

ФОТОМЕТРИЯ В ЛАБОРАТОРНОЙ ПРАКТИКЕ

В.В.ДОЛГОВ, Е.Н.ОВАНЕСОВ, К.А.ЩЕТНИКОВИЧ

МОСКВА 2004



**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**



**РОССИЙСКАЯ МЕДИЦИНСКАЯ
АКАДЕМИЯ ПОСЛЕДИПЛОМНОГО ОБРАЗОВАНИЯ**

В.В.ДОЛГОВ, Е.Н.ОВАНЕСОВ, К.А.ЩЕТНИКОВИЧ

ФОТОМЕТРИЯ В ЛАБОРАТОРНОЙ ПРАКТИКЕ

МОСКВА –2004

Авторы:



Долгов Владимир Владимирович
заведующий кафедрой
клинической
лабораторной
диагностики РМАПО,
профессор, доктор
медицинских наук



Ованесов Евгений Николаевич
директор Научно-
производственного
предприятия «Техномедика»



Щетникович Клавдия Александровна
доцент кафедры клинической
лабораторной диагностики
РМАПО,
кандидат медицинских наук

Книга ставит целью дать обзор основных оптических методов и подходов фотометрического анализа, а также фотометров, используемых в клинко-диагностических лабораториях. Книга в значительной мере носит образовательный характер и может рассматриваться как учебное пособие по фотометрическим методам для студентов медико-биологических факультетов и специалистов клинической лабораторной диагностики. Материал подобран на основе опыта преподавания разделов клинической лабораторной диагностики курсантам циклов специализации и усовершенствования.

Спонсором издания книги является ООО «Витал ДиагностиксСПб» (генеральный директор А.Г.Плехов) Фирма Витал Диагностикс - один из крупнейших отечественных поставщиков реактивов и приборов для клинко-диагностических лабораторий. Фирма поддерживает образовательные программы в области клинической лабораторной диагностики: организует семинары, участвует в конференциях и выставках, издает за свои средства учебно-методическую литературу. Авторы высказывают ООО «Витал ДиагностиксСПб» искреннюю благодарность за издание книги.

СОДЕРЖАНИЕ

	Страница
ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ	8
ФИЗИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ОПТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЯ ВЕЩЕСТВ	8
ОПТИЧЕСКОЕ ИЗЛУЧЕНИЕ. СВЕТ.	10
КОРПУСКУЛЯРНО-ВОЛНОВОЙ ДУАЛИЗМ СВЕТА	10
ВОЛНОВЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ СВЕТА	11
КВАНТОВЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ СВЕТА	12
ХАРАКТЕРИСТИКИ ОПТИЧЕСКОГО ИЗЛУЧЕНИЯ.	13
ГЛАЗ И ЕГО ОПТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА	13
СВЕТОТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ОПТИЧЕСКОГО ИЗЛУЧЕНИЯ	14
СВЯЗЬ МЕЖДУ ЭНЕРГЕТИЧЕСКИМИ И СВЕТОВЫМИ ХАРАКТЕРИСТИКАМИ	15
ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ СВЕТА С ВЕЩЕСТВОМ.	16
ОТРАЖЕНИЕ И ПРЕЛОМЛЕНИЕ СВЕТА.	16
РЕФРАКЦИЯ СВЕТА	20
РЕФРАКТОМЕТР АББЕ	21
ДИСПЕРСИЯ СВЕТА	21
ИНТЕРФЕРЕНЦИЯ СВЕТА	23
Интерференция в тонких пленках.	24
ИНТЕРФЕРЕНЦИОННЫЙ СВЕТОФИЛЬТР.	25
ДИФРАКЦИЯ СВЕТА.	26
ПОЛЯРИЗАЦИЯ СВЕТА.	28
Двойное лучепреломление.	28
ПОЛЯРИМЕТРИЯ.	30
ПОЛЯРИМЕТР.	31
РАССЕЯНИЕ СВЕТА. МУТНЫЕ СРЕДЫ.	32
Определение светорассеивания.	32
Нефелометрия - измерение рассеянного света.	33
Турбидиметрия - измерение прошедшего света.	34
ПОГЛОЩЕНИЕ И ИЗЛУЧЕНИЕ СВЕТА.	35
КВАНТОВЫЕ ПОСТУЛАТЫ БОРА.	35
ЛИНЕЙЧАТЫЕ СПЕКТРЫ АТОМОВ.	36
СПЕКТР ИЗЛУЧЕНИЯ РТУТНОЙ ГАЗОРАЗРЯДНОЙ ЛАМПЫ.	38
СПЕКТРАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ	38
МОЛЕКУЛЯРНЫЕ СПЕКТРЫ.	39
ПОЛОСАТЫЙ СПЕКТР	41
ЭМИССИОННАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ	41
ФОТОМЕТРИЯ.	42
ЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ и ФЛУОРЕСЦЕНЦИЯ.	42
ФОТОЭЛЕКТРИЧЕСКИЕ ЯВЛЕНИЯ В ТВЕРДЫХ ТЕЛАХ	44
ТЕПЛОВОЕ ИЗЛУЧЕНИЕ ВЕЩЕСТВ.	45
КОЛОРИМЕТРИЯ.	46
ОПТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ОКРАШЕННЫХ РАСТВОРОВ.	46
ОСНОВНОЙ ЗАКОН КОЛОРИМЕТРИИ.	46
ЦВЕТ РАСТВОРА.	47
КОЛОРИМЕТРИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИЗМЕРЕНИЙ.	48
ВИЗУАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ.	48
Определение гемоглобина по цвету цельной капиллярной крови.	49

Определение гемоглобина методом Сали.	49
Определение гемоглобина оксигемоглобиновым или гемиглобинцианидным методами на компараторе цвета.	50
Определение гемоглобина сапониновым методом на гемоглобинометре с серым оптическим клином.	51
ФОТОЭЛЕКТРИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ.	51
ФИЗИЧЕСКИЕ ПРИНЦИПЫ И МЕТОДЫ ФОТОМЕТРИИ	52
ТЕРМИНОЛОГИЯ	52
ЗАКОН БУГЕРА.	53
Молярный показатель поглощения ϵ_{λ} .	54
Принцип аддитивности.	55
Измерение в многокомпонентных растворах.	55
Измерение в максимуме спектральной полосы поглощения.	56
Измерение на оптимальной длине волны.	57
ФОТОМЕТРИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ БИОХИМИЧЕСКОГО АНАЛИЗА	58
Измерение по калибровочной кривой.	58
Правила построения калибровочного графика.	58
Метод сравнения стандартного и опытного образца.	59
Методы определения вещества без использования калибратора.	59
Фотометрические единицы.	59
Определение концентрации по молярному показателю поглощения.	60
Измерение скорости изменения поглощения.	61
Измерение по конечной точке (end point method)	62
1-точечное измерение на двухлучевом фотометре	62
Измерение с бланком (холостой пробой) на однолучевом фотометре.	63
Измерение с прозоной (assay with prozone check)	64
Двухволновое измерение с опорной длиной волны	64
Кинетические измерения (kinetic measurement).	65
Измерение по 2-точкам.	67
Многоточечное измерение.	67
Измерение по начальной скорости (initial rate)	67
Кинетический метод с коррекцией по бланку образца.	68
ТУРБИДИМЕТРИЯ И НЕФЕЛОМЕТРИЯ	69
Кривая доза-эффект. (Калибровочный график, отражающий реакцию взаимодействия антигена и атителя).	69
Калибровочный график	70
ФОТОМЕТРИЧЕСКИЕ СХЕМЫ ИЗМЕРЕНИЯ ОПТИЧЕСКОГО ПОГЛОЩЕНИЯ РАСТВОРОВ.	72
ПРИБОРЫ И КОМПОНЕНТЫ ДЛЯ ФОТОМЕТРИЧЕСКОГО АНАЛИЗА.	75
Структурные схемы фотометров. Основные компоненты фотометров.	75
Особенности фотометрической схемы биохимических анализаторов	76
КОМПОНЕНТЫ ФОТОМЕТРИЧЕСКИХ ПРИБОРОВ	77
ИСТОЧНИКИ СВЕТА.	77
Тепловые источники света.	77
Галогеновые лампы.	78
Газоразрядные лампы	78
Дуговые ртутные лампы.	78
Светоизлучающие диоды.	79
Лазеры.	80

СПЕКТРАЛЬНАЯ ФИЛЬТРАЦИЯ	82
ФИЛЬТРЫ.	83
МОНОХРОМАТОРЫ	85
Призмы.	85
Дифракционная решетка.	86
Голографическая решетка	86
Полихроматор.	87
ТОНКИЕ ЛИНЗЫ И ЗЕРКАЛА	87
Линзы	87
Сферические зеркала.	88
Плоские зеркала.	89
КЮВЕТЫ.	89
ПРИЕМНИКИ ОПТИЧЕСКОГО ИЗЛУЧЕНИЯ	93
Электровакуумные фотоэлементы.	93
Фотоэлектронные умножители.	94
Фотодиоды.	94
Волоконная оптика.	96
УСТРОЙСТВА СЧИТЫВАНИЯ	97
Регистрирующие устройства.	97
ПРИБОРЫ ДЛЯ ФОТОМЕТРИЧЕСКОГО АНАЛИЗА.	98
ФОТОМЕТРЫ ОБЩЕГО НАЗНАЧЕНИЯ.	98
Одно лучевые микроколориметры медицинские фотометрические МКМФ-1 и МКМФ-2.	98
Двух лучевой фотоэлектрический колориметр ФЭК-56.	98
Одно лучевой спектрофотометр СФ-46	100
Двух лучевой спектрофотометр Beckman DB	101
ФОТОМЕТРЫ И СПЕКТРОФОТОМЕТРЫ СПЕЦИАЛЬНОГО НАЗНАЧЕНИЯ	103
Биохимический анализатор БиАн	104
Анализатор с вертикальным фотометрированием для ИФА	105
Платишетный анализатор с вертикальным фотометрированием «Униплан»	106
Одноволновые анализаторы	107
Гемоглобинометры фотометрические портативные АГФ-03-1 МиниГЕМ 540 и АГФ-03-2 МиниГЕМ 523.	107
Бихроматические анализаторы.	110
Анализатор билирубина фотометрический неонатальный АБФ-04 Билимет К	110
Двухволновый отражательный анализатор Билитест 2000	112
Транскутанная билирубинометрия	113
Методика проведения транскутанной билирубинометрии.	114
Турбидиметрические анализаторы	116
Анализатор общего белка в моче Белур 600	116
Лазерный анализатор агрегации тромбоцитов АЛАТ2 БИОЛА	117
ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА КАЧЕСТВО ФОТОМЕТРИРОВАНИЯ	119
Причины кажущихся отклонений от закона Бугера	119
Физико-химическая гетерогенность исследуемого раствора	119
ИНСТРУМЕНТАЛЬНЫЕ ПОГРЕШНОСТИ	120
Установка длины волны	120
Влияние монохроматичности света	121
Рассеянный свет.	122
Линейность	124
Использование констант в фотометрическом исследовании.	125

Мениск в лунках планшетов	125
Температура.	126
МЕТРОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ФОТОМЕТРИИ.	128
Правильность фотометрических данных	128
Сходимость фотометрических данных	129
Воспроизводимость спектрофотометрических данных	129
Предел обнаружения и минимально определяемая концентрация	131
Оценка погрешностей определения активности ферментов кинетическим методом с применением линейной регрессии	132
Оценка систематических погрешностей определения активности ферментов	133
СОПОСТАВЛЕНИЕ ТОЧНОСТНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК ЛАБОРАТОРНЫХ МЕТОДОВ НА ПРИМЕРЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ГЕМОГЛОБИНА	134
Методы определения гемоглобина	134
Погрешности методов определения гемоглобина	135
<u>Погрешности, связанных с присутствием разных форм гемоглобина</u>	135
<u>Погрешности преобразования гемоглобина</u>	137
<u>Приборные погрешности</u>	137
<u>Погрешности калибровки приборов</u>	137
<u>Погрешности дозирования крови и растворов</u>	137
<u>Контрольные материалы и их точностные характеристики</u>	137
Суммарная погрешность измерений σ .	138
СРЕДСТВА КОНТРОЛЯ ФОТОМЕТРИЧЕСКИХ ПРИБОРОВ	139
ЛИТЕРАТУРА	141

ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ

Оптические методы исследования веществ основаны на способности этих веществ порождать оптическое излучение или взаимодействовать с ним. .

Фотометрия – совокупность оптических методов и средств измерения *фотометрических величин светового потока*. Основным понятием фотометрии является поток излучения, смысл которого в мощности переносимого электромагнитного (оптического) излучения.

Спектрофотометрия - определение зависимости фотометрических величин от длины волны излучения .

Спектроскопия или эмиссионный спектральный анализ - определение излучательной способности веществ в зависимости от длины волны излучения.

В аналитической химии и клинической лабораторной диагностике широкое применение нашли фотометрические методы количественного анализа, основанные на переводе определяемых компонентов в поглощающие свет соединения с последующим определением их количеств путем измерения светопоглощения растворов.

По окраске растворов окрашенных веществ можно определять концентрацию компонентов при помощи фотоэлектрических приемников оптического излучения (фотоприемников) - приборов, превращающих световую энергию в электрическую. Если измерение ведется без выделения узкого диапазона длин волн, то есть измеряются характеристики всего светового потока, то такой метод анализа часто называется *колориметрическим*. Если же выделяется характерный для поглощения данным веществом оптический диапазон и измерение проводится на определенной длине волны, тогда говорят о собственно фотометрическом методе анализа. Фотометрический метод является более объективным методом, чем колориметрический, поскольку результаты его меньше зависят от поглощения света другими (интерферирующими) окрашенными веществами.

Фотометрический анализ - один из самых старых и распространенных физико-химических методов, для него требуется относительно простое оборудование, в то же время он

характеризуется высокой чувствительностью и возможностью определения большого количества органических веществ. Открытие все новых и новых реагентов, образующих окрашенные соединения с неорганическими ионами и органическими веществами, разработка принципов сопряженных реакций делает в настоящее время применение этого метода почти неограниченным.

Фотометрический метод анализа может применяться для большого диапазона определяемых концентраций. Его используют как для определения основных компонентов различных сложных веществ, так и для определения микропримесей в объектах.. Комбинирование с некоторыми методами разделения и обогащения - хроматографическим, экстракционным - позволяет на несколько порядков повысить чувствительность фотометрических методов.

Фотометрические свойства растворенного вещества характеризуются коэффициентом пропускания T (τ), коэффициентом отражения R (ρ), и коэффициентом поглощения A (α), которые для одного и того же вещества связаны соотношением $T + R + A = 1$.

Определение безразмерных величин T , R и A выполняется с помощью фотометров (приборов для измерения какой-либо фотометрической величины) путем регистрации реакций приемника оптического излучения на соответствующие потоки излучения. При этом в рутинной лабораторной практике принято обозначать приборы, регистрирующие поглощение света веществом, **фотометрами**, отражение – **отражательными фотометрами**.

Фотометрические методы применяются также в тех случаях, когда изучается способность веществ рассеивать (нефелометрия) и пропускать излучение (турбидиметрия), переизлучать поглощенное излучение (флуориметрия), изменять степень поляризации излучения при прохождении его через оптически активные вещества (поляриметрия).

Кроме того, одним из важных разделов физической оптики является **рефрактометрия**, изучающая показатели преломления оптического излучения твердых, жидких и газообразных веществ в зависимости от длины волны излучения.

Названные оптические методы применяются для изучения состояния биологических систем и их изменения в процессах ассоциации-диссоциации, взаимодействия с другими молекулами, образования и распада комплексов фермент-субстрат, антиген-антитело, белок-липид, белок-нуклеиновая кислота; фотофизических и фотохимических процессов и т.д.

Высокая чувствительностью, точность, быстродействие и удобство использования для рутинных исследований предопределяют широкое применение оптических методов в клинической лабораторной диагностике.

ФИЗИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ОПТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЯ ВЕЩЕСТВ

ОПТИЧЕСКОЕ ИЗЛУЧЕНИЕ. СВЕТ.

Оптическое излучение представляет собой электромагнитные колебания определенного диапазона частот, распространяющихся в пространстве со скоростью c , которая для вакуума составляет $3 \cdot 10^8$ м/с. Основной характеристикой электромагнитного излучения является частота ν или длина волны электромагнитных колебаний $\lambda = c/\nu$.

Частотный состав электромагнитного излучения называется его спектром.

Свойства электромагнитного излучения сильно различаются в зависимости от частотного диапазона. Наиболее высокочастотная область колебаний (спектра), характеризующаяся длиной волны $\lambda < 0,05$ нм ($5 \cdot 10^{-11}$ м), соответствует космическим лучам, пронизывающим земную атмосферу, и гамма-излучению, возникающему при ядерных реакциях.

Область колебаний (спектра) с длинами волн от долей нанометра до нескольких десятков нанометров относится к рентгеновскому излучению. «Мягкое», т. е. наиболее длинноволновое и наименее проникающее рентгеновское излучение, примыкает к ультрафиолетовому излучению оптического диапазона.

Оптическим диапазоном электромагнитного излучения называется средняя область спектра с длиной волны от нескольких десятков нанометров (сотых долей микрона) до величины порядка сотни микрометров (долей миллиметра). Оптический диапазон включает: невидимое

ультрафиолетовое излучение с длиной волны до 380 нм, область видимого излучения - свет - с длиной волны от 380 нм до 780 нм и невидимое инфракрасное излучение с длиной волны больше 780 нм

Объединение ультрафиолетового, видимого и инфракрасного излучения в общее понятие *оптический диапазон* оправдывается как однотипностью принципов возбуждения этих излучений, так и общностью методов их индикации и преобразования. Учитывая это, мы будем употреблять термин «свет» (то есть, видимое оптическое излучение) вместо «оптическое излучение» для облегчения понимания некоторых оптических явлений.

Оптическое излучение возникает либо в результате возбуждения атомов или кристаллов, сопровождающегося энергетическими переходами наименее связанных (валентных) электронов, либо в результате тепловых колебаний самих атомов и молекул, испускающих инфракрасное излучение. Рентгеновское излучение отличается от оптического тем, что возникает при возбуждении электронов с внутренних оболочек атома, радиоизлучение — при колебаниях свободных зарядов.

Со стороны более длинных волн к оптическому диапазону примыкает область радиоволн. Наиболее длинноволновое электромагнитное излучение ($\lambda > 10^4$ м) создают промышленные установки (генераторы переменного тока).

На рис. 1 изображен в логарифмическом масштабе полный спектр электромагнитных излучений.

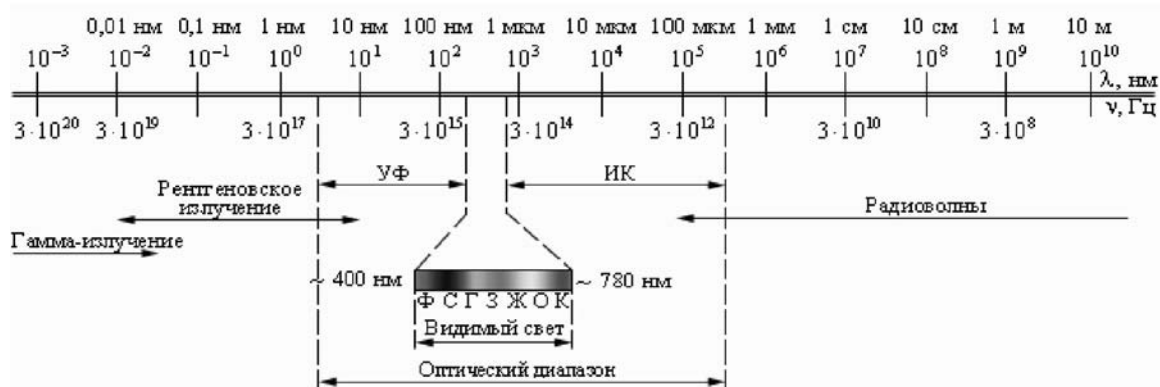


Рис.1. Шкала электромагнитных волн.

Таблица 1.

Источники электромагнитных волн			
Частота ν , Гц	Длина волны λ , м	Диапазон	Источники. Основные методы возбуждения.
10^3	3×10^4	Радиоволны	Переменные токи в проводниках и электронных потоках (генераторы радиочастот, генераторы сверхвысоких частот СВЧ)
10^{12}	30×10^{-4}		
$3,75 \times 10^{14}$	8×10^{-7}	ИК-излучение	Излучение молекул и атомов при тепловых и электрических воздействиях
$7,5 \times 10^{14}$	4×10^{-7}	Видимый свет	Излучение молекул и атомов при тепловых и электрических воздействиях
3×10^{17}	10^{-9}	УФ излучение, мягкий рентген	Излучение атомов при воздействии ускоренных электронов
3×10^{20}	10^{-12}	Рентген, γ -излучение	Атомные процессы при воздействиях ускоренных заряженных частиц.
10^{23}	3×10^{-15}	γ -излучение	Ядерные процессы, радиоактивный распад, космические процессы

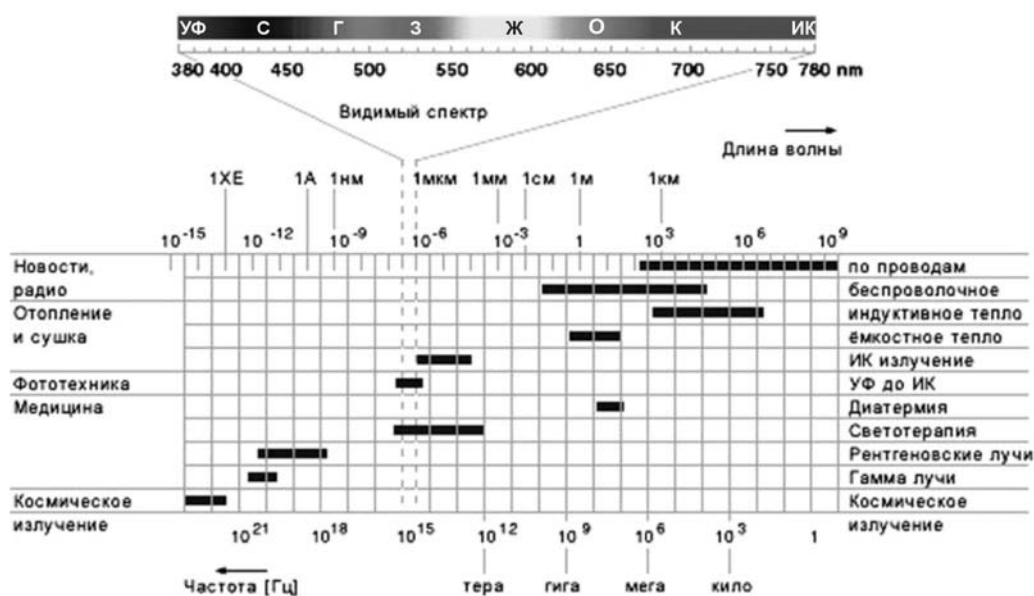


Рис. 2. Области использования электромагнитного и оптического излучения

Таблица 2.

Диапазоны оптического излучения	
Обозначение	Волновой диапазон
Коротковолновое ультрафиолетовое излучение - С (УФ-С)	100 - 280 нм
Средневолновое ультрафиолетовое излучение - В (УФ -В)	280 - 315 нм
Длинноволновое ультрафиолетовое излучение - А (УФ -А)	315 - 380 нм
Видимый свет:	380 - 780 нм
Фиолетовый	380 – 435
Синий	435 – 490
Голубой	490 – 500
Зеленый	500 – 560
Желтый	560 – 595
Оранжевый	595 – 650
Красный	650 - 780
Ближнее инфракрасное излучение А (ИК-А)	780 нм - 1,4 мкм
Среднее инфракрасное излучение В (ИК -В)	1,4 - 3 мкм
Дальнее инфракрасное излучение С (ИК -С)	3 мкм - 1 мм

Корпускулярно-волновой дуализм света

Свет представляет собой сложное явление: в одних случаях он ведет себя как электромагнитная волна, в других – как поток особых частиц - фотонов.

Это означает, что природа света более сложна, чем природа привычных для нас тел окружающего мира. В любых световых явлениях при их глубоком изучении обнаруживается неразрывная связь квантовых и волновых свойств света.

Волновые характеристики света

Свет представляет собой волны электромагнитного поля. В электромагнитной волне колеблются векторы напряженности электрического поля \vec{E} и векторы напряженности магнитного поля \vec{B} .

Как показывает опыт, физиологическое, фотохимическое, фотоэлектрическое и другие действия света вызываются колебаниями электрического вектора. В соответствии с этим в дальнейшем под световым вектором подразумевается вектор напряженности электрического поля \vec{E} . Световые волны являются плоско поперечными, распространяются в однородной среде перпендикулярно направлению электрического и магнитного полей (рисунок 3).

Линии, вдоль которых распространяется световая энергия, называются лучами. В естественном свете колебания различных направлений быстро и беспорядочно сменяют друг друга. Свет, в котором направления колебаний упорядочены каким-либо образом, называется **поляризованным**. Если колебания светового вектора происходят только в одной проходящей через луч плоскости, свет называется плоско поляризованным (или линейно-поляризованным).

Основной волновой характеристикой света является длина волны λ , выражаемая в нм, мкм, или см.

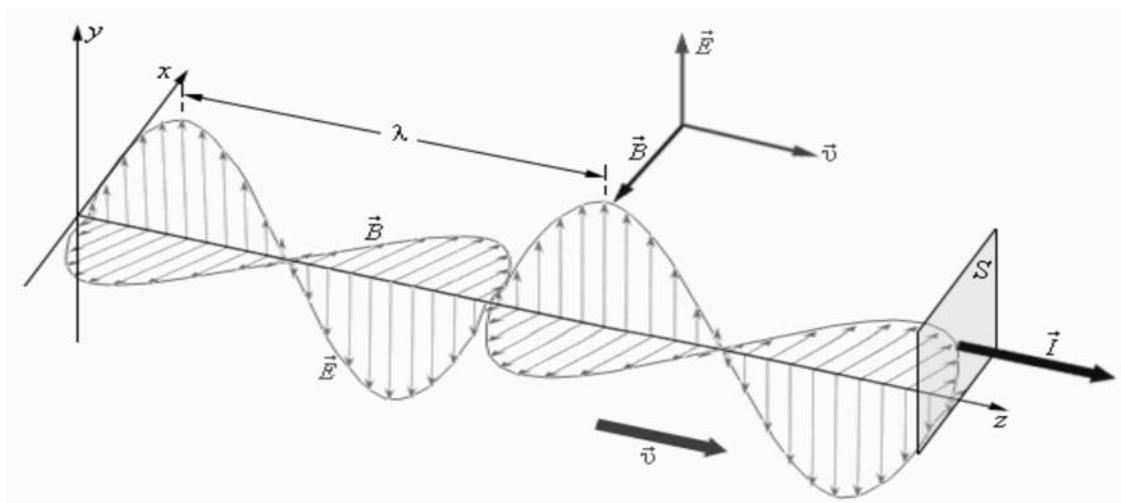


Рис. 3. Световая волна распространяется в направлении оси Z перпендикулярно векторам напряженности электрического \vec{E} и магнитного \vec{B} полей. Характеристикой светового потока является длина волны λ . Если световой поток содержит волны с одинаковой ориентацией плоскостей, в которых лежат вектора \vec{E} световых волн, то такой свет называется поляризованным.

Оптическое излучение какой-либо одной длины волны представляет собой монохроматическое излучение.

Колебание монохроматической световой волны описывается выражением гармонического колебания:

$$E = A \cos(t\omega + \varphi) = A \cos(2\pi \cdot t \cdot c/\lambda + \varphi),$$

здесь t – время, c – скорость распространения волны, φ – фаза гармонического колебания в точке наблюдения.

Важной характеристикой световых волн является их взаимная **когерентность**. Когерентность – это согласованное протекание во времени и пространстве нескольких колебательных или волновых процессов, проявляющееся при их сложении. Колебания называются когерентными, если разность их фаз остается постоянной во времени, сложение колебаний определяет амплитуду суммарного колебания.

При сложении колебаний двух монохроматических световых волн образуется колебание той же частоты. Амплитуда результирующего колебания

$$A_p = \sqrt{A_1^2 + A_2^2 + 2A_1A_2 \cos(\varphi_1 - \varphi_2)}$$

может изменяться в пределах от $A_1 + A_2$ до $A_1 - A_2$ в зависимости от разности фаз $\varphi_1 - \varphi_2$ (рисунок 4).

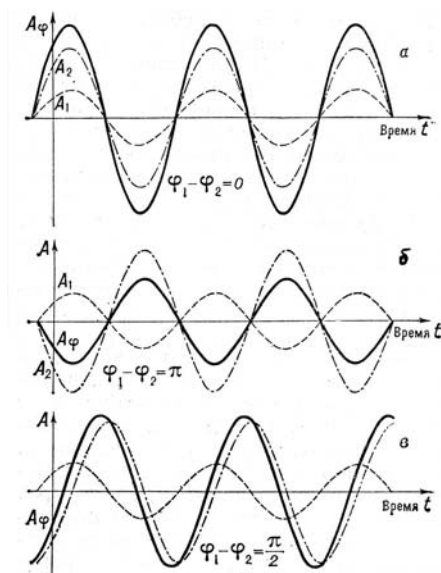


Рис. 4. Сложение колебаний двух световых волн (пунктир) с амплитудами A_1 и A_2 при различных фазах. Результирующее колебание – сплошная линия.

Дневной свет и свет, испускаемый лампами накаливания, - это смесь некогерентных электромагнитных волн разных длин и фаз, образующих непрерывный (сплошной) *спектр*. Волновые свойства света проявляются в *отражении, преломлении, дифракции, интерференции, поляризации, рассеивании* света.

Квантовые характеристики света

Свет испускается и поглощается веществом в виде строго определенных порций энергии - световых квантах - фотонах. Фотоны - элементарные частицы света. Они обладают всеми характеристиками частиц микромира: определенной энергией $E = h\nu$, массой $m = \frac{E}{c^2}$ и импульсом $P = \frac{h\nu}{c}$, где c - скорость света, $\nu = \frac{c}{\lambda}$ - частота электромагнитной волны, h - постоянная Планка: $h[\text{дж}\cdot\text{сек}] = 6,625 \cdot 10^{-34}$.

Принципиальное отличие фотона от микрочастиц - отсутствие массы покоя, поэтому **торможение (поглощение) фотона обязательно связано с превращением кванта света в другой вид энергии** и прекращением самостоятельного существования.

Энергия света прямо связана с частотой. Количественную связь между корпускулярными свойствами E и волновой характеристикой излучения ν устанавливает формула Планка:

$$E = h\nu$$

Как следует из этого уравнения, энергия обратнопропорциональна длине волны, то есть, чем кооче длина волны, тем большую энергию она несет.

Корпускулярные свойства света обнаруживаются в процессах *люминесценции*, спектрах поглощения и испускания (*флуоресценции*), явления *фотоэффекта*.

ХАРАКТЕРИСТИКИ ОПТИЧЕСКОГО ИЗЛУЧЕНИЯ.

Рассматривая излучение как колебательный процесс, можно определить его интенсивность, как мощность лучистого потока, пронизывающего единичную площадку, расположенную нормально к направлению распространения волны. Плотность монохроматического излучения (лучистого потока), пронизывающего данную область пространства, выражается уравнением:

$$I = \frac{v\varepsilon}{2} E_m^2$$

где v — скорость распространения волны в среде с диэлектрической постоянной ε ; E_m^2 — амплитуда напряженности электрического поля электромагнитной волны.

Интенсивность однородного (монохроматического) излучения с частотой ν можно измерять числом фотонов, проходящих через единицу поверхности в единицу времени; поток фотонов N_ϕ связан с мощностью излучения соотношением:

$$N_\phi [\text{сек}^{-1}] = \frac{I}{h\nu}$$

Лучистую энергию можно измерять в обычных энергетических единицах — джоулях *дж* или калориях *кал* или *ккал/моль* (если ее оценивают по тепловому действию). Лучистый поток I измеряют в ваттах *Вт* или калориях в секунду *кал/сек*.

Однако, джоуль слишком крупная единица измерения для оценки энергии единичного кванта излучения. Энергию фотонов чаще всего измеряют в электрон-вольтах (1 эв равен энергии, которую приобретает электрон, проходя участок электрического поля с разностью потенциалов в 1 в):

$$1 \text{ эв} = 1,6 \cdot 10^{-19} \text{ дж} \quad (23 \text{ ккал/моль})$$

Связь между энергией квантов в электрон-вольтах и длиной волны излучения в нанометрах определяется следующим соотношением:

$$h\nu = \frac{hc}{\lambda} = \frac{1239}{\lambda}$$

Так, видимому диапазону излучения с границами $\lambda_1 = 380 \text{ нм}$ и $\lambda_2 = 780 \text{ нм}$ соответствуют энергии фотонов

$$\text{от } h\nu = \frac{hc}{\lambda} = \frac{1239}{380} = 3,26 \text{ эв} \text{ до } h\nu = \frac{hc}{\lambda} = \frac{1239}{780} = 1,6 \text{ эв}$$

Каждый источник излучения характеризуется определенным составом частот или длин волн излучения (**спектром** частот или длин волн), который может быть представлен в виде спектрального распределения

$$I_\lambda = \frac{dI}{d\lambda}, \text{ где } dI - \text{лучистый поток, приходящийся на спектральный интервал } \Delta\lambda.$$

Если источник имеет непрерывный спектр излучения, то суммарный лучистый поток, который он испускает, равен

$$I = \int_0^\infty I_\lambda d\lambda$$

Если излучение относится к видимому диапазону, то интенсивность его может быть определена визуально. Попадая в глаз, видимое излучение вызывает определенное зрительное ощущение, зависящее от мощности излучения и длины волны.

Глаз и его оптические свойства

Глаз - это оптическая система для отображения объекта на сетчатке. Взаимодействие компонентов сетчатки, передней глазной камеры, радужной оболочки, глазной линзы и

стекловидного тела позволяет глазу настроиться на разнообразные условия освещения. Нижняя граница восприятия глаза лежит в пределах долей люкс (свет от звезды на ночном небе).

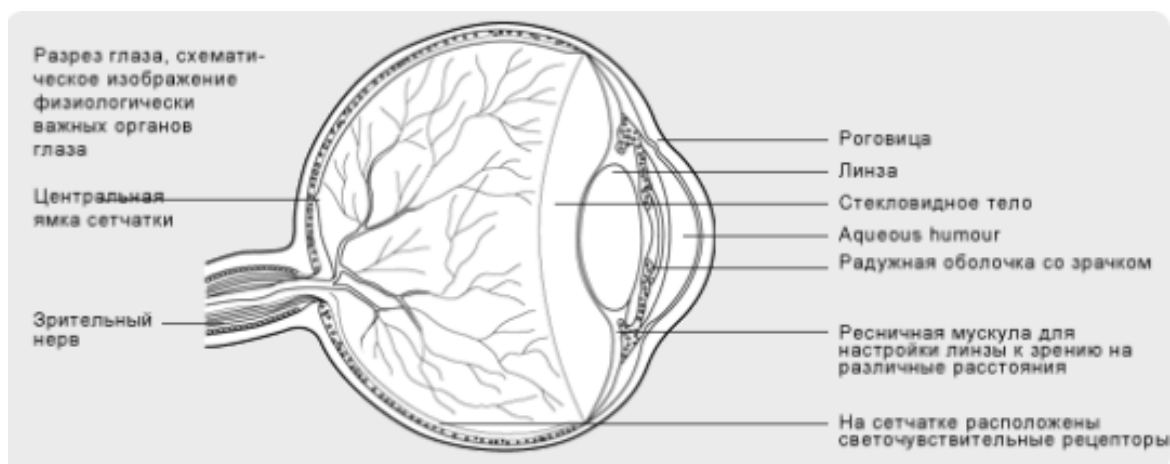


Рис. 5. Схематический разрез глаза, как оптической системы

Основой восприятия света глазом являются рецепторы, расположенные в глазном дне (рисунок 5). В глазу имеется два типа рецепторов (чувствительных органов) так называемые палочки и колбочки. Палочки работают при низкой освещенности и могут воспринимать очень слабые световые потоки (ночное зрение), но не способны различать цвета (“ночью все кошки серые”). Колбочки же задействованы в основном при высоких уровнях освещения и обеспечивают восприятие трех основных цветов: красного, зеленого и синего (дневное зрение).

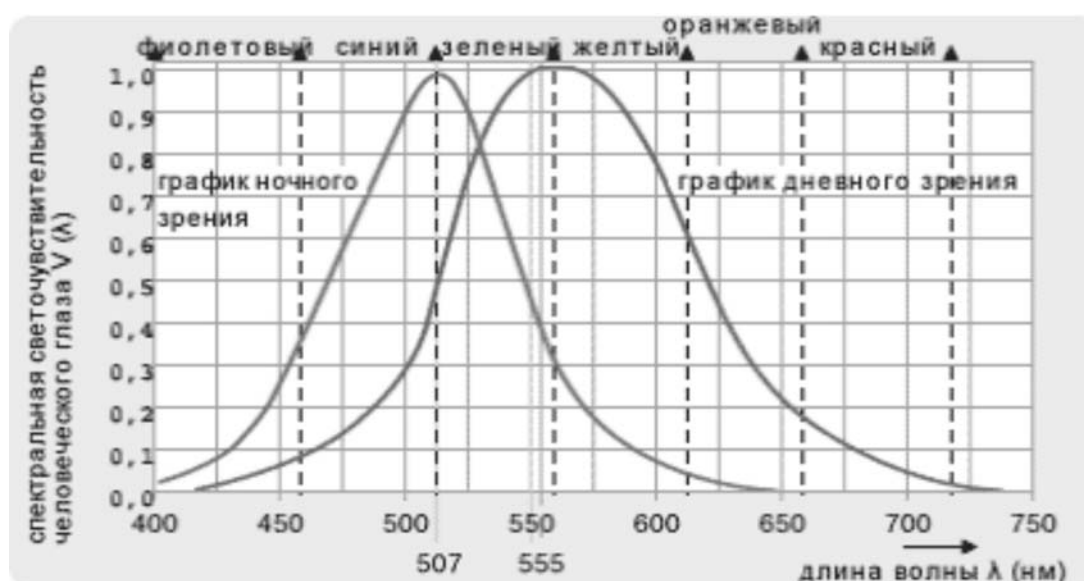


Рис. 6. Спектральная светочувствительность человеческого глаза

Чувствительность, как палочек, так и колбочек зависит от длины волны падающего света. Восприятие начинается при $\lambda_1 = 380$ нм (синий), максимум лежит при $\lambda_{\max} = 555$ нм (зеленый) и заканчивается при $\lambda_2 = 780$ нм (красный). Эта зависимость выражена графиком чувствительности глаза $V(\lambda)$. В зависимости от рецепторов различают график дневного и ночного зрения (рисунок 6). График ночного зрения обозначается $V'(\lambda)$.

Светотехнические характеристики оптического излучения

Лучистый поток, оцениваемый по зрительному ощущению, которое он производит, называется световым потоком ($I_{\text{св}}$). Зрительные ощущения сильно зависят от внешних условий. При определении световых характеристик излучения за основу приняты

характеристики дневного зрения. Поскольку глаз представляет собой селективный приемник излучения, обладающий неодинаковой чувствительностью к излучению различных длин волн, то лучистым потокам одинаковой мощности, но разного спектрального состава, соответствуют различные величины светового потока. Световой поток измеряется в специальных световых (светотехнических) единицах.

Для установления системы световых единиц принят универсальный эталонный платиновый излучатель, представляющий собой модель абсолютно черного тела, т. е. равновесный температурный излучатель с точно фиксированной температурой 2042°K (температура затвердевания расплавленной платины), которая определяет спектральный состав и мощность его излучения.

Силой света источника излучения называется пространственная (или угловая) плотность создаваемого им светового потока:

$$J = \frac{dI_{св}}{d\omega}, \text{ где } \omega - \text{ телесный угол, в котором распространяется излучение.}$$

За единицу силы света принята сила света эталонного излучателя — кандела (*кд*).

Единица светового потока — люмен (*лм*) представляет собой световой поток, который испускает точечный излучатель с силой света $J = 1 \text{ кд}$ в пределах телесного угла $\omega = 1 \text{ стерадиан}$. Полный световой поток, испускаемый источником с силой света в 1 кд равномерно по всем направлениям, равен $I_{св} = 4\pi \text{ лм}$.

Освещенность поверхности называется отношение падающего на нее светового потока к площади A равномерно освещенной поверхности:

$$E = \frac{I_{св}}{A}$$

Единица освещенности E - люкс (*лк*) равна освещенности площади в 1 м^2 при падении на нее светового потока в 1 лм .

Точечный источник света с силой света в 1 кд , помещенный в центре сферы с радиусом в 1 м , создает на поверхности сферы освещенность в 1 лк . Сила света точечного источника и создаваемая им освещенность связаны соотношением:

$$E = \frac{J}{r^2} \cos \theta, \text{ где } r - \text{ расстояние от источника света до освещаемой им поверхности;}$$

θ — угол между направлением светового потока и нормалью к освещаемой поверхности.

При нормальном падении света $E[\text{лк}] = \frac{J}{r^2}$, если J – в канделах, а r - в метрах.

Связь между энергетическими и световыми характеристиками

Связь между энергетическими (объективными) и световыми (субъективными) характеристиками излучения осуществляется с учетом спектральной характеристики чувствительности «усредненного» человеческого глаза. Спектральная чувствительность глаза характеризуется величиной, получившей название *видность* и измеряемой в *лм/вт*.

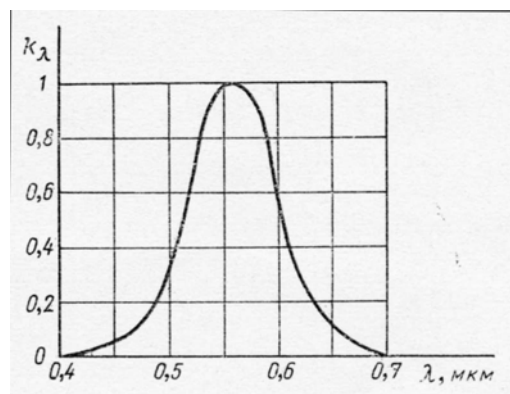


Рис. 7. Кривая видимости глаза.

На рисунке 7 приведена спектральная характеристика относительной видимости k_λ , показывающая относительный уровень светового ощущения, возникающего в результате действия на глаз монохроматического излучения различных длин волн, но одинаковой мощности.

Экспериментальными измерениями установлено, что 1 Вт лучистого потока монохроматического излучения с длиной волны $\lambda_{\max} = 555$ нм (соответствующей максимуму видимости) равен 683 лм светового потока. Иначе говоря, чувствительность среднего глаза в максимуме кривой видимости (длина волны 555 нм – зеленый свет) численно равна 683 лм/Вт.

Таким образом, возможности зрительного анализа светового потока ограничены, во-первых, узким спектральным диапазоном, во-вторых, зависимостью зрительных ощущений от условий наблюдения и спектрального состава излучения.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ СВЕТА С ВЕЩЕСТВОМ.

Взаимодействие света с веществами – это взаимодействие светового электромагнитного поля, колеблющегося с высокой частотой, с электронами, атомами и молекулами веществ, находящимися в этом поле. Наиболее полно такое взаимодействие описывает квантовая механика. Однако многие световые явления могут быть описаны с позиций классической физики.

Свет ведет себя, как электромагнитная волна только при распространении через непоглощающие среды. В остальных случаях световой поток представляется, как поток частиц – фотонов.

Скорость электромагнитных волн в вакууме:

$$c = 2,99792458 \cdot 10^8 \text{ м/с} = 3 \cdot 10^8 \text{ м/сек}$$

Скорость распространения электромагнитных волн в вакууме является одной из фундаментальных физических постоянных.

Скорость распространения электромагнитной волны через вещество конечна и зависит от электрических и магнитных свойств вещества:

$$v = \frac{c}{\sqrt{\epsilon\mu}}, \text{ где } \epsilon \text{ и } \mu \text{ – диэлектрическая и магнитная проницаемости вещества.}$$

Чем больше диэлектрическая или магнитная проницаемость вещества, тем с меньшей скоростью распространяется свет в этом веществе.

Отражение и преломление света.

На границе раздела двух прозрачных сред свет может частично отразиться так, что часть световой энергии будет распространяться после отражения по новому направлению, оставшаяся часть пройдет через границу и будет распространяться во второй среде (рисунок 8).

Закон отражения света: падающий и отраженный лучи, а также перпендикуляр к границе раздела двух сред, восстановленный в точке падения луча, лежат в одной плоскости (*плоскость падения*). Угол отражения γ равен углу падения α .

Закон преломления света: падающий и преломленный лучи, а также перпендикуляр к границе раздела двух сред, восстановленный в точке падения луча, лежат в одной плоскости. Отношение синуса угла падения α к синусу угла преломления β есть величина, постоянная для двух данных сред:

$$\frac{\sin \alpha}{\sin \beta} = n.$$

Постоянную величину n называют **относительным показателем преломления** второй среды относительно первой. Показатель преломления среды относительно вакуума называют **абсолютным показателем преломления**.

Относительный показатель преломления двух сред равен отношению их абсолютных показателей преломления:

$$n = n_2 / n_1.$$

Законы отражения и преломления находят объяснение в волновой физике. Согласно волновым представлениям, преломление является следствием изменения скорости распространения волн при переходе из одной среды в другую. Физический смысл показателя преломления – это отношение скорости распространения волн в первой среде v_1 к скорости их распространения во второй среде v_2 :

$$n = \frac{v_1}{v_2}.$$

Абсолютный показатель преломления равен отношению скорости света c в вакууме к скорости света v в среде:

$$n = \frac{c}{v}.$$

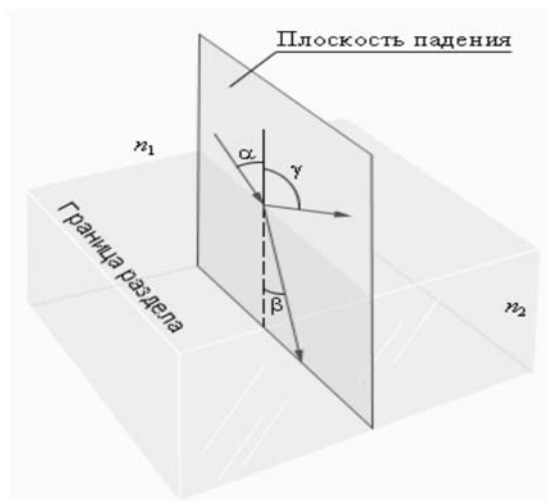


Рис. 8. Законы отражения и преломления: $\gamma = \alpha$; $n_1 \sin \alpha = n_2 \sin \beta$.

Среду с меньшим абсолютным показателем преломления называют оптически менее плотной.

При пересечении границы раздела двух сред свет частично проходит, частично отражается от границы (зеркальное отражение). Интенсивность отраженного света характеризуется коэффициентом отражения T и зависит от угла падения и поляризации света, а также от соотношения показателей преломления n_2 и n_1 второй и первой сред.

При падении света по нормали к поверхности раздела двух сред, коэффициент отражения не зависит от поляризации падающего пучка и равен:

$$T = \frac{(n_2 - n_1)^2}{(n_2 + n_1)^2}$$

В очень важном случае нормального падения света из воздуха на стекло на границу их раздела ($n_{\text{возд}} \approx 1$, $n_{\text{ст}} = 1,5$) $T \approx 4\%$. Очевидно, что при прохождении света в противоположном направлении, коэффициент отражения также будет равен 4% .

Такой случай возникает при прохождении света в фотометрах через стеклянную кювету с жидкой пробой (рисунок 9).

4% света (I_1) отражается от внешней передней стенки кюветы на границе раздела воздух-стекло в сторону источника света и 4% оставшегося света – от внешней задней стенки кюветы на границе раздела стекло-воздух также в направлении источника света.

Часть света (I_2) отразится еще и от внутренней передней стенки кюветы на границе раздела стекла и жидкости и от внутренней задней на границе раздела жидкости и стекла ($T = 0,5\%$).

Суммарно, с учетом всех четырех границ раздела, на отражении от стенок кюветы теряется $\approx 9,2\%$ входящего светового потока.

Это отражение воспринимается приемником излучения, как поглощение света при его прохождении через жидкую пробу и должно быть учтено во избежание ошибки измерения.

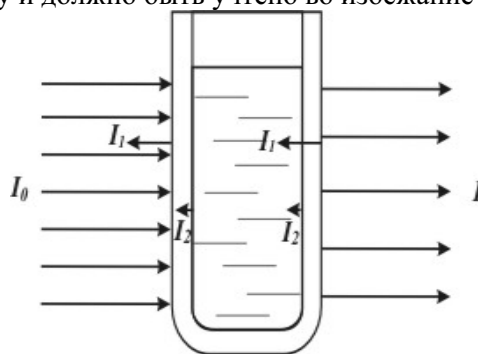


Рис. 9. **Отражение света от стенок кюветы** с неокрашенной прозрачной жидкостью. I_0 – падающий свет; I_1 – свет, отраженный от границы раздела воздух-стекло; I_2 – свет, отраженный от границы раздела жидкость-стекло; I – прошедший свет.

При переходе света из оптически более плотной среды в оптически менее плотную $n_2 < n_1$ (например, из стекла в воздух) можно наблюдать явление **полного отражения**, то есть исчезновение преломленного луча (рис. 10). Это явление наблюдается при углах падения, превышающих некоторый критический угол $\alpha_{\text{пр}}$, который называется **предельным углом полного внутреннего отражения**.

Для угла падения $\alpha = \alpha_{\text{пр}}$ $\sin \beta = 1$ значение $\sin \alpha_{\text{пр}} = n_2 / n_1 < 1$.

Если второй средой является воздух ($n_2 \approx 1$), то формулу удобно переписать в виде:

$$\sin \alpha_{\text{пр}} = 1 / n,$$

где $n = n_1 > 1$ – абсолютный показатель преломления первой среды.

Для границы раздела стекло–воздух ($n = 1,5$) критический угол равен $\alpha_{\text{пр}} = 42^\circ$, для границы вода–воздух ($n = 1,33$) – $\alpha_{\text{пр}} = 48,7^\circ$.

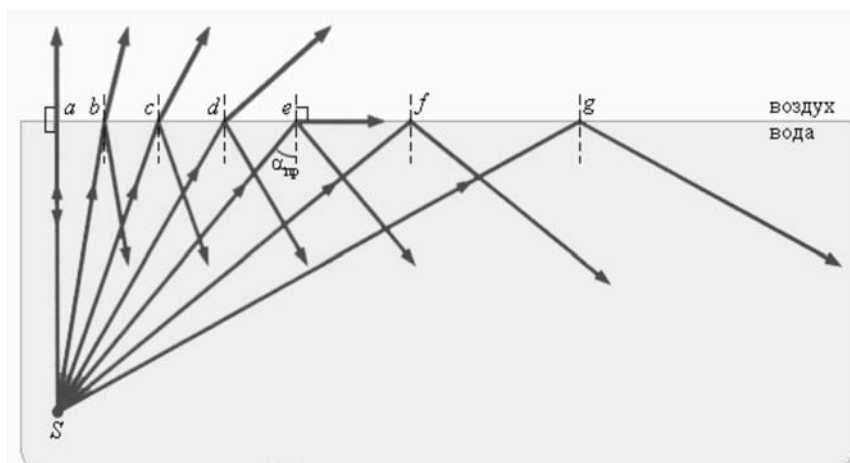


Рис. 10. Полное внутреннее отражение света на границе вода–воздух; S – точечный источник света.

Явление полного внутреннего отражения находит применение во многих оптических устройствах. Наиболее интересным и практически важным применением является создание **волоконных световодов**, которые представляют собой тонкие (от нескольких микрометров до миллиметров) произвольно изогнутые нити из оптически прозрачного материала (стекло, кварц). Свет, попадающий на торец световода, может распространяться по нему на большие расстояния за счет полного внутреннего отражения от боковых поверхностей (рисунок 11). Научно-техническое направление, занимающееся разработкой и применением оптических световодов, называется **волоконной оптикой**.

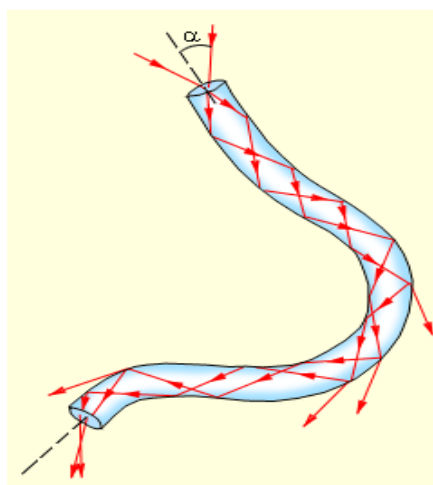


Рис. 11. Распространение света в волоконном световоде. При сильном изгибе волокна внутреннего отражения не достаточно, свет частично выходит из волокна через боковую поверхность.

Согласно молекулярной теории света, под действием электромагнитного поля световой волны в молекулах среды происходит смещение связующих пар внешних (оптических) электронов в сторону более электроотрицательного атома. Это смещение приводит к несовпадению центров положительных и отрицательных зарядов, т.е. молекулы **поляризуются** и приобретают характер **диполей**. Диполи совершают вынужденные колебания с частотой, равной частоте падающей световой волны. Кроме того, данные диполи являются источниками вторичных сферических волн. Если среда однородна и изотропна (свойства среды одинаковы во всех направлениях) и падающая световая волна плоская, то из-за **интерференции** ее со всеми вторичными волнами, излучаемыми диполями среды, получается плоская результирующая волна, которая распространяется в соответствии с законами преломления и отражения света. Так как распространение света в преломляющей среде связано с **поляризуемостью** ее молекул, то различные соединения, среды и вещества

имеют разную преломляющую способность. Величины n некоторых химических веществ и биологических систем приведены в таблице 3.

Таблица 3.

Значения показателей преломления некоторых химических веществ и биологических объектов	
Вещество	Показатель преломления
Воздух	1,00027
Кварц	1,52
Стекло кварцевое	1,469 ($\lambda=404$ нм)
Стекло тяжелый флинт	1,63-1,76
Алмаз	2,42
Вода дистиллированная	1,333
Метиловый спирт	1,329
Этиловый спирт	1,361
Ацетон	1,405
Этилен хлорид	1,359
Хлороформ	1,444
Толуол	1,497
Глицерин безводный	1,501
40% раствор сахарозы	1,4
45% раствор сахарозы	1,42
5% раствор агар-агара	1,342
5% раствор альбумина	1,422
Желатиновый ряд	1,360-1,420
Вирусы	1,502-1,559
Стенки растительных клеток	1,500-1,530
Споры бактерий	1,460-1,537
Эритроциты человека	1,385-1,393
Животные клетки	1,350-1,380

Показатель преломления вещества является безразмерной величиной. Он определяется химической природой и исходным физическим состоянием вещества (газ, жидкость, кристалл). В зависимости от плотности вещества будет меняться количество атомов и молекул в единице объема, и, следовательно, изменяться скорость распространения света в данном веществе и показатель преломления.

Рефракция света

При увеличении плотности показатель преломления (n) возрастает. Эта зависимость различна для различных агрегатных состояний веществ. Так для жидкостей используется формула Гладсона-Даля:

$n - 1 = r\rho$, где ρ – плотность жидкости, r – удельная рефракция или светопреломляющая сила вещества.

Для r формула Гладсона-Даля преобразуется к виду:

$$r = (n - 1) \cdot \frac{1}{\rho}.$$

В экспериментальной практике используют закон Лоренца-Лоренца, который идеально выполняется для изотропных сред (газы, неполярные жидкости) в видимом и ультрафиолетовом диапазонах электромагнитного излучения:

$$r = \frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \cdot \frac{1}{\rho}$$

Рефракция есть мера электронной поляризуемости вещества, характеризующая его физико-химическое состояние. Рефракцию используют для определения состава и структуры химических соединений. Рефрактометрические методы нашли применение в лабораторной медицине. Например, измерение содержания общего белка в сыворотке крови или в лиофильно высушенных биопрепаратах крови – сывороточном альбумине, фибриногене и др. с помощью специального прибора **рефрактометра**.

Рефрактометр Аббе.

Принцип работы рефрактометра Аббе заключается в наблюдении светового потока, прошедшего через слой раствора вещества, помещенного между двумя призмами (рисунок 12).

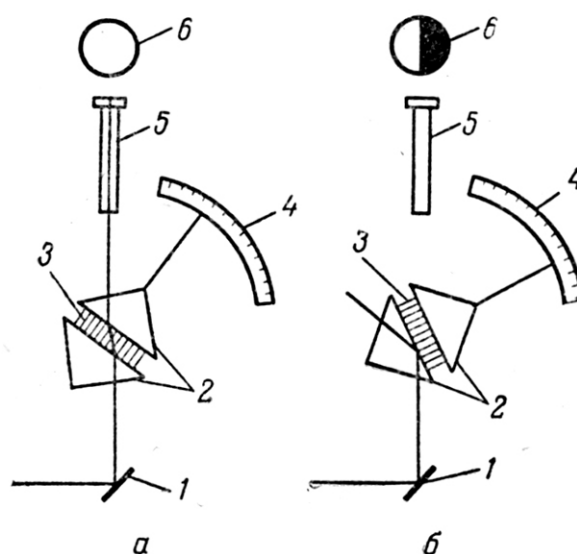


Рис. 12. Схема прохождения белого света в рефрактометре Аббе.

1 – зеркало; 2 – призма; 3 – слой исследуемого вещества; 4 – шкала отсчета; 5 – окуляр; 6 – поле окуляра.

Для определения показателя преломления на рефрактометре Аббе 2-3 капли исследуемого вещества помещают между половинками призмы и плотно сжимают. Пропуская воду необходимой температуры через обкладку призмы, добиваются постоянства температуры призмы и исследуемого вещества. Поворотом зеркала ярко освещают призму белым светом (позиция «а» на рисунке 12). После этого поворотом призмы добиваются появления темного поля в окуляре, что соответствует положению призмы, при котором луч света испытывает полное внутреннее отражение от поверхности раздела между призмой и исследуемым веществом (поле окуляра б, позиция «б» на рисунке 12). Значение n отсчитывают по шкале 4. Отечественной промышленностью выпускаются рефрактометры, выполненные по модифицированным схемам Аббе: рефрактометр РДУ (рефрактометр дисперсионный универсальный), рефрактометр РЛ-2 (рефрактометр лабораторный).

Дисперсия света

Абсолютный показатель преломления характеризует электрические и магнитные свойства среды, он зависит от длины волны света (рисунок 13):

$$n_{\lambda} = \sqrt{\varepsilon_{\lambda} \mu_{\lambda}}, \text{ где } \varepsilon \text{ и } \mu \text{ диэлектрическая и магнитная проницаемости вещества}$$

В оптической области спектра для всех веществ $\mu_\lambda \cong 1$, поэтому $n_\lambda \cong \sqrt{\varepsilon_\lambda}$.

ε_λ определяется взаимодействием электромагнитного поля световой волны с атомами и молекулами вещества.

Распространение света в среде связано с поляризуемостью молекул данного вещества. Под действием поля электроны атомов или молекул вещества совершают вынужденные колебания. При совпадении частоты колебания поля приходящей волны и собственной частоты колебаний электронов возникает резонанс и поглощение света. На частотах, близких к резонансным, проявляется сильная зависимость ε от λ .

Зависимость фазовой скорости распространения световой волны в веществе от длины волны называют **дисперсией света**, или рефрактометрической дисперсией. Среды, в которых эта зависимость существует, называют диспергирующими.

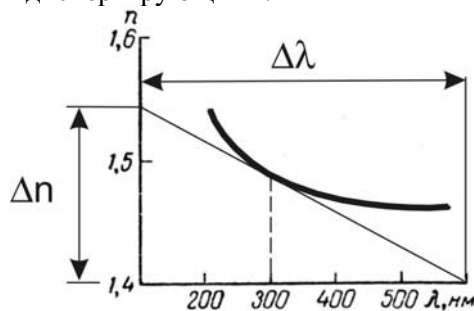


Рис.13. Зависимость показателя преломления n от длины волны λ для кварца.

