

共振拉曼光谱在体测量类胡萝卜素含量

邵永红¹, 何永红¹, 马辉^{1*}, 南楠², 钱龙生², 王淑霞¹

1. 清华大学深圳研究生院光学成像与传感实验室, 广东 深圳 518055

2. 中国科学院长春光学精密机械与物理研究所, 吉林 长春 130033

摘要 类胡萝卜素是人体内重要的抗氧化剂, 能够消除体内的自由基和其它有害氧分。研究表明类胡萝卜素含量与癌症、心血管疾病、老化等疾病发病率呈反比关系。目前检测方法为采用血清液相色谱检测方法, 不能做到在体无损伤、实时测量。文章介绍了一种用于测量类胡萝卜素的新技术——共振拉曼光谱技术, 具有在体无损伤、灵敏度高和实时检测等特点。该技术利用强度远小于美国 ANSI Z136.1-2000 标准的 473 nm 激光激发拇指中类胡萝卜素, 产生强荧光和叠加在其上的弱共振拉曼光, 通过测量拉曼散射光强度在体评估类胡萝卜素的含量。同时, 利用组织通透技术, 改善了测量信噪比。测量了不同饮食习惯志愿者的类胡萝卜素含量, 说明其含量与其摄入量成正比。该技术在临床应用和科学研究等领域具有重要意义。

关键词 拉曼光谱; 激光; 类胡萝卜素

中图分类号: O433.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-0593(2007)11-2258-04

引言

类胡萝卜素是一种抗氧化剂, 是人体内重要的抗氧化物质^[1-4]。通常的类胡萝卜素检测方法为液相色谱法。这种化学方法测量血清中类胡萝卜素含量能给出好的结果, 可惜是有损的检测方法。拉曼光谱^[5-7]具有分子级识别能力, 灵敏度高, 易于定量测量, 已经用于研究各种人体组织、细胞以及其他碳水化合物等^[8-11]。

由于类胡萝卜素的吸收光谱位于蓝绿光波段^[12], 中心波长为 440 nm, 吸收峰在 450 nm 附近, 其谱宽约为 100 nm, 因此利用 473 nm 激光激发类胡萝卜素能够产生共振拉曼散射。

本工作发展了一种新的光学检测方法, 即采用全固态 473 nm 蓝光低噪声激光器激发拇指中类胡萝卜素, 产生共振拉曼光谱, 通过测量共振拉曼光谱参数实现人体内类胡萝卜素的在体无损伤检测。利用组织通透技术, 采用人体无损伤的小分子匹配液通透组织减少组织散射, 进行折射率匹配, 改善了测量信噪比。测量了不同饮食习惯志愿者的拇指中类胡萝卜素含量。

1 实验部分

采用后向散射装置测量类胡萝卜素共振拉曼光谱, 如

图 1 所示。用低噪声全固态倍频蓝光激光器^[13]作为激发源, 激光波长 473 nm, 以满足类胡萝卜素拉曼共振条件, 对应 C=C 产生的共振拉曼光谱为 509.8 nm。激光功率为 20 mW。传导光纤直径为 400 μ m, 照射到样品光斑直径约为 2 mm, 可有效消除皮肤色素分布不均匀对测量结果的影响。照射在皮肤上光强度为 0.64 W \cdot cm⁻², 低于美国 ANSI Z136.1-2000 标准。光谱仪采用海洋公司 OOIB2000 光谱仪, 分辨率为 1 nm。由于拇指的角质层较厚, 且测量起来灵活方便, 所以实验中采用拇指为测量对象。用医用酒精对志愿者

