

# 近红外光谱 ——一种生物医学研究的有效方法

刘扬 庞代文\* 庄林

(武汉大学化学系 武汉 430072)

**摘 要** 近红外光谱技术以其快速、非介入、多组分同时测定等独特的优点而成为生物医学领域中很有潜力的分析方法。本文简要介绍了近红外光谱原理、仪器和相关的数学算法。重点介绍了近年来这一技术在生物医学中的应用,包括生物反应过程分析、生物体组织分析、临床医学和近红外成像等方面的应用的进展。

**关键词** 近红外光谱法 生物医学 非介入分析

## Near Infrared Spectroscopy ——A Potentially Useful Method In Biology And Medicine

LIU Yang, PANG Daiwen\*, ZHUANG Lin

(Chemistry Department, Wuhan University, Wuhan 430072)

**Abstract** Because of its outstanding characteristics, such as rapidness, noninvasive analysis, and simultaneous determination of multi-components etc., near infrared spectroscopy becomes a promising analytical technique in biology and medicine. In this paper, the basic principles of near infrared spectroscopy are briefly introduced. The recent progresses in its applications for biology and medicine, including bioreaction process analysis, tissue analysis, clinical analysis and medicine and near infrared imaging, are reviewed.

**Key Words** Near infrared spectroscopy, Biomedicine, Noninvasive analysis

近红外(NIR)谱区是指介于可见区(VIS)和中红外(MIR)区之间的电磁波,根据美国试验和材料协会(ASTM)规定,其波长范围为700~2500 nm。分子在NIR区的吸收主要由C—H, O—H, N—H, C=O等基团的合频吸收与倍频吸收组成,NIR谱包涵有机物的大量信息。NIR区的吸收强度低,谱带复杂、重叠严重,无法使用经典定性、定量方法,而须借助化学计量学中的多元统计、曲线拟合、聚类分析等方法建模,将其所含的信息提取出来,NIR属二次分析方法。结合合适的定标模型,近红外光谱可实现快速多组分定量分析或类别鉴定、纯度鉴定等定性分析。这种NIR与化学计量学的结合即形成了所谓的现代NIR光谱学。

近红外光谱分析快速、无损、无污染、可进行多组分同时测定。分析对象多样,可以直接分析颗粒、粉末、片剂、纤维,或是溶液、乳浊液甚至是活体的生物组织等等。在生物医学领域中,人们一直在探寻能够进行非介入式在体分析、多组分同时测定和快速在线分析的仪器方法。近红外光谱分析技术同时拥有上述优点,可以实现过程分析和生物体的在体非介入分析和监测,因此在生物医学领域应用具有极大的生命力,引起许多研究者的关注。近年来国际上有关的研究已表明,近红外光谱技术已成为生物医学领域,特别是临床医学上极具发展潜力的分

刘扬 女, 26岁, 博士生, 研究方向为近红外光谱分析、化学计量学。 \*联系人 Email: [dwpang@whu.edu.cn](mailto:dwpang@whu.edu.cn)

2000-08-07 收稿, 2000-12-26 修回

析和研究手段。

## 1 近红外光谱仪器

近红外仪器的发展很快,随着近红外光谱应用范围的扩展,根据不同的应用对象和场合,新的设计和改进不断出现。近红外光谱仪的结构与紫外-可见光谱仪类似,其结构可分为光源、单色器、检测器、测样附件、计算机处理系统五个部分。通常使用的光源是石英卤钨灯,其波长范围为 360~3000 nm。检测器除常用的 PbS 外,还有检测效率较高、但较昂贵的 InAs、InGaAs,多通道二极管阵列等等。测样附件多样,除可用样品池、样品杯外,更可使用光纤进行远程采样。单色器是近红外光谱仪的关键部分,使用较多的为滤光片、扫描光栅单色器和使用干涉仪的傅立叶变换型光谱仪,如我国石油化工研究院研制的多通道近红外光谱仪使用光栅作单色器,多通道 CCD 检测器在石化行业已有广泛应用<sup>[1]</sup>。近年颇受关注的声光可调滤光器(AOFT)式近红外光谱仪利用声波与特定晶体(多采用  $\text{TeO}_2$ )作用,可产生高度相干的单色光,并且仪器无可动部件,有良好的抗震性,从而适合工业上的在线分析。在使用近红外光谱研究生物样品特别是在体分析时,遇到的最大困难是光散射和样品过高的水分吸收。而基于光声效应的光声光谱技术只检测吸收光,从而避免了散射光的干扰,并且使用的微音器能检测很小的吸收,灵敏度较高,被认为是生物医学研究的有效方法。因此将光声技术与近红外相结合,把光声池引入近红外仪器对推动近红外光谱在生物医学中的应用有重要意义。