Величина, определяющая скорость изменения коэффициента преломления с изменением длины волны в веществе, называется **дисперсией вещества**:

$$D_n = \frac{dn}{d\lambda},$$

Например, дисперсию кварца на длине волны 300 нм можно определить из рисунка 13. Для этого необходимо провести касательную к кривой в точке $\lambda = 300$ нм, определить величины Δn и $\Delta \lambda$ и вычислить дисперсию:

$$D_n = \frac{\Delta n}{\Delta \lambda} = \frac{1,55 - 1,4}{(600 - 100) \cdot 10^{-9}} = \frac{0,15}{5 \cdot 10^{-7}} = 3 \cdot 10^{-9} \left[\frac{1}{\text{м}} \right]$$

Для всех прозрачных веществ коэффициент преломления n монотонно возрастает с уменьшением длины волны λ , то есть фиолетовые лучи преломляются сильнее красных (рисунок 14). С учетом наличия дисперсии света при определении D_n и n указывается температура и длина волны, при которой проводилось измерение. Для определенности длины волн выбираются из характеристических спектров излучения некоторых атомов.

Например, показатель преломления дистиллированной воды для желтой линии натрия при 20°C обозначают как $n_D^{20^\circ\text{C}}$, где D – условное обозначение желтой характеристической длины волны излучения (спектральной линии) натрия 589,2 нм.

Таким образом, по показателю преломления, рефракции и дисперсии можно судить о светопреломляющей способности вещества.

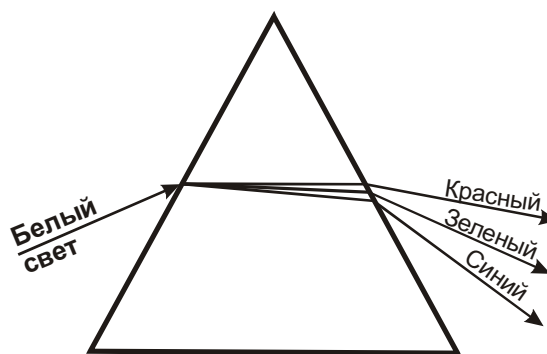


Рисунок 14. Дисперсия света в прозрачной призме. Белый свет расщепляется при выходе из призмы на лучи разного цвета.

Разложение света в диспергирующих призмах используется в **монохроматорах фотометров** для выделения определенной длины волны.

Интерференция света

Интерференция наблюдается при определенных условиях при наложении двух или нескольких световых пучков. Интенсивность света в области перекрытия пучков имеет характер чередующихся светлых и темных полос, причем в максимумах интенсивность больше, а в минимумах меньше суммы интенсивностей пучков. При использовании белого света **интерференционные полосы** оказываются окрашенными в различные цвета спектра. Рассмотрим две монохроматические когерентные световые волны, распространяющиеся независимо друг от друга из двух точек S_1 и S_2 и приходящих в точку наблюдения P (рисунок 15). Расстояния от точки P до точек S_1 и S_2 равны соответственно r_1 и r_2 .

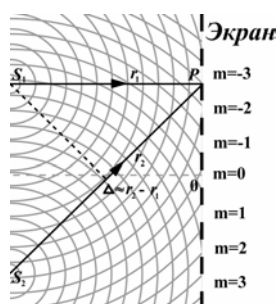


Рис. 15. Явление интерференции при наложении двух монохроматических когерентных световых волн

Для простоты предположим, что обе волны имеют одинаковую амплитуду. Тогда в точке P каждая из них создаст напряженность электрического поля E_1 и E_2 :

$$E_1 = A \cos\left(\frac{2\pi}{\lambda} r_1\right) \text{ и } E_2 = A \cos\left(\frac{2\pi}{\lambda} r_2\right)$$

Фазы колебаний, создаваемых волнами от источников S_1 и S_2 в точке P , различны.

Интерференция световых волн заключается в сложении колебаний частот с разными фазами:

$$E = E_1 + E_2 = A \cos\left(\frac{2\pi}{\lambda} r_1\right) + A \cos\left(\frac{2\pi}{\lambda} r_2\right)$$

Утверждение о том, что волны от источников S_1 и S_2 распространяются независимо друг от друга, а в точке наблюдения они просто складываются, является опытным фактом и носит название **принципа суперпозиции**.

До настоящего времени не существует приборов, которые способны были бы следить за быстрыми изменениями поля световой волны в оптическом диапазоне. **Наблюдаемой величиной является поток энергии, который прямо пропорционален квадрату амплитуды электрического поля волны.**

Физическую величину, равную квадрату амплитуды электрического поля волны, принято называть **интенсивностью светового потока**: $I = E^2$. Для суперпозиции двух волн получим:

$$I_p = 2A^2 \left(1 + \cos 2\pi \frac{r_1 - r_2}{\lambda}\right) = 2I \left(1 + \cos 2\pi \frac{r_1 - r_2}{\lambda}\right).$$

Таким образом, интенсивность светового потока в точке Р зависит от отношения разности хода световых волн $\Delta = r_1 - r_2$ к длине волны λ . Интерференционный максимум (светлая полоса) достигается в тех точках пространства, в которых $\Delta = m\lambda$ ($m = 0, \pm 1, \pm 2, \dots$). При этом $I_{\max} = 4I$. Интерференционный минимум (темная полоса) достигается при $\Delta = m\lambda + \lambda/2$. Минимальное значение интенсивности $I_{\min} = 0$.

На рисунке 16 показано распределение интенсивности света в интерференционной картине в зависимости от разности хода Δ .

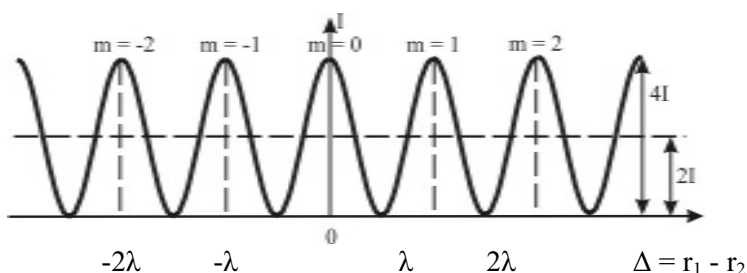


Рис. 16. Распределение интенсивности света в интерференционной картине в зависимости от разности хода Δ .

Интерференция в тонких пленках.

Явление интерференции часто можно наблюдать в масляных или бензиновых пленках на воде или стекле (рисунок 17).

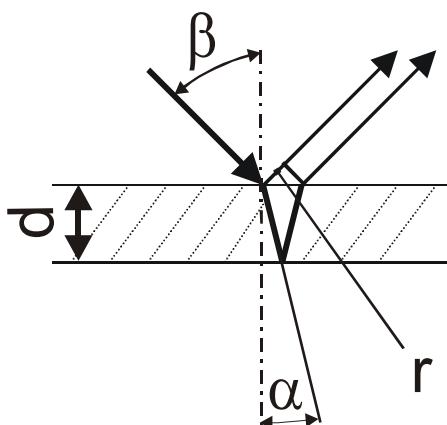


Рис. 17. Ход лучей в тонком слое полупрозрачного вещества.

Белый свет, падая на пленку, частично отражается, частично проникает в пленку и, отразившись от нижнего слоя пленки, выходит из нее. **Лучи отраженного света являются когерентными**, так как они происходят от одного входного луча, но имеют разность фаз определяемой толщиной пленки, углом падения и длиной волны света:

$$\Delta = 2dn \cos \alpha + \frac{\lambda}{2}.$$

Наблюдая масляную пленку в ситуации, когда условия интерференции выполняются для различных длин волн цветовой гаммы, можно видеть радужную окраску пятна.

Интерференционный светофильтр

Явление интерференции широко используется в оптической технике, в частности, для изготовления интерференционных светофильтров. Интерференционный светофильтр состоит из нескольких последовательно расположенных тончайших непоглощающих слоев из диэлектрических материалов – окислов Al_2O_3 , SiO_2 , TiO_2 ; фторидов MgF_2 , CaF_2 , LiF ; сульфидов ZnS , CdS и других соединений. Эти слои могут быть образованы на массивной подложке из стекла, кварца методом вакуумного напыления. Два внешних слоя могут изготавливаться из металлов и служат полупрозрачными зеркалами (рисунок 18).

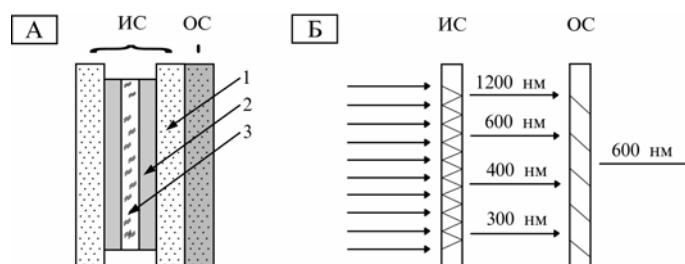


Рис. 18. А – устройство интерференционного светофильтра: ИС – интерференционная система; ОС – отрезающая система; 1 – стеклянные плоскопараллельные пластинки; 2 – полупрозрачные металлические слои; 3 – диэлектрические слои.

Б. – Преобразование белого света интерференционным светофильтром с рабочей длиной волны 600 нм (это вторая гармоника основного колебания $\lambda_0 = 1200$ нм).

При прохождении белого света через такую систему с многочисленными границами раздела свет многократно переотражается. В результате интерференции отраженных лучей с проходящими лучами (отраженные и проходящие лучи когерентны) часть светового потока ослабляется лишь незначительно, а часть - в 10^3 - 10^6 раз. Толщина слоев подбирается равной $\frac{\lambda_0}{2}$ для основной частоты колебаний (в 2-3 раза меньшей рабочей частоты светофильтра), что обеспечивает выделение из белого света излучения с гармониками $\frac{\lambda_0}{n} \pm \Delta\lambda$, где n – номер гармоники.

$2\Delta\lambda$ – это полоса пропускания фильтра, она тем меньше, чем больше слоев имеет светофильтр (рисунок 19).

Отрезающая система (ОС) предназначена для подавления всех частот, кроме рабочей, она может быть выполнена из цветных стеклянных фильтров или специальной интерференционной системы.

Технически достижимо изготовить светофильтры с полосой пропускания до 1 нм. В клинической биохимии используются, как правило, светофильтры со стандартной полосой пропускания 10 ± 2 нм. Светофильтры используются в фотометрах в качестве **монохроматоров**.

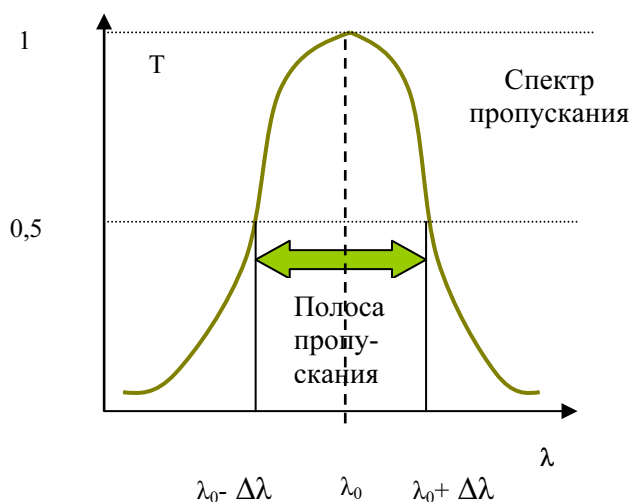


Рис. 19. Полоса пропускания светофильтра.

Дифракция света.

Дифракция света – это отклонение света от прямолинейного распространения, когда свет огибает контур непрозрачных тел и, следовательно, проникает в область геометрической тени. Дифракция является проявлением волновых свойств света (рисунок 20).

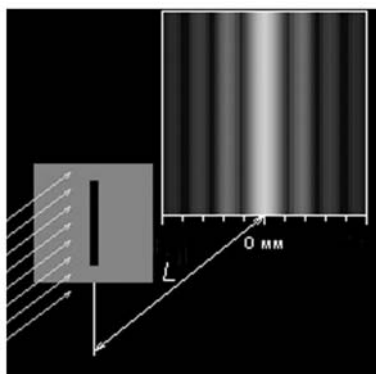


Рис. 20. Дифракция пучка света на узкой щели. На экране в области геометрической тени образуются светлые полосы. Изображение щели размыто.

Если на щель падает световая волна, то, фокусируя линзой свет, прошедший через щель, можно наблюдать чередование максимумов и минимумов освещенности. Если свет падает не на одну щель, а на ряд параллельных щелей (решетку), то пучки, испытав дифракцию на каждой щели, интерферируют между собой.

Простейшая дифракционная решетка состоит из прозрачных участков (щелей), разделенных непрозрачными промежутками. На решетку направляется параллельный пучок света. Наблюдение ведется на непрозрачном экране в фокальной плоскости линзы, установленной за решеткой (рисунок 21).

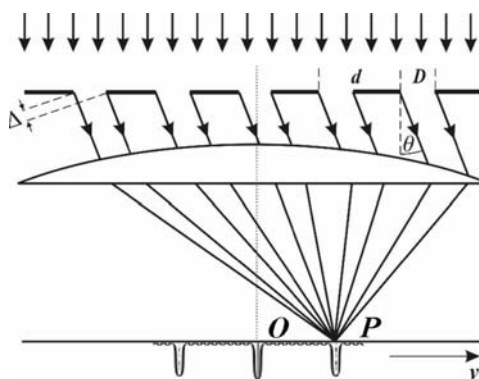


Рис. 21. Дифракция света на решетке.

В каждой точке P на экране в фокальной плоскости линзы соберутся лучи, которые до линзы были параллельны между собой и отклонились на решетке под определенным углом θ . Для того, чтобы в точке P наблюдался интерференционный максимум, разность хода Δ между волнами, испущенными соседними щелями, должна быть равна целому числу длин волн:

$$\Delta = d \sin \theta_m = m\lambda \quad (m = 0, \pm 1, \pm 2, \dots),$$

где d – период решетки, m – целое число, которое называется *порядком дифракционного максимума*. В тех точках фокальной плоскости линзы, для которых это условие выполнено, располагаются *главные максимумы* дифракционной картины.

В каждой точке фокальной плоскости происходит интерференция N волн, приходящих в эту точку от N щелей решетки. В главные максимумы все волны приходят в фазе, потому амплитуда колебаний возрастает в N раз, а интенсивность в N^2 раз по сравнению с колебанием, которое возбуждает волна от одной щели.

Главные максимумы при дифракции света на решетке чрезвычайно узки. Рисунок 22 дает представление о том, как меняется острота главных максимумов при увеличении числа щелей решетки.

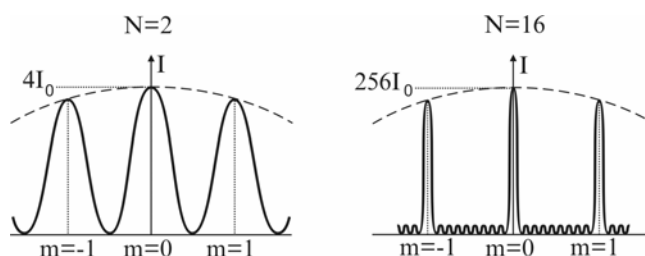


Рис. 22. Распределение интенсивности при дифракции монохроматического света на решетках с различным числом щелей. I_0 – интенсивность колебаний при дифракции света на одной щели.

Решетка способна разлагать излучение в спектр, то есть она является **спектральным прибором – составной частью монохроматоров (устройств для выделения монохроматического света)**. Если на решетку падает некогерентное излучение, то в каждом порядке дифракции (то есть при каждом значении m) возникает спектр исследуемого излучения. На рисунке 23 изображены спектры различных порядков для белого света.

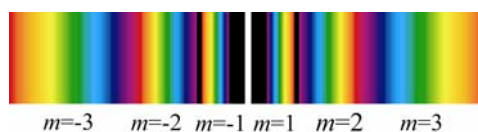


Рис. 23. Разложение белого света в спектр с помощью дифракционной решетки.

Одной из важнейших характеристик дифракционной решетки является ее *разрешающая способность*, характеризующая возможность разделения с помощью данной решетки двух

близких спектральных линий с длинами волн λ и $\lambda - \Delta\lambda$. Спектральной разрешающей способностью R называется отношение длины волны λ к минимальному возможному значению $\Delta\lambda$. Разрешение дифракционной решетки зависит только от порядка спектра m и от числа периодов решетки N .

Пусть решетка имеет период $d = 10^{-3}$ мм (1000 периодов на мм), ее длина $L = 10$ см. Тогда, $N = 10^5$ (это хорошая решетка). В спектре 2-го порядка разрешающая способность решетки $R = \frac{\lambda}{\Delta\lambda} = mN$ оказывается равной $R = 2 \cdot 10^5$. Это означает, что минимально разрешимый интервал длин волн в зеленой области спектра ($\lambda = 550$ нм) равен $\Delta\lambda = \lambda / R \approx 2,8 \cdot 10^{-3}$ нм. В этих же условиях предельное разрешение решетки с $d = 10^{-2}$ мм и $L = 2$ см оказалось бы равным $\Delta\lambda = 1,4 \cdot 10^{-1}$ нм, что вполне приемлемо для фотометрических целей.

Поляризация света.

Двойное лучепреломление.

Во многих кристаллических веществах показатели преломления различны для двух волн имеющих взаимно перпендикулярные направления векторов напряженности электрического поля E (для двух поляризаций электромагнитных волн). Поэтому такие кристаллы раздваивают проходящие через них лучи (рисунок 24). Два луча на выходе кристалла линейно поляризованы во взаимно перпендикулярных направлениях. Кристаллы, в которых происходит **двойное лучепреломление**, называются **анизотропными**. Еще в конце XVII века было обнаружено, что кристалл исландского шпата (CaCO_3) раздваивает проходящие через него лучи.

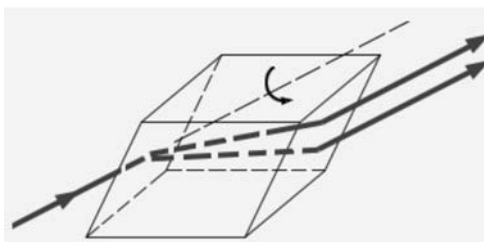


Рис. 24. **Двойное лучепреломление для световых волн**, имеющих взаимно перпендикулярные направления векторов напряженности электрического поля при прохождении света через кристалл исландского шпата. Если кристалл поворачивать относительно направления первоначального луча, что поворачиваются оба луча, прошедшие через кристалл.

Поляризацией света называется выделение из пучка естественного света лучей, поляризованных в определенной плоскости. В источниках света элементарные процессы излучения света атомами происходят независимым образом, поэтому в обычном свете оси электромагнитных волн ориентированы хаотично и свет, испускаемый обычными источниками (солнечный свет, излучение ламп накаливания и т.п.), **неполяризован**. **Неполяризованный свет** называют также **естественным светом**.

При прохождении света через многие кристаллы поглощение света сильно зависит от направления электрического вектора в световой волне. Это явление называют **дихроизмом**. Этим свойством, в частности, обладают пластины турмалина. При определенной толщине пластинка турмалина почти полностью поглощает одну из взаимно перпендикулярно поляризованных волн и частично пропускает вторую волну. Направление колебаний электрического вектора в прошедшей волне называется **разрешенным направлением** пластинки. Пластинка турмалина может быть использована как для получения поляризованного света, так и для анализа характера поляризации света (**поляризатор** и **анализатор**).

Если пропустить свет последовательно через две одинаковые пластинки из турмалина (прозрачное кристаллическое вещество зеленоватой окраски), поворачивающиеся друг относительно друга на угол φ (рисунок 25), то интенсивность прошедшего света окажется прямо пропорциональной $\cos^2\varphi$:

$$I \sim \cos^2\varphi \quad (\text{закон Малюса}).$$

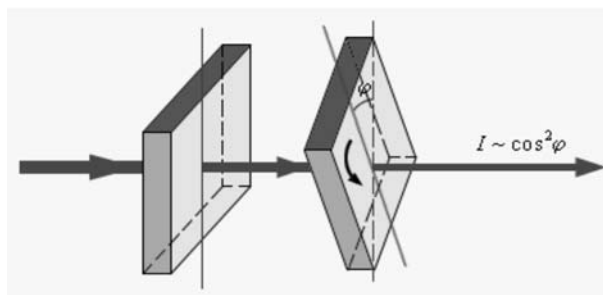


Рис. 25. **Поляризация света.** Левая пластинка поляроида, сделанного из турмалина (поляризатор) выделяет электромагнитные колебания с вертикально направленным вектором E . Интенсивность света, прошедшего через правую пластинку (анализатор), зависит от угла поворота анализатора.

Если при распространении электромагнитной волны вектор E сохраняет свою ориентацию, такую волну называют *линейно-поляризованной* или *плоско-поляризованной*. Плоскость, в которой колеблется вектор E называется *плоскостью колебаний* (рисунок 26), а плоскость, в которой совершает колебание магнитный вектор B - *плоскостью поляризации*.

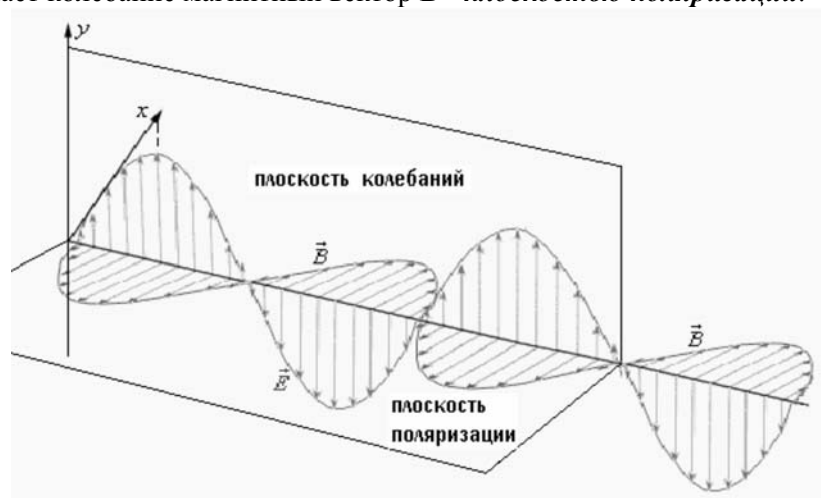


Рис. 26. **Плоскополяризованная световая волна**

Если вдоль одного и того же направления распространяются две монохроматические волны, поляризованные в двух взаимно перпендикулярных плоскостях, то в результате их сложения в общем случае возникает *эллиптически-поляризованная волна* (рисунок 27).

В эллиптически-поляризованной волне в любой плоскости P , перпендикулярной направлению распространения волны, конец результирующего вектора E за один период светового колебания обегает эллипс, который называется *эллипсом поляризации*. Форма и размер эллипса поляризации определяются амплитудами a_x и a_y линейно-поляризованных волн и фазовым сдвигом $\Delta\varphi$ между ними. Частным случаем эллиптически-поляризованной волны является волна с *круговой поляризацией* ($a_x = a_y$, $\Delta\varphi = \pm \pi/2$).

Рисунок 27 дает представление о пространственной структуре эллиптически-поляризованной волны.

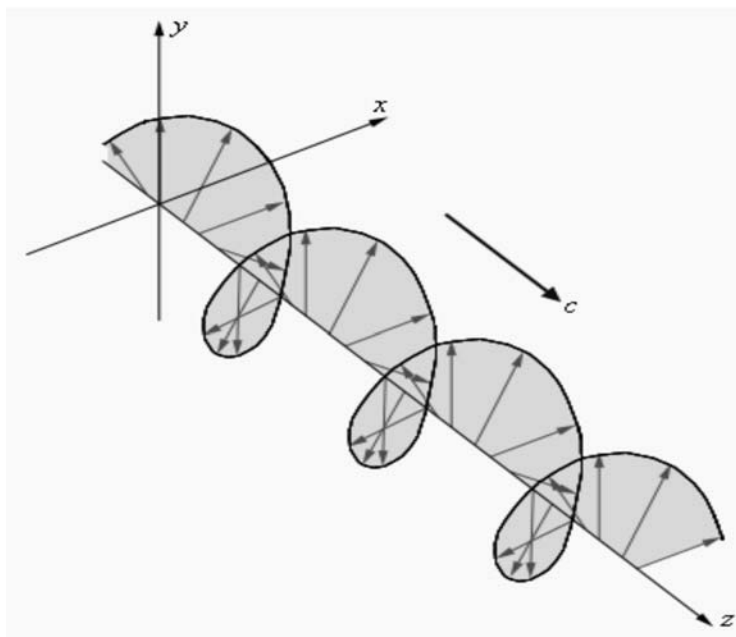


Рис. 27. Электрическое поле в эллиптически поляризованной волне.

Линейно поляризованный свет испускается лазерными источниками определенной конструкции. Свет может оказаться поляризованным при отражении или рассеянии. В частности, голубой свет от неба частично или полностью поляризован. Любую волну (поляризованную и неполяризованную) можно представить как суперпозицию двух линейно-поляризованных во взаимно перпендикулярных направлениях волн:

Поляриметрия.

Вещества, способные изменять (вращать) плоскость поляризации света, являются *оптически активными* веществами; вещества, не способные изменять плоскость поляризации света являются *оптически неактивными*.

Поляриметрический метод анализа основан на измерении угла вращения плоскости поляризации луча света, прошедшего через оптически активную среду, которая помещается между поляризатором и анализатором (см. рисунок 25).

Оптическая активность веществ обуславливается двумя факторами: а) особенностью кристаллической решетки вещества и б) особенностями строения молекулы вещества.

Первой особенностью обладают твердые вещества – кристаллы, например, кварц, хлорид натрия и другие.

Вторая особенность свойственна многим растворам, главным образом, органических веществ: глюкозы, винной кислоты, морфина и другим.

Так молекула глюкозы, также как и других гексоз, асимметрична по расположению гидроксильной группы (-ОН) в последнем положении перед группой -CH₂ОН (рис.28), поэтому сахара имеют стереоизомеры. Аббревиатура D- или L- отражает позицию гидроксильной; D-изомеры записываются с расположением гидроксильной группы справа, L-изомеры - слева от атома углерода. В организме человека сахара представлены в основном D-изоформами, именно к этой изоформе специфичны ферментные системы и транспортные белки, переносчики углеводов через клеточную мембрану.

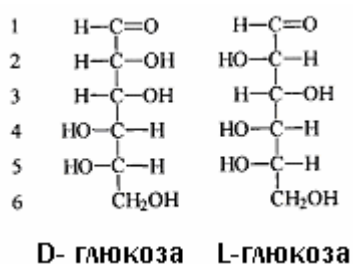


Рисунок 28.

Структурная формула стереоизомеров глюкозы.
Оптически активным является 2 атом углерода

D- и L-изоформы сахаров имеют асимметричные атомы углерода, связанные с разными группировками, поэтому обладают способностью вращать плоскость поляризованного луча. На этом основано определение D-глюкозы в моче с помощью поляриметра. Угол вращения плоскости поляризации зависит от оптической толщины раствора и концентрации глюкозы в растворе.

Поляриметр.

Основной частью любого прибора для поляриметрического анализа является источник поляризованных лучей (поляризатор) и измеритель угла поляризации (анализатор). В качестве поляризаторов и анализаторов используется специальная *призма Николя*, изготавливаемая из исландского шпата и называемая кратко *николь*.

На рисунке 29 приведена схема простейшего поляриметра.

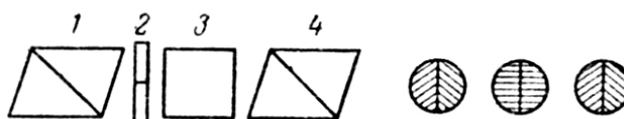


Рис. 29. **Схема простейшего поляриметра.** 1 - поляризатор; 2 – пластинка бикварца; 3 – кювета с раствором; 4 – анализатор.

При использовании простейшего поляриметра анализатор настраивают на «темноту», вращая его вокруг продольной оси. Затем вносят в прибор кювету с исследуемой жидкостью. При этом наблюдается просветление поля окуляра вследствие вращения плоскости поляризации раствором. Поворачивая анализатор, добиваются нового потемнения поля, причем угол поворота анализатора соответствует углу вращения раствором плоскости поляризации. Для более точного определения момента затемнения поля окуляра применяют дополнительную пластинку 2, состоящую из двух пластинок левовращающего и правовращающего кварца (так называемая пластинка *бикварца*).

Если николи взаимно параллельны (свет проходит полностью), то пластинка бикварца окрашена в серовато-фиолетовый цвет. При малейшем повороте анализатора обе половинки бикварца меняют свою окраску: одна становится синей, а другая – красной. Таким образом фиксируется малейший поворот анализатора.

Угол вращения β плоскости поляризации зависит от толщины слоя b , концентрации раствора C и удельного вращения плоскости поляризации α – характеристического свойства оптически активного вещества:

$$\beta = \alpha b C.$$

Для концентрации это выражение преобразуется к виду:

$$C = \frac{\beta}{\alpha b}.$$

В качестве примера поляриметра можно привести измеритель глюкозы поляриметрический ИПГ-01. Прибор предназначен для измерения содержания глюкозы и следов фруктозы в моче при обследованиях населения в лечебных учреждениях и в быту для контроля состояния больных сахарным диабетом. Он также может применяться для измерения концентрации сахара, глюкозы,

фруктозы, камфоры, винной кислоты, никотина, кодеина, мальтозы, ментола, адреналина и других оптически активных веществ в растворах пищевых продуктов, лекарствах, свекловичном соке, фруктовых соках, сиропах, различных химических веществах.

Рассеяние света. Мутные среды.

Если поместить мутный раствор в кювету фотометрического прибора, то световой поток, проходя через кювету, будет поглощаться (если раствор окрашен), частично проходить через кювету, не изменяя направления (трансмиссия), частично рассеиваться, изменяя свое направление, отклоняясь под различными углами (рассеивание). Трансмиссия и рассеяние света зависят от длины волны светового потока, его частоты, интенсивности, а также от свойства рассеивающей среды: размера частиц, их формы, количества, способности к поляризации и др. Если в процессе измерения размер частиц в растворе будет меняться (например, в результате взаимодействия антиген-антитело), то будет соответственно меняться поток проходящего и интенсивность рассеянного света.

Определение светорассеивания.

Характер (тип) рассеивания зависит от соотношения длины волны света (λ) и диаметра частицы, на которой происходит рассеивание (рис.36). Если размер частиц рассеивающей реакционной смеси значительно меньше длины волны светового потока, проходящего через кювету (диаметр частиц $< \lambda/10$), такой вид рассеяния называют упругим.

Интенсивность потока рассеиваемого небольшими частицами подчиняется уравнению Релея:

$$I_r = I_0 \cdot \frac{n_1^2 - n^2}{(n_1^2 + 2n^2)} \cdot \frac{NV^2}{\lambda^4 d^2} \cdot (1 + \cos^2 \beta),$$

где I_r и I_0 соответственно интенсивность рассеянного и падающего света, n_1 и n – коэффициенты преломления частиц и среды; N – общее число частиц; V – объем частиц; λ – длина волны падающего света; d – расстояние до наблюдателя; β – угол, образованный падающим и рассеянным светом.

При лабораторных исследованиях величины V , n_1 , n , λ , d и β известны и постоянны для исследуемого вещества, а $N = C \cdot b$; здесь C – концентрация вещества, b – толщина раствора (также известная величина). Поэтому для определенного угла β формула Релея примет вид:

$$\frac{I_r}{I_0} = k \cdot C, \text{ где все известные параметры объединены в коэффициент } k.$$

В основе рассеяния на малых частицах лежит явление дифракции. Рассеивание света каждой частицей не зависит друг от друга, рассеянный свет распространяется во всех направлениях, однако максимальное количество света рассеивается под углом 0 и 180 градусов к лучу, падающему на частицу (рис. 30А). При длине волны 400 нм такой тип рассеивания будет характерен для частиц диаметром менее 40 нм. К таким частицам в плазме крови относятся многие плазменные белки, в том числе иммуноглобулины, β -липопротеиды, альбумин и т.д. При увеличении размеров частиц (для плазменных белков размер в диапазоне от ~ 40 до 400 нм) рассеивание становится несимметричным и максимальное количество света рассеивается в направлении падающего луча (рис 30Б). Такой тип рассеивания будет характерен при λ 400 нм для IgM, хиломикрон и формирующихся комплексов антигенов с иммуноглобулинами. Когда размер частиц превышает длину волны света (в нашем примере диаметр больше 400 нм) несимметричность светорассеяния еще больше увеличивается (рис 30В). Такой тип рассеивания будет характерен для взвеси бактерий, для клеток крови (тромбоцитов, эритроцитов) и других крупных частиц. Интенсивность рассеяния света определяется средним числом рассеивающих частиц в единице.

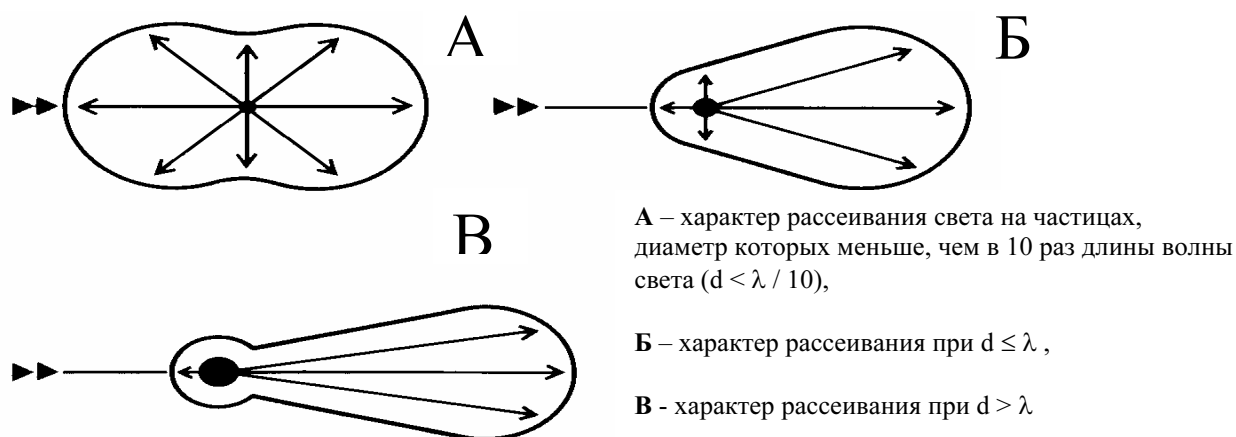


Рис. 30. Характер рассеивания света в зависимости от соотношения диаметра рассеивающих частиц и длины волны падающего света

Нефелометрия - измерение рассеянного света.

Сравнивая величины рассеянного и падающего света I_r и I_0 можно определять концентрацию веществ в растворе. Такой метод исследования называется **нефелометрией**, а приборы, на которых производят измерения – **нефелометрами**.

На рисунке 31 представлена принципиальная схема измерения рассеянного света. Измерение светорассеивания под разными углами (как правило, используются измерение малоуглового рассеивания) дает информацию о размерах частиц в растворе. В то же время, если известны размеры частиц рассеивающего вещества, то возможно по интенсивности рассеянного света при фиксированном угле измерения определить концентрацию вещества. Методы, основанные на взаимодействии антиген-антитело, высоко специфичны, поэтому практически во всех случаях известно, что измеряется. Исходя из этого, приборы для нефелометрии, как правило, программируются под измерение определенных специфических компонентов биологической жидкости, чаще всего индивидуальных белков.

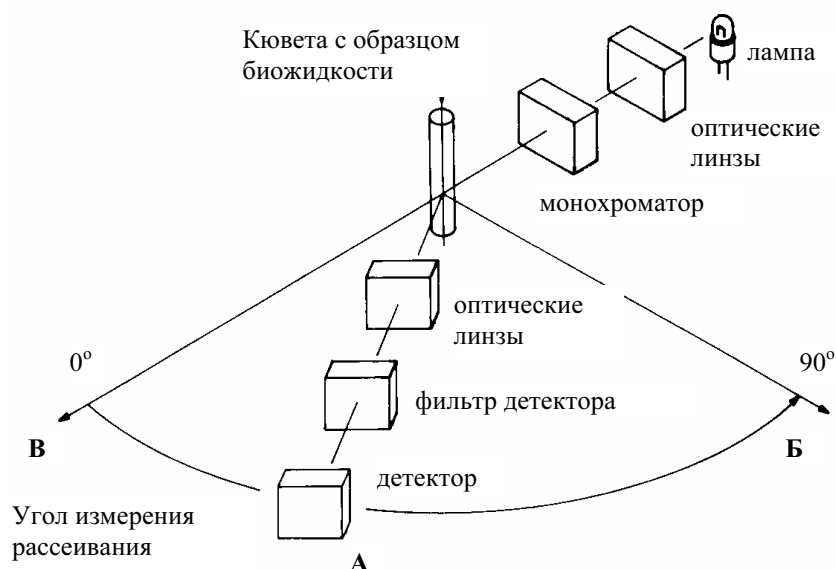


Рис. 31. Схема измерения рассеянного света.

А - нефелометр, регистрирующий малоугловое рассеивание,
 Б - нефелометр, регистрирующий рассеивание под углом 90°.
 В - турбидиметр

На рис. 32 изображена принципиальная схема отечественного нефелометра НФМ.

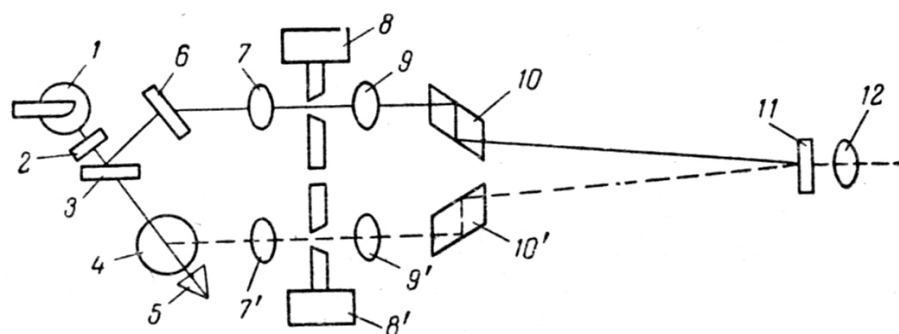


Рис. 32. **Оптическая схема нефелометра НФМ.** 1 - лампа; 2, 11 – светофильтры; 3 – стеклянная пластинка, разделяющая свет на 2 пучка; 4 – кювета с раствором исследуемого вещества; 5 – ловушка света; 6 – стеклянный рассеиватель; 7, 7', 9, 9' – линзы, 8, 8' – уравнивательные диафрагмы; 10, 10' – ромбические призмы; 12 – окуляр.

Свет от лампы разделяется на 2 пучка – один пучок проходит через раствор исследуемого вещества, другой через канал сравнения. В окуляре видны 2 поля – одно измерительного канала, второе – канала сравнения. Изменяя ширину щели, добиваются равной освещенности полей. Результат получают по калибровочным кривым, связывающим ширину щели и концентрацию вещества. В последнее время в нефелометрах вместо обычных ламп используют лазерные источники излучения. Лазер имеет высокую интенсивность излучения, строгую направленность излучения и строго фиксированную длину волны излучения, что делает лазерный луч идеальным для нефелометрических измерений.

Турбидиметрия - измерение прошедшего света.

Метод исследования светорассеивающих растворов по прошедшему через них свету называется **турбидиметрией**. Для измерения световых потоков используются турбидиметры, построенные по принципу визуальных или электрических **фотометров**.

При турбидиметрических исследованиях интенсивность прошедшего светового потока I_t может быть определена по уравнению:

$$\lg \frac{I_t}{I_0} = k \frac{Cbd^3}{d^4 + \alpha\lambda^4},$$

где I_0 – интенсивность падающего светового потока; I_t – интенсивность потока, прошедшего через раствор; C – концентрация рассеивающих частиц в растворе; b – толщина поглощающего слоя раствора; d – средний диаметр рассеивающих частиц; k и α – константы, зависящие от природы вещества и метода измерения; λ – длина волны.

При постоянных b , d , k , α и λ получим:

$$\lg \frac{I_t}{I_0} = tC \text{ или } I_t = I_0 \cdot 10^{-tC}$$

- выражение, подобное закону Бугера-Ламберта-Бера для окрашенных прозрачных растворов. Здесь t – молярный коэффициент **мутности** раствора или **турбидиметрия**.

Таким образом, интенсивность пучка (плотность потока) параллельных лучей света при прохождении через кювету вследствие поглощения меняется по экспоненциальному закону. При турбидиметрии проводится измерение прошедшего светового пучка, также как измеряется и абсорбция при фотометрии (рисунок 33). Поэтому в **качестве турбидиметра можно использовать большинство фотометров и биохимических анализаторов**, так как этот способ не требует особой конструкции прибора.

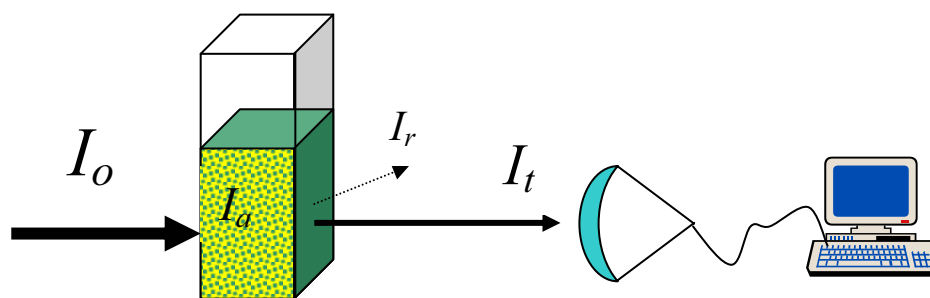


Рис. 33.
Турбидиметрия – метод измерения прошедшего через кювету светового потока.

Обычно при турбидиметрических исследованиях используются короткие длины волн, как правило, 340 нм. Это связано с тем, что доля рассеянного света увеличивается обратно пропорционально четвертой степени длины волны, соответственно при меньшей длине волны прошедший свет будет составлять большую часть от падающего, то есть будет более интенсивным. В то же время оптические системы, как правило, уверенно работают в ближнем ультрафиолете при 340 нм, в более дальнем ультрафиолетовом диапазоне необходимо использовать специальную оптику.

ПОГЛОЩЕНИЕ И ИЗЛУЧЕНИЕ СВЕТА.

При распространении через поглощающую среду электромагнитная волна взаимодействует с веществом, изменяя его энергетическое состояние. Это взаимодействие происходит путем поглощения веществом фотонов – квантов энергии световой волны. Таким образом, при каждом акте поглощения фотона внутренняя энергия вещества увеличивается дискретно – на величину энергии кванта света. Наоборот, при излучении света веществом происходит дискретное уменьшение внутренней энергии вещества. Поглощение света некоторыми твердыми веществами приводит к фотоэлектрическим явлениям, это позволяет достаточно просто регистрировать световые потоки и измерять их параметры. Дискретность обмена энергии обусловлена строением атомов вещества, его молекулярной структуры. Дискретную структуру энергетических состояний атомов впервые описал Бор, выдвинувший два постулата, которые легли в основу квантовой теории строения вещества.

Квантовые постулаты Бора.

Первый постулат Бора (постулат стационарных состояний): атомная система может находиться только в особых *стационарных* или *квантовых* состояниях, каждому из которых соответствует определенная энергия E_n . В стационарных состояниях атом не излучает.

Согласно этому постулату Бора, атом характеризуется системой *энергетических уровней*, каждый из которых соответствует определенному стационарному состоянию (рисунок 34). Механическая энергия электрона, движущегося по замкнутой траектории вокруг положительно заряженного ядра, отрицательна. Поэтому всем стационарным состояниям соответствуют значения энергии $E_n < 0$. При $E_n \geq 0$ электрон удаляется от ядра (ионизация). Величина $|E_1|$ называется *энергией ионизации*. Состояние с энергией E_1 называется *основным состоянием* атома.

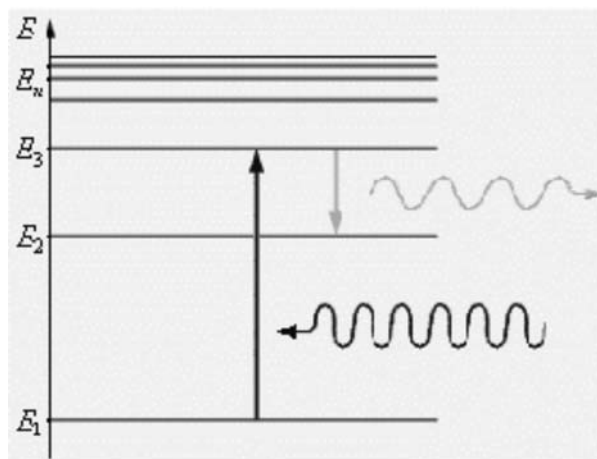


Рис. 34. Энергетические уровни атома и условное изображение процессов поглощения и испускания фотонов.

Второй постулат Бора (правило частот): при переходе атома из одного стационарного состояния с энергией E_n в другое стационарное состояние с энергией $E_m < E_n$ излучается квант, энергия которого равна разности энергий стационарных состояний:

$$h\nu_{nm} = E_n - E_m,$$

где h – постоянная Планка. Отсюда можно выразить частоту излучения:

$$\nu_{nm} = \frac{E_n - E_m}{h}.$$

Если же $E_m > E_n$, то при таком переходе электрона атом поглощает такой же по величине квант энергии.

Линейчатые спектры атомов.

Простейший из атомов, атом водорода содержит единственный электрон. Ядром атома является **протон** – положительно заряженная частица, заряд которой равен по модулю заряду электрона, а масса в 1836 раз превышает массу электрона. Еще в начале XIX века были открыты дискретные спектральные линии в излучении атома водорода в видимой области (так называемый **линейчатый спектр**). Совокупность спектральных линий атома водорода в видимой части спектра была названа **серией Бальмера**. Позже аналогичные серии спектральных линий были обнаружены в ультрафиолетовой и инфракрасной частях спектра. Согласно второму постулату Бора, при переходе электрона с одной стационарной орбиты с энергией E_n на другую стационарную орбиту с энергией $E_m < E_n$ атом испускает квант света, частота ν_{nm} которого равна $\Delta E_{nm} / h$:

$$\nu_{nm} = R \left(\frac{1}{m^2} - \frac{1}{n^2} \right).$$

Чтобы электрон перешел из состояния с низкой энергией E_m в состояние с высокой энергией $E_n : E_m < E_n$, он должен поглотить квант света с частотой ν_{nm} , энергия которого также равна:

$$\nu_{nm} = R \left(\frac{1}{m^2} - \frac{1}{n^2} \right).$$

Таким образом, переход атома из одного энергетического состояния в другое сопровождается либо высвобождением энергии (излучение), либо поглощением энергии.

Рисунок 35 иллюстрирует образование спектральных серий в излучении атома водорода при переходе электрона с высоких стационарных орбит на более низкие.

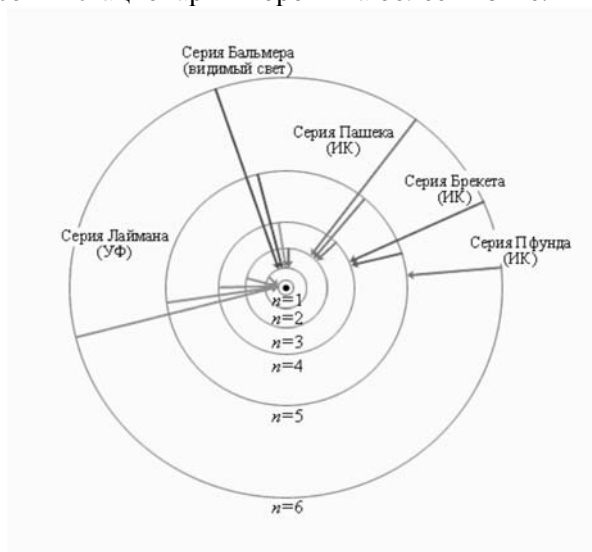


Рис. 35. Стационарные орбиты атома водорода и образование спектральных серий.

На рисунке 36 изображена диаграмма энергетических уровней атома водорода и указаны переходы, соответствующие различным спектральным сериям.



Рис. 36. Диаграмма энергетических уровней атома водорода.

Показаны переходы, соответствующие различным спектральным сериям. Для первых пяти линий серии Бальмера в видимой части спектра указаны длины волн.

Линейчатыми спектрами излучения (и поглощения) обладают все вещества в газообразном атомарном (но не молекулярном) состоянии, причем каждое вещество обладает неповторимым расположением спектральных линий (рисунок 37). В этом случае свет излучают атомы, которые практически не взаимодействуют друг с другом. Это самый фундаментальный, основной тип спектров. Поэтому атомарные спектры используются как эталоны длин волн при спектральной калибровке спектрофотометров и при определении дисперсии и показателя преломления различных веществ (таблица 4). Обычно для наблюдения линейчатых спектров используют свечение паров вещества в пламени или свечение газового разряда в трубке, наполненной исследуемым газом.

При увеличении плотности атомарного газа отдельные спектральные линии расширяются (так как при сближении атомов энергетические уровни «расщепляются», принимая близкие к основному уровню значения) и при очень большой плотности газа, когда взаимодействие атомов становится существенным, эти линии перекрывают друг друга, образуя непрерывный спектр.

Таблица 4.

Обозначения и длины волн спектральных линий при определении дисперсии и показателя преломления различных веществ		
Спектральная линия элемента	Условное обозначение	Длина волны, нм
УФ-линия ртути	i	365,1
Фиолетовая линия ртути	h	404,6
Синяя линия ртути	g	435,8
Синяя линия кадмия	F'	479,9
Синяя линия водорода	F	486,1
Зеленая линия ртути	e	546,0
Желтая линия гелия	d	587,5
Желтая линия натрия	D	589,2
Красная линия кадмия	C'	643,8
Красная линия водорода	C	659,2
Красная линия гелия	r	706,5
ИК-линия цезия	S	852,1
ИК-линия ртути	t	1013,9

Спектр излучения ртутной газоразрядной лампы.

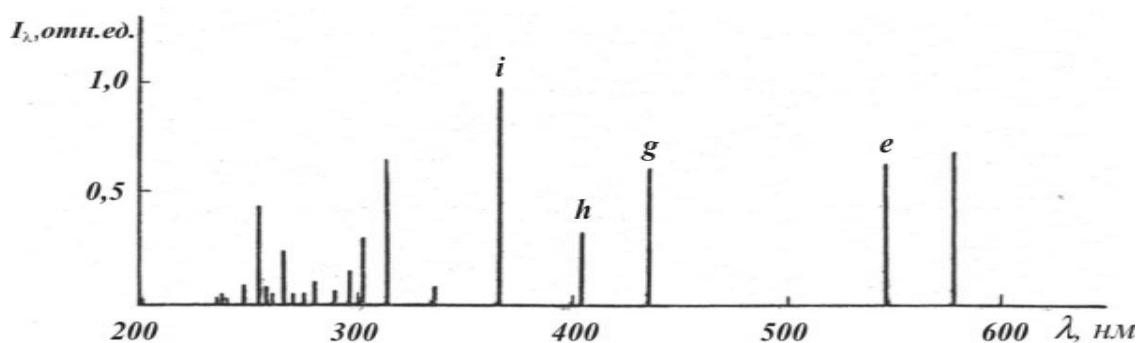


Рис. 37. Линейчатый спектр ртутной газоразрядной лампы.

Спектральный анализ

Линейчатые спектры играют особо важную роль, так как их структура прямо связана со строением атома. Эти спектры создаются атомами, не испытывающими внешних воздействий. Главное свойство линейчатых спектров состоит в том, что *длины волн (или частоты) линейчатого спектра вещества зависят только от свойств атомов этого вещества и не зависят от способа возбуждения свечения атомов*. Атомы любого химического элемента дают спектр, не похожий на спектры всех других элементов: они способны излучать строго определенный набор длин волн.

На этом основан *спектральный анализ* - метод определения химического состава вещества по его спектру. С помощью спектрального анализа можно обнаружить данный элемент в составе сложного вещества, если даже его масса не превышает 10^{-10} М. Это очень чувствительный метод. Изучают спектры с помощью **спектрометров**.

Количественный анализ состава вещества по его спектру затруднен, так как яркость спектральных линий зависит не только от массы вещества, но и от способа возбуждения свечения. Так, при низких температурах многие спектральные линии вообще не появляются. Однако при соблюдении стандартных условий возбуждения свечения можно проводить и количественный спектральный

анализ.

В настоящее время определены спектры всех атомов и составлены таблицы спектров. Благодаря сравнительной простоте и универсальности спектральный анализ является основным методом анализа состава сложных, главным образом органических смесей. Спектральный анализ получил широкое распространение в токсикологии, криминалистической медицине, при исследовании микроэлементов в тканях и жидкостях организма.

Молекулярные спектры.

В молекуле составляющие ее ядра атомов колеблются вдоль соединяющей их прямой линии связи, причем эти колебания специфичны для данного вида молекул; молекула также вращается как целое в пространстве. Вследствие этого вся энергетическая молекулярная система оказывается квантованной в соответствии с тремя основными видами энергии: энергии электронных состояний, энергии колебаний атомов и энергии вращения молекулы.

Колебания ядер вдоль линии связи между атомами называются валентными, при этом расстояние между атомами уменьшается или увеличивается, но сами атомы остаются на оси валентной связи.

Колебания, связанные с изменением торсионного угла между плоскостями отдельных групп атомов в молекуле получили название крутильных или вращательных.

При физиологических температурах колебания атомов в молекулах сопровождаются изменениями длин связей между отдельными атомами на $\pm 0,05 \text{ \AA}$ (ангстрем, равен 10^{-10} см), а угла между связями – на $\pm 5^\circ$.

Полная энергия молекулы $E_{\text{п}}$ записывается в виде:

$$E_{\text{п}} = E_{\text{эл}} + E_{\text{к}} + E_{\text{вр}}$$

Эти три составляющие полной энергии отличаются друг от друга примерно в 10 раз.

При комнатной температуре молекула обычно находится в основном колебательном состоянии.

Энергия, соответствующая различным колебательным уровням, описывается выражением:

$$E_{\text{к}} = \left(V + \frac{1}{2} \right) h \nu_0,$$

где V – колебательное квантовое число, которое может принимать значения 0, 1, 2, 3 и т.д.; ν_0 – характеристическая частота колебания атомов, образующих молекулу.

Вращательная энергия двухатомной молекулы в первом приближении выражается:

$$E_{\text{вр}} = \frac{J(J+1)Ih^2}{8\pi^2},$$

где J – вращательное квантовое число (0, 1, 2, 3 и т.д.); I – момент инерции молекулы.

Соотношения между энергиями, необходимыми для осуществления различных переходов в двухатомной молекуле, показано схематично на рисунке 38.

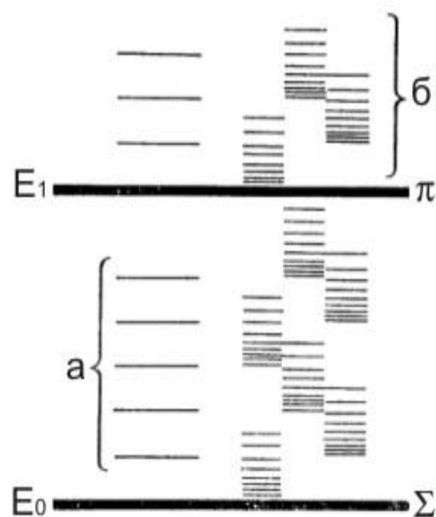


Рисунок 38. Схематическое представление уровней энергии в двухатомной молекуле. E_0 – основное электронное состояние; E_1 – первое возбужденное электронное состояние; а – колебательные уровни атомов; б - вращательные уровни молекулы.

Поскольку для электронного уровня может изменяться колебательное состояние молекулы, т.е. увеличиваться колебательное квантовое число, между двумя основными электронными уровнями (E_0 и E_1) появляется ряд колебательных уровней, которые изображены на левой части рисунка 38. С учетом изменения вращательных состояний каждый из них разбивается на ряд еще более тесных вращательных уровней, которые показаны на правой части рисунка 38. Поглощение небольшого количества энергии, соответствующего, например, броуновскому движению молекул при комнатной температуре или излучению в области СВЧ, может вызвать вращательные переходы без изменения колебательных или электронных состояний.

Для того чтобы вызвать излучение, необходимо сообщить молекуле энергию большую, чем энергия, при которой происходит ее возбуждение (рис. 39).

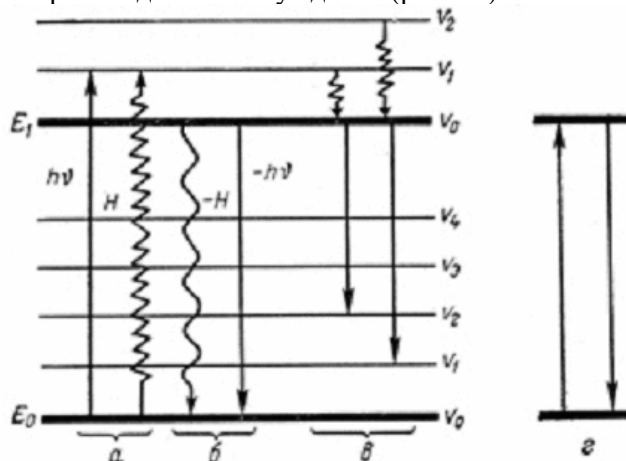


Рис. 39. Поглощение излучения с последующей потерей энергии:

а – переход в возбужденное состояние вследствие поглощения тепла (H) или кванта излучения ($h\nu$); б – излучение в виде кванта излучения ($-h\nu$) или в виде тепла (H); в – переход между близкими энергетическими уровнями не сопровождается излучением; г – резонанс. Колебательные уровни обозначены буквами V_0, V_1 и т.д.

Значения энергий квантовых переходов в молекулах даны в таблице 5.

Таблица 5.

Энергия квантовых переходов в молекулах				
Переход	Излучение	Энергия	Частота, Гц	Длина волны

Ядерный	Гамма-лучи	>120000 эВ, >2760000 ккал/моль	$>3 \times 10^{19}$	$<10^{-2}$
Внутренние электроны атомов	Рентгеновские лучи	$1200-120000$ эВ, $27600-2760000$ ккал/моль	$3 \times 10^{17}-3 \times 10^{19}$	$10^{-2}-1$ нм
Внешние электроны атомов	Ультрафиолетовое излучение	3 эВ – 1200 эВ, $69-27600$ ккал/моль	$7,3 \times 10^{14}-3 \times 10^{17}$	$1-400$ нм
Внешние электроны атомов	Видимый свет	$1,5-3$ эВ, $34-69$ ккал/моль	$3,6 \times 10^{14}-7,3 \times 10^{14}$	$400-800$ нм
Колебания атомов	Инфракрасный свет	$0,124-1,5$ эВ, $5,52-34$ ккал/моль	$2,9 \times 10^{11}-3,6 \times 10^{14}$	$0,8-1000$ мкм
Вращение молекул	Микроволновое излучение	$0,019-5,52$ ккал/моль	$10^9-2,9 \times 10^{11}$	$1-300$ мм
Ядерный спин	Радиоволны	$19-0,19$ ккал/моль	10^7-10^9	$0,3-30$ м

Для молекул, так же как и для отдельных атомов, осуществляется лишь ограниченная часть из полного числа возможных переходов между энергетическими уровнями; вследствие этого были установлены различные «правила отбора», которыми определяются «разрешенные» переходы.

В очень упрощенном виде эти правила можно изложить следующим образом: к разрешенным относятся те переходы, в которых электронное, колебательное и (или) вращательное квантовые числа изменяются на ± 1 .

Полосатый спектр

Полосатый спектр состоит из отдельных полос, разделенных темными промежутками. С помощью очень хорошего спектрального аппарата можно обнаружить, что каждая полоса представляет собой совокупность большого числа очень тесно расположенных линий. В отличие от линейчатых спектров полосатые спектры создаются не атомами, а молекулами, не связанными или слабо связанными друг с другом. Для наблюдения молекулярных спектров так же, как и для наблюдения линейчатых спектров, обычно используют свечение паров в пламени или свечение газового разряда.

Эмиссионная спектроскопия

Неповторимость спектров атомов позволяет изучать состав веществ методом *эмиссионной спектроскопии*. Этот метод заключается в энергетическом возбуждении атомов и наблюдении спектров их излучения с помощью спектрометров (приборов для определения длин волн излучения). Для испарения и возбуждения атомов, содержащихся в твердых телах, очень эффективными средствами являются электрические разряды – электродуговые и электроискровые. Когда в электрическую дугу вводят какое-либо вещество, составляющие его элементы под действием высокой температуры ($3000-8000^\circ\text{K}$) испаряются в плазму дуги и определяют спектр излучения плазмы.

Для определения легковозбудимых элементов используют возбуждение в пламени газовой горелки, а в качестве измерительного устройства служит фотометр.

Разработанные специально для этих целей приборы называются **пламенными фотометрами**.

Пламя особенно удобно использовать для возбуждения металлов, обладающих низким потенциалом ионизации (то есть щелочных металлов). Процедура ввода образца сравнительно проста - растворы можно вводить в пламя в виде аэрозолей. Типичное устройство прибора для эмиссионной фотометрии пламени показано на рисунке 40.

