

文章编号: 0258-7025(2002)05-0450-05

一种简单的测量生物组织折射率的方法

程树英^{1,2}, 沈鸿元^{1*}, 张 戈¹, 黄祥金¹, 黄呈辉¹, 林文雄¹, 黄见洪¹

(¹ 中国科学院福建物质结构研究所, 福建福州 350002; ² 福州大学电子系, 福建福州 350002)

提要 提出一种利用全反射原理, 精确测量生物组织以及一般均匀介质折射率的方法。用波长分别为 0.488 μm , 0.6328 μm , 1.0795 μm 和 1.3414 μm 的激光, 测量了水以及几种猪组织的折射率, 并拟合出它们的色散方程。结果证明该方法具有可靠和简单易行等特点。

关键词 生物组织, 折射率, 全反射, 色散方程

中图分类号 Q 631 **文献标识码** A

A Simple Measurement Method of the Refractive Index of Biotissue

CHENG Shu-ying^{1,2}, SHEN Hong-yuan¹, ZHANG Ge¹, HUANG Xiang-jin¹,
HUANG Cheng-hui¹, LIN Wen-xiong¹, HUANG Jian-hong¹

¹*Fujian Institute of Research on the Structure of Matter, The Chinese Academy of Sciences, Fuzhou 350002*
²*Electronics Department of Fuzhou University, Fuzhou 350002*

Abstract A simple method based on total internal reflection is presented for accurately measuring the refractive index of biological tissue. The refractive indices of water and a few kinds of porcine tissues have been determined at 0.488 μm , 0.6328 μm , 1.0795 μm and 1.3414 μm laser wavelength respectively, and their dispersion equations have been calculated. It proves that the method has great reliability and accuracy.

Key words biological tissue, refractive index, total internal reflection, dispersion equation

1 引言

随着激光生物医学和组织光学的发展, 人们已把生物组织的光学折射率作为独立于生物组织的吸收系数 μ_a , 散射系数 μ_s 和散射相函数 $S(\theta)$ 之外的第四个光学性质参数^[1,2]。由于大多数生物组织对可见和近红外光呈现出不透明、混合和散射的特点, 传统的利用折射定律测量透明固体和液体折射率的方法遇到了很大的困难。生物组织的折射率测量一般都是基于全反射的原理^[3,4], 因为在全反射发生的条件下, 入射光波在组织内的散射可以忽略, 这已为实验所证实。为此, 本文也利用全反射原理, 设计了一种简单的测量生物组织折射率的方法。

2 测量方法和装置

本方法是运用折射定律的特殊形式——全反射原理, 将生物组织、血液等被测材料固定在两块完全相同的三面抛光的 ZF5 玻璃直角棱镜之间, 确保被测材料表面与棱镜面紧密接触, 两者之间无空气间隙, 如图 1 所示。所用测量光源是 0.488 μm Ar⁺ 激光, 0.6328 μm He-Ne 激光和 1.0795 μm , 1.3414 μm Nd:YAP TEM₀₀ 模连续激光, 测量激光束经焦距为 80 cm 的透镜, 聚焦在 32 J 测角仪(精度为 0.5") 平行光管入射刀口上, 夹紧被测材料的两块 ZF5 直角棱镜放在测角仪旋转平台的中央。从测角仪的平行光管出射的 S 偏振准直宽光束(光斑直径约为 3 mm) 以入射角 i 入射到第一块棱镜的 AB 面,

收稿日期: 2001-04-12; 收到修改稿日期: 2001-07-20

作者简介: 程树英(1966.8—), 女, 福建武夷山人, 福州大学电子科学与应用物理系副教授, 博士, 目前从事光电子技术、组织光学等方面的研究。E-mail: sycheng@pub3.fz.fj.cn

