



M Ű E G Y E T E M 1 7 8 2

Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem
Villamosmérnöki és Informatikai Kar
Elektronikai Technológia Tanszék

Pankász Kitti Alexandra

**FOLYADÉKMINTÁK OPTIKAI
VIZSGÁLATA MIKROFLUIDIKAI
KÖRNYEZETBEN**

Tudományos Diákköri Dolgozat

BELSŐ KONZULENS

Dr. Harsányi Gábor

KÜLSŐ KONZULENS

Dr. Szabó Zoltán

Dr. Fürjes Péter

BUDAPEST, 2023

Tartalomjegyzék

Összefoglaló	3
Abstract.....	4
1 Bevezetés	5
2 Optikai mérés technika	6
2.1 Anyag és fény kölcsönhatása	6
2.2 Ultraibolya és látható tartomány	8
2.3 pH mérés optikai módszerekkel.....	8
2.4 ADPD4101 chip mérési és digitális jelfeldolgozó lehetőségei.....	11
2.5 Fotodiódák kapcsolástechnikája	13
3 Front end IC kommunikáció megvalósítása.....	15
3.1 Vezérlőszoftver	15
3.2 Kalibrációs függvények megvalósítása és fejlesztése	17
3.2.1 Integrálási ofszet kalibrálása.....	17
3.2.2 Meghajtóáram kalibrálása.....	17
3.2.3 Teljes kalibráció.....	18
4 pH mérési technikák és tesztelésük	19
4.1 Folyadék vizsgálata spektrométerrel makroküvetében.....	19
4.2 Folyadék optikai mérése front end chippel.....	21
4.3 pH sor transzmissziós spektrumának vizsgálata	24
4.4 pH sor vizsgálata front-end chip segítségével	26
5 Konklúzió.....	31
Irodalomjegyzék.....	33
Függelék.....	35
Ofszet kalibráció kód	35
Áramkalibráció kód	36
Teljes kalibráció kód.....	38

Összefoglaló

Az orvosdiagnosztika és bioanalitika, azon belül is a mikrofluidika alapú diagnosztikai eljárások rohamosan fejlődnek. A mikrofluidikai eszközök célja, hogy az analitikai méréseket minél kisebb folyadéktérfogatban, minél kevesebb felhasznált anyaggal és mintával, automatizálva végezhessük el. Az optikai mérés technika alkalmas lehet a folyadék egyes komponenseinek érintésmentes és akár folyamatos monitorozására.

Az analitikai méréseinkhez egy Organ-on-Chip rendszerekkel kompatibilis mikrofluidikai küvettát terveztünk és valósítottunk meg, amely köré kompakt optikai mérési elrendezést alakítottunk ki. A LED fényforrások meghajtásához és a jel detektáláshoz az Analog Devices optikai mérésekre fejlesztett ADPD4101 front end chipjét használtuk. A chip számos működési móddal és konfigurációs lehetőséggel bír. Munkám során az optikai detektor rendszer optimalizálásával, megfelelő kiértékelési algoritmus definiálásával és jelfeldolgozó szoftver implementálásával foglalkoztam.

A mérési módok tesztelésével és az analóg jelfeldolgozás paramétereinek optimalizálásával sikerült elérni, hogy akár 100 μm vastagságú folyadékrétegen is folyamatos optikai mérést tudjunk megvalósítani. A módszer és a mérőrendszer sejtenyésztő platformokban történő alkalmazhatóságát specifikus tápfolyadékok vizsgálatán keresztül elemeztem. Megmutattam, hogy a fenolvörös pH-indikátort tartalmazó tápfolyadékmintákban (Dulbecco's Modified Eagle Medium - DMEM), az oldatban levő indikátor sárga-vörös-bíbor színváltozásának optikai mérésén keresztül nagy pontossággal tudunk következtetni a kémhatására.

Abstract

Medical diagnostics and bioanalytics, including microfluidics-based diagnostic procedures, are developing rapidly. The goal of microfluidic devices is to perform analytical measurements in the smallest possible volume of liquid, with as few materials and samples as possible, in an automated manner. Optical measurement technology can be suitable for non-contact and even continuous monitoring of individual components of the liquid.

For our analytical measurements, we designed and implemented a microfluidic cuvette compatible with Organ-on-Chip systems, around which we created a compact optical measurement arrangement. The ADPD4101 front end chip developed for optical measurements by Analog Devices was used to drive the LED light sources and for signal detection. The chip has many operating modes and configuration options. During my work, I dealt with the optimization of the optical detector system, the definition of a suitable evaluation algorithm and the implementation of signal processing software.

By testing the measurement methods and optimizing the parameters of analog signal processing, it was possible to achieve continuous optical measurement even on a liquid layer with a thickness of 100 μm . I analyzed the applicability of the method and the measuring system in cell culture platforms through the examination of specific nutrient fluids. I showed that in nutrient fluid samples containing the phenol red pH indicator (Dulbecco's Modified Eagle Medium - DMEM), we can infer its spying effect with high accuracy through the optical measurement of the yellow-red-purple color change of the indicator in the solution.

1 Bevezetés

Számos egészségügyi és biológiai kutatás célja sejtek, markermolekulák vagy hatóanyagok nagy érzékenységű vizsgálata, kis mennyiségben való kimutatása, vagy a sejtek molekuláris hatóanyagra adott válaszána pontos követése, monitorozása. Az elmúlt években egyre nagyobb teret nyer a kémiai és élettani folyamatok miniatürizált térfogatban történő megfigyelése és modellezése, illetve minél kisebb sejtpopulációk, és molekulamennyiségek kimutatására alkalmas nagy érzékenységű módszerek kutatása. Ehhez nagyon sok esetben olyan mikrofluidikai rendszereket alkalmaznak, amelyek alkalmasak minimális térfogatú folyadékminták célzott mozgatására, manipulálására. Ezek a Lab-on-a-Chip szerkezetek további érzékelők integrálásával alkalmasak lehetnek további információ kinyerésére akár a folyadékok viselkedéséről, akár azok összetételéről. A mikrofluidikai rendszerek biztosítják a sejtek, marker- és hatóanyagmolekulák egyik legpontosabb roncsolás és érintésmentes vizsgálatát.

Mikrofluidikai rendszerben lehetőségünk van az oldatokat, hatóanyagokat, tápanyagokat szállítani és szállítás közben vagy a szállítás megállításával alkalmunk adódik az adott összetevőket monitorozni, információt kinyerni a koncentrációra vonatkozóan. Ahhoz, hogy ezen adatokat minél egyszerűbben és gyorsabban kinyerhessük egy elektronikus mérőrendszert kell integrálnunk a mikrofluidika köré. Ezzel lehetőségünk nyílik az egyes analizálandó összetevők mérésére minél pontosabb konfigurációt beállítani az eszközökön és gyors másodpercek alatti mérésre lesz lehetőségünk.

2 Optikai mérés technika

Az optikai méréseknél fontos a megfelelő geometriájú mérési összeállítás, mérés során használatos anyagok és a minta megválasztása. Valamint nagyon fontos a célfeladatnak megfelelő mérési módszer, a gerjesztési és detektálási hullámhossztartomány megválasztása is.

2.1 Anyag és fény kölcsönhatása

A fény kettős természettel rendelkezik. Kisebb energiatartomány esetén a hullám természete jelenik meg, míg magasabb tartományokban a részecske természete. A fény és anyag kölcsönhatásakor mind a kettő megjelenhet. A hullámtermészet a fényszórásnál, fényvisszaverődésnél és fénytörésnél, míg a részecsketermészet fényelnyelődésnél.

A fényszórás az a jelenség, mikor a fény a hullámhossznál jóval kisebb részecskéken halad át és közben véletlenszerűen irányt változtat, szóródik. Az átlátszó közegen áthaladó fény időben oszcilláló elektromos tere az atomok és molekulák, mint szóró centrumok töltéseire hatva polarizálja azokat. Fényvisszaverődésnél egy optikailag sima felületről a beesési szöggel azonos szögben tükröződik vissza a fény. Fénytörés pedig két különböző törésmutatójú közeg határán következik be, ahol a fénysugár haladási iránya a Snellius-Descartes törvény alapján módosul. Amikor a fény egy optikailag ritkább közegből egy sűrűbbe lép, az úgy törik meg, hogy a belépő szögnél egy kisebb szöggel halad tovább. A fény azt az utat választja, amelyhez a legkisebb idő szükséges (Fermat-elv).

$$\frac{\sin \alpha}{\sin \beta} = \frac{c_1}{c_2} = \frac{n_2}{n_1}$$

Az a beesési szög, melynél a törésszög 90° , a teljes visszaverődés határszögének nevezzük. Ha az optikailag sűrűbb közegből a közeghatárra a határszögnél nagyobb beesési szöggel érkeznek a fénysugarak, akkor teljes visszaverődésről beszélünk, azaz a fény veszteségmentesen verődik vissza a határfelületről.

A fény egy elnyelő közegen való áthaladás közben a rétegvastagság függvényében exponenciális függvény szerint veszít intenzitásából:

$$J = J_0 * e^{-\mu \cdot x}$$

Ebben az egyenletben J_0 a rétegbe belépő intenzitás, x a rétegvastagság, J a kilépő intenzitás és μ a abszorpció állandó. Az abszorpció állandó függ a foton energiájától, az anyag minőségétől és az anyag sűrűségétől. Analitikában és diagnosztikában nem csak szilárd testekkel lép kölcsönhatásba a fény, hanem folyadékokkal, oldatokkal élő szervezetből származó folyadékmintákkal is. A folyadék és fény kölcsönhatás leírására a Beer-Lambert törvényt szokás alkalmazni, melyet gyakran a koncentráció meghatározására használnak.

$$\lg\left(\frac{J_0}{J}\right) = \varepsilon \cdot c \cdot x$$

Az egyenletben az ε a dekadikus moláris extinkciós állandó és c a moláris koncentráció.[14]

Egy foton egy elektronnal hat kölcsön az anyagon belül. Az elektron fel tudja venni ezt az energia adagot, amit a foton szállít és átad neki az interakción során. Egy fényfoton energiája a legkülső pálya elektronjának magasabb kötött állapotba kerülését, gerjesztését fedezheti. A pályák között nagy az energiakülönbség, ami kifelé haladva csökken, majd következik a szabad elektronállapot.

A fénykeltés egyik fő mechanizmusa a spontán fényemisszió, amikor a gerjesztett elektron egy foton kibocsátása mellett egy alacsonyabb energiájú betöltetlen pályára ugrik. Az elektron egy magasabb energiaállapotba kerülhet pl. fotonnal való kölcsönhatás következtében, elektromos tér hatására, kémiai reakció következtében stb. miután az elektron az alacsonyabb állapot felé törekszik vissza. Hogy ezt elérje, jellemzően egy rövid késleltetés után energiát ad le spontán külső hatás nélkül, ami fényemisszió formájában jelenik meg.

