

ПРИМЕНЕНИЕ КОМПЬЮТЕРНЫХ И ИНФОРМАЦИОННЫХ ТЕХНОЛОГИЙ В МЕДИЦИНЕ

УДК 532.08; 533.1/5.08; 615.47:616-074

*А.А. Елисеев, Ю.П. Морозова, В.А. Козинская, Б.В. Королев,
И.В. Кулагина, О.В. Смирнов, В.Н. Черепанов*

КОМПЬЮТЕРНАЯ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЯ В МЕДИЦИНСКОЙ ДИАГНОСТИКЕ

Предложена и реализована компьютерная методика лабораторного спектрофотометрического анализа многокомпонентных смесей на автоматизированном спектрофотометре. Проведены измерения электронных спектров поглощения ряда биологических объектов, имеющих важное диагностическое значение в медицине (фенилтиоцианат, миокард, атеросклеротические бляшки, моча, сыворотка крови). При этом математическое обеспечение ЭВМ включало в себя эффективные методы обработки наблюдаемых спектров: оригинальный метод разложения исследуемого спектра по экспериментальным базовым спектрам компонентов и метод производной спектрофотометрии. Методика эксперимента, ее аппаратная реализация, а также полученные результаты измерений могут найти применение в практической лабораторной медицинской диагностике.

В обширном арсенале современных методов диагностики, основанных на оценке морфологических, функциональных, биохимических и генетических параметров организма, появляются принципиально новые методические подходы в анализе гомеостатических систем. Важное место среди этих методов принадлежит оптической спектроскопии, которая дает информацию о физико-химических свойствах среды, таких как строение молекулы, природа химических связей, межмолекулярные взаимодействия, позволяет определять качественно и количественно состав среды. В связи с этим в современной литературе достаточно активно обсуждаются возможности спектроскопии в диагностике широкого круга заболеваний человека [1–7]. Спектрофотометрические методы имеют большое диагностическое значение при исследовании биологических веществ, таких, например, как кровь (цельная, плазма, сыворотка), моча, мягкие ткани организма, биологически активные вещества (витамины, гормоны, ферменты). В частности, изучение аминокислот в клинической химии играет большую роль для диагноза и наблюдения наследственных болезней, аминокислотного метаболизма и других обменных процессов.

Спектры поглощения многих веществ, как правило, накладываются друг на друга, что создает трудности при их идентификации. Поэтому автоматизация спектрофотометрических измерений должна включать в себя соответствующее программное обеспечение, позволяющее решать задачу разделения полос поглощения с целью проведения дальнейшего количественного анализа. В данной работе при обработке экспериментальных данных, полученных на автоматизированном спектрофотометре СФ-26, использовались для этой цели методы производной спектрофотометрии и метод разложения исследуемого спектра многокомпонентной смеси по базисным спектрам, взятым из предварительно созданного банка экспериментальных спектров компонентов смеси. Полученные результаты не только иллюстрируют возможности компьютерной спектрофотометрии в диагностике биологических объектов, но и представляют самостоятельное значение в количественном анализе состава исследуемых веществ.

§1. Методика эксперимента

В этом параграфе изложены аппаратная реализация экспериментальной установки и методы обработки результатов измерения, используемые в данной работе.

1.1. Автоматизированный спектрофотометр СФ-26

Для автоматического сбора и обработки данных спектрофотометрических измерений на основе лабораторного спектрофотометра СФ-26 и микро-ЭВМ была создана

автоматизированная установка (без каких-либо конструктивных изменений спектрофотометра).

Принципы автоматизации. Задача заключается в том, чтобы, сканируя с определенным шагом оптическую систему (в данном случае призму) спектрофотометра, собрать, обработать и представить в удобной форме информацию об изменении светового потока при данной длине волны, проходящего через исследуемый образец. Для этого был разработан блок сопряжения спектрофотометра с ЭВМ, состоящий из функциональных элементов (аналогоцифрового преобразователя с динамическим диапазоном 10^5 ; устройства управления шаговым двигателем; параллельного интерфейса), и необходимые управляющие программы, позволяющие устанавливать режимы сканирования спектра, проводить накопление и обработку регистрируемых спектров, создавать на диске банк спектров.

