

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
A61B 5/00 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780044146.4

[43] 公开日 2009 年 12 月 16 日

[11] 公开号 CN 101605494A

[22] 申请日 2007.10.29

[21] 申请号 200780044146.4

[30] 优先权

[32] 2006.10.27 [33] US [31] 60/855,033

[32] 2006.10.27 [33] US [31] 60/855,032

[86] 国际申请 PCT/US2007/082905 2007.10.29

[87] 国际公布 WO2008/052221 英 2008.5.2

[85] 进入国家阶段日期 2009.5.27

[71] 申请人 阿里戴斯公司

地址 美国马萨诸塞州

[72] 发明人 I·W·亨特尔 S·索马鲁

S·拉方丹 P·A·安克蒂尔

[74] 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

代理人 杨晓光 周良玉

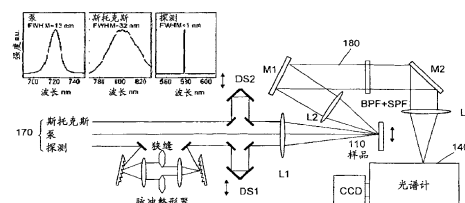
权利要求书 3 页 说明书 18 页 附图 6 页

[54] 发明名称

使用相干喇曼技术及其校准技术用于医疗诊断和治疗目的

[57] 摘要

提供了系统和方法以使用喇曼光谱学进行无创、实时、连续分子检测和量化样品或动物体中的分子种。可以应用这样的系统和方法识别可量化在体中发现的分子种，这对于产前诊断、检测深层皮肤感染、进行脑脊液评价、测量动脉血气、血糖、心脏生物标志物、肌酐流量都非常有用。连续实时地无创量化这样的分子种可以使得治疗过程显著地比现有方法更具有吸引力。



1. 一种使用喇曼光谱学测量动物体中的目标分析物的浓度的方法，包括以下步骤：

体外测量动物体中的目标分析物的浓度；

使用光照射所述动物体的一部分以使辐射从所述样品中的参考分析物和所述目标分析物散射；

检测来自所述参考分析物和来自所述目标分析物的所述散射辐射；

测量对应于来自所述参考分析物的检测的辐射的量的电信号；

测量对应于来自所述目标分析物的检测的辐射的量的电信号；

基于来自所述参考分析物的所述信号计算衰减因子；

基于所述衰减因子修正所述目标分析物的所述信号；以及

通过所述修正的信号确定所述动物体中的所述目标分析物的绝对浓度。

2. 根据权利要求1的方法，其中所述喇曼光谱学是相干的。

3. 根据权利要求1的方法，还包括将所述动物体的所述被照射的部分成像以有助于在所述动物体中定位所述参考分析物和目标分析物存在的位置。

4. 根据权利要求1的方法，其中使用光照射所述动物体的所述部分包括将所述光聚焦到所述动物体的所述部分中的焦平面；并且其中检测来自所述参考分析物的所述散射的辐射包括收集来自所述焦平面的散射的辐射。

5. 根据权利要求4的方法，其中所述聚焦为聚焦到所述动物体的所述部分的所述焦平面处的点或线。

6. 根据权利要求4的方法，其中使用光照射所述动物体的所述部分包括跨所述动物体的所述部分扫描所述光。

7. 一种使用喇曼光谱学测量目标分析物的浓度的系统，包括：

照射源，可以使辐射从样品中的参考分析物和目标分析物散射；

检测器，测量来自所述参考分析物和来自所述目标分析物的所述散射的辐射；以及

处理器，基于对来自所述参考分析物的散射的辐射的所述测量计算衰减因子，基于所述衰减因子修正对来自所述目标分析物的散射的辐射的所述测量，并通过所述目标分析物的所述修正的测量确定所述动物体中的所述目标分析物的绝对浓度。

8. 根据权利要求 7 的系统，其中所述照射源为相干喇曼激光系统。

9. 根据权利要求 7 的系统，还包括成像系统，所述成像系统有助于在所述样品中定位照射所述参考分析物和所述目标分析物的适宜的位置。

10. 根据权利要求 7 的系统，还包括扫描光学部件，用以跨所述样品的一部分扫描所述光。

11. 根据权利要求 7 的系统，还包括光学耦合到所述照射源和所述检测器的内镜。

12. 根据权利要求 1 的方法，其中所述参考分析物自然存在于所述动物体中或者不是自然存在于所述动物体中。

13. 根据权利要求 1 的方法，其中所述散射的辐射的所述检测是无创的。

14. 根据权利要求 1 的方法，其中所述检测是部分侵入的。

15. 根据权利要求 14 的方法，其中通过皮下感测器进行所述检测，或在活体组织上进行所述检测。

16. 根据权利要求 1 的方法，其中所述动物体的所述部分为皮肤或创面培养。

17. 根据权利要求 1 的方法，其中所述动物体的所述部分为下列中的至少一个：组织、分泌产物、排泄产物、外源材料、羊水、胆汁、血液、血浆、耳垢、库氏体液、乳糜、食糜、淋巴、经血、母乳、粘液、胸水、脓、皮脂、血清、尿、唾液、精液、汗、眼泪、大便、眼房水、肺呼出物、痰、胃肠道管饲、肺管饲、和皮肤、干细胞、骨髓、脑脊液、以及移植组织。

18. 根据权利要求 1 的方法，其中所述方法可操作用于在所述动物体的所述部分中识别下列中的至少一种：染色体成分、代谢产物、血气、生物标志物、细菌、病毒、胎儿中的传染病生物标志物、脑膜炎、蛛网膜下出血、脑积水、良性颅内高压、肿瘤、炎症、多发性硬化/格林-巴利综合症、神经梅毒、唐氏综合症、泰-萨氏病、囊性纤维化、由染色体缺失、重复、异位、反转或成环作用导致的遗传疾病、胆固醇、甘油三酯、C 反应蛋白、胆红素、碱性磷酸酶、丙氨酸转氨酶、AST/GOT、TSH、肌酐、白蛋白、CK-MB、肌红蛋白、肌钙蛋白 I、B 型利钠肽（BNP）、肿瘤特定标志物、肿瘤抗原、前列腺特定抗原（PSA）、细胞计数、细胞形态、药物成分或治疗药物（therapeutic drug）。