* 通信联系人。

经过 AB 面以折射角 i_1 折射后,以入射角 i_0 入射到棱镜和生物组织的界面 BC 面上,反射光从 AC 面出射,透射光从第二块棱镜的 $A'B'$ 面出射。当入射到 BC 面的入射角 i_0 达到临界反射角 i_c 时,相应的入射角 i 就是会在 BC 界面发生临界反射的入射角。图 1 中,入射光经过 AB 界面, BC 界面和 AC 界面后,由于菲涅耳反射,各界面间存在反射损耗。对于 S 偏振光, AB 界面的反射率为

$$R_{s1} = \left[-\frac{\sin(i - i_1)}{\sin(i + i_1)} \right]^2 \quad (1)$$

同样 BC 界面和 AC 界面的反射率可分别写为 R_{s2} 和 R_{s3} ,则入射光从 AC 界面透出的总反射率 R_T 为

$$R_T = (1 - R_{s1})R_{s2}(1 - R_{s3}) \quad (2)$$

将 R_{s1} , R_{s2} 和 R_{s3} 的具体表达式代入(2)式,可计算得到 R_T 和 i 的关系曲线为图 2 所示。

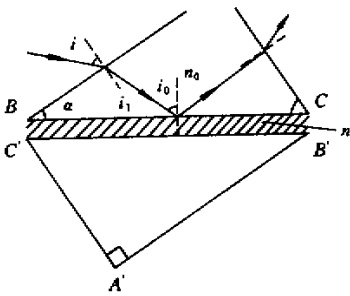


图 1 测生物组织折射率的示意图

Fig. 1 Equipment of measuring refractive indices of the biotissue

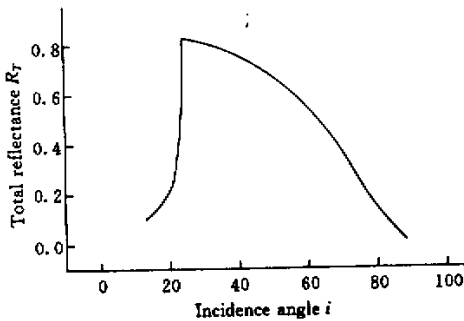


图 2 AC 面出射的总反射率 R_T 与入射角 i 的关系曲线

Fig. 2 Curve between total reflectance R_T from AC interface and incidence angle i

光在 BC 界面发生临界全反射的位置。由图 2 可见,由于各界面存在反射损耗,当发生临界反射时,从 AB 面入射的光仅有 70% 到 80% 从 AC 面透出,并且当入射角 i 继续增大时, R_T 又逐渐减小。这与单界面的菲涅耳反射率曲线不同,单界面的反射率曲线是:达到全反射后, R 一直为 1。

由光的电磁理论知道,发生全发射时,入射光波渗透到透射方介质的有效深度仅有几个波长的数量级。换言之,入射光波只和分界面附近若干个波长厚度的透射方介质发生相互作用。而描写光与生物组织发生散射或吸收的相互作用长度 MFP (Mean Free Path, 平均自由程) 有 50~200 μm 左右^[5],远大于可见光波长。据此文献^[4]得出一个结论:透射方为生物组织时,在全反射发生的条件下,入射光波在组织内的散射是可以忽略的。这也可以理解为生物组织在可见光波长尺度内是光学均匀的。这就是说,当入射角大于临界角 i_c 时,入射光与透射方的生物组织尚未发生散射相互作用就反射了,生物组织表现就象普通的反射镜一样将所有的入射光反射出去。当入射角小于临界角 i_c 时,存在较强烈的散射现象。这个解释也被我们的实验所证实。

因此测量折射率时,从小到大改变入射角 i ,同时观察 AC 面透出的反射光 (R_T) 和 $A'B'$ 面出射的透射光(由于生物组织有一定的厚度, $A'B'$ 面出射的透射光实际上基本是散射光),可观察到当入射角 i 增大到某一角度时,透射的散射光由强变弱、逐渐消失;反射光由弱变强、到刚好最强即峰值,此峰值可由光电探测器来判断。当入射到 BC 面的入射角 i_0 达到临界反射角 i_c 时,相应的入射角 i 就是会在 BC 界面发生临界反射的入射角,由折射定律和三角形的角度关系,可得以下几式

$$\sin i = n_0 \times \sin i_1 \quad (3)$$

$$n = n_0 \times \sin i_c \quad (4)$$

$$i_c = i_1 + \alpha \quad (5)$$

由(3)~(5)三式可得

$$n = \sin i \times \cos \alpha + \sin \alpha \times \sqrt{n_0^2 - \sin^2 i} \quad (6)$$

n_0 为 ZF5 玻璃棱镜的折射率, α 为棱镜的顶角, n_0 和 α 用自准直法^[6] 精确测出, i 为会在 BC 界面发生临界反射的入射角,由精度为 0.5" 的测角仪测出。已知 n_0 和 α , 测出入射角 i , 就可测出被测材料的折射率 n 。