## 2 近红外光谱的模型算法

由于近红外光谱信息复杂,必须依靠化学计量学方法提取相关信息建立模型才能实现定性、定量分析的目的。计算机和化学计量学的发展对近红外光谱技术应用的扩展和深化起着非常重要的推动作用。许多新的多元统计、人工智能、模式识别的算法都被尝试应用于此领域。

在近红外光谱分析中,使用最多、最为经典的方法是用于定量的逐步多元线性回归(SMLR)、主成分回归(PCR)、偏最小二乘法(PLS),以及用于定性的马氏距离、SIMCA(Soft Independent Modeling of Class Analogy)等模式识别方法。近年来人工神经网络(ANN)等一些适于处理非线性问题的人工智能算法也大量被尝试应用于此领域。为了减少 ANN 的输入量和提高运算速度,研究者们<sup>[1, 2]</sup>将主成分方法与 ANN 结合,先求出主成分压缩光谱数据,作为 ANN 的输入节点。许多研究者在处理不同问题时,将 ANN 与 PLS、SMLR、PCR 等算法进行比较发现,通常在非线性情况比较明显时,ANN 方法具有优势。ANN 还被用于定性分析,如刘扬等<sup>[3]</sup>将其用于烟叶感官质量评价。

从建模使用的光谱波长的选择上看,近红外光谱的建模可分为全光谱法和部分波长法。研究表明在许多情况下,光谱中相当一部分信息与所测物质并无关联,无用信息的加入不但不会提高模型精度,相反其中的噪声反而使结果变差。因此,波长范围的适当选取或有效信息的提取和压缩会使模型更可靠。目前许多研究工作围绕此方面展开,例如用遗传算法、小波变换等方法先去除光谱噪声并提取相关信息,而后再用 PLS 等方法建模,取得了较好的结果。然而 Mcshane 等<sup>[4]</sup>对模拟生物体系的研究表明,对于分析复杂介质中的物质时(如分析血液、组织中的葡萄糖、乳酸盐等),往往需要较宽的光谱范围,此时使用较低分辨率的全光谱可能比筛选波长更为合适。

另一研究的热点是模型传递问题。由于近红外光谱分析属二次分析方法, 建立一个可靠的模型需要大量的样品选择和参比方法的数据分析工作。当仪器条件不同、样品测试条件不同时, 如果重新进行上述工作则耗时巨大。因此, 人们试图从算法的角度来解决这一实际问题。如同一仪器随时间推移的模型传递、一台仪器向多台仪器的模型传递、自用样品池检测向用光纤探头检测的模型传递, 以及液体样品在不同温度下测定的模型传递等等。使用较多的是 Wang 等提出的 PDS 算法 (Piecewise direct standardization)<sup>[5]</sup>。一些新的尝试仍在不断进行, 如将 ANN 用于两台仪器间的模型传递。

### 3 近红外在生物医学领域的应用

1977 年, Jebsis 首次报道了血红蛋白和细胞色素在特定近红外区的吸收特性, 并发现氧合血红蛋白和脱氧血红蛋白分别在 760nm 和 850nm 处有两个吸收峰, 其变化可以反映血红蛋白的载氧情况。该报道引起了生物医学界特别是临床医学界的重视, 自此, 近红外光谱技术逐渐渗入这一领域, 并显示出巨大的潜力。目前, 研究范围已涉及生物反应过程的研究与监测, 生物体组织分析, 临床医学, 药物研究, 微生物鉴别, 细胞病理等等, 现已有成功应用的范例, 进一步地探索和开发也在不断进行。