19. 根据权利要求 1 的方法，其中所述参考分析物为 Hb1Ac。

20. 根据权利要求 7 的系统，其中所述照射源能够照射血液样品并检测来自所述样品的散射的辐射，以实时监视血液葡萄糖水平。

21. 根据权利要求 17 的方法，其中在流动条件下照射尿。

22. 根据权利要求 21 的方法，其中所述目标分析物为肌酐。

使用相干喇曼技术及其校准技术用于医疗诊断和治疗目的

相关申请的交叉引用

本申请要求在 2006 年 10 月 27 日提交的题目为“Use of Coherent Raman Techniques for Medical Diagnostic and Therapeutic Purpose”的美国临时专利申请 No. 60/855,032 和在 2006 年 10 月 27 日提交的题目为“Method to Calibrate a Non-Invasive Molecular Diagnostic Device”的美国临时专利申请 No. 60/855,033 的优先权，将其全部内容并入到本文作为参考。

本申请涉及同时提交的题目为“Use of Quantum Control Techniques for Medical Diagnostic and Therapeutic Purposes”的美国专利申请 No.(TBA)，在此将其全部内容并入本文作为参考。

技术领域

本发明涉及使用喇曼散射研究分子的谱技术。

背景技术

喇曼光谱学是一种利用分子的振动谱来帮助表征和识别感兴趣的种（species）的光谱学。相干喇曼技术潜在地提供比自发或非相干喇曼更强的信号强度和更好的背景抑制。通过光产生的特性区分两种形式的喇曼光谱学。自发喇曼光谱学测量分子振动产生的光子的自发非弹性散射。相干喇曼光谱学涉及由其频率差调整在振动谐振附近的激光场诱导的分子极化的宏观振动。

相干喇曼技术为根据样品的三阶极化率返回光相干响应的非线性光谱技术（参见，例如，Shen, Y.R. The Principles of Nonlinear Optics(John

Wiley & Sons Inc. New York, 1984), pp. 267-275)。这些相干技术通常涉及不同频率的多个泵和探测激光。除了光学相干响应之外,样品通常还呈现大的非谐振背景信号。为了管理、减少或消除该背景,发展了各种形式的相干喇曼技术。这些方法包括,而不限于,相干反斯托克斯喇曼光谱学(CARS);相干斯托克斯喇曼光谱学(CSRS);频率调制的CARS(FM-CARS)和CSRS(FM-CSRS);epi-CARS、epi-CSRS;极化CARS/CSRS;时间分辨CARS/CSRS;干涉CARS/CSRS;单脉冲CARS、CSRS;傅里叶变换CARS、CSRS;以及混合CARS/CSRS。与自发喇曼光谱学相比,这些方法中的每一种都可以潜在地使来自样品的信号增强几个量级大小,并由此减小测量样品所需要的时间。然而,对于强散射介质,因为谱相位和极化的干扰,这些技术中的许多技术被认为是不实际的。

生理条件的无创检测相比于现有的侵入性方法是吸引人的治疗过程,现有侵入性方法需要例如疼痛并潜在危险地抽出体液,例如,血液、羊水、或脊髓液。许多当前提出的无创检测要么对低水平的目标分子不敏感,要么不能被校准以提供绝对浓度值。甚至在可以得到离体(in vitro)样品的情况下,高敏感度的检测方法可能也不允许实时分析。下面讨论几个实例。

通常,通过绒毛膜取样(CVS)、羊水诊断、脐带穿刺术进行产前诊断以快速检验唐氏综合症或其他胎儿染色体异常(18, 13)、泰-萨氏病、囊性纤维化等等的存在。这些产前测试还可以用于检测胎儿的传染性疾病,例如,弓形体病、风疹、胎儿内的巨细胞病毒,以便其被处理,并进行用于贫血和低血小板水平的血细胞计数及检查。不幸地,这些诊断的价值却被不可接受的约两百分之一的高风险的妊娠丢失(fetal loss)所抵消。

与例如超声颈项半透明层、自由 β (free beta)、PAPPA屏(PAPPA screen)的其他测试相结合的当前的无创诊断,例如,三或四重标志物血液测试具有仅仅约90-95%的检测率,伴随着2-5%的假阳性率。因此需要更好的方法来辨别胎儿的染色体特性而不会破坏羊膜囊、或以其他方式危及胎儿。虽然已经探索了几种无创测量胎儿DNA的方法,但都没有采用光学无创测量。

通常，细菌和病毒检测是医疗服务提供者和消费者的另一共同关注对象。具体而言，深层皮肤的细菌感染，即所谓的蜂窝织炎，涉及会导致极度紧急的医疗急救的快速和潜在地威胁生命的感染。在感染之后，疾病会扩展到淋巴结和血流和/或包括坏死性筋膜炎。可能的原因包括 A 群链球菌、创伤弧菌、产气荚膜梭菌、脆弱类杆菌和/或抗药性金黄色葡萄球菌（MRSA）。蜂窝织炎通常难以确定并快速地诊断，因为其症状类似深静脉血栓或由淤积性皮炎导致的皮疹。此外，造成蜂窝织炎的细菌不易于通过活组织检查、创面培养或生理盐水冲洗来培养。此外，血液测试是无效的，除非患者已发展成一般性脓毒症。培养花费 24-48 小时，但疾病在 24 小时内便可发展到致命的程度。因此，难以从观察的皮疹确定健康危险的严重程度。需要快速识别在深层皮肤中的细菌群，并优选地辨别涉及的病原体的种类或特定的菌株。如果可以获得这样的诊断，便可以开出抗生素例如青霉素、红霉素和克林霉素、或头孢氨苄的处方。