在不同波长下,由自准直法精确测出的 ZF5 玻璃的折射率见表 1。

图 2 中 R_T 的峰值所对应的入射角 i 的位置就是入射

表 1 四个波长处 ZF5 玻璃的折射率

Table 1 Refractive indices of ZF5 glass at four wavelengths

Wavelength / μm	n
0.488	1.75808
0.6328	1.73455
1.0795	1.71289
1.3414	1.70827

表 2 顶角 α 不同时,该系统可测的折射率 n 的范围Table 2 Range of the measurable refractive indices n at different angle α

$\alpha /(^{\circ})$	The range of refractive indices n			
	$\lambda = 0.488 \mu\text{m}$	$\lambda = 0.6328 \mu\text{m}$	$\lambda = 1.0795 \mu\text{m}$	$\lambda = 1.3414 \mu\text{m}$
25	0.7430~1.5174	0.7330~1.5052	0.7239~1.4940	0.7219~1.4916
30	0.8790~1.5890	0.8672~1.5746	0.8564~1.5613	0.8541~1.5585
35	1.0083~1.6485	0.9949~1.6320	0.9824~1.6168	0.9798~1.6135
40	1.1301~1.6955	1.1149~1.6770	1.1010~1.6599	1.0980~1.6563
45	1.2431~1.7295	1.2265~1.7092	1.2112~1.6904	1.2079~1.6864
50	1.3467~1.7504	1.3287~1.7284	1.3121~1.7081	1.3086~1.7037
55	1.4401~1.7580	1.4208~1.73454	1.4031~1.7127	1.3993~1.7080

3 测量结果和分析

为了验证本测量方法的可靠性,首先对折射率已知的透明介质水的折射率进行测量,然后测量一些生物组织如猪脂肪、猪肌肉和小肠的折射率,结果如下。

3.1 蒸馏水折射率的测量

分别在 $0.488 \mu\text{m}$, $0.6328 \mu\text{m}$, $1.0795 \mu\text{m}$ 和 $1.3414 \mu\text{m}$ 四个波长处测量蒸馏水的折射率,结果见表 3。由表 3 中四个波长处折射率的测量结果拟合出 Sellmeier's 方程的色散系数,得到蒸馏水的色散方程为

$$n^2 = 1.755695 + \frac{0.009626}{\lambda^2 + 0.04757} - 0.007848\lambda^2 \quad (7)$$

由色散方程(7),就可求出不同波长所对应的蒸馏水的折射率。

表 3 测得的四个波长处的蒸馏水的折射率

Table 3 Measured refractive indices of distilled water at four wavelengths

Wavelength / μm	n
0.488	1.33698
0.6328	1.33193
1.0795	1.32457
1.3414	1.32166

三棱镜的顶角 α 设计成不同的角度时,该系统可测的折射率的范围也不同。表 2 给出顶角 α 分别取 25° , 30° , 35° , 40° , 45° , 50° , 55° 时,可测的折射率的范围。

由于生物组织的折射率在 1.35 到 1.55 之间,顶角 α 可在 30° 到 45° 之间选择。本测量装置将顶角 α 设计为 45° 。

由色散方程(7),分别求出波长为 0.45 , 0.625 , 0.65 , 1.0 , 1.2 , $1.4 \mu\text{m}$ 所对应的蒸馏水的折射率 n_{cal} 。并与文献[7]中的数据 n_{data} 比较,结果见表 4。

表 4 不同波长下色散方程算出的 n_{cal} 值和文献[7]中的 n_{data} 值的比较结果Table 4 Comparison between the value n_{cal} calculated from dispersion equation and the value n_{data} in the Ref. [7] at different wavelength

