

Лекция: Методы исследования биологических объектов с применением электромагнитных волн оптического диапазона (продолжительность 3 часа)

В основе большинства оптических методов исследования лежит взаимодействие падающего света с исследуемой биологической средой, в результате которого изменяются параметры светового потока.

Свет представляет собой электромагнитные волны. Электромагнитный спектр излучения с длинами волн от $1 \cdot 10^{-11}$ до $3 \cdot 10^{10}$ см условно разбит на отдельные области. Излучения так называемой *оптической области* спектра простираются от ультрафиолетовой области (УФ) радиации ($\sim 1,0$ нм) до инфракрасных излучений (ИК) с длиной волны до 1 мм:

1. Крайний УФ диапазон	1–10 нм
2. Дальнее УФ излучение	10– 200 нм
3. Ближнее УФ излучение	200– 400 нм
4. Видимый свет	400–780 нм
5. Ближний ИК диапазон	780– $2,5 \cdot 10^3$ нм
6. Среднее ИК излучение	2,5–50 мкм
7. Дальнее ИК излучение	50–1000 мкм

Границы диапазонов весьма условные.

Спектральный диапазон современных фотометрических приборов, работающих в медицинских лабораториях, как правило, ограничивается диапазоном видимого света, ближнего ультрафиолетового и ближнего инфракрасного диапазона.

Классификация фотометрических методов

- Классификация по спектральным характеристикам оптического излучения:*
 - Фотометрические – методы, применяющие для исследования световой поток с широким диапазоном длин волн.
 - Спектрофотометрические – методы, использующие световой поток с узким диапазоном длин волн ($\Delta\lambda < 10$ нм).
- Классификация по виду взаимодействия вещества с излучением:*
 - Абсорбционная фотометрия – методы изучающие поглощение светового потока при его прохождении через биообъект.
 - Нефелометрия – методы изучающие рассеивание света в объекте.
 - Турбидиметрия – метод анализа мутных сред, основанный на измерении интенсивности света прошедшего через исследуемый объект.
 - Рефлектометрия – метод анализа основанный на измерении интенсивности света отраженного от исследуемого объекта.
 - Эмиссионная фотометрия – методы, изучающие излучение света веществом.
 - Люминисцентная фотометрия – методы, изучающие собственное свечение вещества при его возбуждении различными способами.
- Классификация методов по объектам исследования:*
 - Методы исследования биопробы и жидкости (аналитические)
 - Методы, предназначенные для исследования организма.

Фотометрические методы исследования базируются на способности жидких сред (растворов) или тканей поглощать и/или рассеивать, отражать электромагнитное излучение и даже излучать электромагнитные волны под действием световой энергии или в результате химической реакции.

На рис.1 показано изменение интенсивности потока световой энергии при прохождении света через раствор (а) и дисперсную среду (б) с толщиной поглощающего слоя L , где:

I_0 – интенсивность падающего потока световой энергии;

$I_{от}$ – интенсивность потока световой энергии, отраженной от стенки кюветы;

$I_{п}$ – интенсивность потока световой энергии, поглощенной окрашенным раствором;

I_p – интенсивность потока световой энергии, рассеянного дисперсной средой;

I – интенсивность потока световой энергии, прошедшего через слой исследуемого вещества.

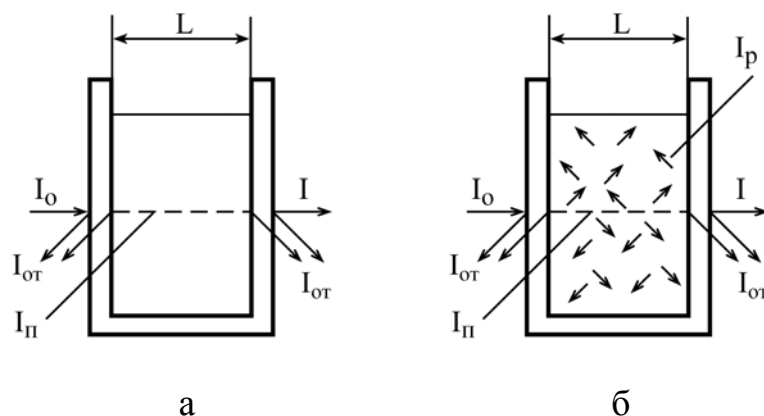


Рис. 1. Явления, возникающие при прохождении а) через прозрачный раствор, б) через дисперсную среду (пояснения в тексте).

Если не учитывать поглощение потока световой энергии стенками кюветы, то интенсивность падающего светового потока I_0 при прохождении кюветы с раствором и дисперсной средой разлагается на составляющие следующим образом:

$$I_0 = I_{от} + I_{п} + I \text{ – для раствора,}$$

$$I_0 = I_{от} + I_{п} + I_p + I \text{ – для дисперсной среды.}$$

В фотометрии $I_{от}$, как правило, компенсируется или учитывается.

Рассмотрим подробнее наиболее часто используемые методы.

Метод абсорбционной фотометрии

В основу абсорбционного метода анализа положен обобщенный закон Бугера – Ламберта – Бера.

Введем понятие пропускание и поглощение световой энергии.

Пропускание (T) – это отношение интенсивности потока световой энергии I , прошедшего через слой исследуемого вещества (рис. 2), к интенсивности падающего потока световой энергии I_0 :

$$T = I / I_0.$$

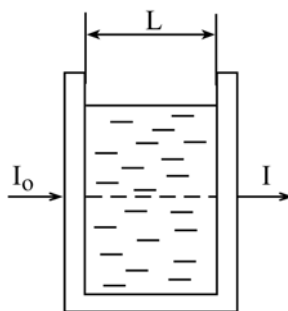


Рис. 2. Прохождение светового потока через кювету с раствором

Поглощение или оптическая плотность (D) – это величина, равная

$$D = \lg(I_0/I) = \lg(I_0/I)$$

Согласно закону Бугера – Ламберта – Бера при облучении раствора монохроматическим излучением с длиной волны λ , поглощение излучения D_λ пропорционально концентрации поглощающего вещества в растворе C (моль/г) и толщине поглощающего слоя L :

$$D_\lambda = a_\lambda CL,$$

где a_λ – коэффициент поглощения, являющийся константой и характеризующий поглощающие свойства вещества при данной длине волны λ .