通常进行也称为腰穿的腰椎穿刺来抽取脑脊液（CSF），以有助于诊断脑膜炎、蛛网膜下出血、脑积水、良性颅内高压、某些肿瘤、炎症、多发性硬化/格林-巴利综合症、神经梅毒 A 等。不幸地腰椎穿刺会产生硬膜外感染、瘫痪、截瘫的危险。一种原位识别 CSF 中的分子而不刺穿保护中枢神经系统的膜的方法可以减小这样的并发症的危险。

阿尔茨海默（Alzheimer）病的临床诊断基于存在的特征性神经和神经心理学特征。目前，没有用于阿尔茨海默病的无创或生前（pre-mortem）生物标志物。相似地，不存在用于帕金森病的已知生物标志物。一种原位监测 CSF 的方法对于评测对例如阿尔茨海默病和帕金森病的疾病的新的治疗的药物反应是有用的。

动脉血气测量帮助医生评估患者的肺功能，尤其是在慢性阻塞性肺病急性发作（AECOPD）期间持续高碳酸化呼吸衰竭的患者。同样，动脉血气（ABG）值对于在新生儿重症监护室（NICU）管理重症、通气患者是有用的。通常，通过动脉穿刺血液提取来获得 ABG 值。重复的间歇的侵入性动脉穿刺具有包括感染、疼痛、贫血的固有危险。在小儿科患者中，

这样的重复的动脉穿刺是困难的，其中脱水增加了血液抽取的难度。此外，频繁对婴儿进行 ABG 取样会导致失血，这样的失血会需要输血并增加血管内污染的危险。低量的采样会造成误差，尤其对于血电解质浓度测量。除了不舒适、健康危险以及管理血液抽出的难度之外，预定的、或间断性的 ABG 采样还会错过改变条件。在表面活性剂管理之后和在高频通气期间，会发生血气值的快速改变。通过连续的 ABG 监视，治疗方式是主动性的而不是反应性的。虽然已开发了一些监视二氧化碳和氧水平的经皮设备（transcutaneous device），但是他们需要经常性的位置改变和探测器的重新校准，并且因为到组织的血流的改变，他们对于血液动力学弱的患者是禁忌的。其他设备，例如，脉搏血氧计提供了血氧饱和度的连续评价，但却不能给出有关 pH 或 PaCO₂ 的信息。

充血性心力衰竭（CHF）是超过 65 岁的人住院治疗的主要原因。目前，测试从患者抽出的血液以评定心肌损伤，并诊断或分级患者状况。该测试被进行几个小时以监视分析物水平的发展。在心脏病发作之后，指示心肌损伤的肌钙蛋白水平将在 1-2 周保持升高。提供心脏生物标志物例如肌酸激酶（CK-MB）、肌红蛋白、肌钙蛋白 I、B 型利钠肽（BNP）、天冬氨酸转氨酶、或乳酸脱氢酶的实时定量确定会帮助急性心肌梗死（MI）、充血性心力衰竭（CHF）的诊断和治疗，或急性管状动脉综合症（ACS）的分级。然而，一些相同的心脏生物标志物会反映骨骼肌损伤。需要一种区分急性 MI、CHF 或 ACS 与骨骼肌损伤的方法。实时且连续的时间过程数据历史将有助于差别诊断。然而，当前公知和提出的监视生物标志物的方法是间歇且时间上延时的。

糖尿病，由于身体没有能力调节葡萄糖所导致的状况，折磨着世界范围的一亿五千万人，其中中国、印度和美国受影响最大。仅仅在美国，两千一百万人患有此病。预期，随着人口年龄和期望寿命的增加，糖尿病患者数目以每年 10% 的速率增加。令人担忧地，儿童和青年的发生率同样升高。糖尿病具有许多短期和长期次次并发症的危险，该并发症包括失明、截肢和神经损伤。因此通过频繁监视血液葡萄糖水平而进行的适宜的疾病

管理便极为重要。不幸地，由于一些原因，当前广泛使用的通过侵入性指尖血液抽取测量血糖的方法不利于患者依从。通常，患者将选择推迟手指测试带来的直接疼痛、不适和不便，即使长期的医疗后果是严重的。此外，对于一些患者，特别是遭受了疾病导致的触觉和视觉损伤的患者，抽血的步骤是困难的。最终，患者通常发现由此获得的信息没有用，因为其仅仅提供了快照而不能够辨别或预测危险的低血糖症（葡萄糖太低）和高血糖症（葡萄糖太多）的时期。毫不吃惊地，小于 30% 的患者一天一次或多次地持续检查他们的葡萄糖水平，即使医生建议患者一天要几次监视和控制其血糖水平。因此，监视依从性仍是有效管理该疾病的重要问题。目前，不存在或没有提出可以精确并定量测量糖尿病患者的葡萄糖水平的检测葡萄糖浓度的无创方法。

通过肾小球滤过率指示肾功能，肾小球滤过率有可以用肌酐滤过率近似。直接实时测量尿液中的肌酐水平将可以早期检测肾衰竭。当前，通常通过 24 小时收集尿液并测量血清肌酐浓度来评价肾功能。通常，医生需要更快速的诊断，特别是如果需要肾治疗。已做出了努力以通过 Cockcroft-Gault 公式数学地估计肾功能或肾小球滤过率并对其细化。需要一种实时测量尿液肌酐浓度和尿液流动的方法以直接确定肌酐流动速率。

除了心脏生物标志物和 ABG 之外，测量患者的 Hgb（血色素）、WBC（白细胞）、Plt（血小板）、Hct（红血球压积）值的其他血液测量，例如，全血细胞计数（CBC）通常需要抽血。通过自动（流式细胞仪）或手动（血涂片）计数来进行 CBC。由于上述的相同原因，需要获得血液分析物的信息的无创方法，尤其是在小儿科的情况下。