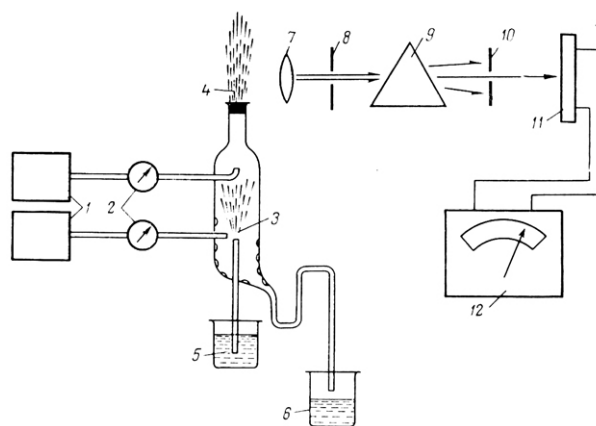


Рис. 40. Принципиальная схема пламенного фотометра. 1 - Цилиндры с топливом и воздухом или кислородом; 2 – клапаны, регулирующие давление и устройства для измерения расхода газов; 3 – распылительная камера; 4 – горелка; 5 – исследуемый раствор; 6 – устройство для осушения распылительной камеры; 7 – фокусирующая линза; 8 – входная щель монохроматора (устройства для разделения сложного спектра на отдельные спектральные линии), 9 – призма, разделяющая свет по длине волны; 10 – выходная щель монохроматора; 11 – фотодетектор; регистрирующее устройство.

Фотометрия.

Способность химического соединения поглощать лучистую энергию определенных длин волн используется при фотометрическом анализе.

Группы атомов, поглощающих кванты света в УФ- и видимой области спектра, называют **хромофорами**. Основными хромофорами в белках являются остатки ароматических аминокислот (фенилаланин, тирозин, триптофан), в нуклеиновых кислотах - пуриновые и пиримидиновые азотистые основания (аденин, гуанин, тимин, цитозин и урацил).

Группы атомов, которые сами не поглощают свет в указанном диапазоне спектра, но при включении в какую-либо хромофорную систему приводят к смещению максимума полосы поглощения и изменению ее интенсивности, называют **ауксохромами**. В белках ауксохромами являются оксо-, amino- и сульфгидрильные группы.

Следует отметить, что образование окрашенных в видимой области спектра соединений необходимо только для методов колориметрического анализа. Применение инструментальных методов позволяет использовать спектры поглощения, лежащие как в ультрафиолетовой, так и в инфракрасной областях спектра.

Фотометрические исследования проводятся на **фотометрах и спектрофотометрах**, с помощью которых измеряют оптические плотности окрашенных растворов исследуемых веществ в спектральном диапазоне поглощения веществ.

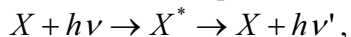
Сплошные спектры изучаются с помощью спектрофотометров.

Люминесценция и флуоресценция.

Излучение света молекулами – **люминесценция** - может происходить при передаче энергии им в различных процессах:

- воздействие потоком электронов (катодными лучами) – катодлюминесценция;
- тепловой нагрев – термолюминесценция;
- химические реакции – хемилюминесценция;
- воздействие электрическим током – электролюминесценция;
- ультразвуковое воздействие – сонолюминесценция;
- воздействие механическим трением - триболлюминесценция;
- облучение ионизирующей радиацией – радиоллюминесценция;
- облучение ультрафиолетовым и видимым светом – фотоллюминесценция или флуоресценция.

Таким образом, флуоресценция является частным случаем люминесценции, когда вторичное свечение объекта вызвано возбуждением световой волной. Возбуждение происходит при большей энергии, то есть при меньшей длине волны, чем вторичное свечение. Поэтому при флуоресценции длина волны свечения больше, чем длина волны возбуждения. Процесс флуоресценции можно представить выражением:



где X и X^* стационарное и возбужденное состояние молекулы, $h\nu$ и $h\nu'$ – квант возбуждающего и вторично излученного света.

По характеру свечения различают **фосфоресценцию** – свечение, продолжающееся относительно долго после прекращения воздействия, и **флуоресценцию** – свечение, происходящее только во время воздействия.

Явление флуоресценции (или флюоресценции) получило свое название от природного минерала – флюорита CaF_2 , у которого оно впервые наблюдалось. Веществами, способными к свечению – **флуорофорами** – являются такие биологические соединения как триптофан, тирозин, фенилаланин, нуклеотиды (НАДН, НАДФ-Н), флавины, порфирины, хлорофиллы, каротиноиды, некоторые витамины, окисленные липиды, белки и другие. В качестве меток при проведении флуоресцентного и люминисцентного анализа часто используются флуорофоры и люминофоры, представленные на рисунке 41.

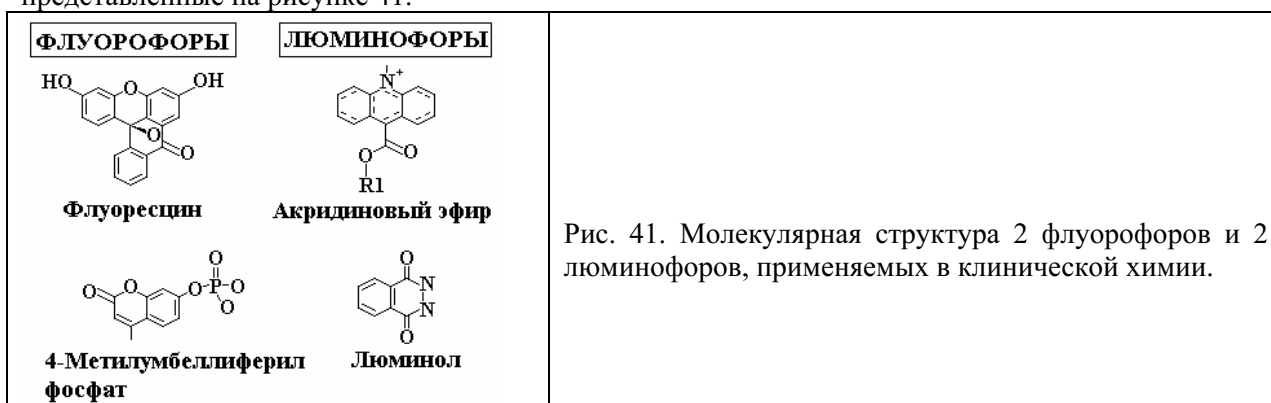


Рисунок 42 иллюстрирует явление флуоресценции.

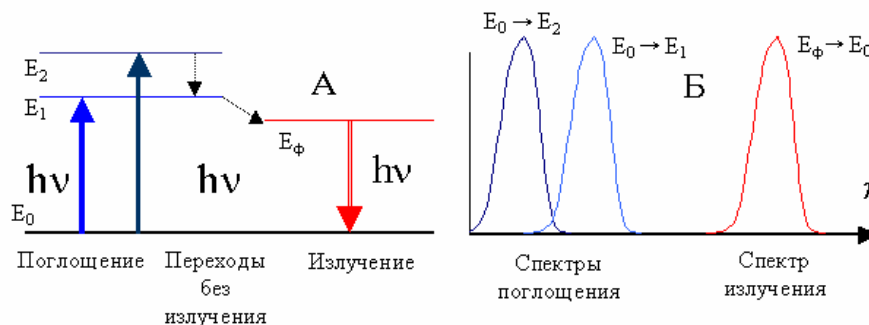
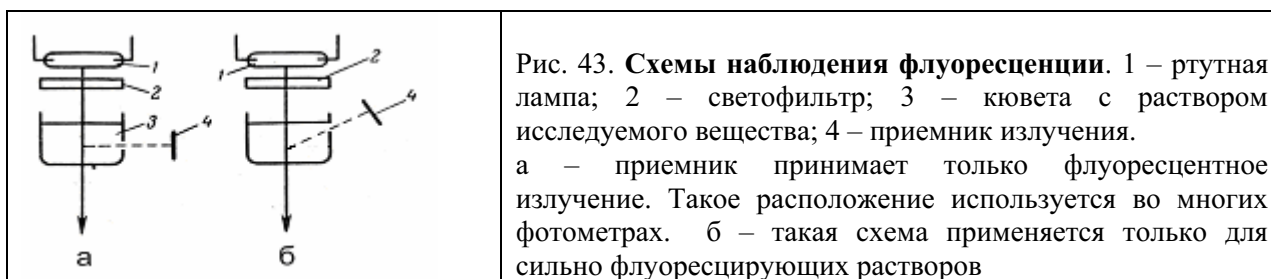


Рис. 42. Энергетические переходы в молекулах при флуоресценции.

А - электронные переходы, соответствующие поглощению света ($E_0 \rightarrow E_1$ и $E_0 \rightarrow E_2$), безизлучательным переходам на нижний возбужденный уровень (E_ϕ) и излучению ($E_\phi \rightarrow E_0$);
Б - Спектральные кривые поглощения и флуоресценции в случае двух возбужденных уровней в молекуле. Излучение происходит с одного E_ϕ уровня.

На рисунке 43 показаны схемы наблюдения флуоресценции. Для фотометрических исследований флуоресценции применяют специализированные фотометры – **флуориметры**, у которых выходная щель из кюветы смонтирована под углом к проходящему свету, согласно принципу, изображенному на рисунке 43. Часто флуориметры объединены в один прибор с фотометрами, так как блок облучения кюветы и система электронной регистрации у них одинаковые.



В люминометрах характерной особенностью является отсутствие источника света, свечение образца индуцируется химической реакцией (хемилюминометры) или любым другим способом передачи энергии веществу.

В клинической химии достаточно часто встает вопрос о выборе технологии для определения той или иной группы аналитов. Например, определение гормонов можно проводить методами фотометрирования, в том числе турбидиметрией и нефелометрией или ИФА-анализом, можно воспользоваться технологиями, основанными на использовании флуоресцентной или люминесцентной метки. Основным недостатком фотометрических методов является относительно узкий линейный диапазон измерения результатов. Даже лучшие фотометры позволяют регистрировать изменения аналитов (гормонов) не более, чем в пределах 4 десятичных порядков. Флуоресцентные и люминесцентные технологии увеличивают линейный диапазон до 6-8 десятичных порядков, то есть позволяют работать без разведения. В таблице 6 представлены сравнительные данные о чувствительности фотометрических, флуоресцентных и люминесцентных методов определения гормонов (и других аналитов). Флуоресцентные и люминесцентные технологии позволяют существенно увеличить чувствительность определения веществ в биопробах, однако они используются, как правило, в закрытых технологиях, включающих прибор-реактивы-калибраторы-контрольные материалы и т.д.

Таблица 6.

Сопоставление методов применительно к гормональным исследованиям			
Метод детекции	Чувствительность (моль/л)	Преимущества метода	Недостатки метода
Нефелометрия Турбидиметрия	$\sim 10^{-6}$	Возможность проведения анализа в б/х пробе	Узкий спектр показателей
ИФА плащечная технология	$10^{-9} - 10^{-6}$	«Открытость» системы	Концентрация ряда гормонов ниже чувствительности системы
ИФА пробирочная технология	$10^{-9} - 10^{-6}$	Возможность быстрого получения результата (1 анализ)	Ограничен спектр, закрытая система
Флуоресценция	$10^{-9} - 10^{-8}$		Эффект гашения флуоресценции, закрытые технологии
Флуоресценция с генерацией сигнала	$10^{-16} - 10^{-9}$	Позволяет проводить измерения в широком диапазоне концентраций	Закрытые технологии, ограничен спектр показателей
Люминесценция	$10^{-9} - 10^{-8}$		Закрытые технологии, ограничен спектр показателей
Люминесценция с генерацией света	$10^{-16} - 10^{-10}$	Измерения в широком диапазоне концентраций, включая минимальные	Закрытые технологии, ограничен спектр показателей

ФОТОЭЛЕКТРИЧЕСКИЕ ЯВЛЕНИЯ В ТВЕРДЫХ ТЕЛАХ.

Электрические явления, происходящие в веществах под действием электромагнитного излучения, называются фотоэлектрическими. Фотоэлектрические явления возникают, когда

энергия поглощённого фотона затрачивается на квантовый переход электрона в состояние с большей энергией. В зависимости от соотношения между энергией фотонов и характерными энергиями вещества (энергией возбуждения атомов и молекул, энергией их ионизации, **работой выхода** электронов из твёрдого тела и т.п.) поглощение электромагнитного излучения может вызывать разные фотоэлектрические явления.

Если энергия облучения достаточно велика для ионизации атомов и молекул газа, то происходит *фотоионизация*, когда электрон выходит за пределы атома или молекулы. Если такая энергия поглощается электронами жидкости или твёрдого тела, возникает *фотоэлектронная эмиссия*. Фотоэлектронную эмиссию часто называют **внешним фотоэффектом**.

В отличие от внешнего фотоэффекта, все фотоэлектрические явления, обусловленные переходами электронов из связанных состояний в квазисвободные внутри твёрдого тела, объединяются термином **фотоэффект внутренний**.

В металлах из-за очень высокой электропроводности внутренний фотоэффект не наблюдается и возникает только фотоэлектронная эмиссия. Примеры фотоприемников, основанных на внешнем и внутреннем фотоэффектах, схематично изображены на рисунке 44. На основе внешнего фотоэффекта функционируют фотоэлементы (рис 44а), на основе внутреннего фотоэффекта – фотодиоды (рис. 44б).

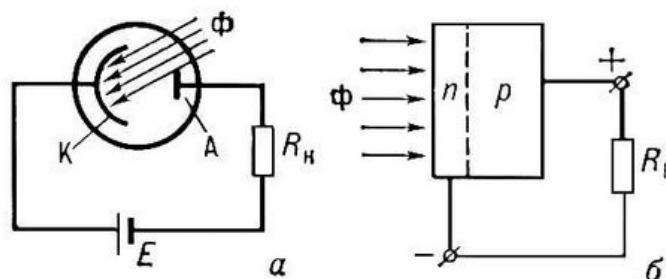


Рис. 44. Фотоэлектрические явления.

а – **внешний фотоэффект**. Под воздействием фотонов света возникает фотоэлектрическая эмиссия и в цепи протекает ток пропорциональный интенсивности потока. Это явление используется в **фотоэлементах**.

б – **внутренний фотоэффект**. Под воздействием фотонов изменяется сопротивление электронно-дырочного перехода в полупроводнике, в результате в цепи изменяется ток. Это явление используется в полупроводниковых **фотодиодах**.

Тепловое излучение веществ.

Абсолютно все вещества при температуре выше нуля °К излучают электромагнитные энергию, возникающую за счет внутренней энергии вещества. Тепловое излучение возникает при всех безизлучательных процессах, то есть при различных типах столкновений частиц в газах, при обмене энергиями электронного и колебательного движений в твердых телах. Как правило, нет равновесия между излучением и поглощением энергии. Горячие тела больше излучают энергии, чем поглощают, а холодные наоборот – больше поглощают, чем излучают. Излучение от горячего тела передается холодному. Для поддержания стационарного, неравновесного состояния к излучающим телам нужно подводить энергию извне, от холодных – отводить.

Равновесие процессов излучения и поглощения выполняется для **абсолютно черного тела**. Спектр равновесного излучения абсолютно черного тела не зависит от природы вещества. Спектры распределения энергии реальных веществ отличаются от спектров абсолютно черного тела. При этом существует выраженная зависимость плотности излучения от температуры. *Это означает, что в случае фотометрических измерений при использовании лампы накаливания в качестве источника света принципиальное значение имеет стабилизация температуры нити накаливания лампы.*

КОЛОРИМЕТРИЯ.

ОПТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ОКРАШЕННЫХ РАСТВОРОВ.

При прохождении белого света с интенсивностью I_0 через прозрачный стеклянный сосуд, заполненный раствором, происходит ослабление этого света (рисунок 45). Выходящий свет будет иметь другую, меньшую, интенсивность I . Ослабление светового потока связано, в основном, с поглощением световой энергии I_a раствором. Кроме того, имеет место отражение света $I_{отр}$ от границ раздела воздух-стекло, стекло-раствор (см. рисунок 45). Наконец, в растворе происходит рассеяние света I_p мельчайшими взвешенными частицами.

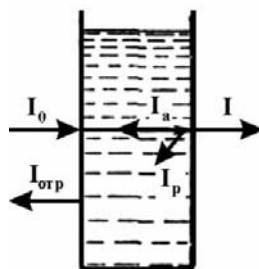


Рис. 45. Поглощение, рассеивание и отражение света от раствора в кювете.

Таким образом, интенсивность прошедшего света можно выразить следующим уравнением:

$$I = I_0 - I_{отр} - I_p - I_a$$

I_a представляет собой интенсивность $(I_0 - I_{отр})$ уменьшенную в A раз, где $A < 1$ – коэффициент поглощения раствора, то есть

$$I = A(I_0 - I_{отр}) = AI_0^{ex},$$

где I_0^{ex} – часть светового потока I_0 , проникающая в раствор.

Для достаточно прозрачных растворов $I_p \approx 0$ и уравнение для прошедшего света примет вид:

$$I = (1 - A)I_0^{ex}.$$

В практике аналитической химии и биохимии не определяют абсолютные фотометрические величины I_0 и I исследуемого раствора, а измеряют их по отношению к фотометрическим величинам другого раствора сравнения (стандарта, холостой пробы) с известными параметрами и налитого в точно такой же сосуд, как и исследуемый раствор. Для стандартного раствора уравнение для прошедшего света будет

$$I_{cm} = (1 - A_{cm})I_0^{ex}.$$

Если раствор сравнения бесцветный (непоглощающий), то $A_{cm} = 0$ и $I_{cm} = I_0^{ex}$.

Величина $\frac{I}{I_0^{ex}} = \frac{(1 - A)I_0^{ex}}{I_0^{ex}} = (1 - A) = T$ называется коэффициентом пропускания.

Величина $D = \lg \frac{1}{T}$ называется оптической плотностью.

Оптическая плотность есть мера непрозрачности раствора.

В дальнейшем для упрощения изложения мы будем обозначать величину I_0^{ex} как I_0 .

Основной закон колориметрии.

Интенсивность окраски в колориметрии выражают величиной оптической плотности D . Связь между интенсивностями падающего светового потока I_0 и светового потока I , прошедшего через окрашенный раствор, устанавливается законом Бугера-Ламберта.

Согласно этому закону однородные слои одного и того же вещества одинаковой толщины поглощают одну и ту же долю падающей на них световой энергии.

Графически закон Бугера-Ламберта представлен на рисунках 46 и 47.

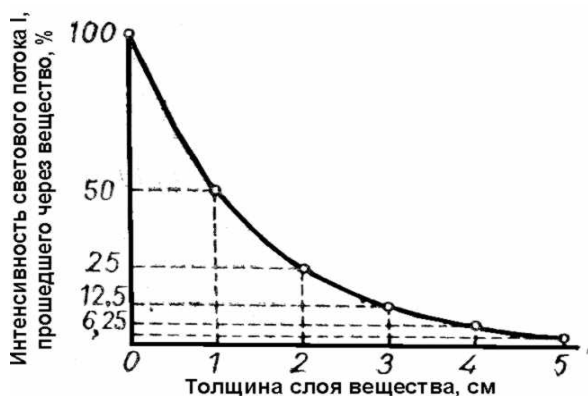


Рис. 46. Зависимость интенсивности выходящего светового потока от толщины слоя поглощающего вещества.

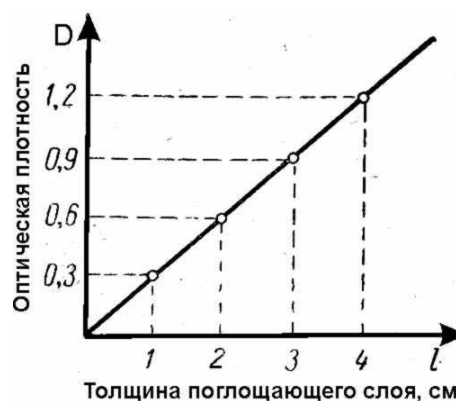


Рис. 47. Зависимость оптической плотности от толщины поглощающего слоя.

Из рисунка 46 получим: $I_1/I_0 = 50/100 = 0,5$; $I_2/I_1 = 25/50 = 0,5$; $I_3/I_2 = 12,5/25 = 0,5$ и т.д.

Из рисунка 47 видно, что оптическая плотность одинакова для одинаковых по толщине слоев и, что общая оптическая плотность нескольких слоев равно сумме оптических плотностей отдельных слоев (свойство адитивности):

$$D_{1-4} = D_{0-1} + D_{1-2} + D_{2-3} + D_{3-4} = 1,2 = 0,3 + 0,3 + 0,3 + 0,3.$$

Другими словами, оптическая плотность вещества прямо пропорциональна толщине поглощающего слоя. В этом состоит основной колориметрии закон Бугера-Ламберта.

Позднее Бером было установлено, что при прохождении света через газы и растворы степень поглощения вещества зависит от числа частиц в единице объема, то есть оптическая плотность зависит от концентрации вещества:

$$D = k \cdot l \cdot C,$$

где k - показатель поглощения – постоянная величина, характерная для растворов вещества (для света определенной длины волны); l – толщина слоя; C – концентрация вещества.

Эта зависимость оптической плотности от концентрации вещества в растворе и толщины поглощающего слоя известна под названием закона Бугера-Ламберта-Бера.

Таким образом, оптическая плотность D есть мера непрозрачности вещества толщиной l для оптического излучения. Оптическая плотность характеризует ослабление оптического излучения в слоях различных веществ (красителях, светофильтрах, растворах, газах и т. д.). Оптическая плотность не зависит от площади поперечного сечения падающего на слой вещества светового потока, она зависит только от толщины поглощающего слоя, концентрации поглощающего вещества и поглощающей способности вещества.

Цвет раствора.

Окраска раствора обусловлена неодинаковым поглощением молекулами растворенного вещества оптических колебаний разных длин волн. Максимум светопоглощения многих окрашенных веществ лежит в видимой области спектра. Цвет раствора определяется длиной волны λ_{\max} , соответствующей максимуму светопоглощения. Интенсивность окраски определяется степенью поглощения, а «чистота» - шириной «пики» спектральной кривой поглощения.

Основной закон колориметрии строго выполняется лишь при прохождении монохроматического света, но во многих случаях при применении сложного (полихроматического) излучения, отклонение от закона Бера можно минимизировать, используя монохроматоры или светофильтры для сужения спектра светового излучения.

КОЛОРИМЕТРИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИЗМЕРЕНИЙ.

Визуальные методы.

В визуальных методах человеческий глаз оценивает окраску исследуемого образца путем сравнения со стандартом. Визуальные методы относятся к колориметрическим методам (колориметрия – измерение цвета).

Визуальные методы включают в себя ряд способов. Некоторые из них представлены на рисунке 48.

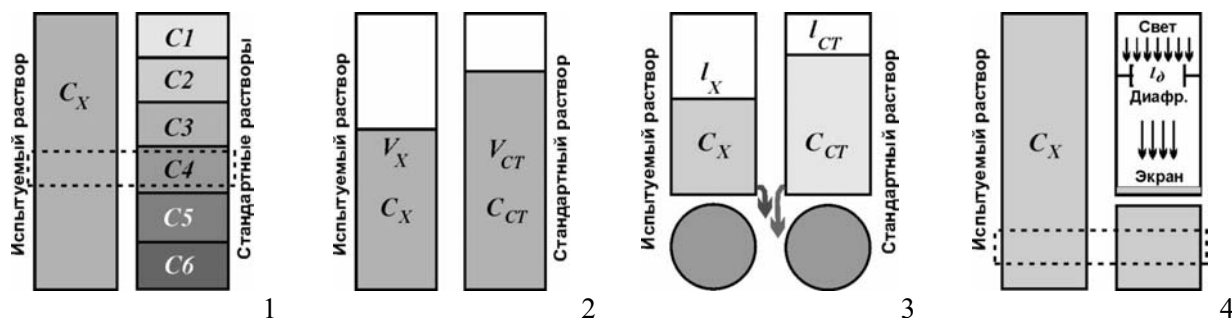


Рис. 48. Визуальные методы колориметрии. 1 – метод цветных шкал (стандартных серий); 2 – метод разбавления; 3 – метод уравнивания интенсивности окраски; 4 – метод диафрагм или оптического клина.

В методе цветовой шкалы готовят серию стандартных растворов с различной концентрацией вещества (с различной окраской растворов). Для этого проводят цветную реакцию вещества с известной максимальной концентрацией в нескольких пробирках. Затем добавляют в пробирки различное количество воды, разбавляя цветные растворы до различных концентраций вещества (интенсивностей цвета). Для исследуемого образца вещества проводят цветную реакцию и определяют концентрацию, сравнивая цвет полученного раствора с цветами стандартных растворов. Данный способ широко используется при полуколичественной оценке содержания ряда метаболитов в моче с помощью тест-полосок, когда окраска тест-полоски сравнивается с цветной шкалой, нанесенной на тубу.

В методе разбавления исследуемый и стандартный (с известной концентрацией) растворы (примерно одинаковой концентрации) наливают в прозрачные градуированные пробирки. Наблюдая окраску добавляют растворитель в пробирку с более окрашенным раствором до тех пор, пока цвета пробирок, то есть концентрации, не уравниваются. Искомое содержание вещества находят из условия: $C_x = a_x/v_x = C_{cm} = a_{cm}/v_{cm}$, откуда $a_x = a_{cm} \cdot v_{cm}/v_x$.

Метод уравнивания интенсивности окраски состоит в сравнении стандартного и испытуемого растворов разной толщины. Для этого наливают эти растворы в стеклянные цилиндры с плоскими доньями и наблюдают окраску сверху сквозь толщу растворов и, сливая более интенсивно окрашенный раствор, добиваются одинаковой интенсивности окраски в обоих цилиндрах. Искомую концентрацию можно найти из соотношения $C_x = C_{cm} \cdot l_{cm}/l_x$.

Уравнивание световых потоков можно достигнуть также в методе диафрагм или оптического клина, сравнивая интенсивность окраски раствора с экраном с подходящей окраской. Освещенность экрана изменяется при изменении ширины диафрагмы, которая имеет соответствующую шкалу. Вместо диафрагмы можно использовать стеклянный световой клин, у которого интенсивность окраски зависит от участка клина. Перемещая клин вдоль диафрагмы максимально размера, добиваются совпадения окраски раствора и экрана.

В связи с индивидуальными, неповторяющимися свойствами глаза, визуальные измерения субъективны и характеризуются относительно большой ошибкой. Человеческий глаз довольно быстро устает, поэтому при выполнении больших серий визуальных определений точность измерения непрерывно уменьшается. Кроме того, производительность таких исследований крайне мала. Несоответствие визуальных методов современным требованиям к точности биомедицинских измерений привело к их вытеснению из медицинской практики фотоэлектрическими методами.

В то же время некоторые методы визуальной колориметрии весьма просты, используют несложное оборудование (часто без электропитания) и недорогие расходные материалы.

Поэтому международные организации здравоохранения сохранили эти методы для исследования анемий у населения в некоторых труднодоступных районах Африки (Anemia Detection Methods in Low-Resours Settings: A Manual Fof Health Workers. December 1997. U.S. Agency for International Development USAID).

Определение гемоглобина по цвету цельной капиллярной крови.



Рис. 49. Набор фильтрационной бумаги WHO HEMOGLOBIN COLOR SCALE.

Наиболее простым является скрининговый полуколичественный тест на анемию с помощью полосок специальной фильтрационной бумаги из набора WHO HEMOGLOBIN COLOR SCALE, разработанного ВОЗ в 1997 году (рисунок 49). Содержание гемоглобина оценивается по цвету капли цельной капиллярной крови помещаемой на бумагу (рисунок 50). Цвет крови определяется методом сравнения со шкалой цветности, имеющейся в наборе. Для такого определения не нужны реагенты, не нужно лизирование, электрическое питание. К достоинствам метода относится также портативность. Чувствительность и специфичность метода составляет 90%. Тест дает результат в течение нескольких секунд.

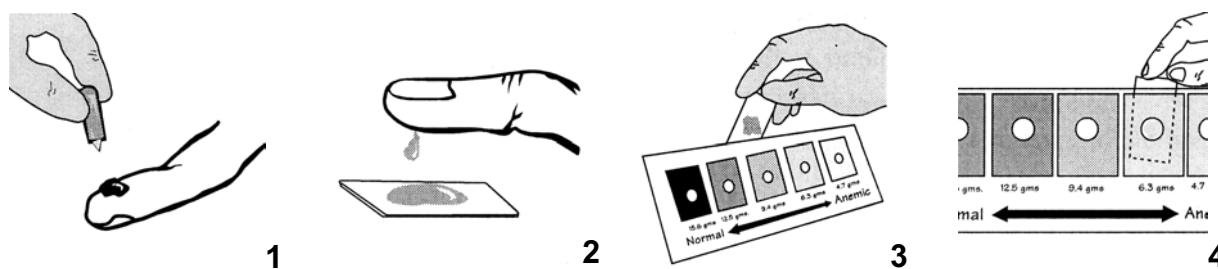


Рис. 50. Определение гемоглобина по цвету цельной крови.

Определение гемоглобина методом Сали.

От прибавления к крови соляной кислоты гемоглобин превращается в хлоргемин (солянокислый гематин, гематин-хлоргидрат) коричневого цвета. Интенсивность цвета определяется количеством Hb в крови. Определение производится в упрощенном колориметре, называемом гемометр Сали (рисунок 51), следующим образом: в трубочку гемометра наливают $n/10$ соляной кислоты до 10 деления. Гемоглибиновой пипеткой, емкостью 0,02 мл набирают капиллярную кровь, переносят в солянокислый раствор в трубочку, перемешивают и получают гематин коричневого цвета. Интенсивность окрашивания зависит

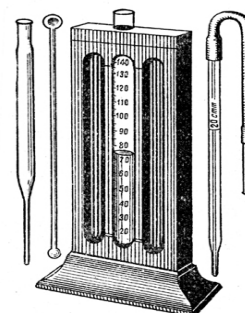


Рис. 51. Гемометр Сали.

от времени реакции. Через строго определенное время реакция прерывается вливанием дистиллированной воды. Затем воду добавляют каплями (перемешивая раствор) до тех пор, пока цвет пробирки не выровняется с цветом стеклянных стандартов, расположенных с двух сторон от трубочки. Когда цвет раствора сравнивается со стандартом, отсчитывают уровень жидкости в трубочке по шкале, проградуированной в единицах концентрации гемоглобина. Метод Сали обладает рядом источников ошибок.

1. «Гематиновая ошибка» - цвет хлоргемина зависит от посторонних факторов, особенно от количества и характера плазматических белков.
2. Нестабильность цвета цветных стандартов, которые со временем «бледнеют» на свету. Это приводит к завышенным результатам измерений. Чтобы этого избежать, необходимо время от времени проверять гемометр, калибруя его другими, более надежными методами. При смене трубочки также требуется перепроверка гемометра.
3. Неточность соблюдения времени реакции.
4. Субъективность оценки интенсивности окраски.

Величина ошибки метода Сали находится в пределах от 10 до 30%.

Достоинством метода относится использование портативного прибора без электрического питания.

Определение гемоглобина оксигемоглобиновым или гемиглобинцианидным методами на компараторе цвета.



Рис. 52. **Компаратор**
Lovibond
System 2000

В этом методе цвет гемоглобина, трансформированного в оксигемоглобин или гемиглобинцианид посредством соответствующих трансформирующих растворов, сравнивается с цветом цветных стеклянных стандартов, расположенных на вращающемся диске компаратора (рисунок 52).

Процедура определения гемоглобина состоит в следующем (рисунок 53):

1. В пробирке (или кювете) проводится цветная оксигемоглобиновая или гемиглобинцианидная реакция.
2. В компаратор помещается диск с цветными стеклянными стандартами, соответствующими методу приготовления цветного раствора.
3. Пробирка с цветным раствором помещается в компаратор.
4. Вращая диск, подбирают стеклянный стандарт с цветом, совпадающим с цветом раствора.
5. Значение концентрации считывают в окошке компаратора (справа внизу).

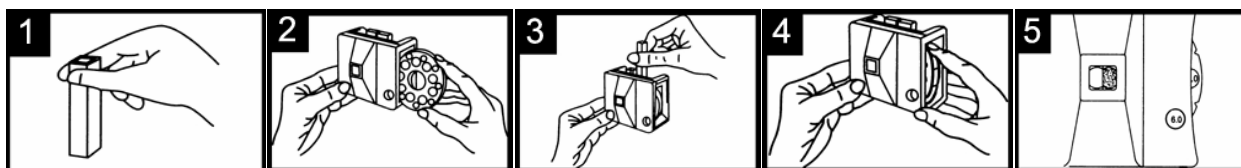


Рис. 53. Процедура определения гемоглобина на компараторе

Описанный метод требует точного дозирования 0,02 мл крови, точного дозирования трансформирующих растворов. Погрешность определения цвета обусловлена 9 градациями цветовых стандартов.

Достоинство компаратора в его портативности и отсутствии электрического питания.

Определение гемоглобина сапониновым методом на гемоглобинометре с серым оптическим клином.

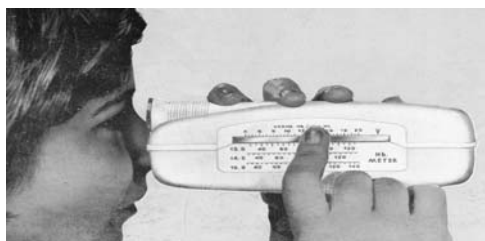


Рис. 54. Гемоглобинометр с оптическим клином BMS OMRON

Гемоглобинометр BMS (рисунок 54) содержит в качестве стандарта оптический серый клин с плавно изменяющейся интенсивностью окраски. Капля капиллярной крови наносится на стеклянную пластину (рисунок 55) и перемешивается деревянной палочкой, пропитанной раствором сапонины и EDTA, в течение минуты до полного лизирования крови. Затем пластина помещается в прибор и наблюдается в окуляре прибора в свете миниатюрной лампочки. Окраска пробы сравнивается с окраской оптического клина, который перемещается пальцем за рычажок до совпадения интенсивностей цвета. Положение рычажка на шкале концентраций дает результат измерения.

Портативный гемоглобинометр BMS питается от батарей 1,5 В. Чувствительность метода 77,5%, специфичность 96%. Погрешность определения гемоглобина около 5%.

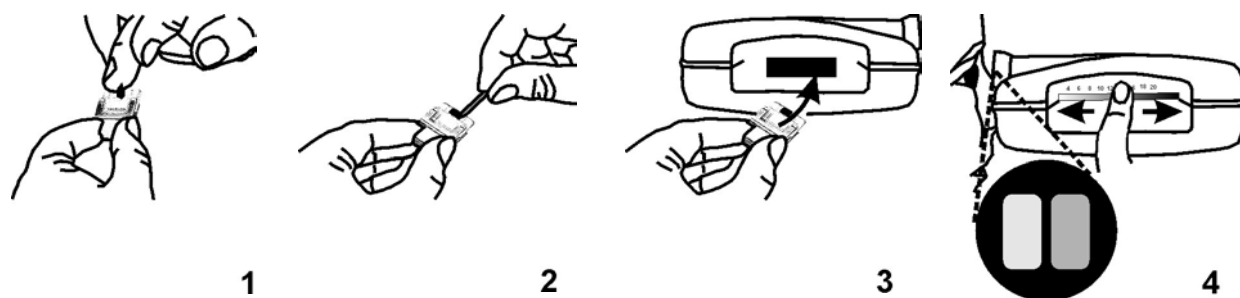


Рис. 55. Определение гемоглобина на гемоглобинометре с оптическим клином

ФОТОЭЛЕКТРИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

В фотоэлектрических методах определяется мощность светового потока, прошедшего через исследуемый раствор с помощью фотодетекторов – приемников светового излучения. В современной аппаратуре это, в основном, фотоэлементы и фотодиоды. В отличие от глаза, который субъективно воспринимает характеристики светового излучения с учетом спектральной кривой видности (см. рисунок 7), фотоэлектрические детекторы реагируют на мощность светового потока (см. рисунок 44). Простейшая схема для измерения поглощения окрашенных растворов представлена на рисунке 56.

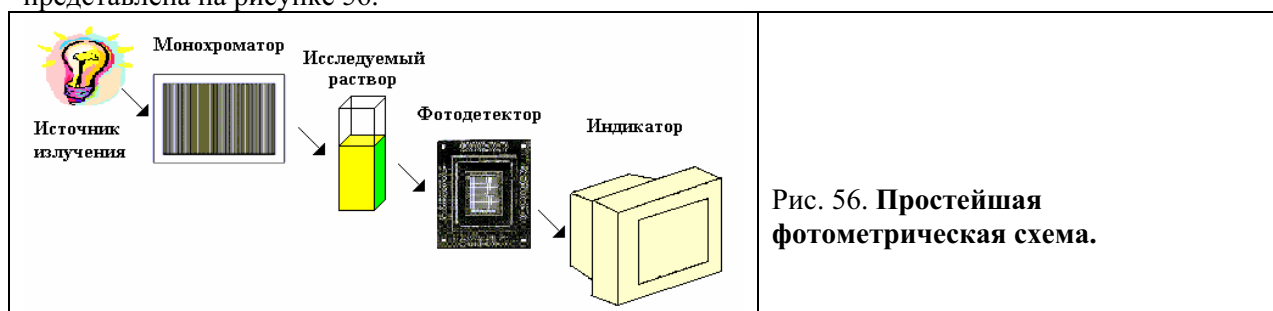


Рис. 56. Простейшая фотометрическая схема.

Оптические приборы, измеряющие полихроматический (в спектральной полосе 7-12 нм) световой поток только видимого диапазона называются **фотоэлектроколориметрами**. Приборы, измеряющие световой полихроматический световой поток в ультрафиолетовом, видимом и инфракрасном диапазонах, называются **фотометрами**. Методы исследования веществ с использованием фотометров называются фотометрическими.

ФИЗИЧЕСКИЕ ПРИНЦИПЫ И МЕТОДЫ ФОТОМЕТРИИ

Терминология

В медицинской литературе часто используется достаточно вольное обращение с терминами физических величин, что объясняется прямым применением англоязычных выражений в русской интерпретации. Поэтому считаем, что необходимо уделить внимание терминологии, используемой в литературе для определения фотометрических величин (таблица 7).

Таблица 7.

Российские стандартизованные термины и обозначения			Другие термины и обозначения, встречающиеся в отечественной и зарубежной литературе		
Термин	Сим-вол	Формула	Термин	Сим-вол	Формула
Пропускание	T	$T = I/I_0 = 10^{-kCl}$	Transmittance (пропускание)	T	$T = I/I_0 = 10^{-aCb}$
Оптическое поглощение	A	$A = 1 - T$ При $R=0$ (отражение) и $S=0$ (рассеяние)	Absorbance (оптическое поглощение)	A	$A = 1 - T$
Оптическая плотность	D	$D = -\lg T = \lg I_0/I = kCl$ $D = -\lg T = \lg I_0/I = \varepsilon_\lambda Cl$	Absorbance (оптическое поглощение)	A	$A = -\lg T = \lg I_0/I = aCb$ $A = -\lg T = \lg I_0/I = \varepsilon Cb$
Единица величины оптической плотности, белл	B	Величина оптической плотности при $T=0,1$ $1 B = -\lg 0,1$	Absorbance (единица оптического поглощения); единица оптической плотности	A $Ed.$	Величина оптического поглощения при $T=0,1$ $1 A = -\lg 0,1$
Коэффициент поглощения	k	$k = D/cl$; c – грамм/литр; l – см	Absorptivity (поглощательная способность)	a	$a = A/(Cb)$
Молярный показатель поглощения на длине волны λ	ε_λ	$\varepsilon_\lambda = D/cl$; c – моль/литр; l – см	Molar absorptivity (молярная поглощательная способность); Коэффициент молярной экстинкции; Молярный коэффициент поглощения	ε ε_λ	$\varepsilon = aM = AM/(Cb)$; M – молекулярная масса
Толщина (см) поглощающего слоя окрашенного раствора (внутренний размер кюветы)	l	-	Path length (внутренняя длина кюветы в см)	b	-
Длина волны света (нм), проходящего через раствор	λ	-	Длина волны света (нм), проходящего через раствор	λ	-

Часто употребляемое в инструкциях на реагенты обозначение оптической плотности «А» (вместо «D») некорректно, да и называют оптическую плотность иногда «поглощением». Следует аккуратно подходить к терминологии и обозначениям, так как вольное их использование затрудняет понимание сути предмета.

Закон Бугера.

Выше приводилось выражение для оптической плотности:

$$D = a \cdot l \cdot c,$$

где D – **оптическая плотность раствора** толщиной l с концентрацией поглощающего вещества c , a - **показатель поглощения**, зависящий от длины волны и природы вещества.

Закон ослабления монохроматического света при поглощении его слоем вещества может быть выражен в экспоненциальной или логарифмической форме:

$$I = I_0 10^{-kCl} ;$$

$$\lg(I_0 / I) = \lg \frac{1}{T} = kCl = D$$

Показатель поглощения света веществом k определяется как величина, обратная расстоянию, на котором поток излучения, образующий параллельный пучок, ослабляется в 10 раз в результате поглощения в веществе. Размерность показателя поглощения растворенного вещества учитывает размерность концентрации раствора C .

Если длину кюветы выражают в сантиметрах, концентрацию раствора в моль/литр, то a называют **молярным показателем поглощения** ε_λ (Согласно рекомендациям ИЮПАК термин «экстинкция» закреплен за характеристиками процессов рассеяния, а не поглощения света). Размерность молярного показателя поглощения $л/(моль \cdot см)$, а его численное значение равно оптической плотности D раствора с концентрацией 1 моль/л при длине кюветы 1 см. Использование для концентрации c размерности моль на метр кубический и измерение l в метрах приводят к размерности молярного показателя поглощения $м^2/моль$. При этом численная величина ε_λ будет меньше в 10 раз. Молярный показатель поглощения ε_λ является константой данного раствора вещества при данной длине волны оптического излучения с определенными условиями по температуре, рН, растворителю и так далее.

Величина оптической плотности D безразмерна, но может исчисляться в «беллах» (сокращение - Б).

Следует обратить внимание на исторические корни законов оптического поглощения.

Впервые закон пропорциональности степени ослабления света толщине слоя и количеству вещества, через которое проходит свет, был сформулирован Бугером в 1729 г. В 1760 г. Ламберт (со ссылкой на Бугера) выразил зависимость интенсивности прошедшего света от толщины слоя математической формулой. Впоследствии, по ряду привходящих обстоятельств зависимость светопоглощения раствора от его концентрации получила название «закон Бера». В рецензии на переиздание труда Бугера С. И. Вавилов писал: «Трудно постичь основания той упорной исторической несправедливости, с которой до нашего времени законы, совершенно ясно и отчетливо сформулированные Бугером, соединяются с другими авторами (закон Бера, закон Ламберта и др.)... Между тем Бугер дал все принципы фотометрии, которыми мы пользуемся в неизменном виде до сих пор, сформулировал математически... основной закон поглощения света в зависимости от яркости, толщины слоя и концентрации». Следуя рекомендации С. И. Вавилова, закон ослабления монохроматического света при поглощении его слоем вещества, выраженный в экспоненциальной или логарифмической форме, следует называть **законом Бугера**.

Зависимость оптической плотности раствора или значений молярного показателя поглощения ε_λ растворенного вещества от длины волны или частоты называют спектром поглощения.

Спектры поглощения состоят из отдельных полос поглощения, обусловленных электронными переходами в молекуле вещества. Основные характеристики полос поглощения следующие: положение максимума (λ_{\max} или ν_{\max}), значение ε_{\max} и полуширина ($\Delta_{1/2}$) равная ширине полосы поглощения при $\varepsilon = 0,5\varepsilon_{\max}$.

На рисунке 57 показано, что пропускание T связано обратно и логарифмически с концентрацией c , тогда как оптическая плотность D связана с концентрацией c прямо и линейно.

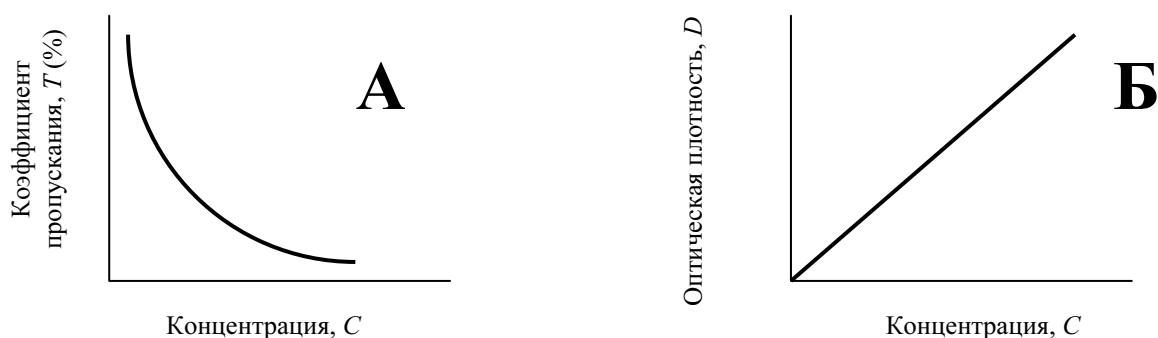


Рис. 57. Связь пропускания и поглощения с концентрацией поглощающего вещества.

А - пропускание связано обратно и логарифмически с концентрацией, Б - поглощение связано прямо и линейно с концентрацией.

Соотношение между пропусканием и поглощением для одного и того же вещества дано в таблице 8.

Таблица 8

Соотношение между пропусканием и поглощением для одного вещества					
Оптическая плотность, безразмерна или Б (белл)	1,0	0,5	0,25	0,125	0,06
Коэффициент пропускания, %	10	31	56	75	87

Молярный показатель поглощения ε_λ .

Закон Бера устанавливает, что оптическая плотность D светового потока определенной длины волны прямо пропорционально концентрации C растворенного вещества. В кювете с фиксированной длиной оптического пути l (в клинической химии принята стандартная кювета в 1 см) оптическая плотность D и концентрация c связаны через молярный показатель поглощения ε_λ . Он специфичен для каждого вещества, определяется структурой вещества, характеризует собой способность молекул вещества поглощать свет с длиной волны λ и не зависит от концентрации вещества. Для НАД·Н и НАДФ·Н установлены следующие значения ε при соответствующих длинах волн:

$$\begin{array}{ll}
 \varepsilon_{334} = 6,18 \cdot 10^3 \text{ л/}(\text{моль} \cdot \text{см})^{-1} & \left. \vphantom{\varepsilon_{334}} \right\} \text{ Для НАД·Н и НАДФ·Н} \\
 \varepsilon_{340} = 6,22 \cdot 10^3 \text{ л/}(\text{моль} \cdot \text{см})^{-1} & \\
 \varepsilon_{365} = 3,4 \cdot 10^3 \text{ л/}(\text{моль} \cdot \text{см})^{-1} & \text{Для НАД·Н} \\
 \varepsilon_{365} = 3,5 \cdot 10^3 \text{ л/}(\text{моль} \cdot \text{см})^{-1} & \text{Для НАДФ·Н}
 \end{array}$$

Если концентрация вещества C измеряется в моль/л, а длина оптического пути l – в см, то единицей измерения ε_λ является л/(моль·см)⁻¹. Поскольку молярный показатель поглощения является функцией длины волны света, зависимость $\varepsilon(\lambda)$ может служить количественной характеристикой спектра данного вещества.

Для каждого вещества характерен свой спектр поглощения, причем он часто разный для окисленных и восстановленных форм. На изменении спектра поглощения при переходе окисленная ↔ восстановленная форма аналитов основано определение концентрации большинства субстратов и активности практически всех ферментов.

Величины ε_λ используются для характеристики веществ, для оценки их чистоты и для сравнения чувствительности измерений различных производных веществ. Например, билирубин,

растворенный в хлороформе, при температуре 25°С будет иметь молярный показатель поглощения 60700 ± 1600 на длине волны 453 нм. Молекулярный вес билирубина равен 584. Следовательно, раствор, содержащий 5 миллиграмм/литр (0,005 грамм/литр) билирубина должен иметь оптическое поглощение в кювете с длиной оптического пути 1 см

$$D = 60700 \cdot 1 \cdot 0,005 / 584 = 0,520$$

Наоборот, если оптическая плотность раствора с такой же концентрацией билирубина имеет плотность $D=0,490$, то чистота билирубина равна $0,490/0,52$ или 94%.

Принцип аддитивности.

Более 120 лет назад К.Фирордт на примере двух поглощающих свет веществ сформулировал и экспериментально подтвердил принцип аддитивности оптических плотностей. В соответствии с этим принципом, оптическая плотность D смеси m соединений, каждое из которых подчиняется закону Бугера, и не вступающих в химическое взаимодействие друг с другом, равна сумме парциальных оптических плотностей, отвечающих поглощению света каждым соединением:

$$D = \varepsilon_1 \cdot c_1 \cdot l + \varepsilon_2 \cdot c_2 \cdot l + \dots + \varepsilon_m \cdot c_m \cdot l = l(\varepsilon_1 \cdot c_1 + \varepsilon_2 \cdot c_2 + \dots + \varepsilon_m \cdot c_m);$$

где $\varepsilon_1, \varepsilon_2 \dots \varepsilon_m$ – молярные показатели поглощения; $c_1, c_2 \dots c_m$ – концентрации компонентов смеси; l – длина кюветы.

На использовании принципа аддитивности основаны практически все методы спектрофотометрического анализа многокомпонентных смесей.

Измерение в многокомпонентных растворах.

Растворы в клинической химии часто представляют собой многокомпонентные системы. При фотометрическом измерении многокомпонентных систем используют принцип аддитивности, согласно которому поглощение отдельного вещества не зависит от других веществ, обладающих собственным поглощением. Поэтому, при данной длине волны оптическая плотность раствора из смеси компонентов, не взаимодействующих между собой, равна сумме оптических плотностей отдельных компонентов при той же длине волны. На рисунке 58 представлены спектры поглощения Кумаси бриллиантового синего без белка и с белком. В обоих состояниях, как в свободном, так и в комплексе с белком Кумаси бриллиантовый синий поглощает, но с разной интенсивностью.

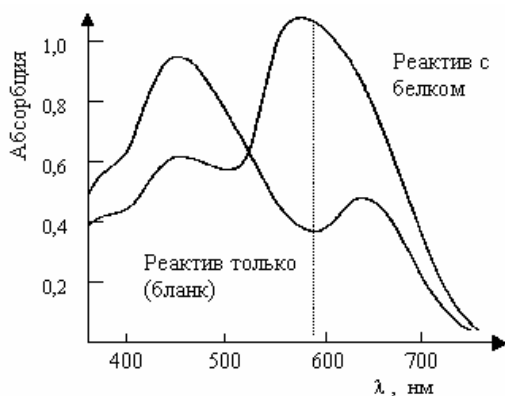


Рис. 58. Спектр поглощения Кумаси бриллиантового синего без белка и в соединении с белком. Реактив используется для фотометрического определения белка в моче.

Для оценки степени поглощения исследуемого раствора, содержащего какое-либо соединение, проводится сравнение интенсивности потока излучения, прошедшего через этот раствор, с интенсивностью потока излучения, прошедшего через раствор сравнения (бланк). Для определения концентрации элемента в этом растворе используют калибровочный график или принципы расчета, изложенные ниже. Для построения калибровочного графика применяют стандартные растворы или калибраторы.

Измерение в максимуме спектральной полосы поглощения.

Исследование растворов рекомендуется проводить при длине волны облучения, соответствующей максимальному поглощению, то есть длине волны, при которой максимален молярный показатель поглощения ε_λ . Действительно, из рисунка 59 видно, что тангенс угла наклона прямой, связывающий оптическую плотность D и концентрацию c , максимален при λ_{\max} . Из закона Бугера также следует, что $D = \varepsilon_\lambda l c$, где ε_λ есть тангенс угла наклона указанной зависимости при $l = 1$. Очевидно, что чувствительность фотометрического определения максимальна при λ_{\max} .

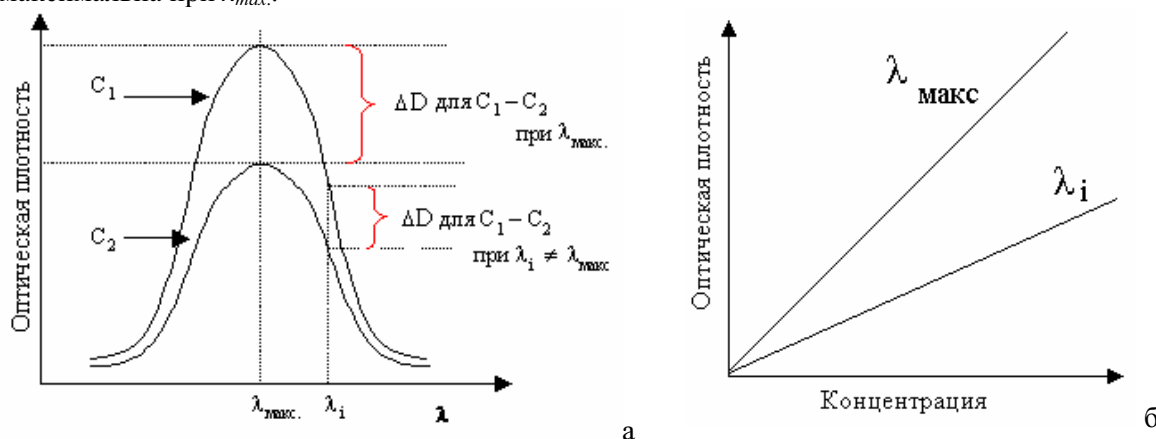


Рис.59. Фотометрическая чувствительность:

а - определение разницы двух концентраций аналита ($C_1 - C_2$) существенно выше при измерении на λ_{\max} , соответствующей максимальному коэффициенту молярной экстинкции ε аналита;
б - зависимость изменения оптической плотности от изменения концентрации имеет больший tg при измерении на λ_{\max} , т.е. большую чувствительность.

Однако для большинства субстратов и продуктов реакций, исследуемых в клинической лаборатории, максимум поглощения лежит далеко за пределами спектрального диапазона применяемых приборов. В таких случаях используют сопряженные реакции, в которых применяют хромогены с хорошо известными спектрами поглощения. В таблице 9 приведены данные о максимуме поглощения водных растворов хромогенов, широко используемых в фотометрических реакциях, и молярный показатель поглощения этих хромогенов.

Таблица 9.

Спектральные характеристики хромогенов, используемых в фотометрических реакциях в клинической лабораторной диагностике.				
Максимум поглощения в воде, λ_{\max} , нм	Молярный показатель поглощения, ε , (л/моль · см)	Субстрат	Хромоген	Применение в клинической химии
340	6220	НАД ⁺ , НАДФ ⁺	НАД·Н, НАДФ·Н	Оптический тест Варбурга
400	18300	<i>p</i> -нитрофенилфосфат	<i>p</i> -нитрофенол	Определение активности фосфомоноэстераз. При 400 нм поглощает субстрат, поэтому измерение проводят при 405 нм
420	21300	<i>o</i> -нитрофенил- β -D-галактопиранозид	<i>o</i> -нитрофенол	Определение активности β -галактозидазы (лактазы)
550	26600	фенолфталеин- β -D-глюкуронид	фенолфталеин	Определение активности β -глюкуронидазы

550			Комплекс Cu^{+2} с белком	Биуретовый метод определения белка
595			Комплекс белка с красителем Кумаси G250	Метод Брэдфорд определения белка в моче
600		Тимол-фталейнфосфат	тимолфталейн	Определение активности щелочной фосфатазы

В клинической биохимии часто измерение производится при изменении цвета хромогена в результате расщепления субстрата и образования продукта, который поглощает в другой области спектра. Так, в результате расщепления щелочной фосфатазой (ЩФ) 4-нитрофенолфосфата образуется нитрофенол, который имеет максимум поглощения при 405 нм, где субстрат вообще не поглощал (рисунок 60). Измерение с узкополосным светофильтром 405 нм позволяет надежно регистрировать данную реакцию.

При окислительно/восстановительной реакции с переходом $\text{НАД}^+ \leftrightarrow \text{НАД}\cdot\text{Н}$ измерение проводится не на максимуме поглощения при 260 нм, где обе формы активно поглощают, а при 340 нм, при котором у $\text{НАД}\cdot\text{Н}$ имеется 2-ой пик поглощения, а НАД^+ практически не поглощает (рисунок 61).

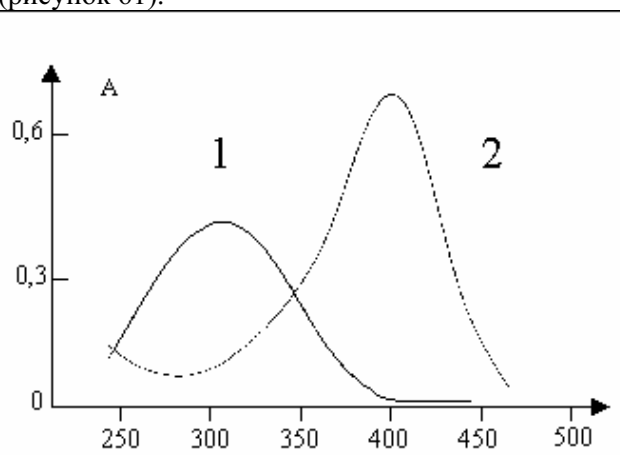


Рис. 60. Спектры поглощения 4-нитрофенолфосфата (1) и 2-нитрофенольного аниона (2), образующегося в результате расщепления субстрата. Измерение с использованием этого хромогена проводится при 405 нм

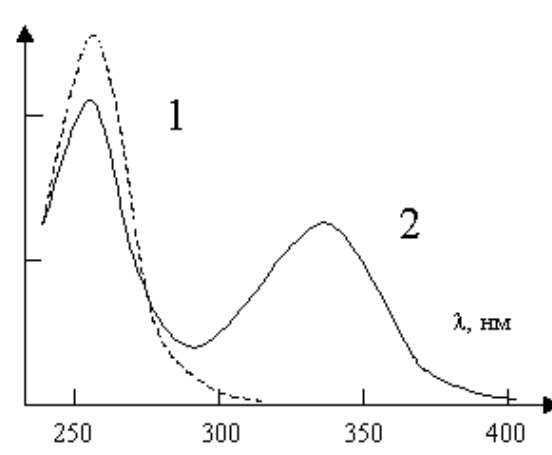


Рис. 61. Спектры поглощения НАД^+ (1) и $\text{НАД}\cdot\text{Н}$ (2). Восстановление НАД^+ до $\text{НАД}\cdot\text{Н}$ прослеживается при 340 нм – максимуме поглощения $\text{НАД}\cdot\text{Н}$, при котором НАД^+ не поглощает

Измерение на оптимальной длине волны.

Если в многокомпонентной системе два или более компонентов имеют максимум поглощения в одной области, то часто измерение проводится не на $\lambda_{\text{макс}}$, а на оптимальной длине волны $\lambda_{\text{опт.}}$, на которой существенно различаются оптическая плотность рабочего раствора (бланка) и исследуемого вещества (рисунок 62). Так, в частности, проводят измерение при определении креатинина методом “конечной точки”, так как субстрат реакции пикриновая кислота и продукт реакции щелочной пикрат, образующийся в реакции Яффе, имеют близкие спектры поглощения.

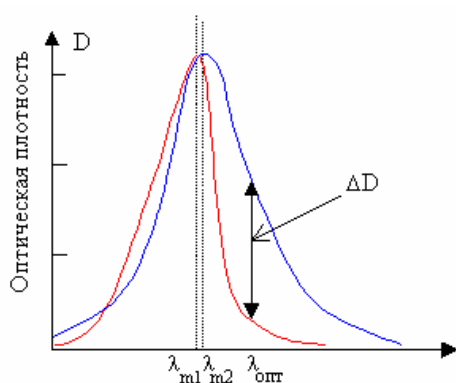


Рис. 62. Измерение оптической плотности на оптимальной длине волны ($\lambda_{опт}$) при близких максимумах поглощения рабочего раствора (бланка) и исследуемого вещества (λ_{m1} и λ_{m2}). При $\lambda_{опт}$ достигается максимальная разница между абсорбцией бланка и исследуемого вещества (ΔD)

ФОТОМЕТРИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ БИОХИМИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

Измерение по калибровочной кривой.

Правила построения калибровочного графика.