Если концентрация раствора C выражена в молях на литр, то коэффициент поглощения a_λ принято называть молярным коэффициентом поглощения и обозначать его как ϵ_λ . Закон Бугера – Ламберта – Бера можно записать в других формах:

$$\lg(I_0/I) = \epsilon_\lambda L,$$

или

$$I = I_0 \exp(-\epsilon_\lambda L).$$

Важнейшим свойством при использовании абсорбционных измерителей является аддитивность величины D_λ , которая позволяет при исследовании растворов, представляющих смесь «n» химически не реагирующих между собой веществ, записать:

$$\lg(I_0/I) = \sum_{i=1}^n \lg(I_0/I_i) = \sum_{i=1}^n D_{\lambda i},$$

где I_i – интенсивность светового потока, прошедшего через раствор i -го компонента смеси, $D_{\lambda i}$ - величина оптической плотности i -го компонента раствора.

Величина пропускания T обычно измеряется в процентах и меняется в диапазоне от 0 до 100%. Оптическая плотность D – оценивается в Беллах.

Чувствительность и погрешность фотометрического анализа во многом зависят от правильного (оптимального) выбора длины волны, на которой производятся измерения, от спектра поглощения исследуемого вещества в растворе, спектра поглощения применяемых реактивов и спектра поглощения стандартных калибровочных растворов.

Приборы для абсорбционной фотометрии

На абсорбционном методе анализа основан принцип действия самых распространенных фотометрических приборов для медицинских лабораторных исследований – **фотоколориметров** и **спектрофотометров**.

Фотоколориметры – приборы, предназначенные для определения количества окрашенного вещества путем измерения величин поглощения и пропускания в видимой части электромагнитного спектра. Общая схема однолучевого колориметра приведена на рис.3.

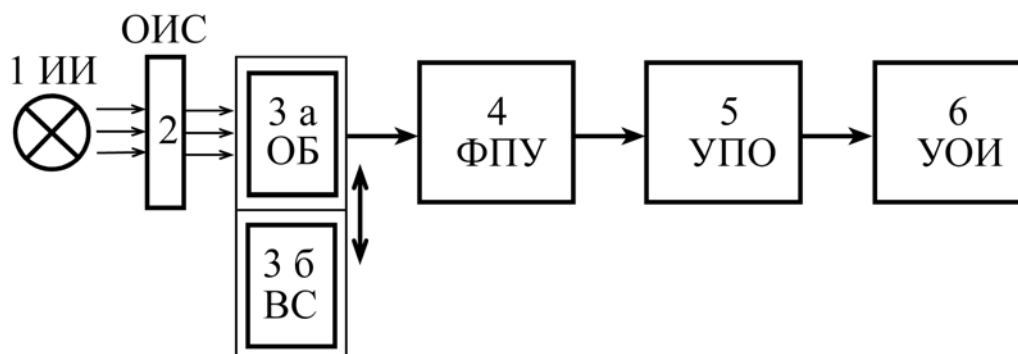


Рис. 3. Схема однолучевого абсорбционного фотометра: 1 – источник излучения 2 – оптическая избирательная система, 3а – исследуемые вещества, 3б – вещество сравнения, 4 – фотоприемное устройство, 5 – устройство преобразования информации, 6 – устройство регистрации и отображения информации.

Принцип действия. От источника видимого света 2 световой поток проходит через оптическую избирательную систему ОИС 2 (светофильтр), где выделяется нужная полоса светового излучения $\Delta\lambda$. После прохождения через кювету 3а с исследуемым образцом или образцом сравнения 3б световой поток, поступает на фотоприемное устройство 4. После преобразования сигнала с ФПУ в блоке 5, окончательный результат на устройстве 6 получаем в виде показания стрелочного прибора (в простейших моделях) или в цифровой форме на экране специального дисплея с документированием результата на печатающем устройстве (или без такового) в единицах оптической плотности (поглощения), пропускания или непосредственно в единицах концентрации исследуемого вещества.

В качестве ОИС в фотоколориметрах часто используют стеклянные фильтры. Основным преимуществом стеклянных фильтров является их низкая стоимость и простота. Главный же их недостаток – широкий диапазон длин волн, пропускаемых фильтром (полоса пропускания $\Delta\lambda$) – до 60 нм.

Чтобы получить излучение с более узкой, чем у стеклянных фильтров полосой пропускания, применяют метало-стеклянные (интерференционные) фильтры. Обычно интерференционные светофильтры имеют ширину полосы пропускания в пределах 6–20 нм.

Величина полосы пропускания любого фильтра оценивается по спектральной характеристике, представленной в виде зависимости пропускания T или оптической плотности D от длины волны λ (рис. 4.).

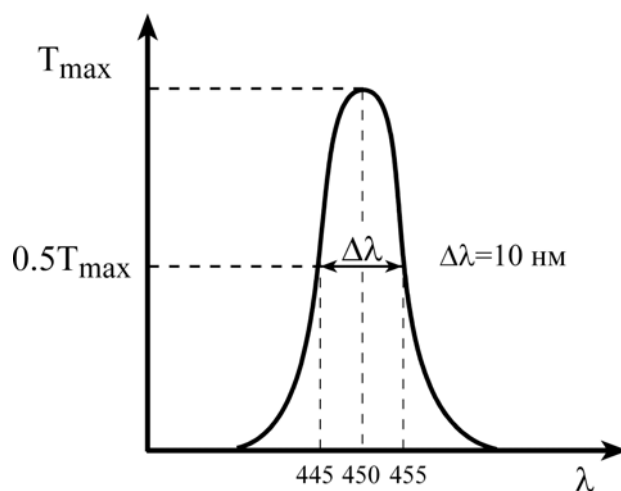


Рис. 4. Определение ширины полосы пропускания фильтра

В спектрофотометрах в качестве ОИС используют монохроматор позволяющий выделить область длин волн $\Delta\lambda = 0,2\text{нм}$. При использовании в качестве источников лазеров отпадает необходимость в ОИС – лазер сам дает монохроматический свет.

Источниками излучения обычно служат лампы накаливания, светодиоды, лазеры, в монохроматорах ртутные лампы (дают широкий спектр излучения). В качестве фотоприемников используют фотодиоды, фоторезисторы, фототранзисторы, для слабых сигналов- фото умножители.