Az anyag fény kölcsönhatást sok területen alkalmazzák a mérés technikában. Ezek közül pár pl.: koncentráció meghatározás fényabszorpcióval, anyagi minőség meghatározás Raman vagy infravörös spektroszkópiával, orvosi diagnosztikában véroxigénszint mérés.

2.2 Ultraibolya és látható tartomány

Az ultraibolya és látható (UV-Vis) tartományon végzett spektroszkópiai mérések magában foglalják az abszorpciós és a reflexiós méréseket.[1] Az UV tartományban felvett spektrumok az abszorbeáló molekula telítettségét mutatják. Ez azért lehetséges, mert csak a többszörös kötéssel rendelkező molekuláknál tapasztalható olyan stabil gerjesztett állapot pár esetet kivéve, hogy abszorpció következzen be a közeli UV-tartományban. Ebben a hullámhossz tartományban átlátszónak detektálhatóak a telített a szénhidrogének, az alkoholok és az éterek. Kivételt képeznek az acetilének, a monofunkciós olefinok, oximok, amidok és karbonsavak, mert ezen anyagok maximumot megközelítő elnyelő csúcsai csak 200 nm felett mérhetőek, azaz csak közeli UV tartományon[2]. Biológiai anyagok, szerves molekulák detektálására leginkább a közeli és közép infravörös tartomány felel meg, ahol a -CH, -OH, -NH, stb. magasabb rendű vibrációs elnyelési sávjai találhatóak.

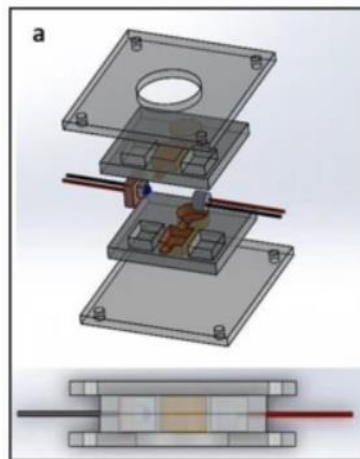
2.3 pH mérés optikai módszerekkel

A pH mérés lehetőséget ad számunkra, hogy egyes kémiai folyamatokat nyomon követhessünk, megfigyelhessük azok apró változásait és a mérés következtében akár menet közben változtassunk a kémiai folyamaton. A pH mérés elterjedt módszerei a kolorimetriás módszerek: ilyenkor indikátor oldatok vagy indikátorpapírok színváltozásával következtetünk a kémhatásra, valamint a pontosabb potenciometriai mérés, ahol elektródák segítségével határozzák meg kémhatást vizes oldatokban a hidrogénionok aktivitásának mérésén keresztül.[3] Egy további lehetőség az előbb említett kolorimetriás módszer továbbfejlesztése, amikor a színváltozást kontrollált körülmények között precíz optikai szenzorral mérjük meg. Ez a mérési módszer azért jobb az előbb említettekkel szemben, mert kis méreteken is lehet vizsgálatot végezni, nincs elektromos kontaktus és folyamatos monitorozásra is tökéletesen alkalmas. Az optikai pH-érzékelők egyes indikátormolekulák elnyelő képességének pH-függés miatt bekövetkezett változásain alapulnak.[4] Sejt és szövettenyésztő médiumok gyakori összetevője a fenolvörös pH-indikátorfesték. Ez a festékmolekula a 6,6-8,4 pH tartományban sárga-barnáspiros-élénk pink színátmeneten keresztül jelzi a kémhatást, amit a látható tartományban abszorpcióméréssel lehet detektálni. A méréshez elég megmérni egy jól megválasztott hullámhosszon (pl. LED fényforrással) a folyadékon

átjutó fényintenzitást, de egy második hullámhossz használatával pontosíthatjuk a mérést, kiküszöbölhetjük a környezeti zajokat, a mérési geometria bizonytalanságát, vagy a folyadék egyéb szórási veszteségeit is. [5]

Napjainkban célunk minél olcsóbb és egyszerűen előállítható mérési módszereket megvalósítani és minél rövidebb méréseket véghez vinni. Egy ilyen mérőrendszert Seyed Ali Mousavi Shaegh és társai dolgoztak ki. Egy valós idejű pH monitorozásra alkalmas rendszert hoztak létre, amellyel mikrofluidikákban lehetővé tettek különböző pH értékű sejttenyésztő tápoldatok mérését. A tápoldatok, amiben sejteket tenyésztenek a pH érték annak függvényében változtatják színüket, hogy a sejtsokzorozódás mekkora mértékben ment már végbe. A fejlesztésük során 0,5 mm vastagságú mikrofluidika köré tervezték a detektort. A bioreaktoros minták valós idejű pH-monitorozását a tápközegben elérhető fenolvörös fényelnyelési szintjének kimutatásával valósítottuk meg. Ezenkívül egy alacsony költségű és felhasználóbarát elektronikus felületet fejlesztettek ki egy Arduino mikrokontroller platform segítségével. A méréseik azt mutatták, hogy a sejttenyésztő folyadékot és sejteket a mikrofluidikába töltve lehet pH-t detektálni[6].

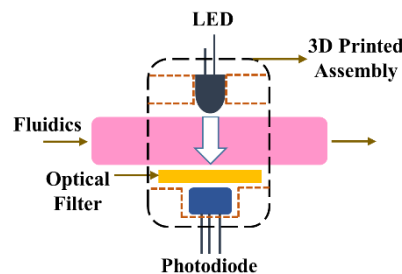
Ecem Saygili és társai egy optikai érzékelővel ellátott mikrofluidikát hoztak létre, hogy a gyógyszer okozta tüdőkárosodást tudják vizsgálni többrétegű bakteriális cellulózzal és zselatin-metakriláttal. A mérést egy $4 \times 4 \text{ cm}^2$ -es mikrofluidikai platformba integrálták. A mikrofluidikai csatornát oldalról világították meg 430 nm és 560 nm hullámhosszú LED-ekkel. A mikrokontroller kalibrálását, mely Arduino volt, fenolvörös sejttenyésztő folyadékkal végezték. A méréseik sikeresek voltak, a pH érzékelővel a kis pH értékbeli változásokat jól nyomon tudták követni, de csak egy viszonylag nagy mikrofluidikai csatornában [7][8].



2. ábra Ecem Saygili és társai által fejlesztett mikrofluidikai platform [7]

Arun Asif és társai betegségek és gyógyszerek valós idejű monitorozásához fejlesztettek egy mikrofluidikába integrált mérési módot. A mikrofluidikába pH érzékelőt terveztek, amely egy fehér LED-ből, optikai szűrőből és egy fotodiódából állt. A fluidikai csatorna vastagsága 3 mm volt. A mérést a közegen áthaladó fény intenzitásának változására alapozták. Az érzékelőt úgy valósították meg, hogy a fenolvörös tápfolyadék színének változásait mérje. A beérkező optikai jeleket Arduino mikrokontrollerrel detektálták. A kalibrálást RPMI (Roswell Park Memorial Institute) tápközeg segítségével végezték. A mérés során a pH érzékelővel sikerült kimutatni a sejtek sérülését és a gyógyszerhatékonyt is kimutatni [9] .

Muhammad Asad Ullah Khalid és társai tüdőrák sejtek élő monitorozását tűzték ki célul bioszenzorokkal. Az egyik bioszenzor amit használtak egy pH érzékelő volt. Az érzékelő egy fehér LED-ből, egy optikai szűrőből és egy fotodiódából áll. A mérést egy 0,5 mm átmérőjű kapillárisban valósították meg. Sejttenyésztő folyadékként fenolvöröst tartalmazó tápfolyadékot alkalmaztak. Az optikai jel detektálására ezen esetben is Arduinot alkalmaztak. A pH ezen mérési összeállításnál is nagy érzékenységgel ($489 \pm 17 \text{ mV/pH}$) sikeresen detektálható volt. [10]

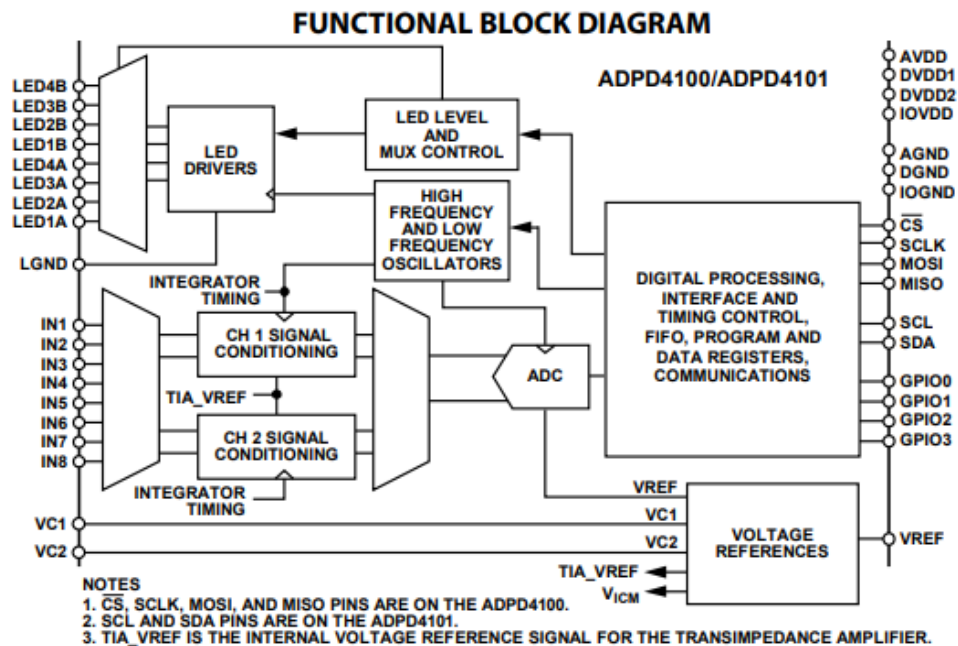


3. ábra: Muhammad Asad Ullah Khalid és társai által fejlesztett pH mérési elrendezés [10]

A pH mérés további fejlesztésére még bőven van lehetőség. Ezek közé tartozik, a fluidikai csatorna méretének csökkentése, ezáltal még kevesebb folyadékra lenne szükség. A kis folyadékvastagság miatt az optikai úthossz és egyben az elnyelő közeg mennyisége is csökken. Az optikai úthosszat meg lehet növelni a fény csatornába való becsatolásával vagy többszörös reflexiós elrendezéssel. A jel/zaj viszony csökkentését és a mérési paraméterek még finomabb kalibrálásával, és az analóg és digitális jelfeldolgozási módszerek megválasztásával érhetjük el.