Wavelength/ μm	n_{cal}	n_{data}	$n_{\text{cal}} - n_{\text{data}}$
0.45	1.33888	1.337	1.88×10^{-3}
0.625	1.33214	1.332	1.4×10^{-4}
0.65	1.33149	1.331	4.9×10^{-4}
1.0	1.32553	1.327	-1.47×10^{-3}
1.2	1.32320	1.324	-8×10^{-4}
1.4	1.32103	1.321	3×10^{-5}

由表 4 可见,由色散方程算出的蒸馏水的折射率 n_{cal} 与文献[7]中的数据 n_{data} 的绝对误差在 10^{-5} ~ 10^{-3} 之间,精确度比较高。因为本测量方法本质上是角度的测量,而所用的测角仪是高精确度的 32 J 测角仪($0.5''$),因此测得的角度是非常准确的,因而测量误差是非常小的。

3.2 一些生物组织折射率的测量

分别用波长为 0.488 , 0.6328 , 1.0795 和 $1.3414 \mu\text{m}$ 的弱激光对一些新鲜离体生物组织例如

猪的肌肉、脂肪以及小肠的折射率在室温下进行测量,组织样品没有经过人为的增加或减小水分的处理,目的是使生物组织的各组分(包括其液体)保持其自然状态,以便保证测量结果是真实的,结果见表5。表5中折射率 n 为对样品测量十次平均的结果, Δn 为其标准偏差。猪肌肉^a和猪肌肉^b分别代表猪肌肉纤维与界面平行和垂直情况。在四个波长处猪组织的折射率的标准偏差都在0.0015和0.0030之间,相对误差只在0.3%以内。这误差对于生物组织来说是比较小的。在0.6328 μm 处,用此方法测得的猪肌肉^a和猪脂肪的折射率与文献[4]中的数据 1.380 ± 0.007 和 1.493 ± 0.005 一致并且误差更小,但猪肌肉^b的折射率与文献[4]中的数据 1.460 ± 0.008 不一致。本方法测得的猪肌肉^a和猪肌肉^b

的折射率数据基本上是一样的,但文献[4]中两者的数据差别很大。作者认为其中的差异可能是由于样品和样品间的差异、不同的组织类型以及测量方法差异而引起的。本方法是采用宽光束准直光(光斑直径约为3 mm)测量的,而文献[4]中是采用压缩光束(光束直径为0.1 mm)测量的。这两种方法光束与样品的接触面积不同,宽光束测得的折射率相当于小面积样品折射率的平均值;而压缩光束测得的折射率相当于样品上每一点的折射率,其所测得的折射率值因受样品不均匀性影响可能有一定的随机性。另外,根据Bolin的观点整块组织样品与“均匀化”即“搅碎捣烂”的样品的折射率在统计意义上没有差别,那么组织的切割方向对组织的折射率应无影响。

表5 四个波长处测得的猪组织的折射率

Table 5 Measured refractive indices of the porcine tissues at four wavelengths

Wavelength/ μm	Porcine muscle ^a	Porcine muscle ^b	Porcine adipose	Porcine small intestine
0.488	1.4016 ± 0.0023	1.3988 ± 0.0015	1.5096 ± 0.0016	1.3909 ± 0.0018
0.6328	1.3812 ± 0.0019	1.3794 ± 0.0019	1.4919 ± 0.0017	1.3731 ± 0.0021
1.0795	1.3721 ± 0.0025	1.3697 ± 0.0022	1.4820 ± 0.0023	1.3605 ± 0.0030
1.3414	1.3703 ± 0.0022	1.3671 ± 0.0020	1.4779 ± 0.0018	1.3589 ± 0.0019

从四个波长处测定的猪组织的折射率可看出,四种猪组织的折射率满足正常色散关系。由表5中三个波长(0.488 μm , 0.6328 μm 和1.3414 μm)处四种猪组织折射率的测量结果,分别拟合出它们的科西方程的色散系数,得到它们的色散方程分别为:

猪肌肉^a

$$n = 1.3696 + \frac{0.000274}{\lambda^2} + \frac{0.001749}{\lambda^4} \quad (8)$$

猪肌肉^b

$$n = 1.3655 + \frac{0.002092}{\lambda^2} + \frac{0.00139}{\lambda^4} \quad (9)$$

猪脂肪

$$n = 1.4751 + \frac{0.004538}{\lambda^2} + \frac{0.000875}{\lambda^4} \quad (10)$$