Для построения калибровочных графиков используют несколько известных концентраций определяемого вещества. В прежние годы для этого использовались основные стандартные растворы, из которых готовилась серия рабочих разведений. В настоящее время используются калибраторы с разным уровнем концентрации, определенной точным (лучше референтным) методом. Обычно для построения графиков используют четыре-пять различных концентраций (калибровочных точек). Для каждой концентрации согласно методике определения проводят три параллельных исследования, в которых определяют оптическую плотность D в каждой калибровочной пробе. Если результаты получаются разными, то усреднять их не следует, так как не известно, какие значения правильные. На оси абсцисс откладывается концентрация c , а на оси ординат – плотность D . На оси D откладывают все полученные значения D_i , соответствующие концентрациям c_i . Через скопление точек наилучшим образом проводят линию - калибровочный график. Если закон Бугера соблюдается, график будет иметь вид прямой линии, проходящей через нулевую точку (рисунок 63, график А). Подсчет фактора в случае графика А можно проводить по отношению:

$$F = \frac{C_i}{D_i}, \text{ где } F - \text{ фактор, } C_i - \text{ концентрация вещества, } D_i - \text{ оптическая плотность } i - \text{ того}$$

калибратора

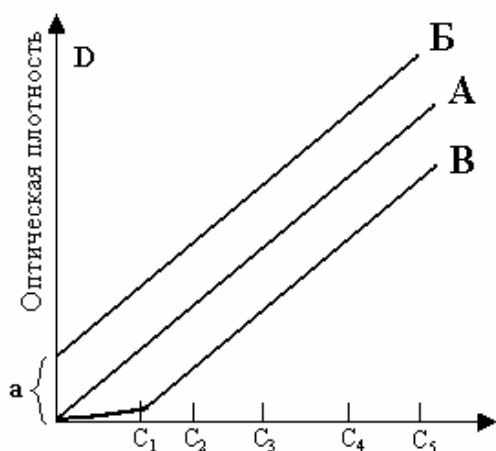


Рис. 63. Варианты при построении калибровочного графика при линейной зависимости экстинкции от концентрации исследуемого вещества:

А - закон Бугера-Ламберта-Бера соблюдается, прямая выходит из нулевой точки, правильный вариант калибровочного графика

Б - имеет место влияние систематического фактора, желательно измерение по сравнению с холостой пробой, в которой бы этот фактор учитывался.

В - измерение неверное, так как низкие концентрации вещества не измеряются. График следует переделать с другим калибратором или на другом приборе

Возможны варианты при построении калибровочного графика. Если получается график Б (рисунок 63), то использовать его можно, но имеется систематическая ошибка, которую необходимо учитывать при расчете фактора:

$$F = \frac{C_i}{D_i - a}, \text{ где } a - \text{отрезок на оси ординат от } 0 \text{ до начала калибровочного графика.}$$

Если получается график В (рисунок 63), то пользоваться им нельзя, так как не определяются по этому графику низкие концентрации калибратора. Недостатком расчетов с помощью калибровочных графиков при работе ручными методами является то, что калибровка проводится редко и опытная проба не исследуется одновременно с калибровочной. Расчеты по калибровочным графикам обычно используют для методов, при которых имеются стабильные результаты изо дня в день (гемоглобин, общий белок). Следует отметить, что при работе на современных ручных фотометрах оператору фактически приходится проводить калибровку каждый день, то есть систематически строить и оценивать калибровочные графики. Однако при работе на анализаторах построение и использование графиков осуществляется автоматически. Неприемлемо использовать графики, построенные на других приборах или в других лабораториях. Для каждого фотометра необходимо проводить свою калибровку методов.

Калибровочные графики необходимы, так как графический анализ дает возможность установить степень линейности связи между оптическим поглощением D и концентрацией c , а также позволяет определить чувствительность метода.

Существуют определенные требования при построении калибровочного графика.

1. Необходимо установить линейность между нулевой и минимальной калибровочной точкой: для этого нужно использовать калибраторы с низкой концентрацией, то есть построить калибровочный график для очень низких концентраций, чтобы иметь право проводить расчеты при той ситуации, когда встретится очень низкая концентрация определяемого анализа.
2. Необходимо измерить концентрацию вещества около максимальной калибровочной точки, чтобы убедиться в сохранении закона при высоких концентрациях.
3. Оценить ориентировочно влияние вариации. Для этого следует определить третью (среднюю) концентрацию 20 раз, рассчитать среднее арифметическое значение и среднее квадратическое отклонение (СКО). Через среднее арифметическое значение провести новый график. Все точки на основном графике не должны отступать от вновь проведенной линии более чем на 1,2 СКО.

Метод сравнения стандартного и опытного образца.

Этот метод определения концентрации является наиболее приемлемым, так как анализируемая и стандартная пробы обрабатываются в одинаковых условиях. Поэтому при больших сериях исследований стандартную пробу рекомендуют исследовать в начале серии и примерно через каждые 20 анализируемых проб, определяя отношение c_{cm} / D_{cm} или фактор (F).

Расчет ведут по стандарту или по фактору.

Расчет по стандарту обозначается в том случае, если используется уравнение:

$$C_i = D_i \cdot C_{cm} / D_{cm}, \text{ где } C_i - \text{искомая величина}$$

Расчет по фактору – это тот случай, когда используется уравнение:

$$C = D \cdot F.$$

Следует помнить, что в опытной и стандартной пробах должен обрабатываться одинаковый объем образца. Например, в реакции необходимо использовать 100 микролитров образца, в качестве биологической жидкости используется плазма в том же объеме, но в плазму при ее получении добавляют цитрат 1 : 9, следовательно в 100 микролитрах плазмы будет содержаться 90 мкл исследуемой биологической жидкости. Это следует учитывать при расчетах, вводя поправочный коэффициент.

Данный метод расчета справедлив только на линейном диапазоне зависимости оптической плотности от концентрации.

Методы определения вещества без использования калибратора.

Фотометрические единицы.

В некоторых случаях, когда для метода отсутствует калибратор (например серомукоид, средние молекулы) для выражения количества вещества используют измеренную плотность,

которую переводят в фотометрические единицы (E_d). Для этого плотность умножают на 100. Например, $D = 0,3$, ответ в бланке анализа – $30 E_d$.

Определение концентрации по молярному показателю поглощения.

Определение основано на прямом применении закона Бугера, согласно которому концентрация рассчитывается по формуле:

$$C = D / l \cdot \varepsilon$$

Концентрация определяется делением измеренной оптической плотности на известный для данного вещества молярный показатель поглощения при длине волны измерения: $C = D / \varepsilon$. При этом следует учитывать разведение образца. Молярный показатель поглощения установлен экспериментально для многих веществ (см. таблицу 9).

ПРИМЕР: определение концентрации НАДН на основе определения оптической плотности раствора.

Молярный показатель поглощения НАДН при 340 нм $6,22 \times 10^3$ л \times моль $^{-1}$ см $^{-1}$. Измеренная оптическая плотность в 1 см кювете при 340 нм составила 0,38. Концентрация НАДН определяется по соотношению:

$$C = \frac{D}{\varepsilon l} = \frac{0,38}{6,22 \times 10^3 \text{ л} \times \text{моль}^{-1} \text{см}^{-1} \times 1 \text{ см}} = \frac{0,38}{6,22 \times 10^3 \text{ л} \times \text{моль}^{-1}} = 6,11 \times 10^{-5} \text{ моль/л}$$

Примером использования такого же принципа может служить определение гемоглобина гемиглобинцианидным методом по Драбкину.

В конце 30-х годов Драбкин измерил спектрофотометрические константы цианметгемоглобина – миллимолярные коэффициенты экстинкции: $\varepsilon_{540} = 11,53$; $\varepsilon_{545} = 11,52$; $\varepsilon_{551} = 11,10$. В 50-х годах появились сообщения, что величина миллимолярного показателя поглощения цианметгемоглобина при 540 нм ниже величины, приведенной Драбкиным. Разногласия в величине ε_{540} для цианметгемоглобина достигали 9 %. Международная гематологическая ассоциация и созданный ею комитет по стандартизации гемоглобинометрии решили считать величину миллимолярного показателя поглощения цианметгемоглобина при 540 нм равной 11,0 ($\varepsilon_{540} = 11,0$).

Молекулярная масса гемоглобина составляет 64458. На каждую молекулу Hb приходится 4 гема, каждый из которых состоит из атома железа и порфиринового кольца. Когда в спектрофотометрических измерениях говорят о Моле гемоглобина, то имеют в виду не всю молекулу, а только ее $\frac{1}{4}$ часть, т.е. один граммэквивалент Hb. В этом смысле 1 моль или 1 граммэквивалент Hb содержит 1 грамм-атом железа, связывающий 1 моль O_2 или CO. Молекулярная масса или эквивалентный вес Hb равен $64458 / 4 = 16114$ г, т.е. 1 миллимоль соответствует 16,114 г Hb в 1 л крови.

Определение общего гемоглобина по гемиглобинцианиду спектрофотометрическим методом. Кровь разводят трансформирующим раствором в отношении 1 : 251, а именно 0,02 мл крови (пипетка Сали или капилляр “end-to-end”) смешивают с 5,0 мл трансформирующего реактива. После перемешивания через 3 мин измеряют оптическую плотность D против воды при 540 нм в кювете с толщиной оптического слоя $l=1$ см.

$$\text{Hb в г/л} = \frac{\text{Оптическая плотность} \times \text{миллиэквивалентный вес} \times \text{разведение}}{\text{миллимолярный показатель поглощения} \times \text{толщина оптического слоя в см}} =$$

$$\frac{D \times 16,114 \times 251}{11,0 \times 1,0} = D \times 367,7, \text{ где } D - \text{измеренная оптическая плотность.}$$

Несмотря на относительную простоту измерения гемоглобина гемиглобинцианидным методом на спектрофотометре, этот способ не получил повсеместного использования в ежедневной практике отечественных клинико-диагностических лабораторий. Это в первую очередь связано с тем, что измерение проводится не на спектрофотометрах, а на фотометрах с относительно большой шириной полосы пропускания, на которых нельзя быть уверенным в реальной величине миллимолярного показателя поглощения. Поэтому работа на фотометрах старой конструкции со светофильтрами, где 540 нм соответствует 540 ± 10 нм (то есть в диапазоне 530 – 550 нм) не позволяет использовать приведенную формулу расчета, так как ϵ не будет равно 11. Кроме того, существенное влияние может оказать нелинейность приборов в широком диапазоне оптической плотности, влияние реактивов и др. факторов. Поэтому измерение гемоглобина на фотометрах ведут, как правило, по калибровочному графику, построенному по калибровочным растворам гемиглобинцианида. Такие растворы выпускаются, в частности НПО “РЕНАМ”, которые поставляются в 4 ампулах из светозащитного стекла с концентрациями (в пересчете на гемоглобин), равными 50, 100, 150 и 200 г/л. Это перекрывает практически весь диапазон нормы и патологии.

Измерение скорости изменения поглощения.

В клинической биохимии фотометрические измерения в большинстве случаев проводятся непосредственно при протекании биохимических реакций, в процессе которых потребляются субстраты, повышается концентрация продуктов реакций или меняются ко-факторы реакций.

Одним из самых распространенным оптических тестов является тест Варбурга (УФ-тест), основанный на том, что один из продуктов дегидрогеназной реакции - восстановленная форма никотинамидадениндинуклеотид или его фосфат (НАДН или НАДФН) - имеет максимум поглощения при длине волны 340 нм, а их окисленные формы при этой длине волны практически не поглощают (рис. 61). УФ-тест может быть использован для определения скоростей тех реакций, в которых не участвуют НАД или НАДФ, но образующиеся продукты посредством других ферментативных реакций приводят к окислению НАДН или восстановлению НАД (непрямой оптический тест Варбурга).

При кинетическом определении вычисляют изменение поглощения за 1 мин и рассчитывают активность по формуле:

$$A = \frac{V \times 1000}{\epsilon \times l \times v} \times \frac{\Delta D}{\text{мин}}, \quad \text{где}$$

A – активность фермента, измеряемая в международных единицах (МЕ или Ед или U), определяется как количество фермента, которое катализирует превращение 1 микромоля (мкмоль) субстрата в 1 минуту. Каталитическая активность фермента выражается числом единиц, рассчитанных для 1 литра биологической жидкости (Ед/л).

V - объем реакционной смеси, мл;

1000 - коэффициент перерасчета миллилитров в микромоль;

ϵ – миллимолярный показатель поглощения НАДН в реакции 6,22 л/(ммоль × см);

l - длина оптического пути (1 см);

v - объем пробы (сыворотки крови или другого материала), мл;

ΔD - изменение оптической плотности за 1 мин.

Результат арифметических вычислений для первой дроби формулы $\frac{V \times 1000}{\epsilon \times l \times v}$ является фактором (F). Значение фактора вводится в программу фотометра или биохимического анализатора, которые рассчитывают активность фермента следующим образом:

$$A = F \times \Delta D / \text{мин}$$

При определении активности ферментов с использованием диагностических наборов применяют прописи постановки анализов, представленные в инструкциях к наборам. В этих случаях известен используемый хромоген (следовательно, известен его коэффициент молярной экстинкции), установлены объем реакционной среды и объем образца, как правило, измерение

проводится в кювете с длиной оптического пути 1 см. Поэтому расчет активности фермента проводится по фактору (F), умноженному на $\Delta D/\text{мин}$. Фактор приводится в инструкциях для разных температур инкубации. В современных программируемых фотометрах и биохимических анализаторах все расчеты программируются и результаты получаются в конечном виде.

Единицы активности ферментов. В системе СИ единицей активности ферментов является **катал** (кат), который соответствует количеству фермента, которое превращает 1 моль субстрата за 1 секунду.

В 1976 г. в издании “Инструкции для авторов” международного биохимического Союза было указано, что, наряду с изменением активности ферментов в каталах, единицу количества фермента можно характеризовать и другой величиной – **международной единицей** (МЕ) – количество фермента, которое катализирует превращение 1 микромоля (мкмоль) субстрата в 1 минуту. При этом объемная активность фермента выражается как МЕ/л, удельная активность – как МЕ/мг белка. При необходимости выразить результаты в каталах следует пересчитать конечные результаты по следующим формулам:

$$\text{МЕ/л} \begin{array}{c} \xrightarrow{0,0167} \\ \xleftarrow{60} \end{array} \text{мккат/л} \quad \text{или} \quad \text{МЕ/л} \begin{array}{c} \xrightarrow{16,7} \\ \xleftarrow{0,06} \end{array} \text{нкат/л}$$

В последнее время более точным определением активности ферментов считается кинетический метод со стандартом (используется лиофилизированный фермент определенной активности). Таким образом фермент проявляет свою активность в конкретных условиях

проведения реакции. Расчет проводят по формуле:
$$\text{Активн. (Е/л)} = \frac{\Delta D_{\text{пробы}}}{\Delta D_{\text{стандарта}}} \times \text{Активн. стандарта (Е/л)}.$$

Измерение по конечной точке (end point method)

Реакция, сопровождающаяся изменением фотометрического сигнала, развивается за некоторый период времени и достигает определенного конечного состояния, так называемой конечной точки. Изменение сигнала, как функция времени, представлено на рисунке 64. При измерении по конечной точке уровень сигнала соответствует количеству продуктов реакции в инкубационной среде после фиксированного времени инкубации. Поглощение измеряется после окончания реакции при стабильном значении сигнала.

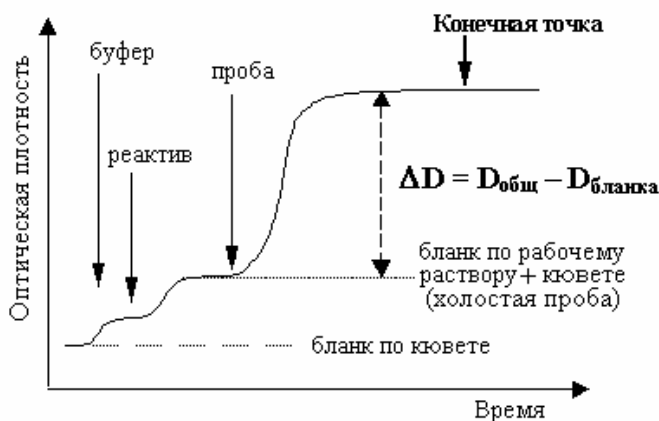


Рис. 64. Измерение по конечной точке. Стрелками показаны моменты внесения буфера, реактива и биологической пробы, в качестве которой может быть сыворотка, плазма, моча и другая биологическая жидкость

Существует несколько схем измерения по конечной точке.

1-точечное измерение на двухлучевом фотометре.

При работе на 2-х лучевом фотометре измерение ведется в режиме сравнения растворов в двух кюветах. В каждую кювету вносится одинаковое количество реактива, затем в 1 кювету вносится с биопроба с известной концентрацией и получают стандартный раствор с известной концентрацией исследуемого вещества, а в другую кювету помещают количество воды или физиологического раствора, равное количеству биопробы, и получают таким образом опорный раствор (бланк).

2-х лучевая схема фотометрирования предусматривает автоматическое вычитание бланка, при этом фотоэлектрический сигнал бланка (оптическая плотность) принимается за нулевой отсчет оптической плотности, относительно которой и проводится 1-точечное измерение. Пример изменения сигнала при построении калибровочной кривой при измерении по конечной точке представлен на рисунке 65. Измерение проводится по методу *1-точечного измерения* (1-point assay).

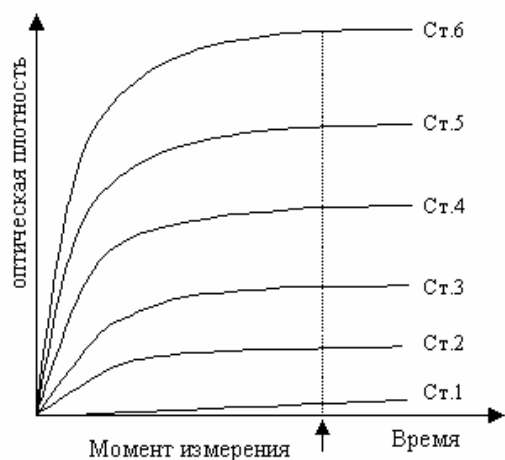


Рис. 65. **1-точечное измерение.** Сигнал развивается как функция времени для 6 стандартов (в данном случае использовались стандарты для IgA). Исходная точка - нуль. Концентрация каждого стандарта измеряется 1 раз по конечной точке (по достижении стационарного уровня)

Измерение с бланком (холостой пробой) на однолучевом фотометре.

При работе с 1-канальным фотометром 1-точечное измерение сопровождается значительной систематической ошибкой, связанной с влиянием на конечный результат рабочего реактива, в котором проводилось измерение, отражение света от стенок кюветы, темновым током фотоприемников и др.

Для исключения систематического влияния на результаты измерения внешних интерферирующих факторов (вне пробы) используют измерение относительно бланка (холостой пробы). Как правило, бланк определяется по рабочему реактиву, то есть по готовому к употреблению реактиву перед измерением пробы. Оптическая плотность пробы ($D_{пробы}$) рассчитывается по соотношению:

$$D_{пробы} = D_{конечной\ точки} - D_{бланка}$$

Процедура измерения с бланком схожа с 1-точечным измерением, но при измерении с бланком учет бланка проводится в ручном режиме.

При измерении по конечной точке с бланком рекомендуется составлять рабочую таблицу. Примером может служить таблица 10, составленная для определения аналита с использованием стандартного раствора.

Таблица 10

Рабочая таблица для определения концентрации аналита методом измерения с бланком по рабочему реактиву			
	Бланк	Стандарт	Проба
Рабочий раствор	1 мл	1 мл	1 мл
Дистиллированная вода	10 мкл	-	-
Стандарт	-	10 мкл	-
Проба	-	-	10 мкл
Перемешать, измерить оптическую плотность через 5 мин инкубации, $t=37^{\circ}\text{C}$, $\lambda=540\text{ нм}$ (520-560)			
$C_{пробы} = \frac{D_{пробы} - D_{бланка}}{D_{стандарта} - D_{бланка}} \times C_{стандарта}$			

Измерение с прозоной (assay with prozone check)

Измерение с прозоной является разновидностью измерения с бланком. При измерении в одной кювете, когда отсутствует кювета сравнения, сопоставление конечного результата проводят в кювете с рабочим реактивом до момента добавления к нему исследуемой биопробы (см. рисунок 64). Такой способ измерения характерен для биохимических анализаторов и обозначается обычно как *2-х точечное измерение с прозоной*. Таким образом, прозона – это временной период до добавления в измерительную кювету биопробы. Важно при этом, чтобы прозона не была слишком короткой и система при измерении бланка достигла стационарного состояния. При добавлении в реакционную среду нескольких реактивов прозона определяется при достижении стабильного состояния после внесения всех реактивов перед пробой.

Таким образом, бланк – это характеристика, отнесенная к шкале оптической плотности, бланк определяет оптическую плотность рабочего реактива, прозона – характеристика, отнесенная к шкале времени, она определяет момент достижения стабильного уровня рабочего реактива

Двухволновое измерение с опорной длиной волны

В отдельных случаях ставится задача учета интерферирующих (мешающих) факторов измерения, например в случае учета гемолиза, иктеричности или липимичности сыворотки или при использовании исчерпанных кювет. В таких случаях прибегают к измерению с использованием опорной волны, т. е. измерения плотности на 2 длинах волн – основной и поддерживающей. Эта схема представлена на рисунке 66. В этом случае измеряется только сигнал, связанный с исследуемым аналитом, однако часть сигнала, определяемая самим аналитом, отсекается.

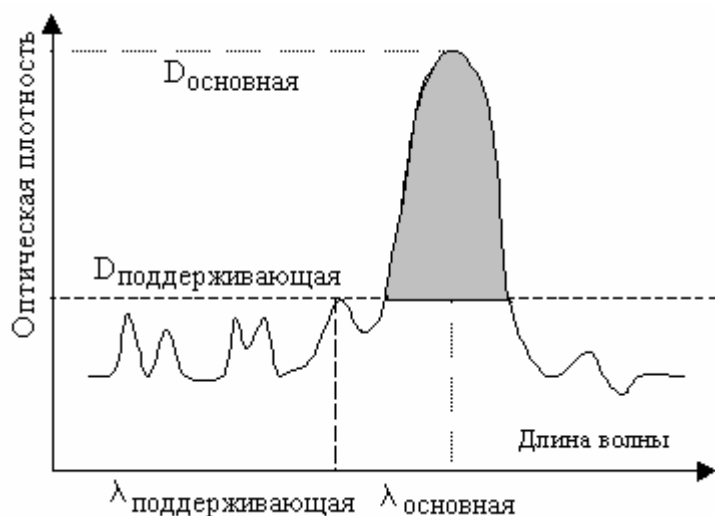


Рис. 66. Двух волновая схема измерения с использованием основной и опорной длин волн. Поглощение, соответствующая влиянию интерферирующих факторов (поглощение на соседних длинах волн), отсекается. Учитывается только плотность выше $D_{опорная}$

Данная схема может быть применена на тех приборах, у которых кювета с пробой облучается белым светом, а монохроматор (призма или решетка) расположены после кюветы (такая схема используется в биохимических анализаторах). При этом условно принято, что опорная волна не должна отступать от основной более чем на 100 нм. При использовании дискретных длин волн на биохимических анализаторах обычно в качестве опорной применяется длина волны, которая ближе всего расположена к основной. На таком принципе анализируют степень иктеричности, липимии и гемолиза для сыворотки. Спектры поглощения для билирубина, оксигемоглобина (HbO_2) и рассеивания при опалесценции липимичной сыворотки представлены на рисунке 67. Спектры гемоглобина и билирубина измеряли фотометрическим, а липиды турбидиметрическим методами.

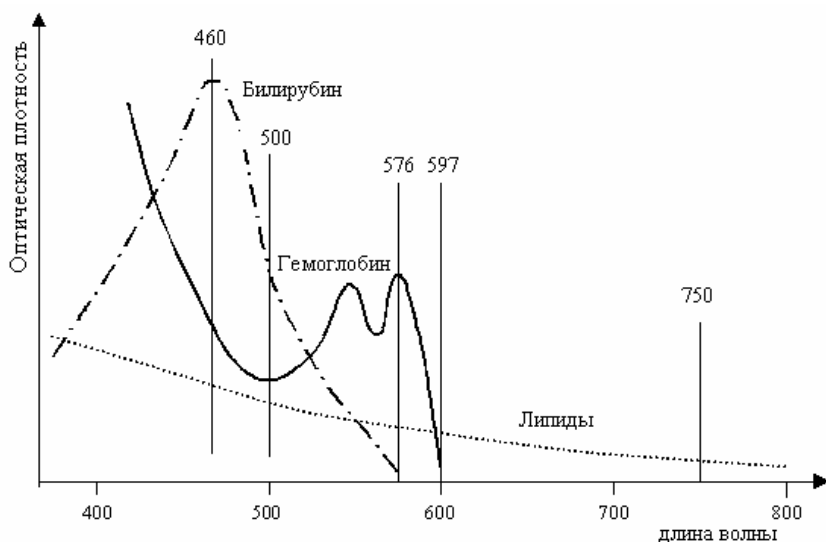


Рис. 67. Спектры поглощения оксигемоглобина, липидов и билирубина. Разница в оптической плотности на разных длинах волн используется для определения степени иктеричности, липимичности и гемолиза

Принцип получения информации о степени иктеричности, липимичности и гемолиза для сыворотки.

20 мкл сыворотки смешивают с 200 мкл дистиллированной воды, к этому раствору в качестве реактива добавляется 600 мкл 1/15 М фосфатного буфера (рН = 7,4). Приготовленный раствор измеряется на длинах волн 460, 500, 576, 597 и 750 нм. По результатам измерений вычисляются следующие величины:

1. $\Delta D 460/500$ (разность плотностей на 460 и 500 нм)
2. $\Delta D 576/597$ (разность плотностей на 576 и 597 нм)
3. $\Delta D 597/750$ (разность плотностей на 597 и 750 нм)

Полученные значения в фотометрических единицах (Б) используют для оценки степени иктеричности ($\Delta D 460/500$), гемолитичности ($\Delta D 576/597$) и липимичности ($\Delta D 597/750$) каждого значения по 4-х бальной шкале – 0, 1, 2 или 3, что соответствует часто используемой оценки этих параметров в “крестах” (-, +, ++, +++). Абсолютные значения устанавливаются для каждого прибора отдельно, так как измерение может проводиться на близких к обозначенным длинам волн и на приборах с разными оптическими характеристиками. Тем не менее, для ориентации приводим характерные ранговые значения (таблица 11). В бланке результатов анализа при проведении данной процедуры появляется «флаг», тем самым врач может оценить результат с учетом слияния интерферирующих факторов.

Таблица 11

Ранговые значения оптической плотности для оценки степени иктеричности, липимичности и гемолиза сыворотки крови.			
Ранговое значение	Иктеричность ($\Delta D 460/500$)	Гемолитичность ($\Delta D 576/597$)	Липимичность ($\Delta D 597/750$)
0 (-)	< 0,040	< 0,002	< 0,006
1 (+)	0,040 – 0,103	0,002 – 0,005	0,006 – 0,011
2 (++)	0,104 – 0,204	0,006 – 0,009	0,012 – 0,020
3 (+++)	> 0,204	> 0,009	> 0,020

Кинетические измерения (kinetic measurement).

Кинетическое измерение подразумевает определение меняющейся в ходе реакции оптической плотности. Наиболее широко кинетическое измерение используется для определения активности ферментов, хотя в последнее время разработано достаточно много методов определения концентрации субстратов в период кинетического протекания реакций.

Кинетическое измерение требует, наряду с соответствующим фотометрическим оборудованием, также точного поддержания температуры в измерительной кювете и правильного отсчета временных интервалов. Так, общепринятым считается поддержание температуры в

измерительной ячейке в пределах $\pm 0,2^{\circ}\text{C}$. Эти условия являются обязательными для кинетических методов и доступны только при использовании современных фотометров и биохимических анализаторов.

Что касается абсолютного значения температуры, то для определения активности ферментов используются 25°C , 30°C и 37°C . Температура 25°C является стандартной в физической химии, поэтому эта температура была предложена Комиссией по ферментам международного Союза по ферментам в 1961 г. В 1964 г. было предложено использовать 30°C , что связано с климатическими особенностями ряда стран и мнением о наибольшей стабильности результатов по определению активности ферментов при этой температуре. Однако в настоящее время большинство измерений в биохимических анализаторах проводится при 37°C . Фактор температуры следует строго учитывать, так как он вносит существенные изменения в показатели активности ферментов. В таблице 12 приведены пересчетные коэффициенты для коррекции температурного фактора. Эти коэффициенты носят ориентировочный характер, так как зависят не только от конкретного фермента, но и от буфера, pH, ионной силы и т.д.

Таблица 12.

Корректирующие температурные коэффициенты для активности ферментов.			
Фермент	Температура в измерительной ячейке		
	25 °C	30 °C	37 °C
Аланинаминотрансфераза (АЛТ)	1,00	1,32	1,82
Аспаратаминотрансфераза (АСТ)	1,00	1,37	2,08
α -Амилаза	1,00	1,30	1,80
γ -Глутамилтрансфераза (ГГТ)	1,00	1,37	1,79
Креатинкиназа (КК)	1,00	1,56	2,44
Лактатдегидрогеназа (ЛДГ)	1,00	1,33	1,92
Щелочная фосфатаза (ЩФ)	1,00	1,22	1,64
Холинэстераза (ХЭ)	1,00	1,24	1,55

Протекание кинетических реакций неоднозначное. На рисунке 68 представлены типичные варианты протекания кинетических реакций. Существует несколько схем кинетического измерения.

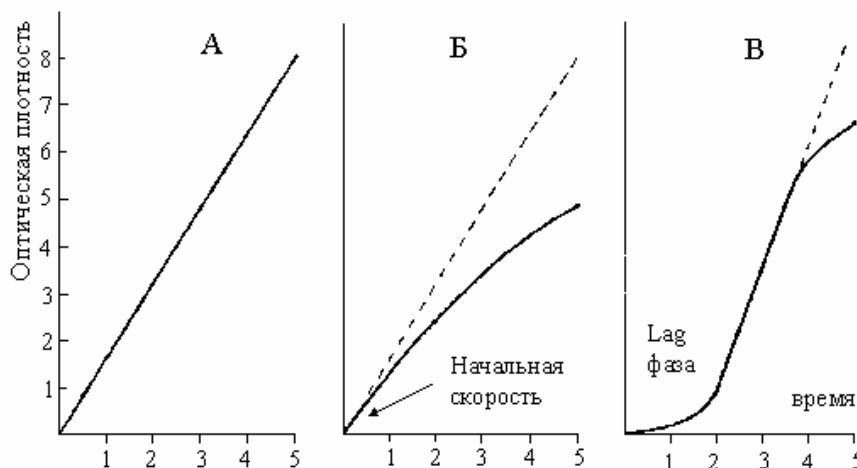


Рис. 68. Скорость ферментативной реакции как функция времени. А - скорость постоянна в течение всего периода измерения, в любой период можно по скорости реакции оценивать активность фермента, Б - скорость реакции постоянно снижается, рекомендуется активность фермента оценивать по начальной скорости, В - линейный участок, в течение которого рекомендуется определять активность фермента, устанавливается в середине периода инкубации.

Измерение по 2-точкам.

В случае постоянной скорости кинетической реакции (рисунок 68,А) измерение можно проводить на любом отрезке линейной кривой, приводя измерение поглощения к 1 минуте. Расчет ведут по формуле: $A_{кт} = \Delta D / \text{мин} \times F$.

Достоинством данного способа является простота, возможность измерения без использования стандарта, а также независимость в пределах линейного диапазона плотностей от влияний системных интерферирующих факторов. Кинетический способ измерения допустим при использовании вымытых пластиковых кювет, которые предназначены для разового использования в биохимических анализаторах, так как оптическая плотность меняется на определенное значение в любой промежуток времени и не зависит от величины оптической плотности холостой пробы. Однако необходимо убедиться, что измерение проводится в линейном диапазоне протекания кинетической реакции.

Двухточечное измерение потенциально включает возможность нескольких методических ошибок. Если реакция начинается с очень высокой скоростью, то она может замедлиться или вообще прекратиться из-за потребления всего количества субстрата. Выявить такую погрешность при 2-х точечном измерении не представляется возможным. На ошибку указывает несоответствие результатов биохимического исследования клиническим данным. Реакция вообще может иметь нелинейный характер.

Реакция может задержаться на старте (Lag фаза в мультиферментных тестах, рисунок 68, В). Наличие Lag фазы, как правило, объясняют выравниванием температуры и задержкой для равномерного перемешивания пробы с реактивом, однако основное значение имеет, по-видимому, задержка для образования комплекса субстрата [S] с ферментом [E], поэтому Lag фаза может подолжаться до нескольких минут. При кинетических исследованиях существенное значение имеет порядок внесения реактивов. Считается правильным для лучшего перемешивания реактив большего объема добавлять к меньшему объему, в измерительную кювету сначала вносится биопроба (меньший объем), а затем рабочий реактив (большой объем), то есть, стартуют реактивом. В современных биохимических анализаторах программы составлены так, что в качестве стартового реактива используют сыворотку, то есть, к большому объему добавляют меньший. Перемешивание в этих случаях достигается использованием специальной процедуры, в частности, разного рода шейкеров или вибрации игл дозаторов, которые эффективно и стандартно перемешивают реакционную среду. При ручном дозировании качественного перемешивания добиться достаточно трудно. Кроме того, в случае определения НАДн-дегидрогеназ при старте сывороткой может быть допущена ошибка, связанная с накоплением эндогенных продуктов. Например, при определении активности лактатдегидрогеназа (ЛДГ) может в пробе накопиться эндогенная ривиноградная кислота, которая будет завышать результат.

Многоточечное измерение.

В клинической химии для измерений, в которых регистрируется более 2 точек, принят термин “кинетическое” измерение, хотя 2-х точечное измерение также кинетическое. Непрерывное (многоточечное) измерение оптической плотности в ходе реакции позволяет оценивать характер кинетики и выбирать для расчетов линейный участок кривой.

Многочетное измерение прироста концентрации продукта реакции (снижения субстрата, либо изменения состояния кофермента) считается наиболее точным методом определения активности ферментов. Изменение оптического поглощения в этом случае должно быть одинаковым за равные промежутки времени (допуск отклонений от линейности не должен превышать 10 %).

Измерение по начальной скорости (initial rate)

Скорость ферментативной реакции зависит от соотношения концентрации субстрата и количества фермента. Рисунок 69 показывает, что скорость реакции может увеличиваться в зависимости от количества фермента при одинаковой начальной концентрации субстрата. Такая зависимость возникает в тех случаях, когда количество фермента мало.

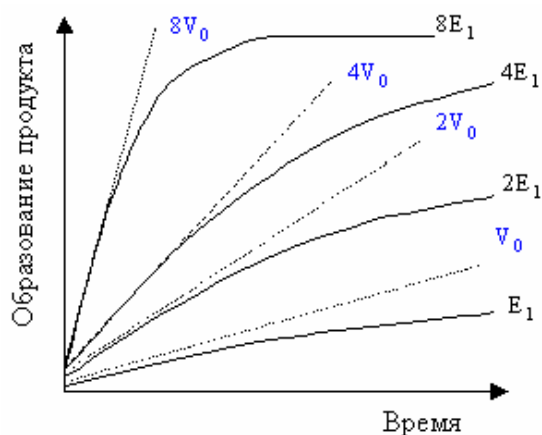


Рис. 69. Кинетические кривые при разной низкой концентрации фермента и постоянной начальной концентрации субстрата. Начальная скорость V_0 удваивается при удвоении количества фермента. Тем не менее, кинетика реакции нелинейна, поэтому о содержании фермента можно судить по начальной скорости, которая регистрируется.

В конечном счете, плато будет достигнуто на одном уровне, но время достижения плато может быть чрезвычайно продолжительным. Поэтому в таких случаях не ждут достижения плато, а работают на нелинейном участке. Технически регистрируется значение максимальной скорости изменения оптической плотности (рисунок 70), то есть производная $\Delta D / \Delta t$. Как правило, она имеет место в начале реакции (рисунок 68, Б), когда концентрация субстрата максимальна, поэтому способ называется – по начальной скорости. Очевидно, что такой способ регистрации доступен только автоматическим анализаторам, оснащенным соответствующей вычислительной техникой.

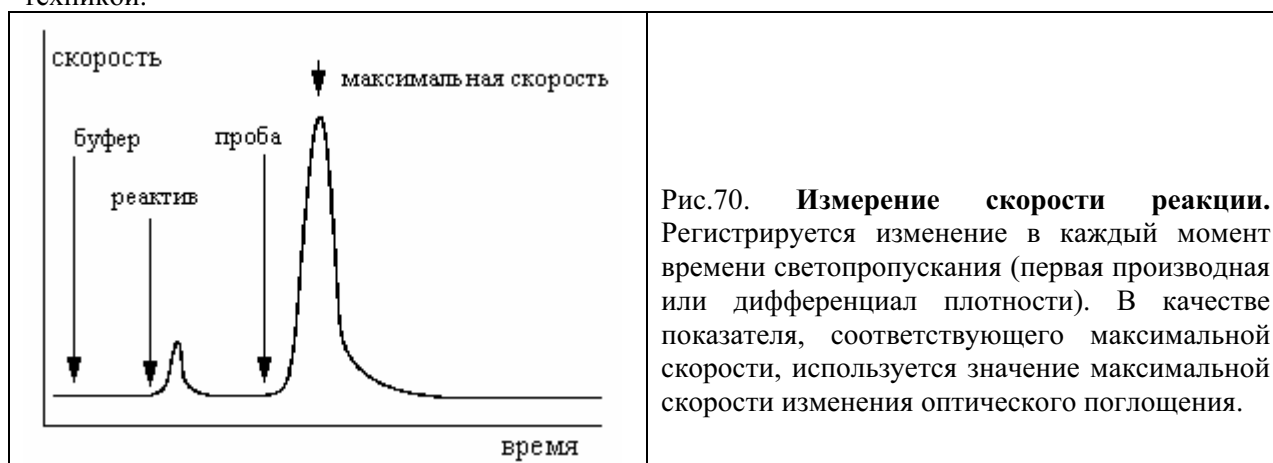


Рис.70. Измерение скорости реакции. Регистрируется изменение в каждый момент времени светопропускания (первая производная или дифференциал плотности). В качестве показателя, соответствующего максимальной скорости, используется значение максимальной скорости изменения оптического поглощения.

Кинетический метод с коррекцией по бланку образца.

Кинетический метод измерения в клинической химии используется не только для определения активности ферментов, но и для количественного измерения концентрации субстратов. При этом возможны варианты, при которых одновременно меняется бланк рабочего реактива (рисунок 71). В этом случае в расчетах необходимо учитывать коррекцию по бланку образца (рабочего реактива) и вести расчеты по соотношению:

$$C_{\text{пробы}} = \frac{\Delta D_{\text{пробы}} - \Delta D_{\text{бланка}}}{\Delta D_{\text{стандарта}} - \Delta D_{\text{бланка}}} \times C_{\text{стандарта}}$$

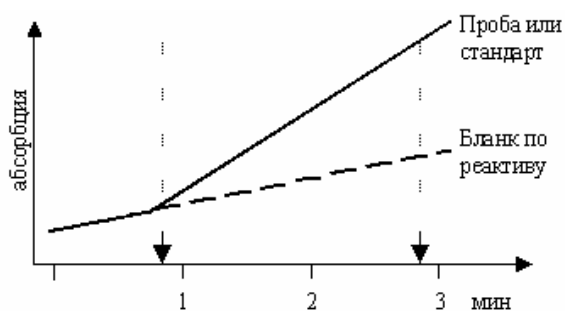


Рис. 71. Кинетическое измерение с коррекцией по бланку образца. Программа используется при нестабильном бланке. Стрелками указаны возможные моменты измерения пробы и бланка

ТУРБИДИМЕТРИЯ И НЕФЕЛОМЕТРИЯ

Турбидиметрия и нефелометрия в клинической химии используется в основном для определения индивидуальных белков. Особенностью таких определений является построение калибровочного графика с использованием не менее пяти концентраций, так как калибровочный график имеет нелинейный характер.

Кривая доза-эффект. (Калибровочный график, отражающий реакцию взаимодействия антигена и антитела).

Реакция антиген-антитело, проявляется в растворе в виде образования агрегатов. Схематически реакцию взаимодействия антигенов (Ag) с антителами (At) можно изобразить следующим образом: если при определении антигена ввести в тест-систему постоянное количество антител, то при невысокой концентрации белка (антигена) все антигены связаны с антителами, если образующиеся иммунные комплексы осадить центрифугированием, то в супернатанте можно определить несвязанные антитела. Такое явление называется избытком антител или антитело-экссесс (рисунок 72, А). При увеличении концентрации Ag повышается оптическая плотность.

Когда концентрация антигенов и антител пропорциональна, происходит связывание всех антител и антигенов, такой комплекс выпадает в осадок в виде преципитата и в супернатанте не определяются антитела и антигены. Такое состояние определяют как эквивалентное (рис. 72, Б).

При дальнейшем увеличении концентрации антигенов количество антител бывает недостаточным для полного связывания белка. При этом частицы иммунных комплексов становятся мелкими, преципитат практически не формируется. В супернатанте при этом определяются свободные антигены. Такое явление носит название антиген экссесс (рисунок 72 В).

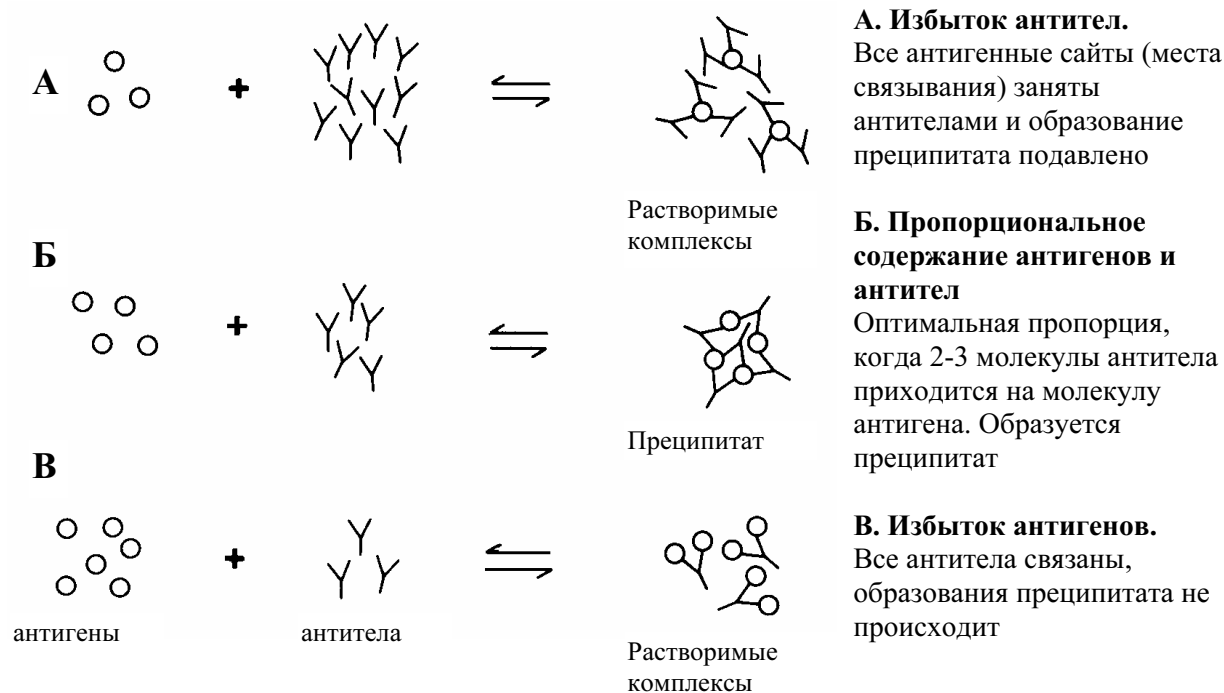


Рис. 72. Схематическая диаграмма формирования преципитата при взаимодействии антиген-антитело.

В 1929г. Heidelberger и Kendall описали график классической преципитационной кривой. График носит название кривой Хайдельбергера-Кендаля (рисунок 73). Эту кривую можно разделить на 3 зоны:

- 1) *Зона избытка антител:* Величина преципитатов увеличивается по мере добавления антигенов, в супернатанте сохраняются свободные антитела
- 2) *Зона соответствия антигена и антитела:* Имеет место максимальная преципитация, супернатант не содержит ни свободных антител ни свободных антигенов
- 3) *Зона избытка антигенов:* Из-за высокой концентрации антигенов формируются небольшие иммунные комплексы, а не преципитат, супернатант содержит свободные антигены.

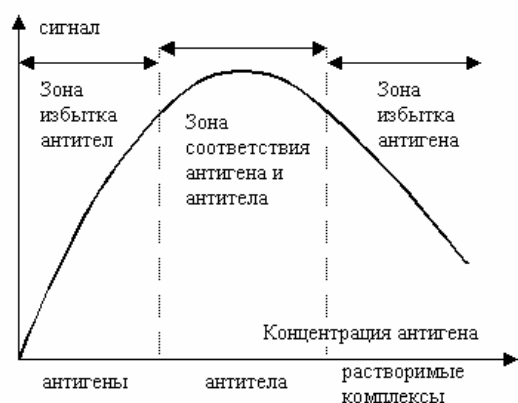


Рис. 73. Кривая доза-эффект при образовании комплексов антиген-антитело в иммунохимической реакции (кривая Хайдельбергера-Кендаля)

Такая форма кривой характерна практически для всех методов иммунопреципитации, включая иммунотурбидиметрию и иммунонефелометрию, и рассматривается в этих методах как кривая доза-эффект.

Калибровочный график

Для практических измерений необходимо, чтобы регистрация проводилась на восходящем участке кривой доза-эффект, этот участок используется в качестве калибровочного графика (стандартной кривой) (рис. 74).

Калибровочная кривая строится для каждого индивидуального белка, для каждого прибора, при любом изменении условий регистрации и периодически по мере проведения исследований. При серийных исследованиях в стандартных условиях допускается корректировка графика на основании измерения одного из стандартов. Это основано на наблюдении о том, что характерный вид стандартной кривой не меняется из-за влияния систематических факторов, а происходит параллельный сдвиг всего графика. В этих случаях производят пересчет графика, так, чтобы он шел параллельно первичной кривой, но проходил бы через новую точку. Для построения калибровочного графика используются стандарты, которые фирма-поставщик соответствующих тест-наборов обязана предоставлять пользователям или их необходимо выписывать отдельно.

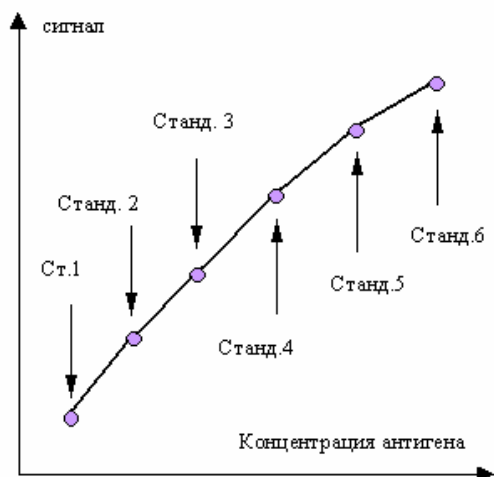


Рис. 74. **Калибровочный график**, характерный для определения индивидуальных белков турбидиметрическим и нефелометрическим методами. Для построения графика требуется, по крайней мере, 5 стандартных растворов антигена

Так как зависимость концентрации белка от сигнала измерения определяется кривой Хайдельбергера-Кендаля, то очень большое значение имеет оптимальное отношение содержания антител и антигенов в реакционной смеси. Обычно состав реакционной смеси подбирается фирмами производителями наборов таким образом, чтобы определение проводилось в зоне кривой доза-эффект, обозначаемой как зона избытка антител (антитело эксцесс). Иногда при очень высокой концентрации белка в определяемой биологической жидкости антител для образования иммунного комплекса бывает недостаточно (антиген эксцесс) и частицы преципитата становятся мелкими, определение попадает в нисходящую часть кривой Хайдельбергера-Кендаля, в которой с увеличением концентрации белка сигнал прибора уменьшается. В результате может быть выдан неправильный результат (вместо высокой концентрации — низкая концентрация белка). Чтобы избежать этого проводят разведение биологической жидкости. Если сигнал прибора увеличивается, это свидетельствует о том, что определение проводилось в нисходящей части кривой и допущена ошибка. Разведение проводят до такой концентрации белка, чтобы она располагалась в зоне избытка антител (восходящий отрезок калибровочного графика). Полученный при конечном разведении результат умножают на степень разведения.

Многие современные приборы (турбидиметры и нефелометры) способны определять и отслеживать избыток антигенов автоматически. Процедура основана на регистрации ускорения реакции после добавления дополнительного количества антигена, в качестве которого используются малые дозы калибратора. Схема такого метода представлена на рис. 75. Если после дополнительного внесения в реакционную среду антигена, реакция ускоряется, то, следовательно, реакция протекает с избытком антител и измерение проводится верно, на восходящем отрезке кривой доза-эффект. Если же дополнительное добавление антигена не приводит к ускорению преципитации, то измерение проводится при избытке антигена на нисходящем отрезке кривой доза-эффект. Измерение необходимо повторить при обязательном разведении образца, так как в нем имеется избыток антигена.

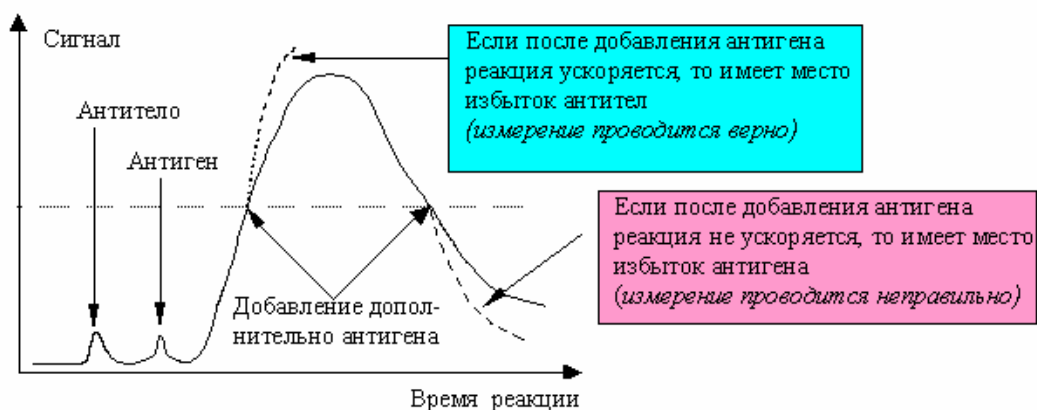


Рис. 75. Способ определения, в какой зоне кривой доза-эффект - избытка антител или избытка антигена - происходит измерение. Если реакция ускоряется после дополнительного добавления антигена (калибратора), то измерение проводится верно

При постановке иммунотурбидиметрических реакций на обычном фотометре для предупреждения ошибки, связанной с избытком антигена, необходимо знать диагноз заболевания. Следует подчеркнуть, что избыток антигена чаще всего наблюдается в чрезвычайных ситуациях. Например, при миеломной болезни концентрация IgG (Ag) может быть очень высокой, и исследование попадает в зону избытка антигена. Чтобы избежать такой ошибки, необходимо знать диагноз и оценить данные электрофоретического определения белков и концентрации общего белка. При наличии М-градиента и высокой концентрации общего белка пробу на IgG нужно развести и повторно определить IgG иммунотурбидиметрическим методом.

Методы турбидиметрии и нефелометрии можно автоматизировать, что делает возможным получение результата анализа в течение нескольких минут. При сравнении методов турбидиметрии и нефелометрии, как правило, считается, что нефелометрический метод более чувствителен, так как в этом случае измеряется только рассеянный свет. При турбидиметрических измерениях в относительно прозрачных средах, когда проходит до 95 % светового потока, достаточно трудно избавиться от небольших флуктуаций в работе источника излучения и нестабильности всей измерительной системы. Тем не менее, за последнее время созданы достаточно стабильные высокоразрешающие фотометрические системы, поэтому турбидиметрические измерения стали конкурентными с нефелометрическими методами по чувствительности для количественных иммунохимических измерений в клинической биохимии. Методы позволяют с высокой специфичностью и чувствительностью определять концентрацию белка в количестве 1 мг в литре. При более низких концентрациях нефелометрия остается предпочтительным методом.

Подчеркиваем, что в качестве стандартов и контрольных материалов для турбидиметрии и нефелометрии необходимо использовать специально подготовленные стандарты и контрольные сыворотки, содержащие индивидуальные белки, концентрация которых измерена турбидиметрическим или нефелометрическим методами с использованием иммунохимической реакции.

ФОТОМЕТРИЧЕСКИЕ СХЕМЫ ИЗМЕРЕНИЯ ОПТИЧЕСКОГО ПОГЛОЩЕНИЯ РАСТВОРОВ.

Простейшая схема измерения изображена на рисунке 56. Эта схема подразумевает, что интенсивность светового потока, падающего на исследуемый раствор известна. Измерить абсолютное значение интенсивности этого потока с достаточной точностью невозможно, так как часть падающего потока отражается от стенок сосудов содержащих раствор (см. рисунок 45) и учесть величину этого отражения сложно. Поэтому в аналитической химии и биохимии проводят относительные фотометрические измерения. Метод измерения оптического поглощения исследуемого раствора относительно раствора сравнения в одной и той же спектральной полосе излучения реализуется двумя основными схемами:

1. Схемой фотометрирования с одним световым лучом (однолучевое фотометрирование).
2. Схемой фотометрирования с двумя световыми лучами (двухлучевое фотометрирование).

Однолучевое фотометрирование (рисунок 76). Вначале измеряется сигнал фотодетектора, соответствующий величине излучения $I_{ст}$, прошедшего через раствор сравнения (стандартный раствор, холостую пробу) и кювету, содержащую этот раствор. Оптическая плотность кюветы с раствором сравнения $D_{ст+пробир}$ и сигнал $I_{ст}$ связаны соотношением:

$$D_{ст+пробир} = \lg \frac{I_0 - I_{отр}}{I_{ст}}.$$

Затем измеряется сигнал фотодетектора, соответствующий величине излучения I_n , прошедшего через кювету с исследуемой пробой. Оптическая плотность исследуемого раствора $D_{n+пробир}$ и сигнал I_n связаны соотношением:

$$D_{n+пробир} = \lg \frac{I_0 - I_{отр}}{I_n}.$$

Искомая плотность D_n равна:

$$D_n = D_{n+пробир} - D_{ст+пробир} = \lg \frac{I_0 - I_{отр}}{I_n} - \lg \frac{I_0 - I_{отр}}{I_{ст}} = \lg \frac{I_{ст}}{I_n}$$

Рассмотренная схема измерения содержит одно измерительное плечо. Чтобы измерить сигналы, соответствующие $I_{ст}$ и I_n необходимо попеременно вводить в измерительное плечо кювету с исследуемым раствором и кювету с раствором сравнения. Такую схему называют схемой прямого фотометрирования.

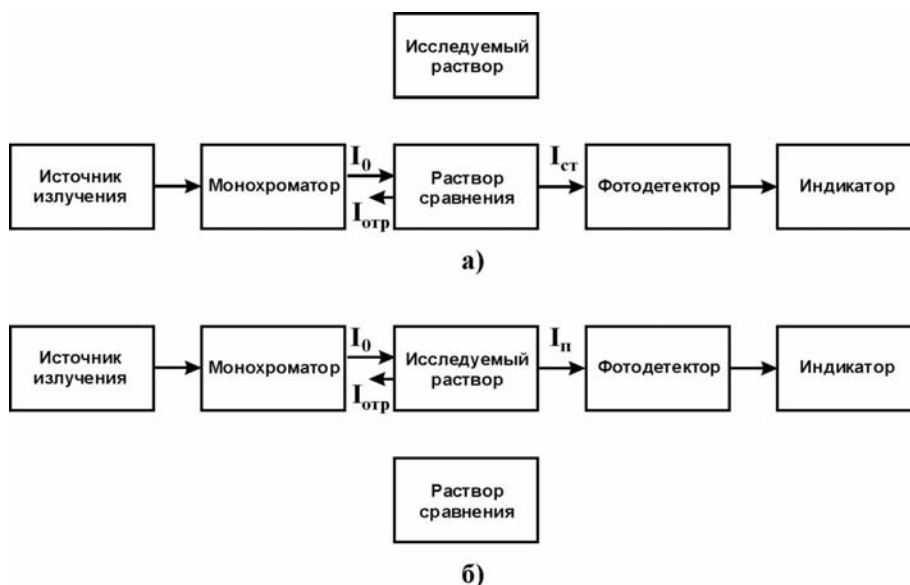


Рис. 76. Схема однолучевого метода измерения оптической плотности

исследуемого раствора относительно раствора сравнения в одной и той же спектральной полосе излучения.

Последовательно измеряется оптическая плотность кюветы со стандартом (а) и исследуемой пробой (б)

Измерение оптической плотности проводится в одном канале последовательно. Вначале измеряется сигнал раствора сравнения (а), затем – исследуемого раствора (б). Результаты регистрируются отдельно, обработка производится вручную. Недостаток метода в большом временном интервале между фотометрированием растворов, что приводит к погрешностям измерений из-за временной нестабильности оптико-электронного тракта (источника излучения и фотоприемников).

Двухлучевое фотометрирование. Оптическая плотность исследуемого и сравнительного образцов измеряется одновременно в двух каналах. Далее могут быть различными схемы сопоставления сигналов. На рисунке 77 показана схема, при которой сигналы поступают на 2 фотоприемника и представляются на 2-х индикаторах. Устраняется временная нестабильность источника излучения. Недостаток схемы в наличии 2-х фотоприемников имеющих разную временную стабильность параметров, что приводит к погрешностям измерений.

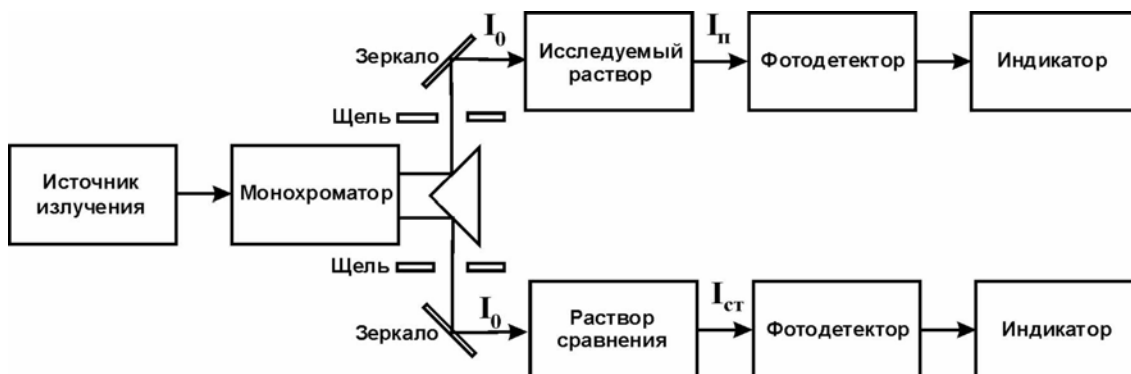


Рис. 77. Схема двухлучевого фотометрирования с одним монохроматором и с двумя отдельными каналами измерения.

На рисунке 78 представлена схема, при которой оптическая плотность исследуемого и сравнительного образцов измеряется одновременно в двух каналах, сигналы поступают на 2 фотоприемника и на устройство сравнения. Устройство сравнения может быть нуль-индикатором, в этом случае одной из щелей добиваются выравнивания сигналов в 2-х каналах. Искомую величину находят по шкале на щели (ФЭК-56). В другом случае на индикатор может выводиться искомая величина.

Устраняется временная нестабильность источника излучения. Недостаток схемы в наличии 2-х фотоприемников, имеющих разную временную стабильность параметров, что приводит к погрешностям измерений.



Рис. 78. Схема двухлучевого фотометрирования с одним монохроматором, с двумя фотоприемниками и устройством сравнения.

Схема с «разделением» 2-х лучей во времени (рисунок 79). Два луча от монохроматора приходят на вращающийся диск с зеркальными и прозрачными секциями (переключатель лучей). Короткие импульсы 2-х лучей, разделенные во времени, поступают на один фотоприемник. Импульсные сигналы фотоприемника сравниваются анализатором и на индикатор поступает искомая величина. Устраняется временная нестабильность источника излучения и фотоприемного тракта. Наиболее точная схема измерения.

