

ИМПЕДАНСЕН АНАЛИЗ НА ТЕЧНИ ЛИПИДНИ ФИЛМИ С ПОМОЩТА НА УСТРОЙСТВО, БАЗИРАНО НА КОМПЮТЪРНАТА ЗВУКОВА КАРТА

ФИЛИП СИМЕОНОВ, ВАЛЕРИ КОЧЕВ

*Катедра „Атомна физика“, група „Медицинска физика“
Физически факултет, Софийски университет „Св. Климент Охридски“*

Филип Симеонов, Валери Кочев. ИМПЕДАНСЕН АНАЛИЗ НА ТЕЧНИ ЛИПИДНИ ФИЛМИ С ПОМОЩТА НА УСТРОЙСТВО, БАЗИРАНО НА КОМПЮТЪРНАТА ЗВУКОВА КАРТА

Статията е посветена на конструирането на сравнително просто и евтино устройство за изследване на импеданса, използващо звуковата карта на персонален компютър. Цялата схема работи като съчетание на звуковата карта с един предусилвател с постоянно усилване, независимо от честотата. Той дава възможност да се съгласува входния импеданс на картата с импеданса на образеца, което е особено важно при изследването на химични и биологични системи. Това драстично подобрява качеството на измерванията, които при използването на стандартен софтуер дават незадоволителни резултати. Като примери са показани някои анализи на импеданса на моделни липидни системи.

Filip Simeonov, Valery Kochev. IMPEDANCE ANALYSIS OF LIPID LIQUID FILMS WITH THE AID OF DEVISE BASED ON PC SOUND CARD

Construction and major principles of operation of a set-up, suitable for impedance analysis of biologically relevant samples are disclosed in the paper. The devise is based on a simple scheme, operating in conjunction with the PC sound card. While many programs running directly on sound card are capable of simulating impedance analyzer, their performance is not consistent when chemical or biological systems are explored. The addition of pre-amplifier drastically improves the implementation of the set-up. Some examples of impedance analysis of lipid model systems are given and their behavior is discussed.

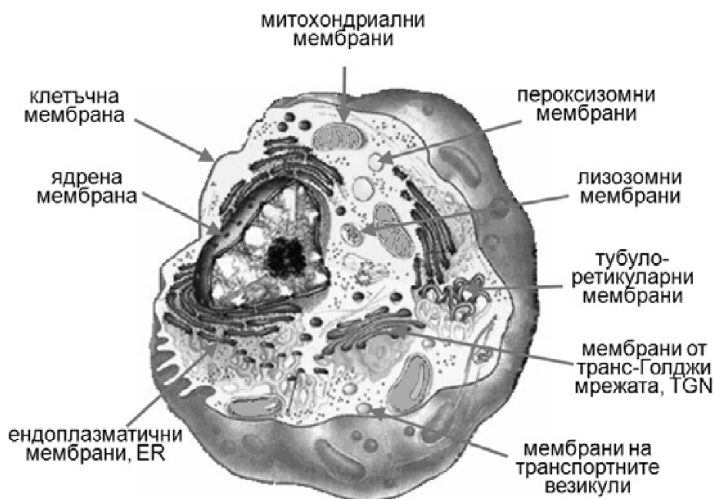
Keywords: impedance analysis, lipid membrane analogs, solid supported lipid films

PACS numbers: 87.14.Cc, 87.16.Dg, 87.80.-y

За контакти: Филип Симеонов, Валери Кочев, Катедра „Атомна физика“, Физически факултет, Софийски университет „Св. Климент Охридски“, бул.„Джеймс Баучер“ 5, София 1164, тел.: +359 2 8161317, E-mail: fipost@abv.bg

1. ВЪВЕДЕНИЕ

Изучаването на клетъчните процеси на молекулно ниво вече повече от половин век е в центъра на вниманието на съвременната биология. С откриването на носителя на генетичната информация изключителни усилия бяха насочени към изясняване на механизмите за нейната експресия, за намиране на интимната връзка между гени и белтъци, а оттам и за разгадаване на големата тайна за съхраняването на отношенията структура–функции. Появата на много нови физични и химични методи за изследване на материята, както и на теоретични подходи към решаване на загадките на микросвета, даде възможност за по-задълбочено навлизане в тайните на биологичните форми на живота. Не е странно, че тези проучвания разшириха изобщо кръгозора на разбиранията ни за молекулярната биология на клетката и за биохимичните превръщания на веществата в нея. От друга страна, макар и с леко закъснение, се развиха и представите за едни от най-важните субклетъчни структури – липидните мембрани [1] (фиг. 1). Големите постижения във физикохимията на интерфейсите от първата половина на ХХ в. несъмнено дадоха силен тласък в тази насока. Разкрити бяха движещите сили, лежащи в основата на образуването, полиморфизма и стабилността на биомембраните [2].



Фиг. 1. Скица на животински еукариот, онагледяваща мембранното обзавеждане на клетката

Мембранологията се оформи като едно огромно самостоятелно и перспективно направление в сферата на науките за живота. Съществен принос даде и бумът в технологиите, базиращи се на класически и съвременни

принципи от всички области на физиката – твърдо тяло, акустика, оптика, електроника, атомна физика, флуидомеханика и т.н. Така в момента мембранологията има на разположение широка гама от експериментални средства за атакуване на проблемите, свързани с богатата архитектура и неимоверно важната роля на липидните мембрани в клетъчната физиология. Като се вземе предвид техният крайно сложен молекулен състав и организация, не е трудно да си представим трудностите, на които се натъкват учените, работещи по тези въпроси. Несъмнено изучаването на свойствата на по-прости моделни системи, възпроизвеждащи част от параметрите на нативните биомембрани, е от особен интерес за осмисляне на функционалната активност на тези клетъчни образувания.

От горното кратко изложение е ясно колко сериозна задача е изследването на биомембранните аналози с адекватен физичен инструментариум. Добре известен факт е обаче, че за жалост болшинството от модерните експериментални методи изискват сложни, скъпо струващи технически средства. Такива системи се обслужват от високо квалифициран персонал, съдържат екзотична апаратура и са почти немислими за лабораторен студентски практикум. Очевидно провеждането на научни проучвания с достъпни опитни установки е крайно важно за нуждите на образованието и подготовката на кадри. Проблемът за намиране на по-евтини апаратурни изпълнения не е нов и негови решения се срещат все по-често. Докладвани са множество варианти на лабораторно произведени уреди, заместващи с успех скъпите установки [3]. Така един приемлив компромис между изпълнение и костуемост в много случаи може да се окаже изключително полезен както за научни, така и за образователни цели.

В настоящата работа е представено именно едно такова техническо решение, базиращо се на концепцията за импеданса. Причините да се насочим към него не са малко. Непрекъснато засилващият се интерес към електрохимичните методи за изследване в областта на биологията и медицината се определя на първо място от изключителната роля, която играят биоелектрохимичните процеси в субклетъчната физиология. От друга страна, бурното развитие на аналитичната електрохимия в последно време снабди учените с нови мощни средства за извличане на информация за тези процеси на молекулно ниво. Поради редица свои преимущества, като чувствителност, неинвазивност, сравнително проста и евтина апаратура, тя си извоюва едно много широко приложение, особено в интердисциплинарните научни направления. В редица случаи електрохимичните методи за анализ съществено се обогатяват с прилагането на импеданския подход. Възможността честотата да се мени по време на измерването определя този подход като спектроскопичен, т.е. при електрохимичната импедансна спектроскопия (англ. Electrochemical Impedance Spectroscopy, EIS) се следи честотно зависимото поведение на

образца при облъчването му посредством електродите с електромагнитна енергия. Веднага трябва да се обърне внимание, че изследването на импеданса на химични и биологични системи изисква по-специално отношение най-малко поради две причини – стремежа към „непертурбиращо“ въздействие (за да не се променят параметрите в хода на измерването) и съществено нелинейния отговор на системата. Напоследък се видя, че такива измервания са прелюдия към модерните техники на сканираща EIS и импедансна томография.

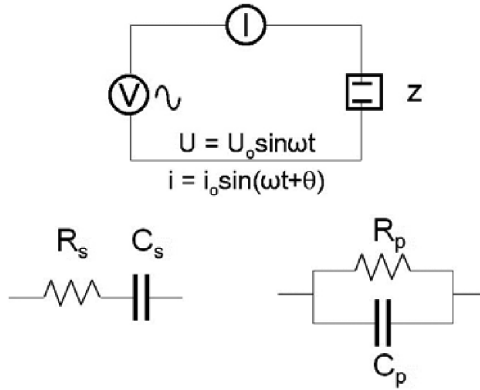
Докладваното тук устройство е в състояние да измерва със задоволителна точност импеданса главно в аудио-диапазона (приблизително 10 Hz–10 kHz). Това честотно ограничение се налага от възможностите на звуковата карта, която е съществен компонент от него. Предимствата, които предлага такова решение, са повече от ясни. На достъпна, нищожна цена се реализира уред, способен да измерва импеданса на разнообразни химични и биологични системи, който, освен PC и софтуерното му обезпечаване, включва само още един модул – сравнително просто устроен електронен предусилвател.