#### 3.1 生物反应过程的研究与监测

由于近红外响应速度快, 又可进行多组分的同时和无损检测, 因此往往可以获取生物过程中常规方法无法得到的一些重要参数。目前在生物化学工业上, 还缺乏真正经济、可靠的能够连续监测生物反应的传感器。从原理上讲, 可以通过反应器窗口原位收集近红外光谱, 并实时测定多组分的含量。许多研究者正致力于此方向的研究。Chung<sup>[6]</sup>等从简单体系入手, 用混合溶液模拟发酵过程的反应液, 采用近红外光谱同时测定葡萄糖、谷酰胺、氨、乳酸盐和谷氨酸盐的浓度。Mcshane<sup>[7]</sup>进而进行了复杂的细胞培养液中葡萄糖、乳酸盐和氨的同时测定。Li 等<sup>[8]</sup>将光纤插入发酵反应室, 使用一种小型二极管阵列光谱仪在 1100~1450nm 的波长范围同时测定反应过程中葡萄糖和乙醇浓度, 对发酵反应进行在线原位监测。并比较了 ANN、PLS 建模的效果。此外, 近红外光谱还可用于生化反应中微生物的鉴别和分类。

在生命过程的研究中, 近红外光谱被用于测定脑血流量和脑血管中 CO<sub>2</sub> 的活性, 人体肌肉组织在运动中的氧化代谢等等。肌红蛋白存在于心肌和骨骼肌中, 参与细胞间的氧的传递, 用可见光测定时, 无法穿透组织, 只能测定表面状况, 而近红外对组织的穿透性使研究肌肉中的肌红蛋白成为可能。Kenneth 等<sup>[9]</sup>据此用透射光谱测定了在血红蛋白存在下的肌红蛋白溶液的不同含氧程度, 并用反射光谱对模拟组织情况的溶液进行了研究, 校正后的模型对肌红蛋白含氧量的预测误差为 2%。亚皮秒时间分辨近红外吸收光谱被用于研究肌红蛋白中亚铁血红素的电子弛豫和热弛豫动力学, 以供进一步研究亚铁血红素蛋白质配合物的光分解<sup>[10]</sup>。

#### 3.2 生物体组织的研究

皮肤中水分的测定。近红外可穿透致密的皮肤组织 0.15~0.20mm, 从而可以非介入地研究真皮组织。Dreassi 等<sup>[11]</sup>发表了系列报告, 通过水分和类脂的近红外光谱变化研究了正常皮肤和萎缩皮肤, 以及它们和几种化学物质的相互作用。研究表明, 使用近红外光谱只需简单的接触即可区分正常和萎缩皮肤, 并可研究不同病变皮肤对化学物质的不同相互作用。Kathleen<sup>[12]</sup>用

近红外反射光谱研究了皮肤中的水分, 指出皮肤中水分以四种不同形态存在, 并提示用近红外可以研究药物的透皮吸收。

脑组织的研究。Tamura<sup>[13]</sup>发现 700~1000nm 的近红外光具有更强的组织穿透性, 对活体组织的透过深度可达几个厘米, 并且这一波长段的光的吸收主要由几个生色团引起。他将这一发现用于鼠脑组织的原位研究, 用光纤传输单色光, 通过吸收光强度的变化来研究脑组织。该结果对脑休克的机理和药物治疗以及由于组织缺氧引起的脑和其它器官的供氧不足很有意义。Kusaka<sup>[14]</sup>等用连续近红外光谱研究了新生小猪脑组织中血红蛋白的氧化态和细胞色素 c 氧化酶的还原态。近红外光谱还被用于研究人体姿势变化时, 脑组织含氧状况的敏锐变化。

### 3.3 临床医学

近红外光谱在临床常规分析中的最大优势在于其对组织的透过性好, 能够进行体外或在体的非破坏、非介入分析。主要有全血或血清中血红蛋白载氧量、pH 值、葡萄糖、尿素等含量的测定。

Kuenstner 和 Norris<sup>[15]</sup>提出了“近红外血红蛋白测定法”(near-infrared hemoglobinometry), 将近红外光谱用于人血液样品的分析。他们将样品置于一敞口池中, 采用垂直光路以 2nm 间隔扫描得到 400~2500nm 范围的光谱, 结果相当精确, 标准差为 3.2g/L。

血液的 pH 值的常规测定方法为电化学方法, 需要血管穿刺。血液的 pH 值与血红蛋白中组氨酸残基有关, 而组氨酸可在近红外光谱中反映出来, 因此可用近红外进行血液 pH 值测定。Alam 等进行了溶血溶液中 pH 值的研究, 随后又对全血 pH 值进行体外测定<sup>[16]</sup>, 为近红外非介入测定血液 pH 值奠定了基础。