В зависимости от числа световых потоков одновременно используемых в фотометрических приборах, фотометры могут быть одно и многолучевые. На рис. 5. приведена схема двулучевого фотометра. В однолучевых фотометрах (рис. 3) кюветы с исследуемым раствором и раствором сравнения по очереди передвигаются в зондирующий световой поток.

Существуют фотометрические системы, использующие для изучения свойств вещества одновременно два (или более) спектральных потока излучения. В этих приборах сравниваются характеристики биообъекта для двух (или более) длин волн. В зависимости от числа длин волн, в которых происходит исследования объекта и фотометры делят на одно- и многоволновые. Пример двух волнового одноканального фотометра приведении на рис. 6.

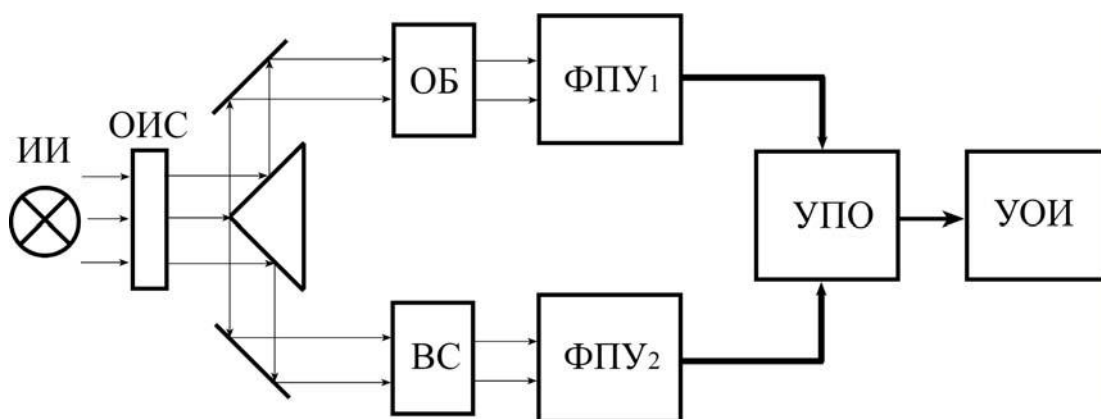


Рис. 5. Структура двулучевого одноволнового фотометра

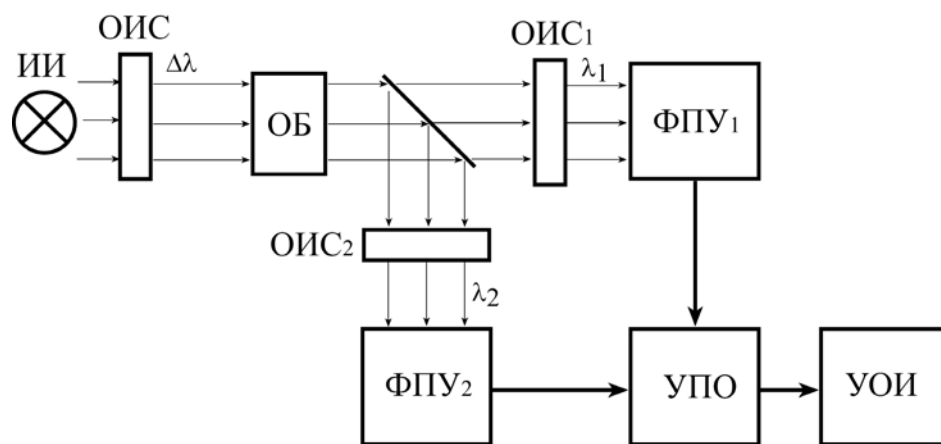


Рис.6. Схема двухволнового одноканального фотометра.

Спектрофотометры.

Основное отличие спектрофотометра (рис.7) от фотоколориметра состоит в возможности пропустить через исследуемый образец световой поток любой требуемой длины волны, проводить фотометрические измерения, сканируя весь диапазон длин волн не только видимого света, но и ближнего ультрафиолета (200 до 380 нм). Целью режима сканирования является построение спектральной кривой поглощения (абсорбции).

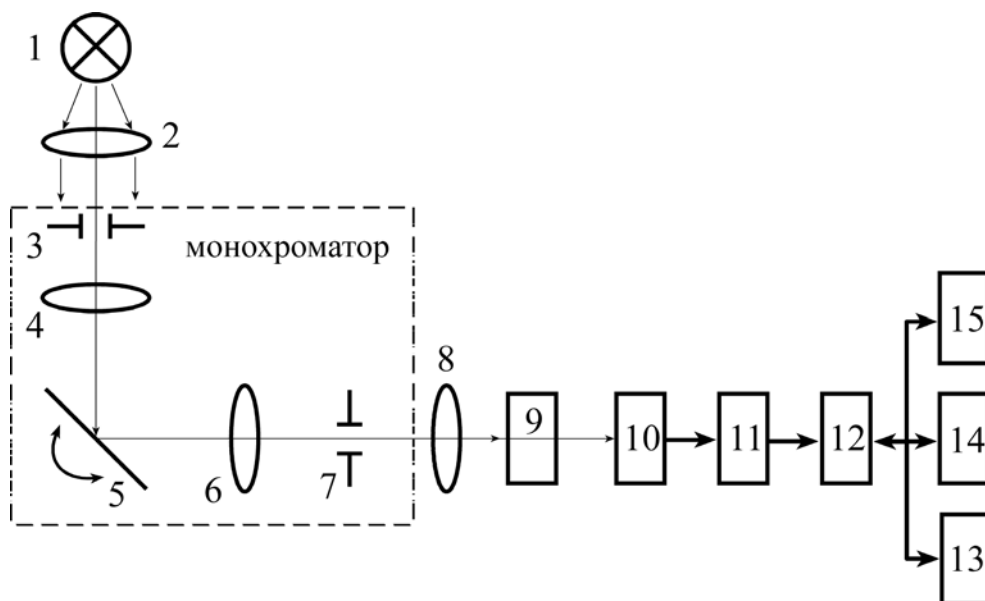


Рис. 7. Обобщенная структурная схема одноканального спектрофотометра.