Технические характеристики экспериментальной установки:

- спектральный диапазон измерений: 186–1100 нм;
- обратная линейная дисперсия: 1; 7,5; 42,4 нм/мм соответственно при 200, 340, 600 нм;
- динамический диапазон чувствительности по оптической плотности D : $10^{-3} < D < 3$.

Положительные качества установки:

- сокращено время получения спектра;
- данные эксперимента отображаются в графическом виде;
- оперативно применяются различные способы обработки полученных данных;
- увеличена точность регистрации и обработки измерений;
- расширен диапазон измерений оптической плотности.

1.2. Метод математического разложения спектра смеси по спектрам составляющих компонентов с известной концентрацией

Количественный анализ на основе математического разложения может быть полезен в тех случаях, когда наблюдается значительное перекрытие спектров компонентов смеси и в то же время имеется возможность получить их в чистом виде.

Математическое обоснование метода. Пусть имеется k веществ, для которых получены спектры, где каждый спектр представляет собой набор точек (отсчетов оптической плотности) при заданных длинах волн: $D(\lambda_1), D(\lambda_2), \dots, D_n(\lambda_n)$. Рассматривая спектр поглощения смеси этих веществ, предположим, что для смеси выполняется принцип суперпозиции:

$$D(\lambda) = \sum_{n=1}^k C_n D_n(\lambda), \quad (1)$$

где $D(\lambda)$ – спектр поглощения смеси; $D_i(\lambda), C_i$ – спектр поглощения i -й компоненты и ее концентрация. Учитывая, что $D_i(\lambda)$ представляют собой наборы отсчетов на различных длинах волн $\lambda_1, \dots, \lambda_m$, перепишем (1) в виде системы уравнений

$$D(\lambda_m) = \sum_{i=1}^k C_i D_i(\lambda_m), \quad m=1, \dots, n. \quad (2)$$

Система (2) разрешается в случае $k = n$ (n – число отсчетов в каждом спектре). Однако на практике обычно имеем $n \gg k$, т.е. число экспериментальных отсчетов значительно превышает число анализируемых компонентов. Система (2) оказывается переопределенной и требует специальных методов решения.

В этой ситуации можно прибегнуть к формальным методам разложения функций по функциональному базису, полагая, что $D_1(\lambda), \dots, D_k(\lambda)$ – это базисные функции, $D(\lambda)$ – разлагаемая функция, а C_i – коэффициенты разложения. Коэффициенты C_i определяются единственным образом, если базисные функции $D_1(\lambda), \dots, D_k(\lambda)$ являются линейно-независимыми, т.е. невозможно получить базисный спектр $D_i(\lambda)$ из $D_j(\lambda)$ при $i \neq j$ никакой линейной операцией. На практике это условие выполняется всегда.

Для построения системы уравнений с учетом переопределенности домножим (2) почленно на $D_1(\lambda)$ и просуммируем по всем строкам. Затем повторим эту процедуру для $D_2(\lambda), \dots, D_k(\lambda)$. В итоге получим систему уравнений с симметричной относительно главной диагонали матрицей, которая легко может быть решена относительно C_i :

$$\sum_{\lambda} D_j(\lambda) D(\lambda) = \sum_i C_i \sum_{\lambda} D_j(\lambda) D_i(\lambda), \quad (3)$$

$$\lambda = \lambda_1, \dots, \lambda_n; \quad j=1, \dots, k.$$

Разложение можно считать успешным, если относительная погрешность восстановления спектра $\delta < 3\%$.

Анализ ошибок и ограничений метода. Применимость метода разложения по базисным функциям определяется выполнимостью условия (1), т.е. принципа суперпозиции (аддитивности). Для рассматриваемой задачи это означает, что отсутствуют нелинейные концентрационные эффекты; отсутствует межмолекулярное взаимодействие, способное деформировать профиль спектра поглощения хотя бы одной компоненты смеси; недопустимо в смеси наличие $(k+1)$ -й компоненты (например, неизвестной примеси), спектр которой не представлен в базисе D_1, \dots, D_k . Математически это ограничение обусловлено неортогональностью базисных спектров. Это не означает, что количество эталонных спектров n_s должно быть равно количеству компонентов смеси n_c . Это условие можно сформулировать как $n_s \geq n_c$, причем если $n_s > n_c$, то кон-

центрация базисных спектров, не представленных в смеси, будет близка к нулю.