2. ЕЛЕКТРОХИМИЧНА ИМПЕДАНСНА СПЕКТРОСКОПИЯ, EIS

Както казахме, при редица проучвания електрохимичните методи могат да бъдат разширени с използването на техники, базиращи се върху концепцията за импеданса. В повечето случаи е удобно той да бъде определен, като на електрохимичната клетка с образца се подава променливотоково възбуждане. Едно голямо преимущество на метода е възможността честотата да се мени по време на измерването, като това сканиране по същество представлява вече някаква форма на спектроскопия. С други думи, аналогично на оптичната спектроскопия, при EIS пробата се „облъчва“ посредством електродите с електромагнитна енергия с честоти, вариращи в доста широк обхват – от микрохерци (μHz) до гигахерци (GHz). По този начин могат да се изследват честотно зависимите пасивни електрични свойства (т.е. импедансът или комплексната проводимост) на различни системи. Такъв подход се оказва мощно средство както за определяне на структурата им, така и за следене на процесите, протичащи в тях. В последно време той се изяви като особено чувствителна методика към параметрите на интерфейсните зони.

Известно е, че при прилагане на променливо синусоидално напрежение $U(\omega t)$ към някаква пасивна електрична верига протичащият ток I има също синусоидална форма и е отместен по фаза спрямо напрежението. В зависимост от компонентите на веригата това отместване може да бъде положително (при наличие на капацитивно съпротивление), отрицателно (с индуктивно съпротивление) или нула (чисто активно, омично съпротивление). Тъй като химичните и биологичните системи много рядко съдържат индуктивна

компонента, разглежданията обикновено се ограничават до вериги, съдържащи комбинации от капацитивни и омични съпротивления, фиг. 2.



Фиг. 2. Пасивна електрическа верига (горе) и двете основни комбинации от честотно независими елементи (долу)

В комплексно представяне импедансът $Z = U/I$ и комплексната проводимост (адмитанс, $Y = I/Z$) се задават във вида

$$Z = \operatorname{Re}Z + i \operatorname{Im}Z; \quad Y = \operatorname{Re}Y + i \operatorname{Im}Y,$$

така че връзката между отделните им части ще бъде

$$\begin{aligned} \operatorname{Re}Z &= \frac{\operatorname{Re}Y}{(\operatorname{Re}Y)^2 + (\operatorname{Im}Y)^2} & \operatorname{Re}Y &= \frac{\operatorname{Re}Z}{(\operatorname{Re}Z)^2 + (\operatorname{Im}Z)^2} \\ \operatorname{Im}Z &= \frac{-\operatorname{Im}Y}{(\operatorname{Re}Y)^2 + (\operatorname{Im}Y)^2} & \operatorname{Im}Y &= \frac{-\operatorname{Im}Z}{(\operatorname{Re}Z)^2 + (\operatorname{Im}Z)^2} \end{aligned}$$

По-нататък ще работим с импеданса Z , въпреки че в някои случаи е по-удобно да се използва Y . Това, естествено, не променя разглежданията. В много случаи импедансът на образеца представлява комбинация от последователно и/или паралелно свързани “идеални” елементи, т.е. честотно независими съпротивления (R) и кондензатори (C). Най-простите примери са показани на фиг.2. От теорията на електричните вериги за тях са известни следните зависимости:

$$Z = R_s + \frac{1}{i\omega C_s} = \frac{1}{\frac{1}{R_p} + i\omega C_p},$$

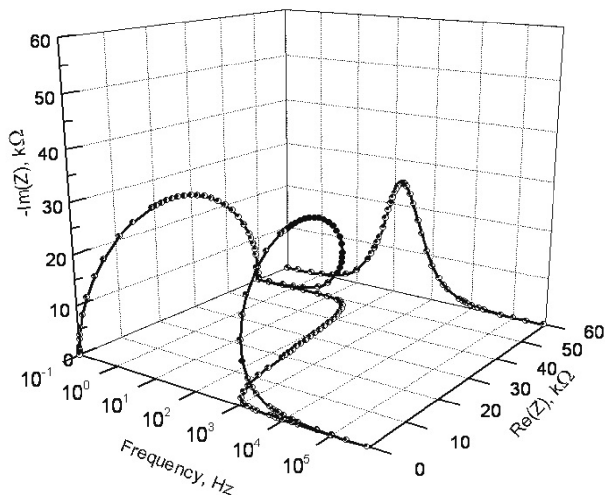
$$\operatorname{Re} Z = R_S = \frac{R_P}{1 + (\omega R_P C_P)^2} = \frac{R_P}{1 + W_P}, \quad \operatorname{Re} Y = \frac{1}{R_P} = \frac{\omega^2 R_S C_S^2}{1 + (\omega R_S C_S)^2} = \frac{W_S}{R_S (1 + W_S)},$$

$$\operatorname{Im} Z = \frac{1}{\omega C_S} = \frac{\omega R_P^2 C_P}{1 + (\omega R_P C_P)^2} = \frac{R_P \sqrt{W_P}}{1 + W_P}, \quad \operatorname{Im} Y = \omega C_P = \frac{\omega C_S}{1 + (\omega R_S C_S)^2} = \frac{\omega C_S}{1 + W_S},$$

където $\omega = 2\pi f$ е кръговата честота и $W = (\omega RC)^2$.

При пасивните вериги импедансът Z по определение не зависи от приложеното напрежение, но, както се вижда от горните формули, зависи от честотата $f = \omega/2\pi$, т.е. $Z = Z(f)$. За химичните и биологичните обекти обаче трябва да се има предвид и обстоятелството, че те променят свойствата си при прилагане на по-високи напрежения. Ето защо използваните за измерване сигнали трябва да бъдат достатъчно слаби, без, разбира се, това да пречи на регистрацията им. Зависимостта на импеданса от честотата може да служи за описание на пасивните електрични свойства на изследваните системи, като им бъде приписана еквивалентна схема, която от своя страна е физически адекватна на различните структури и процеси в тях.

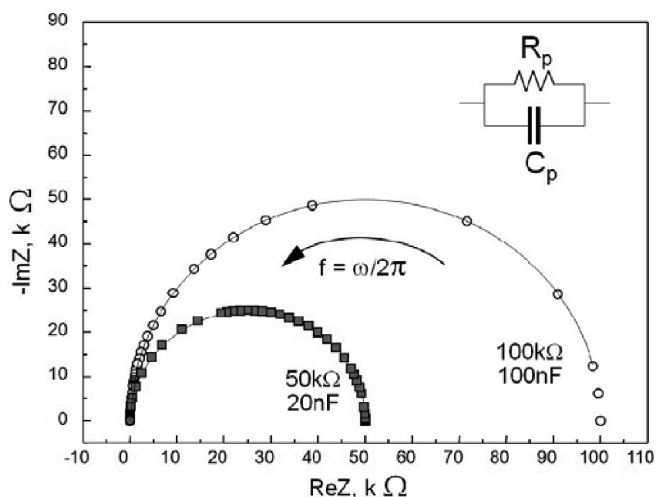
Един удобен начин за представяне на връзките между отделните компоненти на еквивалентната схема и намиране на техните стойности са т.нар. *импедансни диаграми*. Тъй като $Z(f) = \operatorname{Re} Z(f) + i \operatorname{Im} Z(f)$, той може да бъде изобразен като радиус-вектор или точка в тримерното пространство $(\operatorname{Re} Z, \operatorname{Im} Z, f)$. С промяната на честотата Z описва някаква крива в това пространство. Импедансните диаграми са ортогоналните проекции на Z в трите равнини $(\operatorname{Re} Z, -\operatorname{Im} Z)$, $(\operatorname{Re} Z, f)$ и $(-\operatorname{Im} Z, f)$, фиг. 3.



Фиг. 3. Тримерно представяне на импеданса Z и неговите проекции в трите равнини $(\operatorname{Re} Z, -\operatorname{Im} Z)$, $(\operatorname{Re} Z, f)$ и $(-\operatorname{Im} Z, f)$ [4]

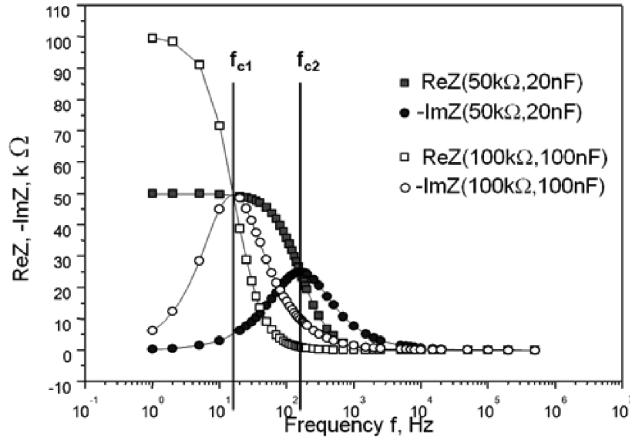
От конкретния вид на кривите може да се съди за еквивалентната схема, породила такова импедансно поведение, както и да бъдат определени нейните параметри. Като илюстрация по-надолу са показани теоретично получени импедансни диаграми за някои прости комбинации от съпротивления (R) и кондензатори (C). Естествено, ще се спрем само на най-характерните.