猪小肠

$$n = 1.3560 + \frac{0.004678}{\lambda^2} + \frac{0.000863}{\lambda^4} \quad (11)$$

利用这几个色散方程,在波长1.0795 μm 处,计算出猪肌肉^a、猪肌肉^b、猪脂肪和猪小肠的折射率分别为1.3711, 1.3683, 1.4796和1.3607。与表5中的测量平均值相比较,这四种猪组织的拟合折射率的绝对误差分别为-0.001, -0.0014, -0.0024,

0.0002。因此按科西公式拟合出的色散方程是正确的。有了色散方程,这几种猪组织在0.488~1.3414 μm 波段内任意波长处的折射率就可求出。

3.4 测量中应注意的几个问题

1) 生物组织样品必须是新鲜的,同一样品在几种波长下的测量必须保证其液体无渗漏并尽可能在几个小时内完成。

2) 生物组织样品两面必须与玻璃棱镜紧密接触,样品和棱镜界面间不允许有气泡出现。

3) 棱镜装置必须放置在测角仪旋转台的中央,并且从平行光管出来的宽光束准直光也必须正好打在旋转台的中心,这样才能保证所测得的角度是精确的。

4 结 语

通过利用全反射原理和本实验装置,在0.488, 0.6328, 1.0795和1.3414 μm 四个波长处,对水和猪组织的折射率进行测量并拟合出它们的色散方程,结果证明该方法具有可靠和简单易行等特点。它可用于测量所有离体动物组织以及血液的折射率,

获得在 $0.488\sim 1.3414\ \mu\text{m}$ 波段内任意波长处的折射率,为组织光学提供“治疗窗口”(0.6 μm 到 1.3 μm)的折射率数据。

参 考 文 献

- 1 V. V. Tuchin, I. L. Maksimova, D. A. Zimnyakow *et al.*. Light propagation in tissues with controlled optical properties [J]. *Journal of Biomedical Optics*, 1997, **2**(4):401~417
- 2 Li Hui, Xie Shusen, Lu Zukang. Refractive index in biological tissue optics [J]. *Laser and Infrared* (激光与红外), 1999, **29**(1):51~55
- 3 F. P. Bolin, L. E. Preuss, R. C. Taylor *et al.*. Refractive index of some mammalian tissues using a fiber optic cladding method [J]. *Appl. Opt.*, 1996, **28**(12):2297~2303
- 4 Hui Li, Shusen Xie. Measurement method of the refractive index of biotissue by total internal reflection [J]. *Appl. Opt.*, 1996, **35**(10):1793~1795
- 5 Brian C. Wilson, Steven L. Jacques. Optical reflectance and transmittance of tissues; Principles and applications [J]. *IEEE J. Quantum Electron.*, 1990, **26**(12):2186~2197
- 6 Shen H. Y., Xu H., Zeng Z. D. *et al.*. Measurement of refractive indices and thermal refractive index coefficients of LiNbO_3 crystal doped with 5 mol.-% MgO [J]. *Appl. Opt.*, 1992, **31**(31):6695~6697
- 7 George M. Hale, Marvin R. Querry. Optical constants of water in the 200-nm to 200- μm wavelength region [J]. *Appl. Opt.*, 1973, **12**(3):555~563

敬 告 作 者

根据“中国学术期刊(光盘版)”和“美国工程信息公司(EI)数据库”的要求,本刊从 2002 年第一期起对刊登的论文增加下列内容:

1. 论文第一作者简介(30~50 字)。可按以下顺序列出:姓名(出生年月),性别,民族(汉族可省略),籍贯,职称,学位,研究方向。在简介前加“作者简介:”作为标识。

2. 电子信箱

3. 文章参考文献类型标识:[M]—专著(书);[C]—论文集;[J]—期刊文章;[D]—学位论文;[R]—报告;[S]—标准;[P]—专利,并置于论文题目后。[参考文献的题目、作者(3 位以上写满 3 位)、年、卷、期、起止页码均须给全并准确]

4. 为便于联系和审稿,英文版稿件请附中文摘要。

希作者在投稿时提供以上信息,谢谢合作。

《中国激光》编辑部

二〇〇二年五月