Hall 等<sup>[17]</sup>对经脱水处理的干血清中尿素的含量进行了测定, 并与血清样品不经脱水直接测定的结果进行比较, 表明对干血清的测定结果并不优于直接测定, 但回归分析有所简化。Domjan<sup>[18]</sup>等进行了全血和血清中蛋白质、类脂的定量分析, 并与溶解于缓冲溶液中的白蛋白和球蛋白进行了比较。结果表明近红外光谱可以对全血和血清进行快速、有效、价廉的分析。用近红外光谱进行尿液中尿素、肌氨酸酐和蛋白质的定量分析也有报道<sup>[19]</sup>。

血糖的非介入检测可以说是近红外光谱在血液分析中应用研究最多的一个方面。葡萄糖在近红外谱区(700~1800nm)有明显吸收, 因此近红外光谱非常适合葡萄糖的非介入检测, 并且采用近红外方法不使用酶, 无须复杂的制样过程, 简便快捷, 能进行连续监测。Spanner 等<sup>[20]</sup>研究了用近红外光谱为糖尿病人研制连续非介入式血糖监控仪的有关问题。他们开发出的仪器是将光声感应探头通过光纤束与含有 8 个激光二极管的二极管阵列耦合在一起, 激光二极管阵列可调制出不同波长的近红外光, 光声感应探头则适宜作生物组织的非介入检测。该仪器对全血中葡萄糖浓度的微小变化十分敏感, 对血糖的测定精度与临床使用的连续血糖监控仪十分接近。非介入近红外光谱血糖传感器的设计已有专利<sup>[21]</sup>。Mueller 等<sup>[22]</sup>也提出用近红外进行非介入血糖监测, 并提供了可以提高模型可靠性的校正方法。在 2000 年匹兹堡会议上, Toshiyasu 等<sup>[23]</sup>发表论文, 在使用流动池连续分析的条件下, 研究模型对基线漂移和其他成分干扰的排除, 以得到稳定可靠的模型。

Afromowitz 等<sup>[24]</sup>开发了一种烧伤分析系统, 首先用宽通带滤镜分离伤口散射的光(部分为

近红外光), 而后进行数学处理, 将伤口分为“可很快愈合”、“较慢愈合”两类, 结果表明该系统对伤口愈合情况的预测比医生的预测更准确, 从而可以最大限度地减少伤口愈合后的变形。近红外光谱在临床医学中的重要应用还包括大脑功能研究、心血管疾病及癌症的辅助治疗, 目前这些问题多采用近红外成像技术进行研究, 在下面一节中单独介绍。

### 3.4 近红外成像

近红外成像技术是近年来颇为活跃的一个研究热点, 除了在工业、遥感、天文等领域的应用外, 更是受生物医学领域重视的一种新的成像方法。其基本原理仍是基于近红外光对人体组织的一定的穿透性和血红蛋白的选择性吸收。最主要的应用要属脑血流量和脑功能的研究。当大脑受刺激时, 近红外光谱能在体测量大脑额叶血流量变化, 进而可用于脑功能参数的测量。使用近红外进行脑功能成像时, 一些光纤头固定在研究对象的头皮上, 光束透过颅骨由组织产生光散射后, 一些光束射出, 由距光源几公分远的光学传感器检测并在计算机上成像。研究过程中, 对象无须保持躺姿, 因而更接近实际情况, 且此方法具有价格低廉、非介入、实时连续等突出的优点, 因而受到国际神经生物学界的广泛重视, 被认为是对功能性磁共振成像(FMRI)、正电子发射断层扫描(PET)等方法的重要补充。美国密苏里州立大学的神经学成像专家 Gratton 研究小组研制的事件相关光学信号系统(EROS)即是用近红外光直接对大脑的神经活动成像, 其花费不超过 5 万美元, 远远低于 FMRI 设备每特斯拉 100 万美元的价格<sup>[25]</sup>。目前, 近红外脑功能成像被用于脑损伤及康复、癫痫疾病以及大脑语言优势的研究<sup>[26]</sup>等等。国内, 华中科技大学的骆清铭等正在开展用近红外光谱方法进行脑血流量和脑功能成像的研究<sup>[27]</sup>。除脑部成像外, 近红外可检测血管中存在的不同密度的脂蛋白, 因而近红外心血管成像被用于心血管疾病如粥样血管硬化等的研究。文献<sup>[28]</sup>对此方面的原理和仪器应用有较详细的介绍。在癌症诊断方面, 近红外成像被用于乳腺肿瘤的辅助诊断, 现已在临床实际应用, 并日趋普及。