Импедансът $Z(f)$ на успоредно свързани R_p ($50\text{ k}\Omega$) и C_p (20 nF) (RC -кръг) в зависимост от честотата описва кривата, дадена с по-тъмен маркер на фиг. 4. Имайки предвид горните изрази за $\text{Re}Z$ и $\text{Im}Z$, не е трудно да се покаже, че проекцията на тази крива в равнината ($\text{Re}Z, -\text{Im}Z$) (известна още като Nyquist plot) представлява допирателна към ординатата полуокръжност с център върху абсцисата и радиус $R_p/2$. На фиг. 4 е показана и втора полуокръжност за други стойности на R_p ($100\text{ k}\Omega$) и C_p (100 nF), маркирана с бяло. Нарастването на честотата f е указано със стрелка.



Фиг. 4. Диаграма на Найкуист (Nyquist) за успоредно свързани R_p и C_p

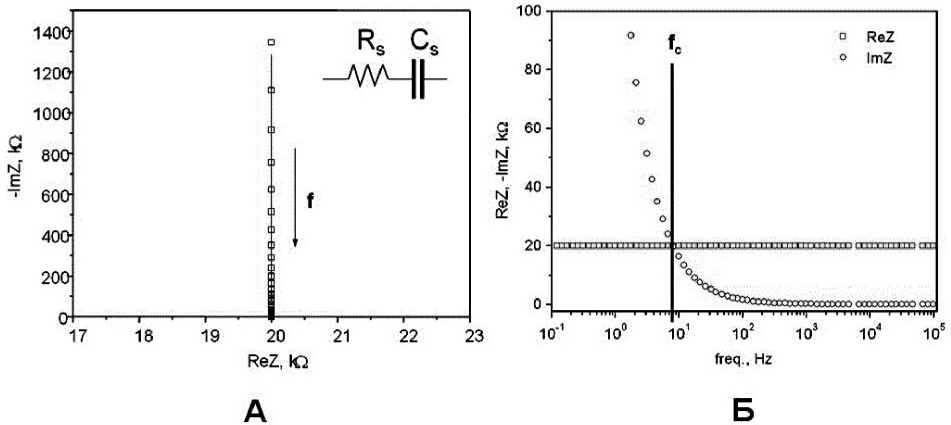
Кривите на зависимостта от f (фиг. 5) в другите две диаграми (на Боде) също имат типична форма и дават възможност за определяне на R_p и C_p . R_p се определя от стойността, към която клони $\text{Re}Z$ при ниски честоти, а C_p – от максимума на $\text{Im}Z$ или инфлексната точка на $\text{Re}Z$, които се проявяват на честотата на полупрехода $f_c = 1/2\pi R_p C_p = 1/2\pi\tau$, наричана още характеристична, или *критична честота*. На диаграмата на фиг. 4 тя съответства на върха на полуокръжността.



Фиг. 5 Диаграма на Бодe (Bode) за успоредно свързани R_p и C_p

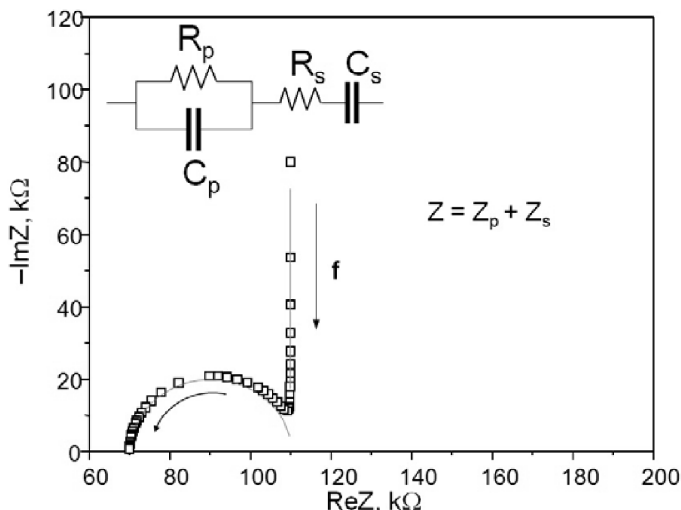
Алтернативен начин на комплексното представяне на Z може да бъде зададено чрез неговия модул $|Z|$ и фазовия ъгъл θ : $Z = \text{Re}Z + i\text{Im}Z = |Z|e^{-i\theta} = |Z|\cos\theta - i|Z|\sin\theta$.

При последователно свързани R_s ($20 \text{ k}\Omega$) и C_s ($1 \mu\text{F}$) импедансната диаграма в комплексната равнина е права, перпендикулярна на абсцисата, пресичаща я в точката $\text{Re}Z = R_s$ (фиг. 6А). Правата започва от безкрайност при ниските честоти и клони към нула при високите, както следва и от израза за $\text{Im}Z$. Съответно, на другата диаграма (фиг. 6Б) реалната част на импеданса е постоянна за всички честоти $\text{Re}Z = \text{const} = R_s$, а имагинерната е $\text{Im}Z = -1/\omega C_s = -f_c R_s / f$ (т.е. от вида $1/x$).



Фиг. 6. Импедансни диаграми на Найкуист (А) и Бодe (Б) за последователно свързани $R_s = 20 \text{ k}\Omega$ и $C_s = 1 \mu\text{F}$

Ако към R_s ($70 \text{ k}\Omega$) и C_s ($1 \text{ }\mu\text{F}$) добавим още и един RC -кръг, ще се получи диаграмата от фиг. 7.



Фиг. 7. Диаграма на Nyquist за последователно свързани R_s , C_s и RC -кръг ($R_p = 40 \text{ k}\Omega$, $C_p = 20 \text{ nF}$; $R_s = 70 \text{ k}\Omega$, $C_s = 1 \text{ }\mu\text{F}$)

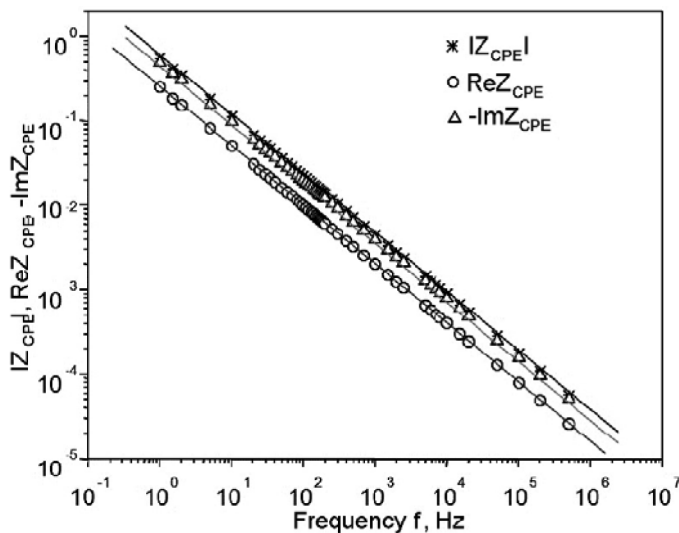
За съжаление обаче, не винаги е възможно поведението на една реална система да бъде моделирано с еквивалентна схема, съдържаща само краен брой честотно независими елементи (идеални R и C). Обикновено импедансът на химичните и биологични образци е силно нелинеен, т.е. може да зависи от честотата както пряко, така и косвено (когато самите му компоненти зависят от f). Това налага въвеждането на нелинейни елементи с характерна честотна зависимост. Един от най-популярните е т.нар. *елемент с постоянна фаза* (англ. Constant Phase angle Element, CPE). Той се дефинира с израза

$$Z_{\text{CPE}} = A(i\omega)^{-a}$$

където A и a са параметри, независещи от f . Очевидно, за $a = 0$ CPE представлява идеален резистор $R = A$, докато за $a = 1$ той е идеален кондензатор $C = 1/A$. Използвайки равенството на Ойлер, можем да намерим реалната и имагинерната част на Z_{CPE} :

$$Z_{\text{CPE}} = A(i\omega)^{-a} = A\omega^{-a} e^{-ia\pi/2} = A\omega^{-a} \cos(a\pi/2) - iA\omega^{-a} \sin(a\pi/2),$$

т.е. модулът и фазовият ъгъл са съответно $|Z_{\text{CPE}}| = A\omega^{-a}$ и $\theta = a\pi/2$. От тук е ясно, че в логаритмичен мащаб зависимостта на $|Z_{\text{CPE}}|$, $\text{Re}Z_{\text{CPE}}$ и $-\text{Im}Z_{\text{CPE}}$ от честотата дава прави линии (фиг. 8). При това положение очевидно и диаграмата в равнината ($\text{Re}Z$, $-\text{Im}Z$) ще бъде права.