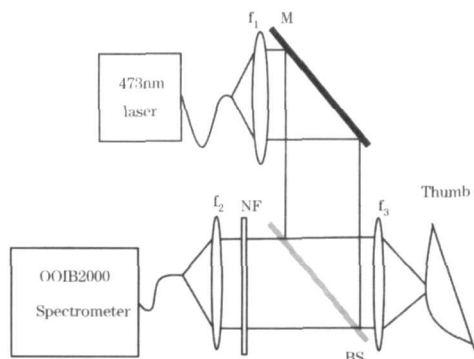


Fig 1 Schematic diagram of measuring resonance Raman spectrum

f_1 : collimating lens; M: mirror; f_2 : coupling lens;

f_3 : objective lens; NF: notch filter; BS: dichroic beamsplitter

收稿日期: 2006-08-06, 修订日期: 2006-11-16

基金项目: 国家自然科学基金项目(60578003)资助

作者简介: 邵永红, 1972年生, 清华大学深圳研究生院博士后 * 通讯联系人 e-mail: mahui@tsinghua.edu.cn

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

的拇指肚进行擦拭, 去除皮肤表面杂物, 将匹配液(光学甘油) 涂于拇指肚上, 以减少散射提高信噪比。然后轻轻按于探测窗上, 蓝激光照射 2 min 后开始采集数据, 采集时间约为 7 s, 测量 4 次, 取平均值以消除抖动噪声。

我们挑选了一批年龄在 25~ 35 岁之间的青年男志愿者作为实验对象, 他们平时饮食习惯不同, 如多食水果者, 多食蔬菜者, 多食肉者和均衡饮食者。按上述方法分别获得了各自的类胡萝卜素共振拉曼光谱。

2 结果与分析

图 2a 为在体检测拇指类胡萝卜素的光谱, 以 473 nm 激光激发后直接由光谱仪检测结果, 体现出类胡萝卜素强的宽荧光光谱特性和叠加在荧光之上的尖锐的拉曼峰, 峰值位置为 509.8 nm, 对应 C=C 产生的共振拉曼光谱。实验中, 采用多项式拟合荧光背景曲线, 并与实测曲线差分, 以扣除荧光背景影响(图 2b)。背景拟合统计均方差与多项式阶数关系如图 3 所示, 实验数据处理时, 拟合阶数选为 5, 形成的拉曼光谱曲线如图 2b。

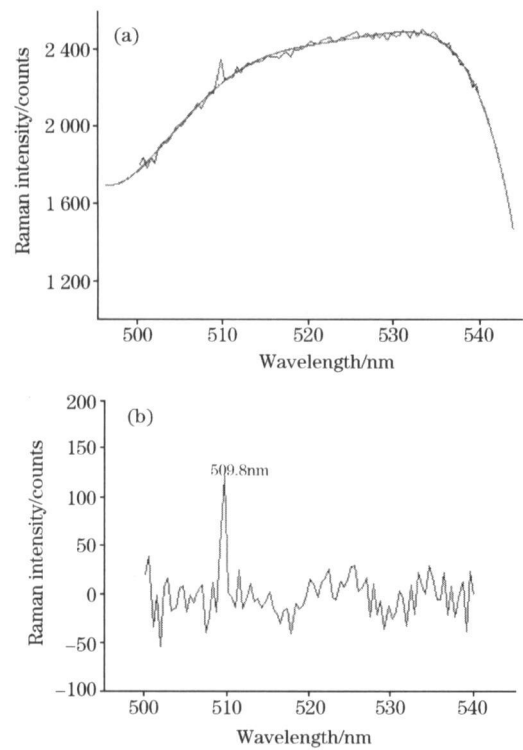


Fig 2 (a) Experimental fluorescence spectra and fitting fluorescence spectra; (b) Difference resonance Raman spectra

由于拉曼光在皮肤表面具有很强的散射系数, 降低了系统对拉曼光信号的收集效率。实验中利用组织通透技术, 在拇指涂上甘油并将盖玻片盖于拇指上, 甘油减小了盖玻片与皮肤间大的折射率变化, 有效地降低了皮肤表面的散射损耗, 提高了系统信噪比。图 4 为增加匹配液前后拇指类胡萝卜素拉曼光谱曲线, 虚线为没有匹配液情况, 拉曼光谱峰值