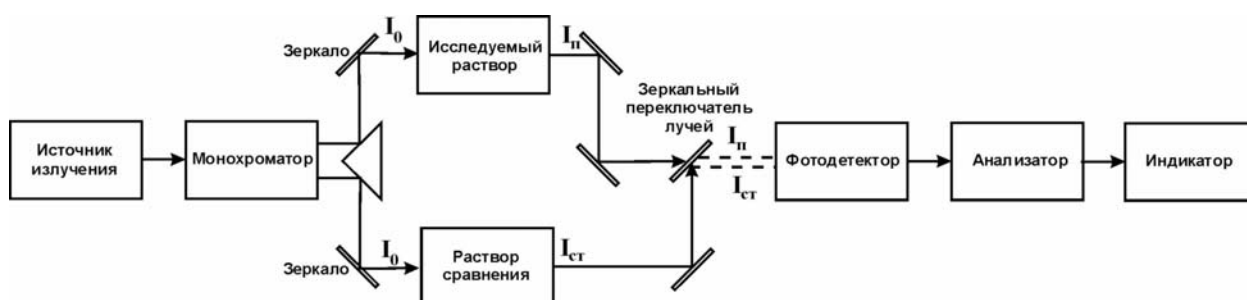


Рис. 79. Схема двухлучевого фотометрирования с «разделением» 2-х лучей во времени с одним монохроматором, одним фотоприемником и анализатором.

ПРИБОРЫ И КОМПОНЕНТЫ ДЛЯ ФОТОМЕТРИЧЕСКОГО АНАЛИЗА.

СТРУКТУРНЫЕ СХЕМЫ ФОТОМЕТРОВ

Фотометр

Фотометр – оптический прибор, позволяющий измерять световой поток на фиксированных длинах (диапазонах) волн. Основные компоненты одноканального (однолучевого) фотометра показаны на рисунке 80.

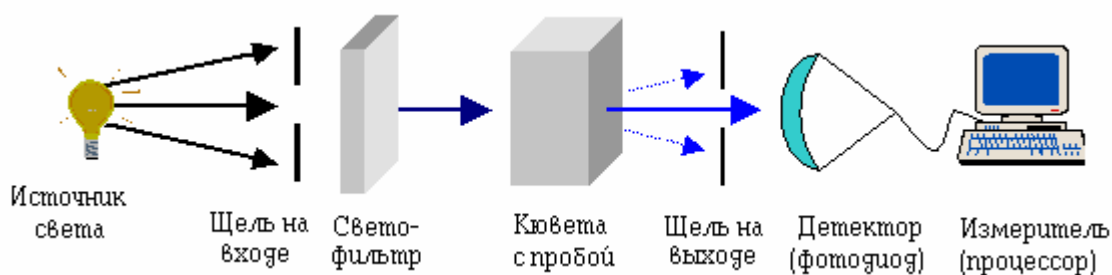


Рис.80. Основные компоненты одноканального фотометра

Свет от источника излучения проходит через входную щель и попадает на светофильтр, который пропускает узкую область спектра, необходимую для измерения. Свет попадает на кювету с образцом, частично, в зависимости от количества исследуемого вещества, поглощается в кювете. Прошедший через кювету свет отделяется на выходной щели от рассеянного света. На фотоприемнике световой поток преобразуется в электрический сигнал, который измеряется микропроцессором. Величина прошедшего через кювету света зависит от состава и количества вещества в кювете. Как указывалось выше, в одноканальном фотометре измерение холостой пробы, калибратора, опытных проб и контролей измеряется последовательно, в двухканальном фотометре измерение может проводиться по схеме компенсации, т.е. постоянного сравнения с бланком (холостой пробой).

Спектрофотометр

Спектрофотометр – оптический прибор, который разлагает световой поток на непрерывный спектр и позволяет измерять его на любой длине волны в пределах оптического диапазона. В качестве диспергирующего устройства, разлагающего свет на монохроматический, используется диспергирующая призма или дифракционная решетка.

Последовательность и месторасположение отдельных оптических элементов и систем на пути следования светового потока от источника света до детектора излучения в том или ином спектрофотометре характерны для данного прибора. Существенным для спектрофотометра является возможность непрерывной регистрации спектра, разрешающая способность.

Основные элементы спектрофотометра представлена на рисунке 81. Свет пропускается через монохроматор, чтобы обеспечить выбор желательной области спектра, которую нужно использовать для измерений. Щели нужны, чтобы выделить узкий луч света и, тем самым, улучшить цветную чистоту. Свет затем проходит через поглощающую ячейку (кювету), где часть излучательной энергии поглощается, в зависимости от природы и концентрации раствора. Не поглощенный свет попадает на фотоприемник (фотоэлемент, фотоумножитель, фотодиод и др.), преобразующий энергию излучения в электрический сигнал, величина которого может быть зарегистрирована измерительным устройством и выведена на стрелочный или цифровой индикатор.

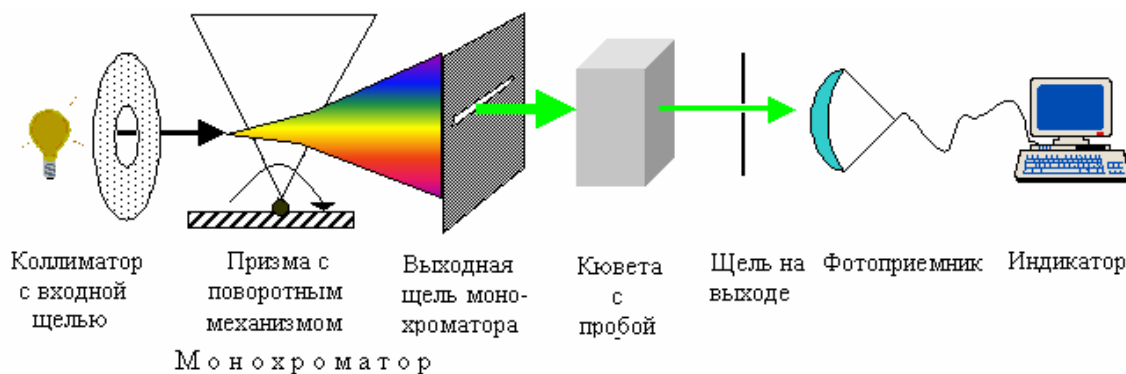


Рис. 81. Основные компоненты спектрофотометра

Особенности фотометрической схемы биохимических анализаторов

Основой функционирования биохимического анализатора является получение избыточной информации, из которой компьютер с мощным программным обеспечением отбирает необходимые данные. Для получения многопараметрической информации биохимические анализаторы оснащены, как правило, полихроматорами (рис. 82), которые позволяют одновременно регистрировать оптическую плотность исследуемых растворов на нескольких длинах волн.

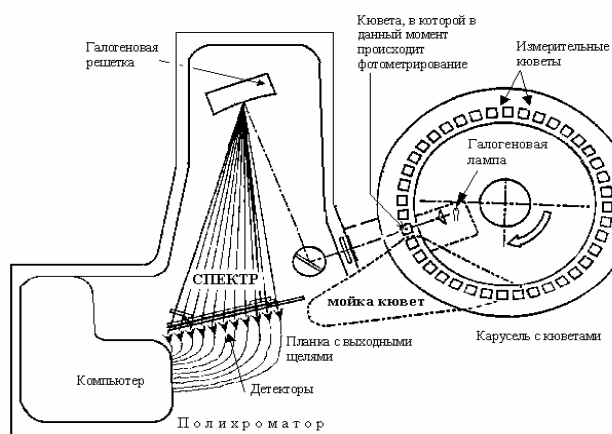


Рис. 82. Типичная схема основных узлов фотометрического блока биохимического анализатора. Использование нескольких фотодиодов, регистрирующих одновременно сигналы разных частей спектра, является основным компонентом полихроматора.

Источник света (как правило, галогеновая лампа) находится внутри карусели с измерительными кюветами, в которых содержатся пробы для измерения. Карусель через фиксированные промежутки времени, примерно через 20 с, совершает оборот, при котором все кюветы освещаются белым светом, проходящим через входную щель. Таким образом, каждые 20 с все кюветы, находящиеся на карусели, фотометрируются белым светом, причем часть из кювет может быть пустой или моется в этот период, тем не менее, данные о них поступают в компьютер. Прошедший через кювету свет разлагается на решетке в спектр и измеряется серией (до 12 штук) детекторов, каждый из которых настроен на определенную длину спектра, включая измерение в ультрафиолете и ближнем инфракрасном диапазоне (полихроматор). Компьютер анализирует результаты измерений всех детекторов, представляет результаты в конечном виде, кроме того, компьютер через соответствующие датчики контролирует работу практически всех узлов анализатора.

Таким образом, в фотометрах и спектрофотометрах происходит селекция светового сигнала, отражающего концентрацию субстрата или активность фермента в пробе. В биохимических анализаторах измеряются многократно многочисленные кюветы с пробами по нескольким спектральным характеристикам, а компьютер по заданной программе выбирает необходимые сигналы и на основе анализа их изменения рассчитывает концентрацию или активность аналитов.

КОМПОНЕНТЫ ФОТОМЕТРИЧЕСКИХ ПРИБОРОВ

Источники света.

Тепловые источники света.

Типичными тепловыми излучателями являются лампы накаливания. В их запаянной, заполненной вакуумом или инертным газом, колбе вольфрамовая спираль под действием электрического тока накаляется до высокой температуры (около 2600-3000 °K), в результате излучается тепло и свет. Спектр излучения лампы накаливания является непрерывным и полностью перекрывает оптический диапазон от 340 до 1000 нм. Однако, интенсивность излучения в ультрафиолетовой части спектра в сотни раз меньше, чем в красной области (рисунок 83). Неравномерность спектра приходится «выравнивать» с учетом спектральной чувствительности фотоприемника введением в оптическую схему фотометра специальных поглощающих светофильтров.

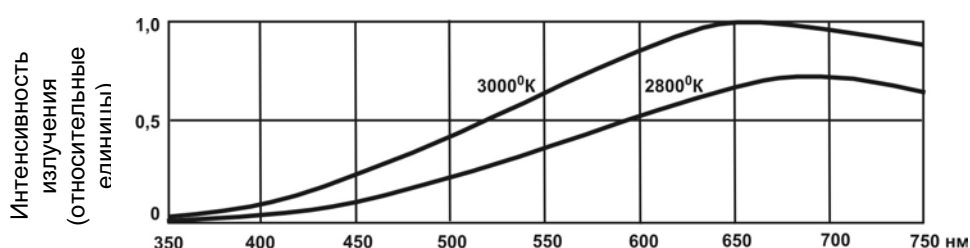


Рис. 83. Спектры вольфрамовой лампы накаливания при температурах 3000°K и 2800°K.

Важнейшие свойства лампы накаливания - световая отдача и срок службы - определяются температурой спирали. При повышении температуры спирали возрастает яркость, но вместе с тем сокращается срок службы. Сокращение срока службы является следствием того, что испарение материала, из которого сделана нить, при высоких температурах происходит быстрее, колба темнеет, а нить накала становится все тоньше и в определенный момент расплавляется, лампа выходит из строя.

Потемнение колбы можно значительно сократить за счет увеличения давления газов-наполнителей, преимущественно тяжелых (аргон, криптон, ксенон), ведущего к уменьшению скорости испарения атомов вольфрама.

Галогеновые лампы.

Галогенные лампы накаливания по структуре и принципу действия сравнимы с лампами накаливания, но они содержат в газе-наполнителе незначительные добавки галогенов (бром, хлор, фтор, йод) или их соединения. С помощью этих добавок возможно в определенном температурном интервале практически полностью устранить потемнение колбы и обусловленное этим уменьшение светового потока (рис. 84). Размер колбы в галогенных лампах накаливания может быть сильно уменьшен, вследствие чего, с одной стороны, можно повысить давление в газе-наполнителе, а, с другой стороны, становится возможным применение дорогих инертных газов криптона и ксенона в качестве газов-наполнителей. Повышение давления инертных газов внутри колбы значительно уменьшает испарение вольфрама и увеличивает тем самым время работы лампы, которое составляет для современных ламп до 4000 часов (против ~ 100 часов для обычных ламп).



Рис. 84. **Вольфрам-галогенный цикл.** Испаренный из спирали в процессе работы лампы вольфрам попадает в результате диффузии или конвекции в температурную область ($T_1 < 1400$ К) вблизи стенки колбы, где образует стабильное вольфрам-галогенное соединение. Вместе с тепловым потоком эти соединения снова перемещаются в зону горячей спирали ($T_2 > 1400$ К) и там распадаются. Часть вольфрама восстанавливается на спирали, но уже на новом месте. Нормальный вольфрам-галогенный цикл приводит к предотвращению потемнения колбы, но не к увеличению срока службы, который закончится в результате разрыва спирали на возникших "горячих ячейках".

Газоразрядные лампы.

Водородные и дейтериевые лампы представляют собой стеклянную трубку с кварцевым окошком или кварцевую трубку, содержащую анод и катод, заполненную газом водорода или дейтерия. Эти лампы относятся к газосветным источникам с дуговым разрядом. Они дают непрерывный спектр в УФ-области (185—360 нм), который возникает при рекомбинации свободных электронов с ионизированными атомами водорода или дейтерия, наполняющими газоразрядный баллон.

В газе всегда находится некоторое количество свободных электронов и ионов, которые образуются под действием УФ- и космического излучений. При наложении разности потенциалов электроны начинают двигаться к аноду, а ионы - к катоду. Лампы имеют нагреваемые термоэлектронные катоды, которые выделяют термоэлектроны (как правило, нагреваемые катоды включают за 1 мин до зажигания газового разряда). Часть нейтральных атомов водорода или дейтерия при столкновении с вторичными электронами и термоэлектронами ионизируется, что вызывает свечение, которое формирует непрерывный спектр в УФ-диапазоне длин волн.

Дуговые ртутные лампы.

Ртутно-кварцевые лампы относятся к смешанным (люминесцентно-тепловым) источникам с высокой интенсивностью излучения. Широко распространенными являются лампы типа ДРТ (ДРТ-230, ДРТ-400 и ДРТ-1000) Название ламп отражает их основные конструктивные особенности: ДРТ - дуговая, ртутная, трубчатая.

Лампы типа ДРТ имеют самонагревающиеся вольфрамовые электроды, покрытые оксидной пастой. В полость кварцевой колбы лампы помещают строго определенное количество ртути и спектрально-чистый аргон при давлении 1,5—3,0 кПа. Питание ртутно-кварцевых ламп перечисленных типов осуществляют от сети переменного тока с частотой 50 Гц и напряжением 220 В. Для нормального включения и работы ламп необходима соответствующая пускорегулирующая аппаратура. После зажигания дугового разряда происходит нагревание разрядной трубки и начинается испарение ртути, возрастает давление ее

паров, изменяются электрические параметры ртутно-кварцевых ламп. Этот начальный период с неустановившимся режимом составляет от 5 до 10 мин для разных типов ламп. Затем при стабильном напряжении питания ламп их электрические параметры стабилизируются, лампа начинает работать в установившемся режиме.

Основную часть излучения ламп типа ДРТ составляет излучение плазмы дугового разряда паров ртути, имеющее линейчатый спектр (таблица 13). Кроме спектральных линий ртути хорошо заметен спектр, обусловленный высокой температурой от дугового разряда, приводящего к свечению раскаленных газов, стенок и электродов газоразрядной трубки. Таким образом, спектры излучения ламп данного типа охватывают УФ-, видимую и ИК-области спектра.

Таблица 13

Относительное распределение потока излучения ламп типов ДРТ-230, ДРТ-400 и ДРТ-1000			
Длина волны спектральной линии, нм	Поток излучения линии, %	Длина волны спектральной линии, нм	Поток излучения линии, %
248,2	10,5	302,2	31,2
253,7	26,1	312,6	68,0
265,2	23,4	334,1	6,6
270,0	4,1	365,0	100,0
275,3	3,2	404,7	35,9
280,0	10,3	435,8	62,4
2894	5,0	546,1	71,8
296,7	14,3	577,0	70,4

Срок службы ламп типа ДРТ составляет 1500—3000 ч. Он определяется в основном уменьшением прозрачности кварцевой трубки для УФ-излучения.

В спектрофотометрах СФ-26 и СФ-46 для градуировки используют газовые лампы дугового разряда с низким давлением - ртутно-гелиевые лампы типа ДРГС-12, колба которой заполняется небольшим количеством ртути и инертным газом (гелием) до давления в несколько миллиметров ртутного столба.

В настоящее время разработаны и широко применяются в фотобиологических исследованиях источники света на основе ртутного разряда высокого давления с излучающими добавками галогенидных солей. Такие лампы позволяют получить излучение, сконцентрированное в одной или нескольких областях оптического диапазона. Так, эффективный диапазон излучения металлогалогенных ламп лежит в УФ-области в пределах 250—400 нм (лампы ДРТИ-125 и ДРТИ-1000) или в видимой области в пределах 400-450 нм (лампы ДРТИ-125-1 и ДРТИ-1000-1) и пределах 530-580 нм (лампы ДРТИ-125-2 и ДРТИ-1000-2).

Светоизлучающие диоды.

Светоизлучающий диод (светодиод) – это полупроводниковый прибор, преобразующий электрическую энергию в энергию оптического излучения на основе явления инжекционной электролюминисценции. В светодиоде при протекании в нём постоянного или переменного тока в область полупроводника инжектируются избыточные носители тока - электроны и дырки; их **рекомбинация** сопровождается оптическим излучением. Светодиоды испускают некогерентное излучение, но, в отличие от тепловых источников света, - с более узким спектром, вследствие чего излучение в видимой области воспринимается как одноцветное. Спектр излучения зависит от полупроводникового материала и его легирования. Применяются соединения типа GaP, GaN, GaP, GaAs, SiC, а также твёрдые растворы (например, $GaAs_{1-x}P_x$, $Al_xGa_{1-x}As$, $Ga_{1-x}In_xP$).

Примеры светодиодов и их спектры приведены на рисунке 85.

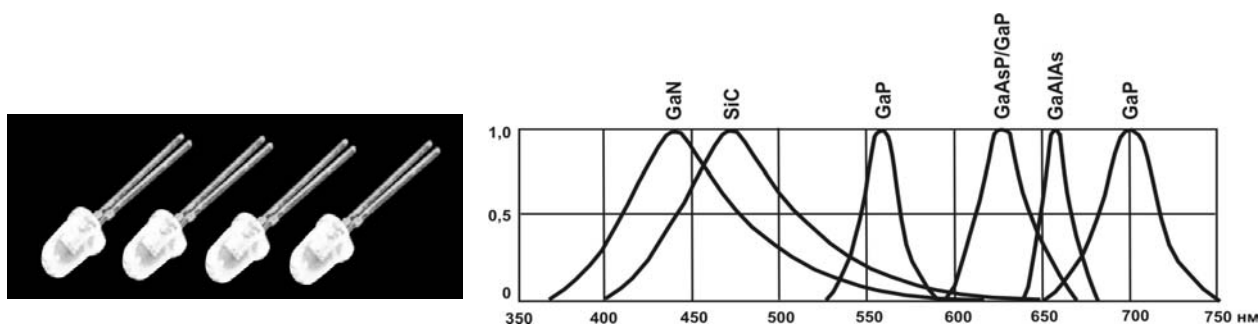


Рис. 85. Инжекционные светодиоды и их нормализованные спектры

В последнее время появились светодиодные источники **ультрафиолетового диапазона**. На рисунке 86 представлена полупроводниковая структура, излучающая свет на длинах волн 278, 325 и 338 нм в достаточно узком спектральном диапазоне, и нормализованные спектры излучения такой структуры.

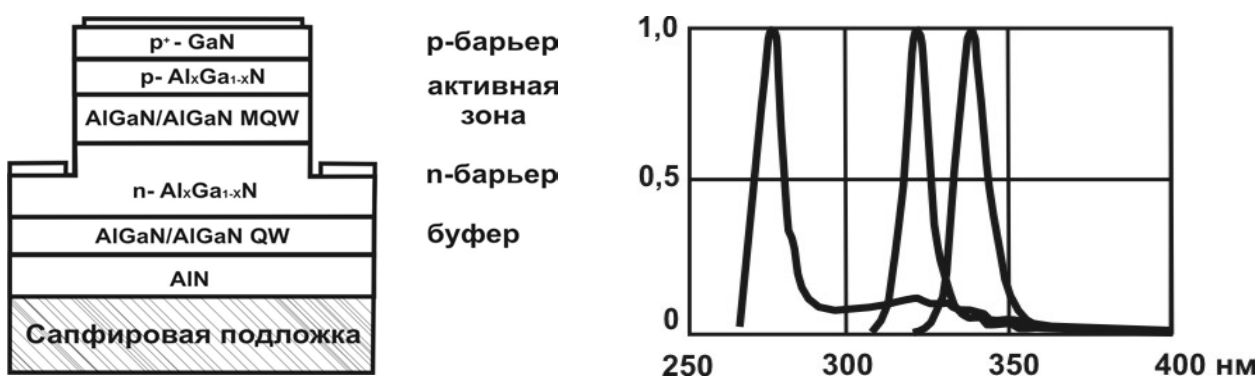


Рис.86. А- Структура слоев ультрафиолетового светодиода, которая образует сложную систему энергетических уровней. Длина волны излучения зависит от состава материала слоев $\text{Al}_x\text{Ga}_{1-x}\text{N}$; слой $\text{p}^+\text{-GaN}$ имеет высокую концентрацию акцепторов.

Б- Нормализованные спектры излучения ультрафиолетовых светодиодов. Излучение имеет узкую спектральную полосу с максимумом 278 нм – 9 нм; с максимумом 325 нм – 8,5 нм; с максимумом 338 нм – 10,2 нм

Лазеры.

Лазеры (Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation) или оптические квантовые генераторы – это современные когерентные источники излучения, характеризующиеся: 1) узким направленным пучком и 2) когерентностью. Важнейшим свойством лазерного излучения является чрезвычайно высокая степень его монохроматичности, недостижимая в излучении нелазерных источников (рис.87).



Рис. 87. А - некогерентный световой пучок, Б – когерентный пучок лазерного излучения

Когерентный луч характеризуется высокой монохроматичностью и минимальным рассеиванием в однородной среде. В то же время для монохроматичного пучка света выполняются все законы оптики. В частности, по интенсивности отклонения лазерного луча при огибании частиц с известными размерами определяется концентрация данных частиц в растворе (лазерная

нефелометрия). Монохроматичность лазерного излучения возникает в результате согласованного, кооперативного испускания световых квантов многими атомами рабочего вещества.

Принцип работы лазера. Атом может находиться в различных энергетических состояниях с энергиями E_1 , E_2 и т.д. В теории Бора эти состояния называются стабильными. На самом деле стабильным состоянием, в котором атом может находиться бесконечно долго в отсутствие внешних возмущений, является только состояние с наименьшей энергией. Это состояние называют основным. Все другие состояния нестабильны. Возбужденный атом может пребывать в этих состояниях лишь очень короткое время, порядка 10^{-8} с, после этого он самопроизвольно переходит в одно из низших состояний, испуская квант света, частоту которого можно определить из второго постулата Бора. Излучение, испускаемое при самопроизвольном переходе атома из одного состояния в другое, называют *спонтанным*. На некоторых энергетических уровнях атом может пребывать значительно большее время, порядка 10^{-3} с. Такие уровни называются *метастабильными*.

Переход атома в более высокое энергетическое состояние может происходить при резонансном поглощении фотона, энергия которого равна разности энергий атома в конечном и начальном состояниях. Переход электрона в атоме с верхнего энергетического уровня на нижний может происходить под влиянием внешнего электромагнитного поля, частота которого равна собственной частоте перехода. Возникающее при этом излучение называют *вынужденным* или *индуцированным*. Вынужденное излучение обладает удивительным свойством. Оно резко отличается от спонтанного излучения. В результате взаимодействия возбужденного атома с фотоном атом испускает еще один фотон той же самой частоты, распространяющийся в том же направлении. На языке волновой теории это означает, что атом излучает электромагнитную волну, у которой частота, фаза, поляризация и направление распространения точно такие же, как и у первоначальной волны (**когерентное излучение**). В результате вынужденного испускания фотонов *возрастает амплитуда* волны, распространяющейся в среде. С точки зрения квантовой теории, в результате взаимодействия возбужденного атома с фотоном, частота которого равна частоте перехода, появляются два совершенно одинаковых фотона-близнеца. Именно индуцированное излучение является физической основой работы лазеров.

На рисунке 88 схематически представлены возможные механизмы переходов между двумя энергетическими состояниями атома с поглощением или испусканием кванта.

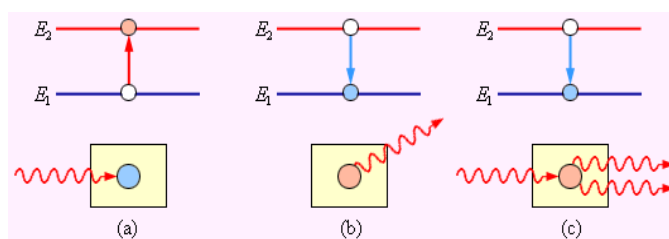


Рис. 88. Изображение процессов (а) поглощения, (б) спонтанного испускания и (с) индуцированного испускания кванта.

В полупроводниковом лазере (рис. 89), в отличие от лазеров других типов, используются излучательные квантовые переходы не между изолированными уровнями энергии атомов, молекул и ионов, а между разрешенными энергетическими **зонами** кристалла. В полупроводниковом лазере возбуждаются и коллективно излучают атомы, слагающие кристаллическую решётку. Это отличие определяет важную особенность полупроводниковых лазеров — малые размеры и компактность (объем кристалла $\sim 10^{-6}—10^{-2}$ см³). Важными особенностями полупроводниковых лазеров являются: высокая эффективность преобразования электрической энергии в энергию когерентного излучения (до 30—50%); малая инерционность, обуславливающая широкую полосу частот прямой модуляции (более 10^9 Гц); простота конструкции; возможность перестройки длины волны излучения и наличие большого числа полупроводников, непрерывно перекрывающих интервал длин волн от 320 до 32000 нм.

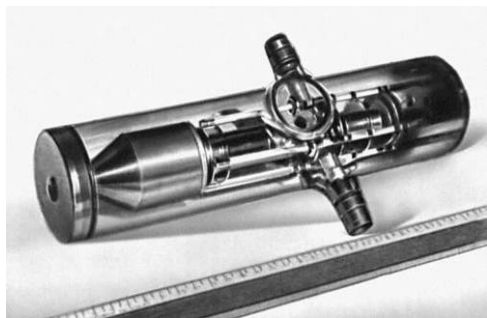


Рис. 89 Фотография полупроводникового лазера

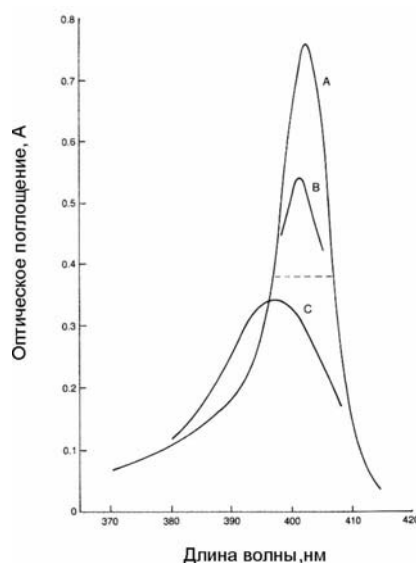
СПЕКТРАЛЬНАЯ ФИЛЬТРАЦИЯ

Система для выделения (фильтрации) излучательной энергии необходимой длины волны и подавления других длин волн называется **монохроматором**. Существуют различные способы фильтрации, включая использование фильтров, призм, и дифракционных решеток. Комбинации линз и щелей могут устанавливаться до и после монохроматического устройства, чтобы сделать световые лучи параллельными или выделить узкие световые потоки. Щели переменной ширины используются для регулирования световыми потоками, достигающими фотоприемник.

Выбор типа монохроматора зависит от целей аналитических исследований. Узкополосные фильтры желательны использовать в пламенной фотометрии, чтобы выделить излучение на данной длине волны. Узкая спектральная полоса требуется также в спектрофотометрах при идентификации острых смежных спектральных пиков поглощения. В том случае, когда часть излучения монохроматора не поглощается исследуемым веществом, происходит нарушение закона Бера. Обычно это наблюдается в широкополосных устройствах. При уменьшении спектральной полосы может увеличиться поглощение и улучшиться линейная связь с концентрацией. Это особенно важно для веществ, которые имеют острый спектральный максимум поглощения.

В качестве примера приведем спектральные кривые поглощения раствора копропорфирина I (рис. 90). При увеличении спектральной полосы спектрофотометрирования от 1 до 20 нм происходит уменьшение поглощения в максимуме. *Естественная полоса поглощения вещества определяется как ширина спектральной кривой на уровне половины максимума поглощения.* Кривая поглощения, полученная со спектральной полосой сканирования 1 нм, выявляет естественную спектральную полосу поглощения копропорфирина I приблизительно 10 нм. Как общее правило: *чтобы измерить величину поглощения в пределах 99.5 % от истинной величины, спектральная полоса не должна превышать 10 % естественной полосы поглощения.*

Рис. 90. Влияние спектральной полосы фотометрирования на измерение поглощения копропорфирина I. Кривая A получена сканированием с полосой 1 нм, кривая B – с полосой 10 нм, кривая C – с полосой 20 нм. При полосе 10 нм наблюдается значительное уменьшение величины максимального поглощения, а при 20 нм, при еще большем уменьшении величины пика поглощения и его «размытия», происходит смещение $\lambda_{\text{макс}}$, обусловленное асимметрией естественной кривой поглощения.



Копропорфирин 1 является необычным примером очень узкой естественной спектральной полосы поглощения. Большинство же клинических процедур лабораторной биохимии использует поглощение молекул, для которых естественная полоса составляет от 40 до 200 нм и более. Естественная полоса NADH - 58 нм ($\lambda_{\text{макс}} = 339$ нм). Было бы идеально использовать для точных измерений этого вещества спектральную полосу 6 нм или меньше. Фактические исследования показали, что использование спектральной полосы 10 нм на 340 нм дает измеренную амплитуду поглощения в 98% от величины поглощения, полученной в полосе 1 нм.

Измерения обычно проводятся на длине волны максимума поглощения из соображений получения наибольшей чувствительности исследования. Это связано с тем, что при максимальном ε максимальна чувствительность фотометрического определения изменений концентрации аналита (см. рисунок 59).

Однако, иногда желательно выбрать другую длину волны, чтобы минимизировать влияние других веществ на правильность измерения. Например, турбидиметрическая чувствительность больше в синей области спектра, чем в красной. Тем не менее, иногда именно красная область предпочтительнее для турбидиметрических исследований, чтобы избежать поглощения света билирубином (460 нм) или гемоглобином (417 - 575 нм). Раствор, полученный в процедуре с щелочным пикратом для креатинина, имеет относительно плоский максимум в видимой области приблизительно на 480 нм, но реактив в бланке сам сильно поглощает свет в области меньше 500 нм. Компромисс находится выбором длины волны 520 нм, где минимизируется вклад бланка. Значения бланка должны, конечно, поддерживаться минимальными. Небольшая разница между двумя большими величинами поглощения приводит к существенной неопределенности. Следовательно, уменьшение поглощения бланка улучшает точность и правильность измерения. Линейный рабочий диапазон метода может быть расширен измерениями не в максимуме поглощения. Предпочтительно, однако, не проводить измерения на крутом склоне спектральной кривой поглощения, так как небольшая ошибка в установке длины волны спектрофотометра может привести к существенной ошибке в измерении поглощения (рис.91).

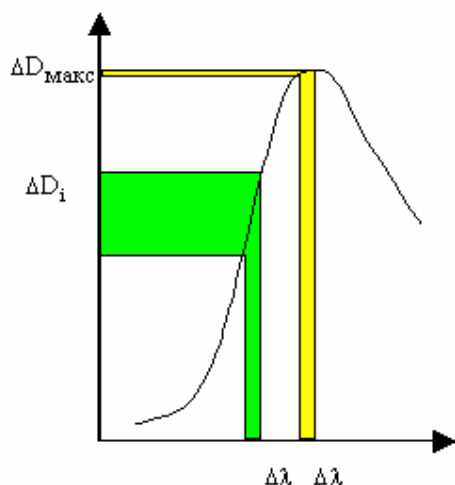


Рис. 91. 2 типа измерения с использованием узкополосного светофильтра: на максимуме пропускания и при длине волны, отличной от максимального пропускания.

При измерении на максимуме пропуская ошибка в установке длины волны ($\Delta \lambda$, которая может быть в пределах допустимой) практически не будет влиять на правильность измеренной оптической плотности ($\Delta D_{\text{макс}}$). При измерении на длине волны, отличной от максимального пропускания, ошибка в установке длины волны - существенный фактор в вариации измеренной абсорбции (ΔA_i)

ФИЛЬТРЫ.

Стекланный абсорбционный фильтр

Стекланный абсорбционный фильтр - самый простой тип фильтра, это тонкое цветное стекло. Некоторые металлические соединения и соли, растворенные или взвешенные в стекле, окрашивают его в цвет, соответствующий длинам волн света прошедшего сквозь стекло. Строго говоря, стекланный абсорбционный фильтр не является монохроматором, потому что пропускает свет в относительно широком диапазоне длин волн. Спектральная чистота фильтра или другого спектрального элемента обычно описывается в терминах спектральной полосы. Спектральная полоса определяется, как ширина (в нанометрах) спектральной кривой пропускания на уровне половины от максимального пропускания (рисунок 92а). Обычно используемые стекланные фильтры из цветного стекла имеют спектральную полосу больше 50 нм и относятся к широкополосным фильтрам.

Комбинация широкополосных и отрезающих стеклянных фильтров

Комбинация широкополосных и отрезающих стеклянных фильтров применяется в фотометрических приборах (рисунок 92б). Одни отрезающие фильтры имеют резкую границу в спектре поглощения, пропуская свет с большими длинами волн справа от границы и подавляя коротковолновую часть. Другие фильтры подавляют только длинноволновую область. Комбинируя двумя или несколькими широкополосными и отрезающими фильтрами, можно получить комбинированный фильтр с более узкой полосой.

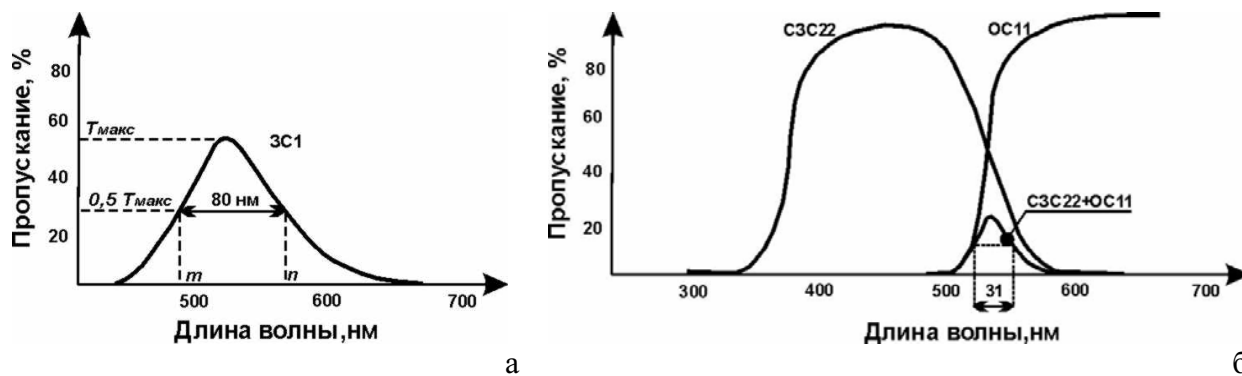


Рис. 92 **Фильтр из цветного стекла ЗС1.** а - Спектральная полоса фильтра ($n-m$) определяется, как ширина в нанометрах спектральной кривой пропускания на уровне половины от максимального пропускания; б - Фильтр, полученный комбинацией стекол СЗС22 и ОС11 имеет спектральную полосу пропускания 31 нм.

Узкополосные интерференционные фильтры

Узкополосные интерференционные фильтры - третий тип фильтров. Интерференционные светофильтры могут иметь разнообразную конструкцию. В современных биохимических анализаторах наиболее распространены фильтры с габаритным диаметром 12,7 мм и световой зоной (диаметр светопропускания) 8 мм. Конструкция новейшего фильтра на 340 нм представлена на рисунке 93. Интерференционное покрытие наносится на одну из двух подложек из плавленного кварца. Подложки монтируются в герметичную металлическую оправу. Между подложками находится инертный газ, обеспечивающий защиту и стойкость дифракционного покрытия. Конструкция фильтров видимого диапазона более проста, так требования к фильтрам не столь жесткие. Инертный газ в них не применяется.

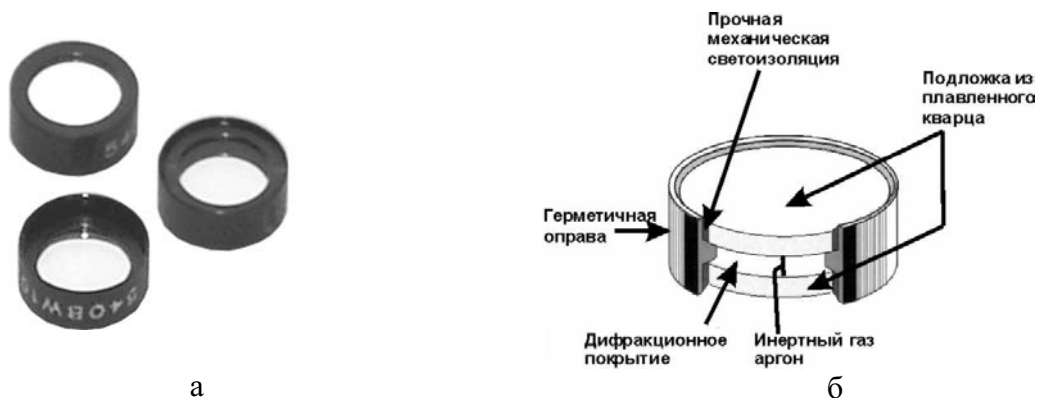


Рис. 93. **Типовые интерференционные фильтры:** а – фильтр для биохимических анализаторов; б – конструкция фильтра для ультрафиолетового диапазона

Типичные требования к интерференционным светофильтрам для биохимии:

Точность установки длины волны - ± 2 нм;

Спектральная полоса - $10 \text{ нм} \pm 1 \text{ нм}$;

Подавление постороннего света в диапазоне от 100 нм до 1200 нм (кроме рабочей полосы пропускания). Степень подавления - $0,01\%$ от $T_{\text{макс}}$ светофильтра (10^{-4}).

МОНОХРОМАТОРЫ

Монохроматор – это оптическая система для выделения узких участков спектра излучения с заданной длиной волны. Простой монохроматор включает входную щель, коллиматор, диспергирующее устройство, фокусирующий объектив и выходную щель (см. рис. 81).

Выходная и входная щели монохроматора предназначены для получения достаточно резкого и четкого изображения спектральной линии оптического излучения, качество которого определяется размерами щелей – шириной и высотой. Щели обычно имеет размеры прямоугольника. Щечки (края) щелей перемещаются с помощью винта с высокой точностью (до 1 мкм). Рабочая ширина щелей зависит от ширины полос пропускания и составляет до 1 мм. Щели необходимо предохранять от загрязнения пылью, для этого их закрывают специальной насадкой.

Коллиматор – это оптическое устройство, предназначенное для получения параллельных пучков белого света, направляемых на диспергирующую систему. Он состоит из объектива или вогнутого зеркала, в фокусе которого располагается входная щель. В современных приборах широко используются монохроматоры с автоколлиматорными устройствами, в которых совмещены функции объектива коллиматора, входной щели и фокусирующего объектива. В таких приборах свет проходит через один и тот же объектив дважды в прямом и обратном направлении, что позволяет уменьшить размеры спектрофотометра, сделать его компактным и удешевить.

Диспергирующим устройством может быть как призма, так дифракционная или голографическая решетка. Обязательной частью монохроматора является механическое устройство для изменения положения диспергирующей системы по отношению к падающему лучу. Это обеспечивает изменение спектральной линии, подаваемой на выходную щель.

Призмы.

Призмы широко используются в монохроматорах. Призма преобразует белый свет в непрерывный спектр за счет дисперсии преломления. Действие призмы основано на явлении *дисперсии*, то есть зависимости показателя преломления n вещества от длины волны света λ . Излучение с короткими волнами отклоняется (или преломляется) призмой больше, чем с длинными волнами (рис. 94). Это приводит к нелинейной «развертке» спектра: длинные волны расположены на шкале длин плотнее, чем короткие, но с помощью щели в спектре может быть выделены узкая полоса.

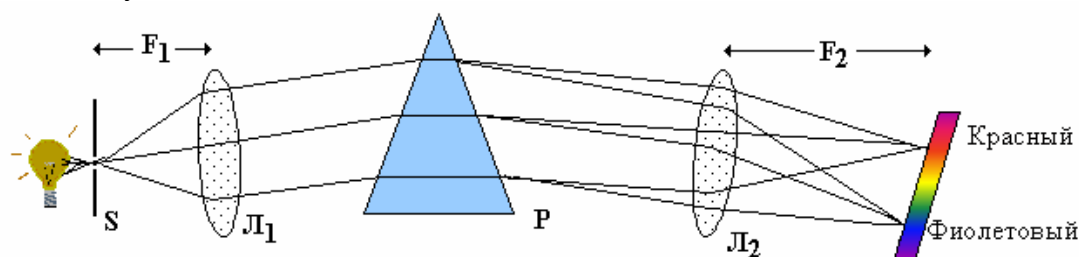


Рис. 94. **Разложение излучения в спектр при помощи призмы.** Щель S , на которую падает исследуемое излучение, находится в фокальной плоскости (F_1) линзы L_1 . Эта часть прибора называется *коллиматором*. Выходящий из линзы параллельный пучок света падает на призму P . Вследствие дисперсии свет разных длин волн выходит из призмы под разными углами. В фокальной плоскости линзы L_2 располагается экран (или выходящая щель), на котором фокусируется излучение. В результате в разных местах экрана возникает изображение входной щели S в свете разных длин волн.

У всех прозрачных твердых веществ (стекло, кварц), из которых изготавливаются призмы, показатель преломления n в диапазоне видимого света убывает с увеличением длины волны λ , поэтому наиболее сильно призма отклоняет от первоначального направления синие и фиолетовые лучи и наименее – красные. Монотонно убывающая зависимость $n(\lambda)$ называется *нормальной дисперсией*.

Дифракционная решетка.

В спектральных приборах высокого класса вместо призм применяются дифракционные решетки. Вне зависимости от способа изготовления решетки представляют собой периодические структуры (полосы или штрихи).

При изготовлении решеток с помощью резца, она называется механической. Лучшие решетки содержат от 1000 до 2000 линий/мм и изготавливаются с особой тщательностью. Изготовление таких решеток требует применения самых высоких технологий и они используются как матрицы для изготовления менее дорогих точных копий, которые уже используются в спектральных приборах (рисунок 95). На практике применяются также и более грубые решетки с 50–100 штрихами на миллиметр, нанесенными на поверхность прозрачной пленки.

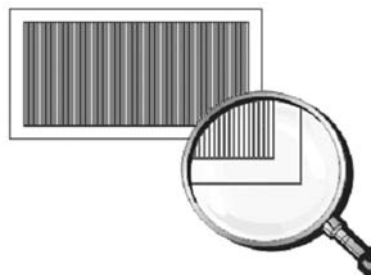


Рис. 95. Дифракционная решетка. Дифракционная решетка изготавливается путем нанесения тонкого слоя алюминий-медного сплава на поверхность плоской стеклянной пластины, на которой механически гравятся множество маленьких параллельных борозд (линий).

При падении на решетку белого света за решеткой возникнет разложенный по цветовым пучкам свет, то есть, дифракционная решетка разлагает белый свет на спектральные составляющие, поэтому она употребляется как диспергирующий элемент монохроматора. Для работы в проходящем свете применяют плоские прозрачные стеклянные дифракционные решетки (рис. 96А), для исследований в отраженном свете используют ступенчатые (*эшелеты*) отражательные дифракционные решетки (рис. 96Б). Последние представляют собой металлические пластинки, на которых с помощью специально заточенных алмазных резцов нанесены на очень близком расстоянии порядка нескольких микрон равноотстоящие друг от друга штрихи.

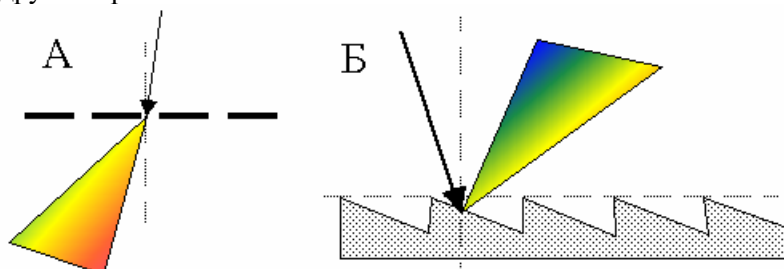


Рис. 96. Получение спектра на дифракционных решетках. А – ход лучей на прозрачной дифракционной решетке, Б – ход лучей на отражательной дифракционной решетке.

Голографическая решетка

Современные голографические решетки изготавливаются с помощью лазерных технологий или высокоточной механической обработки. На таких решетках достигается частота полос до 6000 на 1 мм. Голографические решетки применяются для работы в УФ- и видимой областях спектра.

Параллельные линии «рисуются» на фоточувствительном материале (фоторезист) хорошо сфокусированным лазерным лучом. После того как линии нанесли на фоторезист, он обрабатывается химическими реагентами, которые растворяют и вымывают подверженные воздействию лазера места фоторезиста, образуя таким образом линии решетки. После химической обработки на фоторезист напыляют слой материала с высокой отражательной способностью – решетка готова для использования. Основанием для голографической решетки может служить плоская или вогнутая поверхность. Вогнутая решетка, кроме того, фокусирует свет подобно зеркальной линзе и называется самофокусирующей. Голографические решетки чрезвычайно точны, обладают слабым паразитным световым рассеянием и широко используются в биохимических спектрофотометрах.

Дифракционная решетка дает значительный выигрыш в интенсивности выделенных спектральных составляющих. Кроме того, шкала «развертки» по длинам волн у дифракционной решетки линейная:

$$y_m = m \frac{\lambda}{\alpha} F,$$

У призмы показатель преломления n в диапазоне видимого света убывает с увеличением длины волны λ , поэтому наиболее сильно призма отклоняет от первоначального направления синие и фиолетовые лучи и наименее – красные. Сопоставление шкал спектров, развернутых призмой и дифракционной решеткой, представлены на рисунке 97.

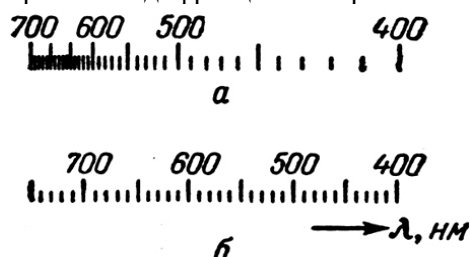


Рис. 97. Сопоставление шкал спектров, «развернутых» призмой (а) и решеткой (б).

У призмы в диапазоне видимого света шкала убывает с увеличением длины волны λ . У дифракционной решетки шкала «развертки» по длинам волн линейная.

Полихроматор.

Диспергирующие оптические системы (призмы, решетки) «разворачивают» падающий на них свет в спектр. Чтобы выделить узкую спектральную полосу на пути разложенного в спектр излучения устанавливают непрозрачный экран со щелью. Ширина щели определит спектральную полосу монохроматора. Если вместо экрана разместить в квазинепрерывный ряд фотоприемники, то на каждый приемник будет падать излучение со спектральной полосой, определяемой геометрическими размерами фоточувствительной площадки приемника. Таким образом, сигнал каждого фотоприемника будет соответствовать интенсивности падающего на него излучения узкой спектральной полосы, а вся совокупность этих сигналов будет соответствовать спектру излучения (рисунок 98).

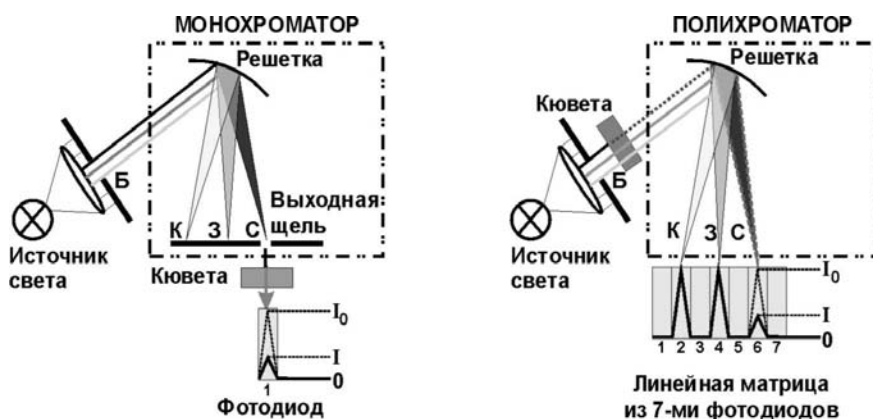


Рис. 98. Схемы фотометрирования с монохроматором (слева) и с полихроматором (справа). В монохроматоре рабочая спектральная полоса определяется выходной щелью, оптическая плотность определяется по сигналам I и I_0 одного фотоприемника. В полихроматоре весь спектр воспринимается матрицей фотоприемников. Рабочая спектральная полоса определяется размером фотоприемника. Оптическая плотность может измеряться одновременно каждым фотоприемником матрицы в соответствующей этому приемнику спектральной полосе.

ТОНКИЕ ЛИНЗЫ И ЗЕРКАЛА

Линзы

Линзой называется прозрачное тело, ограниченное двумя сферическими поверхностями. Если толщина самой линзы мала по сравнению с радиусами кривизны сферических поверхностей, то линзу называют *тонкой*.

Линзы входят в состав практически всех оптических приборов. Линзы бывают *собирающими* и *рассеивающими*. Собирающая линза в середине толще, чем у краев, рассеивающая линза, наоборот, в средней части тоньше (рисунок 99).

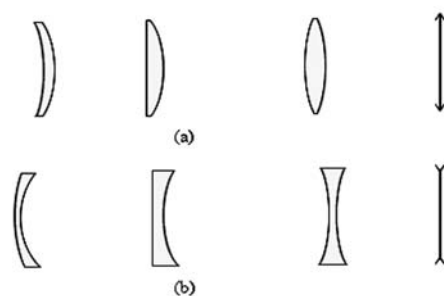


Рис. 99. Собирающие (а) и рассеивающие (б) линзы и их условные обозначения.

Прямая, проходящая через центры кривизны O_1 и O_2 сферических поверхностей (рис. 100), называется *главной оптической осью* линзы. В случае тонких линз можно приближенно считать, что главная оптическая ось пересекается с линзой в одной точке, которую принято называть *оптическим центром* линзы O . Луч света проходит через оптический центр линзы, не отклоняясь от первоначального направления. Все прямые, проходящие через оптический центр, называются *побочными оптическими осями*.

Если на линзу направить пучок лучей, параллельных главной оптической оси, то после прохождения через линзу лучи (или их продолжения) соберутся в одной точке F , которая называется *главным фокусом* линзы. У собирающих линз - фокусы действительные, у рассеивающих – *мнимые*. Пучки лучей, параллельных одной из побочных оптических осей, также фокусируются после прохождения через линзу в точку F' , которая расположена при пересечении побочной оси с *фокальной плоскостью* Φ , то есть плоскостью, перпендикулярной главной оптической оси и проходящей через главный фокус. Расстояние между оптическим центром линзы O и главным фокусом F называется *фокусным расстоянием* и обозначается той же буквой F .

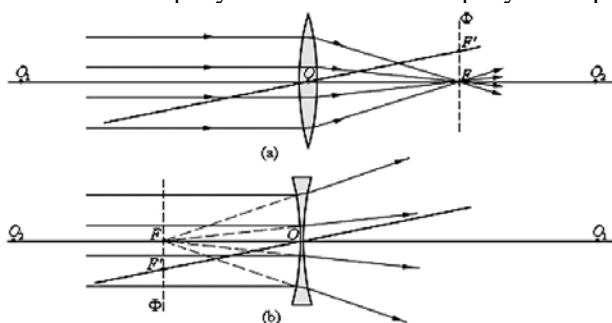


Рис.100. Преломление параллельного пучка лучей в собирающей (а) и рассеивающей (б) линзах. Точки O_1 и O_2 – центры сферических поверхностей, O_1O_2 – главная оптическая ось, O – оптический центр, F – главный фокус, F' – побочный фокус, OF' – побочная оптическая ось, Φ – фокальная плоскость.

Основное свойство линз – способность давать *изображения предметов*. В фотометрических приборах линзы используются в *коллиматорах* для преобразования расходящихся пучков света в параллельные и в *фокусирующих* устройствах для преобразования параллельных или расходящихся пучков света в сходящиеся пучки.

Сферические зеркала.

Для целей фокусировки могут служить также эллиптические, параболические и сферические зеркала. Эллиптические зеркала имеют отражающую поверхность в виде сегмента эллипса, параболические – параболы, сферические – сферы. Центр сферы, из которой вырезан сегмент, называют *оптическим центром сферического зеркала*. Вершину сферического сегмента называют *полюсом*. Прямая, проходящая через оптический центр и полюс зеркала, называется *главной оптической осью* сферического зеркала. Главная оптическая ось выделена из всех других прямых, проходящих через оптический центр, только тем, что она является осью симметрии зеркала.

Сферические зеркала бывают *вогнутыми* и *выпуклыми*. Если на вогнутое сферическое зеркало падает пучок лучей, параллельный главной оптической оси, то после отражения от зеркала лучи пересекутся в *главном фокусе* зеркала F . У вогнутого сферического зеркала главный фокус действительный (рисунок 101).

Главный фокус *выпуклого* зеркала является *мнимым*. Если на выпуклое зеркало падает пучок лучей, параллельных главной оптической оси, то после отражения в фокусе пересекутся не сами лучи, а их продолжения (рисунок 102).

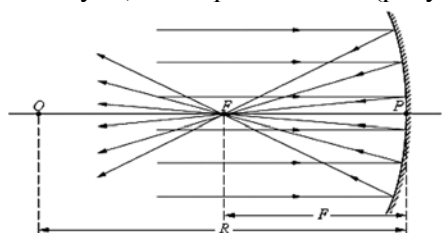


Рис.101. Отражение параллельного пучка лучей от вогнутого сферического зеркала. Точки O – оптический центр, P – полюс, F – главный фокус зеркала; OP – главная оптическая ось, R – радиус кривизны зеркала.

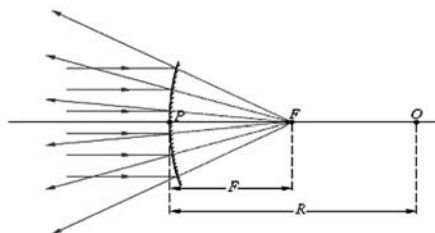


Рис. 102. Отражение параллельного пучка лучей от выпуклого зеркала. F – мнимый фокус зеркала, O – оптический центр; OP – главная оптическая ось.

Плоские зеркала.

Плоские зеркала используются для изменения направления пучка света в приборах. Плоские зеркала не изменяют расходимость или сходящность светового пучка.

КЮВЕТЫ.

Кюветы могут быть цилиндрическими (круглыми в сечении), квадратными или прямоугольными (в сечении), и могут изготавливаться из обыкновенного стекла, кварцевого стекла, боросиликатного стекла или пластмассы. Квадратные или прямоугольные кюветы имеют плоско-параллельные оптические поверхности и постоянную толщину (световой путь). Наиболее распространенные кюветы имеют толщину 1,0 см с жесткими допусками.

Стекланные и кварцевые кюветы.

Важной характеристикой кювет является пропускание светового потока стенками кюветы, это зависит от материала, из которого изготовлена кювета.

Кюветы из обычного стекла не рекомендуют использовать даже в ближнем ультрафиолете, то есть при 340 нм из-за сильного поглощения стекла в этой области спектра. Для работы в дальнем ультрафиолете рекомендуется использовать флуоритовые кюветы, которые прозрачны для длин волн 125 – 200 нм. Кюветы из обычного боросиликатного стекла подходят для измерений в видимой и ближней УФ частях спектра. Для работы в более коротковолновой области (меньше 300 нм) требуются кюветы из кварца. Спектральные характеристики оптических материалов для кювет представлены на рисунке 103 (оконное стекло дано для сравнения).

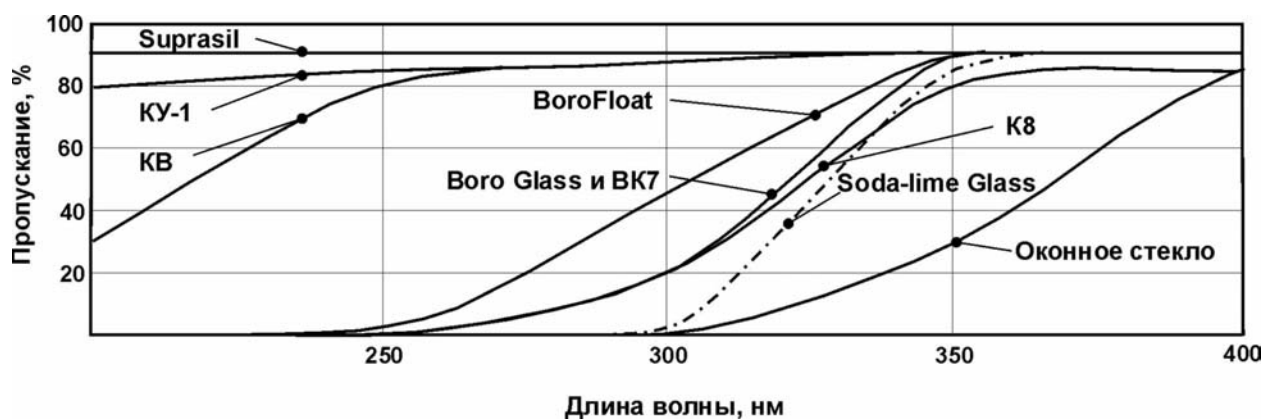


Рисунок 103. Спектры пропускания оптических материалов.

В клинической биохимии принято использовать прямоугольные кюветы с плоскопараллельными стенками и длиной оптического пути 1 см. Прямоугольные кюветы практически не изменяют направление светового потока и незначительные перемещения такой кюветы в световом потоке не приводят к существенным ошибкам измерения.

Пластиковые кюветы.

В спектрофотометрах и современных фотометрах широко применяются прямоугольные кюветы из полистирола макротипа (размер 10 × 10 × 45 мм), в которых измерение ведется в объеме около 1 мл, и полумикрокюветках (рисунок 104) размером 10 × 4 × 45 мм, объем реакционной смеси около 0,5 мл. В микрокюветках луч проходит по узкому каналу шириной до 2 мм то же расстояние в 10 мм, как в макрокюветках, поэтому луч должен быть узким. Для точной ориентации кювет требуются специальные держатели.



Рисунок 104. Пластиковые макро-, полумикро- и микрокюветы BRAND с маркерами положения



Рисунок 105. Спектры пропускания пластиковых кювет

Современные пластиковые кюветы имеют спектральные характеристики близкие к кварцевому стеклу (рисунок 105).

Пластмассовые кюветы имеют хорошую прозрачность и в видимой, и УФ областях, но использование пластмассовых кювет наталкивается на проблемы обеспечения допусков, очистки, стойкости к воздействию растворителей, температурных деформаций. Большинство пластмассовых кювет разработано для одноразового использования.

Химическая стойкость пластиковых кювет:

ПС – кюветы из полистирола; ПММК – кюветы из полиметилметакрилата (из оргстекла); BRAND - пластиковые кюветы BRAND.

Вещество	ПС	ПММК	BRAND
Уксусная кислота	-	-	+
Ацетон	-	-	+
Нашатырь	+	+	+
Benzaldehyde	-	-	+
Butanon	-	-	+
Хлороформ	-	-	-
Dioxan	-	-	+
DMF	-	-	+
Ethyl acetate	-	-	+
Hexane	-	+	-
Hydrochloric acid, 36%	+	-	+
Hydrofluoric acid, 10%	+	+	+

Isopropanol	+	+	+
Nitric acid, 65%	-	-	+
Sodium hydroxide	+	+	+

Созданы также фотометры, в которых фотометрирование проводится в круглых пробирках. Фотометрическая ячейка таких фотометров сконструирована таким образом, что пробирка занимает всегда одно и то же положение в световом потоке (центрируется). В противном случае незначительные смещения пробирки от заданного положения могут привести к большим ошибкам, так как пробирка представляет собой цилиндрическую линзу. Другой источник ошибки – эллиптичность (отклонение от цилиндрической формы) пробирки. Устранить эту ошибку можно только экспериментальным путем. Нужно нанести маркер на одну какую-либо сторону пробирки и устанавливать в дальнейшем пробирку в фотометр только в одной и той же ориентации. Эллиптичность приводит к изменению стандартной оптической длины пробирки и это отклонение (систематическую ошибку) нужно определить с помощью стандартных растворов и учитывать в дальнейшем при обработке результатов. Конечно, этот метод пригоден только для ручных технологий работы на фотометрах.