Отметим возможность использования метода для обнаружения межмолекулярного взаимодействия при сильном перекрытии спектров, когда другие методы не позволяют обнаружить деформацию контуров. Детектором наличия такого взаимодействия может служить большая ошибка δ или несоответствие концентраций фактически приготовленным.

1.3. Производная спектрофотометрия

Количественный анализ по спектрам поглощения основан на законе Бугера-Ламберта-Бееера, отражающем линейную зависимость оптической плотности D и ее производных от концентрации раствора C и толщины поглощающего слоя d [8]:

$$D_\lambda = \epsilon_\lambda C d, \quad \frac{d^n D_\lambda}{d\lambda^n} = \frac{d^n \epsilon_\lambda}{d\lambda^n} C d, \quad (4)$$

где ϵ_λ – молярный показатель поглощения анализируемого вещества при аналитической длине волны λ .

Основным положительным эффектом дифференцирования спектров является увеличение разрешения перекрывающихся в исходных спектрах полос. Наиболее общим и легко реализуемым из всех методов получения производных спектров является метод численного дифференцирования. Все методы численного дифференцирования можно разделить на две группы: метод разностей и методы, предполагающие предварительное описание экспериментальных данных с помощью выбранной математической функции с последующим аналитическим дифференцированием этой функции.

При рассмотрении производных функции можно сделать следующие выводы [8]:

- с ростом порядка дифференцирования производные спектры усложняются и ширина основных пиков в четных производных прогрессивно уменьшается;
- в нечетных производных абсциссе λ_0 (центр полосы) соответствует нулевое значение производных;
- в четных производных абсциссе λ_0 соответствует отрицательный (во второй, шестой, ...) или положительный (в четвертой, восьмой, ...) экстремумы;
- на каждой ступени дифференцирования точки перегиба в исходном спектре превращаются в экстремумы, а экстремумы – в точки пересечения следующей производной с осью абсцисс.

Уменьшение полуширины основных пиков в четных производных улучшает разрешение полос, перекрывающихся в исходных спектрах. При этом полосы большой ширины (независимо от интенсивности), ниспадающие или восходящие ветви пологих пиков, рассеянный свет, постоянное фоновое поглощение и тому подобное при дифференцировании подавляются, что обеспечивает уменьшение систематических ошибок количественного анализа. Для уменьшения отношения сигнал/шум численное дифференцирование включает в себя многократное сглаживание исходных данных.

Производная спектрофотометрия используется в научном эксперименте в физической, органической и аналитической химии, биохимии и биофизике, фармацевтическом анализе, криминалистической эксперти-

зе, анализе пищевых продуктов и полимеров, при контроле чистоты атмосферного воздуха и сточных вод.

§2. Применение спектрофотометрии

2.1. Анализ электронного спектра поглощения фенилтиоцианата

В работе изучены электронные спектры поглощения фенилтиоцианата (ФИТЦа), который широко используется в клинической химии для определения аминокислот; рассмотрено взаимодействие ФИТЦа с аминокислотами (триптофан, тирозин). Проведен квантово-механический расчет молекулы ФИТЦа методом ЧПДП со спектроскопической параметризацией [9].

В табл. 1 приведены расчетные и полученные экспериментальные данные для длин волн переходов $S_0 - S_i$

($i=1-5$), силы осциллятора для каждого перехода и дипольные моменты.

Дипольный момент основного состояния – 2,20 D. По данным табл. 1 видно, что переход $S_0 \rightarrow S_1$ является запрещенным, а остальные переходы – разрешенные. Также были получены спектры поглощения триптофана и тирозина, причем все три наблюдаемые полосы поглощения соответствуют $\pi \rightarrow \pi^*$ переходам.

Анализ полученных спектров поглощения с учетом изменения концентраций ФИТЦа, тирозина и триптофана показал, что при взаимодействии аминокислот с ФИТЦем явно проявляется структура спектра поглощения ФИТЦа с некоторыми дополнительными пиками и перегибами, соответствующими тирозину или триптофану с резким возрастанием интенсивности. ФИТЦ предоставлен НИИ медицинской генетики РАМН.