为 86.1, 实线为折射率匹配后测量结果, 拉曼光谱峰值为 89.2。折射率匹配后, 拉曼光谱峰值增强了 3.1 个强度单位。

下面分析采用折射率匹配对信噪比的影响。定义拉曼光谱积分强度为

$$I = \sum I_i \cdot \omega_i \quad (1)$$

其中 ω_i 为权重, 这里取 $\omega_i = 1$ 。

由于图中信号基线为零, 所以噪声的统计涨落均方差为

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (S_i - \bar{S})^2}{N}} \quad (2)$$

其中, N 为数据点数量, S_i 和 \bar{S} 分别为信号强度和平均值。

定义信噪比为

$$SNR = 20 \lg(I/\sigma) \quad (3)$$

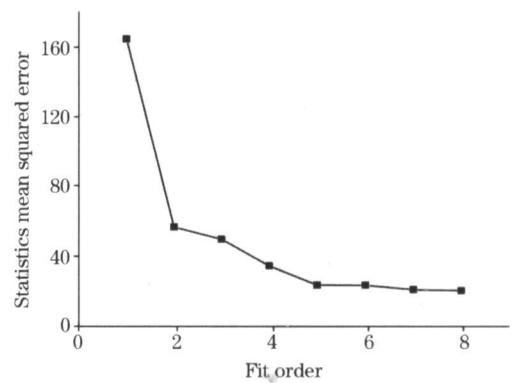


Fig 3 Statistics mean squared error changes with increasing fit order

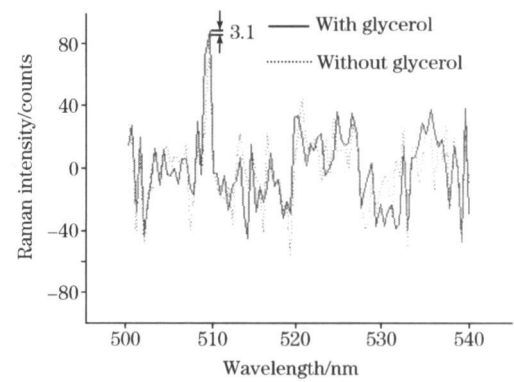


Fig 4 Difference resonance Raman spectra, solid line with glycerol, dotted line without glycerol

由公式(2) 计算出采用折射率匹配前后的积分光谱强度值分别为 116 和 162, 均方差分别为 25 和 22, 信噪比分别为 13.4 和 17.3 dB, 经小分子匹配液通透后系统信噪比提高了 3.9 dB。

现在分析饮食习惯与类胡萝卜素含量关系。针对前面不同饮食习惯志愿者的测量结果, 利用拟合、差分算法, 计算出拉曼绝对强度值。从图 5 可以看出, 多食蔬菜和水果者类胡萝卜素含量较高, 且效果基本相同。多食肉类而少食蔬菜水果者类胡萝卜素测量值较低。一般饮食者含量介于二者之

间。实验中不能给出体内类胡萝卜素含量和每日摄入量的定量关系,是由于实验中实验者的数量较少,而且每日摄入类胡萝卜素的量也不确定,无法给出更广泛的统计结果。但利用本文介绍的光学方法可以证实饮食习惯和体内类胡萝卜素含量存在比较明显的相关性。为了能够实现体内类胡萝卜素含量水平定量评估、每日摄入的类胡萝卜素真正能够转化为体内类胡萝卜素的效率评估等,我们已经开始设计新的实

验,对更多的人进行测量和统计。

3 讨 论

共振拉曼光谱法^[14]能够快速准确评估人体类胡萝卜素含量。在实际测量中,利用组织通透技术,减少了皮肤表面散射损耗,提高了系统信号收集效率和信噪比。类胡萝卜素除了 $C=C$ 产生的 1525 cm^{-1} 拉曼频移外,还有相对较弱的 $C-C$ 和 $C-CH_3$ 产生的 1159 和 1008 cm^{-1} 两个拉曼频移^[15],实验中没能探测到。分析主要原因为实验中光学透镜未镀增透膜,导致系统对弱的拉曼信号收集效率较低。另外,光谱仪在短波长处响应度低,因此强度相对较弱的两个峰淹没在噪声中。通过改善光学系统参数提高系统信号收集效率,选用更高灵敏度的光谱仪,能够测量到弱拉曼散射光信号。我们希望通过继续改进和完善该技术以满足其在皮肤疾病、眼科疾病及其它恶性肿瘤疾病研究中应用要求。近年来,拉曼光谱方法应用于恶性肿瘤诊断方面的工作也有所进展^[16]。