Кроме прямоугольных кювет и пробирок в фотометрах с вертикальным фотометрированием применяются групповые кюветы – 8-ми и 12-ти луночные стрипы, планшеты из 96 лунок и 9-ти луночные блоки (рисунок 106). Планшеты бывают цельными и наборными из 8-12 стрипов.

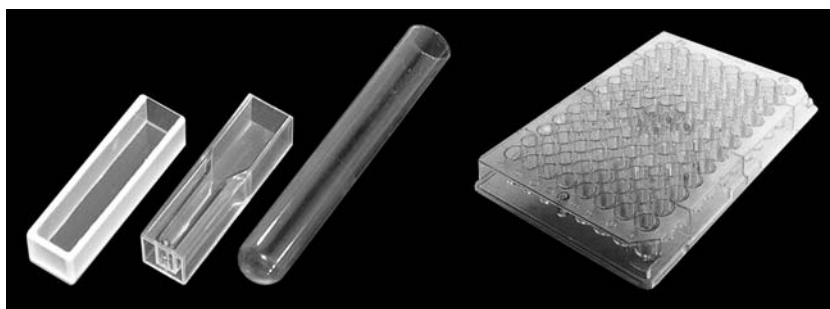
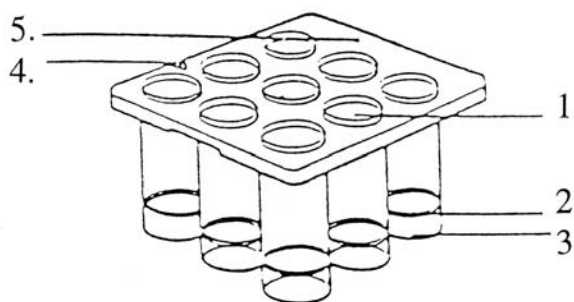


Рисунок 106. Стеклоянная прямоугольная макрокювета, пластиковая полумикрокювета, пробирка из боросиликатного стекла и полистироловый планшет с 96 лунками.

Рисунок 107. Конструкция 9-ми луночного блока для анализатора FP-901.

1 – 9 кювет (лунок); 2 – плоское оптическое окно; защитный ободок; 4 – прорезь для правильной ориентации блока в фотометре; 5 – место для идентификационной записи.



Лунки в стрипах и планшетах имеют цилиндрическую форму небольшого диаметра, что приводит к возникновению мениска жидкости. Вогнутый мениск подобен рассеивающей линзе, выпуклый – собирающей линзе. Наличие мениска сферической формы предъявляет строгие требования к позиционированию лунки в оптическом канале фотометра. Для компенсации влияния мениска донья лунок иногда делают сферической формы, а световой луч возможно тоньше и фокусируют его на поверхность мениска на оси симметрии.



Кюветы должны быть чистыми и оптически прозрачными. Разводы или налет на стенках, очевидно, изменяют величину поглощения. Стеклокюветы, используемые в видимом диапазоне, очищаются обильным ополаскивающим водопроводной и дистиллированной водой. Щелочные растворы не должны оставаться в кюветах длительное время, так как щелочь медленно растворяет стекло, что приводит к разводам. Кюветы могут очищаться в умеренном моющем средстве или ополаскиваться сконцентрированной смесью HCl : вода : этанол (1:3:4). Кюветы никогда не нужно ополаскивать цветными очищающими растворами, так как растворы имеют тенденцию адсорбироваться на поверхности и изменять цвет стекла.

Кюветы, используемые для измерений в УФ области спектра должны обрабатываться с особой тщательностью. Невидимые царапины, отпечатки пальцев или остаточные следы ранее измеренных растворов могут значительно повлиять на поглощение. Хороший способ проверки кювет заключается в том, что все используемые кюветы заполняются дистиллированной водой, затем измеряется поглощение каждой кюветы против бланка. Эта величина, по существу, должна быть равна нулю.

В настоящее время в некоторых фотометрах используются проточные кюветы. В этих кюветах реакционная смесь через помпу подается в узкий канал, в котором производится измерение оптической плотности. Стандартная проточная кювета имеет внутренний объем (в котором производится непосредственно измерение) ~30 мкл. В проточных кюветах последующая проба вымывает из кюветы предыдущую пробу. Для того чтобы не было эффекта переноса при последовательном измерении разных проб (надежно промывалась кювета), рекомендуется пропускать через кювету не менее 10-кратного объема по сравнению с измерительным объемом, то есть не менее 300 мкл.

Уменьшение объема реакционной кюветы имеет ограничения. При ручном дозировании даже с использованием автоматизированных пипеток нежелательно работать с объемами менее 8 – 10 мкл, так как при таком дозировании существенно увеличивается ошибка, связанная с объемом биопробы. Особенно сильно этот фактор влияет при дозировании вязких растворов. Как правило в клинической химии используются соотношение объем биопробы/объем рабочего реактива в диапазоне 1 : 10 - 1 : 200. Поэтому наиболее распространенными являются измерительные кюветы с объемом около 1 мл.

В биохимических автоанализаторах используются реакционные кюветы с малым объемом до 100 мкл. При этом дозирование осуществляется с диапазоном в 0,1 мкл. Для этого используются специальные гамльтоновские шприцевые дозаторы и стандартная процедура дозирования. Кроме того, применяются схемы дозирования с разделением в наконечнике воздушной пробкой объемов биопробы и рабочего реактива и вымывание из наконечника биопробы дополнительным объемом растворителя.

ПРИЕМНИКИ ОПТИЧЕСКОГО ИЗЛУЧЕНИЯ

Важнейшими элементами любого фотоэлектрического прибора являются фоточувствительные элементы (детекторы), которые связывают в единое целое оптическую и электронную части системы. В фоточувствительных элементах под воздействием квантов поглощенного света происходит изменение сопротивления без выхода электронов из чувствительного элемента (внутренний фотоэффект) или испускание электронов (внешний фотоэффект или фотоэлектронная эмиссия).

Электровакуумные фотоэлементы.

Электровакуумным фотоэлементом называют вакуумный или ионный диод, основанный на явлении фотоэлектронной эмиссии электронов в вакуум (электронный фотоэлемент) или газ (ионный фотоэлемент), преобразующий энергию оптического излучения в электрические сигналы и содержащий фотокатод и анод (рисунок 108).

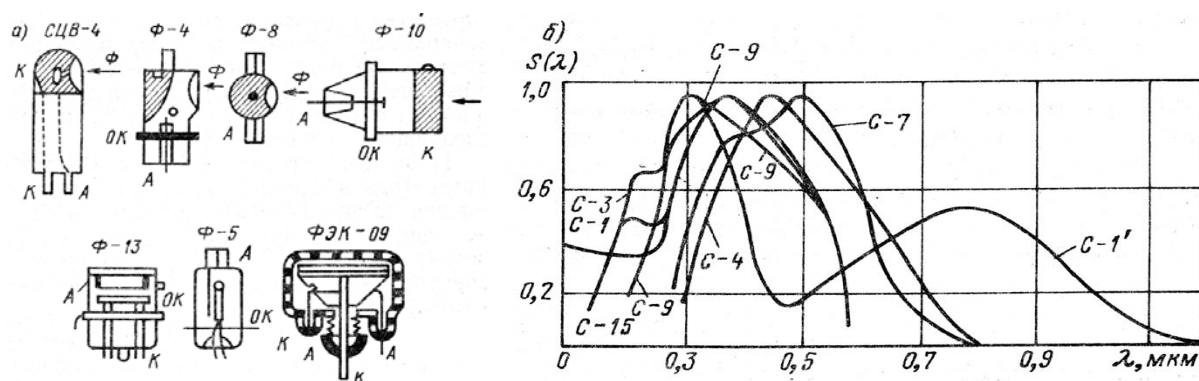


Рис. 108. Схемы стандартных электровакуумных фотоэлементов (а) и спектральные характеристики некоторых фотокатодов (б): К — фотокатод; Л — анод; ОК — охранное кольцо

Ионные (газонаполненные) фотоэлементы применяются редко. Наиболее распространены электровакуумные фотоэлементы (ФЭ).

Размер ФЭ, расстояние между электродами, конструкция цоколя, выводов зависят от типа аппаратуры, в которой он используется. Форму фотокатода и анода определяют требования полного сбора эмитированных электронов на анод. Тип фотокатода и материал окна колбы ФЭ определяют диапазон его спектральной чувствительности.

Спектральная чувствительность фотоэлемента зависит в основном от фотокатода: его толщины, материала подложки и окон баллона. В меньшей степени она зависит от температуры фотокатода (изменяется работа выхода электрона), его старения (постепенного изменения свойств фотокатода за счет неидеального вакуума и газоотделения арматуры и стенок колбы), напряженности электрического поля у фотокатода, зависящей от приложенного напряжения (при освещении фотокатода коротковолновыми квантами вылетающие фотоэлектроны имеют большую энергию и сбор их на фотокатод требует высокого напряжения питания), утомления фотокатода.

Утомление характеризуется неравномерным понижением спектральной чувствительности (под действием потока излучения) фотокатода во времени (чувствительность уменьшается сильнее в длинноволновой области спектра), оно зависит от качества и типа фотокатода, от режима освещенности фотокатода, от анодного напряжения и температуры среды, а также от цикличности работы ФЭ во времени. Наиболее сильное утомление наблюдается у серебряно-кислородно-цезиевых фотокатодов.

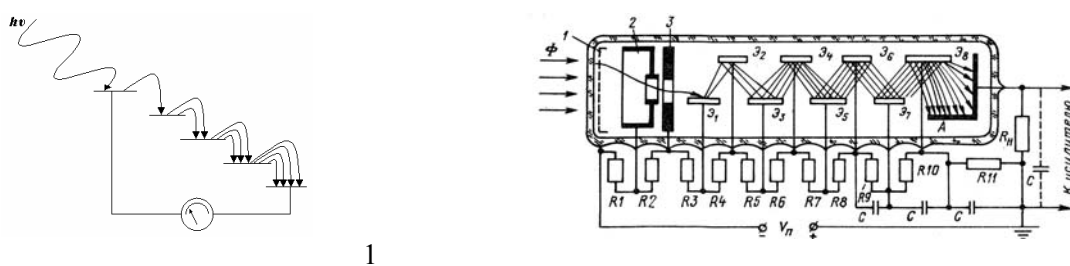
Для оценки спектральной чувствительности фотоэлементов разработана система типовых спектральных характеристик. Световые характеристики вакуумных ФЭ линейны в широком динамическом диапазоне (диапазоне изменения светового потока) $\sim 10^{10}$.

Временное разрешение ФЭ определяется временем движения электронов от места их образования при освещении до поверхности катода (10^{-12} с), временем пролета их от катода до анода (10^{-11} - 10^{-10} с) и переходными процессами в цепи ФЭ - нагрузка.

Фотоэлектронные умножители.

Фотоэлектронным умножителем (ФЭУ) называют электровакуумный прибор, преобразующий энергию оптического излучения в электрические сигналы и содержащий фотокатод, вторично-электронный умножитель и анод.

Конструктивно от вакуумного фотоэлемента ФЭУ отличается тем, что кроме фотокатода и анода содержит еще фокусирующую электронно-оптическую систему, диафрагму и дополнительные электроды (диноды), являющиеся эмиттерами вторичных электронов (рис.109).



1

2

Рис. 109. Фотоэлектронный умножитель ФЭУ: 1 - принцип каскадного усиления сигнала, 2 - устройство ФЭУ

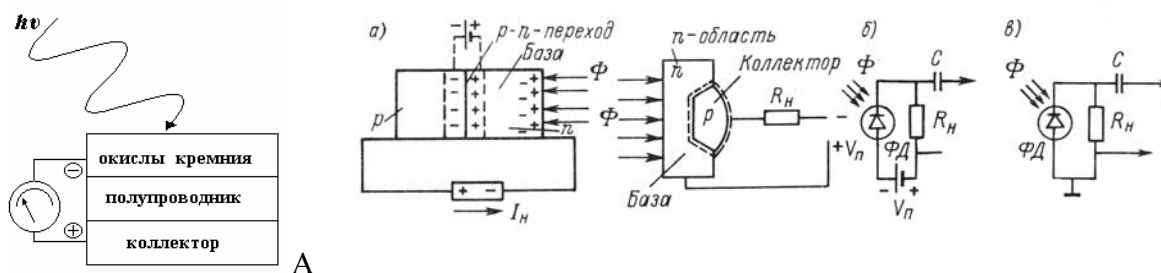
При освещении фотокатод 1 эмитирует первичные фотоэлектроны, которые ускоряются электрическим полем и фокусируются электронно-оптической системой 2 на первый динод Э₁ вызывая его увеличенную вторичную электронную эмиссию. Вторичные электроны, вылетевшие из первого динода, ускоряются электрическим полем и направляются на второй динод Э₂, увеличенный поток электронов со второго динода направляются на третий и т. д.

Электрическое поле, ускоряющее электроны, создается делителем постоянного напряжения, обеспечивающим большой положительный потенциал каждого последующего каскада относительно предыдущего R1—R11.

Фотокатоды ФЭУ аналогичны фотокатодам ФЭ и могут работать «на просвет» и «на отражение». При работе «на просвет» полупрозрачный фотокатод наносится на плоское выходное окно колбы в виде круга диаметром 10-50 мм (делают до 250 мм). При работе «на отражение» входное окно часто располагают на боковой стенке колбы, а излучение попадает на фотокатод со стороны вакуума.

Фотодиоды.

Фотодиодами называют полупроводниковые приборы, основанные на внутреннем фотоэффекте, использующие одностороннюю проводимость p-n перехода, при освещении которого появляется э.д.с. (фотогальванический режим) или (при наличии питания) изменяется значение обратного тока (фотодиодный режим).



А

Б

Рис. 110. Фотодиод.

А – принцип образования э.д.с. при облучении светом; Б - схема генерирования и разделения пар носителей заряда при освещении *p-n*-перехода (а) и режимы включения фотодиода: фотодиодный (б) и фотогальванический (в)

Фотодиоды для фотометров видимого и ближнего ультрафиолетового диапазонов изготавливают на основе кремния. Спектральные чувствительности фотодиодов для видимой (фотодиод марки S1337-BR) и ультрафиолетовой+видимой (фотодиод марки S1337-BQ) областей спектра приведены на рисунке 111.



В современных фотометрах используют как одиночные фотодиоды, так и матрицы фотодиодов смонтированных в одной конструкции. Одиночные фотодиоды могут быть различной конструкции и иметь различные размеры фоточувствительной площадки (рисунок 110а).

Матрицы фотодиодов представляют собой одномерный или двумерный массив диодов (рисунок 112 б,в соответственно). Размер отдельного фоточувствительного элемента в линейной матрице составляет 0,3 x 3,2 мм, а двумерной матрице – 1,3 x 1,3 мм.

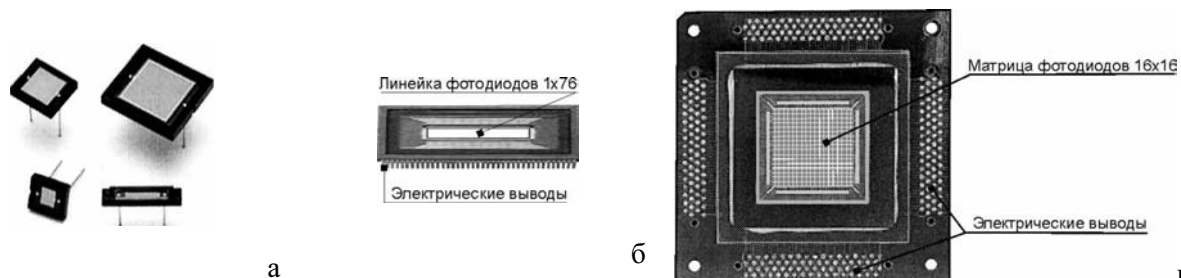


Рис. 112. Матрицы фотодиодов: а - одиночные фотодиоды, б - одномерный , в - двумерный массив фотодиодов

Развитие полупроводниковых матриц фотодиодов и их использование в качестве приемников излучения в спектрофотометрах привело к созданию устройств, измеряющих поток излучения одновременно на множестве длин волн. Каждый фотодиод матрицы в этих устройствах «принимает» определенную длину волны (рисунок 113). Некоторые датчики имеют разрешение 2 нм на один диод в интервале от 200 до 340 нм и разрешение 1нм на диод в интервале от 340 до 800 нм.

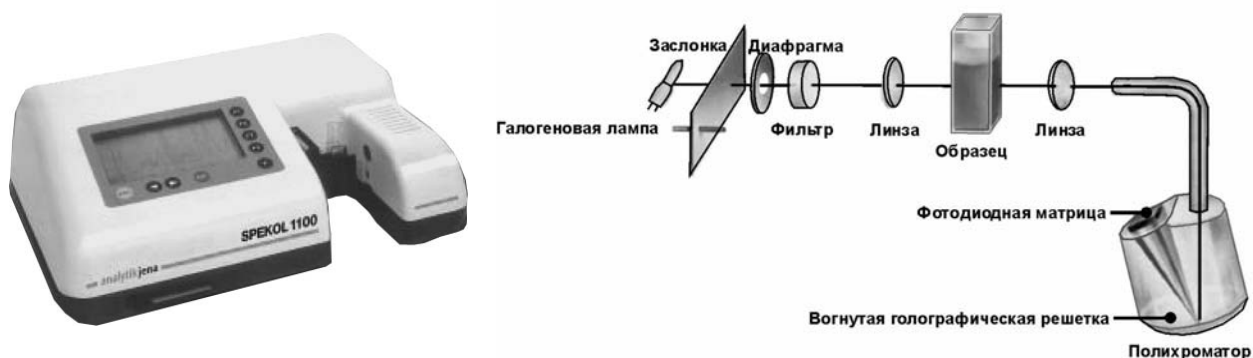


Рис. 113. Спектрофотометр SPEKOL 1100 и его оптическая схема. За счет использования матрицы фотодиодов существенно уменьшаются размеры спектрофотометра и исчезает поворотный механизм полихроматора.

ВОЛОКОННАЯ ОПТИКА.

Использование в фотометрах традиционных оптических элементов линз, решеток, фильтров, кювет и т.д. накладывает большие ограничения на возможности конструирования новых эффективных приборов. Стекловолоконные световоды, представляющие собой либо отдельное волокно, либо связку волокон, обладают, с одной стороны, устройствами для канального пропускания света, с другой стороны, их гибкость, возможность разделения одного пучка на несколько световодов, дают неоценимые преимущества для новейших конструкций фотометров.

Применение волоконной оптики в спектрофотометрах позволяет лучше распределить (направить) внутри прибора световые потоки, миниатюризировать и удешевить оптические подсистемы для использования в автоматизированных устройствах. Например, единственный источник света может быть мультиплексирован с многочисленными датчиками через волоконную оптику для оптимального расположения источника и датчиков в пределах автоматизированной системы (рисунок 114).

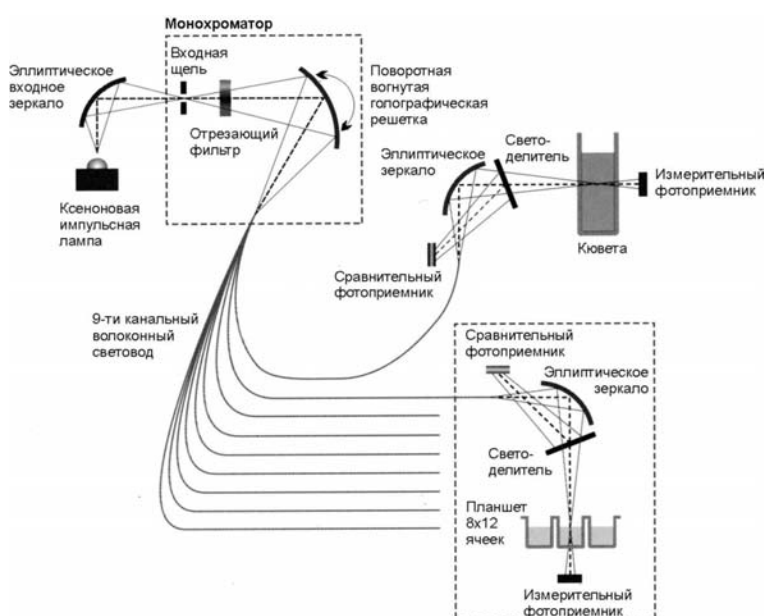


Рис. 114. Волоконный световод минимизирует оптическую схему планшетного фотометра SPECTRAmax PLUS

Совмещение оптоволоконной технологии с лазерной прецизионной технологией голографических решеток и микроэлектроники привело к созданию гибридных миниатюрных фотометров (рисунок 115). Свет направляется через гибкий волоконный световод. Такие элементы

применяются в плашечных фотометрах, в отражательных фотометрах для полифункциональных полосок «сухая химия».

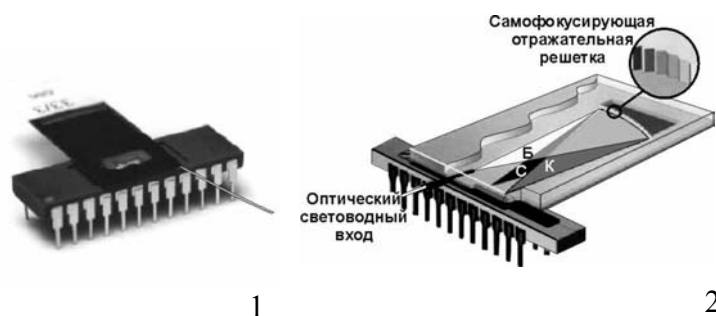


Рис. 115. **Микроспектрофотометр** фирмы MicroPart на основе микроэлектронного чипа с фотодиодной линейкой. 1 – общий вид; 2 – конструкция чипа: Б – белый свет, С- синий участок спектра, К- красный участок спектра

Недостатком волоконной оптики является значительный рассеянный свет, изменение светопропускания за счет изменения коэффициентов преломления оптических материалов световодов, а также потери при передаче света после продолжительного использования световодов в UV области спектра. Эти потери связаны с поляризацией оптических материалов и приводят к уменьшению оптической чувствительности фотометров.

УСТРОЙСТВА СЧИТЫВАНИЯ

Величина электрического сигнала фотопреобразователя может считываться и отображаться на стрелочных гальванометрах, цифровых индикаторах со светодиодными формообразующими элементами, жидкокристаллических индикаторах и экранах.

Гальванометры могут измерять величину электрического тока фотоэлемента напрямую или служить индикатором нуля в схемах выравнивания сигнала образца относительно стандарта или бланка. Выравнивание производится поворотом ручки (изменением) резистора в плече сравнения электрических токов образца и стандарта, искомая величина отсчитывается на шкале, механически связанной с ручкой резистора. В прямых системах считывания выход фотоэлемента подключается к чувствительному гальванометру без предварительного усиления тока. В других приборах усилители тока служат для увеличения сигнала фотоприемника до необходимой величины.

Цифровые устройства индикации подключаются к выходу блоков усиления тока и цифровой обработки фотометрических данных и обеспечивают визуальное отображение чисел, соответствующих оптической плотности, пропусканию или концентрации. По сравнению с гальванометрами, цифровые устройства считывания имеют большее быстродействие, удобнее для восприятия информации и меньше утомляют оператора.

Современные фотометры содержат микропроцессорные устройства считывания величины фототока и программного определения плотности образца относительно плотности бланка. Значение плотности бланка хранится в памяти микропроцессора.

РЕГИСТРИРУЮЩИЕ УСТРОЙСТВА.

Фотометры могут быть оснащены устройствами регистрации данных, как в текстовом, так и в графическом виде (например, спектры поглощения и пропускания как функции времени или длины волны). Зависимость поглощения от времени широко используется для кинетических исследований активности ферментов. Так, при кинетическом определении лактатдегидрогеназы, скорость уменьшения концентрации НАДН может отображаться в виде изменения оптической плотности на длине волны 340 нм по мере того, как пуриват преобразуется в лактат. В современных биохимических анализаторах множественные измерения плотности через короткие интервалы времени обрабатываются микропроцессорной системой, чтобы выделить линейную часть кривой, рассчитать наклон $\Delta D/\text{мин}$, умножить на соответствующую константу (фактор) и получить искомую величину, которая отображается на дисплее или распечатывается на бумаге.

Чаще всего в качестве таких устройств регистрации используются малогабаритные принтеры со струйной печатью (на обычную бумагу) или с термopечатью (на термобумагу). Вообще, современные принтеры могут иметь любой формат печати (размеры поля печати),

который выбирается исходя из конкретной задачи. Некоторые спектрофотометры оборудованы графопостроителями – устройствами для отображения фотометрических данных на бумаге с помощью управляемой по одной или двум координатам чернильной головки.

ПРИБОРЫ ДЛЯ ФОТОМЕТРИЧЕСКОГО АНАЛИЗА.

Фотометрические приборы, применяемые для лабораторных исследований, можно разделить на 2 группы:

1. Фотометры и спектрофотометры общего назначения, которые предназначены для определения оптической плотности или пропускания растворов с последующим пересчетом фотометрических параметров в значения искомых параметров исследуемых веществ либо по формулам, либо по таблицам, либо по калибровочным графикам.

2. Фотометры и спектрофотометры специального назначения или анализаторы фотометрические - предназначены для проведения исследований растворов определенных веществ по методикам, внесенным в алгоритмы работы прибора, с получением, как правило, конечного результата в виде измеряемого параметра аналита.

ФОТОМЕТРЫ ОБЩЕГО НАЗНАЧЕНИЯ.

Однолучевые микроколориметры медицинские фотометрические МКМФ-1 и МКМФ-2.

Микроколориметр применяют для измерения оптической плотности и светопропускания растворов в диапазоне видимого света 425-610 нм. В качестве источника света используется лампа накаливания. Приемник излучения – фотоэлемент Ф-9. Прибор снабжен набором сменяемых вручную светофильтров с длинами волн в максимуме 425, 458, 515, 540, 570, 610 нм. В качестве регистрирующего устройства применен гальванометр с широкой шкалой. Для установки нуля пропускания и необходимого коэффициента усиления (100% пропускания) имеются 2 ручки.

Микроколориметр МКМФ-02 имеет встроенный микропроцессор, вместо гальванометра используются светодиодные индикаторы.

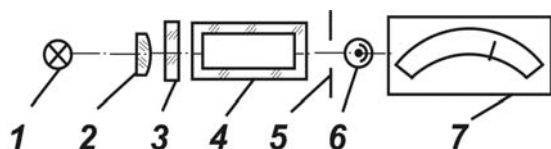


Рис.116. Микроколориметр МКМФ-1: оптическая схема и внешний вид.

1 – лампа накаливания; 2 – конденсорная линза; 3 – сменяемый (вручную) светофильтр; кювета; 5 – диафрагма (щель); 6 – фотоэлемент; 7 – гальванометр.

Двухлучевой фотоэлектрический колориметр ФЭК-56.

Колориметр применяют для измерения оптической плотности и светопропускания растворов в области спектра 315-630 нм. В качестве источников света используют две сменные лампы: лампу накаливания, дающую сплошной спектр излучения в видимой области спектра, и ртутную лампу с линейчатым спектром излучения в ультрафиолетовой и видимой областях. Приемниками света служат два сурьмяно-цезиевых фотоэлемента Ф-4, включенных по дифференциальной схеме. Прибор снабжен набором узкополосных светофильтров,

расположенных на поворотной турели. В набор входят светофильтры с максимумами пропускания на 315, 364, 400, 434, 490, 540, 582 нм (варианты – 597 и 630 нм) (рисунок 117).

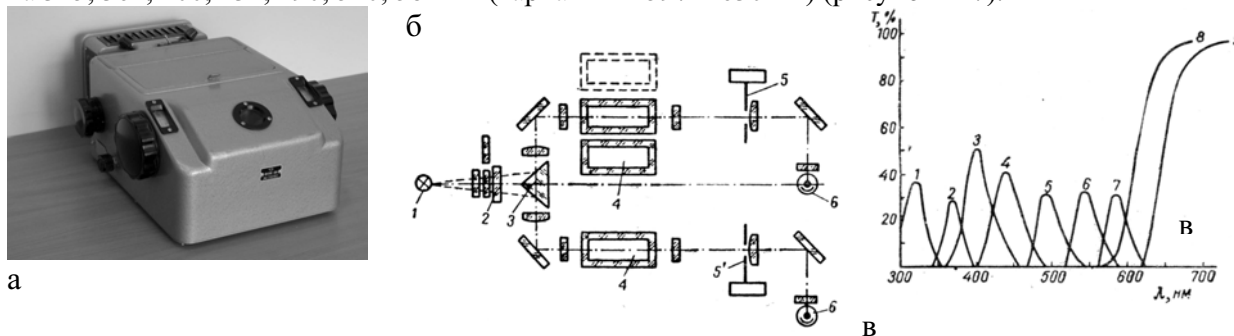


Рис.117. Фотоэлектроколориметр ФЭК-56. а) – внешний вид; б) – оптическая схема: 1 – источник света; 2 – светофильтр; 3 – светоделительная призма; 4 – кюветы для исследуемых и стандартных растворов; 5 – компенсационная диафрагма; 6 – фотоэлементы; в) спектральные характеристики светофильтров ,1-9 – номера светофильтров.

Свет от источника, пройдя через светофильтр, попадает на призму, которая делит поток на 2 луча: левый и правый. Далее эти лучи идут по параллельным каналам через кюветы, диафрагмы и попадают на фотоэлементы. Фотоэлементы подключены по дифференциальной схеме через усилитель на индикаторную лампу, используемую в качестве нуль-индикатора. Измерение плотности или светопропускания проводится вращением барабана привода щели. Изменяя размер щели, добиваются равенства световых потоков, падающих на фотоэлементы двух каналов. Равенство индицируется нуль-индикатором. По нанесенным на барабаны шкалам определяют плотность или пропускание относительно опорного канала, в который может быть помещена кювета с бланком или стандартом.

Колориметры МКМФ-02 и ФЭК-56 – приборы общего назначения. Несмотря на то, что они широко применяются в клиничко-диагностических лабораториях, они не являются специализированными медицинскими приборами и не призваны выполнять сугубо медицинские задачи, в том числе по обеспечению необходимого качества лабораторных исследований.

Основными недостатками таких приборов для клинической химии являются использование клиновидного клапана, который для компенсации уменьшает световой поток, проходящий через кювету, применение широкополосных светофильтров, отсутствие термостатирования и относительно малый оптический диапазон.

Так, рекомендуемый оптический диапазон для ФЭКов составляет 0,2 – 0,8 единиц оптической плотности (белл). В современных фотометрах и биохимических анализаторах линейный оптический диапазон расширен от 0 до 2,5 и даже 3,0 белл. Это существенное улучшение, которое позволяет значительно расширить диапазон измеряемых концентраций аналитов без их разведения (рис. 116) и позволяет шире использовать расчет неизвестной концентрации по стандарту.

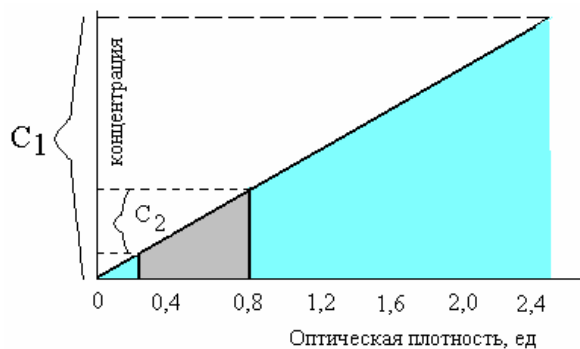


Рис. 118. Расширение диапазона измерения концентрации аналита в зависимости от оптического диапазона.

ФЭК с линейным диапазоном оптической плотности от 0,2 до 0,8 Б позволяет измерять без разведения концентрацию аналита в пределах, обозначенных “С2”; Современный фотометр с линейным диапазоном оптической плотности от 0 до 2,5 Б позволяет измерять без разведения концентрацию аналита в 3 раза более широких пределах, обозначенных “С1”

Однолучевой спектрофотометр СФ-46.

В основу работы спектрофотометра СФ-46 (рис 119а) положен принцип измерения отношения двух световых потоков: потока, прошедшего через исследуемый образец, и потока, падающего на исследуемый образец (или прошедшего через контрольный образец).

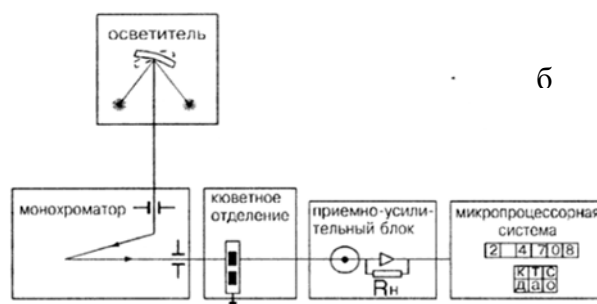
Структурная схема спектрофотометра представлена на рисунке 119б. Световой пучок из осветителя попадает в монохроматор через входную щель и разлагается дифракционной решеткой в спектр. В монохроматический поток излучения, поступающий из выходной щели в кюветное отделение, поочередно вводятся контрольный и исследуемый образцы. Излучение, прошедшее через образец, попадает на катод фотоэлемента в приемно-усилительном блоке. Электрический ток, проходящий через резистор R_H , который включен в цепь фотоэлемента, создает на резисторе падение напряжения, пропорциональное потоку излучения, падающему на фотокатод.

Усилитель постоянного тока с коэффициентом усиления, близким к единице, обеспечивает передачу сигналов на вход микропроцессорной системы (далее - МС). МС по команде оператора поочередно измеряет и запоминает напряжения U_T , U_0 и U , пропорциональные темновому току фотоэлемента, потоку, прошедшему через контрольный образец, и потоку, прошедшему через исследуемый образец соответственно. После измерения МС рассчитывает коэффициент пропускания T исследуемого образца.

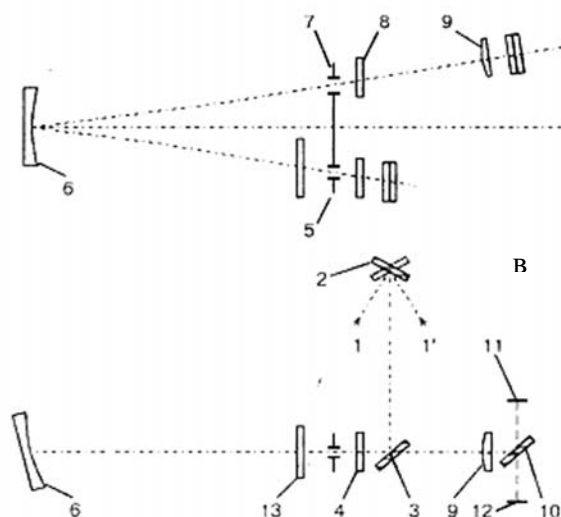
Значение измеренной величины высвечивается на цифровом табло.



а



б



в

Рис. 119. Спектрофотометр СФ-46

а – внешний вид

б - структурная схема спектрофотометра

в - оптическая схема: 1, 1' — источники света; 2 — зеркальный конденсор; 3 - поворотное зеркало; 4 - линза; 5 — входная щель монохроматора; 6 — дифракционная решетка; 7 - выходная щель монохроматора; 8 и 9 — линзы; 10 — поворотное зеркало; 11 и 12 — фотоэлементы; 13 — светофильтр

Оптическая схема СФ-46 показана на рисунке 119в. Излучение от источника 1 или 1' падает на зеркальный конденсор 2, который направляет его на плоское поворотное зеркало 3 и даст изображение источника излучения в плоскости линзы 4, расположенной вблизи входной щели 5 монохроматора. Монохроматор построен по вертикальной автоколлимационной схеме. Прошедшее через входную щель излучение падает на вогнутую дифракционную решетку 6 с переменным шагом и криволинейным штрихом. Решетка изготавливается на сферической поверхности, поэтому, помимо диспергирующих свойств, она обладает способностью фокусировать спектр. Применение переменного шага и криволинейного штриха значительно

уменьшает абберационные искажения вогнутой дифракционной решетки и позволяет получить высокое качество спектра во всем рабочем диапазоне длин волн.

Диафрагмированный пучок фокусируется в плоскости выходной щели 7 монохроматора, расположенной над входной щелью 5. Сканирование осуществляется поворотом дифракционной решетки, при этом монохроматическое излучение различных длин волн проходит через выходную щель 7, линзу 8, контрольный или измеряемый образец, линзу 9 и с помощью поворотного зеркала 10 попадает на светочувствительный слой фотоэлемента 11 или 12. Для уменьшения рассеянного света и срезания высших порядков дифракции в спектрофотометре используются два светофильтра: из стекла ПС11 для работы в области спектра 230—450 нм и из стекла ОС14 для работы в области спектра 600—1100 нм. Смена светофильтров производится автоматически.

Линзы изготовлены из кварцевого стекла с высоким коэффициентом пропускания в ультрафиолетовой области спектра. Для обеспечения работы спектрофотометра в широком спектральном диапазоне используются два фотоэлемента и два источника излучения сплошного спектра. Сурьмяно-цезиевый фотоэлемент с окном из кварцевого стекла применяется для измерений в области спектра от 190 до 700 нм, кислородно-цезиевый фотоэлемент - для измерений в области спектра от 600 до 1100 нм. Длина волны, при которой следует переходить от измерений с одним фотоэлементом к измерениям с другим фотоэлементом, указана в паспорте спектрофотометра. Дейтериевая лампа предназначена для работы в области спектра от 190 до 350 нм, лампа накаливания - для работы в области спектра от 340 до 1100 нм. Для проверки градуировки прибора используется ртутно-гелиевая лампа ДРГС-12.

Спектрофотометр СФ-46 – прибор общего назначения. В клинко-диагностических лабораториях применяется для исследований на длинах волн, которые не характерны для широко применяемых хромогенов, а также при проведении работ, связанных с контролем качества.

Двухлучевой спектрофотометр BECKMAN UV 5240.

Спектрофотометр BECKMAN UV 5240, работающий в ультрафиолетовой, видимой и ближней ИК областях спектра в двух лучевом или одно лучевом режимах, представляет собой цифровой спектрофотометр с прямым считыванием данных, выполняющий запись информации в соотносительной форме. Он предназначен для проведения быстрых и точных измерений спектральных измерений поглощения, пропускания или концентрации образца в диапазоне длин волн от 190 до 800 нм и от 800 до 3000 нм.

На спектрофотометре можно производить качественные и количественные анализы жидкостей, газов и твердых тел.

Основными компонентами спектрофотометра BECKMAN UV 5240 являются: монохроматор (дифракционная решетка), источники излучения (с автоматическим переключением) – вольфрамовая лампа и дейтериевая лампа, электронное оборудование, самописец, большой отсек для образцов, фотоприемники УФ, видимого и ИК диапазонов. Сканирование по длинам волн производится автоматически или вручную. Выбор ширины щели также может производиться вручную или программно сервомеханизмом (механическим приводом).

Записывающее устройство спектрофотометра имеет систему для периодически повторяющегося сканирования, которая может производить либо последовательное сканирование, либо одновременное сканирование. В спектрофотометре имеется система из нескольких потенциометров, которая позволяет оператору производить нужную подстройку нуля.

Функциональная схема спектрофотометра Beckmann UV 5240 изображена на рисунке 120. Излучение от вольфрамовой или дейтериевой лампы попадает в монохроматор через входную щель и через широкополосные фильтры предварительной фильтрации с длинами волн 300, 350, 400, 460, 560 и 690 нм. После монохроматора свет проходит через выходную щель и разделяется переключателем света на два одинаковых луча, проходящих

через опытный образец и через образец сравнения. 2 луча, выходящие из отсека с образцами направляются вторым переключателем света на один фотоприемник последовательно во времени от опытного образца и образца сравнения. Результат измерения представляется на цифровом дисплее в виде значения либо пропускания, либо оптической плотности, либо концентрации. Волновые параметры излучения представляются на прецизионных шкалах.

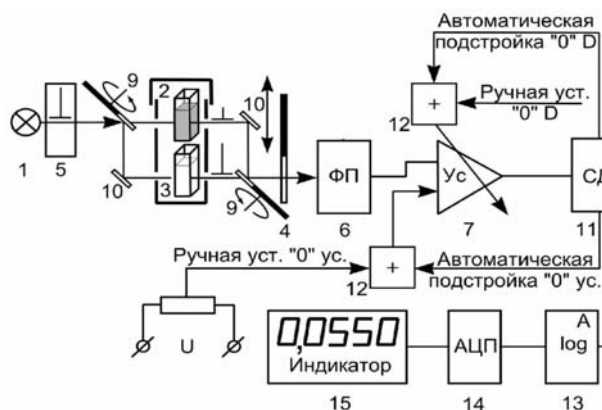


Рисунок 120. Двухлучевой спектрофотометр Beckmann UV 5240. Общий вид и функциональная схема.

1 – источник света; 2 – исследуемый образец; 3 – стандартный образец; 4 – заслонка; 5 – монохроматор; 6 – фотоприемник; 7 – усилитель фототока; 9 – переключатели света (диски с зеркальными и прозрачными секторами); 10 – зеркала; 11 – устройство автоматического регулирования; 12 – устройства электрической подстройки усилителя; 13 – аналоговый логарифмический преобразователь (для режима измерения плотности); 14 – аналого-цифровой преобразователь; 15 – индикаторное устройство. Регистратор не изображен.

Технические параметры и характеристики спектрофотометра Beckmann UV 5240.

Описание характеристики или параметра	Характеристика или значение параметра
Принцип работы	Двух лучевой и одно лучевой режимы работы
Монохроматор	Дифракционная решетка и предварительная спектральная фильтрация
Диапазоны длин волн	190-800 нм 800-3000 нм
Точность установки длины волны	$\pm 0,5$ нм (190-800 нм) $\pm 2,5$ нм (800-3000 нм)
Воспроизводимость длины волны	0,1 нм (190-800 нм) 0,5 нм (800-3000 нм)
Разрешение	$< 0,2$ нм (190-800 нм) $< 1,2$ нм (800-3000 нм)
Фотометрическая линейность	0,3% при оптической плотности 1,0 белл 0,5% при 2,0 белл 3% при 3,0 белл
Фотометрическая воспроизводимость	0,002 белл при оптической плотности 1 белл 0,003 белл при оптической плотности 2 белл

	0,015 белл при оптической плотности 3 белл
Рассеянное излучение	<0,1 % на 370 нм <0,1 % на 220 нм
Стабильность нуля	0,0005 белл/час или 0,005 белл/день при оптической плотности 0 белл

АНАЛИЗАТОРЫ МЕДИЦИНСКИЕ ФОТОМЕТРИЧЕСКИЕ.

В данном разделе рассматриваются специализированные фотометрические приборы, предназначенные для проведения медицинских лабораторных исследований. В зависимости от назначения в основе прибора лежит спектрофотометр или фотометр. Приборы содержат всевозможные устройства обработки данных и автоматизации лабораторных процедур. В настоящее время используется огромное количество фотометров и спектрофотометров специального назначения - анализаторов, некоторые из них представлены на рисунке 119.

С точки зрения методов управления измерением анализаторы делятся на ручные, полуавтоматические и автоматические.

В ручных фотометрах управление процессом фотометрирования и калибровки производится вручную и только представление данных бывает автоматизировано. Так в колориметре фотометрическом концентрационном КФК-3 установка длины волны, спектральной полосы и калибровки производится вручную. Встроенный процессор может пересчитывать измеренную плотность значения по фактору в численное значение измеряемого параметра, в том числе и в режиме разделения времени для двух точечных кинетических исследований.

В полуавтоматических анализаторах (рисунок 119), как правило, имеется программное устройство, содержащее алгоритм фотометрирования по биохимическим методикам. Оператор выбирает необходимый алгоритм и устанавливает исследуемый образец в прибор. Программное устройство автоматически выбирает спектральные диапазоны фотометрирования, последовательность измерений, временные интервалы измерений и т.д. При этом алгоритм предусматривает и процедуры калибровки с запоминанием калибровочных данных и автоматическим «построением» калибровочной кривой. Данные измерений могут представляться на устройствах индикации или распечатываться встроенными принтерами. Многие из таких анализаторов способны «обучаться», то есть в них можно вносить дополнительные методики исследований. Такие анализаторы относят к «открытым» системам. Примером такого программируемого анализатора может служить биохимический анализатор БиАн (полное название - анализатор биохимический фотометрический кинетический, тип средства измерения АБхФк-02-«НПП-ТМ»). Пробоподготовка в полуавтоматических анализаторах производится вручную.

Типовые фотометрические параметры программируемых фотометров:

- Линейный диапазон измерения оптической плотности 0,2 – 2 Б.
- Линейность 5% - 1%.
- СКО 0,005 - 0,001.
- Спектральная полоса (для фильтров) 8-10 нм.
- Число спектральных каналов (фильтров) 4 - 8.



1



2



3



Рис. 121. Фотометры и спектрофотометры для клинико-диагностических лабораторий. 1 - БиАн (Россия); 2 – SPECTRAmax Plus; 3 – Photometer 5010; 4 – ScreenMaster; 5 – Human 2000; 6 – StatFax 1904 Plus; 7 – Specol 1100; 8 – Specord 30; 9 – Униплан (Россия).

Биохимический анализатор БиАн.

Биохимический анализатор БиАн (рисунок 121, 1) предназначен для определения концентрации веществ в жидких биологических пробах по измеренному значению оптической плотности в стандартных кварцевых и стеклянных кюветках или в цилиндрических пробирках с длиной оптического пути 10 мм при проведении биохимических анализов кинетическим методом и по конечной точке.

Устройство анализатора БиАн представлено на рисунке 122. Один микропроцессор управляет работой функциональных элементов фотометра: дисплеем, микродвигателем привода вращения турели, режимом работы лампы осветителя, нагревательными элементами и датчиками температуры термостатов, кнопками управления, электронной схемой усиления и обработки фототока и т.д. Второй процессор содержит команды управления при выполнении различных операций, необходимых для проведения лабораторного исследования. В этом процессоре реализован алгоритм интерфейса пользователя.

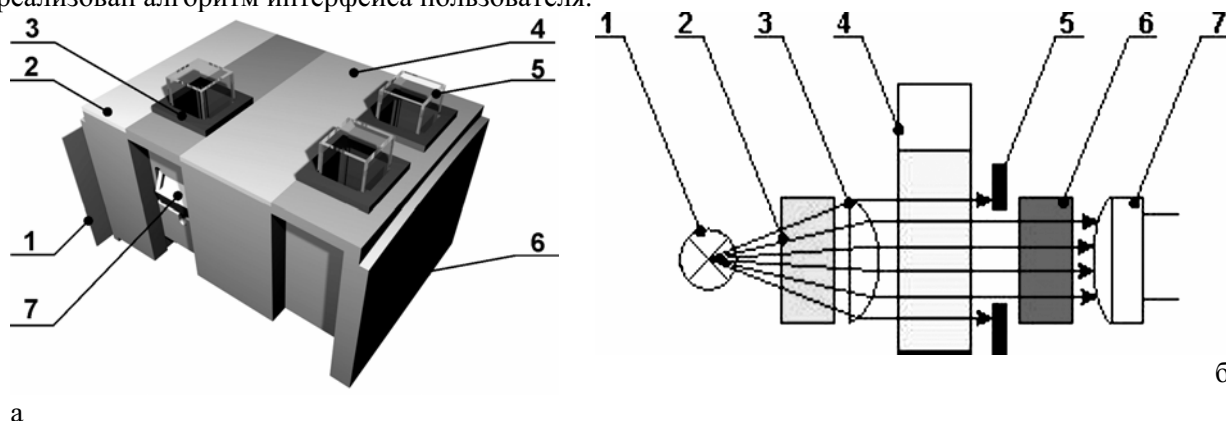


Рис. 122. Устройство анализатора БиАн.

а - оптический блок состоит из пластмассового корпуса 6, секции с двумя гнездами для установки кювет или пробирок 5, картриджа с осветительной галогеновой лампой 4, секции с фотометрическим гнездом 3, картриджем с турелью для установки светофильтров 2, и печатной платой 1. На корпусе установлен также датчик положения кюветы (пробирки) 7.

б - оптическая схема фотометра: 1 – галогеновая лама, 2 - выравнивающий светофильтр, 3 – коллиматор, 4 - кювета с биопробой, 5 – диафрагма, 6- интерференционный светофильтр, 7 - фотодиод

В анализаторе БиАн гнезда секции 5 и фотометрическое гнездо термостатируются при температуре 37 градусов. При работе с фотометром используются как пробирки, так и кюветы. При использовании цилиндрических пробирок в гнезда фотометра устанавливается специальный механические адаптер (переходник – держатель), обеспечивающий позиционирование пробирок в оптическом канале с высокой точностью.

Наличие стандартного фотометрического гнезда позволяет производить метрологический контроль и проверять работоспособность фотометра с помощью стеклянных мер, которые размещены в корпусах с габаритами стандартной кюветы (набор стеклянных мер оптической плотности НОСМОП-7).

Оптическая схема анализатора БиАн изображена на рисунке 121б. В качестве осветителя в оптической схеме используется галогеновая лампа. Температурный баланс достигается в течение 10-15 минут после прогрева окружающих лампу элементов корпуса блока. С целью снижения теплового потока лампа работает в импульсном режиме, при этом временная диаграмма электрического тока лампы обеспечивает увеличение долговечности лампы. Для того, чтобы оптимизировать спектр излучения лампы, применен выравнивающий светофильтр, он же выполняет функцию подавления рассеянного света. Коллиматор (линза) создает сходящийся световой поток, направляемый на кювету (пробирку) с биопробой. Световой поток ограничивается диафрагмой. После фотометрической кюветы свет проходит через интерференционный светофильтр и попадает на фотодиод. Интерференционные светофильтры расположены на вращающейся турели. Размещенный непосредственно перед фотодиодом светофильтр ослабляет влияние внешних засветок, что важно при открытом фотометрическом гнезде. Тонкостенный корпус термостата обеспечивает достаточную теплопроводность для стабилизации температуры термостата при динамическом нагреве. При таком режиме нагрева расходуется минимум мощности при точности стабилизации $\pm 0,2$ градуса.

Спектральные каналы анализатора БиАн: 340 нм, 405 нм, 492 нм, 540 нм, 620 нм, 690 нм, спектральная полоса пропускания интерференционных фильтров 10 ± 2 нм.

Диапазон оптических плотностей 0 – 3 Б, линейность при 2 Б – 3%, СКО при 2 Б – 0,001Б.

Анализаторы с вертикальным фотометрированием.

Фотометры с вертикальным фотометрированием применяются для различных биохимических и иммуноферментных анализов. Конструкция таких фотометров позволяет проводить параллельные измерения одновременно по нескольким оптическим каналам (рисунки 123-126). Другой особенностью этих фотометров является использование микрокювет – лунок стрипов или планшетов с микрообъемами растворов исследуемых веществ.

Рисунок 123. Оптическая схема девяти канального анализатора FP-901.

1 – галогеновая лампа; 2 – обтюратор (прерыватель света – вращающийся диск с отверстиями); 3 – поворотное зеркало; 4 – турель с узкополосными интерференционными фильтрами; 5 – оптико-волоконный разветвитель света на 9 каналов; 6 – 9 коллимирующих линз; 7 – 9-ти луночный планшет; 8 – кремниевые фотодиоды.

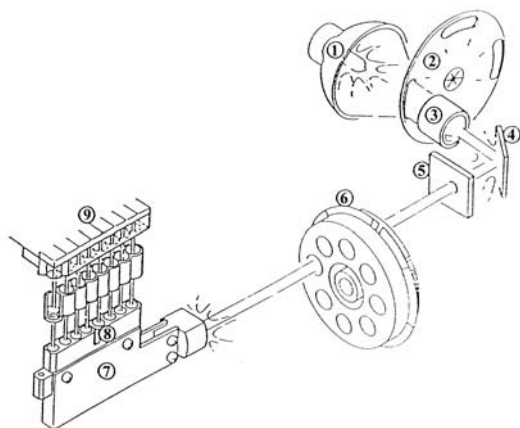
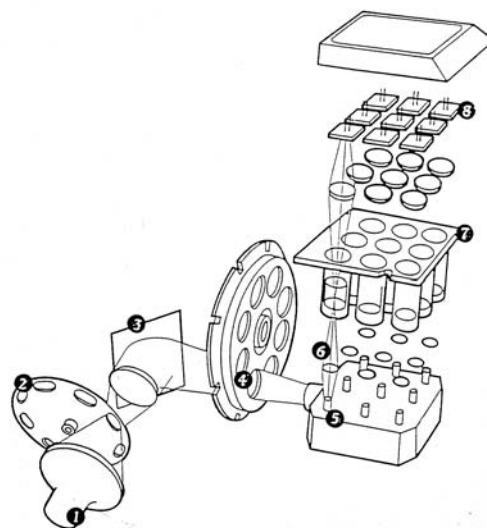
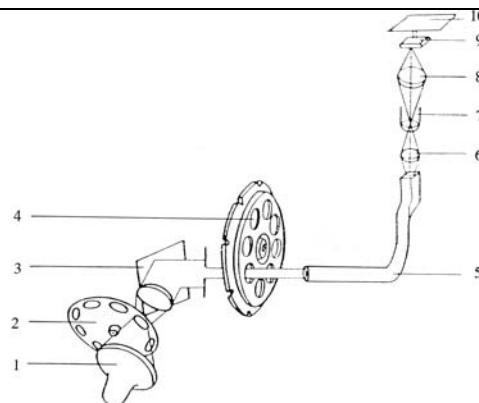


Рисунок 124. Оптическая схема восьми канального анализатора Multiscan.

1 – галогеновая лампа; 2 – обтюратор; 3 – коллиматор; 4 – поворотное зеркало; 5 – апертура (щель); 6 – турель с интерференционными фильтрами; 7 – оптико-волоконный разветвитель света на 8 каналов; 8 – фокусирующие линзы; 9 – верхние линзы и фотоприемники.

Рисунок 125. Оптическая схема восьми канальных анализаторов Mutascreeen, Bioscreen и Auto-EIA.

1 – галогеновая лампа; 2 – обтюратор; 3 – поворотное зеркало; 4 – турель с интерференционными фильтрами; 5 – оптико-волоконный разветвитель света на 8 каналов; 6 – фокусирующие линзы; 7 – лунки планшета; 8 – фокусирующие линзы; 9 – кремниевые фотоприемники; 10 – усилитель фототока.



Планшетный анализатор с вертикальным фотометрированием «УНИПЛАН»

Прибор "УНИПЛАН" представляет собой фотометр с вертикальным ходом светового луча и предназначен для регистрации результатов иммуноферментного анализа (ИФА), проводимого на специальных полистирольных планшетах с 96 лунками.

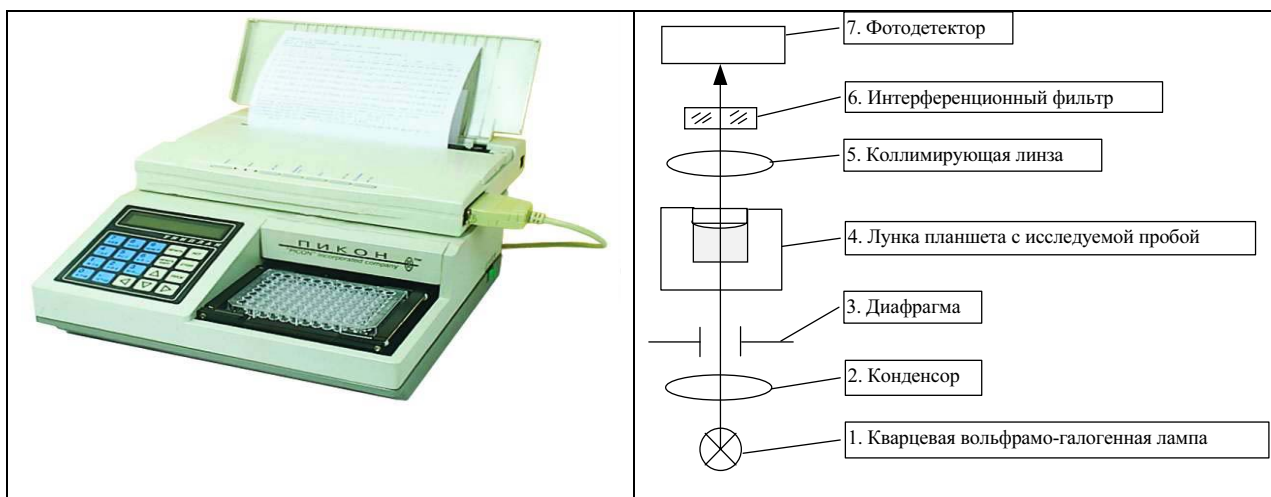


Рис.126. Планшетный фотометр с вертикальным фотометрированием – общий вид и Оптическая схема прибора

Свет от кварцево-галогенной лампы, сформированный конденсором и ограниченный диафрагмой, проходит через лунку полистирольного планшета, в которой находится анализируемая проба. Ослабленный пробой световой поток проходит через коллимирующую линзу, интерференционный светофильтр, выделяющий узкий спектральный участок и поступает на фотодетектор.

Прибор обеспечивает измерение оптической плотности в диапазоне от 0 до 3,0 Б (белл) в спектральном интервале 400-700 нм с точностью 1,5% или 0,005 Б. Время измерения 96 лунок планшета не более 1 мин.

Проведение измерений производится по встроенным программам для тест-систем, выпускаемым как в России, так и за рубежом.

Одноволновые анализаторы

Гемоглобинометры фотометрические портативные АГФ-03-1 МиниГЕМ 540 и АГФ-03-2 МиниГЕМ 523.

Для некоторых массовых исследований достаточно использование простых анализаторов, рассчитанных на одну методику фотометрического определения вещества. К таким фотометрам относятся одноволновые гемоглобинометры фотометрические портативные АГФ-03-1 МиниГЕМ 540 и АГФ-03-2 МиниГЕМ 523.

Фотометрическое исследование концентрации общего гемоглобина - может проводиться как на спектрофотометрах и фотоколориметрах общего назначения (СФ-46, СФ-56, СФ-121, ФЭК-56, КФК-3 и т.п.), так и на специализированных фотометрах – гемоглобинометрах. Наиболее точные результаты получаются на спектрофотометрах, однако, измерение на них относительно сложное и трудоемкое. Исследование же на фотоколориметрах требует частой предварительной калибровки прибора по калибровочным растворам, что также неудобно. Гемоглобинометры дают приемлемую для рутинных исследований точность и в то же время просты и удобны в эксплуатации. В лабораториях используют несколько типов гемоглобинометров - гемоглобинометр фотоэлектрический ГФ-Ц-04, гемоглобинометр фотоэлектрический "Гемолан-5", микрофотометр МФ-1020, гемоглобинометр фотометрический портативный АГФ-03 МиниГЕМ. Наиболее известны два последних. Гемоглобинометр МиниГЕМ (рис. 127) широко представлен в российских лабораториях и в последние годы экспортируется за рубеж. Он выделяется современным дизайном, функциональной простотой и, самое главное, стабильностью измерений, которая обеспечивается уникальной функцией автоматической коррекции оптических параметров (автокалибровка).



Рис. 122. Гемоглобинометр МиниГЕМ - оптическая схема и внешний вид.

МиниГЕМ - специализированный фотометр для определения концентрации гемоглобина крови в г/л. Измерение оптической плотности проводится в узком спектральном диапазоне с использованием стандартной 10 мм фотометрической кюветы с последующим автоматическим пересчетом в результат анализа по заданному алгоритму.

Оригинальная оптическая схема, использующая узкополосные светофильтры, высокочувствительная электронная обработка с функцией автоматического контроля параметров оптико-электронного тракта обеспечивают точность, а также хорошую воспроизводимость результатов измерения.

При подготовке прибора к работе не требуются присущие многим фотометрам и фотоколориметрам процедуры установки нуля и калибровки. Отпадает необходимость использования калибровочных растворов. Контроль правильности калибровки прибора осуществляется при помощи прилагаемой контрольной оптической меры (светофильтра из специально подобранных оптических стекол). Предусмотрен также контроль чистоты и качества поверхностей оптической кюветы и уровня оптического нуля, от которых, не в последнюю очередь, зависит точность измерений. Контроль уровня оптического нуля (оптической плотности бланка) осуществляется по оптической кювете, заполненной дистиллированной водой. На тот случай, когда качество кюветы незначительно отличается от стандартных требований (наличие небольших царапин, неоднородностей в стекле и пр.), в приборе предусмотрена процедура «обнуления» по кювете с водой. Простота измерений и отсутствие процедур калибровки снижают вероятность ошибок даже для неопытного лаборанта или медсестры и расширяют зону применения прибора в медицинских учреждениях.