1 – источник световой энергии, 2 – оптическая система, направляющая поток энергии на входную щель; 3 – входная щель; 4 – оптическая система, формирующая параллельный поток световой энергии; 5 – диспергирующий элемент (призма или дифракционная решетка); 6 – оптическая система, направляющая поток энергии на выходную щель; 7 – выходная щель; 8 – оптическая система, формирующая поток энергии, проходящий через кювету; 9 – кювета; 10 – фотоприемник; 11 – аналого-цифровой преобразователь; 12 – микро-ЭВМ; 13 – индикатор; 14 – пульт оператора; 15 – интерфейс связи с внешней ЭВМ и регистрирующим устройством

Принцип работы спектрофотометра. Полихроматический свет от источника проходит через монохроматор, который разлагает белый свет на цветовые компоненты. Монохроматическое излучение с дискретным интервалом в несколько нанометров проходит через ту часть прибора, где располагается образец с исследуемой пробой. Далее принцип работы и устройство спектрофотометра аналогичны принципу работы и устройству колориметра

Источником видимого света служит вольфрамовая, как правило, галогенная лампа, дающая постоянный поток света в диапазоне 380— 950 нм. В качестве источника УФ используются водородные или дейтериевые лампы.

Нефелометрия

Нефелометрический анализ проводится с целью определения концентрации, размера и формы диспергированных частиц в дисперсных средах. Интенсивность и направление светового потока, рассеянного взвесью частиц, зависят от размера частиц.

Можно выделить два наиболее значимых случая рассеяния света, рис. 8. Рэлеевское или симметричное (случай А) рассеяние имеет место, когда размер частиц не превышает 0,1 от длины волны λ .

Рассеяние Ми – когда размер частиц приблизительно равен длине волны светового потока (случай Б). Частицы больших размеров рассеивают свет неравномерно. Вперед – по направлению потока рассеивается больше света, чем в обратном направлении.

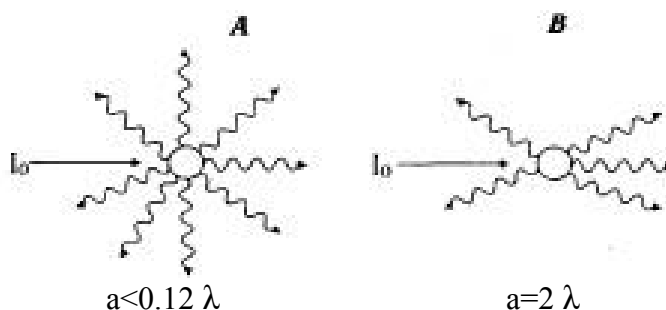


Рис. 8. Рассеяние света при различных соотношениях размера частиц a и длины волны электромагнитного излучения λ .

В результате измерения светового потока рассеянного объектом под разными углами можно построить индикатрису рассеяния – кривую, графически отображающую различие в интенсивностях света, рассеянного в разных направлениях (прямая задача). Примеры индикатрис рассеяния для частиц разных размеров приведены на рис. 9.

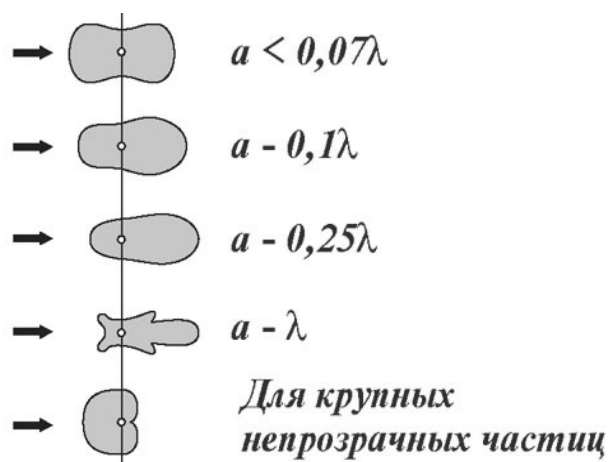


Рис. 9. Индикатрисы рассеяния света для частиц разных размеров.

Получение информации о размерах и концентрации частиц по индикатрисе рассеивания – обратная задача нефелометрии. Точное решение обратной задачи сложно.

Аппаратура для нефелометрических исследований представляет собой специализированные спектрофотометры для измерения интенсивности рассеянного света под углом к направлению падающего на раствор светового потока.

Приборы, предназначенные для **нефелометрических исследований**, называются **нефелометрами** (рис. 11). Длины волн, используемые в большинстве нефелометров, находятся в диапазоне 340—650 нм.

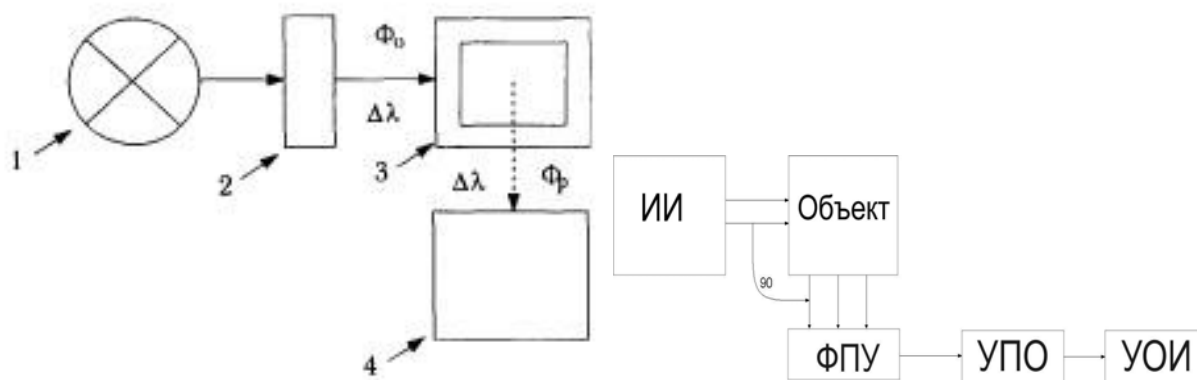


Рис. 10. Схема нефелометра. 1 — источник световой энергии; 2 — полосовой фильтр; 3 — кювета; 4 — фотоприемник; Φ_0 — падающий поток световой энергии; Φ_r — поток световой энергии, рассеянный жидкой дисперсной системой; □□ — полоса пропускания светофильтра

Турбидиметрический метод анализа

Данный вид исследования мутных сред основан на измерении изменения интенсивности потока световой энергии, прошедшего через дисперсную систему. Изменение потока световой энергии вызвано как поглощением, так и

его рассеянием дисперсной системой. Метод аналогичен колориметрическому методу, но в ряде случаев измерение может происходить в потоке «белого света» без применения полосовых фильтров.

