeny modul Linkit Smart, tlačítka a displej. Ta je oddělena DC/DC izolátorem od digitální země, ke které je připojena digitální část obvodu, která se stará o řízení analogového frontendu (zesílení operačních zesilovačů, výběr mezi napěťovou a proudovou větví, ...). Třetí zemí je analogová země, která slouží k napájení operačních zesilovačů. Dle doporučení z dokumentace čipu AD5933 [9] jsou digitální a analogová země propojeny v jednom místě, blízko u AD5933, a také je jedna

strana desky určena pouze pro země (kromě několika propojů, které nebylo možné provést jinak). Spoje na desce mají zaoblené ohyby, což doporučuje Bruce Carter ve svém článku o návrhu plošných spojů [10].



Obrázek 10. V obvodu se vyskytují celkem tři země. Na obrázku jsou zakresleny jako modrá plocha. Zleva jsou to země USB konektoru, země digitálních součástí analogového frontendu a analogová země.



Obrázek 11. Schéma napájení. NKA0505 je DC/DC izolátor, který odděluje napájení části s modulem Linkit Smart od napájení zbytku desky. Zároveň převádí napětí 5V na dvě symetrická napětí $\pm 5V$. Zbývající dva čipy jsou LDO obvody, které z $\pm 5V$ vytvoří $\pm 3.3V$, ze kterých je napájen analogový frontend.

8. Závěr

Tato práce představila hlavní problémy, se kterými se při měření biologických vzorků setkáváme a ukázala jejich řešení.

Součástí práce je i návrh prototypu zařízení, který využívá čip pro měření impedance AD5933. Již od počátku bylo zařízení konstruováno s ohledem na zvýšené požadavky z pohledu bezpečnosti. Celá analogová část je proto elektricky izolovaná od řídicí části systému, který je napájen ze sítě. Zařízení předpokládá připojení standardních sond prostřednictvím konektoru RJ12.

Vzhledem k tomu, že čip AD5933 není přizpůsoben práci s biologickými vzorky, bylo nutné vytvořit analogovou část upravující signál z AD5933 a umožňující připojení sond používaných pro tato měření. V rámci práce vznikla i deska plošných spojů. Tato část představovala největší výzvu celé práce. Aby byly vyloučeny chyby, byla celá analogová část namodelována v nástroji MacSpice, který využívá SPICE simulátor.

Zařízení bylo navrženo s ohledem na cenu, proto jeho součástí není velký zobrazovací panel, ale je možné jej ovládat z PC, mobilního telefonu či tabletu. Řízení zajišťuje modul Linkit Smart 7688, který zpřístupňuje výsledky měření prostřednictvím webového rozhraní. Je tak možné měřit nejenom aktuální hodnotu impedance pro zvolené frekvence, ale i sbírat tyto hodnoty v čase.

Zařízení najde uplatnění v biologických laboratorích, které potřebují měřit mikroskopické biologické vzorky, jako jsou například buňky, buněčné membrány, či viry v krvi.

Poděkování

Děkuji docentu Zdeňku Vašíčkovi za jeho nápady a vedení při tvorbě práce. Dále také děkuji inženýru Václavu Šimkovi za pomoc s přípravou desky plošných spojů.

Literatura

- [1] Cédric Margo. A four-electrode low frequency impedance spectroscopy measurement system using the AD5933 measurement chip. *Physiological Measurement*, 2013.
- [2] Balaji Srinivasan, Aditya Reddy Kolli, Mandy Esch, Hasan Abaci, Michael L Shuler, and James J Hickman. Teer measurement techniques for in vitro barrier model systems. *Journal of laboratory automation*, 20, 01 2015.
- [3] Label-free, real-time cell analysis in a 96-well format. <https://www.aceabio.com/products/rtcaspl/>. Dostupné: 5.4.2018.
- [4] Bionas Discovery 2500 system. <http://www.bionas-discovery.com>. Dostupné: 5.4.2018.
- [5] MERS00002, Millicell ERS-2 Voltohmmeter. <http://www.merckmillipore.com>. Dostupné: 5.4.2018.
- [6] Konrad Chabowski, Tomasz Piasecki, Andrzej Dzierka, and Karol Nitsch. Simple wide frequency range impedance meter based on ad5933 integrated circuit. *Metrology and Measurement Systems*, 22.
- [7] Liviu Breniuc, Valeriu David, and Cristian-Győző Haba. Wearable impedance analyzer based on ad5933. *EPE 2014 - Proceedings of the 2014 International Conference and Exposition on Electrical and Power Engineering*, pages 585–590.
- [8] Mohd Akmal Mhd Yusoff. Development of an ad5933-based impedance meter prototype for impedimetric sensor applications. *Procedia Chemistry*, 20:56–59.
- [9] AD5933, 1Msps. <http://www.analog.com/media/en/technical-documentation/data-sheets/ad5933.pdf>. Dostupné: 5.4.2018.
- [10] Bruce Carter. The PCB is a component of op amp design. *Texas Instruments Incorporated*, 2005.