Технические данные. Диапазон измеряемой концентрации общего гемоглобина крови от 40 до 360 г/л. Суммарная погрешность определения концентрации гемоглобина, полученная при медицинских испытаниях, не превышает 2% во всем диапазоне измеряемых концентраций. Объем пробы для фотометрирования - не менее 1 мл и не более 4 мл. Длина оптического пути кюветы - $10 \pm 0,1$ мм. Питание прибора может осуществляться от сети переменного тока напряжением 220 В 50 Гц или от 3-х внутренних стандартных сухих элементов питания типа АА. Прибор содержит экономичную электронную схему, поэтому время работы в автономном режиме составляет от одного года до 4 лет лет (в течение всего срока годности батарей) без замены элементов питания.

Выпускается 2 модели гемоглобинометра МиниГЕМ: МиниГЕМ 540 (тип средства измерения АГФ-03-1) и МиниГЕМ 523 (тип средства измерения АГФ-03-2).

В приборе отсутствуют какие-либо ручки или кнопки включения и управления процессом измерения. Прибор автоматически включается и автоматически производит измерение, когда в него помещается фотометрическая кювета или контрольный светофильтр. Повторные измерения производятся через каждые 4 секунды до тех пор, пока кювета или контрольный светофильтр не будут извлечены из кюветного отделения. Каждый измерительный цикл сопровождается звуковыми сигналами.

После извлечения кюветы прибор находится в пассивном режиме ожидания, пока в него вновь не будет помещена кювета или контрольный светофильтр. В пассивном режиме электроэнергия практически не потребляется, что обеспечивает долговременное использование элементов питания без их замены.

Источником света в гемоглобинометре МиниГЕМ является яркий полупроводниковый светодиод зеленого цвета свечения с узкой диаграммой излучения. Световой пучок от светодиода падает на находящуюся в фотометрической ячейке кювету с исследуемым раствором. Прошедший кювету световой поток падает на светофильтр, который вырезает узкую область спектра. Спектральная кривая пропускания фильтра имеет максимум на длине волны 540 нм для гемоглобинометра МиниГЕМ 540 и 523 нм для гемоглобинометра МиниГЕМ 523. Далее свет попадает на фотоприемник, в качестве которого используется полупроводниковый фотодиод. В фотоприемнике происходит преобразование света в электрический сигнал.

Электронная плата содержит аналоговую схему усиления и преобразования фотоэлектрического сигнала фотоприемника в цифровой сигнал, микропроцессорную систему измерения и управления, а также жидкокристаллический индикатор. Особенностью микропроцессорной системы является использование в ней энергонезависимой электронной памяти, предназначенной для хранения набора чисел, используемых в алгоритме пересчета электрического сигнала в значение концентрации гемоглобина. Сразу после включения прибора в сеть или установки элементов питания, а затем примерно через каждый час, прибор автоматически переходит в активный режим, производит контрольное измерение параметров оптико-электронного тракта и снова переходит в пассивный режим (автокалибровка)

Методы определения гемоглобина. МиниГЕМ-540 предназначен для определения концентрации общего гемоглобина унифицированным гемиглобинцианидным методом с фотометрированием на длине волны 540 нм (рисунок 128, а).

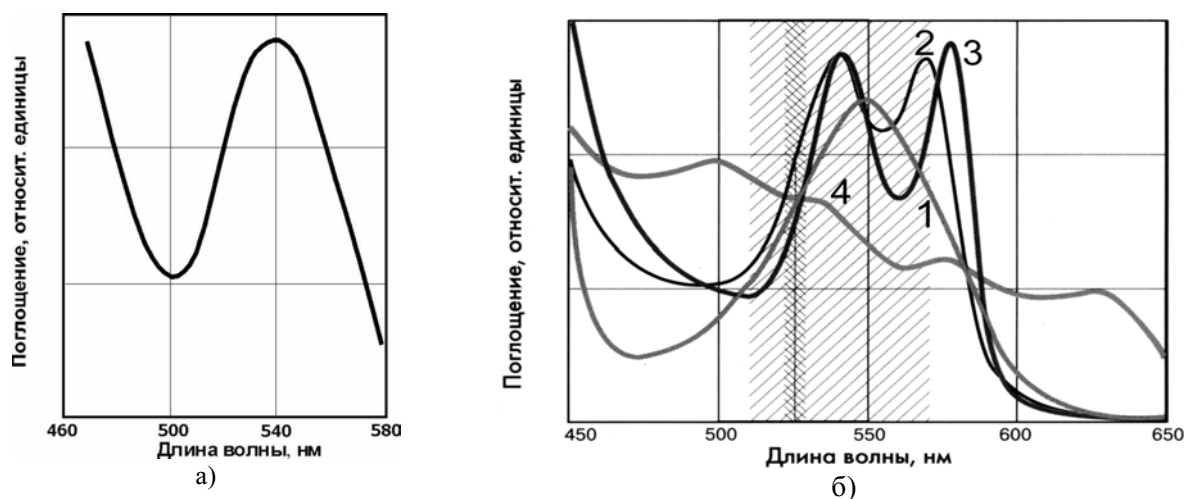


Рис.128. Спектр поглощения производных гемоглобина.

а) – спектр поглощения гемиглобинцианида (CNmetHb),

б) – спектры поглощения производных гемоглобина: 1 – дезоксигемоглобина (HbH); 2 – карбоксигемоглобина (HbCO) 3 – оксигемоглобина (HbO₂); 4 – метгемоглобина (MetHb).

Гемоглобинцианидный метод основан на преобразовании основных производных гемоглобина – оксигемоглобина, метгемоглобина и карбоксигемоглобина в одну форму гемоглобинцианид (гемоглобинцианид). Спектральная кривая поглощения гемиглобинцианида имеет широкий максимум на длине волны 540 нм. Фотометрирование биопробы на этой длине волны обеспечивает максимальную точность измерения концентрации гемоглобинцианида (т.е. общего гемоглобина). Время пробоподготовки составляет 15-20 минут. По данным Комитета ВОЗ по стандартизации в гематологии точность гемоглобинцианидного метода составляет 2%.

«МиниГЕМ 523» также определяет концентрацию общего гемоглобина, но при фотометрировании биопробы крови, приготовленной в слабом растворе аммиака, на длине волны 523 нм (модифицированный метод Дервиза-Воробьева).

Производные гемоглобина остаются при этом методе неизменными и каждая имеет свою кривую спектральную кривую поглощения (рисунок 128б). Спектры основных производных оксигемоглобина и метгемоглобина имеют изобестическую точку на длине волны 523 нм. Поглощение на этой длине волны у этих производных одинаково и оптическая плотность биопробы не зависит от процентного соотношения производных. Методическая ошибка

определения гемоглобина из-за наличия карбоксигемоглобина не превышает 1,5%, если концентрация карбоксигемоглобина в крови не выше 10%.

Преимуществом этого метода является простота пробоподготовки: трансформирующий раствор представляет собой 0,04% водный раствор аммиака, а время лизирования – около 1 секунды.

Бихроматические анализаторы.

Анализатор билирубина фотометрический неонатальный АБФ-04 Билимет К

Анализатор билирубина фотометрический неонатальный АБФ-04 Билимет К – прибор, предназначенный для определения концентрации билирубина прямым фотометрированием плазмы крови.

Для определения концентрации общего билирубина и прямого билирубина используются различные биохимические методики с проведением химических реакций. При этом существует возможность определения концентрации общего билирубина методом прямого фотометрирования плазмы крови. Несмотря на то, что при этом определяется только общий билирубин этот подход представляет значительный интерес в неонатологии, так как у новорожденных детей преобладает одна производная билирубина, практически равная концентрации общего билирубина. Билирубин представляет собой пигмент с ярко выраженной желтой окраской. Его спектральная кривая поглощения имеет максимум на длине волны 460 нм (синяя область спектра). Измеряя поглощение на этой длине волны можно было бы определить концентрацию общего билирубина в крови. Однако ряд факторов усложняют такое измерение. Билирубин является сильным поглотителем и поэтому оптимальная для построения фотометра плотность 0,3-0,5 Б оптической плотности достигается в кювете с длиной оптического пути примерно 250 микрометров (0,25 мм). Изготовить такую кювету непросто. Кроме того, фотометрирование непосредственно крови усложняется присутствием форменных элементов крови, рассеянием света на них, а также интерференцией билирубина с гемоглобином, который частично поглощает свет в синей области спектра. Поэтому для фотометрирования необходимо, во-первых, получить образцы плазмы крови, а, во-вторых, нужно исключить влияние гемоглобина, присутствующего в небольшом количестве в плазме. Плазму для фотометрирования получают на лабораторных центрифугах в гепаринизированных гематокритных капиллярах. Принцип фотометрического определения концентрации билирубина в плазме крови поясняется на рисунке 129.

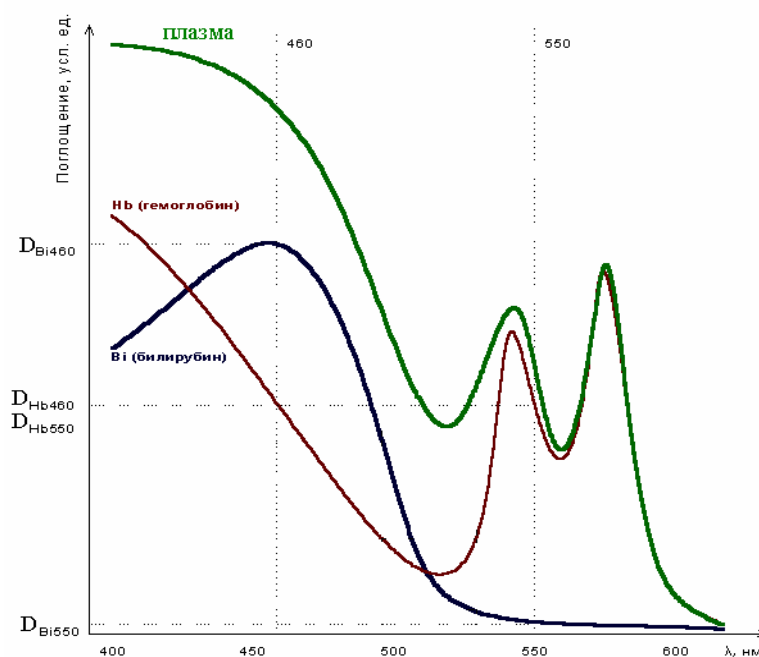


Рис. 129. Принцип оптического фотометрирования при определении концентрации билирубина в плазме.

Фотометрирование можно проводить на спектрофотометрах на двух длинах волн 460 и 550 нм, на которых гемоглобин имеет одинаковые коэффициенты поглощения, а билирубин имеет максимум поглощения на длине волны 460 нм и не поглощает на длине волны 550 нм. Именно это позволяет исключить влияние гемоглобина при измерении концентрации билирубина.

$$D_{\text{плазма}}(460 \text{ нм}) = D_{\text{Hb}}(460 \text{ нм}) + D_{\text{Bi}}(460 \text{ нм})$$

$$D_{\text{плазма}}(550 \text{ нм}) = D_{\text{Hb}}(550 \text{ нм}) + D_{\text{Bi}}(550 \text{ нм})$$

$$D_{\text{Bi}}(460) = D_{\text{плазма}}(460 \text{ нм}) - D_{\text{плазма}}(550 \text{ нм}),$$

поскольку $D_{\text{Bi}}(550 \text{ нм}) = 0$, а $D_{\text{Hb}}(550 \text{ нм}) = D_{\text{Hb}}(460 \text{ нм})$

Фотометр билирубина Билимет К

Однако спектрофотометры общего назначения мало пригодны для таких рутинных измерений, так как необходимо иметь специальные кюветы с малой оптической длиной. Для этих целей служит специализированный фотометр Билимет К – анализатор билирубина фотометрический неонатальный (тип средства измерения АБФ-04).

Определение концентрации общего билирубина анализатором БИЛИМЕТ К производится методом прямого фотометрирования плазмы крови в тонком стеклянном капилляре. Для разделения крови в капилляре на фракции используется устройство для получения плазмы крови УППК-01-«НПП ТМ или подходящая гематокритная центрифуга. Результат фотометрирования может быть распечатан устройством печатающим УП-02-«НПП ТМ»

Оптическая плотность исследуемого образца вычисляется как логарифм отношения световых потоков на двух длинах волн. Двухволновая методика измерения выбрана для уменьшения погрешностей измерения и устранения влияния присутствия в капилляре остаточной лизированной крови, которая даёт окраску раствора в красной части спектра.

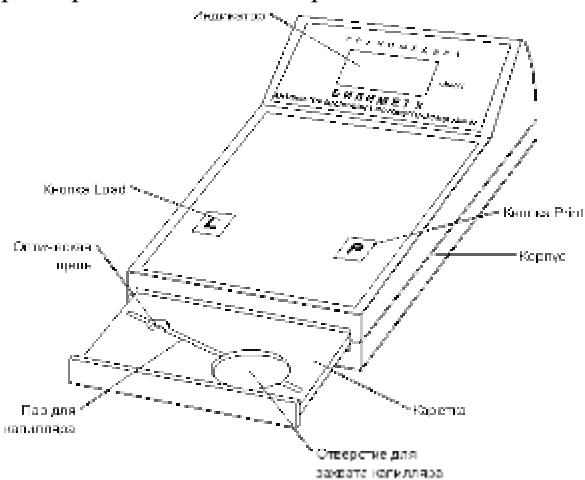


Рисунок 130. Анализатор Билимет К: внешний вид и конструкция.

Фотометр Билимет К измеряет оптическое поглощение на длинах волн 492 нм и 523 нм ($D_{\text{Bi}492}$, $D_{\text{Bi}523}$).

Выбор длины волны 492 нм для фотометрирования билирубина связан с тем, что в максимуме поглощения 460 нм при оптической толщине капилляра $\sim 0,9$ мм оптическая плотность составляет $\sim 3D$. Производить точные измерения при такой плотности довольно сложно. Вторая длина волны – изобестическая точка спектров поглощения производных гемоглобина.

Обратим внимание, что выбранные точки лежат на склонах спектральных кривых поглощения и особенность этого метода заключается в том, что измерение необходимо производить при помощи пучков света с узкой шириной спектра и строго фиксированной длиной волны. Такая методика измерения предполагает использование монохроматических или узкополосных световых пучков, получаемых при помощи интерференционных светофильтров. Однако практика показала, что эти фильтры имеют свойство со временем менять, хотя и незначительно, длину волны, а поглощение, измеряемое на склоне спектральной кривой, сильно

зависит именно от длины волны. Таким образом, возникает необходимость в уточнении длин волн светофильтров. Это можно сделать, измеряя поглощение стеклянной меры (цветного стекла ОС6). Стеклянная мера обладает стабильностью спектральной характеристики, и по так называемому удельному наклону спектральной линии, характеризующему зависимость наклона линии спектра от абсолютного значения поглощения, можно вычислить длины волн, на которых находятся максимумы пропускания светофильтров.

Перед определением билирубина на анализаторе Билимет К необходимо наполнить капилляр кровью (чаще всего из пятки новорожденного) и получить на центрифуге плазму. Для фотометрирования необходимо нажать кнопку LOAD на лицевой панели анализатора. Из анализатора выдвинется каретка с углублением, куда укладывается капилляр так, чтобы часть капилляра с плазмой полностью закрыла миниатюрную щель с левой стороны каретки (рисунок 131). После повторного нажатия на кнопку LOAD каретка автоматически переместится внутрь фотометра, при ее движении прибор автоматически «подкалибруется». Фотометрирование произойдет автоматически, как только каретка займет свое положение внутри прибора и значение концентрации отобразится на цифровом дисплее. Фотометрирование пробы длится доли секунды. После фотометрирования каретка автоматически выдвигается из прибора. Результат измерения фиксируется либо вручную, либо распечатывается печатающим устройством УП-02.



Рис. 131. Определение билирубина на фотометре Билимет К.

Двухволновый отражательный анализатор Билитест 2000

Двухволновый отражательный анализатор Билитест 2000 (рис. 132) - автоматический двухволновый фотометр для неинвазивного определения степени гипербилирубинемии новорожденных. Метод спектрального измерения подобен методу двухволнового измерения прибором Билимет К. Спектрофотометрические измерения оптического сигнала на указанных длинах волн проводятся при облучении исследуемой кожей новорожденного коротким световым импульсом от светодиода сине-зеленого света. Излученный световой импульс подводится к облучаемому участку кожи с помощью подвижной световодной головки, обеспечивающей также последующий сбор и подвод к фотодетекторам рассеянного в обратном направлении света. Оптико-электронная схема анализирует рассеянное в обратном направлении световое излучение на длинах волн 492 и 523 нм и выдает на цифровое жидкокристаллическое табло сигнал, содержащий измерительную информацию.

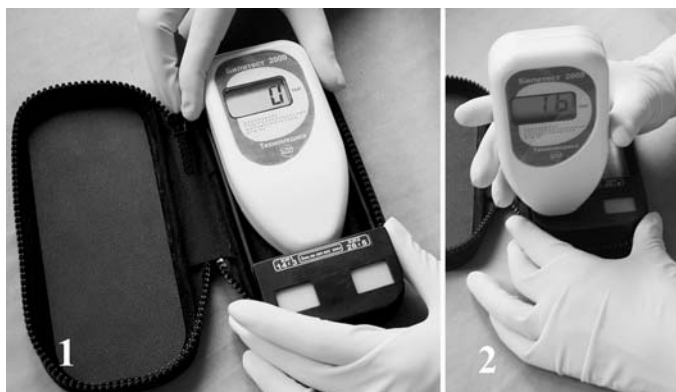


Рис. 132. 1 - Внешний вид анализатора Билитест 2000, 2 - проверка анализатора с помощью имитаторов кожи.

Косвенно измеряемой фотометрической величиной является десятичный логарифм отношения спектральных коэффициентов отражения света от подкожной клетчатки на двух рабочих длинах волн 492 и 523 нм (транскутанный билирубиновый индекс ТБИ), который коррелирует с коэффициентом корреляции $> 0,9$ с концентрацией билирубина в сыворотке крови (рисунок 128) и применяется для установления у новорожденных степени гипербилирубинемии в родильных домах, клиниках акушерства, детских больницах и центрах охраны здоровья матери и ребенка.

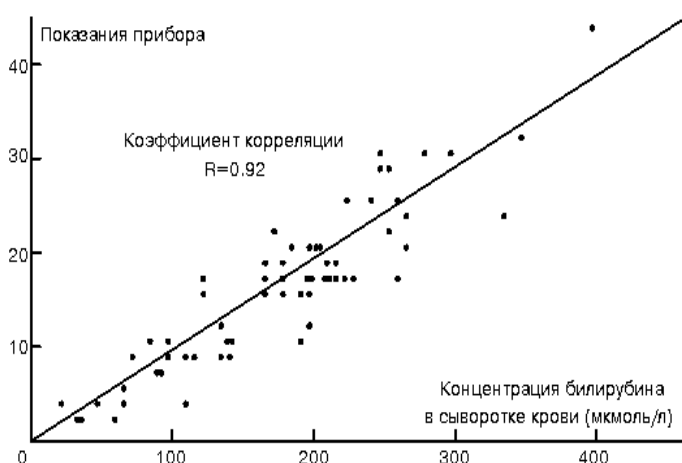


Рис. 133. Корреляционная связь показаний прибора Билитест 2000 (в ТБИ) и концентрацией билирубина в плазме (сыворотке) крови.

Транскутанная билирубинометрия

Принцип транскутанной билирубинометрии основывается на явлении обратной диффузии билирубина из крови в окружающую ткань (дерму). Увеличение концентрации билирубина в крови приводит к увеличению концентрации билирубина в дерме, и наоборот, уменьшение концентрации билирубина в крови (например, при переливании крови) приводит к обратному движению билирубина из дермы в кровь до тех пор, пока между этими двумя системами не наступит равновесие

Результат неинвазивного определения билирубина зависит от таких физических параметров биоткани новорожденного, как толщина кожного покрова и подкожной жировой клетчатки, *пигментация кожи*, насыщенность подкожной клетчатки кровеносными капиллярами. Вариация значений содержания билирубина, связана с индивидуальными особенностями этих параметров у ребенка в случае незначительной билирубинемии, оказывается сопоставимой со значением концентрации билирубина в крови.

Для уменьшения влияния индивидуальной вариации физических параметров кожи ребенка (в особенности – пигментации кожи) в анализаторе Билитест 2000 используется метод вычитания сигналов двух оптических каналов с разной оптической длиной.

Для пояснения принципа определения ТБИ на анализаторе Билитест 2000 рассмотрим двухслойную модель кожи. В этой модели кожа описывается в виде двух слоев – верхнего слоя, которой представляет собой эпидермис, и нижнего слоя – дермы (рисунок 134).

Оптическая схема прибора содержит два передающих световода, между которыми ассиметрично размещается принимающий световод (рисунок 134). Расстояния от принимающего световода до ближайшего передающего световода составляют 0,2 мм (ближний канал – короткий световой путь l_1) и 0,5 мм (дальний канал – длинный световой путь l_2).

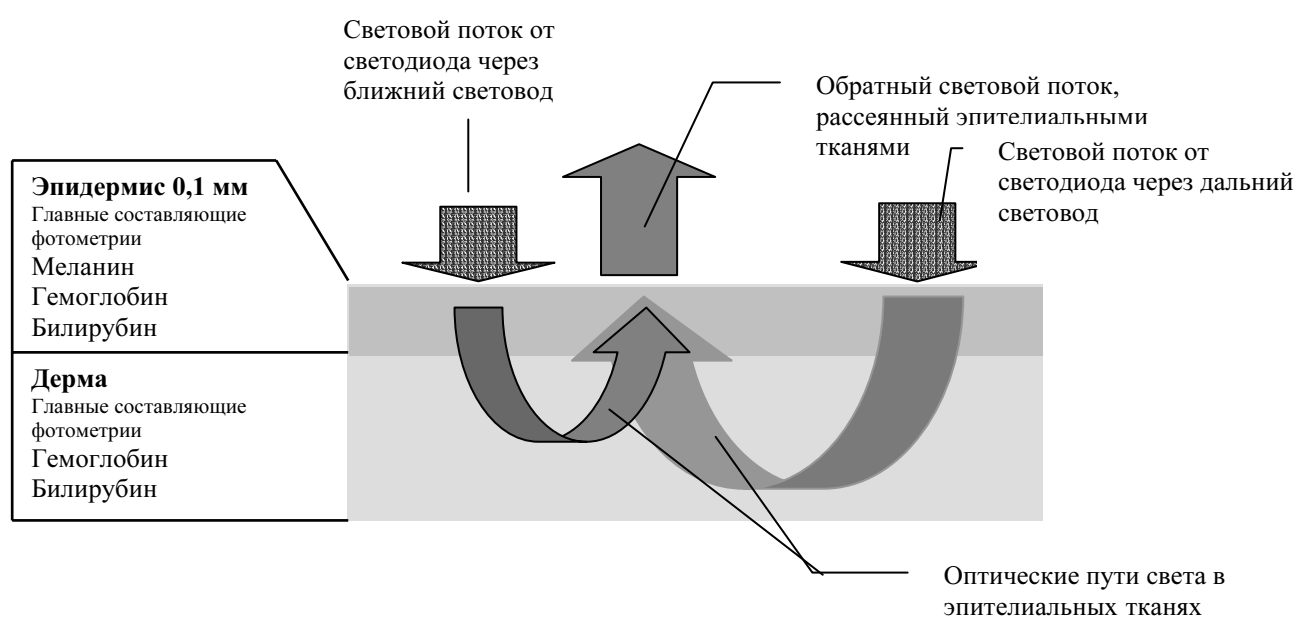


Рисунок 134. Схематичное изображение оптических путей света в коже (двухслойная модель) и основные поглощающие и рассеивающие вещества на выбранных длинах волн 492 и 523 нм.

Световой поток, исходящий из ближнего световода, проходит слой эпидермиса, некоторый путь l_1 в дерме и, поглощаясь и рассеиваясь, попадает в передающий световод, вновь пройдя слой эпидермиса. Аналогично можно описать оптический путь, который проходит световой поток от удаленного световода, но с учетом того, что он описывает некоторый другой путь l_2 в дерме. Расстояние между удаленным передающим световодом и принимающим световодом увеличено с 0,2 мм до 0,5 мм именно для того, чтобы оптические пути световых потоков различались. Таким образом, световые потоки как через ближний, так и через дальний световоды пересекают слой эпидермиса дважды (при входе и при выходе из эпителиальных тканей). Сигналы ближнего и дальнего каналов содержат одинаковые сигналы, обусловленные воздействием меланина и других факторов тонкого верхнего слоя, и неодинаковые сигналы, обусловленные содержанием билирубина и гемоглобина в толстом нижнем слое. Поэтому, из разностного сигнала ближнего и дальнего каналов можно определить по двух волновой методике билирубин (как в Билимете К).

Методика проведения транскутанной билирубинометрии.

Билитест 2000 с установленными элементами питания не требует включения и выключения и автоматически находится в режиме ожидания измерений. Обычно измерения ТБИ проводятся на лбу над переносицей (рисунок 135). В случае необходимости, для получения дополнительной информации о динамике «прокрашивания» кожи ребенка, ТБИ определяется на груди ребенка и на пяточке.



Рис. 135. Транскутанное определение билирубина с помощью анализатора Билитест 2000.

Для определения ТБИ у новорожденного торец подвижной головки анализатора устанавливается плотно и перпендикулярно к выбранному участку кожи. Измерение производится при нажатии на прибор с плавным увеличением усилия до появления звукового сигнала. Окончание звукового сигнала (через 1-3 секунды) свидетельствует о завершении измерения, после чего прибор отводится от кожи.

Значение ТБИ отображается на цифровом табло. Повторные измерения можно проводить через каждую секунду. Через 30 секунд после последнего измерения табло гаснет, и прибор автоматически переходит в режим ожидания измерений.

При проведении измерений следует иметь в виду, что результаты исследований могут быть недостоверными, если в области измерения имеются подкожные гематомы или сосудистые пятна (например, после проведения инфузионной терапии). В этом случае предпочтительнее проводить измерение ТБИ на верхней части грудины. При определении ТБИ у маловесных новорожденных, находящихся в тяжелом соматическом состоянии с расстройствами гемодинамики, на месте соприкосновения прибора с кожей и некоторого нажима появляется пятно гиперемии, быстро и самостоятельно исчезающее. Однако повторные замеры ТБИ в этой области дают завышенные результаты из-за локального стоаза крови.

ПРИ ФОТОТЕРАПИИ, в процессе которой происходит фотоокисление билирубина и превращение его в нетоксичную водорастворимую форму - люмирубин, прямой корреляции с уровнем билирубина в крови не отмечается. Вместе с тем, принимая во внимание известную стадийность в обмене билирубина при фототерапии, можно на основании динамики показаний прибора "Билитест" определить эффективность проведения фототерапии у конкретного новорожденного.

1 стадия - это первые 4 часа фототерапии. В этот период происходит быстрое разложение билирубина в коже (и значительное уменьшение ТБИ) при сохранении неизменной концентрации билирубина в сыворотке.

2 стадия - 4-12 часов фототерапии. За этот период происходит элиминация люмирубина из крови с желчью и мочой, а сывороточный билирубин проникает в ткани на место изомеризованного. В результате в этот период наблюдается снижение сывороточного билирубина при повышении ТБИ.

3 стадия - 2-3 сутки фототерапии, отмечается выравнивание показателей сывороточного билирубина и ТБИ.

4 стадия - после окончания фототерапии. Билирубин из крови продолжает выделяться с желчью и мочой, а также проникает в кожу, в связи с этим продолжается падение уровня сывороточного билирубина при замедлении уменьшения ТБИ.

Измерение ТБИ в период фототерапии не дает возможности однозначно судить об уровне билирубина в крови, а лишь позволяет определить динамику прокрашивания кожи и эффективность проведения данного лечения. В связи с этим измерение ТБИ в процессе фототерапии целесообразно только в течение всего периода проведения данной процедуры и не имеет смысла в эпизодического виде.

ПРИ ГЕМОЛИТИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ новорожденных рекомендуется в первую очередь контролировать показатель почасового прироста сывороточного билирубина (мониторинг). В стадии разгара при высоком почасовом приросте в результате интенсивного внутрисосудистого гемолиза проникновение билирубина в кожу и ее прокрашивание могут отставать от нарастания сывороточного билирубина. В этом случае даже относительно невысокие показатели ТБИ требуют контроля сывороточного билирубина (можно прибором «Билимет») и контроля ТБИ каждые 30 - 60 минут для выявления интенсивности кожного прокрашивания, что в какой-то мере будет указывать на выраженность накопления сывороточного билирубина.

Турбидиметрические анализаторы

Турбидиметрические методы чаще всего применяются при анализе белков. Как уже отмечалось выше, в большинстве случаев для турбидиметрии характерна нелинейная зависимость оптической плотности от концентрации белков. Поэтому для проведения исследований этим методом требуется, как правило, многоточечная калибровка (определение С-реактивного белка).

Однако, в случае малых концентраций рассеивающих частиц оптическая плотность связана с концентрацией белка практически линейно. Эта особенность используется в анализаторе общего белка в моче «БЕЛУР 600», разработанного НПП «Техномедика» (Россия).

Существенное влияние на светопропускание оказывает и размер рассеивающих частиц. В случае, когда рассеивающие частицы перемещаются в «поле зрения» фотометра, на фотоприемнике возникает электрический сигнал, величина которого связана с размером движущейся частицы, пересекающей оптический канал. Статистический анализ флуктуаций светопропускания используется в лазерном анализаторе агрегации тромбоцитов АЛАТ2-«БИОЛА», разработанном НПФ «Биола» (Россия). Лазерный анализатор предназначен для определения концентрации тромбоцитов и динамического исследования процесса агрегации тромбоцитов

Анализатор общего белка в моче «Белур 600»

Белур 600 предназначен для определения общего белка в моче сульфосалициловым методом (турбидиметрия), пирогаллоловым красным и Бредфорд (фотометрия). Конструктивно прибор аналогичен гемоглобинометру «МиниГЕМ», только в качестве источника излучения используется оранжевый светодиод и светофильтр с длиной волны 600 нм (рисунок 1). На рисунке 137 представлена зависимость измеренной оптической плотности от концентрации общего белка в моче. В диапазоне от 0 до 2 г/л эта зависимость с достаточной точностью может быть принята линейной.

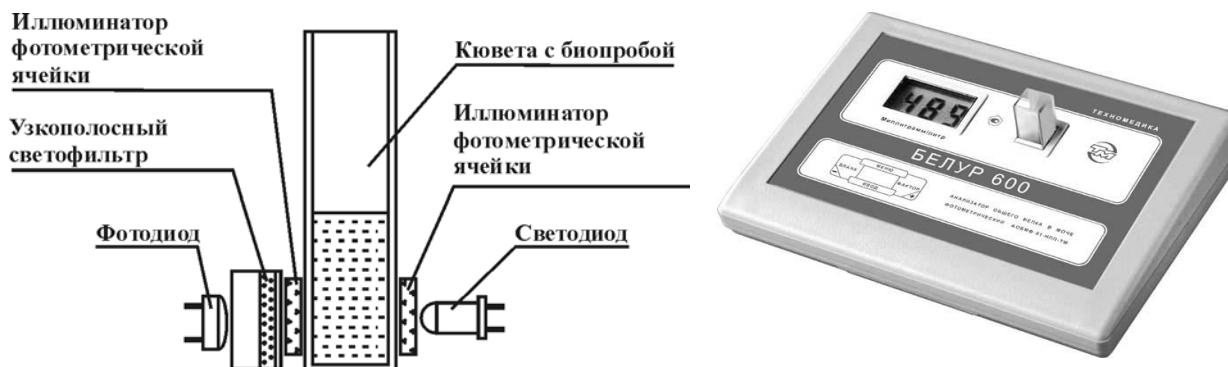


Рисунок 136. Анализатор Белур 600 - оптическая схема и внешний вид.

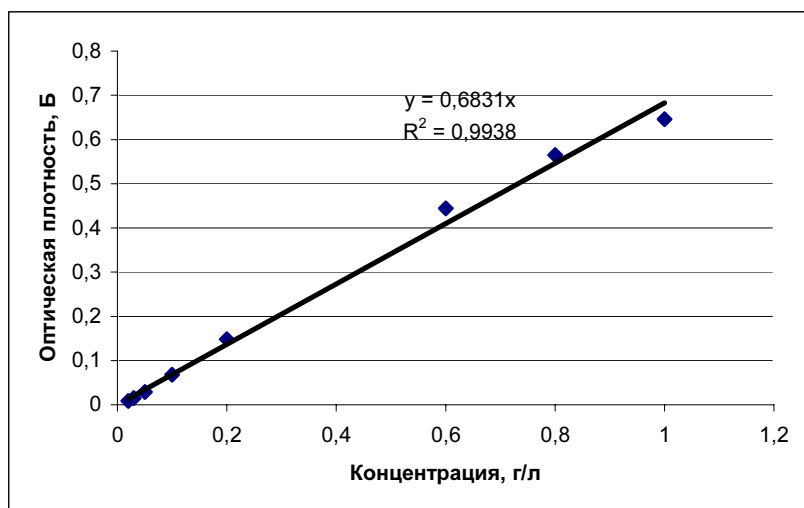


Рисунок 137.
Анализатор Белур 600.
Зависимость оптической плотности от концентрации общего белка в моче для пирогаллолового метода.

Лазерный анализатор агрегации тромбоцитов АЛАТ2-«БИОЛА»

Анализатор агрегации – это микропроцессорный прибор, предназначенный для исследования агрегации кровяных пластинок (тромбоцитов) и других клеток в суспензии, оценки фактора формы тромбоцитов, определения концентрации тромбоцитов, а также определения активности фактора Виллебранта. Агрегация регистрируется как традиционным турбидиметрическим методом, так и методом, основанным на оценке среднего размера агрегатов в процессе их образования и роста.

Основные компоненты лазерного анализатора показаны на рисунке 138.

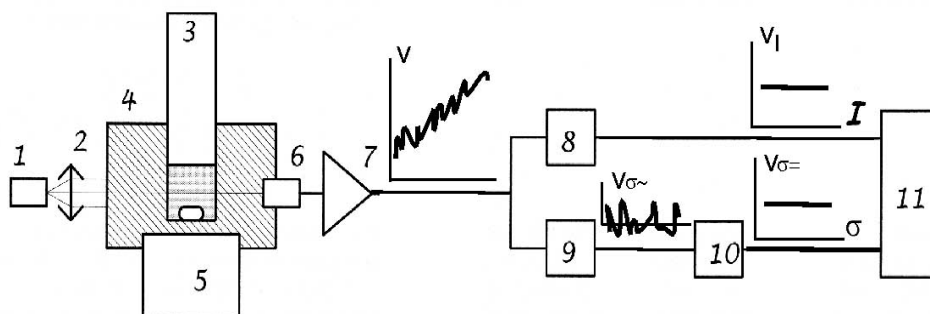


Рисунок 138. Блок-схема лазерного анализатора агрегации тромбоцитов АЛАТ2-«БИОЛА»

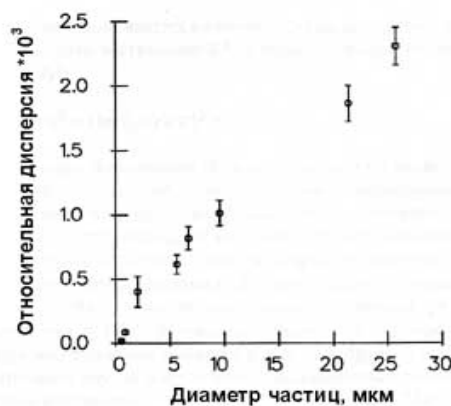
Кювета 3 устанавливается в термостатируемый блок 4. Электромагниты 5 создают вращающееся магнитное поле. Полупроводниковый лазер 1 с коллимирующей линзой 2 дает узкий пучок света, так что оптический канал занимает малую часть образца. Мощность лазера поддерживается на постоянном уровне высокостабильной электронной схемой. Таким образом, интенсивность света, падающего на фотодиод 6 пропорциональна светопропусканию образца, которое, в свою очередь, зависит от концентрации тромбоцитов, от количества и размеров агрегатов. Ток фотодиода преобразуется в напряжение усилителем 7. Это напряжение подается на входы фильтра низких частот 8 и фильтра высоких частот 9. Фильтр низких частот выделяет медленно меняющуюся компоненту оптического сигнала I . Фильтр высоких частот выделяет флуктуации светопропускания, вызванные «случайным» изменением числа частиц в оптическом канале. Сигнал с фильтра высоких частот поступает на выпрямитель 10, выходное напряжение которого пропорционально среднему квадратическому отклонению светопропускания σ . Как I , так и σ преобразуются в цифровую форму и обрабатываются встроенным микроконтроллером.

В анализаторе АЛАТ2-«БИОЛА» используется статистический метод анализа флуктуаций светопропускания обогащенной тромбоцитами плазмы (ФСП-метод). При перемешивании образца число тромбоцитов и/или их агрегатов, находящихся в оптическом канале, меняется случайным

образом. Относительная дисперсия таких флуктуаций пропорциональна среднему оптическому радиусу этих частиц:

$$\left(\frac{\sigma}{I}\right)^2 \sim R \text{ (рисунок 139).}$$

Рисунок 139.
Относительная дисперсия флуктуаций светопропускания как функция размеров частиц.



В случае одиночного рассеяния оптическая плотность суспензии клеток D пропорциональна концентрации клеток:

$$D = \lg\left(\frac{I_0}{I}\right) \sim N, \text{ где } I \text{ и } I_0 - \text{интенсивность света, проходящего через среду с частицами и без них}$$

соответственно. Если объем оптического канала мал по сравнению с объемом пробы, вариация числа частиц в нем описывается распределением Пуассона и относительное среднее квадратическое отклонение светопропускания имеет зависимость:

$$\frac{\sigma}{I} \sim N^{-1/2} \text{ или } \left(\frac{D \cdot I}{\sigma}\right)^2 \sim N.$$

На рисунке 5 дано сравнение результатов измерения концентрации тромбоцитов человека лазерным анализатором и в камере Горяева.

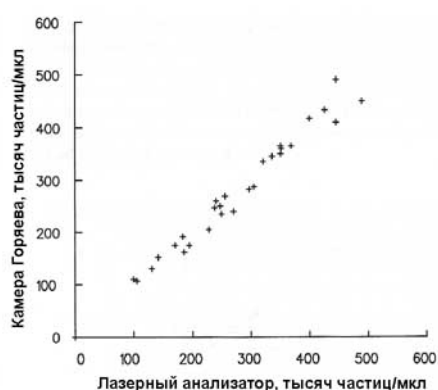


Рисунок 140.
Сравнение результатов измерения концентрации тромбоцитов лазерным анализатором и в камере Горяева.

ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА КАЧЕСТВО ФОТОМЕТРИРОВАНИЯ

Причины кажущихся отклонений от закона Бугера

Закон Бугера, строго говоря, справедлив лишь для проходящего через гомогенную изотропную среду плоскопараллельного пучка монохроматического света при соответствии величины $c=D/\epsilon l$ истинной концентрации вещества в растворе и незначительной заселенности возбужденного энергетического уровня. Если толщина слоя выдерживается постоянной и равной $l=1$, то зависимость $D = f(c)$ изображается прямой линией, проходящей через начало координат с тангенсом угла наклона, равным ϵ .

Нарушение указанных условий приводит к кажущимся отклонениям от закона Бугера, выражающимся в искривлении зависимости $D = f(c)$. Другими словами, коэффициент поглощения ϵ в уравнении $c=D/\epsilon l$ перестает быть постоянным, а возрастает или уменьшается с ростом c . В первом случае говорят о положительных, во втором - об отрицательных отклонениях от закона Бугера (рис. 142).

Наиболее часто встречающиеся причины отклонений от закона Бугера можно разделить на три группы: 1) физико-химические, связанные со свойствами анализируемого вещества или всего раствора; 2) инструментальные, связанные с особенностями данного спектрофотометра; 3) связанные с анизотропией изучаемого объекта.

Физико-химическая гетерогенность исследуемого раствора

К физико-химическим причинам относится, прежде всего, несоответствие подставляемого в уравнения значения c истинной концентрации вещества в растворе. Это несоответствие может быть вызвано реакциями диссоциации, ассоциации или химического взаимодействия растворенного вещества с растворителем и т. п., если молярные показатели поглощения продуктов этих реакций отличаются от молярных показателей поглощения исходных веществ (рисунок 141).

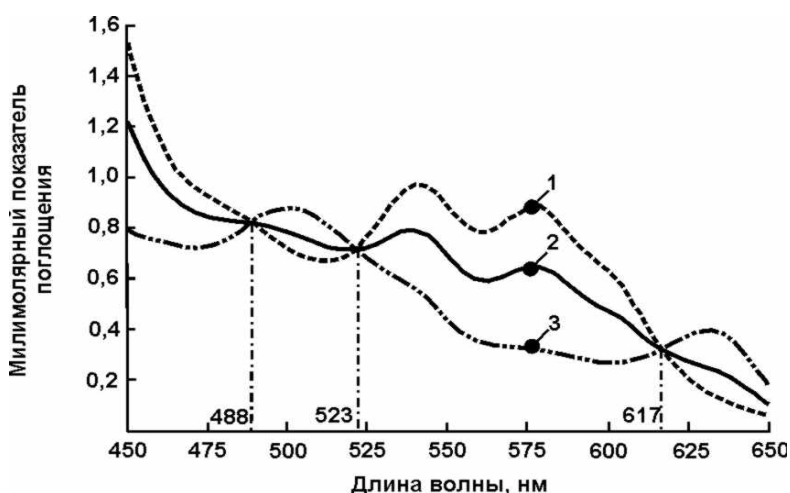
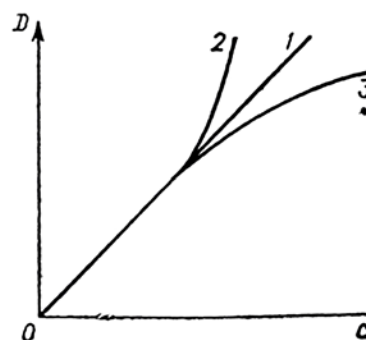


Рисунок 141. Спектральная зависимость величины миллимолярного показателя поглощения метгемоглобина от pH раствора: 1 – pH = 10,22; 2 – pH = 7,4; 3 – pH = 6,1.

Если константы этих процессов и молярные показатели поглощения продуктов (например ассоциатов) известны, отклонения от закона Бугера могут быть устранены подстановкой уравнение для определения оптической плотности D истинных значений c и ϵ . Часто удается подобрать интервал концентраций, в котором явления ассоциации и диссоциации не наблюдаются и отклонения от закона Бугера отсутствуют.

Рис. 142. Зависимость оптической плотности D от концентрации поглощающего свет вещества в растворе при соблюдении закона Бугера (1), положительных (2) и отрицательных (3) отклонениях от него.



Другой физико-химической причиной отклонения от закона Бугера является флуоресценция анализируемого вещества. Попадание испускаемого раствором флуоресцентного потока на фотоэлемент приводит к увеличению интенсивности прошедшего через раствор света, что, естественно, снижает экспериментально определяемую оптическую плотность. Вследствие частичной реабсорбции флуоресцентного света наблюдаемые отклонения будут зависеть от длины кюветы. При прочих равных условиях отклонения от закона Бугера вследствие флуоресценции будут возрастать с увеличением оптической плотности и уменьшаться с ростом концентрации растворенного вещества (эффект тушения).

Кроме двух рассмотренных выше следует упомянуть третью группу причин кажущихся отклонений от закона Бера, связанную с распределением поглощающего вещества в объеме анализируемого объекта. Так, для оптически анизотропных молекул поглощение неполяризованного света зависит от степени их упорядоченности. Это явление может наблюдаться, например, при микроспектрофотометрии биологических объектов, обладающих определенной структурой.

Отклонения от закона Бера могут проявляться и из-за неравномерного распределения поглощающего вещества в пучке света (кювете). Подобные ошибки также встречаются, в основном, в микроспектрофотометрии и здесь не рассматриваются.

Инструментальные искажения

Установка длины волны

Для многих аналитических целей длина волны может быть удовлетворительной, если она близка к $\lambda_{\text{макс}}$ спектра поглощения измеряемого хромогена и если эта длина волны легко воспроизводима. Большинство фильтров попадает в эту категорию и весьма удовлетворительно, так как при этом исследуемый раствор сравнивается со стандартом на фиксированной длине волны и в фиксированной спектральной полосе излучения. Однако с призмами и дифракционными решетками возможен непрерывный набор длин волн, и в этом случае становится необходимой проверка их точности и воспроизводимости. Знание точной длины волны становится критическим при использовании известного молярного показателя поглощения для идентификации веществ в токсикологических исследованиях и в дифференциальных методах. Например, исследование ферментов, основанное на NAD-NADH реакции, базируется на константе молярного показателя поглощения равного 6220 для NADH на длине волны 340 нм. Поэтому, при использовании фотометрических констант необходимо, чтобы установка длины волны была точной и воспроизводимой и, чтобы измерительный прибор обладал достаточной фотометрической точностью.

Для приборов с узкой спектральной полосой в качестве стандарта длин волн в диапазоне 280 – 650 нм может быть использовано стекло с оксидом гольмия. Это стекло имеет спектр пропускания с очень узкими минимумами в пропускании на фиксированных длинах волн и, измеряя поглощение этого стекла, можно сравнить полученный по максимумам поглощения масштаб шкалы длин волн с паспортными данными. Если эти данные не совпадают, можно построить калибровочную кривую, чтобы связать приборные данные масштаба с истинными длинами волны. Типичный спектр пропускания для оксида гольмия показан на рисунке 131а.

Максимумы поглощения этого фильтра, подходящие для калибровки, имеют следующие длины волн (нм): 279.3; 287.6; 333.8; 360.8; 418.5; 536.4; 637.5. Растворы оксида гольмия, разведенные в хлорной кислоте, могут использоваться для проверки любого спектрофотометра.

В России выпускается фильтр из стекла ПС7 на основе смеси окислов редкоземельных элементов, который также может служить для проверки шкал спектрофотометров (рисунок 131б).

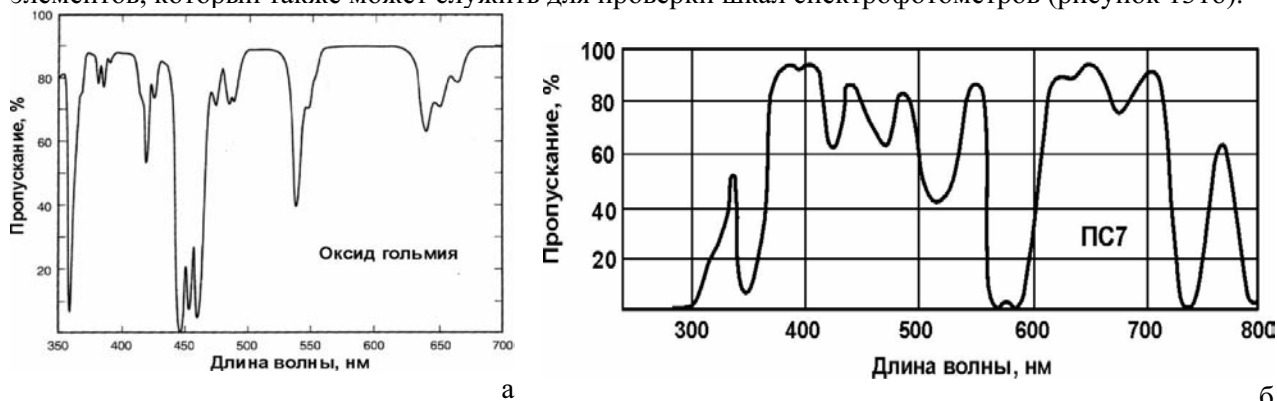


Рис. 131. Спектры пропускания фильтров, используемых для поверки спектрофотометров.

1 – спектр пропускания фильтра на основе оксида гольмия;

2 – спектр пропускания фильтра на основе дидима (смеси оксидов редкоземельных элементов).

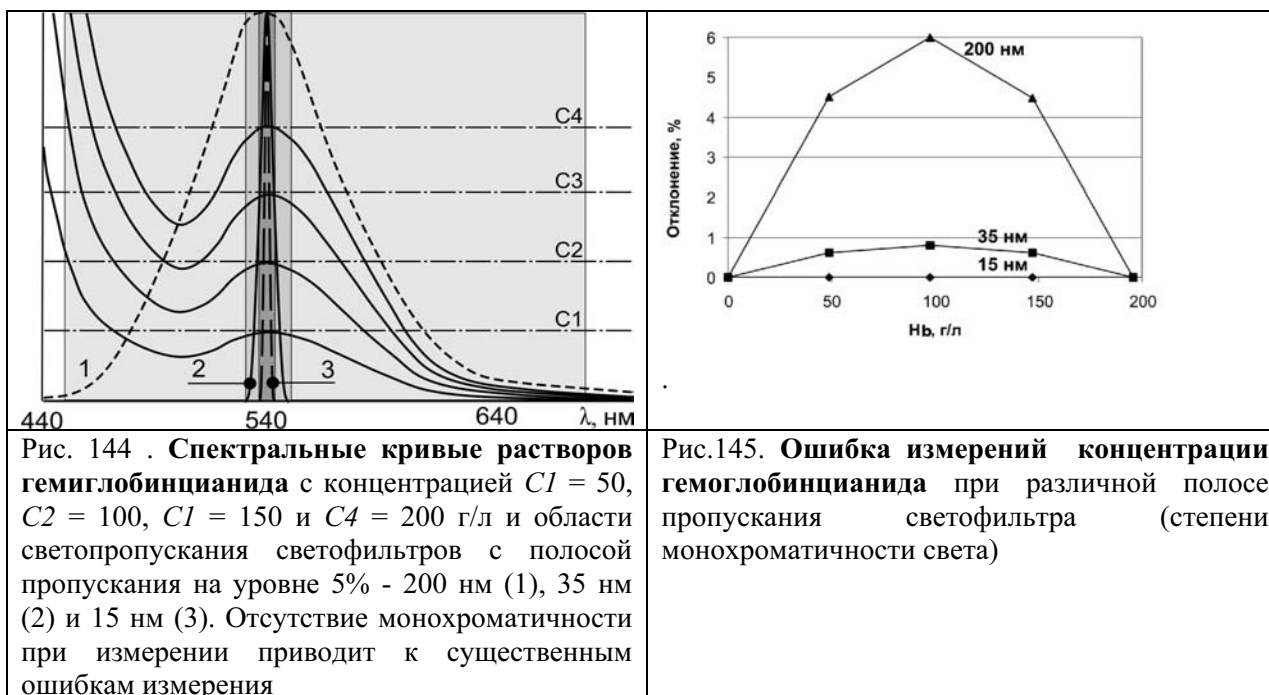
Влияние монохроматичности света

Частой инструментальной причиной кажущихся отклонений от закона Бугера является немонохроматичность падающего на образец светового потока. В любом реальном фотометре с непрерывным источником излучения из выходной щели исходит пучок света с некоторым интервалом длин волн s , который определяется шириной выходной щели h и дисперсией монохроматора или полосой пропускания светофильтра.

В общем случае увеличение интервала длин волн s приводит к падению измеряемого поглощения и кажущейся величины ε в области максимумов и одновременно к увеличению D и ε в области минимумов спектральных кривых. Эти изменения мало заметны для веществ с широкими спектральными полосами (в этих случаях закон Бугера выполняется и при больших щелях) и могут быть очень резкими при полосах малой ширины. Для того, чтобы на практике избежать существенного искажения формы спектральной полосы и величины ε , необходимо, чтобы спектральная ширина щели была значительно меньше полуширины исследуемой полосы:

$$s \leq 0,2\Delta_{1/2}$$

На рисунке 144 приведены спектральные кривые растворов гемиглобинцианида с концентрацией 50, 100, 150 и 200 г/л и области светопропускания светофильтров с широкой и узкой полосой пропускания (интервалом длин волн s). Отсутствие монохроматичности при измерении может привести к дополнительным ошибкам измерения. Это связано с тем, что в области спектральной чувствительности прибора, которая определяется полосой пропускания светофильтра, оптическая плотность неодинакова для различных длин волн. Это приводит к тому, что зависимость сигнала фотопреобразователя от концентрации раствора имеет нелинейный характер. Степень нелинейности зависит от ширины пропускания светофильтра. Чем больше кривая поглощения в области светопропускания отклоняется от уровня A_{540} , тем к большей нелинейности это приводит, особенно на длинах волн больше 540 нм.



На рисунке 145 приведены графики нелинейности для различных интервалом длин волн λ . Прямолинейная светосигнальная характеристика (наклон графика концентрация – электрический сигнал) может быть «привязана» при калибровке прибора к любым 2 значениям концентрации. На рисунке 133 представлен случай, когда ошибка за счет нелинейности равна нулю при концентрации 0 г/л и 200 г/л. При этом ошибка максимальна в середине этого диапазона и составляет 6% для широкополосного фильтра (200 нм, такую характеристику имеет зеленое стекло ЗС-1), 0,8% для фильтра 30 нм, 0,003% для фильтра 10 нм и 0% для спектрофотометра. Ошибка в 6% для широкополосного фильтра в несколько раз превышает допустимый предел. Избежать ошибки можно только путем калибровки фотокориметра при помощи калибровочных растворов гемоглобинцианида различной плотности. Для спектрофотометров ошибка, связанная с нелинейной зависимостью сигнала от плотности, пренебрежимо мала и калибровать их подобным образом не нужно.

В специализированных фотометрах – анализаторах - калибровочная кривая может быть внесена в программу обработки электрического сигнала и показания таких приборов (в единицах концентрации) также имеют линейную зависимость от концентрации исследуемого раствора.

Спектральная полоса фотометра обычно заявляется изготовителем. Этот параметр принимается без проверки из-за отсутствия удобного метода контроля. Спектральная полоса может быть измерена на спектрофотометре при помощи ртутной лампы, спектр излучения которой имеет множество острых, четких линий излучения между 250 и 580 нм. Очевидно, что ширина полосы излучения на уровне 0,5 максимума спектра излучения может быть спектральной полосой фотометра. Спектральная полоса может быть рассчитана по документации изготовителя. Для проверки спектрофотометров со спектральной полосой от 8 нм могут использоваться интерференционные фильтры с полосой от 1 до 2 нм.

Рассеянный свет.

Помимо конечной ширины щели, немонахроматичность светового потока может быть вызвана присутствием рассеянного света. Под рассеянным светом обычно понимают полихроматическое излучение, попадающее в кюветную камеру фотометра в результате различных отражений и рассеяний в диспергирующей системе. К рассеянию света приводят дефекты в призмах, зеркалах, дифракционных решетках или светофильтрах, возникающие на оптических деталях в «промышленной» атмосфере налеты, пыль и т. п. Длины волн рассеянного света не ограничены каким-либо интервалом, как это имеет место для немонахроматического света, проходящего через широкую щель. Рассеянный свет - это излучение длин волн вне узкой спектральной полосы номинально переданной монохроматором или фильтром. Как правило, в

рассеянном излучении присутствует свет всех длин волн, которые испускает источник излучения, причем интенсивность рассеянной радиации мало зависит от ее длины волны.

Рассеянный свет воздействует на фотоприемник в пределах области спектральной чувствительности приемника. Наличие рассеянного света приводит к нарушению линейности измеренных значений плотности относительно концентраций.

Идеальный монохроматор пропустил бы свет только в заданной спектральной полосе. На практике рассеяние и дифракция внутри монохроматора добавляют свет других длин волны в выходной луч. Такой свет далее преобразуется другими компонентами фотометра и непосредственно исследуемым образцом. Рассеянный свет может попадать на фотоприемник и минуя образец.

Источниками паразитного излучения света являются также неплотная светоизоляция фотометрической ячейки и флюоресценция образца. Нарушения светоизоляции должны исключаться. Свет, являющийся результатом флюоресценции, увеличивает паразитный сигнал на фотоприемник, что приводит к кажущемуся уменьшению поглощения. Флюоресцирующие источники рассеянного света сложно учесть при обычной оценке рассеянного света.

Источником рассеянного света могут быть нарушения целостности интерферирующих слоев интерференционного фильтра или недостаточное подавление излучения за пределами рабочей спектральной полосы фильтра.

Наиболее сильно влияние рассеянного света сказывается при измерениях в коротковолновом диапазоне спектра.

Многие фотометры оснащены одним или несколькими фильтрами, подавляющими рассеянный свет (рисунок 134). Так, синий фильтр используется с вольфрамовой лампой накаливания для подавления длин волн больше 400 нм. Если спектрофотометр установлен на 340 нм, например, большая часть рассеянного света имеет длины волны в видимом диапазоне. Синий фильтр поглощает большую часть видимого света, но хорошо пропускает ультрафиолетовую часть спектра. По аналогии, красный фильтр используется для длин волн в диапазоне от 650 до 800 нм.

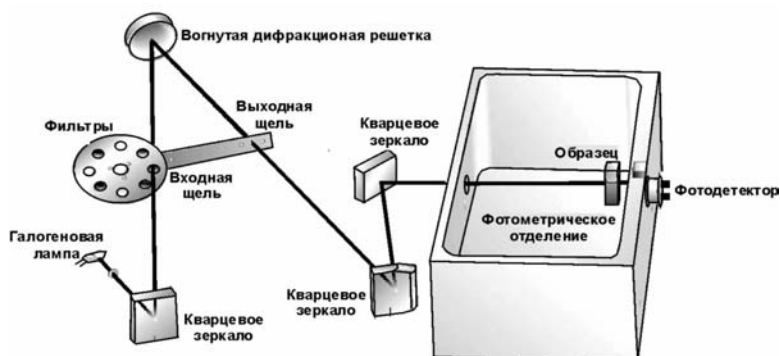


Рис. 146. **Технология уменьшения рассеянного света** в спектрофотометре SPECORD 30. Перед дифракционной решеткой размещены фильтры, суживающие спектральную полосу с целью снижения рассеивающего света.

Для обнаружения рассеянного света удобны отрезающие фильтры. Они могут иметь стекло, подобное подавляющим фильтрам, которое резко «отрезает» часть спектра, почти полностью поглощая излучение в одном диапазоне спектра и хорошо пропуская излучение в другом диапазоне. Жидкие фильтры эффективны и удобны в ультрафиолетовом диапазоне, где рассеянный свет доставляет особенно много хлопот. Водный раствор нитрита натрия 50 г/л должен показывать, по существу, 0 % пропускания при измерении против воды в диапазоне от 300 до 385 нм. Ацетон, измеренный против воды, должен давать 0 % пропускания в диапазоне от 250 до 320 нм.

Рассеянный свет обычно определяется как отношение или процент рассеянного света к общему количеству света. Уровень рассеянного света α при данной длине волны характеризуют отношением:

$$\alpha = \frac{I_p}{I_0} \cdot 100 \% = \frac{I_p}{I_p + I_m} \cdot 100 \% ,$$

где I_p и I_m - интенсивности рассеянного и монохроматического излучения.

Так как I_p мало изменяется с длиной волны, величина α особенно велика в тех областях спектра, где I_m мало, т. е. мала эмиссия источника или чувствительность фотоприемника (границы спектрального диапазона). Кроме того, I_m резко падает в тех случаях, когда велика оптическая плотность раствора сравнения (в методе дифференциальной фотометрии). Рассеянный свет

сказывается также в случае измерения с опорной волной при двух волновой фотометрии, если разница $D_{\text{макс}}$ и $D_{\text{опор}}$ невелика. Эти опасности особенно реальны в дальней УФ-области (190 — 220 нм), где рассеянный свет может вызывать сдвиги максимумов поглощения, появление ложных максимумов и другие артефакты.

В присутствии рассеянного света измеряемое (кажущееся) пропускание раствора T' равно:

$$T' = \frac{I_m T + I_p T_p}{I_p + I_m},$$

где T и T_p - пропускание монохроматического и рассеянного света соответственно.