С точки зрения чувствительности метода, в частности при определении концентрации иммуноглобулинов, сравнение нефелометрии и турбидиметрии оказывается в пользу нефелометрии, т. к. этот метод более чувствителен, когда небольшое количество взвешенных частиц приводит к заметному возрастанию сигнала при незначительном фоне.

Преимущество турбидиметрического анализа заключается в том, что измерения могут быть выполнены практически на любом колориметре или фотометре.

Люминесцентная фотометрия

Люминесцентная фотометрия Основана на способности ряда молекул, при определенных условиях испускать электромагнитное излучение оптического диапазона спектра.

Энергетические переходы атомов и молекул строго квантованы, рис. 11. При возбуждении, каким либо образом электроны переходят на более высокий уровень, но находятся там они могут очень короткое время, после чего они переходят на минимально возможный для данного вещества подуровень возбужденного состояния. И именно переход с этого подуровня на основной и вызывает появление свечения.

Перевод молекул в возбужденное состояние возможен различными способами и в связи с этим различают:

- Фотолюминесценцию
- Хемилюминесценцию
- Электролюминесценцию
- Катодолюминесценцию
- Рентгенолюминесценцию
- Термолюминесценцию
- радиолюминесценция

Так как энергия перехода между уровнями для данного атома всегда постоянна. Спектр излучения не зависит от возбуждающего излучения. По длительности свечения различают флуоресценцию – свечение, возникающее и исчезающее практически мгновенно при соответствующем воздействии (1–10 нс), и фосфоресценцию – длительное свечение (от мс до нескольких секунд и более) после удаления источника возбуждения.

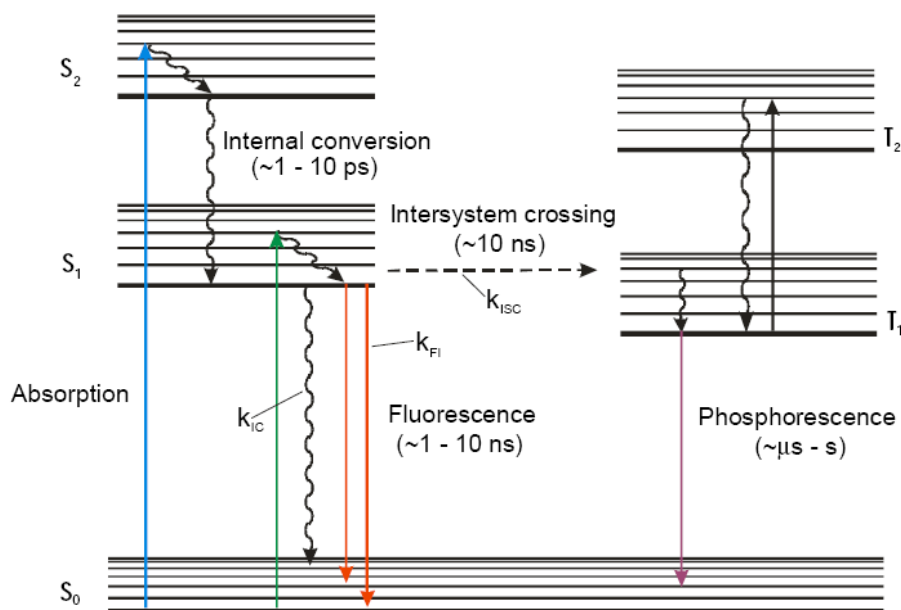


Рис. 11. Схема энергетических переходов в молекуле при возникновении люминесценции.

В медикобиологических исследованиях наиболее широко используют явление фотолюминесценции (флуориметрию), причем в качестве возбуждающего источника применяют УФ. Этот метод обладает значительно большей чувствительностью, чем другие фотометрические методы и используются для обнаружения и идентификации веществ

Часто фотолюминесценции. В соответствии с законом Вавилова, спектр флуоресценции специфичен для данного вещества и не зависит от возбуждающего (в пределах Стокса). Возможно обнаружение до 10^{-11} г примеси, причем достаточно быстро.

Вторым правилом является правило Стокса, согласно которому спектр флуоресценции и его максимум по сравнению со спектром абсорбции смещен в сторону больших длин волн (рис. 12): $\lambda_{\text{падающ}} < \lambda_{\text{излуч}}$.

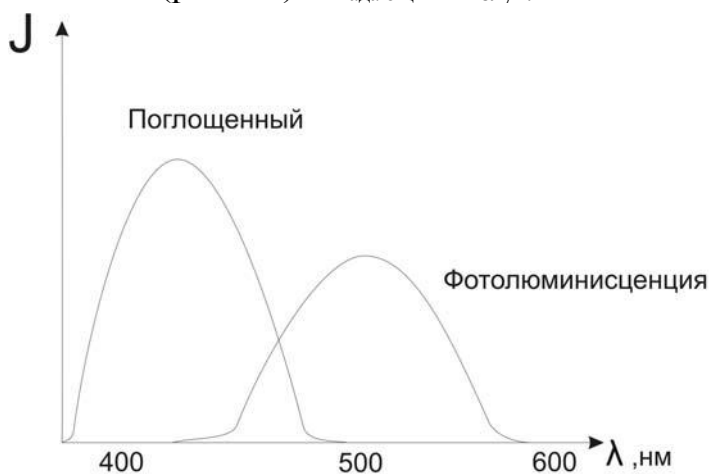


Рис. 12. Спектры поглощенного излучения и возбужденного свечения

Достаточно широко используется флуоресценция для обнаружения белков и оценки их состояния. Каждый вид белков имеет собственный спектр

флуоресценции. При данной методике изучается специфичность формы кривых и расположении максимумов в спектре люминесценции.

По флуоресценции живой клетки можно оценить функциональное состояние этой клетки. Широко используется обнаружение исследуемых веществ с помощью флуоресцентного зонда. При связывании флуоресцентных зондов и биомолекулы, молекулы флуоресцентного зонда может поменять свой спектр флуоресценции или квантовый выход.