Фиг. 8. Честотна зависимост на модула на импеданса $|Z|$ и двете му части $\text{Re}Z$ и $-\text{Im}Z$ за CPE с параметри $A = 2$, $a = 0,7$

Пасивните електрични свойства на някаква среда между два електрода с площ A на разстояние d един от друг напълно се определят от нейната специфична проводимост σ' и от диелектричната проникваемост ϵ' . Тези величини могат да бъдат получени от измерването на импеданса, като се имат предвид зависимостите

$$G = \sigma'(A/d),$$

$$C_p = \epsilon'\epsilon_0(A/d),$$

За широк честотен диапазон обаче диелектричните свойства на веществата не остават постоянни. Подобно на импеданса се наблюдава дисперсия на диелектричната проникваемост $\epsilon' = \epsilon'(\omega)$, като ϵ' намалява от една статична стойност ϵ'_L за ниските честоти до някакво гранично ϵ'_∞ за високите. Това поведение се описва от класическата теория на Дебай-Хюкел [5] за полярни електролити с въвеждането на комплексната диелектрична проникваемост

$$\epsilon^\infty = \epsilon' \quad i\epsilon'' = \epsilon'_\infty + \frac{\epsilon'_L \epsilon'_\infty}{1 + i\omega\tau} = \epsilon'_\infty + \frac{\epsilon'_L \epsilon'_\infty}{1 + (\omega\tau)^2} \quad i\omega\tau \frac{\epsilon'_L \epsilon'_\infty}{1 + (\omega\tau)^2},$$

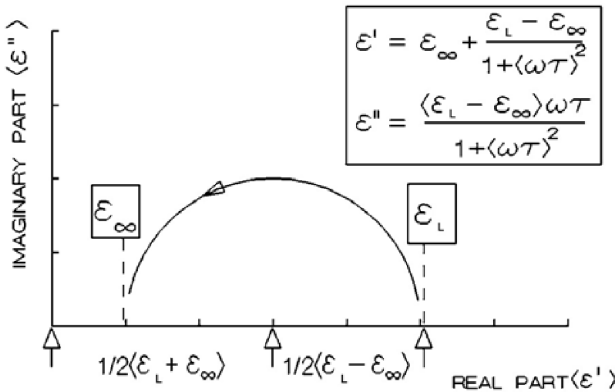
където имагинерната част $\epsilon'' = (\sigma' - \sigma'_L)/\omega\epsilon_0$ е известна като диелектрични загуби, а τ има смисъл на релаксационна константа. Теорията обяснява разликата $\Delta\epsilon' = \epsilon'_L - \epsilon'_\infty$ с диполната поляризация. Молекулите се разглеждат като взаимодействащи сферични частици във вискозна среда. Тяхната ориентация в променливото външно електрично поле

среща противодействието на топлинното движение и междумолекулните сили. Лесно се вижда, че, както и в случая на импеданса, зависимостта на имагинерната ϵ'' от реалната част ϵ' представлява полуокръжност с радиус $\frac{1}{2}\Delta\epsilon'$ (фиг. 9). Едно по-късно полуемпирично доусъвършенстване на модела, направено от Коул и Коул [6], включва и СРЕ в еквивалентната схема, така че горният израз се превръща в

$$\epsilon^* = \epsilon' - i\epsilon'' = \epsilon'_\infty + \frac{\epsilon'_L - \epsilon'_\infty}{1 + (i\omega\tau)^{1-\alpha}}$$

При това положение на диаграмата в равнината (ϵ', ϵ'') центърът на полуокръжността ще бъде отместен на ъгъл $\alpha\pi/2$ под абсисата. В зависимост от характера на изследването, понякога се оказва по-информативно данните да се представят чрез комплексната проводимост, чиято имагинерна част се дава с изрази

$$\sigma'' = (\epsilon' - \epsilon'')\omega\epsilon_0.$$



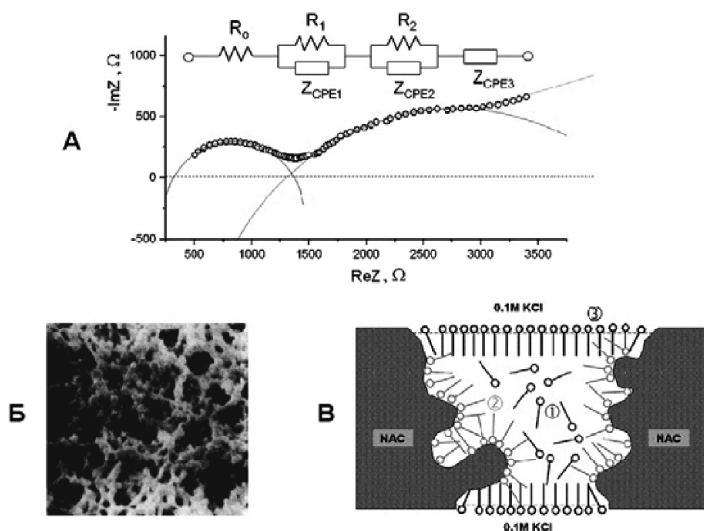
Фиг. 9. Диаграма на Коул-Коул (Cole-Cole) за двете части на диелектричната проницаемост

Тук е мястото да напомним, че (на всичкото отгоре) в общия случай на анизотропна среда диелектричната проницаемост е тензор от втори ранг с компоненти ϵ_{ij} , задаващи връзката между векторите на електричното поле \mathbf{E} и индукцията \mathbf{D} [7]:

$$D_i = \sum_j \epsilon_{ij} E_j.$$

Намирането на адекватен модел, който задоволително да обяснява експерименталните резултати, получени с помощта на електрохимичната импедансна спектроскопия (EIS), не винаги е лесна задача. Данните от измерването на импеданса трябва да се напасват с подходяща еквивалентна схема.

За тази цел има разработени програми, осигуряващи тяхната комплексна апроксимация (едновременно и на реалната и на имагинерната част). Еквивалентната схема сама по себе си обаче не е в състояние да отговори еднозначно на въпроса какви са конкретните механизми и структури, лежащи в основата на модела (напр. фиг. 10).



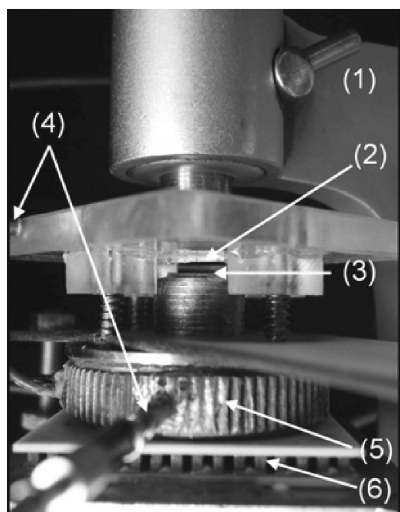
Фиг. 10. Импедансно изследване на нитроацетатцелузна (NAC) филтърна мембрана, импрегнирана с лецитин. R_0 е съпротивлението на разтвора (0,1M KCl), в който е потопена мембраната. (A) Диаграма на Найкуист (по данни на Е. Матсаридиζ); (Б) електронно-микроскопска снимка на порите в мембраната; (В) хипотетично разпределение на молекулите в липидната фаза, което би могло да обясни трите вида импедансно поведение

Във всички случаи са необходими допълнителни съображения за изясняване на неговата физическа същност. Ето защо проблемът значително се опростява, когато е налице информация от източници, независими от електрохимичния експеримент.

3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНА УСТАНОВКА И ИЗПОЛЗВАНИ МАТЕРИАЛИ

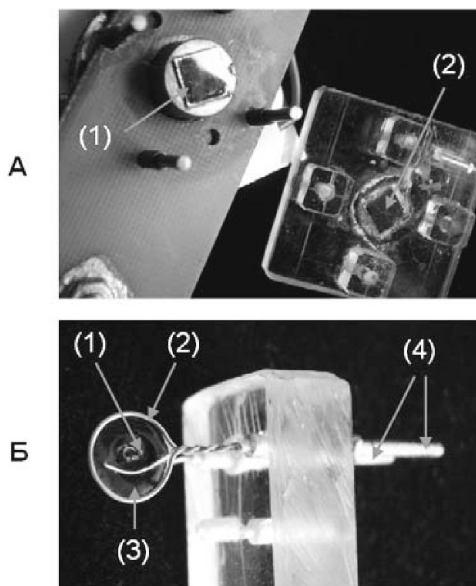
За измерване на импеданса на липидните филми върху твърдотелна подложка беше изработена и сглобена експерименталната установка, показана на фиг. 11. Тя е съставена от следните възли – микрометрично устройство за установяване на разстоянието между подложките-електроди (1); работни електроди (2, 3), свързващи се с измервателното устройство чрез иглени

конектори (4); пелтие-елемент (6) за поддържане на температурата на филмите. Електродите са монтирани върху държател (5). В долния електрод, контактуващ с пелтие-елемента, е вградено термосъпротивление за следене на температурата на подложките.