发明内容

本发明的实施例提供了用于医疗诊断和治疗目的的相干喇曼技术，以及用于同样目的的其校准技术。

在一个方面，一种使用喇曼光谱学测量动物体中的目标分析物的浓度的方法，包括以下步骤：体外测量动物体中的目标分析物的浓度；使用光

照射所述动物体的一部分以使辐射从所述样品中的参考分析物和所述目标分析物散射；检测来自所述参考分析物和来自所述目标分析物的所述散射辐射；测量对应于来自所述参考分析物的检测的辐射的量的电信号；测量对应于来自所述目标分析物的检测的辐射的量的电信号；基于来自所述参考分析物的所述信号计算衰减因子；基于所述衰减因子修正所述目标分析物的所述信号；以及通过所述修正的信号确定在所述动物体中的所述目标分析物的绝对浓度。

一些实施例包括下列特征中的一个或多个。所述喇曼光谱学是相干的。将所述动物体的所述被照射的部分成像以有助于在所述动物体中定位所述参考分析物和目标分析物存在的位置。使用光照射所述动物体的所述部分包括将所述光聚焦到所述动物体的所述部分中的焦平面。检测来自所述参考分析物的所述散射的辐射包括收集来自所述焦平面的散射的辐射。将光聚焦可以是聚焦到所述动物体的所述部分的所述焦平面处的点或线。使用光照射所述动物体的所述部分包括跨所述动物体的所述部分扫描所述光。所述参考分析物可以自然存在于所述动物体中或者非自然存在于所述动物体中。所述散射的辐射的所述检测是无创的或部分侵入的。可以通过皮下感测器进行所述检测，或在或活体组织上进行所述检测。所述动物体的所述部分可以为皮肤或创面培养。所述动物体的所述部分可以为下列中的至少一个：组织、分泌产物、排泄产物、外源材料、羊水（amniotic fluid）、胆汁、血液、血浆、耳垢、库氏体液、乳糜、食糜、淋巴、经血、母乳、粘液、胸水、脓、皮脂、血清、尿、唾液、精液、汗、眼泪、大便、眼房水、肺呼出物（pulmonary exhalat）、痰、胃肠道管饲（gastrointestinal gavage）、肺管饲（pulmonary gavage）、和皮肤、干细胞、骨髓、脑脊液、以及移植组织。所述方法可以在所述动物体的所述部分中识别下列中的至少一种：染色体成分、代谢产物、血气、生物标志物、细菌、病毒、胎儿中的传染病生物标志物、脑膜炎、蛛网膜下出血、脑积水、良性颅内高压、肿瘤、炎症、多发性硬化/格林-巴利综合症、神经梅毒、唐氏综合症、泰-萨氏病、囊性纤维化、由染色体缺失、重复、异位、反转或成环作

用导致的遗传疾病、胆固醇、甘油三酯、C反应蛋白、胆红素、碱性磷酸酶、丙氨酸转氨酶、AST/GOT、TSH、肌酐、白蛋白、CK-MB、肌红蛋白、肌钙蛋白 I、B 型利钠肽 (BNP)、肿瘤特定标志物、肿瘤抗原、前列腺特定抗原 (PSA)、细胞计数、细胞形态、药物成分或治疗药物 (therapeutic drug)。所述参考分析物可以为 Hb1Ac。可以在流动条件下照射尿。所述目标分析物为肌酐。

在另一方面,描述了一种使用喇曼光谱学测量目标分析物的浓度的系统,包括:照射源,可以使辐射从样品中的参考分析物和目标分析物散射;检测器,测量来自所述参考分析物和来自所述目标分析物的所述散射的辐射;以及处理器,基于对来自所述参考分析物的散射的辐射的所述测量计算衰减因子,基于所述衰减因子修正来自所述目标分析物的散射的辐射的所述测量,并通过所述目标分析物的所述修正的测量确定在所述动物体中的所述目标分析物的绝对浓度。

一些实施例包括下列特征中的一个或多个。所述照射源为相干喇曼激光系统。可以使用成像系统以帮助在所述样品中定位照射所述参考分析物和所述目标分析物的适宜的位置。扫描光学部件跨所述样品的一部分扫描所述光。可以将内镜光学耦合到所述照射源和所述检测器。所述照射源能够照射血液样品并检测来自所述样品的散射的辐射,以实时监视血液葡萄糖水平。

一些实施例提供了系统和方法用于以比现有方法较少侵入性的方式进行染色体异常、传染病、或血液特性的产前诊断,如此可以减少妊娠丢失。一些实施例提供了系统和方法用于以比现有方法更快速的方式检测和识别细菌或病毒群,特别是深层皮肤的细菌感染,即所谓的蜂窝织炎。一些实施例提供了比腰椎穿刺较少侵入性的系统和方法来获取脑脊液,以特别地诊断脑膜炎,或有助于研究阿尔茨海默病和帕金森病的生物标志物的临床发展。一些实施例提供了连续实时、无创的系统和方法以测量动脉血气值,具体地, PaCO_2 , 从而估计肺功能。一些实施例提供了系统和方法,用于实时定量确定心脏生物标志物和心脏生物标志物的时间过程数据历史,以

快速估计心肌损伤，并帮助诊断急性心肌梗死（MI）、充血性心力衰竭（CHF），或分级急性管状动脉综合症（ACS）。一些实施例提供了方法和系统，用于自动实时连续监视血糖水平，以能够进行密集的胰岛素治疗和血糖控制从而减小特别是术后的死亡率。一些实施例提供了方法和系统，用于自动实时连续且无创地监视血糖水平，以能够进行高级胰岛素治疗和血糖控制。一些实施例提供了无创方法和系统以确定全血细胞计数（CBC）以减小特别是小儿科情况的疼痛和不适。一些实施例提供了方法和系统，以通过在流动条件下的尿中的肌酐浓度水平直接获得瞬时肌酐流量（CFR），从而提供肾衰竭的早期指示或有助于药物例如氨基糖苷类（aminoglycosides）的配量。一些实施例提供了方法和系统，以校准检测的分子的浓度。