Количественное преобразование возбуждающей энергии в энергию флуоресценции определяется выходом флуоресценции. Существуют понятия **энергетического и квантового выходов**. Энергетический выход люминесценции E , определяется через отношение энергии люминесценции к энергии возбуждения, поглощенной в веществе.

$$\frac{\Phi_l}{\Phi_n} = E = \left(\frac{\Phi_l}{\Phi_0} \right) (1 - \tau_l)$$

Φ_l – интенсивность люминесценции

Φ_0 – интенсивность излучения

Φ_n – интенсивность поглощенного излучения

τ_l - коэффициент пропускания при люминесценции

По данным анализа энергетического выхода люминесценции можно провести количественный анализ веществ. Так для энергетического выхода можно также записать

$$E = m_\lambda Cl,$$

где m_λ – удельный показатель люминесценции, C – концентрация флуорофора, l – толщина исследуемой среды.

График интенсивности флуоресценции от концентрации флуоресцирующего вещества имеет максимум, рис. 13. При концентрации выше 10^{-4} – 10^{-5} г/мл выход флуоресценции начинает уменьшаться и затем падает до нуля, что связано с повышением поглощения в среде. Этот эффект называют концентрационным поглощением. В случае больших концентраций происходит интенсивное поглощение энергии возбуждающего света первыми слоями раствора и нарушается равномерность поглощения энергии по всему объему раствора, что, естественно, ведет к изменению суммарного потока флуоресценции.

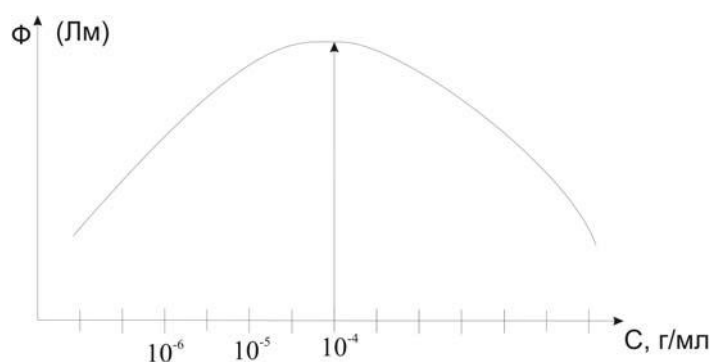


Рис. 13. График интенсивности флуоресценции от концентрации флуоресцирующего вещества

Общая структура и направление потоков световой энергии в флуориметра показаны на рис.14.

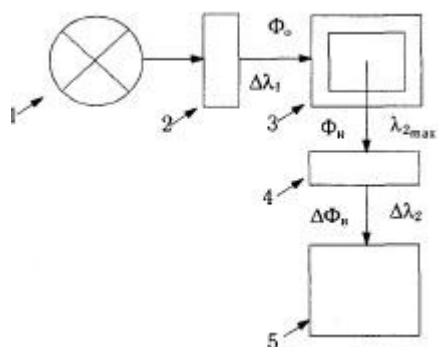


Рис. 14. Структура флуориметра. 1 – источник световой энергии для возбуждения (лампа накаливания, импульсная лампа); 2 – полосовой фильтр, пропускающий поток световой энергии для возбуждения в полосе длин волн $\Delta\lambda_1$; 3 – кювета; 4 – полосовой фильтр, пропускающий поток излученной световой энергии в полосе длин волн $\Delta\lambda_2$; 5 – фотоприемник; Φ_0 – падающий поток световой энергии в полосе длин волн $\Delta\lambda_1$ для возбуждения исследуемого раствора; $\Phi_{\text{и}}$ – поток световой энергии излучения, вызванный возбужденным исследуемым раствором с максимумом излучения λ_2 ; $\Delta\Phi_{\text{и}}$ – поток световой энергии излучения в полосе длин волн $\Delta\lambda_2$

Обычно в качестве источника УФ используют газоразрядные лампы (ртутные, ксеноновые и др.). В качестве фотоприемников чаще всего используют ФЭУ (см. рис.15).

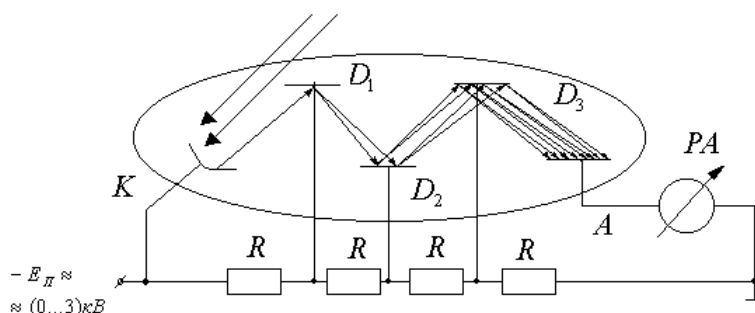


Рис. 15. Схема подключения фотоэлектронного умножителя: К – фотокатод, $D_1...D_3$ – диноды, PA – микроамперметр, А – анод, R – делитель напряжения.

Хемилюминесцентный анализ

Особое место в люминесцентном анализе занимают хемилюминесцентные методы анализа. Обычно это реакции окисления, в ходе которых происходит возбуждение молекул продуктов реакции и выделение световой энергии (лучистая дезактивация) при возвращении их в основное состояние.

Наиболее эффективно хемилюминесцентные вещества используются в качестве индикаторов. При титровании окрашенных и мутных сред их преимущество по сравнению с флуоресцентными индикаторами заключается в том, что нет необходимости прибегать к формированию светового потока возбуждения. В аналитической практике нашли наибольшее применение такие хемилюминесцентные индикаторы, как люминол, люцегитин, лафин и силаксен. Поскольку биологические катализаторы – ферменты, как правило, чрезвычайно избирательны, то биолюминесцентные методы очень специфичны.

Поляриметрия

Поляриметрия – методы исследования, основанные на измерениях: 1) степени поляризации света и 2) оптической активности, т. е. величины вращения плоскости поляризации света при прохождении его через оптически-активные вещества. Величина такого вращения в растворах зависит от их концентрации; поэтому поляриметрию широко применяется для измерения концентрации оптически-активных веществ. Измерение вращательной дисперсии – изменения угла вращения при изменении длины волны света (т. н. спектрополяриметрия) – позволяет изучать строение веществ. Угол вращения α зависит от ряда факторов:

– типа вещества, имеющего характерный угол вращения – удельное вращение

$$[\alpha]_D^{20} (\text{град}) ;$$

– концентрации оптически активного вещества C (г/см³)

– от длины l (дм) трубки (кюветы.)