Комбинируя уравнения для α и T' , получим выражение для погрешности, вносимой в измерение пропускания вследствие присутствия рассеянного света:

$$\Delta T_p = T' - T = \alpha (T_p - T) / 100$$

Анализ этого выражения показывает, что с уменьшением пропускания исследуемого раствора (увеличением его оптической плотности) погрешность ΔT_p возрастает. Так, при $\alpha = 0,5\%$ и $T_p = 1$ относительная погрешность измерения $D = 1$ составляет 2%, а при $D = 2$ она возрастает до 8,75%. При $T_p < T$ рассеянный свет приводит к уменьшению, а при $T_p > T$ - к увеличению измеряемого пропускания. В результате присутствие рассеянного света ухудшает структуру измеряемого спектра, снижает ее разрешение. При $T_p = T$ величина $\Delta T_p = 0$, поэтому рассеянный свет не влияет или мало влияет на результаты измерения пропускания нейтральных фильтров.

Наиболее простым методом измерения уровня рассеянного света является метод фильтров. Метод заключается в измерении кажущегося пропускания практически непрозрачных при данной длине волны объектов ($T = 0$), свободно пропускающих излучение с другими длинами волн ($T_p = 1$). В соответствии с выражением для погрешности ΔT_p измеряемое пропускание таких объектов (в процентах) численно равно величине α . В качестве фильтров для длин волн 200 - 220 нм рекомендуется использовать раствор KCl 10 г/л, около 270 нм - раствор KI или NaI 10 г/л, для длин волн 300-330 нм - ацетон, а 340 - 370 нм - раствор NaNO₂ 50 г/л (во всех случаях $l = 1$ см).

Недостатком указанного метода является необходимость измерения очень низких значений пропускания. Если измерять пропускание одного из этих растворов в 1 см кювете относительно того же раствора в 0,5 см кювете, то регистрируемые величины будут находиться в более благоприятном для измерения диапазоне.

Пропорциональность между оптической плотностью и концентрацией вещества в растворе нарушается также при чрезвычайно большой интенсивности падающего на вещество света (лазерное излучение), когда значительная часть молекул вещества оказывается в возбужденном состоянии.

Линейность

Для того чтобы фотометр правильно измерял поглощение в своем диапазоне плотностей, его отклики на изменения светового потока должны быть линейно пропорциональны этим изменениям. Это означает, между поглощенным светом и показаниями прибора должна существовать линейная зависимость.

Чтобы проверить линейность инструмента могут использоваться различные растворы. С помощью жидких материалов можно выявить ошибки разведения, нестабильность, сдвиг поглощения при изменении рН, температурное влияние. Альтернативой жидким растворам служит стеклянный фильтр, который на данной длине волны имеет незначительное поглощение. Фильтр ПС7 имеет поглощение 0.09 в 550 нм и может использоваться для проверки линейности следующим образом:

1. Установите длину волны 550 нм, закройте кюветное отделение фотометра и установите поглощение ноль (пропускание 100%).
2. Установите фильтр и определите поглощение. Запишите результат.
3. Удалите фильтр и установите плотность 0,25.
4. Снова установите фильтр и определите плотность.
5. Повторите процедуру для ряда других плотностей 0.50, 0.75, 1.00, 1.25 и т.д.
6. Определите величины приращений плотности фильтра для каждого измерения.

Линейность удовлетворительна, если приращения остаются постоянными. Такая же процедура используется с подходящим фильтром на спектрофотометрах, в которых раствор

бланка имеет ряд дискретных значений плотностей с шагом приблизительно в 1 единицу поглощения.

Более простой метод заключается в том, чтобы использовать рабочий раствор максимальной концентрации. Количество раствора должно быть, по возможности, большим и известным. Раствор помещается в сосуд, по объему в несколько раз больше, чем рабочий раствор. Затем:

1. Часть раствора наливается в кювету и определяется его плотность на заданной длине волны.
2. Весь раствор из кюветы возвращается в сосуд.
3. В сосуд добавляется объем воды, равный объему исходного раствора, получается раствор, разбавленный в 2 раза.
4. Повторяются процедуры 1-2.
5. В сосуд добавляется объем воды, равный объему разбавленного раствора.
6. Повторяются процедуры 1,2, 5, 1.

В результате получается ряд концентраций с плотностями в отношении 1: 1/2 :1/4 : 1/16 и т.д. Этим концентрациям должно соответствовать отношение измеренных плотностей 1: 1/2 :1/4 : 1/16 и т.д. Непропорциональность измеренных значений плотностей свидетельствует об отсутствии линейности в диапазоне плотностей рабочего раствора. Большой объем исходного раствора необходим для минимизации ошибок разбавления. Этот метод хорош тем, что определяется линейность измерений непосредственно в отношении конкретного исследуемого вещества.

Использование констант в фотометрическом исследовании.

Выше представлены методы фотометрического определения концентрации вещества посредством измерения оптической плотности раствора и расчета концентрации с использованием таких констант, как фактор или молекулярный показатель поглощения.

Нужно быть внимательным при использовании таких констант. Ни при каких условиях константа не должна использоваться, если плотность стандарта или исследуемых растворов выходит за пределы линейного участка калибровочной кривой, то есть, если кривая не отражает закон Бугера. Чтобы напрямую сравнивать исследуемый раствор со стандартом или чтобы определить калибровочную константу, необходимо использовать три или больше калибратора в каждой серии определений, так как изменения в реагентах, условиях работы, размерах кювет, ухудшение или изменение параметров фотометра могут приводить к каждодневным изменениям в величине оптического поглощения из-за изменений параметров калибратора. Нелинейная калибровочная кривая может использоваться лишь в том случае, если для калибровки используется достаточное количество калибраторов с различными концентрациями, чтобы перекрыть весь диапазон ожидаемых плотностей неизвестных растворов.

В некоторых случаях качественные калибровочные материалы могут оказаться трудно доступными, тогда можно использовать константы, полученные на качественных материалах и опубликованные в литературе. В общем случае использование опубликованных констант приводит к ненадежным результатам, если не следовать опубликованному методу до мелочей и если используемый фотометр не обеспечивает высокую спектральную чистоту оптического излучения в рабочем диапазоне длин волн. Использование широкополосного излучения обычно ведет к занижению поглощения. Оптическая плотность NADH при 340 нм, например, часто используется, как референтная для определения активности ферментов и основана на молярном показателе поглощения равном 6220. Эта величина получается при точно описанных и тщательно контролируемых условиях и не может использоваться, если эти условия не соблюдаются.

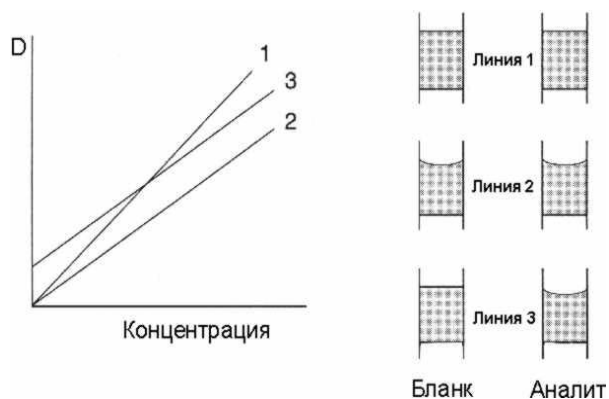
Можно сказать, что опубликованные данные для молярного показателя поглощения или коэффициента поглощения могут быть использованы как справочные значения до тех пор, пока они не будут подтверждены измерениями, проведенными на хороших стандартных материалах именно на данном фотометре.

Мениск в лунках планшетов

Появление мениска и его кривизна зависят от смачиваемости стенок пластиковой лунки раствором сравнения и аналитом. На рисунке 147 показаны возможные варианты влияния мениска на результаты фотометрирования. Видно, что в случае одинаковых

менисков для бланка и аналита зависимость оптической плотности от концентрации линейна, однако наклон линии существенно меньше, чем при отсутствии мениска, что приводит к заниженным значениям измеренной плотности. В случае отличия менисков для бланка и аналита зависимость также линейна, однако линия имеет меньший наклон и смещена относительно шкалы плотности, что также приведет к ошибкам определения оптической плотности. Избежать влияния мениска можно лишь соответствующей калибровкой прибора по калибровочным образцам.

Рисунок 147. Влияние мениска при вертикальном фотометрировании на зависимость оптической плотности от концентрации вещества (анализатор FP-901).



Температура.

Многие фотометрические процедуры связаны с кинетическими исследованиями активности ферментов, то есть измерениями оптической плотности субстратов в процессе ферментативной реакции. Установлено, что скорость ферментативных реакций при изменении температуры на 10°C изменяется в 2 раза. Например, активность АСТ в сыворотке, определённая набором фирмы Randox при 37°C , составляет 35 Ед/л, а при 25°C – 16 Ед/л. При дальнейшем понижении температуры реакционной смеси скорость реакции будет снижаться: при 15°C активность АСТ равна 8 Ед/л, при 5°C — 4 Ед/л. Фотометры для кинетических исследований содержат термостатируемую фотометрическую ячейку. Степень стабилизации номинальной температуры определяется заданной погрешностью определения активности фермента. Например, для заданной погрешности $\pm 4\%$ температура должна выдерживаться в пределах $\pm 0,2^{\circ}\text{C}$.

В большинстве фотометрических аналитических процедурах оптическая плотность исследуемого раствора сравнивается непосредственно с оптической плотностью калибратора или ряда калибраторов. В таких условиях незначительные ошибки в калибровке длины волны, в изменении спектральной полосы оптического излучения, незначительный рассеянный свет и так далее, обычно не вносят серьезные ошибки в результат измерения. Использование ряда калибраторов, перекрывающих широкий диапазон концентраций, также может обеспечить необходимую линейность, то есть соответствие закону Бугера для данного метода и фотометра. Следует особо подчеркнуть, что в последнее время появились калибраторы не только для субстратов, но и для калибровки активности ферментов. Это очень важно, так как появилась принципиальная возможность улучшить качество определения практически всего спектра рутинных, часто используемых в клинической биохимии показателей В случае использования опубликованных в научной литературе или предварительно определенных молярных показателей поглощения, коэффициентов пропускания или факторов к фотометрам предъявляются более строгие требования по аттестации их параметров. Периодическая проверка спектрофотометров (фотометров) также улучшает надежность обычных сравнительных исследований.

МЕТРОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ФОТОМЕТРИИ.

Правильность фотометрических данных

Правильность измерений отражает близость к нулю систематической погрешности и характеризуется разностью среднего результата серии измерений (\bar{x}) и истинного значения измеряемой величины (μ).

Правильность фотометрических данных можно оценить по результатам исследования стандартных образцов (эталонов), свойства которых считаются известными.

Фотометрическое исследование дает два вида результатов, одни из которых выражены в единицах длины волны (частоты), а другие - оптической плотности (пропускания). В соответствии с этим в фотометрии используют стандарты для поверки шкалы длин волн и шкалы оптической плотности или пропускания.

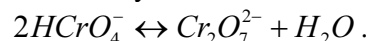
Поверку шкалы длин волн спектрофотометра лучше всего производить по спектру излучения ртутной лампы (см. рисунок 37). В этом спектре в области 220 -1150 нм имеется ряд весьма узких пиков, положение которых известно с точностью до 0,01 нм. Для текущего контроля шкалы длин волн могут использоваться растворы или стеклянные фильтры с редкоземельными элементами, обладающими весьма узкими полосами поглощения.

Поверка шкалы пропускания спектрофотометров по действующей в России системе стандартизации производится по наборам нейтральных светофильтров, аттестованных на образцовом приборе. Пропускание этих фильтров мало зависит от длины волны, поэтому такая поверка характеризует лишь линейность шкалы пропускания прибора и не обеспечивает единства результатов измерений объектов с селективным поглощением. Из-за отсутствия стандартов оптической плотности шкала оптических плотностей в отечественных приборах органами Госстандарта не поверяется. В тех случаях, когда требуется проверка шкалы плотности, используют стандарты оптического пропускания с коэффициентами пропускания, пересчитанными в оптическую плотность относительно воды или кварцевого прозрачного стекла.

За рубежом в качестве эталона оптической плотности используют чаще всего раствор 0,06006 г/л (0,006006%) $K_2Cr_2O_7$ в 0,005 М H_2SO_4 . Оптическую плотность этого раствора неоднократно измеряли на приборах разных типов при длинах волн 235, 257, 313 и 350 нм, соответствующих максимумам и минимумам поглощения. Рекомендуемые средние значения оптических плотностей - 0,7483 для 235 нм, 0,8645 - для 257 нм, 0,2916 - для 313 нм и 0,6403 - для 350 нм. Наблюдаемые для разных приборов отклонения от этих величин не превышают 0,004 для 235 нм и 0,002 для прочих длин волн.

Для поверки работы прибора при более коротких длинах волн можно использовать раствор никотиновой кислоты (0,016399 г/кг в 0,1 М HCl), оптическая плотность которого при 210 нм равна 0,7533.

Национальное бюро стандартов США для стандартизации измерений оптической плотности рекомендует растворы $K_2Cr_2O_7$ в 0,001 М $HClO_4$ (Standard Reference Material SRM-935) (таблица 13). Кроме указанных выше длин волн используют измерения при 345 нм. Эта длина волны соответствует изобестической точке равновесия



Кажущиеся показатели поглощения при 345 нм не зависят от концентрации раствора $K_2Cr_2O_7$ (таблица 14). Поэтому эти длина волны рекомендована для поверки линейности шкалы прибора.

Измерения, выполненные даже на тщательно выверенном по эталонам приборе, будут содержать систематические погрешности, как в значениях λ_{max} , так и в величинах ϵ . Эти погрешности связаны с некогерентностью используемого излучения и полностью избежать их при применении источников излучения с непрерывным спектром невозможно. Чем уже полоса поглощения, чем меньше ее симметрия и чем в более коротковолновой области она расположена, тем сильнее (при прочих равных условиях) искажения в λ_{max} и ϵ из-за некогерентности излучения.

Таблица 14.

Кажущиеся показатели поглощения ε [в кг/(г см)] раствора $K_2Cr_2O_7$ в 0,001 М $HClO_4$ (23,5 °С)					
К ₂ Cr ₂ O ₇ , г/кг раствора	Длина волны, нм				
	235	257	313	345	350
0,020	12,26	14,26	4,80	10,60	10,67
0,040	12,30	14,32	4,81	10,60	10,68
0,060	12,35	14,37	4,82	10,60	10,69
0,080	12,39	14,43	4,82	10,60	10,70
0,100	12,43	14,49	4,83	10,60	10,75

* Спектральная ширина щели 1,2 нм для 235 нм и 0,8 нм для других длин волн

Сходимость фотометрических данных

Сходимость отражает близость друг к другу результатов параллельных измерений, выполненных в одинаковых условиях, и характеризуется в абсолютных значениях средним квадратическим (стандартным) отклонением (σ - «сигма», SD, дисперсия), определяемой по соотношению:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (X_i - X_{cp})^2}{n-1}}$$

Сходимость в относительных единицах определяется коэффициентом вариации (V или CV_{cx}), рассчитываемом по уравнению:

$$V = \frac{\sigma}{X_{cp}} \times 100\%$$

Сходимость результатов фотометрических измерений одного и того же объекта, выполненных на одном и том же приборе в течение короткого промежутка времени, определяется погрешностями настройки прибора на 0 и 100% пропускания, погрешностями отсчета по измерительному прибору, нестабильностью электронной схемы прибора в процессе измерения и другими причинами.

В зависимости от величины оптической плотности (пропускания) и особенностей фотометра вклад различных факторов в суммарную дисперсию измерения будет разным. Поэтому сходимость результатов фотометрических измерений обычно характеризуют зависимостью коэффициента вариации оптической плотности (V_{cx}) от величины D .

Фактическая погрешность измерений на данном приборе может быть определена на основе экспериментального исследования. По результатам такого исследования зависимость V_{cx} от D может быть аппроксимирована с помощью метода наименьших квадратов уравнением:

$$V_{cx} = k_0 + k_1 \cdot D + k_2 \cdot D^2$$

Вычисленные значения σ_{cx} можно использовать, например, для оценки статистических весов измерений.

Отметим, что в отечественных спектрофотометрах величина σ_{cx} относительно мала по сравнению с величиной $\sigma_{воспр}$, характеризующей воспроизводимость результатов измерений (рисунок 136).

Воспроизводимость фотометрических данных

Если измерения (или серия измерений) выполнены в различных условиях (в разное время, на разных приборах, различными методами и т. п.), то для оценки близости результатов используют термин «воспроизводимость».

Очевидно, что сходимость определяется лишь случайными погрешностями эксперимента, а в оценку воспроизводимости могут входить и систематические погрешности, связанные с

особенностями разных приборов, методов, временным дрейфом и т. п. Для количественной оценки воспроизводимости также используют величины дисперсии или σ .

Раздельное описание погрешностей спектрофотометрического измерения, связанных со сходимостью и воспроизводимостью результатов, не является общепринятым. Оно целесообразно при экспериментальном изучении составляющих общей погрешности измерения на конкретном фотометре или в серии измерений одного объекта на ряде приборов.

Перечислим основные факторы, влияющие на воспроизводимость результатов спектрофотометрического измерения.

1. Химические и фотохимические факторы: случайные погрешности в приготовлении анализируемого раствора, влияние мутности раствора и флуоресценции анализируемого вещества или содержащихся в растворе примесей.

2. Кюветная погрешность, включающая в себя некомпенсированное из-за разной толщины кювет поглощение растворителя, разное светопоглощение кювет, многократные внутренние отражения света в кюветах. Последняя причина вызывает при обычных условиях погрешность в 0,05—0,2% пропускания. Наиболее существенным компонентом кюветной погрешности является невоспроизводимость положения кювет относительно оптического пучка. Именно эта погрешность лимитирует общую воспроизводимость спектрофотометрического измерения на отечественных приборах.

3. Погрешность холостого опыта, складывающаяся (аналогично п.1) из погрешностей в приготовлении растворов, а также влияния их мутности или способности к флуоресценции. Возможно несколько способов учета оптической плотности холостого раствора, из которых наиболее точным является непосредственное измерение оптической плотности испытуемого раствора относительно холостого.

4. Погрешность установки аналитической длины волны, складывающаяся из погрешности отсчета по шкале длин волн и явлений «гистерезиса», т. е. несоответствия положения диспергирующего элемента (призмы, решетки) и указателя на шкале длин волн. При работе в районе пологого максимума поглощения анализируемого вещества неточная установка длины волны практически не сказывается на точности измерений. В то же время на крутых участках спектра эта погрешность может возрастать до 0,7% измеряемой величины.

Относительный вклад перечисленных факторов зависит от спектра поглощения анализируемого вещества, особенностей прибора и условий анализа. Очевидно, что при последовательных измерениях одного объекта, не связанных с перестановкой кювет, включением и выключением прибора, погрешность результатов можно оценивать величиной $\sigma_{сх}$. В остальных случаях следует использовать $\sigma_{воспр}$ или величину оптической плотности σ_D , характеризующую суммарную погрешность измерения без разделения ее на составляющие погрешности.

Экспериментальная зависимость относительного коэффициента вариации от величины D для спектрофотометра СФ-26 представлена на рисунке 148а. Аналогичные зависимости характерны для спектрофотометров других типов (рис. 148б). Анализ этих зависимостей показывает, что оптимальное по воспроизводимости значение оптической плотности D_{opt} лежит обычно в интервале 0,3 - 0,8 Ед.

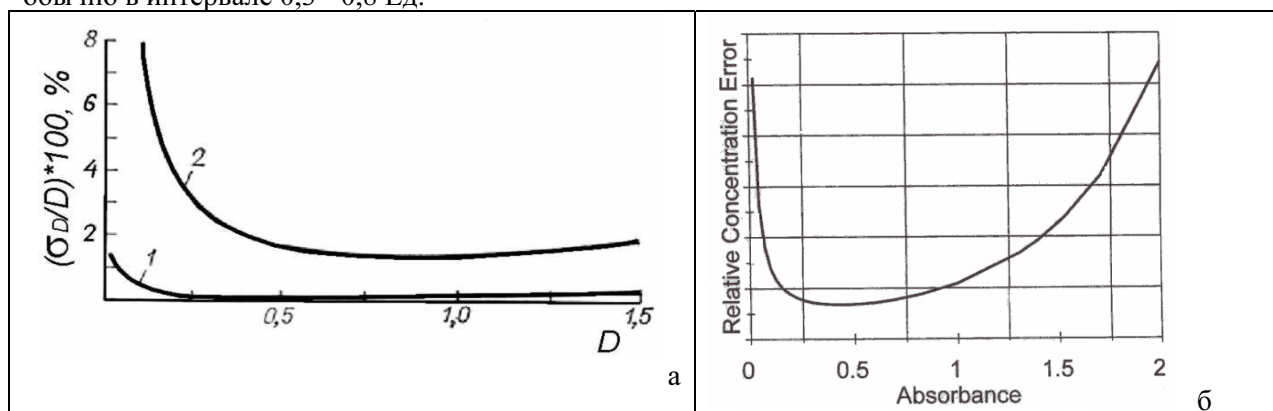


Рис. 148. Погрешности фотометрирования при разной оптической плотности исследуемого раствора. Лучшие результаты при определении концентрации исследуемого вещества будут достигаться в диапазоне 0,3 – 0,8 Ед.

а - Зависимость коэффициента вариации для сходимости (1) и воспроизводимости (2) измерений на спектрофотометре СФ-26 (растворы $K_2Cr_2O_7$ в 0,005 М H_2SO_4) от величины оптической плотности раствора; б – аналогичная кривая, представляемая в зарубежных источниках (Lewandrowski, 2002)

Относительная погрешность фотометрического измерения резко возрастает при $D < 0,2$ и лишь медленно увеличивается при $D > 1,5$.

С величиной D_{opt} связан вопрос о рекомендуемом рабочем интервале оптических плотностей. Последний определяют таким образом, чтобы во всем интервале коэффициент вариации не превышал удвоенного минимального V_{min} значения при D_{opt} :

$$\sigma_{воспр} / D \leq 2 (\sigma_{воспр} / D)_{min}$$

Для большинства современных биохимических фотометров рабочий интервал оптических плотностей равен 0,2 - 2,0.

Результаты фотометрических измерений в большинстве случаев интересны не сами по себе, а в сравнении с аналогичными результатами, полученными в другое время, для другого объекта, часто на другом приборе. Например, определение концентрации вещества в растворе сводится к сравнению оптических плотностей исследуемого раствора и раствора стандарта определяемого вещества с известной концентрацией. Идентификация вещества включает сравнение его фотометрических параметров (величин λ_{max} , отношений оптических плотностей при определенных длинах волн и т. п.) с аналогичными параметрами стандарта.

При измерении оптических плотностей одних и тех же объектов на различных фотометрах (в том числе на приборах одного типа) полученные значения могут отличаться на 0,02—0,05 единицы оптической плотности; в области $\lambda < 235$ нм отклонения могут быть и больше.

Предел обнаружения и минимально определяемая концентрация

Для оценки возможности определения данным методом низких концентраций или количеств анализируемого вещества принято рассматривать две характеристики - предел обнаружения и минимально определяемую концентрацию.

Пределом обнаружения называют наименьшую концентрацию или количество (C_L) вещества, которые определяются данным методом с заданной вероятностью. Величина C_L зависит от суммарной погрешности холостого опыта (фона) и определяется тем минимальным аналитическим сигналом, который можно зарегистрировать относительно этого фона с заданным уровнем значимости. При этом превышение регистрируемого аналитического сигнала над указанным минимальным значением не должно служить мерой фактической концентрации (количества) вещества в анализируемом растворе. Это превышение является лишь свидетельством присутствия анализируемого вещества в исследуемом растворе. Таким образом, предел обнаружения является качественной характеристикой метода анализа.

При спектрофотометрических измерениях наименьший обнаруживаемый аналитический сигнал:

$$D_L = \bar{D}_{хол} + k\sigma_{хол}$$

где $\bar{D}_{хол}$ - средняя оптическая плотность в холостом опыте; k - коэффициент с рекомендуемым значением 3; $\sigma_{хол}$ - значение σ_D при $D = \bar{D}_{хол}$.

Если $\bar{D}_{хол} = 0$, то предел обнаружения

$$C_L = D_L / \epsilon l$$

Если, например, если при $D = 0$ величина $\sigma_D \approx 0,008$, то $D_L \approx 0,024$. Максимально возможное значение молярного показателя поглощения для органических соединений около $1,5 \cdot 10^5$. При $l = 1$ см это соответствует $C_L = 1,6 \cdot 10^{-7}$ моль/л.

Минимально определяемая концентрация или количество вещества C_{min} - это наименьшая концентрация или количество, определяемые данным методом с заданной погрешностью. Значение C_{min} является количественной характеристикой метода анализа и зависит от вариации результата анализа ($\sigma_{C_{min}}$) в области $C > 0$. Обычно C_{min} определяют из условия

$$C_{min} = 3 \sigma_{C_{min}} \cdot t,$$

где t — критерий Стьюдента.

При линейном градуировочном графике $C_{min} \approx 2C_L$. Вычисление C_{min} требует экспериментального определения $\sigma_{C_{min}}$ при низких значениях концентраций.

Оценка погрешностей определения активности ферментов кинетическим методом с применением линейной регрессии

Кинетический метод определения активности ферментов оптическим методом заключается в определении скорости изменения оптической плотности реакционной смеси во время ферментативной реакции.

Активность фермента EA связана со скоростью a изменения плотности D соотношением:

$$EA = a \frac{F}{t(\text{минут})},$$

где F – фактор, t – время, a – скорость изменения оптической плотности.

На рисунке 136 представлен график зависимости оптической плотности D от времени протекания реакции t . Оптическая плотность, как функция времени, определяется выражением $D = D_0 - at$,

где a – скорость изменения плотности: $a = \frac{\Delta D}{\Delta t} = \frac{D_{t_1} - D_{t_0}}{t_1 - t_0}$.

Определенная таким образом скорость a будет иметь значительную погрешность. Чтобы уменьшить погрешность, оптическую плотность определяют многократно (n раз) за время реакции Δt через небольшие интервалы времени τ , а скорость изменения плотности находят как тангенс угла наклона a_x прямой регрессии $D = D_0 - a_x t$.

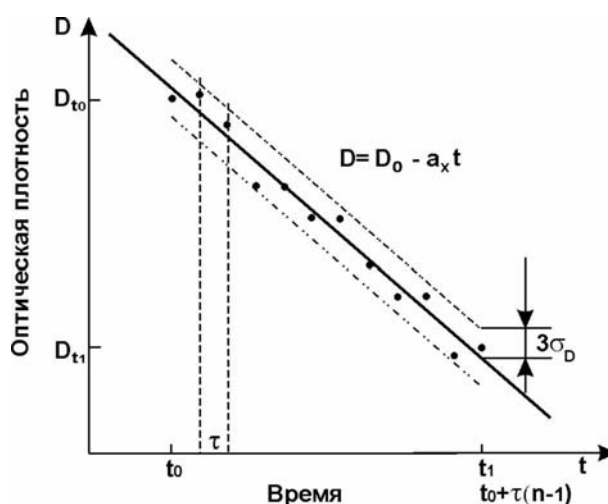


Рис. 149. Определение скорости изменения оптической плотности по линейной регрессии.

n – количество определений оптической плотности; σ_D – стандартное отклонение определения плотности; $\tau = (t_1 - t_0)/(n - 1)$ – интервалы времени между определениями плотности; $(t_1 - t_0)$ – время наблюдения реакции. Через равные интервалы времени τ фотометр измеряет n значений плотности. Теоретически химическая реакция идет с линейным изменением оптической плотности и все эти точки должны лежать на одной прямой.

Для нормального распределения наклон прямой регрессии σ_{a_x} связан со стандартным отклонением определения оптической плотности σ_D выражением:

$$\sigma_{a_x} = \sqrt{\frac{12(n-1)}{n(n+1)}} \sigma_D$$

Стандартное отклонение случайной составляющей определения активности фермента:

$$\sigma_{EA} = \frac{F}{\Delta t(\text{минут})} \sqrt{\frac{12(n-1)}{n(n+1)}} \sigma_D$$

При $n > 5$ это выражение можно упростить с точностью до 10%:

$$\sigma_{EA} = \frac{F}{\Delta t(\text{минут})} \frac{3}{\sqrt{n}} \sigma_D$$

При $\Delta t = 1$ минута для фотометра получим:

$$\sigma_D = \sigma_{EA} \frac{\sqrt{n}}{3F}$$

Пользуясь этим выражением можно оценить предельное стандартное отклонение фотометрирования при определении активности ферментов. Оценки точностных характеристик при фотометрических кинетических определениях активностей некоторых ферментов приведены в таблице 15.

Обратим внимание, что полученные оценки CV необходимо соотносить со значением оптической плотности D_0 , так как, вообще говоря, CV различно для больших и малых плотностей. В данном случае CV соответствует плотностям порядка 2-х белл.

Таблица 15

Точностные характеристики определения активности ферментов фотометрическим кинетическим методом								
Фермент	Длина волны λ , нм	Фактор	Активность фермента МЕ/мл	Вариация %CV	σ_{EA}	σ_D фотометра	Смещение %В	Нелинейность фотометра $\Delta_{нел}$, %
А-амилаза	405	11077	110	10	11	0,0017	15	9
АЛТ	340	1745	20	15	3	0,0029	15	9
АСТ	340	1745	20	10	2	0,0019	10	4
ГГТ	405	1158	20	10	2	0,0029	15	9
КФК	340	4127	100	20	20	0,0082	20	14
ЛДГ	340	16030	330	10	33	0,0035	10	4
ЩФ	405	2757	200	10	20	0,0123	15	9

Оценка систематических погрешностей определения активности ферментов

Величина систематической погрешности определения активности ферментов зависит от температурной нестабильности реакционной смеси, нелинейности оптической плотности и качества дозирования:

$$\Delta_{сист} = \Delta_{темп} + \Delta_{нел} + \Delta_{доз}$$

Выше уже говорилось, что при изменении температуры реакционной смеси на 0,2°C скорость реакции изменится на 4%. Ошибка дозирования составляет порядка 2%.

Предельно допустимая величина систематической ошибки определения АСТ указана в Приказе Минздрава России № 45 от 07.02.2000г. и составляет 10 %. Поэтому вполне справедливо будет предъявить предельно допустимое требование к нелинейности:

$$\Delta_{нел} = \Delta_{сист} - \Delta_{темп} - \Delta_{доз}$$

$$\text{или } \Delta_{нел} = (10 - 4 - 2)\% = 4\%.$$

Оценки предельно допустимых нелинейностей для других ферментов приведены в таблице 15. Разумеется, при выборе фотометра следует руководствоваться наименьшими значениями параметров погрешностей.

СОПОСТАВЛЕНИЕ ТОЧНОСТНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК ЛАБОРАТОРНЫХ МЕТОДОВ НА ПРИМЕРЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ГЕМОГЛОБИНА

Методы определения гемоглобина

Исследование концентрации гемоглобина крови является одним из наиболее массовых и клинически важных лабораторных исследований. Известно, что суточная вариация этого параметра может достигать у человека 2%. Нормы точности, предъявляемые к лабораторному исследованию гемоглобина, определены отраслевым стандартом «Правила проведения внутрилабораторного контроля качества количественных методов клинических лабораторных исследований с использованием контрольных материалов» ОСТ 91500.13.0001-2003, утвержденным Приказом Минздрава РФ № 220 от 26.05.2003 г. Предельно допустимые значения смещения (В) и коэффициента общей аналитической вариации (CV), рассчитанные по результатам 20 измерений определяемого показателя в контрольном материале гемоглобина, составляют $\pm 4\%$ и 4% соответственно. Достижение такой точности требует тщательного проведения измерений, анализа и устранения всех источников погрешностей. В общем случае погрешности можно разделить на погрешности метода, погрешности пробоподготовки и погрешности измерений (фотометрирования - для оптических методов), то есть приборные погрешности.

Наиболее массовыми, рутинными методами исследования гемоглобина крови являются фотометрические методы, использующие свойство гемоглобина и его производных хорошо растворяться в воде, окрашивая раствор характерным цветом. Ниже рассмотрены наиболее распространенные методы, в которых для фотометрирования используются растворы гемиглобинцианида (гемиглобинцианидный метод), гемихрома (гемихромный метод) или водные растворы производных гемоглобина крови в присутствии незначительного количества (0,04%) аммиака (модифицированный метод Дервиза-Воробьева). Сущность методов проста - с помощью трансформирующих растворов из цельной крови приготавливается фотометрический раствор (биопроба), по оптической плотности которого определяется концентрация гемоглобина:

$$C_{\text{Нв}}(г/л) = (D(\lambda)_{\text{пробы}} \cdot F \cdot 10) / L$$

где $D(\lambda)_{\text{пробы}}$ - оптическая плотность биопробы на рабочей длине; F - коэффициент (фактор) пересчета оптической плотности в концентрацию, 10 - толщина "идеальной" спектрофотометрической кюветы, L - истинная длина кюветы.

Для гемиглобинцианида фактор является известной величиной и равен 367,7 ($\lambda = 540$ нм). Для гемихромного метода фактор также известен и равен 398,0 (для $\lambda = 540$ нм).

Обратим внимание, что величина фактора определена для монохроматического измерения, когда спектральная полоса составляет 1 нм. Такая полоса достигается только в спектрофотометрах. Содержание гемоглобина можно определить и по формуле (2):

$$C_{\text{Нв}}(г/л) = C_{\text{калибратора}} \cdot (D(\lambda)_{\text{пробы}} / D(\lambda)_{\text{калибратора}})$$

где $C_{\text{калибратора}}$ - концентрация гемоглобина в калибровочном растворе, который прилагается, как правило, к трансформирующему реагенту; $D(\lambda)_{\text{пробы}}$ - оптическая плотность биопробы; $D(\lambda)_{\text{калибратора}}$ - оптическая плотность калибратора.

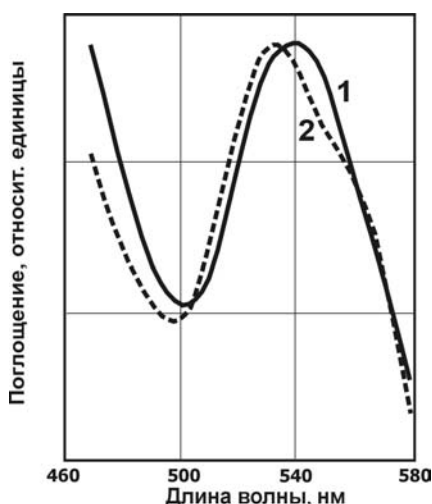


Рис. 150. Спектры поглощения гемиглобинцианида (1) и гемихрома (2)

Оптимальной областью фотометрирования является максимум спектральной кривой поглощения. Для гемиглобинцианида - это 540 нм (рисунок 150), которая и есть рабочая длина волны для этого метода. Измерение в максимуме кривой, где смягчаются требования к точности установки длины волны, снижает требования к точности изготовления и стабильности оптических фильтров. Максимум кривой поглощения гемихрома находится на длине волны 533 нм. Однако измерение на этой длине волны возможно только в спектрофотометрах. В специализированных фотометрах применяются полосовые светофильтры с типовыми длинами волн. Ближайшая к 533 нм типовая длина волны 540 нм, на которой и проводится фотометрирование с учетом коэффициента пересчета для 540 нм.

Для модифицированного метода Дервиза-Воробьева оптимальной (рабочей) является изобестическая точка 523 нм, в которой минимизируются погрешности измерений (рисунок 128б).

Погрешности методов определения гемоглобина

К погрешностям метода относятся погрешности, связанные с оптическими свойствами биопробы, способами подготовки биопробы, а также способами (оптическими схемами) фотометрирования. Согласимся, что все погрешности случайные и имеют нормальное распределение, поэтому будем оперировать для выражения методической погрешности величиной стандартного отклонения (σ). Для каждого метода определения гемоглобина суммарная погрешность будет в нашем примере определения гемоглобина складываться из погрешностей, связанных с присутствием разных форм гемоглобина в крови, преобразования гемоглобина при приготовлении пробы для фотометрирования, погрешностей приборных, калибровки, дозирования, контрольных материалов.

Погрешности, связанные с присутствием разных форм гемоглобина

В крови гемоглобин существует в четырех основных формах: оксигемоглобин (HbO_2), дезоксигемоглобин (HbH), карбоксигемоглобин (HbCO) и метгемоглобин (HbMet). Производные гемоглобина имеют характерные спектры поглощения (см. рисунок 128б). Фотометрирование непосредственно крови затруднительно по следующим причинам:

1. Гемоглобин в крови не свободен, а находится в эритроцитах. Наличие клеток и белков приводит к значительному рассеянию света, оптические свойства крови не подчиняются закону Бугера-Ламберта-Бера, который устанавливает прямо пропорциональную зависимость между поглощением светового потока определенной длины волны и концентрацией растворенного вещества.

2. Концентрация гемоглобина в крови высока, поэтому для достижения оптимальной плотности фотометрирования 0,5 Б (белл) (большинство фотометров работает при плотности биопроб 0,2-2 Б) требуется кювета с длиной оптического пути 50 микрометров. Изготовить такую кювету с необходимой точностью и поместить в нее кровь проблематично.

3. Так как производные гемоглобина имеют различающиеся спектральные кривые поглощения, результат фотометрирования зависит от соотношения производных, которое в

общем случае неизвестно. Чтобы определить это соотношение измерения нужно проводить в нескольких точках спектра, а это сложно и дорого.

Из сказанного вытекают следующие требования к пробе крови: она должна иметь окраску и быть прозрачной. Оптическая плотность пробы в стандартных спектрофотометрических кюветах (10 мм) должна быть в пределах 0,2 - 2 белл. Проба должна иметь одну производную гемоглобина с удобным для фотометрирования спектром поглощения или способ фотометрирования должен учитывать поглощение разных форм гемоглобина.

Однако существуют особенности, которые также необходимо учитывать при фотометрировании биопроб. Так, закон Бугера-Ламберта-Бера справедлив только при фотометрировании растворов в монохроматическом свете. Поскольку поглощение производных гемоглобина имеет спектральную зависимость, то, в случае использования в оптической схеме светофильтра с широкой полосой пропускания, линейная зависимость оптической плотности от концентрации вещества нарушается.

При фотометрировании гемиглобинцианида для абсорбционных светофильтров с полосой пропускания 200 нм (зеленое стекло ЗС-1) нелинейность (ошибка) достигает 6%. Такие светофильтры имеют старые фотометры и в таком случае необходима калибровка с помощью калибровочных растворов. Современные колориметры и специализированные фотометры - гемоглобинометры содержат узкополосные светофильтры с полосой пропускания менее 40 нм, которые обеспечивают нелинейность меньше процента. Ширина полосы пропускания оказывает влияние на величину погрешности измерения и в другом случае. При фотометрировании крови, разведенной в слабом (0,04%) растворе аммиака (оксигемоглобиновый метод, предложенный в 1959 году Дервизом и Воробьевым), в случае использования светофильтра с широкой полосой пропускания (широкая заштрихованная область на рисунке 128б) и при наличии существенных количеств метгемоглобина и карбоксигемоглобина ошибка измерения может достигать 30%, что абсолютно неприемлемо.

В узкой спектральной полосе с центром на длине 523 нм (узкая заштрихованная область на рисунок 124б) два основных производных гемоглобина - оксигемоглобин и метгемоглобин имеют одинаковое поглощение (изобестическая точка), поэтому результат фотометрирования не зависит от относительного содержания этих производных в растворе. Поглощение же третьей производной - карбоксигемоглобина больше на величину $(0,97-0,84)/0,84 \cdot 100 = 15,4\%$ (при 100% содержании карбоксигемоглобина в крови). В таблице 16 представлены данные о методической ошибке при разном процентном содержании карбоксигемоглобина и сопутствующих симптомах отравления угарным газом.

Таблица 16

Методическая ошибка при разном процентном содержании карбоксигемоглобина в крови		
% НвСО	Симптомы отравления угарным газом	Ошибка, %
до 5%	Курение	0-0,75
10	Симптомов нет	1,5
10-20	Напряжение во лбу, расширение кожных сосудов	1,5-3
20-30	Головная боль и пульс в висках	3-4,5
30-40	Резкая головная боль, усталость, головокружение, ослабленное зрение, тошнота, рвота, упадок сил	4,5-6
40-50	Резкая головная боль, усталость, головокружение, ослабленное зрение, тошнота, рвота, упадок сил плюс учащенный темп дыхания и удушье	6-7,5
50-60	Кома, конвульсии, дыхание Чейна-Стокса	7,5-9
60-70	Кома, конвульсии, слабое дыхание и пульс, возможна смерть	9-10,5
70-80	Замедление и остановка дыхания, смерть через несколько часов	10,5-12

Таким образом, в подавляющем большинстве случаев фотометрирование в узкой спектральной полосе с максимумом на длине волны 523 нм (модифицированный метод Дервиза-Воробьева) дает вполне приемлемый для практики результат. Этот метод реализован в гемоглобинометре "Мини-ГЕМ-523". Методическая ошибка определения гемоглобина из-за наличия карбоксигемоглобина не превышает 1,5%, если концентрация карбоксигемоглобина в крови не выше 10%.

Погрешности преобразования гемоглобина

При приготовлении биопроб гемиглобинцианида и гемихрома возникают погрешности, связанные с погрешностью преобразования производных, с чистотой и прозрачностью растворов, величиной pH.

О точности преобразования можно судить по калибровочным растворам гемиглобинцианида и гемихрома. Согласно паспортным данным, погрешность для этих растворов составляет 2%. Поскольку технология приготовления фотометрических растворов (биопроб) для этих методов подобна технологии приготовления калибровочных растворов, погрешность определения гемиглобинцианида и гемихрома превышает 2%, так как в крови могут присутствовать примеси, искажающие спектр и прозрачность раствора.

Приборные погрешности

К основной приборной погрешности можно отнести погрешность установки оптического "нуля", который играет фундаментальную роль в фотометрических измерениях. Относительно этой величины оптической плотности определяется плотность растворов. При исследовании гемоглобина оптический "ноль" - это плотность холостой пробы или дистиллированной воды, налитых в абсолютно чистую кювету. Измеренная плотность холостой пробы принимается за ноль отсчета плотностей растворов гемоглобина. Если измерение плотности холостой пробы произведено в загрязненной кювете, то оптический ноль будет определен неправильно и ошибка измерений может быть абсолютно неприемлемой. Избежать этой ошибки можно только тщательной и аккуратной работой с прибором и кюветой.

Другие причины, такие как загрязнение оптического канала фотометра, изменение яркости источника света при изменении или напряжения электрического питания или внешней температуры (оптико-электронные параметры), также приводят к ошибке определения оптической плотности. Контролировать проявление этих факторов можно, постоянно проверяя уровень оптического нуля, что крайне неудобно при рутинных исследованиях. Автоматическое "слежение" за уровнем оптического нуля осуществляется в двух лучевых (двух канальных) спектрофотометрах, в которых холостая проба устанавливается в опорный канал (канал сравнения). Однако, такое оборудование и дорого и неудобно для рутинных исследований. Как уже отмечалось выше, специализированные фотометры - гемоглобинометры "МиниГЕМ-540" и "МиниГЕМ-523" лишены таких недостатков, так как в них при помощи микропроцессора периодически определяются оптико-электронные параметры прибора и тем самым "отслеживается" уровень оптического нуля (автокалибровка).

Погрешности калибровки приборов

Для тех приборов, которые калибруются с помощью калибровочных растворов, к приборным погрешностям добавляется погрешность калибровки. Погрешность калибровки обусловлена погрешностью приготовления калибровочных растворов и может составлять от 1% до 6% в зависимости от знаков реальных отклонений концентраций (плюс или минус) калибровочных растворов от истинных значений концентраций.

Погрешности дозирования крови и растворов

Источником ошибок при дозировании является некалиброванные дозаторы и низкая квалификация лаборантов. Кроме того, имеет значение личный опыт лаборанта. Достижимая точность дозирования составляет 1%.

Контрольные материалы и их точностные характеристики

Для каждого метода выпускаются реагенты и контрольные материалы.

Для гемихромного метода фирмой "Вектор-Бест" (Новосибирск) выпускаются наборы реагентов "Гемоглобин-Ново" и калибровочные растворы "Гемосо-Ново".

Линейная область определения концентрации гемоглобина - 30-180 г/л, отклонение от линейности не более 2%. Чувствительность определения - не более 25 г/л. Время реакции - 5 мин. Окраска растворов устойчива до 5 часов. Фотометрирование на длине волны 540 нм (см. рисунок 138). В состав набора "Гемосо-Ново" входят 4 ампулы по 5 мл калибровочных растворов гемихрома, соответствующих концентрациям гемоглобина от 50 до 190 г/л +/- 2%, коэффициент вариации для каждой концентрации 2%.

Для гемиглобинцианидного метода фирмой "Ренам" (Москва) выпускается реагент "Диагем-Т". Время реакции - 30 мин. Область линейности 50-200 г/л, отклонение от линейности - 2%. Чувствительность 2,5 г/л. Фотометрирование на длине волны 540 нм (см. рисунок 138).

Набор калибровочных растворов гемиглобинцианида этой же фирмы "Ренам" предназначен для калибровки фотометров. Набор содержит 4 ампулы по 5 мл раствора с концентрациями 50, 10, 150, 200 г/л +/-2% при коэффициенте вариации для каждой концентрации 2%. После вскрытия ампулы раствор пригоден для использования в течение 8 часов. При производстве калибровочных растворов гемиглобинцианида фирма "Ренам" использует в качестве стандарта раствор гемиглобинцианида, который выпускает National Institute of Public Health and the Environment, Голландия. Точность этого стандарта 0,2%.

Набор контрольных растворов гемоглобина "Диагем-К" включает в себя растворы с концентрациями в диапазонах 70-90, 110-130 и 140-180 г/л при точности 2% и коэффициенте вариации 2%.

Трансформирующим раствором при модифицированном методе Дервиза-Воробьева является слабый 0,04% раствор аммиака. Время реакции - 1-2 секунды. После суток хранения приготовленного раствора крови оксигемоглобин начинает переходить в метгемоглобин, что не меняет суммарное поглощение на рабочей длине волны 523 нм, и, следовательно, измеряемую концентрацию гемоглобина. Для контроля этого метода пригоден "Контрольный раствор гемоглобина для негемиглобинцианидных методов исследования гемоглобина" "Калибратор-Ренам" фирмы "Ренам". Контрольное значение концентрации находится в пределах 15-170 г/л. с точностью 2% при коэффициенте вариации 2%.

Суммарная погрешность измерений σ .

Исходя из приведенных выше точностных параметров реагентов и калибровочных растворов, а также методических погрешностей измерений, можно оценить погрешность определения концентрации гемоглобина каждым из описанных методов.

Введем обозначения:

σ_1 - совокупная методическая погрешность.

σ_2 - погрешность преобразования гемоглобина при приготовлении биопробы для фотометрирования.

σ_3 - погрешность, связанная точностью установки оптического нуля.

σ_4 - погрешность, связанная со стабильностью электрооптических параметров.

σ_5 - погрешность калибровки.

σ_6 - погрешность дозирования, которая присутствует как при дозировании крови, так и реагента, поэтому ее нужно учитывать с двойным весом. Выше мы говорили, что в хорошем случае $\sigma_6 \sim 1\%$.

σ_7 - погрешности приготовления контрольных растворов гемоглобина.

Подразумевается, что все погрешности случайные и имеют нормальное распределение

Гемихромный или гемиглобинцианидный методы с использованием спектрофотометра (СФ-46, СФ-50). В спектрофотометрах можно установить узкую спектральную полосу 1 нм, поэтому $\sigma_1=0$. В этих приборах измерения проводятся относительно опорной (холостой пробы). Если кюветы, в которые наливаются измерительная и холостая пробы абсолютно одинаковы (по оптическому поглощению стенок и по оптической длине, то тогда можно принять $\sigma_3=0$, $\sigma_4=0$.

При расчете концентрации по фактору $\sigma_5=0$. Будем считать приведенные погрешности независимыми, тогда суммарная погрешность σ будет:

$$\sigma = \sqrt{(\sigma_2)^2 + (\sigma_6)^2} = \sqrt{2^2 + 1^2} = \sqrt{5} = 2.23\%$$

Полученный результат удовлетворяет биологически обоснованным нормам аналитической точности определенным ОСТом 91500.13.0001-2003.

Если определение концентрации проводится относительно калибратора ($\sigma_5=2\%$), то суммарная погрешность σ станет:

$$\sigma = \sqrt{(\sigma_2)^2 + (\sigma_5)^2 + (\sigma_6)^2} = \sqrt{2^2 + 2^2 + 1^2} = \sqrt{9} = 3.00\%$$

Таким образом, максимальная точность достигается на спектрофотометрах при измерении оптической плотности в узкой спектральной полосе с расчетом концентрации гемоглобина по фактору. Использование же калибраторов в спектрофотометрах может только ухудшить точность измерений плотности растворов гемоглобина.

Здесь следует делать оговорку. Для гемоглобина известен монокроматический молярный показатель поглощения на длине волны 540 нм, поэтому хорошо отрегулированный спектрофотометр не нуждается в калибровке по калибровочным образцам гемоглобина.

"МиниГЕМ-540" (гемоглобинцианидный метод) содержит светофильтр с полосой пропускания 30 нм, поэтому $\sigma_1 = 1\%$ (нелинейность). Прибор имеет встроенную схему микропроцессорного контроля оптического нуля, т.е. $\sigma_3=0$, $\sigma_4=0$. Прибор измеряет оптическую плотность гемиглобинцианида с автоматическим пересчетом в концентрацию гемоглобина по фактору и никакие калибраторы при измерении не используются. Для гемоглобинометра "МиниГЕМ-540" получим следующую оценку точности:

$$\sigma = \sqrt{(\sigma_1)^2 + (\sigma_2)^2 + (\sigma_6)^2} = \sqrt{1^2 + 2^2 + 1^2} = \sqrt{6} = 2.45\%$$

Это удовлетворяет биологически обоснованным нормам аналитической точности.

Гемоглобинометр "МиниГЕМ-523" (оксигемоглобиновый модифицированный метод Дервиза и Воробьева) - при оценке точности необходимо учесть данные таблицы 15. Для большинства клинических случаев концентрация карбоксигемоглобина не превышает 10% и, поэтому, $\sigma_1 < 1,5\%$. Оценка суммарной ошибки для этого случая:

$$\sigma = \sqrt{(\sigma_1)^2 + (\sigma_2)^2 + (\sigma_6)^2} = \sqrt{1.5^2 + 2^2 + 1^2} = 7.25 = 2.69\%$$

Таким образом, модифицированный метод Дервиза-Воробьева по точности практически совпадает с гемиглобинцианидным и гемихромным методами, если в них измерения проводить на спектрофотометрах по калибратору.

Выше приведена оценка максимальной точности. Если измерения проводятся в грязной кювете (недопустимы даже следы пальцев!), или используемый прибор нестабилен в процессе измерений, то допущение что $\sigma_3=0$, $\sigma_4=0$ несправедливо и ошибки измерений возрастают многократно. Заметим также, что существенную долю суммарной ошибки составляют погрешности калибровочных растворов и реагентов. Кроме того, трудно "удержать" предельную точность дозирования. Последнее обстоятельство склоняет многих к идее использовать контрольные растворы гемоглобина или образцы контрольной крови для "сквозной" калибровки системы дозатор-кровь-дозатор-реагент-прибор. Считается, что в этом случае можно "подстроиться" к ошибкам дозирования, *калибруя* фотометр по фотометрическим растворам гемиглобинцианида (биопробам), полученным из калибровочных образцов гемоглобина. Однако в этом случае можно снизить значение смещения (B), но вариационная ошибка (CV) таким образом не устранится. Проведем аналогичную оценку минимальной погрешности σ для "сквозной" калибровки с учетом погрешности контрольных растворов гемоглобина $\sigma_7 = 2\%$:

$$\sigma = \sqrt{(\sigma_2)^2 + (\sigma_7)^2} = \sqrt{2^2 + 2^2} = \sqrt{8} = 2.83\%$$

Это не лучший результат. В случае не слишком качественных приборов, у которых величины σ_1 , σ_3 , σ_4 , σ_5 имеют большие значения, существует опасность того, что выявить ошибку в системе, где все может быть одновременно плохо, нельзя. Поэтому то, что можно проверить, лучше проверить и откалибровать независимо. В первую очередь можно и нужно проверить фотометр. Тогда в системе дозатор-кровь-дозатор-реагент-прибор уже есть априори точное звено и ошибку нужно будет искать вне этого звена.

СРЕДСТВА КОНТРОЛЯ ФОТОМЕТРИЧЕСКИХ ПРИБОРОВ

В соответствии с Российским законодательством фотометры и спектрофотометры, а также анализаторы на их основе, используемые в медицинских лабораториях, относятся к средствам измерения медицинского назначения. Как средства измерения, они подлежат обязательной процедуре сертификации и периодической проверке в эксплуатации. Средства поверки

фотометрических приборов сами являются средствами измерения и вносятся в Государственный реестр средств измерения наравне с фотометрами и другими средствами измерения (таблица 17). Средства поверки вполне подходят и для проверки приборов в повседневной практике. Представленные в таблице 17 оптические меры конструктивно различаются, так как предназначены для конкретных приборов, однако многие из них пригодны для общего применения, так как держатели стеклянных мер выполнены в габаритах стандартной кюветы (например, наборы мер НОСМОП-6, НОСМОП-7, НОСМОП-9, КС-105 и другие).

Таблица 17

Перечень стеклянных оптических мер для поверки средств измерения медицинского назначения				
№ п/п	Наименование	Тип	№ гос. регистрации	Диапазон или поверяемые СИ
1.	Набор образцовых спектральных мер	НОСМ-5	13177-92	Анализатор гипербилирубинемии фотометрический АГФ-02 (Билитест)
2	Набор образцовых стеклянных мер оптической плотности	НОСМОП-5		Анализатор билирубина фотометрический АБФ-01 (Билимет)
3.	Набор образцовых стеклянных мер оптической плотности	НОСМОП-6	15582-02	Гемоглобинометр фотометрический портативный АГФ-03 (МиниГЕМ)
4.	Набор стеклянных мер оптической плотности	НОСМОП-7	20818-01	Анализатор биохимический фотометрический АБхФк-02 (БиАн)
5.	Набор стеклянных мер	НОСМ-8	21582-01	Анализатор гипербилирубинемии фотометрический АГФ-04 (Билитест-2000)
6	Набор стеклянных мер оптической плотности	НОСМОП-9	23929-02	Анализатор билирубина фотометрический АБФ-04 (Билимет К)
7	Комплект светофильтров	КНС-10.1	22617-02	400-800 нм; $\Delta=0,15-0,25\%$
8	Комплект светофильтров	КС-105	22054-02	Спектрофотометры UV-VIS. $\Delta=0,5\%$
9	Светофильтры поверочные	СФП-01	21755-01	Анализатор Гарант-3. Активность холинэстераз крови.
10	Комплект светофильтров	КОФ-02	20560-00	Анализатор жидкости Флюорат-02
11	Комплект светофильтров	АЛБ-КФ-сбо	18955-99	Анализатор АБ-01-УОМЗ
12	Комплект светофильтров поверочных	КСП-01	18091-99	ИФА и Б/Х. 0-2,5 Б; 340, 405, 450, 480, 490, 540, 570, 620, 630 нм
13	Комплект светофильтров поверочных		12135-90	ИФА- АИФ-Ц-01С. 1,5-93%
14	Комплект светофильтров	КС-102	9117-83	Универсальный. 400-800 нм
15	Комплект светофильтров	КС-100; КС-101	7821-86	Универсальный. 200-110 нм
16	Меры оптические планшетные	RVP	24205-03	ИФА. 0 – 4 Б. $\Delta=0,015-0,006$ Б
17	Набор оптической плотности		12959-91	ИФА. АКИЦ-01; АКИЦ-02
18	Набор мер	КНФ-1	11894-89	0,03-2,1 Б

	коэффициента пропускания оптической плотности			ФЭК-56,60; ЛМФ-69,72; КФК; КФК-2; КФК-2МП; КФО; ФО-1;НФР; КФК-3
19	Комплект образцовых мер оптической плотности и волновых чисел	СОД	13054-89	400 – 5000 см ⁻¹
20	Меры образцовые волновых чисел	ТАС-1	12308-90	200-900 нм
21	Меры для прибора	Розграф	22006-01	Показатель РОЭ.

Для проверки фотометров могут использоваться и цветные жидкие растворы. В качестве примера приведем характеристики набора REDI-CHECK (фирма??), состоящего из жидких цветных растворов с различными спектральными характеристиками (рисунок 151) и различными плотностями. Рабочие растворы приготавливаются перед использованием путем разведения в различной степени цветных растворов в буферных растворах. Плотности различных разведений для каждого цвета имеют соотношение 1:1; 1:2; 1:4; 1:8.

Набор позволяет проверить линейность фотометра в диапазоне оптических плотностей до 2 белл и в спектральных диапазонах:

Цвет раствора	Используемый фильтр, нм
Желтый	340, 380
Голубой	405, 415, 545-550, 600
Оранжевый	415, 450
Красный	490-492, 505

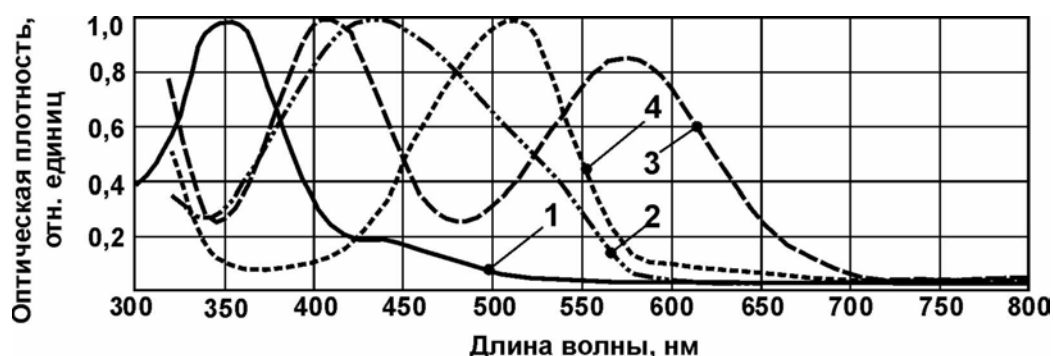


Рисунок 151. Нормализованные спектры поглощения стандартных растворов REDI-CHECK.

1 – желтый раствор; 2 – оранжевый раствор; 3 – синий раствор; 4 – красный раствор.

Литература.

1. ГОСТ 7601-78

Межгосударственный стандарт.

Физическая оптика.

Термины, буквенные обозначения и определения основных величин.

Москва, ИПК Издательство стандартов, 2001.

2. А.Г. Чертов.

Физические величины.

(Терминология, определения, обозначения, размерности, единицы).

Москва, «Высшая школа», 1990.

4. Клиническая лабораторная аналитика.
Под редакцией В.В. Меньшикова.
Москва, «Агат-Мед», 2002.
5. Артюхов В.Г., Путинцева О.В.
Оптические методы анализа интактных и модифицированных биологических систем.
Воронежский государственный медицинский университет, 1996.
6. Долгов В.В., Щетникович К.А., Лукичева Т.И., Прудник И.М.
Методические аспекты определения индивидуальных белков.
Учебно-методическое пособие. Labsystems, 2000
7. Ованесов Е.Н.
Как обеспечить требуемую точность определения гемоглобина крови.
Лаборатория. №1, с. 7-10, 2002.
8. Lewandrowski K.
Clinical Chemistry. Laboratory Management & Clinical Correlation.
Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia. 2002.
9. Tietz textbook of clinical chemistry. 2nd ed.
Tietz N.W., Burtis C.A., Ashwood E.R.
Philadelphia, W.A. Saunders Company, 1994.
10. O. Suovaniemi.
Automated instrumentation for clinical and research laboratories.
Helsinki, University of Helsinki and Biohit Oy, 1994.
11. Anemia Detection Methods in Low-Resours Settings: A Manual Fof Health Workers.
U.S. Agency for International Development USAID
December 1997.
12. Д.И. Рощупкин, В.Г. Артюхов.
Основы фотобиофизики.
Воронеж, ВГУ, 1997.
13. И.Я. Берштейн, Ю.Л. Каминский.
Спектрофотометический анализ в органической химии.
Ленинград, «Химия», Ленинградское отделение, 1986.
14. З. Марченко.
Фотометрическое определение элементов.
Москва, «Мир», 1971.
15. Й. Тодоров.
Клинические лабораторные исследования в педиатрии.
София, «Медицина и физкультура», 1966.
16. Ю.С. Ляликов.
Физико-химические методы анализа.
Москва, «Химия», 1974.
17. У.Ф. Пиккернинг.
Современная аналитическая химия.
Москва, «Химия», 1977.

18. Г. Шарло.

Методы аналитической химии.

Москва, «Химия», 1966.

19. А. Ryer.

Light measurement handbook.

Newburyport, International Light, Inc., 1998

20. Б.М. Щиголев.

Математическая обработка наблюдений.

Москва, «Наука», 1969.