Таблица 1

Характеристика электронных переходов и состояний ФИТЦа в этаноле и ацетонитриле

Переход	$\lambda_{\text{теор.}}$, нм	$\lambda_{\text{эсп.}}$, нм		Сила осциллятора	Дипольный момент, D
		Этанол	Ацетонитрил		
$S_0 \rightarrow S_1$	335	–	312	0,0061	7,71
$S_0 \rightarrow S_2$	283	278	278	0,1611	3,45
$S_0 \rightarrow S_3$	277	266	264	0,1872	3,40
$S_0 \rightarrow S_4$	239	253	251	0,0469	3,05
$S_0 \rightarrow S_5$	228	226	–	0,2503	2,17

2.2. Количественный анализ нитросоединений

Работоспособность метода разложения по базисным спектрам была проверена на двухкомпонентных смесях (паранитроанилин и 2,4-динитроанилин в водном растворе) и четырехкомпонентных смесях (ортонитрофенол, метанитроанилин, паранитроанилин, 2,4-динитроанилин). При этом восстановленные спектры отличались по концентрации от заданного состава менее чем на 3%. Отметим, что графическое представление результатов анализа на экране облегчает выбор рабочего диапазона длин волн. Эта методика представляет интерес для анализа лекарственных аппаратов, например сульфатазиола и сульфаниламида, смесей хлорофиллов [1].

2.3. Спектральный анализ мягких тканей

Условия эксперимента: спектральный диапазон 200–600 нм, шаг сканирования по длине волны 2 нм, щель спектрофотометра 0,4 мм, толщина образцов 20 мкм, температура комнатная.

Атеросклеротические бляшки. Спектры нормальной ткани и бляшек (образцы предоставлены Сибирским медицинским университетом) приведены на рис. 1. Отчетливо наблюдается различие нормальной и аномальной тканей: заметно относительное возрастание поглощения в области 284 нм.

Миокард, проводящая система миокарда. Характерные спектры поглощения этих биологических объектов (исследуемый материал предоставлен НИИ кар-

диологии РАМН) приведены на рис. 2. Наблюдается относительно меньшее поглощение в тканях миокарда

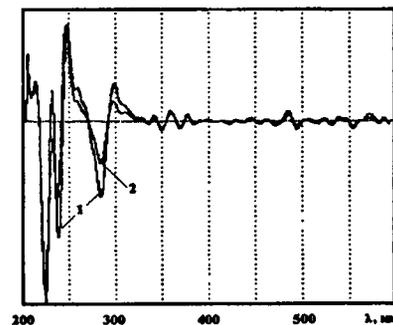
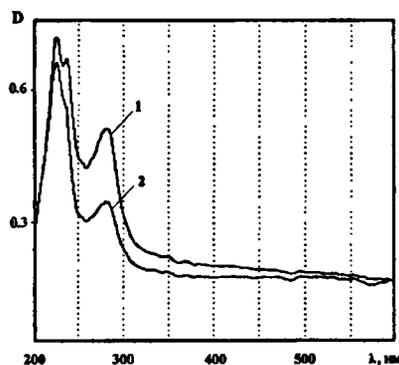


Рис. 1. Оптическая плотность (вверху) и ее вторая производная (в относительных единицах) нормальной ткани (1) и атеросклеротической бляшки (2)

по сравнению с проводящей системой в области 222 нм, что свидетельствует о различном содержании алифатических аминокислот в белках этих тканей.

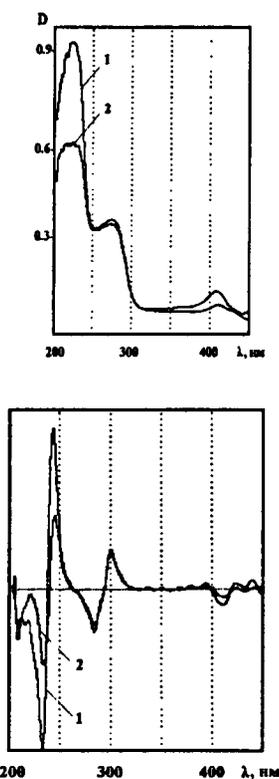


Рис. 2. Оптическая плотность (вверху) миокарда (2), его проводящей системы (1) и ее вторая производная (в относительных единицах)