Определив α можно рассчитать концентрацию вещества в растворе по формуле:

$$C = \frac{\alpha}{[\alpha]_D^{20} \cdot l}$$

$[\alpha]_0^{20}$ - угол вращения при концентрации вещества 1 г/мл, длине трубки 10 см, температуре 20⁰ С и желтом свете (D линия Na) – $\lambda=589,3$ нм. Примеры $[\alpha]_0^{20}$ для ряда веществ приведены в табл.

Таблица

Раствор	$[\alpha]_0^{20} \frac{\text{град} \cdot \text{см}^3}{\text{дм} \cdot \text{г}}$	Направление вращения плоскости поляризации
Тростниковый сахар	+66,44	Правое
Виноградный сахар	+52,5	Правое
Фруктовый сахар	-91,9	Левое

К оптически активным веществам относится например глюкоза, и на поляриметрическом принципе основан прибор для измерения содержания сахара в крови, моче.

Измерения, как правило, проводят на приборах, называемых поляриметрами (рис.15) и спектрополяриметрами.

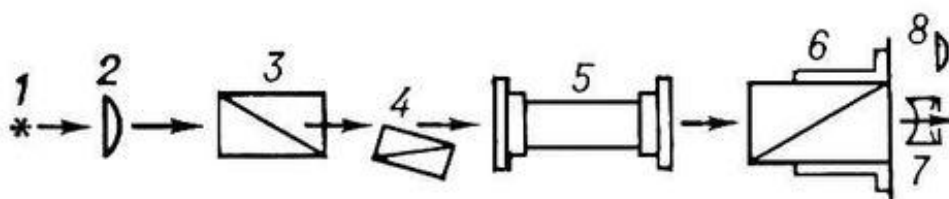


Рис. 15. Схема полутеневого поляриметра: 1 – источник света; 2 – конденсор; 3– 4 – полутеневой поляризатор; 5 – трубка с измеряемым оптически-активным

веществом; 6 – анализатор с отсчётным устройством; 7 – зрительная труба; 8 – окуляр отсчётного устройства (например, микроскопа-микрометра).

Фотооксигемометрия

Фотооксиметрия представляет собой неинвазивный метод определения соединения кислорода в крови. Основным переносчиком кислорода в крови является гемоглобин. В зависимости от того, с чем связаны молекулы гемоглобина различают:

1. Восстановленный гемоглобин HbR
2. Оксигемоглобин HbO₂
3. Карбоксигемоглобин HbCO
4. Метгемоглобин MetHb – нейтрализованная форма гемоглобина не способная связываться с кислородом.

Важным показателем крови является ее кислородной емкостью – способность данного объема крови связывать определенный объем кислорода. Кислородная емкость в первую очередь определяется концентрацией Hb в крови. Так 1г гемоглобина способен связать 1,355см³ O₂. Степень насыщения (сатурации) крови кислородом (SpO₂) определяется по формуле:

$$OS = SpO_2 = \frac{[HbO_2]}{[HbR] + [HbO_2]} * 100\% \text{ или } SpO_2 = 1 - \frac{[HbR]}{[HbR] - [HbO_2]}$$

Спектральными характеристиками окисленного и восстановленного гемоглобина на ряде длин волн сильно различаются (рис. 16). На длине волны λ=660нм отношение коэффициентов поглощения оксигемоглобина и HbR составляет 1:10, а на длине 960нм ~2:1. На некоторых волнах поглощение обеими формами Hb одинаково. Например при 810 нм.

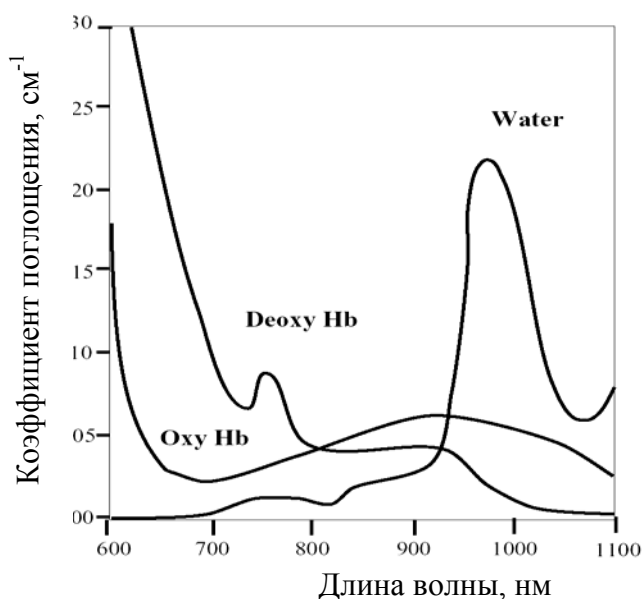


Рис. 16. Спектры поглощения различных форм гемоглобина: оксигемоглобина ввосстановленного гемоглобина/

Величину SpO₂ можно определить как:

$$SpO_2 = A - B \cdot \frac{D(660\text{нм})}{D(810\text{нм})},$$

где А и В опытные константы.

Точное определение SpO_2 таким способом возможно только в случае инвазивной методики. При использовании неинвазивной методики (датчик накладывается на палец или ухо) на величину оптической плотности влияет: оптическая плотность тканей (помимо крови), толщина просвечиваемого слоя крови. И первые датчики, работающие по такому принципу (оксигеметрии) были весьма неточны, их приходилось калибровать для различных групп людей.

В современных приборах (пульсометрах) для оценки содержания O_2 в крови используют для измерения пульсовую волну. Сигнал с выхода датчика: пропорционален абсорбции света, проходящего через ткани и включает две составляющие: пульсирующую, обусловленную изменением объема артериальной крови при сердечном выбросе крови, и постоянную базовую составляющую, определяемую оптическими свойствами кожи, венозной и капиллярной крови и других тканей исследуемого участка (рис. 17). Измерение проводят на двух длинах волн 660 – красный и 940 – инфракрасный (ИК). Производят измерение в момент максимума амплитуды сигнала и измеряется постоянная составляющая в момент диастолы.