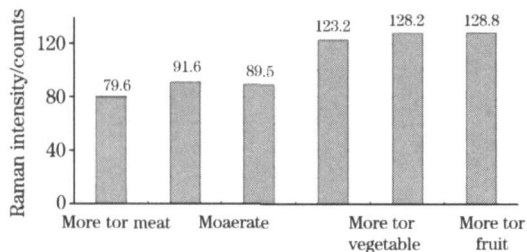


Fig 5 Resonance Raman intensity (counts) versus the number of fruit and vegetable intake

参 考 文 献

- [1] Sies H, Stahl W. Am. J. Clinical Nutrition, 1995, 62: 1315S.
- [2] Regina B Ramanauskaitė, Ine G M J, et al. Pure & Appl. Chem., 1997, 69(10): 2131.
- [3] Paul S Bernstein. Pure & Appl. Chem., 2002, 74(8): 1419.
- [4] Matthew B, Schabath H, Barton Grossman, et al. J. Nutr., 2004, 134: 3362.
- [5] LIU Gang, LIU Jiarong, ZHANG Lin, et al(刘刚, 刘剑虹, 张林, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2005, 25(5): 723.
- [6] SU Jing, YU Xiling, YOU Jinglin, et al(苏静, 于锡玲, 尤静林, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2005, 25(4): 532.
- [7] Utzinger U, Heintzelman D L, Mahadevan Jansen A, et al. Appl. Spectrosc., 2001, 55: 955.
- [8] ZHAO Xiaojie, JIANG Shan, FAN Yongchang, et al(赵晓杰, 江山, 范永昌, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 1994, 14(1): 29.
- [9] CEN Yan, ZHANG Ren, YAO Wenhua, et al(岑剡, 张人, 姚文华, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2005, 25(3): 405.
- [10] Zinchuk V V, Dorokhina L V. Biology and Chemistry, 2002, 6(1): 29.
- [11] Endo M, Kim C, Karaki T, et al. Phys. Rev. B, 1998, 58: 899.
- [12] Igor V Ermakov, Maia R Ermakova, Robert W McClane, et al. Optics Letters, 2001, 26(15): 1179.
- [13] LÜ Yafei, TAN Huiming, QIAN Longsheng(吕彦飞, 檀慧明, 钱龙生). Optics and Precision Engineering(光学精密工程), 2005, 13(3): 260.
- [14] Zhi C Y, Bai X D, Wang E G. Appl. Phys. Lett., 2002, 80: 3590.
- [15] Gellermann W, Ermakov I V, Ermakova M R, et al. J. Opt. Soc. Am. A, 2002, 19: 1172.
- [16] YU Ge, XU Xixuan, LÜ Shuhua, et al(于轲, 徐晓轩, 吕淑华, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2006, 26(5): 869.

Carotenoid Levels Measured by Resonance Raman *in Vivo*

SHAO Yong hong¹, HE Yong hong¹, MA Hui^{1*}, NAN Nan², QIAN Long sheng², WANG Shu xia¹

1. Laboratory of Optical Imaging and Sensing, Graduate School at Shenzhen, Tsinghua University, Shenzhen 518055, China

2. Changchun Institute of Optics, Fine Mechanics and Physics, Chinese Academy of Sciences, China Instrument and Control Society, Changchun 130033, China

Abstract Carotenoid molecules are powerful antioxidants which can act as scavengers for free radicals, singlet oxygen, and other harmful reactive oxygen species in human body. Studies have shown an inverse correlation between the level of carotenoid and the risk of cancers, cardiovascular diseases, and degenerative diseases. High performance liquid chromatography is used for measuring carotenoid levels as a standard method, but it is not noninvasive and real time detecting. The authors have developed a novel noninvasive optical technology to measure carotenoid level *in vivo* by detecting the resonance Raman spectra, which can be used for high sensitivity and real time detecting. When a low noise 473 nm laser with power less than the exposure limit set by ANSI Z136.1-2000 standards, a clearly distinguishable low resonance Raman spectra superimposed on a strong fluorescence background is produced. The carotenoid level is assessed by measuring the resonance Raman intensity. Using penetrating tissue technology, the authors improved the signal to noise ratio in the setup. The experimental results from different volunteers confirmed that the carotenoid level is proportional to the intake of it. The technology provided important values for clinic applications and science research.