2.4. Спектрофотометрия в лабораторной медицинской диагностике

Моча. Электронный спектр поглощения мочи здорового человека имеет относительно гладкую структуру, полоса поглощения широкая ($\lambda \approx 200-550$ нм) с максимумом на $\lambda \approx 360$ нм. Повышенное содержание белка в моче приводит к смещению максимума поглощения в коротковолновую область. Следует отметить, что на практике для целей диагностики иногда легче проводить люминесцентное обнаружение продуктов жизнедеятельности организма, например порфиринов в мо-

че [6]. Так, на ранней стадии отравления свинцом содержание порфиринов в моче возрастает в 2–10 раз. Это возрастание обнаруживают по изменению цвета флуоресценции (в норме – голубовато-зеленый цвет, при отравлении – от розового до красного). Повышенное содержание порфиринов в моче может быть и при некоторых заболеваниях печени, лимфогранулематозе. Содержание порфиринов в моче может и падать по сравнению с нормой в 4–10 раз при азотемии (накопление в крови избыточного количества продуктов белкового обмена при урологических заболеваниях).

Сыворотка крови. Проведенные измерения спектров поглощения сыворотки крови в области 340–730 нм при определенных патологических состояниях детей показали незначительные смещения центров полос поглощения (табл. 2) и в то же время сильное изменение относительных и абсолютных величин поглощения, особенно в области 418 и 466 нм. Изменение поглощения связано с концентрационным изменением состава крови. Например, известно, что наблюдающееся повышение поглощения сыворотки крови больного гепатитом на $\lambda = 466$ нм обусловлено повышенным содержанием билирубина в крови. Из табл. 2 видно также, что в зависимости от заболевания появляются или исчезают в спектре поглощения некоторые линии, что свидетельствует также об изменении концентрации компонентов крови.

Таблица 2

Центры линий поглощения сыворотки детской крови при некоторых заболеваниях

Образец	Максимумы поглощения, нм					
	344	356	422	464	492	—
Норма	344	356	422	464	—	492
Анемия	—	352	418	464	—	490
Кожный зуд	—	356	418	464	—	490
Аллергический миокардит	—	350	422	466	—	492
Гепатит	—	352	416	466	478	488
Гастродуоденит	346	352	418	466	478	490
Сердечно-сосудистое заболевание	344	358	418	468	478	492
Лимфаденит	—	350	418	466	—	490

* Ошибка измерения длины волны $\approx \pm 2$ нм.

ЛИТЕРАТУРА

1. Штерн Э., Тиммонс К. Электронная абсорбционная спектроскопия в органической химии. М.: Мир, 1974. С. 291.
2. Чевари С., Чаба И. Спектрофотометрический метод определения гемоглобина в крови // Лабораторное дело. 1983. № 8. С. 457–460.
3. Чевари С., Андл Т. Определение железа в сыворотке и его диагностическое значение // Лабораторное дело. 1987. № 4. С. 252–255.
4. Спектроскопические методы исследования в физиологии и биохимии. Л.: Наука, 1987. С. 204.
5. Приезжев А.В., Тучин В.В., Шубочкин Л.П. Лазерная диагностика в биологии и медицине. М.: Наука, 1989. С. 237.
6. Барашков Н.Н. Люминесцентный анализ на службе здоровья. М.: Наука, 1985. С. 95.
7. Sherwood R.A., Titheradge A.C., Richards D.A. Measurement of plasma and urine amino acids by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection using phenylisothiocyanate derivatization // J. of Chromatography. 1990. V. 528. P. 293–303.
8. Новые физико-химические методы исследования органических соединений: Уч. пособие / Б.В. Иоффе, И.Г. Зенкевич, М.А. Кузнецов, И.Я. Бернштейн. Л.: ЛГУ, 1984. С. 240.
9. Артюхов В.Я., Галева А.И. Спектроскопическая параметризация методом ЧПДП // Изв. вузов. Физика. 1986. №11. С. 96–100.

Статья представлена кафедрой оптики и спектроскопии физического факультета Томского государственного университета и лабораторным отделом областного организационно-методического и контрольного центра по лабораторному делу, поступила в научную редакцию «Кибернетика и информатика» 15 декабря 1999 г.