附图说明

图 1A 是用于测量离体样品的 CARS 系统的示意图；

图 1B 是图 1A 的 CARS 系统的实施方式的示意图；

图 2 是用于测量流动的样品的 CARS 系统的示意图；

图 3 是用于表面测量并具有焦深控制的 CARS 系统的示意图；

图 4 是包括三维成像制导（guidance）的 CARS 系统的示意图；以及

图 5 是包括三维成像制导和内镜附加装置的 CARS 系统的示意图。

具体实施方式

提供了一种光学、无创、无损系统和方法以检测分子，特别是体外（ex vivo）、体内（in vivo）或体外和体内两者的生理分析物或生物标志物。具体而言，使用相干喇曼技术来进行否则是困难的医疗诊断和治疗处置。

在一个方面，公开了一种用于光学测量样品中的分子的方法，由此通过相干喇曼光谱学（CARS）识别和量化分子种。与常规形式的喇曼光谱学相比，CARS 技术潜在地使来自样品的分子信号增强几个量级大小，同时消除了非谐振背景，减小了测量时间，并使得可以实时分析。因为技术

的光学特性，所以可能进行无创检测。

分析物的体内检测是复杂的，这是因为生物组织散射或减弱用于测量的光这一事实，这显著减小了 CARS 光学信号并由此减小了测量精度。此外，体内分析物产生的 CARS 信号不仅依赖于分析物的浓度，而且依赖于分析物附近的温度、水合作用和成分。提供这样的校准技术，其可以显著增强 CARS 信号并修正体内物体的动态变化，否则该动态变化会抑制分析物的测量。

首先，描述了几种 CARS 系统。然后，描述了校准方法。

在 Dmitry Pestov, Robert K. Murawski, Gombojav O. Ariunbold, Xi Wang, Miao Chan Zhi, Alexei V. Sokolov, Vladimir A. Sautenkov, Yuri V. Rostovtsev, Arthur Dogariu, Yu Huang, 和 Marlan O. Scully(2007 年 4 月)发表在 Science 316 (5822), 265 的“Optimizing the Laser-Pulse Configuration for Coherent Raman Spectroscopy”中可以找到关于 CARS 系统的进一步的信息，在此将其全部内容并入本文作为参考。

图 1A 是透射式 CARS 系统的示意图，该系统可以用于例如体外测量。将样品 110 放置到取样位置 120 中。从相干喇曼激光系统 130 产生光脉冲 170 并照射样品 110。光脉冲 170 与样品 110 的相互作用所产生的散射光 180 被检测器 140 收集和测量。由微处理器 160 分析来自检测器 140 的响应于测量的光的信号 150。可以通过另一子系统预处理信号 150 以提取或去除例如样品 110 的组成部分对信号的贡献。检测器 140 为同时记录感兴趣的波带内的多个光频率的信号的多通道单色仪。可替代地，检测器为检测单一光频率的扫描单通道单色仪。通过扫描单通道单色仪扫描感兴趣的频率范围以测量发射的喇曼信号。可替代地，使用时间分辨、延迟探测配置及时测量分子的响应，并通过该响应确定分析物的浓度。还可以使用其他检测方案。

在图 1A 的透射式系统中，光透射通过感兴趣的样品或区域，并在光源的相反侧测量散射的光。对于探测束，样品至少是部分透明的。例如，可以通过将样品设置到光学透明容器中，或将样品设置在其间具有间隙的

两个玻璃载片之间并至少部分地密封组件以包含所述样品，来进行体外分析。虽然图 1A 示例了透射式系统，但可替代地，可以通过设置在与光源同侧的检测器收集来自样品的背散射光，或被设置在样品的对侧的镜反射并再次通过样品的光。

图 1B 示意性地示例了处于反射模式配置的图 1A 的系统的示例性实施方式，其中探测光从样品表面反射而不是透射通过样品。在图 1B 的系统中，相干喇曼系统 130（未示出）包括 Ti: 蓝宝石再生放大器（Legend, Coherent: 1 KHz 重复速率，~1 mJ/脉冲），其均匀泵浦两个光参量放大器（OPA）（OperA-VIS/UV 和 OperA-SFG/UV, Coherent）。使用第一 OPA 的输出（ $\lambda_1=712-742$ nm，可调谐；FWHM~12 nm）和放大器输出的小部分（ $\lambda_2=803$ nm，FWHM~32 nm）分别作为泵和斯托克斯束。第二 OPA 的输出被用作探测束（ $\lambda_3=578$ nm）并被发送通过可以调整脉冲的带宽的脉冲整形器，例如可调节的狭缝。

斯托克斯和探测脉冲通过可以适宜地调整其相对时序的延迟级（delay stage）（DS1, DS2），然后所有三个束 170 通过 2 英寸凸透镜 L1（焦距 $f=200$ mm）聚焦到样品 110 上。通过 2 英寸消色差透镜（ $f=100$ mm）收集散射光 180 并将其聚焦到附着有液氮冷却的电荷耦合器件（CCD: Spec-10, Princeton Instruments）的光谱仪 140（Chromex Spectrograph 250is）的入射狭缝上。光谱仪 140 记录有关散射光 180 的信息，即光谱。光谱提供了样品中的分子的指纹，该样品产生对束的可检测的响应。光谱仪 140 与计算机系统（未示出）通讯，计算机系统数字存储光谱，并对其进行分析。基于光谱中的分析物信号的大小，计算机系统确定存在多少感兴趣的分析物。如在下面所详细描述，基于同样存在于样品中的“参考”分析物的信号的幅度，计算机系统可以可选地校准分析物信号的幅度。在量化了样品中的分析物的量之后，计算机系统或使用系统的用户可以基于分析物的量提出治疗过程，或提出有助于估计患者的健康情况的进一步的测量。