2.4 ADPD4101 chip mérési és digitális jelfeldolgozó lehetőségei

Az optikai mérésekhez az Analog Devices által fejlesztett ADPD4101 chipet választottuk, amely komplett multimodális érzékelőként működik. Az eszköz akár 8 fotodiódát is tud működtetni és 8 különböző bemeneten mérni feszültség- vagy áramjelet. 12 időrés (timeslot vagy csatorna) áll rendelkezésre az eszközben, amellyel 12 különböző előre konfigurált mérést is el lehet végezni. A regiszterek írása és olvasása, tehát a mértadatok lekérése és a méréskonfiguráció beállítása is I2C interfészen keresztül zajlik. A vezérlőáramkör rugalmas LED meghajtást és szinkron érzékelést tesz lehetővé. Az eszköz 1,8 V-os analóg magot és 1,8 V/3,3 V-os kompatibilis digitális bemenetet/kimenetet (I/O) használ. Az analóg frontend (Analog Front End - AFE) kiküszöböli az aszinkron modulált interferenciából, jellemzően a környezeti fényből eredő jeleltolásokat és zavart, így nincs szükség optikai szűrőkre vagy külső vezérlésű egyenáram-megszakító áramkörre. Többféle üzemmód áll rendelkezésre, amelyek lehetővé teszik, hogy az ADPD4101 érzékelő alkalmas legyen a fotodiódák, biopotenciálektródák, ellenállás-, kapacitás- és hőmérsékletérzékelők szinkron mérésére.



4. ábra: ADPD4101 funkcionális blokkdiagrammja

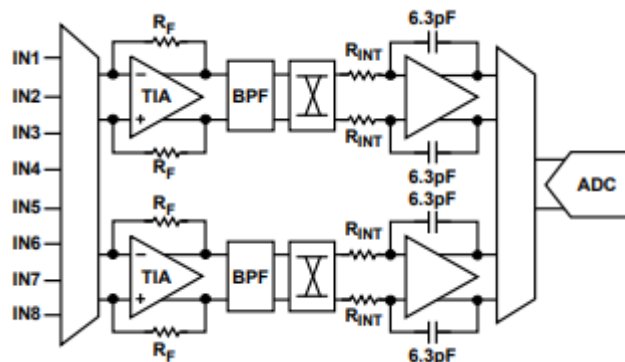
Az ADPD4101 digitálisan állítható 0-200 mA-es áramgenerátorokat tartalmaz, amik áramnyelő konfigurációban tudnak meghajtani akár 4 LED-et is egy időben (vagy

más tetszőleges szenzort). Az áramgenerátort impulzusüzemben lehet használni 0-255 μ s közötti impulzusszélesség megválasztásával.

Az ADPD4101 analóg jelfeldolgozó része (5. ábra) a 8 bemenetű multiplexer után a következő konfigurálható és ki/be kapcsolható elemekből áll:

- Transzimpedancia-erősítő (TIA) változtatható erősítéssel egybemenetű vagy differenciális konfigurációs lehetőséggel
- Sáváteresztő szűrő (BPF) fix átviteli karakterisztikával
- Integrátor változtatható bemeneti ellenállással
- 14 bites analóg-digitál átalakító (ADC)

A 8 bemenet valamelyike egy csatornán, két választott bemenete két külön csatornán vagy egy bemenetpár egy csatornán differenciális módban is mintavételezhető.



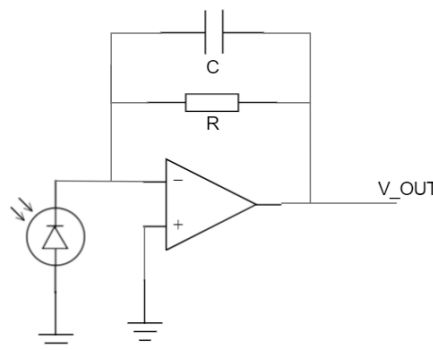
5. ábra: Analóg jelút blokkdiagram, [15]

A front end chip analóg modulját a méréseink során tipikusan úgy konfiguráltuk, ami megfelel a szinkron működésű analóg integrálási módnak. Ennél a beállításál egy rövid, 2 μ s-os LED impulzus kiadásával szinkronban a fotodióda áramát a TIA-val erősítve egy az impulzusra illesztett sávszűrőn engedjük át, majd 1 vagy akár több impulzust összeintegrálva alakítjuk át digitális adattá az ADC-n. Mivel a BPF kimenetén természetes módon egy nagyobb pozitív és egy ezt követő kisebb negatív impulzus is megjelenik, mindkét impulzust a megfelelő előjellel integráljuk fel. További zajcsökkentést érhetünk el egy speciális analóg chopperelési technikával és a nagyszámú ismétléssel, átlagolással.

2.5 Fotodiódák kapcsolástechnikája

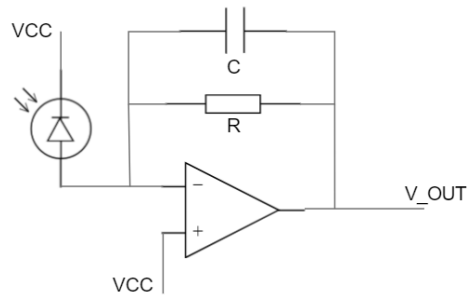
A fotodiódára érkező fény áramot (I_d) generál, ami a műveleti erősítő kimeneti feszültségének növekedéseként jelenik meg. Az I_d iránya ellentétes a dióda nyitóirányú működésével. A fény elektron-lyuk párokat kelt a pn-átmenet kiürített rétegében, amit a tértöltés a dióda katódjára és anódjára vezet. A fotoáram arányos a beérkező fényintenzitással.

A fotodiódák előfeszítés nélkül vagy záróirányú előfeszítéssel is használhatók. Előfeszítés nélkül (fotovoltaikus módban) a sötétáram nagyon alacsony lehet, viszont rosszabb a válaszidő, mivel a fotodióda kapacitása maximális, ami lassabb működési sebességhez vezet. Fotovoltaikus módban a fotodióda kimenete nagy intenzitású megvilágítás esetén nemlineáris karakterisztikát mutat. A fotovoltaikus mód alacsony frekvenciájú, nagy érzékenységű mérést igénylő alkalmazásoknál előnyös. Zero-bias bekötés esetén (6. ábra) az áramjelet feszültségjellé alakítjuk és az áram-feszültség arányt az R visszacsatoló ellenállás értéke határozza meg. Az erősítő neminvertáló bemeneti kapcsa földelve van, és ha a virtuális rövidre zárás feltételezést alkalmazzuk, akkor tudjuk, hogy az invertáló bemeneti kapocs is mindig körülbelül 0 V-on lesz. Így a fotodióda katódja és anódja egyaránt 0 V-on van tartva. A műveleti erősítő olyan kimeneti feszültséget generál, ami a visszacsatoló ellenálláson éppen a fotoárammal megegyező áramot generálja. Ez a bekötési mód azért előnyös, mert minimális a szivárgási áram, minimális a zaj, viszont így a legnagyobb fotodióda kapacitása, ami lassítja a válaszidőt. [16][17]



6. ábra: A nulla feszültségű fotodióda bekötési mód

A második esetben a fotodióda anódját a TIA invertáló bemenetére kötjük, katódján keresztül egy kis pozitív feszültséggel előfeszítjük. A TIA nem-invertáló bemenetére pozitív feszültséget kötve toljuk el a kimeneti jelszintet. Ezt a fotodióda kapcsolási módot azért előnyös, mert záróirányú előfeszítése miatt kisebb a dióda kapacitás, így a válaszidő gyorsabb, nagyobb az érzékenység, nagyobb fényintenzitások mellett is még lineárisa a detektor válasza, viszont a szivárgási áram nagyobb, ami egyenáram-eltolást és nagyobb zajt okoz.



7. ábra: Záróirányban előfeszített fotodióda bekötési mód

3 Front end IC kommunikáció megvalósítása

3.1 Vezérlőszoftver

A mikrokontrollerhez használt programozási nyelv C++ Arduino környezet. Az Analog Devices által elkészített (EVAL-CN0503-ADRZ) demonstrációs eszköz teljes szoftveres környezete rendelkezésünkre állt, de a meglévő kódokat C nyelvről C++ nyelvre és az általunk használt mikrokontroller megfelelő alap parancskészletére kellett átírni. Az új Arduino Nano Every mikrokontrollerre és ADPD4101 front end chipre specializált program így már csak 7 fájlból tevődik össze (leszámítva a további meghívott néhány standard könyvtárat):

main.ino	indítja és kiértékeli a méréseket, kezeli a soros kommunikációt: a soros porton érkező parancsokat fogadja és küldi a válaszokat
adpd4101.cpp és .h	az I2C-s kommunikációért felel és a frontend chip driver függvényeit tartalmazza (regiszterek írása, olvasása, adatkérés, egyéb alapfunkciók) [11]
adpd4101_app.cpp és .h	a frontend chip magasabb rendű applikációs függvényeit tartalmazza (inicializálás, üzemmódok kapcsolása, mérési szekvenciák, kalibrációs rutinok)
adpd4101_registers.h	a frontend chip regiszterei elnevezéseinek definiálásait tartalmazza
adpd4101_configuration.h	inicializálási és mérési konfigurációs beállításokat tartalmaz [12]

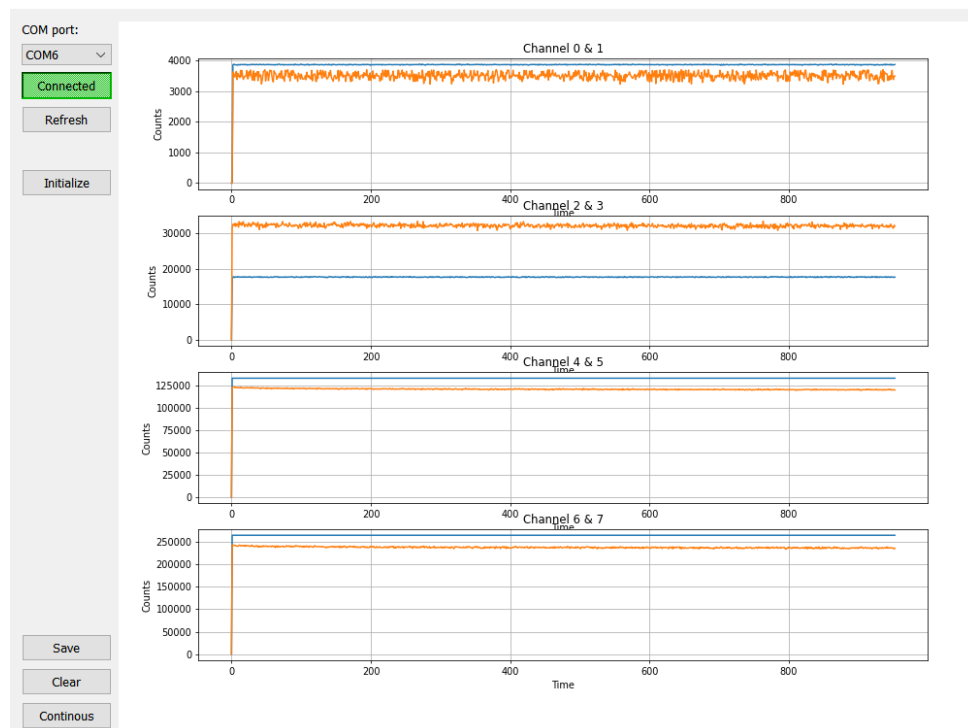
1. Táblázat: 7 programfájl

A konfigurációs fájl az egyes időrésekhez tartozó beállításokat tartalmazza: bemenet csatornájának kiválasztása, bemenet pár kiválasztása, LED kimenetének és áramának beállítása, időrés bemenetének előzetes feszültségének beállítása, TIA feszültségének, pulzálási feszültségének és ellenállásának megadása. Ezen kívül

tartalmazza a beolvasott érték bájtjainak számát, az egy cikluson belül található ismétlési számot.