## 4 展望

从上述各类研究不难看出, 近红外光谱凭借其快速、非介入、非破坏、多组分同时测定等优势而进入生物医学领域。由于生命过程和生物体本身的复杂性、诸多影响和限制因素以及对测定结果较高的要求, 这一领域使用的近红外光谱仪往往更复杂、可靠性要求更高。特别是近红外成像技术, 要求激光和复杂的成像算法。这也许是近红外光谱进入这一领域相对较晚的原因。目前, 近红外光谱在生物医学中的应用还基本处于探索、开发和评估阶段, 与其在农业上的成熟应用相比还有一定差距, 但其独特的优势已为生物医学工作者提供了新的契机。随着近红外技术、计算机技术、光学技术等不断发展, 研究的不断深入, 近红外技术将在生物医学领域中充分发挥出潜力, 有望在探索生命过程的奥秘, 以及重大疾病预防、诊断、处理上起到更多的实际作用。

### 参考文献

- [1] 陆婉珍, 袁洪福, 徐广通等. 现代近红外光谱分析技术, 北京: 中国石化出版社, 2000.
- [2] 吉海彦, 严衍录. 分析测试学报, 1999, 18 (3), 12~14.
- [3] 刘扬, 庞代文, 鲁哲学等. 分析化学的成就与挑战, 重庆: 西南师范大学出版社, 2000, 1167~1168.
- [4] Mcshane J Michael, Cote L Gerard. Appl Spectrosc., 1998, 52 (6), 878~884.
- [5] Wang Y, Veltkamp D J, Kolwaski B R. Anal Chem., 1991, 63, 2750.
- [6] Chung H, Mark A Arnold, Martin Rhiel, et al. Appl. Spectrosc., 1996:50(2), 270~276.

- [7] Mcshane J Michael, Cote L Gerard . Appl. Spectrosc., 1998:52(8),1073~1076.
- [8] Li Yue et al. J. Near-infrared Spectrosc.,1999(7),101~108.
- [9] Kenneth A S, David R M, Eric O F,et al. Appl. Spectrosc., 1999,53(3),325.
- [10] Lim M, Jackson T, Anfinrud P. J. Phys. Chem., 1996:100(29),12043~51.
- [11] Dreassi E, Ceramelli G, Fabbri L, et al. Analyst, 1997: 122(8), 767~776.
- [12] Kathleen Martin. Appl. Spectrosc.,1998:52(7),1001~1007.
- [13] Tamura M. Jpn.Circ. J.,1992:56,366~375.
- [14] Kusaka T, Isobe K, Kawada K, et al. Photomed. Photobiol., 1995:17,63~65.
- [15] Kuenstner J T, Norris K H. J. Near-infrared Spectrosc.,1995:3,11~18.
- [16] Alam M.Kathleen,et al. Appl. Spectrosc., 1999:53(3),316.
- [17] Hall J W, Pollard A. J. Near-infrared Spectrosc.,1993:1(3),127~132.
- [18] Domjan G, Kaffka K J, Jako J M, et al. J. Near-infrared Spectrosc., 1994:2(2),67~78.
- [19] Shaw R, Kotowich S, Mantsch ,et al. Clin. Biochem.,1996:29(1),11~19.
- [20] Spanner G, Niessner R. Fresenius J. Anal.Chem.,1996:355(3-4),327~328.
- [21] Raber Peter E, Santman Jeff. WO Patent No.9725915 A1,1997.
- [22] Mueller U A, Mertes B, Fischbacher C,et al. Int. J. Artif. Organs, 1997: 20(5),285~290.
- [23] Toshiyasu Tarumi, Gary W S. On-line Glucose Monitoring Using Near Infrared Spectroscopy, Pittcon 2000,319.
- [24] Afromowitz M A, Callis J B,Heimbach D B, et al. IEEE Trans. Biomed. Eng.,1998:35,842~850.
- [25] Taubes G. Science,1997,276:1991~1993.
- [26] Watanabe , Nerouscience letter, 1998, 256, 49~52.
- [27] 骆清铭, 邓晖, 龚辉等, 红外与毫米波学, 1999: 18 (2), 138~144.
- [28] Robert J D, Daron G D, Robert G B Jr, et al. Appl. Spectrosc., 1996:50(2),18A~34A.