可以窄化探测脉冲的光谱以减小除了分析物之外的分子的信号，例如

在上述的 Science 上的文献所描述的。为了部分地弥补由狭缝引起的脉冲能量的牺牲，使用较厚的非线性晶体用于产生探测脉冲的频率转换过程，这导致开始的探测谱更窄，并由此导致脉冲整形器的更高的透光率。可替代地，第二 OPA 也可以被设置在基束中的第二谐波晶体所替代。或者，还可以使用在第一 OPA 中同时产生的其他波长以简化设置。

可替代地，可以通过单激光产生脉冲，来自该单激光的脉冲通过脉冲整形器。脉冲整形器将单激光脉冲分为两个泵脉冲和探测脉冲，根据需要调整脉冲的谱内容，并根据需要在脉冲之间引入期望的时间延迟。在本领域中，公知适宜的脉冲整形技术。

图 2 示意性示出了与图 1A 中示例的系统相似的 CARS 系统，但其中被分析的材料 205 替代地处于流束 (flow stream) 210 中。材料 205 为溶解到液体中的固体或气体、液体或气体，例如，例如血液、血浆、羊水或脊髓液的体液、或例如药液的合成材料。储存器 230 在材料 205 与液体介质混合并作为流束 210 流过流通池 (flow cell) 220 之前将其保持为固体形式。可替代地，在其流过流通池 220 之前，材料 205 可以作为由稀释液稀释的液体或气体保持在储存器 230 中。可替代地，保持在储存器 230 中的材料 205 自身在通过流通池 220 时可以为未稀释的气体或液体。被分析材料 205 的成分还可以被标记以有利于识别目标分子或分子种。存储器 230 可以为人体、动物体、桶、瓶或可以保持材料 205 的任何适宜的容器。

可选地通过流量检测仪 215 测量流束 210 的流速。可以通过本领域的技术人员公知的任何常规方法测量流速，该方法包括但不限于：激光多普勒流量测量、科氏流量计、超声波流量计、磁流量计以及机械流量计。虽然不需要，但流量检测可以通过流量检测器 215 测量并被电连接到处理器 160 用于分析。

材料 205 以流束 210 的形式流动通过具有适宜的光学特性的流通池 220，该适宜的光学特性允许光学测量被分析的材料 205，即，对于泵和探测束至少是部分透明的。流动池 220 可以为例如石英、玻璃或塑料流动池。可替代地，流动池 220 可以为导管、微流芯片或本领域的技术人员公知的

任何其他适宜的光学透明的流动池。应该注意，并不需要对于所有流量测量使用流动池。例如，流束 210 可以为低湍流的喷流，例如，在染料激光器中所近似使用的。对于本领域的技术人员而言，形成光学可接受的喷流的方法是显而易见的。

流束 210 可以被再循环并发送到储存器 230，或被导引到废物容器 (waste) (未示出)。来自相干喇曼激光系统 130 的光 170 经过流动池 220。通过检测器 140 检测喇曼信号 180。来自检测器 140 的信号被发送到微处理器 160 以有待进行分析。

光学无创技术，例如，相干喇曼光谱学，可以返回这样的信号，通过该信号可以量化分析物的浓度。例如，在相干喇曼光谱学中，信号的强度正比于分析物的浓度。然而，衰减、散射以及皮肤和其他组织对信号的干扰贡献会混淆喇曼光谱学对于定量测量特别是体内生物材料中的分析物的有用性。共焦聚焦提供了一种限制不希望的贡献的方法。在基础 II 型共焦配置中，物镜在样品平面的样本 (specimen) 上形成针孔的图像，其随后被相同的透镜成像到检测器针孔上。通过在共轭焦面中的显微镜光学轴上定位针孔，通过检测器针孔孔径基本上将检测限制为在焦平面附近发生的发射或散射，这基本上抑制了来自焦平面之外的离焦光。这样的测量系统有效地主要记录了在材料内从具有椭球形状的体积反射或透射的光。聚焦椭圆的长轴为沿光流 (optical flow) 或 z 轴并例如 x 和 y 轴的长度的大约两倍。通过选择共焦光学系统的适宜的数值孔径将共焦光学系统“询问”的体积设定到期望的值。数值孔径可以相对较大，例如，约 0.9。

II 型共焦配置使得能够从已知体积的材料确定喇曼谱。如果材料是同质的 (例如，血液)，加倍共焦体积就会近似加倍喇曼谱中的每一个峰的高度。如果可以足够精确地测量或建模通过皮肤的衰减，便可以确定通过喇曼共焦系统探测的分子种的绝对浓度。喇曼共焦光学系统由此可以确定分子种 (例如，血液分析物，例如，葡萄糖) 的相对和绝对浓度。

图 3 是其中通过 II 型共焦系统获得信号的实施例的示例性示例。在点扫描模式，仅仅分析样品上的点。为了能够以二维或三维共焦成像样本，

在样本内取样的点应该是可以移动的，并收集和存储产生的信号。通过扫描光学部件（optics）315 操纵来自相干喇曼激光系统 310 的光 305 以帮助扫描样品，并由此构建样品的共焦图像。

光 305 典型地包括准备（泵）脉冲和探测脉冲的对，例如，参考图 1A、1B 和 2 描述的。准备和探测脉冲的每一个的持续时间超短，例如，小于约 1 皮秒。可替代地，准备脉冲是超短的，例如，飞秒脉冲，而通过相移探测脉冲的谱分量或通过用例如光带宽滤波器、狭缝或本领域的技术人员公知的任何其他类型的空间光调制器来在光谱上窄化探测脉冲的频率带宽来在时间上拉伸探测脉冲。