Az munkám megkezdésekor rendelkezésemre állt egy kezdetleges programverzió, amely alkalmas volt a frontend chippel való I2C kommunikációra, bizonyos konfigurációs adatok feltöltésére, néhány parancs fogadására és végrehajtására, amit a soros porton keresztül (USB-kábel) pl. egy PC terminálprogrammal küldünk neki.

Későbbiekben a megjelenítéshez és a mérési adatok teszteléséhez egy Python programozási nyelven írt kezdetleges grafikus megjelenítő programot is használtam.



8. ábra: A szoftver kezelő modulja

3.2 Kalibrációs függvények megvalósítása és fejlesztése

3.2.1 Integrálási ofszet kalibrálása

Az integrálási ofszet állítására azért volt szükségünk, hogy megtaláljuk azt a megfelelő ofszet időt, melynél a legnagyobb mért intenzitást kapjuk. (A BPF kimenetének nullátmenete essen egybe az integrálás előjelének váltásával). Ehhez olyan függvényt készítettem, aminél meg kell adni a kalibrálandó csatorna számát. A függvény először kiolvassa az adott csatornához tartozó LED ofszetét, ami az integrálási ofszet keresés kezdeti értéke lesz. Létrehoztam egy ciklust, aminek feltételnek adtam, hogy csak 64-szer fusson végig, mert több mérés után azt tapasztaltam, hogy ennyi mérés elég ahhoz, hogy egy maximum helyet meghatározhassak. A ciklusban az integrálási offsetet mindig növelem 31,25 ns-al, ami a legkisebb időfelbontás. Az integrálási ofszet regisztere 2 részből áll: az alsó 5 biten 31,25 ns-os idővel tudom növelni az integrálási időt, míg a felső 8 biten 1 µs-al. A ciklusban egy maximumkeresést hajtok végre, majd a 64 mérés után a legnagyobb visszaolvasott mért intenzitáshoz tartozó ofszet értéket írom bele az integrálási ofszet regiszterébe, amit a függvény a végén ki is ír a soros porton keresztül. A függvény helyes működésének ellenőrzésére minden csatornán elvégeztem az integrálási ofszet kalibrálását, a mért adatokat ábrázoltam és onnan is leolvastam a maximumokat, melyek megegyeztek a program által meghatározottal.

3.2.2 Meghajtóáram kalibrálása

Optimális árambeállításra azért van szükség, hogy a lehető legnagyobb fényintenzitással tudjunk mérni, de ne vezéreljük túl sem a fotodiódát, sem a TIA-t. Az áramkalibráló függvény bemeneti adatai: a kiválasztott csatorna száma, a LED-hez tartozó maximális áramkorlát és az elérni kívánt jelszint százalékban kifejezve. A függvény először lekérdezi a front end chip megfelelő regiszteréből, hogy melyik LED van használatban a kiválasztott csatornánál, be van-e kapcsolva a „zero adjust” (digitális ofszet érték) bit és a mennyi impulzusok száma. Egy feltételes cikluson belül egy mérést elvégzek és utána megvizsgálom, hogy az aktuálisan mért jel az ofszetkorrekció és az impulzusszám-nomrálás után az ADC szaturációs értékének hány százalékánál jár. Ezt a következő képlettel számolom:

$$\text{jelenlegi százalék} = \frac{\text{beérkező adat} - \text{zeroadj} * 2048}{\text{impulzusszám} * \text{ADC szaturáció}}$$

Ezután megvizsgálom, hogy ez az érték elérte-e már a kívánt célértéket vagy elérte-e már a maximális meghajtóáramot. Ha ezek nem teljesülnek akkor az áram értékét 1 egységgel, azaz 1,5 mA-rel megnövelem és újra lefut a mérés és feltételvizsgálat. Azonban, ha bármelyik feltétel teljesül, akkor az áramot egy egységgel kisebb értékre állítom, és beleírom a hozzá tartozó regiszterbe. Ha a kalibrációt üres küvettával végezzük el és a limitet kb. 70-80%-nak választjuk, akkor maximalizálhatjuk a mérőjelet, minimalizálhatjuk a zajt és más minták vagy környezeti háttérfény mellett sem telítődik könnyedén az ADC.

3.2.3 Teljes kalibráció

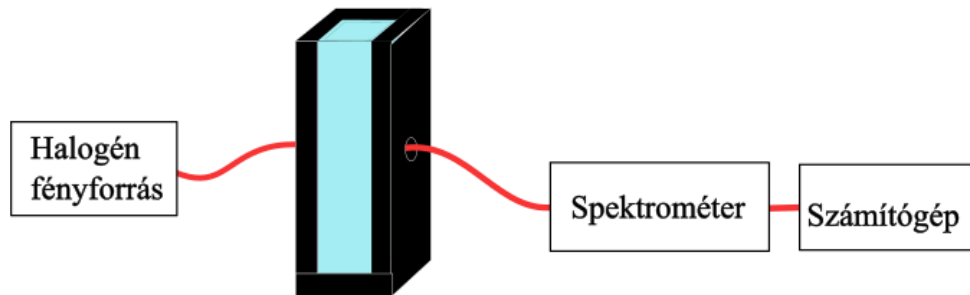
A teljes kalibrációval lehetőségünk nyílik a LED meghajtó árama mellett az erősítő paraméterek és az egy mérésben összeintegrálandó impulzusok számát is automatikusan beállítani. Ahhoz, hogy a környezeti fény és a zaj a lehető legkevésbé befolyásolja az optikai mérést, a lehető legnagyobb hasznos fényintenzitást kell használni. Ezután a TIA erősítését akkorára állítjuk, hogy még ne vezéreljen túl, és így az ADC sem megy telítésbe. Ha még mindig túl kevés a mért jel, akkor beállíthatjuk úgy is az analóg integrátort, hogy több egymás után következő impulzust is felösszegezzen.

A teljes kalibrálástvégző függvény bemenő paraméterei: a kalibrálandó csatorna száma, a LED-hez tartozó maximális meghajtó áram és az elérni kívánt jelszint százalékban kifejezve. Létrehoztam egy ciklust, ami a legkisebb visszacsatoló ellenállástól (legkisebb erősítéstől) indulva elvégez egy meghajtóáram kalibrációt. Ha a meghajtó áram elérte a maximális áramkorlátot és még mindig nem megfelelő a visszamért jelszint, akkor növeli eggyel az erősítés értékét és a ciklus ismétlődik. Ha még a legnagyobb erősítés és a legnagyobb LED meghajtóáram mellett sem értük el a kívánt jelszintet, akkor a keresést az integrálási szám növelésével folytatjuk tovább. Az összeintegrálható impulzusok számát 17-ben maximáltuk, ugyanis a többi szokásos beállítás mellett ennyi impulzus még különösebb gond nélkül belefér egy időrésnek fenntartott időintervallumba. Ha a keresés során bármikor meghaladjuk a kívánt jelszintet, visszalépünk az előző még alkalmas beállításokra beírjuk a front end chip regisztereibe a ezeket a paramétereket és kiíratjuk a kalibrálás eredményét soros porton.

4 pH mérési technikák és tesztelésük

4.1 Folyadék vizsgálata spektrométerrel makroküvetében

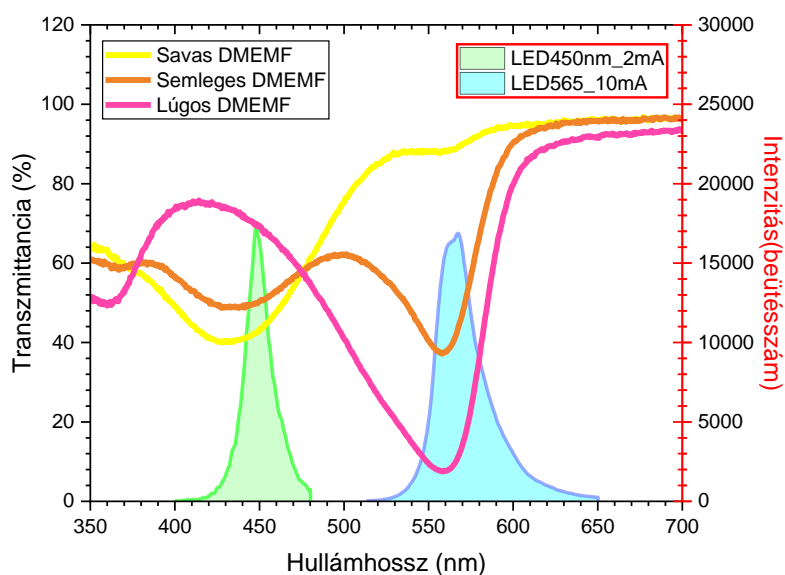
Az optikai transzmissziós spektrumok felvételéhez UV-Vis spektrofotométert (AvaSpec-ULS2048XL) használtam 200 nm és 1340 nm közötti tartományon 2,4 nm-es felbontással. A minta megvilágításához AvaLight-DHC fényforrást használtam, ami egy kombinált deutérium és a halogén kettős fényforrás. A fényforrástól a küvetéig és a küvetétől a spektrofotométerig 6 mm-es kollimátorlencsével szerelt univerzális optikai szálakkal vezettem a fényt, amik 200-2500 nm-es hullámhossztartományon használhatóak.



9. ábra: Folyadék vizsgálata spektrométerrel makroküvetében mérési összeállítás

A méréseket Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEMF) tápfolyadékban végeztem. Ez egy fenolvörös indikátorfestéket tartalmazó tápfolyadék, ami sejtek számára biztosítja a növekedéshez szükséges tápanyagokat, növekedési faktorokat, megfelelő kémiai környezetet. A sejtek életbenmaradása szempontjából fontos a tápfolyadék stabil kémhatása, amit inkubátorban általában kb. 5%-os széndioxidot tartalmazó atmoszférával pufferelemek. A festék savas közeg esetén sárga, lúgos közeg esetén lila színű.[13]

Makroküvetékbe töltöttem egy semleges, egy NaOH oldattal lúgosított (lila) és egy tejsavval savasított (sárga) tápfolyadékot. Ezeket a optikai küvetatartóba behelyeztem és mind a 3-nak felvettem a transzmissziós spektrumát, hogy megvizsgáljam mekkora hullámhosszú LED-ekkel érdemes a későbbi méréseket végezni.