Фиг. 11. Снимка на експерименталната установка за изследване на импеданса на липидни филми върху твърда подложка: 1) микрометър; 2) горен работен електрод; 3) долен работен електрод; 4) иглени („pin“) конектори; 5) държател за долния електрод (месинг); 6) пелтие-елемент

В тази установка като твърдотелни подложки-електроди се използват силициеви заготовки от полупроводникови MOS (Si/SiO_2) структури, които имат златно покритие от едната страна (фиг. 12А). Върху това покритие се отлагат липидните филми. При изследване на импеданса на пенните липидни филми е използвана електрохимичната клетка, показана на фиг. 12Б. Нейните два електрода са изработени от неръждаема стоманена жица (Krupp Dental, Germany), като единият е кръгъл, с формата на пръстен, а другият има Г-образна форма, която влиза в центъра на кръга (т.е. на пенния филм след образуването му). Свързването на всички електроди към измервателното устройство се извършва чрез позлатени pin-конектори тип Amphenol ($\text{Ø } 1,5 \text{ mm}$).



Фиг. 12. Снимка на използваните в работата електроди. (А) MOS пластинки със златно покритие, прикрепени към съответните държатели: 1) горен електрод; 2) долен електрод. (Б) Електроди за измерване на импеданса на пенни филми: 1) централен Г-образен електрод; 2) периферен кръгъл електрод; 3) пенен филм; 4) иглени конектори

Липидните филми, с които е работено в нашето изследване, се получават от естествен лецитин с растителен произход (Lecithin, „Walmark Co. Ltd.“, Czech Republic). Той се разтваря в нормален хексан (n-Hexan, C_6H_{14} , „Merck KG&A“, Germany) до концентрация от 20 mg/ml. За приготвяне на смесените пенни филми като детергент е използван натриев додецил сулфат ($CH_3(CH_2)_{10}OSO_3Na^+$, NaDoS, SDS, „Merck KG&A“, Germany).

4. МЕТОД НА ИЗМЕРВАНЕ. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Подходът за изследване на електричните свойства на химични и биологични образци, предлаган в тази работа, дава възможност да се измерва с висока точност импедансът на RLC-вериги и е изграден върху проста, евтина и широко достъпна схема. Реализиран е чрез стандартна стерео звукова компютърна платка, базирана на „ALC861-GR“ (16 битов АЦП-ЦАП (A/D-D/A) преобразувател с до 96 kHz честота на извадката) [8] плюс схема с двоен операционен усилвател LM358 за поддържане на висок входен импеданс.

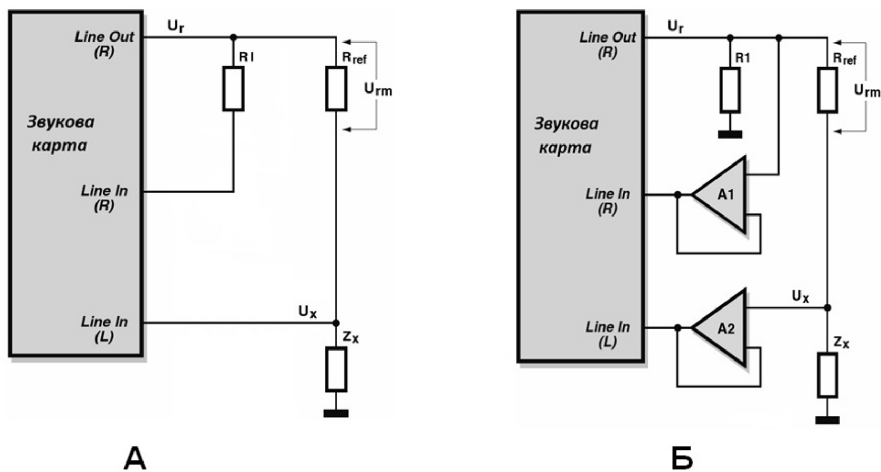
Методът на измерване се основава на следния принцип. Единият от двата изходни канала (десният) на звуковата карта подава синусоидален сигнал

към делителя на напрежение, състоящ се от сравнителен резистор R_{ref} и изследвания импеданс Z_x . Вторият изходен канал (левият) не се използва. По-средством двата входни канала се измерват двете напрежения U_{rm} и U_x . По принцип е възможно напрежението, приложено върху R_{ref} , да се разглежда като пропорционално на напрежението, което подава програмата през изхода. На практика обаче звуковата карта притежава латентност между командата за подаване на сигнал от програмата и изработването на сигнала. Този проблем се решава елегантно, като се използват левият и десният вход на картата.

В нашата работа за отчитане на данните от входовете на звуковата карта е използвана програмата PhysLab 5.0 с автор С. П. Палто, Москва, Институт кристаллографии [9]. Тази програма представлява виртуален осцилоскоп, използващ компютърната звукова карта за регистрация на сигнала от нейния вход и изход. Преди всичко PhysLab е предназначена за изследвания, използващи фазово чувствителни измервания. Основните „уреди“, които използвахме от програмата, и техните характеристики са:

- Нискочестотен двуканален осцилоскоп (Oscilloscope) с макси-мална честота на дискретизация на входния сигнал 96 kHz.
- Синхронен детектор (Lock-In), предназначен за синхронно отчитане на честотата, амплитудата и фазата на периодични сигнали до 5 V. Сумарната нелинейност от дискретизацията на сигнала е не повече от 0,01%. Динамичният диапазон на измервания опорен сигнал е от 2 mV до 5 V. Честотният диапазон на измервания опорен сигнал е от 20 Hz до 48 kHz.
- Управляем генератор на сигнал (VF-scanner). Генерира синусоидални сигнали. Сигналят може да бъде генериран едновременно по два канала, като единият може да се използва в качеството на опорен сигнал. Ако VF-scanner се използва заедно с Lock-In, това дава възможност да се изследват амплитудно-честотните характеристики на физични обекти.

Като първоначална идея беше реализирана следната проста схема (която условно ще наричаме V1), чиято блок-схема е показана на фиг. 13А. Отношението между падовете на напреженията върху сравнителното съпротивление R_{ref} и образеца Z_x и фазата между тях са ключовите параметри за пресмятане на импеданса. Падът U_r върху последователно свързаните R_{ref} и Z_x (който е равен на изходното от картата напрежение) съдържа пада U_x , определящ се от импеданса на образеца. Чрез разликата в нивата на напрежението U_{rm} върху сравнителния резистор и напрежението U_x върху образеца и фазовата разлика между двата сигнала става възможно да се определи импедансът на изследвания образец.



Фиг. 13. Блок-схема на устройството за измерване на импеданса. (А) Вариант V1, в който се използват директно входовете на звуковата карта. (Б) Вариант V2, в който е добавена схема с операционни усилватели за поддържане на високо входно съпротивление

Тъй като в процеса на тестване бяха получени някои незадоволителни, несъвпадащи с теорията резултати, се наложи да се изработи допълнителна схема с двоен операционен усилвател LM358 за поддържане на висок входен импеданс. Като резултат бе сглобено устройството V2 (чиято блок-схема е показана на фиг. 13Б), чрез което вече може да се измери с по-висока точност импедансът на различни RLC- вериги. Съпротивлението $R1$ задава изхода на звуковата карта спрямо земята. Двата операционни усилвателя, вградени в един корпус (всеки с усилване единица) действат като буфер с висок входен и нисък изходен импеданс. Синусоидалното напрежение U_r (идващо от изхода на звуковата карта), което се подава на образеца, се измерва посредством десния входен канал. Падът на напрежение върху образеца U_x се измерва посредством левия входен канал. Захранващото напрежение на операционния усилвател се поддържа ниско до 3,3 V с цел предпазване на звуковата карта от повреди. Точността на измерването зависи от това, доколко точно е определена стойността на R_{ref} .