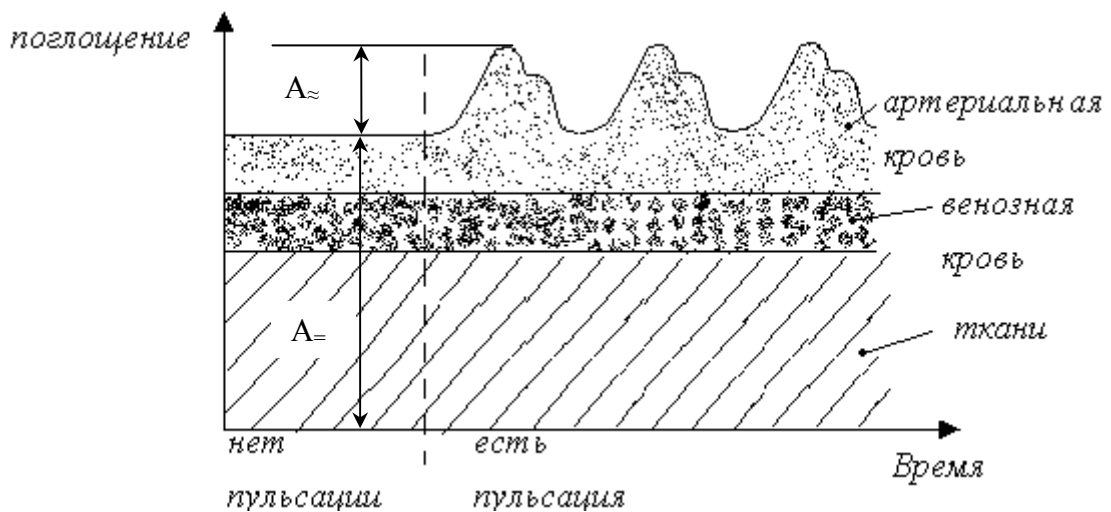


Рис. 17. Изменение оптических свойств (поглощение) при пропускании света через биоткань с кровеносными сосудами.

Находят значение R по формуле:

$$R = \frac{\left(\frac{A \approx}{A =}\right)^{KP}}{\left(\frac{A \approx}{A =}\right)^{ИК}}$$

Здесь $A \approx$ и $A =$ – пульсовые и постоянные (медленно меняющиеся) составляющие поглощения по красному и инфракрасному каналу.

Величина R эмпирически связана со значением сатурации (содержанием O_2) калибровочной зависимостью, которую получают из экспериментальных данных (близка к линейной). Величина R определяется только оптическими свойствами артериальной крови и не зависит от оптических свойств кожи и подлежащих тканей, что определяет достаточно высокую точность измерений.

На рис 18 представлена структурная схема пульсового оксиметра.

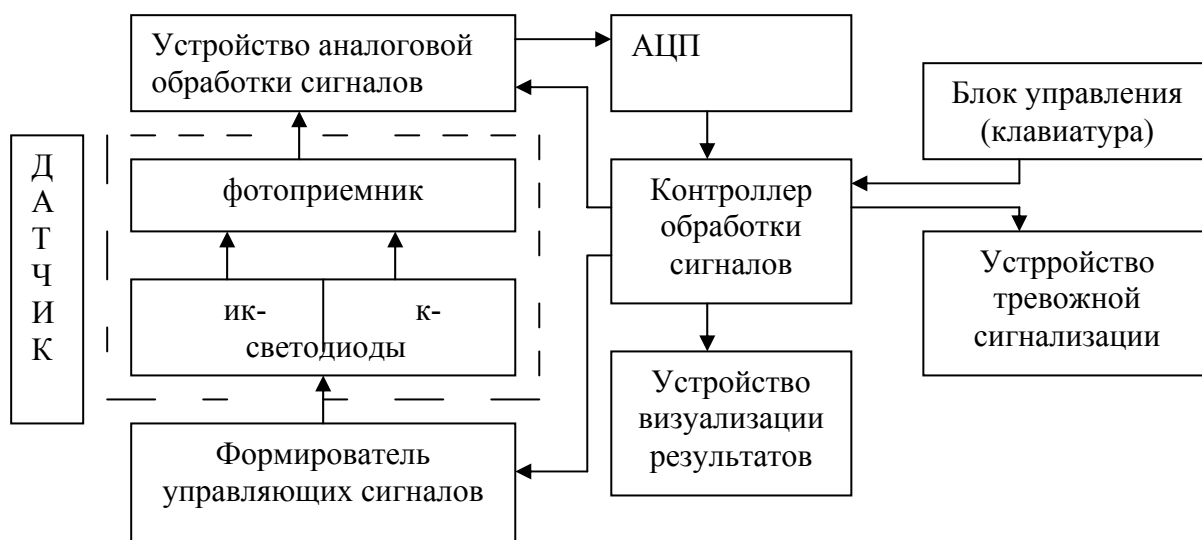


Рис 18. Структурная схема пульсометра.

В задачу формирователя управляющих сигналов входит почередная засветка красного и инфракрасного диодов, а так же ввод темного поля, позволяющего учесть влияние посторонней фоновой засветки. Частота переключения диодов составляет 100–1000 Гц.

Задачей устройства аналоговой обработки сигналов является формирование и усиление четырех сигналов: постоянных составляющих красного и инфракрасного каналов и переменных составляющих красного и инфракрасного каналов. Здесь же происходит фильтрация сетевых наводок и артефактов движения.

Контроллер обработки сигналов производит все вычислительные операции и осуществляет управление системой в целом. Он включает в себя микропроцессорное устройство, ПЗУ для хранения программы и градуировочной таблицы, ОЗУ для хранения текущей информации и средства сопряжения с остальными устройствами..

Таким образом, основная задача пульсового оксиметра – измерить с возможно большей точностью величину R и ей в соответствие величину SpO_2 по градуировочной характеристике, заложенной в память прибора в виде функции или таблицы.

Пульсометры используются при монетарировании состояния пациента в частности:

- при операциях с наркозом;
- при транспортировке больных;
- кислородной терапии и респираторной поддержке;

- в палатах интенсивной терапии.