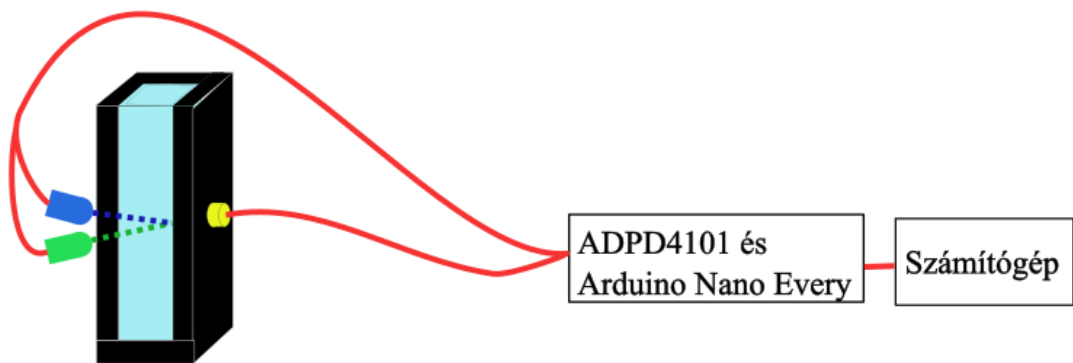
10. ábra: Semleges, savas és lúgos tápfolyadékok transzmittancia spektrumaival, 450 nm és 565 nm LED intenzitás spektrumaival együtt ábrázolva

A mért spektrumokat ábrázoltam (10. ábra) és arra a következtetésre jutottam, hogy savas (sárga) tápfolyadék esetén a 430 nm környéki elnyelési csúcs jelenik meg, lúgos (lila) esetén pedig a 560 nm-es elnyelési csúcs. Jól meghatározott, stabil körülmények között elegendő lenne csak az egyik elnyelési csúcs monitorozása, hogy következtethessünk a pH változására, de sokkal stabilabb mérést tudunk végrehajtani ennek a két komplementer elnyelési csúcsonak a szimultán mérésével. Tehát a transzmissziós spektrumok alapján azt mondhatjuk, hogy a fehér fényű halogén fényforrást hatékonyan le tudnánk cserélni két diszkrét hullámhosszú fényforrásra, amik transzmittált intenzitásuk között a későbbiekben egy függvénykapcsolatot lehet felírni, amivel a tápfolyadék pH értékét lehet kiszámítani.

A fent megállapított elnyelési sávokhoz legközelebbi hullámhosszú 450 nm-es és 565 nm-es LED állt a rendelkezésemre. Ellenőrzésképpen felvettem a LED-ek emissziós intenzitását és a tápfolyadék transzmissziós spektrumával összevetve megállapítottam, hogy a LED-ek alkalmasak lesznek, mert az intenzitás tartományaik egész jól fedik a korábban megállapított abszorpciós hullámhossztartományokat.

4.2 Folyadék optikai mérése front end chippel

Az ADPD4101 front end chip és a szoftver teszteléséhet egy mérési összeállítást raktam össze, hogy valós körülmények között vizsgálhassam meg a mérési konfigurációk működését. Az ADPD4101 chipet egy minimális mennyiségű külső alkatrészt tartalmazó panelre lett felforrasztva, melyen tüskesorokkal lehet hozzáférni a szükséges ki és bemeneti analóg és digitális kivezetésekhez, I2C kommunikációs csatornához és tartalmaz egy 1,8 V-os feszültségstabilizátort is. A frontend chip vezérlése egy Arduino Nano Every mikrokontrolleren keresztül lett megvalósítva. A mérési összeállítás optikai része egy küvettából és egy küvettatartóból állt, amelybe bele volt ágyazva két LED és egy szilícium fotodióda. A fényforrások egy 450 nm hullámhosszú (kék) és egy 565 nm hullámhosszú (zöld) LED-ek voltak. A kék LED a fénykibocsátási szöge 26° , a zöldé 30° . Detektorként egy SPD900-9P azonosítójú közönséges szilíciumdióda síküveg ablakú TO-39 tokban, melynek aktív felülete $3 \times 3 \text{ mm}^2$, nagy méretű és érzékeny így sok fényt képes érzékelni. Folyadékmintáknak az előző spektrofotométeres mérésnél is használt savas, semleges és lúgos kémhatású tápfolyadékokat használtam.



11. ábra: Folyadék optikai mérése front-end chippel mérési összeállítása

Annak érdekében, hogy egyszerre több különböző mérési beállítást is teszteljek, a 2. táblázatban látható konfigurációval végeztem a méréseket, a maximális 12 csatornából (időrésből) 8 csatornát kihasználva.

Csatorna	LED1 árama (mA)	LED2 árama (mA)	Visszacsatoló ellenállás (Ω)	Chopper elési mintázat	Ismétlés	Integrálási szám
A	24		12k5	-	1	1
B		50	200k	-	1	1
C	1.5		12k5	A	6	1
D		50	12k5	A	16	1
E	3		12k5	A	16	1
F		50	50k	A	16	1
G	1.5		12k5	A	16	1
H		24	100k	A	16	1

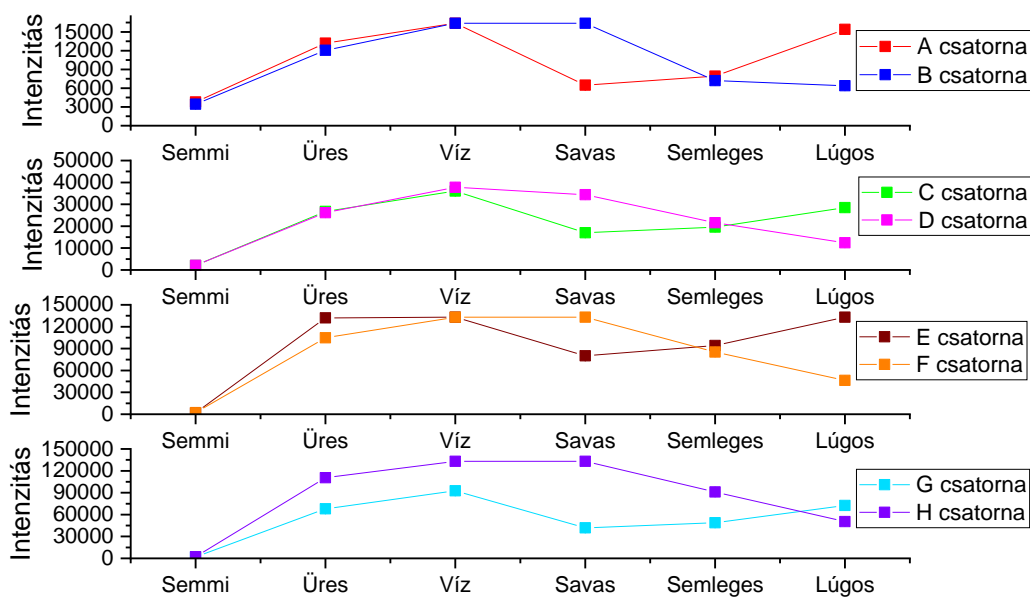
2. Táblázat: Az ADPD4101 front-end chip első 8 csatornájának paraméterei

Az A, C, E és G csatonák a kék LED-et használják fényforrásként, a B, D, F és H a zöld LED-et. Mivel a zöld LED-ek gyártástechnológiájukból adódoan tipikusan kisebb hatásfokkal világítanak, mint a kék LED-ek, ezért szignifikáns eltérések mutatkoznak a szükséges meghajtóáram és erősítőbeállításokban is. A zöld LED-nél a gyenge fényintenzitás miatt nagy erősítést kell alkalmazni, és több impulzusismétlést és átlagolást a zaj elnyomása érdekében, a kék LED-nél viszont a nagy intenzitás miatt a legkisebb erősítés mellett is nagyon kis meghajtóáram telítésbe tudja vinni a TIA-t vagy az ADC-t. Az „A” és „B” csatornát referenciacsatornaként alkalmaztam, ezeknél kikapcsoltam a BPF-t és az analóg integrátort, csak a TIA és ADC működött, tehát a környezeti fényt is lehet vele monitorozni. Ebben a konfigurációban jól lehet vizsgálni a detektor telítődését és a TIA túlvezérlését is. A többi csatornát úgy igyekeztem konfigurálni, hogy a C-D, E-F, G-H párok hasonló nagyságrendű jelet produkáljanak. A mérésvezérléshez a számítógépes vezérlő és adatgyűjtő programot használtam. Első lépésben üres küvetta mellett kalibráltam az integrálási offsetet minden csatornára, kivéve az első kettőt.

Csatorna	Integrálási ofszet (ms)
A	-
B	-
C	31.8125
D	32
E	31.8125
F	31.15625
G	31.84375
H	32.375

3. Táblázat: A szoftver által számított integrálási idők

A mérés 100 Hz-es ismétléssel zajlott, ami alatt mind a 8 konfigurált csatorna mérése lezajlik. Először a teljesen üres kűvetta tartó intenzitásának felvételével kezdtem, majd utána felvettem a vízzel töltött kűvetta, semleges tápfolyadékot tartalmazó kűvetta, savas tápfolyadékot tartalmazó kűvetta és lúgos tápfolyadékot tartalmazó kűvetta intenzitás értékeit. Minden minta mérését néhány másodperces adatrögzítéssel (több száz mérési pontban) végeztem, majd a lementett eredményeket utólag csatornánként átlagoltam és értékeltem ki OriginLab adatfeldolgozó programban. Ennek eredménye látható a 12. ábrán.



12. ábra: A szoftver segítségével felvett jelértékek különböző beállítások mellett

Az összesített grafikonról leolvasható, hogy a még az első két csatornán is megfelelő a jelerősség, elhanyagolható a zaj, viszont tudjuk, hogy ezeken a szűrés a chopperelés nélküli konfigurációkban nagyon érzékeny a mérés a környezeti

megvilágításra, így azok nem adhatnak pontos információt. A második és harmadik csoport jelei nagyon hasonlóak, de a harmadik csoport intenzitásai jóval nagyobbak, így az a csoport lesz alkalmasabb a mérésekre. A negyedik csoport jelei nagyon zajosak voltak és a lúgos tápfolyadék esetén nem mértem ki akkora különbséget, mint a többi jelcsoportoknál. A mérések kiértékelése azt mutatja, hogy az 5 és 6 csatorna beállításai lesznek a legalkalmasabb a mérésekhez.