Принципът на действие на вариант V2 е същият като предишния. Отново разликата в нивата на напрежението U_r върху сравнителния резистор и напрежението U_x върху образеца и фазовата разлика между двата сигнала дава възможност да се определи импедансът на изследвания образец. Имат се предвид следните прости формули:

$$U_x = I_{ref} \cdot Z_x = \frac{U_{rm}}{R_{ref}} \cdot Z_x,$$

$$\text{където } U_{rm} = U_r - U_x.$$

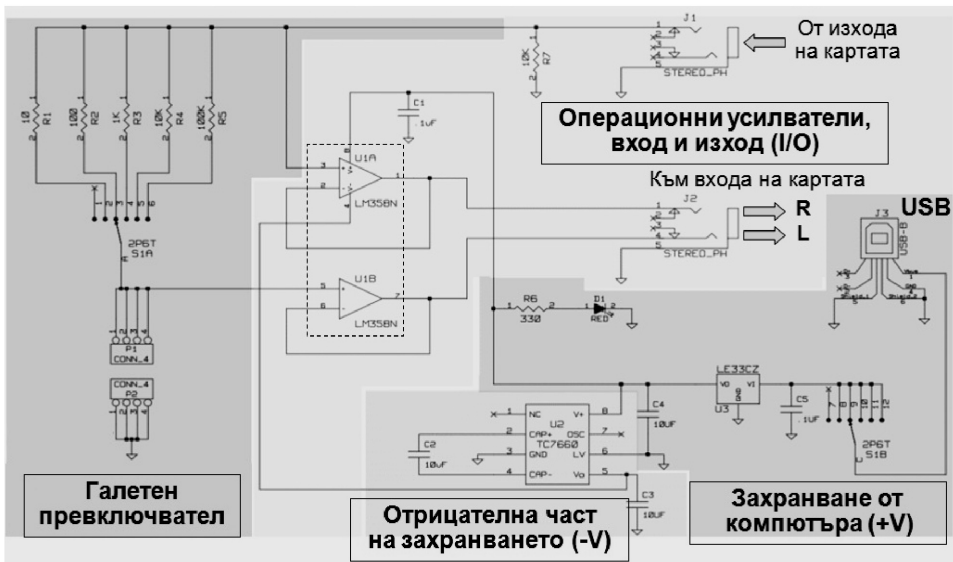
В крайна сметка можем да запишем

$$U_{rm} = A \cdot \sin(\omega t)$$

и

$$U_x = A \cdot \sin(\omega t + \varphi)$$

Електрическата схема на предусилвателя от вариант V2 е показана на фиг.14. В нея операционният усилвател LM358 се захранва с напрежение до $\pm 3,3V$. Напрежението не бива да надвишава тази стойност, тъй като е възможно да бъде повредена звуковата карта. За осигуряване на това напрежение схемата се свързва към $+5V$ -ата линия на USB порта на компютъра, след което чрез регулатора на напрежение LE33CZ то се понижава до $+3,3V$. Конверторът на напрежение TC7660 преобразува напрежението $+3,3V$ в напрежение $\pm 3,3V$. Галетният превключвател служи за избор на съпротивлението R_{ref} . Монтиран е и светодиодиод за указване дали схемата е в работно положение.

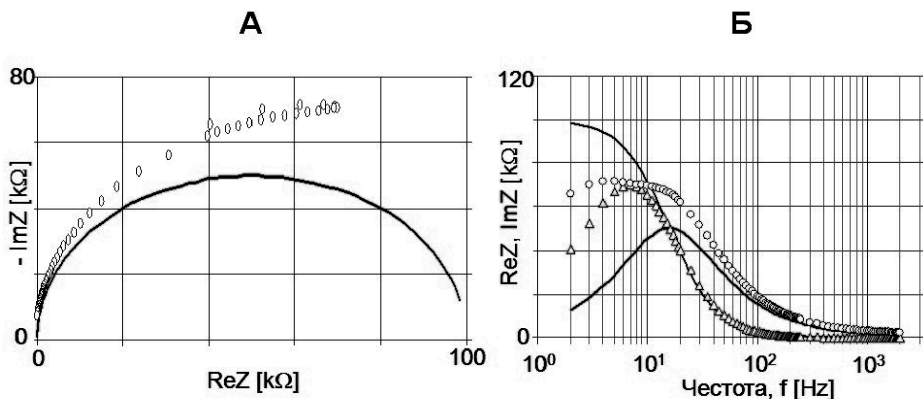


Фиг. 14. Електрическа схема на предусилвателя и захранването му

Както казахме, най-напред бяха проведени серия измервания, при които сигналът беше подаван директно на звуковата карта (или т.нар. вариант V1). Като репрезентативна извадка по-надолу са показани резултатите

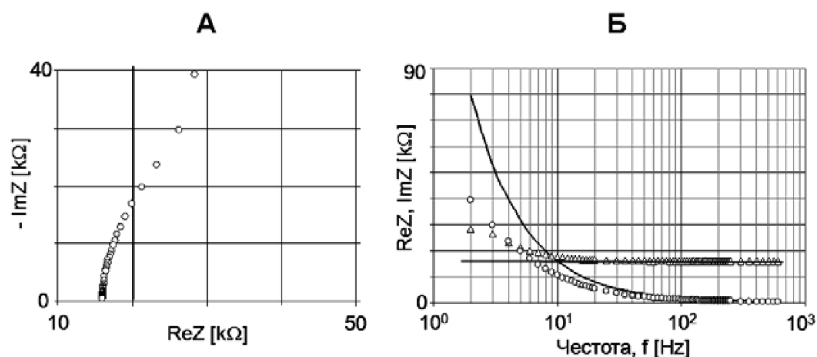
от някои измервания на успоредно и последователно свързани стандартни електронни елементи – съпротивления и кондензатори, независещи от честотата. Резултатите са дадени във вид на импедансни диаграми съответно на Найкуист (зависимост на $-\text{Im}Z$ от $\text{Re}Z$) и Боде (зависимост на $\text{Re}Z$ и $\text{Im}Z$ от честотата f). Този начин на представяне изглежда най-удобен за целите на нашето изложение, тъй като дава възможност за бързо ориентиране в поведението на импеданса.

На фиг. 15 са дадени резултатите от измерването на импеданса на успоредно свързани $R_p = 100 \text{ k}\Omega$ и $C_p = 100 \text{ nF}$ със сравнително съпротивление $R_{\text{ref}} = 9,83 \text{ k}\Omega$ (определено с омметър G-1004.501, производство на бившата ГДР). Въпреки че диаграмите в общи линии запазват характерната форма за този тип свързване (срв. фиг.4, 5), вижда се голямото несъответствие и за двете диаграми между експерименталните и теоретичните стойности.



Фиг. 15. Импедансни диаграми на Найкуист (А) и Боде (Б) за успоредно свързани $R_p = 100 \text{ k}\Omega$ и $C_p = 100 \text{ nF}$ измервани по схема VI. Експерименталните данни са показани с маркери ($-\text{Im}Z(\text{Re}Z)$: \circ , $\text{Re}Z(f)$: \circ , $\text{Im}Z(f)$: \triangle), а теоретично пресметнатите стойности – с непрекъснати криви

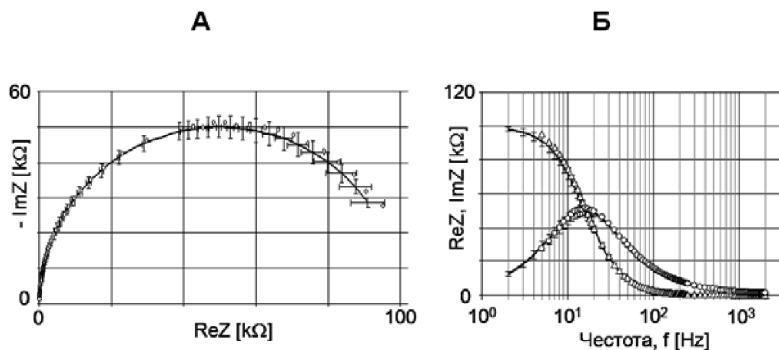
Не е по-добро положението и с другите модели. При последователно свързани $R_s = 20 \text{ k}\Omega$ и $C_s = 1 \text{ }\mu\text{F}$ (срв. фиг. 6) се получават резултатите, дадени на фиг.16. Несъответствието е по-силно изразено в ниските честоти, като стойностите за $\text{Re}Z$ са завишени, а тези за $\text{Im}Z$ са занижени, което води до сигмоидалния вид на Найкуист-диаграмата (фиг. 16А), която в този случай трябва да бъде права линия.



Фиг. 16. Импедансни диаграми на Найкуист (А) и Боде (Б) за последователно свързани $R_s = 20 \text{ k}\Omega$ и $C_s = 1 \text{ }\mu\text{F}$ измервани по схема V1. Експерименталните данни са показани с маркери $(-\text{Im}Z(\text{Re}Z))$: \circ , $\text{Re}Z(f)$: \circ , $\text{Im}Z(f)$: \triangle , а теоретично пресметнатите стойности – с непрекъснати криви

Очевидно е, че и при двата вида свързване отклонението от истинските импедансни криви е много голямо. Ето защо в тези случаи не сметохме за нужно да дадем грешката в цифров вид.

Представените по-долу измервания имат за цел да се сравнят резултатите, получени с използване на съгласуващия предусилвател (схема V2) с тези от предишния параграф. Най-напред е измерена комбинация от успоредно свързани съпротивление и кондензатор със същите стойности $R_p = 100 \text{ k}\Omega$ и $C_p = 100 \text{ nF}$ като на фиг. 15.