Keywords Raman spectrum; Laser; Carotenoid

* Corresponding author

(Received Aug. 6, 2006; accepted Nov. 16, 2006)

(上接 2242 页)

分会报告于 24 日下午至 27 日上午在 7 个不同的会场同时进行, 会议研讨的范围涵盖了原子光谱、分子光谱、质谱、激光光谱、X 射线和同步辐射、化学计量学等光谱/质谱分析的各个方面; 同时还组织了形态分析、环境分析、元素质谱前沿、生物光谱传感技术、光谱在纳米材料的应用等当前世界相关热点问题的专题研讨会。在笔者之一(张)所在的分子光谱会场, 厦门大学任斌教授在报告中就过渡金属体系的表面寻找表面增强拉曼光谱(SERS)研究做了深入浅出介绍, 着重于利用针尖拉曼拉曼光谱(TERS)技术, 寻找纳米颗粒表面 SERS 活性位, 开展单晶电极表面的分子的吸附和反应等需要高灵敏度体系 TERS 研究。此外, 还有多位工作者就利用红外、近红外、拉曼等分析手段对纳米科学、溶液科学、气溶胶科学、生物学、医学等各个领域的不同方面进行的研究做了精彩的报告。会议还组织了一个拥有二十多个展台的小型展览会, 同时厦门市科技局组织了一个由厦门仪器厂家参展的厦门展区。

本届 CSI XXXV Award 得主为美国 Indiana 大学的 Gary M. Hieftje 教授。他在原子发射吸收光谱、荧光光谱的理论机制研究上作了突出的贡献。他注重于原子光谱及质谱等分析方法的研究, 此外, 对化学仪器及实验的在线计算控制、具有时间分辨的发光过程的使用、将信息理论引入分析化学、近红外反射分析以及将随机过程用于基本动力学化学信息方面做了深入的研究。Dr. Hieftje 教授指导了 200 多名学生, 包括部分的博士后以及世界各地的访问学者, 发表了 500 多篇高质量的文章。同时, 本届会议也设立“优秀报展奖”, 该奖项由岛津奖、P E 奖、JAAS 奖及 CSI 组委会奖组成, 主要用于表彰那些研究水平高、能突出展示研究内容要点、版面编排好的报展(共 15 名)。

谱学分析目前已经成为化学、地质学、生物化学等几十个学科领域不可或缺的分析检测手段。近在眼前的食品安全、中药、水质检测, 远在天边的火星探险, 都离不开光谱化学。从一定意义上讲, 谁掌握了更先进的分析检测技术, 谁就掌握了科技发展的优先权、人民健康的保障权、商业发展的制定权以及突发事件的主动控制权。第 35 届国际光谱会议得以在中国召开, 是我国光谱界学者近十年努力争取的结果, 也是国际光谱学界对中国光谱科学发展的充分肯定; 而我国近年来各方面的形势大好则是决定性的因素。

大会于 9 月 27 日下午圆满结束, 与会者反映甚佳。在闭幕式上, 下届会议主席 Zóray 教授充分肯定了本次会议取得的成功, 并欢迎大家前往匈牙利布达佩斯参加 2009 年召开的第 36 届国际光谱会议。本届大会主席黄本立致闭幕词时感谢来自各方面的帮助和支持和与会者的热情投入使大会取得成功, 并宣布了在 9 月 24 晚举行的国家代表会议上通过的第 37 届 CSI (CSI XXXVII) 将于 2011 年在巴西的里约热内卢州 Búzios 市举行的决议。