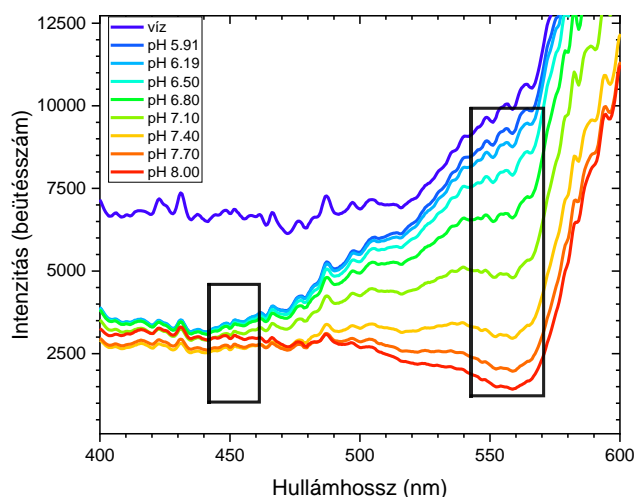
4.3 pH sor transzmissziós spektrumának vizsgálata

Az előző méréseknél a pH 6 alatti és pH 8 feletti mintákkal feltérképeztük a pH-skála határait. Egy ismert pH-sor méréseiből lehetőségünk lenne egy kalibrációs görbe felvételéhez, ami után akár egy ismeretlen oldatról képesek leszünk annak pH értékének megállapítására. Ennek érdekében egy asztali pH mérő segítségével (Metler Toledo) pontos pH sort készítettem, melynek értékei a következők voltak: 5,91, 6,19, 6,5, 6,8, 7,1, 7,4, 7,7, 8,0. Ezt úgy állítottam elő, hogy a DMEMF tápfolyadékba belekevertem 2,13g nátrium hidrogén foszfátot, ezzel egy lúgos folyadékot hozva létre, majd folyamatos pH-mérés mellett sósavat cseppenként adagolva állítottam be az egyes pH értékeket.



13. ábra: pH sor DMEMF tápfolyadékban

A mérési elrendezés az első mérés összeállításával egyezett meg, azaz a tápfolyadékokat standard 10 mm-es makroküvetkékbe töltöttem és fehér halogén fényforrással átvilágítva felvettem a transzmittált intenzitáspektromaikat (14. ábra).



14. ábra: pH sor spektrumai makroküvetében mérve (LED tartományok kijelölve)

A tartományokon vizsgált jeleket pH értékeként átlagoltam. A kalibrációs görbe meghatározásához kellett találni egy függvénykapcsolatot a két hullámhosszon mért jel között, amelyre egy egyenest vagy esetleg egy egyszerű polinomot lehet illeszteni és ezzel egyértelmű függvényt tudunk felállítani a mért adatok és az ismert pH értékek között. A következő függvényeket teszteltem:

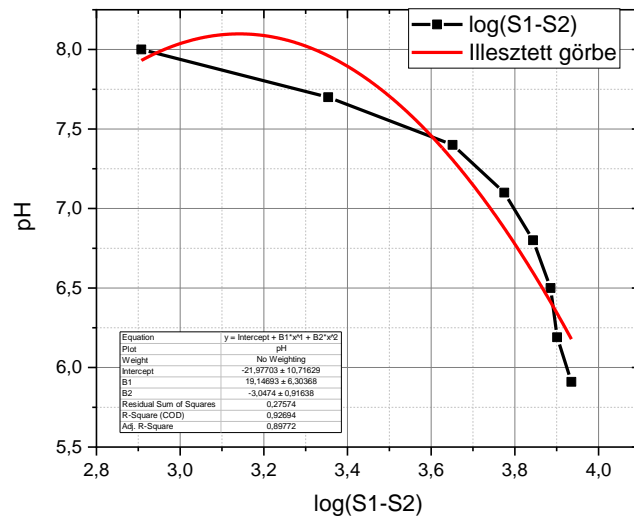
$S1 = \text{kék LED megvilágítás esetén mért jel};$

$S2 = \text{zöld LED megvilágítás esetén mért jel};$

$O = \text{függvény eredménye}$

$$O = S1 - S2 \quad (1) \quad O = \frac{S1-S2}{2} \quad (2) \quad O = \frac{S1-S2}{S1+S2} \quad (3) \quad O = \log(S1 - S2) \quad (4)$$

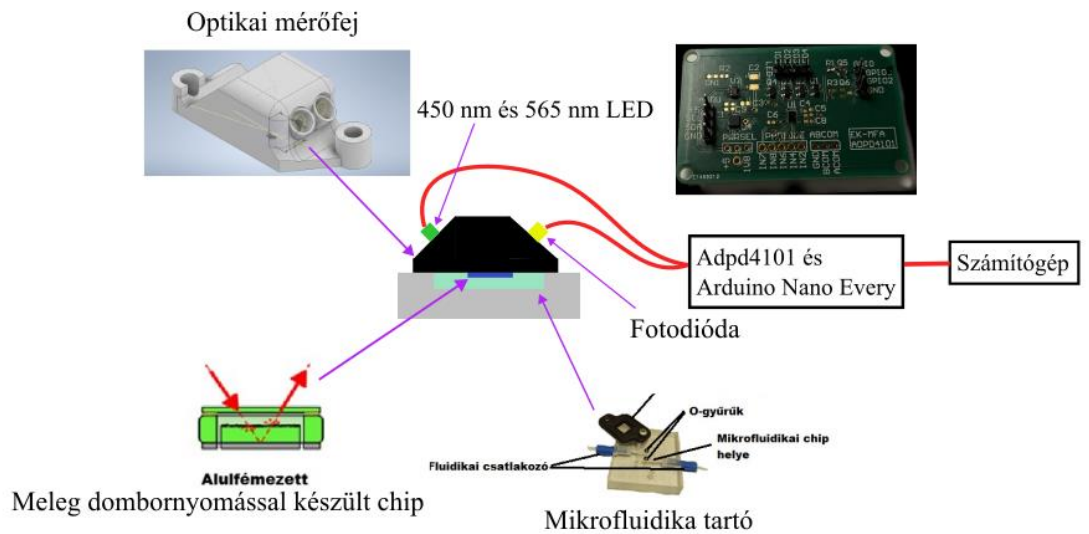
Az (1) és (2) egyenlet, nagyjából ugyanazt az eredményt hozta. A probléma az volt vele, hogy érzékeny a bemenő intenzitás ingadozására, emiatt a mért értékek és az illesztett görbe nagy mértékben eltértek. A (3)-as egyenletet azért volt ezek után célszerű tesztelni, mert ezzel ki lehetne küszöbölni az előző problémát úgy, hogy az átjutó össz intenzitással normáljuk a különbségi jelet. A (4)-iknél azért választottam logaritmikus megközelítést, mert ismert, hogy az fényelnyelés a koncentrációtól exponenciálisan függ, tehát ezzel a logaritmusképzéssel linearizálni tudjuk az összefüggést. A legjobbnak a logaritmikus (4) megközelítést találtam.



15. ábra: Makroküvetében mért értékek függvénykapcsolata a pH függvényében

4.4 pH sor vizsgálata front-end chip segítségével

Célunk továbbra is a mérés miniatürizálása és az anyagköltség csökkentése. Ennek érdekében létrehoztunk egy speciális mérési összeállítást. Ez állt egy mikrofluidikából, egy mikrofluidika tartóból, egy fecskendőből, egy LED és detektor tartó fejből és az áramkörből. Továbbra is 450 nm hullámhosszú és egy 565 nm hullámhosszú LED-et alkalmaztunk fényforrásnak és az SPD900-P Si fotodiódát. A chipék mérete 10 mm × 10 mm × 1,5 mm. A chipbe mart fluidikai tároló rész 6 mm × 4 mm, a mélysége 100 µm. Egy transzreflexiós mérési összeállítást valósítottunk meg, ahol a fényforrások és a detektor is ugyanazon az oldalon vannak integrálva az optikai mérőfejbe, amit ráhelyezünk a mikrofluidikai chipre. A reflexiós alumínium réteget vákuumpárológatóval vittük fel a chipék hátoldalára.



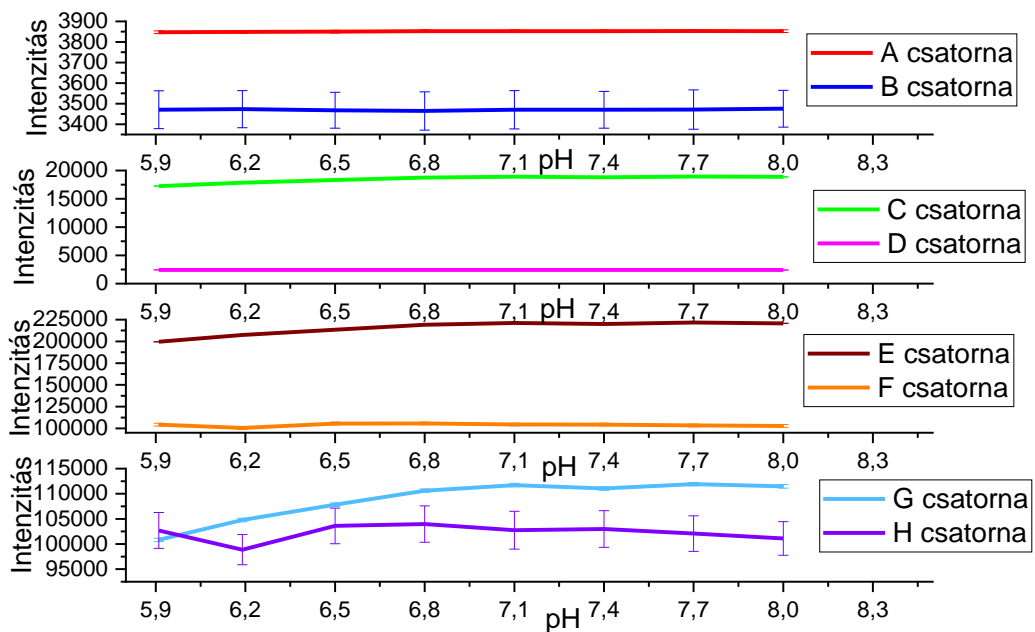
16. ábra: Mikrofluidikai optikai mérési összeállítása

A mikrofluidikai chipeket először tiszta vízzel töltöttem fel, így végeztem el a meghajtóáram és erősítő kalibrációkat. Az első két csatornán nem változtattam semmit, ezeket továbbra is a környezeti fény, a fotodióda telítettségének, a TIA és az ADC monitorozására használtam. A „C” és „D” csatornákon integrálási offsetet és a maximális áramot kalibráltam a szoftverrel. Az utolsó 4 csatornán integrálási offsetet és teljes kalibrálást is végeztem (erősítés, meghajtóáram és integrálási szám). Az alap adatokhoz képesti változásokat félkövér dőlttel jeleztem a 4. táblázatban.