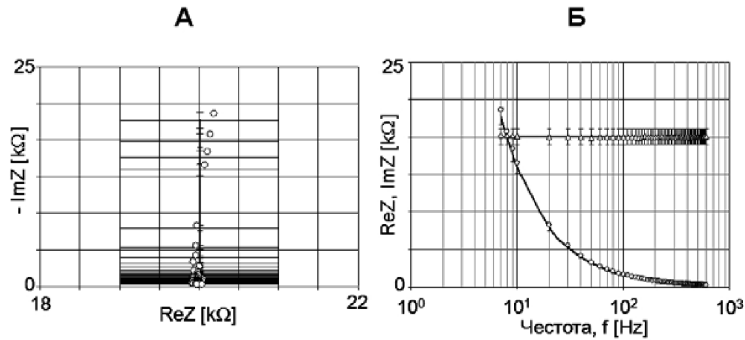


Фиг. 17. Импедансни диаграми на Найкуист (А) и Боде (Б) за успоредно свързани $R_p = 100 \text{ k}\Omega$ и $C_p = 100 \text{ nF}$. Измерванията стават по схема V2. Експерименталните данни са показани с маркери $(-\text{Im}Z(\text{Re}Z))$: \circ , $\text{Re}Z(f)$: \circ , $\text{Im}Z(f)$: \triangle , а теоретично пресметнатите стойности – с непрекъснати криви

Много по-доброто представяне на устройството при наличието на съгласуващ предусилвател е очевидно. Независимо от това, тук е дадена и

грешката, дължаща се на вариацията в R - и C -елементите. Тя е изчислявана при предположение за отклонение от 5% в стойностите на съпротивленията и кондензаторите. Както се вижда, получените резултати са доста под рамките на грешката.

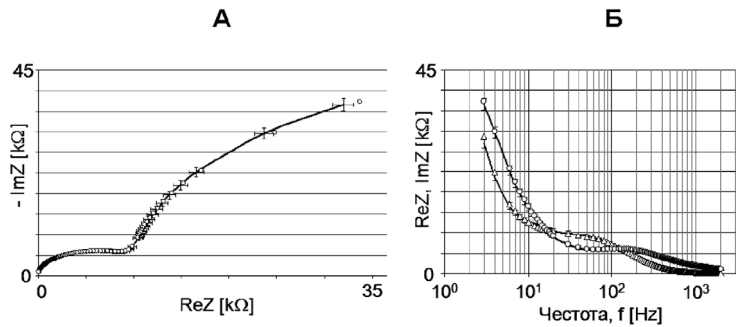
Следващата серия представя измерване на същата комбинация от последователно свързани $R_s = 20 \text{ k}\Omega$ и $C_s = 1 \text{ }\mu\text{F}$, както на фиг. 16.



Фиг. 18. Импедансни диаграми на Найкуист (А) и Боде (Б) за последователно свързани $R_s = 20 \text{ k}\Omega$ и $C_s = 1 \text{ }\mu\text{F}$. Измерванията стават по схема V2. Експерименталните данни са показани с маркери ($-\text{Im}Z(\text{Re}Z)$: \circ , $\text{Re}Z(f)$: \circ , $\text{Im}Z(f)$: Δ), а теоретично пресметнатите стойности – с непрекъснати криви

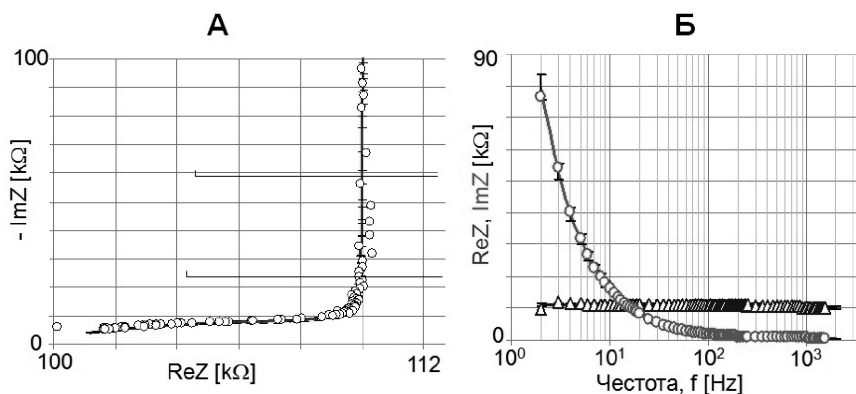
Тук отново се наблюдава извънредно надеждното действие на измерителното устройство. На графиката на фиг. 18А скалата по X е разтегната и затова отсечките на грешката изглеждат по-големи.

С усложняване на моделните схеми за измерване чрез добавянето на допълнителни елементи точността остава в същите граници. Това е категорично демонстрирано на следващите две фигури (фиг. 19, 20).



Фиг. 19. Импедансни диаграми на Найкуист (А) и Боде (Б) за комбинация от два последователни RC -кръга, в които $R_{p1} = 10 \text{ k}\Omega$; $C_{p1} = 100 \text{ nF}$ и $R_{p2} = 100 \text{ k}\Omega$; $C_{p2} = 1 \text{ }\mu\text{F}$

Данните, получени от измерването на два последователни RC -кръга почти напълно съвпадат с теоретичните изчисления (фиг. 19). Това, че втората полуокръжност не може да бъде записана цялата, се дължи на обхвата на звуковата карта, който за тези стойности на RC -комбинацията се оказва недостатъчен в ниските честоти.



Фиг. 20. Импедансни диаграми на Найкуист (А) и Боде (Б) за комбинация от един RC -кръг (с $R_p = 10 \text{ k}\Omega$; $C_p = 22 \text{ nF}$) и последователно свързани с него $R_s = 100 \text{ k}\Omega$ и $C_s = 100 \text{ nF}$

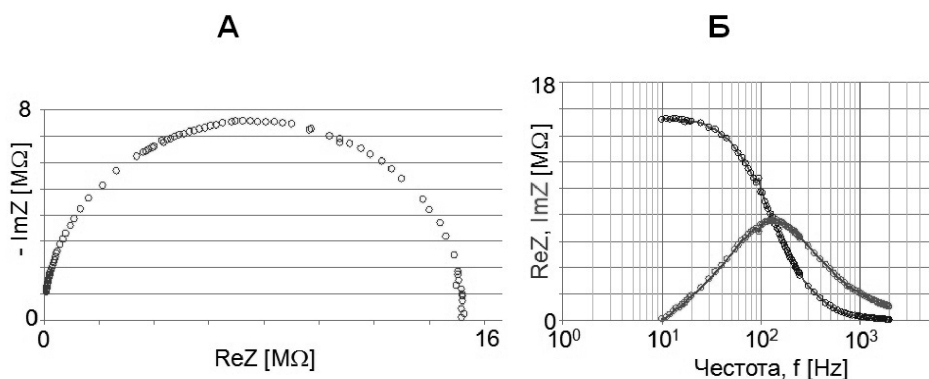
Също много добри резултати се получават и при използване на комбинация от един RC -кръг и последователно свързани с него R_s и C_s (срв. фиг. 7). Съответните импедансни диаграми са показани на фиг. 20. За да не се претрупва графиката, в диаграмата на Найкуист (фиг. 20А) са дадени само две отсечки на грешката по X . Също така, за по-голяма яснота на фиг. 20В скалата по Y е разтеглена, за да се види по-отчетливо характерната за този тип свързване част от окръжност във високите честоти.

Тъй като устройството е конструирано с основната идея да бъде използвано за изследване на различни мембранни аналози, естествено бяха правени измервания на някои липидни моделни системи. В нашата работа сме се ограничили до два типа от тях, които се различават съществено както по структура, така и по свойства.

Първо ще представим резултатите от липидните филми върху подложка. Те се получават с нанасяне на разтвор от лецитин в нормален хексан с концентрация 20 mg/ml върху златната повърхност на електродите. Като най-презентативни, демонстриращи възможностите на измерителното устройство, са показани зависимостите на импедансните диаграми от дебелината на филмите (т.е. от разстоянието между електродите). Веднага е редно да кажем, че става дума за много “дебели” филми. Те съществено се различават по вътрешна структура и свойства от тънките течни филми [10], които

могат да достигнат и до мономолекулни слоеве. Използваните тук филми трябва да се разглеждат по-скоро като хомогенни и изотропни, съставени от обемен разтвор. Разбира се, те също притежават и адсорбирана към металните електроди мономолекулна компонента, но нейният импеданс не може да бъде регистриран на “фона” на обемната част. В случая обаче е по-важно, че устройството може задоволително да работи в течна среда с ниска диелектрична проникваемост (за липидите $\epsilon \approx 2$). Освен това тези филми са интересни и от практическа гледна точка, тъй като са свързани с проблемите на смазване на металните повърхности [11]. Такива са например някои части от двигателите с вътрешно горене, които работят на по-високи натоварвания.

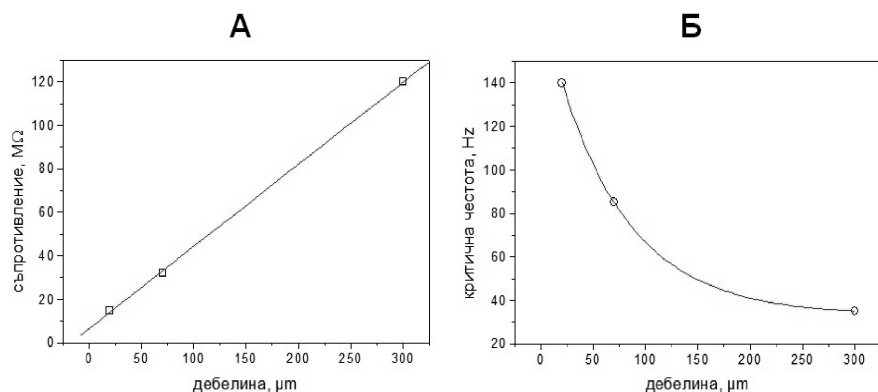
По-долу е изследвана зависимостта на импеданса от дебелината на филмите. Получени са двата вида импедансни диаграми за три дебелини на липидните филми – 20, 70 и 300 μm . На фиг. 21 са показани резултатите за 20 μm . За останалите дебелини формата на кривите е аналогична.