扫描光学部件 315 包括一个或多个扫描镜，这些扫描镜通过类似于检流计的移动线圈机制的机制电机机械振荡，来帮助光栅扫描样品。在被扫描光学部件 315 操纵之后，光 305 通过在物镜 330 的后焦平面中的针孔孔径 320。物镜 330 将通过样品表面 350 的光 305 聚焦到焦平面 335。通过物镜 330 成像在焦平面附近的从样品发射或背散射的光，并通过双色镜或分光器 360 将光导引向针孔孔径 340，该针孔孔径 340 位于物镜 330 的后共轭平面以有助于抑制来自焦平面 335 之外的体积的光。然后通过检测器 345 检测通过针孔孔径 340 的发射或散射的光。在另一共焦配置中，通过样品中的相干喇曼过程的非线性响应来功能性地替代针孔孔径 320 和/或 340，即，仅仅焦点具有足够强度的光以提供 CARS 信号。

可以通过采用转移样品台（未示出）并保持光 305 基本固定（台扫描）来获得相干喇曼系统的共焦扫描操作。可以使用提供光 305 和样品的相对移动的其他配置。例如，扫描光学部件 315 可以包括扫描镜，所述扫描镜位于与物镜 330 的后焦平面共轭的扫描透镜的后焦平面中。或者，例如，在固定样品之上扫描物镜 330 自身，而光 305 基本保持静止（扫描透镜系统）。在另一可替代的实施例，在扫描光学部件 315 中采用两个扫描镜（未示出）。依赖于使用的镜的距离和类型，可能需要光学中继系统以在两个镜之间传导光 305。

通过物镜 330 控制样品内的焦平面 335 的位置（例如，焦平面的深度），

其可选地通过检测器 345 观察的信号来获知。例如，如果用户想把焦平面设置在皮肤中的基层角质层处，可以移动物镜 330 直到检测到来自毛细血管中的血色素的喇曼信号。一旦到达希望的深度，便开始搜索细菌标志物例如脂多糖的指示剂。

如上所述，从体内样品获得的信号可以被例如温度、水合和成分的因子动态衰减。使用下面详细描述在校准技术用于图 3 的系统或这里描述的任何的其他系统来增强测量的精确度。

图 4 是用于图像制导光谱检测的 CARS 系统的示意图。相干喇曼系统与成像系统相组合。成像光源 455 将成像光 480 发射到双色镜 415，以便成像光基本上与光 405 共线。光源 455 例如为白光源、二极管或激光。来自相干喇曼激光系统 410 的光 405 和成像光 480 被导引通过扫描光学部件 420。扫描光学部件 420 与上述的扫描光学部件 315 相同或相似。光 405 和成像光 480 通过针孔孔径 425，并通过物镜 440 聚焦以照射样品 488。光至少部分透过样品表面 490，例如人皮肤和组织，并聚焦到例如人或动物体内的样品 488 内的焦平面 495 上。如在权利要求中所使用的，“动物体”表示人和动物。

通过双色镜或分光器 435 将来自焦平面 495 附近的被照射的体积的喇曼信号导引通过针孔孔径 445 到达检测器 450。针孔孔径 445 位于物镜 440 的后焦平面。在另一实施例中，检测器针孔不是必须的，因为非线性 CARS 过程产生紧密聚焦体积（tight focal volume）。同样，non-descan 部分允许检测器靠近物镜。通过物镜 440 成像从焦平面反射或散射的成像光 480，并通过双色镜 430 将其导引到成像检测器 460，例如 CCD 或 CMOS 相机。成像检测器 460 产生的信号被发送到图像处理器控制器 465 用于分析。图像处理器控制器 465 还与物镜 440 通讯和/或与样品转移台（如果存在）（未示出）通讯，并可以指示透镜 440 和/或样品转移台移动到特定的位置从而辐射感兴趣的样品部分。在美国专利 7,217,266 中描述了另一适宜的成像系统，将其全部内容并入到这里作为参考。

图 3 的实施例适宜用作例如医疗诊断或治疗处置设备的一部分，以定

位期望的位置，例如，人体或动物体内的血管。一旦定位了期望的位置，可以发出相干喇曼脉冲序列以获得辐射的体积内的目标分子的喇曼谱。这里描述的设备特别适用于测量血糖水平、心脏生物标志物、尿内生肌酐清除率、菌株存在和染色体异常、或神经退行性疾病生物标志物。使设备适用于上述应用而做出的修改仅仅需要常规实验。

在可替代的配置中，还可以以用于成像的复用形式利用相干喇曼激光系统 405。具体而言，通过从跨整个样品的点获得喇曼谱，来获得样品的“喇曼成像”。每一个谱为在样品中的该点处存在的分子响应于该束的“指纹”。计算机系统或用户可以使用这些谱确定样品的结构，并获得特别感兴趣的点处的附加的测量，以尝试例如量化存在于该点处的感兴趣的分析物的量。例如，“喇曼成像”可以指示样品中的特定的点包含的胶原质基本上多于血色素，而样品中的其他点包含的血色素基本上多于胶原质。具有更多血色素的点可能包含血管，用户便可以尝试获得来自血管的附加的信息，例如，测量血管中的葡萄糖。

图 5 是适于内镜光谱检测的设备的另一实施例的示意图。将图 4 的相干喇曼和成像系统与光纤 505 和内镜探测器 510 组合。可以将这样的探测器插入到例如子宫中以分析羊水而不刺穿羊膜囊。可替代地，将探测器插入通过腹部。通过超声波成像来导引这两种过程。一旦探测器到达可以分析胎儿组织或羊水的位置，发射相干喇曼脉冲序列以光谱检测三体性或其他遗传缺陷的染色体标志物。还可以比较来自胎儿组织或羊水的喇曼信号与来自羊膜外侧的母体组织。

使用这里描述的设备用于定量体内测试生物体液和组织，用于确定生化或血液学特征，或测量蛋白质、激素、碳水化合物、脂质、药物、毒素、气体、电解质等的浓度。如果分析物的绝对浓度是恒定的，分析物的无创测量同样是恒定的，检测的信号的变化直接与潜在的分析物的变化相关。该变化仅依赖于分析物的浓度和检测方法。然而，在实践中，恒定浓度的分析物的检测信号不是恒定的。当信号从其源到分析物然后到检测器传送时，会发生信号衰减。在这里描述的测量中，当在体内应用时，检测的光