Csatorna	LED1 áram	LED2 áram	Visszacatoló ellenállás (Ω)	Choppe relési minta	Ismétlés	Integrálási szám	Beállítások	LED impulzus- szélesség (μ s)	Integrációs szélesség (ms)
A	24 mA		12k5	-	1	1	-----	2	3
B		49,5 mA	200k	-	1	1	-----	3	3
C	48 mA		12k5	A	6	1	Integ offset + LED current	2	3
D		49,5 mA	200k	A	16	1	Integ offset + LED current	3	3
E	21 mA		50k	A	32	1	Integ offset + full calib	2	3
F		49,5 mA	200k	A	16	16	Integ offset + full calib	3	3
G	21 mA		50k	A	16	1	Integ offset + full calib	2	3
H		49,5 mA	200k	A	16	15	Integ offset + full calib	3	3

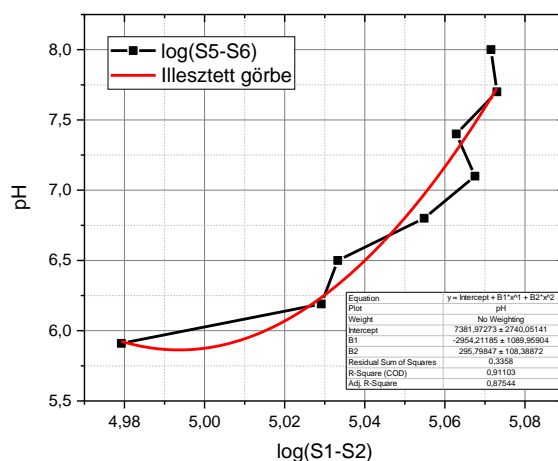
4. Táblázat: Az ADPD4101 front-end chip első 8 csatornájának paraméterei (sima: alap beállítások, dőlt: szoftverrel számított beállítások)

A szoftveres beállítások után 5,9 pH és 8 pH között felvettem tápfolyadékok intenzitás értékeit. Ezeknek vettem az átlagát és a szórását. A 17. ábrán ábrázoltam a mért adatokat. Látható, hogy az első és második csatornán nincs nagy változás, a jelek csak kis mértékben térnek ki és nagyon alacsony az intenzitás. A harmadik és negyedik csatornán már mindkét esetben megjelenik nagyobb mértékű intenzitásváltozás, de még mindig nem nagy az intenzitás, amely befolyásolja, hogy milyen érzékenyen tudunk detektálni. Az ötödik és hatodik csatornán, mindkét jel esetén elég nagy intenzitást tapasztalunk, a jelek pont aszerint változnak, ahogy reméljük. A sárga folyadék esetén a zöld LED magasabb és a lilás szín felé egyre csökken az intenzitása. Kék LED esetén pont fordítva, sárgás szín detektálásánál alacsonyabb, majd a lilás szín felé felerősödik a detektált intenzitás. A hetedik csatornán szintén magas jelet detektálok, de a párján a nyolcadik csatornán nagyon zajos a jel.



17. ábra: Mikrofluidikában mért jelértékek az egyes pH értékeken

A megfelelő jelek kiválasztása után egy függvény kapcsolatot kerestem megint. Ezen esetben is a logaritmikus megközelítést tapasztaltam a legmegfelelőbbnek. Az egyes pH értékekhez tartozó függvényértékeket ábrázoltam és illesztettem rá egy másodfokú görbét, amelyet a jövőben kalibrációs görbeként lehet majd alkalmazni.



18. ábra: Mikrofluidikában mért értékek függvénykapcsolata a pH függvényében

Az OriginLab a függvény értékek pontjaira egy másodfokú görbét illesztett rá az alábbi képlet segítségével:

$$y = B_0 + B_1 \cdot x^1 + B_2 \cdot x^2$$

A függvény értékeit a matematikai szoftver segítségével állapítottam meg.

$$y = 7381.97 + (-2954.21) \cdot x^1 + 295.80 \cdot x^2$$

Az illesztési görbe átlagos pontossága is meghatározható a szoftver segítségével. A szoftver négyzetösszegek segítségével határozza meg ezt az értéket, mellyel a görbe és az adat közötti pont távolsága meghatározható. ez úgy történik, hogy először kiszámítja az adatpontok és az átlag közötti eltérést, az átlag négyzeteinek teljes összegét határozza meg, azután az átlag négyzeteinek regressziós összegét. A négyzetösszeget, amit végül ennek a kettő értéknek a hányadosával kapunk, lesz egy százalék érték, amely arra ad közelítést, hogy mekkora pontossággal illeszkedik a görbe az értékekre. A mi esetünkben ez 91 %. Ebből következtethető, hogy a mérésünk valószínűleg tartalmazni fog 9%-os hibát. Összességében kijelenthető, hogy közelítőleg abszolútértékben 0.1 pH pontossággal lehetőség van mérni a műszerrel.

$$\text{Négyzetösszegek összesítése} = \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2$$

$$\text{Regressziós négyzetösszegek összesítése} = \sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - \bar{y})^2$$

$$R^2 = \frac{\text{Regressziós négyzetösszegek összesítése}}{\text{Négyzetösszegek összesítése}}$$

5 Konklúzió

A pH mérés előkészítése sok körülményt igényel mikrofluidikában. Ilyen kis mintamennyiségnél figyelni kell a pontos geometriai összeállításra, a mérőműszer megfelelő beállítására, a megfelelő fluidika kialakításra és a megfelelő tesztfolyadék megválasztására. Emiatt volt szükséges először a folyadék tiszta spektrumát felvenni, amely megmutatta nekünk, hogy mely LED-ekkel érdemes a további mérési összeállításban használni. Végül a 450 nm és a 565 nm LED bizonyult megfelelőnek. Utána megbizonyosodtam róla, hogy a front-end chip alkalmas-e pH detektálására. Ezt makroküvetében végeztem el és a mérésekből az derült ki, a zöld és kék LED-ek használatával lehetséges különbséget tenni a savas (sárga) és lúgos (lila) oldatok között. A következő kihívást a mikroküvetta nagyon kis optikai úthossza jelentette, ahol a hasznos jelváltozás a zajhoz képest jelentősen lecsökkenhet.

A következő teszteknel egy ismert pH sort mértem végig szimultán makroküvetében spektrofotométerrel és mikroküvetében a front end chippel meghajtott LED-eket és fotodiódát tartalmazó optikai fejjel. A mérési elrendezések hasonlóak voltak, de amíg a makroküveténél az optikai úthossz 10 mm, addig a mikroküveténél 45-45°-os transzreflexiós elrendezésben mérve is csak kb. 300 μm . A makroküvetés pH-sorozat mérésnél meghatározott számítási módszert sikerült átültetni a mikrofluidikai csatornában LED-ekkel elvégzett méréssorozatra is. A $\log(S_1 - S_2)$ összefüggéssel számolt értékek és az ismert pH-értékek között másodfokú összefüggést állapítottam meg, aminek paramétereit függvényillesztéssel meg is határoztam. A mérőszoftver továbbfejlesztése során érdemes lenne megoldania pH-kalibráció felvételét és a másodfokú illesztést is magában foglaló pH-kalibrációs rutint is implementálni, ezután már egy ismeretlen oldat pH-jának mérésére vagy akár folyamaton monitorozására is képesek lehetnénk.

A két mérés után eltérő kinézetű pH-kalibrációs görbéket kaptam. Ez amiatt lehetséges, mert teljesen más mérési elrendezésben, más gerjesztéssel és teljesen más geometriában történtek a mérések. A makroküvetés mérésnél közel feketetest eloszlású fehérfehér fényel végeztem a méréseket, ami az optikai szálon való áthaladás után és a spektrofotométer érzékenységi görbéje miatt jelentősen eltérő a két hullámhossztartományon. Igaz, hogy a mikrofluidikás méréseknél is a LED-ek

teljesítménye eltérőnek bizonyult, de az erősítési paraméterek független megváltoztatásával a mérőjelben már sikerült hasonló nagyságrendű értékeket elérni. A másik hibaforrás lehet az is, hogy a küveták cserélgetése, geometriai eltéréseik miatt egy kis ofszet hiba jelentkezhet az egymás után felvett spektrumokban. Emiatt a második esetben tapasztalt jelekre az illesztett függvény más görbealakot hozott, mert más jel érték különbségek is léptek fel, mint az első esetben.

Összességében kijelenthető, hogy 100 μm vastagságú fenolvörös indikátort tartalmazó folyadékrétegben sikerült pH értéket detektálni LED, fotodióda és egy front end chip köré épített egyszerű áramkörrel. Nagyon pontos és stabil mérési elrendezést és finom jel kalibrációt igényel, de ezek megvalósításával létre lehet hozni egy kisméretű, kis mennyiségű folyadékminta pH mérésére alkalmas érintésmentes mérőműszert.

Irodalomjegyzék

- [1] Huaiyu Wang and Paul K. Chu, *Surface Characterization of Biomaterials*, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415800-9.00004-8>, 2013
- [2] Compoundsq Marieta LC Passos, Mafalda C Sarraguc, a, and M Lu' cia MFS Saraiva, T Prasada Rao and VM Biju, *Spectrophotometry Organic*, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.14465-8>, 2019
- [3] D.Webster, *PH – PRINCIPLES AND MEASUREMENT*, <https://doi.org/10.1016/B0-12-227055-X/00913-5>, 2003
- [4] Marc J.P. Leiner, Paul Hartmann, *Theory and practice in optical pH sensing*, [https://doi.org/10.1016/0925-4005\(93\)85266-D](https://doi.org/10.1016/0925-4005(93)85266-D), 1993
- [5] Andreas Steinegger, Otto S. Wolfbeis, Sergey M. Borisov, *Optical Sensing and Imaging of pH Values: Spectroscopies, Materials, and Applications*, <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c00451>, 2020
- [6] Seyed Ali Mousavi Shaegh; Fabio De Ferrari, Yu Shrike Zhang; Mahboubeh Nabavinia; Niema Bintah Mohammad; John Ryan; Adel Pourmand; Eleanor Laukaitis, Ramin Banan Sadeghian; Akhtar Nadhman; Su Ryon Shin; Amir Sanati Nezhad; Ali Khademhosseini; Mehmet Remzi Dokmeci, *A microfluidic optical platform for real-time monitoring of pH and oxygen in microfluidic bioreactors and organ-on-chip devices*, <https://doi.org/10.1063/1.4955155>
- [7] Ecem Saygili, Utku Devamoglu, Ece Bayir, Ozlem Yesil-Celiktas, *An optical pH-sensor integrated microfluidic platform multilayered with bacterial cellulose and gelatin methacrylate to mimic drug-induced lung injury*, <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2023.01.023>
- [8] Utku Devamoglu, Irem Duman, Ecem Saygili & Ozlem Yesil-Celiktas, *Development of an Integrated Optical Sensor for Determination of β -Hydroxybutyrate Within the Microplatform*, <https://doi.org/10.1007/s12010-021-03563-3>
- [9] Arun Asif, Kyung Hwan Kim, Faiza Jabbar, Sejoong Kim & Kyung Hyun Choi, *Real-time sensors for live monitoring of disease and drug analysis in microfluidic model of proximal tubule*, <https://doi.org/10.1007/s10404-020-02347-1>
- [10] Muhammad Asad Ullah Khalid, Young Soo Kim, Muhsin Ali, Byung Gul Lee, Young-Jae Cho, Kyung Hyun Choi, *A lung cancer-on-chip platform with integrated biosensors for physiological monitoring and toxicity assessment*, <https://doi.org/10.1016/j.bej.2019.107469>
- [11] *ADPD410X No-OS Driver* | Analog Devices, <https://wiki.analog.com/resources/tools-software/uc-drivers/adpd410x>