Фиг. 21. Импедансни диаграми на Найкуист (А) и Боде (Б) за липиден филм с дебелина 20 μm

От характерната форма на диаграмите и за трите дебелини може да се извади заключение, че най-удобен еквивалентен RC -модел за описание на импеданското поведение е простата схема на успоредно свързани съпротивление и кондензатор (фиг. 4, 5). Известно е, че в този случай съпротивлението R_p може да бъде намерено от диаграмата на Найкуист, тъй като тя представлява допирателна към ординатата полуокръжност с център върху абсцисата и радиус $R_p/2$. Така за стойностите на това съпротивление при трите различни дебелини на филмите се получават 15 $M\Omega$, 32 $M\Omega$ и 120 $M\Omega$, съответстващи на 20, 70 и 300 μm респективно. Тези стойности звучат много правдоподобно, като се вземе предвид, че удовлетворяват една почти идеална линейна зависимост на R_p от дебелината (фиг. 22А), както би трябвало да се очаква. Друг интересен резултат е експоненциалната зависимост на

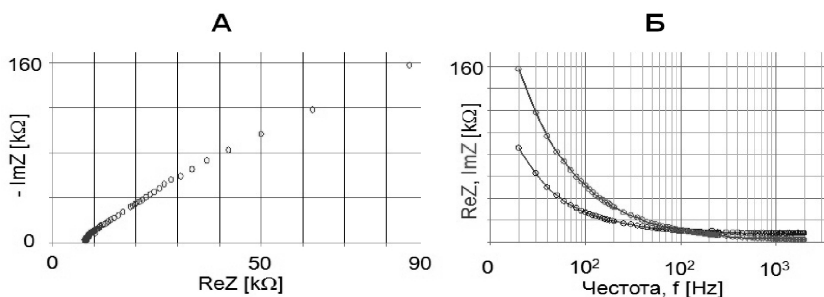
критичната честота f_c (отговаряща на пресечната точка на реалната и имагинерната част на импеданса в диаграмата на Боде) от дебелината (фиг. 22Б), който за момента обаче ще се въздържим да дискутираме.



Фиг. 22. Зависимост на еквивалентното паралелно съпротивление R_p (А) и критичната честота f_c (Б) от дебелината на липидните филми

Както казахме, за тези дебелини на филма поведението на импеданса се доминира от $R_p C_p$ -модела на „обемната” фаза. С използваната тук конфигурация електроди не сме в състояние да постигнем по-тънки филми, каквито са наблюдавани в работа [12], където са използвани електроди от полирани месингови повърхности с леко сферична форма.

Втория пример, който ще дадем, касае импеданса на пенни филми. Обикновено те се образуват чрез изтъняването на течна прослойка от разтвор на детергент, която се намира във въздушна среда [13]. Добре известно е, че този тип филми в крайното си равновесно положение представляват бислой, в който амфифилните молекули са ориентирани с хидрофилните глави навътре, към водната фаза (евентуално съдържаща електролит), и с въглеродородните вериги навън, към газовата фаза. В нашия случай пените филми са смесени, т.е. освен детергент съдържат и липид. Те са получавани с добавянето на воден разтвор (0,1KCl) на натриев додецил сулфат (SDS) към основния липиден формиращ разтвор. Смесването на двата разтвора е възможно поради отмиващото действие на детергента [14, 11].



Фиг. 23. Импедансни диаграми на Найкуист (А) и Боде (Б) за смесен детергент-липиден филм

Заслужава да отбележим, че в литературата се срещат импедансни измервания на пенни филми, повечето от които обаче са изградени само от детергент [15, 16]. Освен това тези изследвания са с чисто фундаментална физикохимична насоченост. Ето защо не е странно, че нашите резултати не съвпадат с получените в цитираните работи. За това могат да се изтъкнат най-малко две основни причини: 1) както споменахме, нашите филми освен детергент съдържат и липид, който драстично променя както структурата на филма, така и диелектричната му проницаемост; 2) в цитираните работи за измерване на импеданса е използвана професионална, скъпо струваща апаратура с много по-широк обхват на честотите. Естествено, биха могли да се добавят и редица други различия в условията на експеримента. В случая за нас е от значение изобщо възможността да се провеждат такъв род измервания с конструираното просто устройство, което имаме на разположение.

5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Целта на настоящата работа беше да се намери сравнително евтино и просто техническо решение за изследване на моделни мембранни системи с използването на методи, базиращи се върху концепцията за импеданса. Изпълнението на поставените задачи доведе до конструирането на устройство, състоящо се от звуковата карта на РС и съгласуващ предусилвател, способно да измерва импеданса на различни химични системи със задоволителна точност. Неговото софтуерно обезпечаване се осигурява от програмата PhysLab5.0, разработена от Палто за трансформиране на звуковата карта в редица виртуални физични уреди, като генератор на сигнали, осцилоскоп, фазово чувствителен детектор и т.н. Проведените тестови измервания на прости еквивалентни електрични модели показаха, че експериментално получените данни се напасват с теоретичните в рамките на грешката за стойно-

стите на електронните елементи. От друга страна, изследването с помощта на описаното устройство на някои липидни системи дава резултати, които качествено се вписват в очакванията за поведението на техния импеданс. Нещо повече, в случая на липидни филми върху подложка намереното еквивалентно успоредно съпротивление R_p удовлетворява изискването за линейно нарастване с дебелината на филмите. В крайна сметка, получените експериментални резултати дават основание да се направи недвусмислено заключение за надеждността на проектираното и изработено устройство за изучаване на импеданса на различни химични и биологични образци. То може с успех да бъде използвано както за научна дейност, така и за нуждите на лабораторния студентски практикум. Като се има предвид, че то практически не е сложно за реализиране и цената му е пренебрежима, не е трудно да си представим, че е възможно да се окаже едно ценно помагало за редица лаборатории.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Alberts, B., A. Johnson, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter. *Molecular Biology of the Cell*, 4th ed. New York, 2002.
- [2] Mouritsen, O. *Life as a Matter of Fat. The emerging science of lipidomics*. Springer Verlag, Heidelberg, 2005.
- [3] Yudin, S. G., L. M. Blinov, V. V. Lazarev, S. P. Palto. Distribution and amplification of an electric field in ferroelectric-dye heterostructures. *Physics of the Solid State*, 2012, Volume 54, Issue 5, pp 940–944.
- [4] Bard, A. J., L. R. Faulkner. *Electrochemical methods: Fundamentals and applications*, 1st ed., 717 pp. John Wiley & Sons, New York, 1980.
- [5] Debye, P., E. Hückel (1923). Zur Theorie der Elektrolyte. I. Gefrierpunktserniedrigung und verwandte Erscheinungen. – *Physik. Z.*, **24**: 185–206.
- [6] Cole, K. S., R. H. Cole (1941), Dispersion and Absorption in Dielectrics. I. Alternating Current Characteristics. – *J. Chem. Phys.*, **9**: 341–351.
- [7] Ландау, Л. Д., Е. М. Лифшиц, *Электродинамика сплошных сред*. Москва, Наука, 1982.
- [8] 7.1 Channel High Definition Audio Codec Trac ID: *JATR-1076-21 Rev. 1.3*.
- [9] Palto, S. Doctoral Dissertation (Inst. Kristallogr. Ros. Akad. Nauk, Moscow, 1998).
- [10] Karabaliev, M., V. Kochev (1993). Glassy carbon as a solid substrate for thin liquid film based sensors. – *Anal. Lab.*, **2**(2): 88–97.
- [11] Адамсон, А. *Физическая химия поверхностей*. Москва, Мир, 1979.
- [12] Karabaliev, M. (2001). Formation and investigation of solid supported thin liquid films of lipids. Possibilities for development of sensor elements, Ph.D. thesis, University of Sofia.
- [13] Ежерова, Д., Р. М. Kruglyakov. *Foam and Foam Films*, pp. 773. Elsevier, Amsterdam, 1998.
- [14] Шелудко, А. *Колоидна химия*. София, Наука и изкуство, 1966.
- [15] Yaros, H. D., J. Newman, and C. J. Radke (2003). Evaluation of DLVO theory with disjoining-pressure and film-conductance measurements of common-black films stabilized with sodium dodecyl sulphate. – *J. Colloid Interface Sci.*, **262**: 442–455.
- [16] Kostoglou, M., E. Georgiou, and T. D. Karapantsios (2011). A new device for assessing film stability in foams: Experiment and theory. – *Colloid Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects*, **382**: 64–73.