- [12] *EVAL-ADPD410x-ARDZ User Guide* | Analog Devices,
<https://wiki.analog.com/resources/eval/user-guides/circuits-from-the-lab/eval-adpd410x>
- [13] Baksa Viktória, *SEJTENYÉSZTÉS*,
<http://www.etox.eu/Sejteny%C3%A9szt%C3%A9s.pdf>
- [14] Damjanovich, Fidy, Szöllősi: *Orvosi Biofizika, 2007*
- [15] <https://www.analog.com/media/en/technical-documentation/data-sheets/adpd4100-4101.pdf>
- [16] Light Sensors, <https://www.electronicshub.org/light-sensors/>
- [17] Light Sensors, https://www.electronics-tutorials.ws/io/io_4.html

Függelék

Ofszet kalibráció kód

```
int32_t adpd4101_app_Int_offset_calibration(uint8_t chan){
    uint32_t ret=0;
    uint32_t buff[ADPD4101_NUM_CH];
    uint16_t max_integ_offset=0;
    uint32_t max_val=0;
    uint8_t i=0, j=0;
    uint16_t LED_offset_us = 0, Int_offset = 0;
    uint16_t reg_val;

    ret = adpd4101_reg_read(ADPD410X_REG_LED_PULSE(chan), &reg_val);
    if (ret != 0)
        return ret;

    LED_offset_us = (reg_val & BITM_LED_PULSE_A_LED_OFFSET) >>
    BITP_LED_PULSE_A_LED_OFFSET;
    Int_offset = (LED_offset_us - 2)<<5;

    for(j=0;j<128;j++) {

        for (i = 0; i < ADPD4101_NUM_CH; i++) {
            buff[i] = 0;
        }

        ret = adpd4101_reg_write_mask(ADPD410X_REG_INTEG_OFFSET(chan),
Int_offset, BITM_INTEG_OFFSET_A_INTEG_OFFSET);
        if (ret != 0) {
            Serial.println(F("int offset write failed"));
            return ret;
        }

        ret = adpd4101_app_read_samples(buff, 1);
        if(max_val<buff[chan]) {
            max_integ_offset = Int_offset;
            max_val = buff[chan];
        }

        Int_offset += 1;
    }

    ret=adpd4101_reg_write_mask(ADPD410X_REG_INTEG_OFFSET(chan),
max_integ_offset, BITM_INTEG_OFFSET_A_INTEG_OFFSET);
    if (ret != 0)
        return ret;

    Serial.print(F("int offset set: : "));
    Serial.print(    ((    (float)(max_integ_offset>>5)*1000)    +
(float)(max_integ_offset & 0x1f)*31.25)/1000 , 5);    // upper bits in us,
lower 5 bits in 31.25 ns
    Serial.println(F(" us"));
    return 0;
}
```

Áramkalibráció kód

```
int32_t      adpd4101_app_LED_current_one_slot_calibration(      uint8_t
slot_in, uint16_t current_max, uint16_t target ) {
    uint16_t LED_no, LED_val;
    uint16_t LED_reg_mask;
    uint16_t max_curr, now_curr;
    uint16_t ret, i = 0;
    uint32_t zero_adj_flag, puls_cnt;
    uint32_t readback, data_buff[ADPD410X_MAX_SLOT_NUMBER];
    const uint32_t adc_sat = 8191;
    float landing, comp;
    uint16_t reg_data;

    max_curr = current_max/1.5;

    ret = adpd4101_reg_read(ADPD410X_REG_LED_POW12(slot_in), &LED_val);
    if ((LED_val & BITM_LED_POW12_A_LED_CURRENT1) != 0) {
        LED_no = 1;
        LED_reg_mask = BITM_LED_POW12_A_LED_CURRENT1;
    }
    else {
        LED_no = 2;
        LED_reg_mask = BITM_LED_POW12_A_LED_CURRENT2;
    }

    ret = adpd4101_reg_write_mask(ADPD410X_REG_LED_POW12(slot_in), 0,
BITM_LED_POW12_A_LED_CURRENT1);
    if (ret != 0) {
        Serial.print(F("ERROR1!"));
        return -1;
    }

    ret = adpd4101_reg_write_mask(ADPD410X_REG_LED_POW12(slot_in), 0,
BITM_LED_POW12_A_LED_CURRENT2);
    if (ret != 0) {
        Serial.print(F("ERROR2!"));
        return -2;
    }

    ret = adpd4101_reg_read(ADPD410X_REG_ADC_OFF2(slot_in), &reg_data);
    if (ret != 0) {
        Serial.print(F("ERROR3!"));
        return -3;
        zero_adj_flag = (reg_data & BITM_ADC_OFF2_A_CH2_ADC_ADJUST) >>
BITP_ADC_OFF2_A_CH2_ADC_ADJUST;
    }

    ret = adpd4101_reg_read(ADPD410X_REG_COUNTS(slot_in), &reg_data);
    if (ret != 0) {
        Serial.print(F("ERROR4!"));
        return -4;
    }
    puls_cnt = (reg_data & BITM_COUNTS_A_NUM_REPEAT); // pulses

    now_curr = 0;
    while(1)
```

```

{
  ret = adpd4101_app_read_samples(data_buff, 1);
  if (ret == 0) {
    Serial.print(F("ERROR5!"));
    return -5;
  }

  comp = (float)(data_buff[(slot_in)] - zero_adj_flag * 2048) /
(float)(puls_cnt * adc_sat);
  comp *= 100.0;
  if ((comp > target) || (now_curr > max_curr)) {
    if (now_curr == 0) {
      now_curr = 1;
      Serial.println(F("Current set to minimum"));
    }
    else
      now_curr--;

      ret=adpd4101_reg_write_mask(ADPD410X_REG_LED_POW12(slot_in),
now_curr, LED_reg_mask);
    if (ret != 0) {
      Serial.print(F("ERROR7!"));
      return -7;
    }
    break;
  }

  else if ((comp == target) || (now_curr == max_curr)) {
    Serial.println(F("Max current"));
    landing = comp;
    break;
  }

  now_curr++;

  ret=adpd4101_reg_write_mask(ADPD410X_REG_LED_POW12(slot_in), now_curr,
LED_reg_mask);
  if (ret != 0) {
    Serial.print(F("ERROR7!"));
    return -7;
  }

  landing = comp;
}

return 0;
}

```

Teljes kalibráció kód

```
int32_t adpd4101_app_optimalization( uint8_t slot_in, uint16_t current_max,
float target ) {
    uint16_t LED_no, LED_val;
    uint16_t LED_reg_mask;
    uint16_t max_curr, now_curr;
    uint16_t TIA_gain=4;
    uint16_t ret, i = 0;
    uint32_t zero_adj_flag, integ_num = 1, puls_cnt;
    uint32_t readback, data_buff[ADPD410X_MAX_SLOT_NUMBER];
    const uint32_t adc_sat = 8191;
    float landing, comp;
    uint16_t reg_data;

    max_curr = current_max/1.5;

    while(TIA_gain>=0 && TIA_gain<5)
    {
        ret = adpd4101_reg_write_mask(ADPD410X_REG_AFE_TRIM(slot_in),TIA_gain,
BITM_AFE_TRIM_A_TIA_GAIN_CH1); // 12.5 kOhm TIA
        if (ret != 0) {
            Serial.print(F("ERROR0!"));
            return -1;
        }
        ret = adpd4101_reg_write_mask(ADPD410X_REG_COUNTS(slot_in),integ_num,
BITM_COUNTS_A_NUM_INT);
        if (ret != 0) {
            Serial.print(F("ERROR0!"));
            return -1;
        }

        ret = adpd4101_reg_read(ADPD410X_REG_LED_POW12(slot_in), &LED_val);
        if ((LED_val & BITM_LED_POW12_A_LED_CURRENT1) != 0) {
            LED_no = 1;
            LED_reg_mask = BITM_LED_POW12_A_LED_CURRENT1;
        }
        else {
            LED_no = 2;
            LED_reg_mask = BITM_LED_POW12_A_LED_CURRENT2;
        }

        ret = adpd4101_reg_write_mask(ADPD410X_REG_LED_POW12(slot_in), 0,
BITM_LED_POW12_A_LED_CURRENT1);
        if (ret != 0) {
            Serial.print(F("ERROR1!"));
            return -1;
        }

        ret = adpd4101_reg_write_mask(ADPD410X_REG_LED_POW12(slot_in), 0,
BITM_LED_POW12_A_LED_CURRENT2);
        if (ret != 0) {
            Serial.print(F("ERROR2!"));
            return -2;
        }
    }
}
```

```

ret = adpd4101_reg_read(ADPD410X_REG_ADC_OFF2(slot_in), &reg_data);
if (ret != 0) {
    Serial.print(F("ERROR3!"));
    return -3;
    zero_adj_flag = (reg_data & BITM_ADC_OFF2_A_CH2_ADC_ADJUST) >>
BITP_ADC_OFF2_A_CH2_ADC_ADJUST;
}

ret = adpd4101_reg_read(ADPD410X_REG_COUNTS(slot_in), &reg_data);
if (ret != 0) {
    Serial.print(F("ERROR4!"));
    return -4;
}

puls_cnt = (reg_data & BITM_COUNTS_A_NUM_REPEAT);

now_curr = 0;
while(1)
{
    ret = adpd4101_app_read_samples(data_buff, 1);
    if (ret == 0) {
        Serial.print(F("ERROR5!"));
        return -5;
    }

    comp = (float)(data_buff[(slot_in)] - zero_adj_flag * 2048) /
(float)(puls_cnt * adc_sat);
    comp *= 100.0;
    Serial.println(comp);

    if ((comp > target) || (now_curr > max_curr)) {
        if (now_curr == 0) {
            now_curr = 1;
            Serial.println(F("Current set to minimum"));
        }
        else{
            now_curr--;
        }
        ret=adpd4101_reg_write_mask(ADPD410X_REG_LED_POW12(slot_in),
now_curr, LED_reg_mask);
        if (ret != 0) {
            Serial.print(F("ERROR7!"));
            return -7;
        }
        break;
    }

    else if ((comp == target) || (now_curr == max_curr)) {
        Serial.println(F("Max current"));
        landing = comp;
        break;
    }

    now_curr++;
}

```

```

        ret=adpd4101_reg_write_mask(ADPD410X_REG_LED_POW12(slot_in), now_curr,
LED_reg_mask);
        if (ret != 0) {
            Serial.print(F("ERROR7!"));
            return -7;
        }

        landing = comp;
    }

    if(data_buff[(slot_in)]<(adc_sat*puls_cnt*(target/100)) && TIA_gain>0){

        TIA_gain--;

    else{

        if(data_buff[(slot_in)]<(adc_sat*puls_cnt*(target/100)) ){
            integ_num++;
            ret=adpd4101_reg_write_mask(ADPD410X_REG_COUNTS(slot_in), integ_num,
BITM_COUNTS_A_NUM_INT);
            if (ret != 0) {
                Serial.print(F("ERROR7!"));
                return -7;
            }
        }
        else{
            ret=adpd4101_reg_write_mask(ADPD410X_REG_LED_POW12(slot_in),
now_curr, LED_reg_mask);
            if (ret != 0) {
                Serial.print(F("ERROR7!"));
                return -7;
            }
            break;
        }
    }
}

return 0;
}

```