必须传输通过各种类型的组织，每一种都会以动态的方式衰减信号。例如，皮肤温度、水合和分析物成分都将随时间变化，并可以造成衰减水平的变化。此外，人与人之间这些变化是不同的。

可以使用校准方法修正该动态衰减。具体而言，为了测量生理或医疗相关分析物（“目标分析物”）的绝对浓度，使用参考分析物来校准目标分析物的浓度测量。假设目标分析物具有商业或标准方法来确定其绝对浓度。通过这里描述的一种或多种无创检测方法在目标位置检测参考分析物和目标分析物二者的丰度（abundance）。通过本领域的技术人员公知的任何常规方法，例如，酶测定法、HPLC、电化学测定或质谱来测量目标分析物的浓度。选择的参考分析物的浓度不应该随时间发生明显变化（例如，在大于1天或大于1周的时间内不发生明显变化），并且，在一个实施例中，在身体中自然产生。然而，通常，许多自然产生的分析物将随时间变化。还可以使用合成或自然产生的分析物，只要其浓度相对于希望的测量周期（ τ ）不改变或缓慢改变。

在一个实施例中，校准方法包括下列步骤：

1. 使用适宜的常规方法首先在时间（ t_0 ）测量目标分析物以初始测量目标分析物的绝对浓度 $[C_T(t_0)]$ 。

2. 在同时或近似同时，通过这里描述的无创技术中的一种，例如，使用测量来自人或动物体的信号的图3的系统，测量来自参考分析物 $[S_R(t_0)]$ 和目标分析物 $[S_T(t_0)]$ 的信号。

3. 在之后的时间（ t ）其中 $t_0 < t < \tau$ ，测量来自参考分析物 $[S_R(t)]$ 和目标分析物 $[S_T(t)]$ 的信号。

4. 根据公式 $\alpha_R(t, t_0) = [S_R(t_0)] / [S_R(t)]$ 计算时间（ t ）的衰减因子。这给出了参考信号的相对衰减。假设 $C_R(t)$ 随时间缓慢变化，即 $C_R(t) = C_R(t_0)$ 。

5. 假设在时间（ t ）时来自目标分析物的信号的强度经历了与参考分析物相同的衰减，即， $\alpha_T = \alpha_R$ 。由此，通过公式 $\bar{S}_T(t) = \alpha_R(t, t_0) S_T(t) = \alpha_T(t, t_0) S_T(t)$ 修正 $S_T(t)$ 。 $\bar{S}_T(t)$ 是来自目标分子的信号，使得从时间 t_0 到 t 衰减没有改变；假设仅有的对值的改变的贡献来自分析物的浓度改变。

6. 假设信号正比于浓度，即， $C(t)$ 正比于 $S(t)$ 。那么， $C_T(t)/\bar{S}_T(t) = C_T(t_0)/S_T(t_0)$ ，这意味着 $C_T(t) = [\bar{S}_T(t)/S_T(t_0)]C_T(t_0) = \alpha_R(t)[S_T(t)/S_T(t_0)]C_T(t_0)$ 。

7. 由此，可以通过下列公式确定在时间 (t) 的目标分子的绝对值浓度测量：

$$[C_T(t)] = \frac{S_R(t_0)S_T(t)}{S_R(t)S_T(t_0)}C_T(t_0)$$

8. 在期望的时间周期 (τ) 结束时，重复步骤 1。

在该方法中，假设参考信号在时间窗口 τ 是恒定的，并且在光学窗口中的所有信号受到了相同的乘性衰减。实际上，后一假设不总正确。不符合乘性衰减假设并且等于检测的分析物的浓度的导出量将足够满足。例如，检测的 CARS 信号的强度由下列公式给出：

$$I_{CARS}(\Omega) = (\chi_R^{(3)}(\Omega))^2 + (\chi_{NR}^{(3)})^2 + 2\text{Re}(\chi_R^{(3)}(\Omega))\chi_{NR}^{(3)} \dots$$

该公式中的第一项为共振项，其依赖于目标分子的数目的平方并依赖于频率，并且在共振时最大。第二项为非共振项，并近似与频率无关。最后一项为色散 (dispersive)，被示为在共振时消失。远远偏离共振时，中间项可以被独立出来。由此导出量 $\chi_R^{(3)}(\Omega) = \sqrt{I_{CARS}(\Omega_R) - I_{CARS}(\Omega_{\text{偏离共振}})}$ 正比于目标分子浓度，并真正满足乘性假设。

使用这里阐述的光谱方法和系统来例如用于无创测量体内葡萄糖浓度。使用 HbA1c 作为校准标准。HbA1c 为与葡萄糖紧密结合的血色素 A 的亚型。葡萄糖的反向反应或从血色素的分解进行得相对缓慢，因此，该亚型的构建通常将持续大约 4 周。人体血液中的 HbA1c 具有~120 天的半衰期，因此适宜用作这里描述的无创光谱方法的校准标准。在这里描述的方法中可以采用的其他适宜的且长寿命的种，例如果糖胺，这对于本领域的技术人员是显而易见的。

还可以使用这里阐述的方法和系统来例如获得来自流量管 (flow tube) 中包含的尿样品的相干喇曼信号。设置为从患者收集尿液输出的导管将尿流导引通过流量计，然后通过用于喇曼检测的光学透明的部分。在尿液中

的肌酐清除率测量的情况下，流速和瞬时肌酐浓度的乘积给出了期望的清除率，即，单位时间清除的肌酐的血浆的期望体积。可以通过邻近的参考单元、通过内部标志物例如尿素、或通过这些方法的组合，来校准肌酐浓度的绝对值。

已经全面描述了本发明，可以对其进行修改和改变而不背离本发明的精神和范围，这对于本领域的技术人员将是显而易见的。其他实施例包含在下列权利要求中。

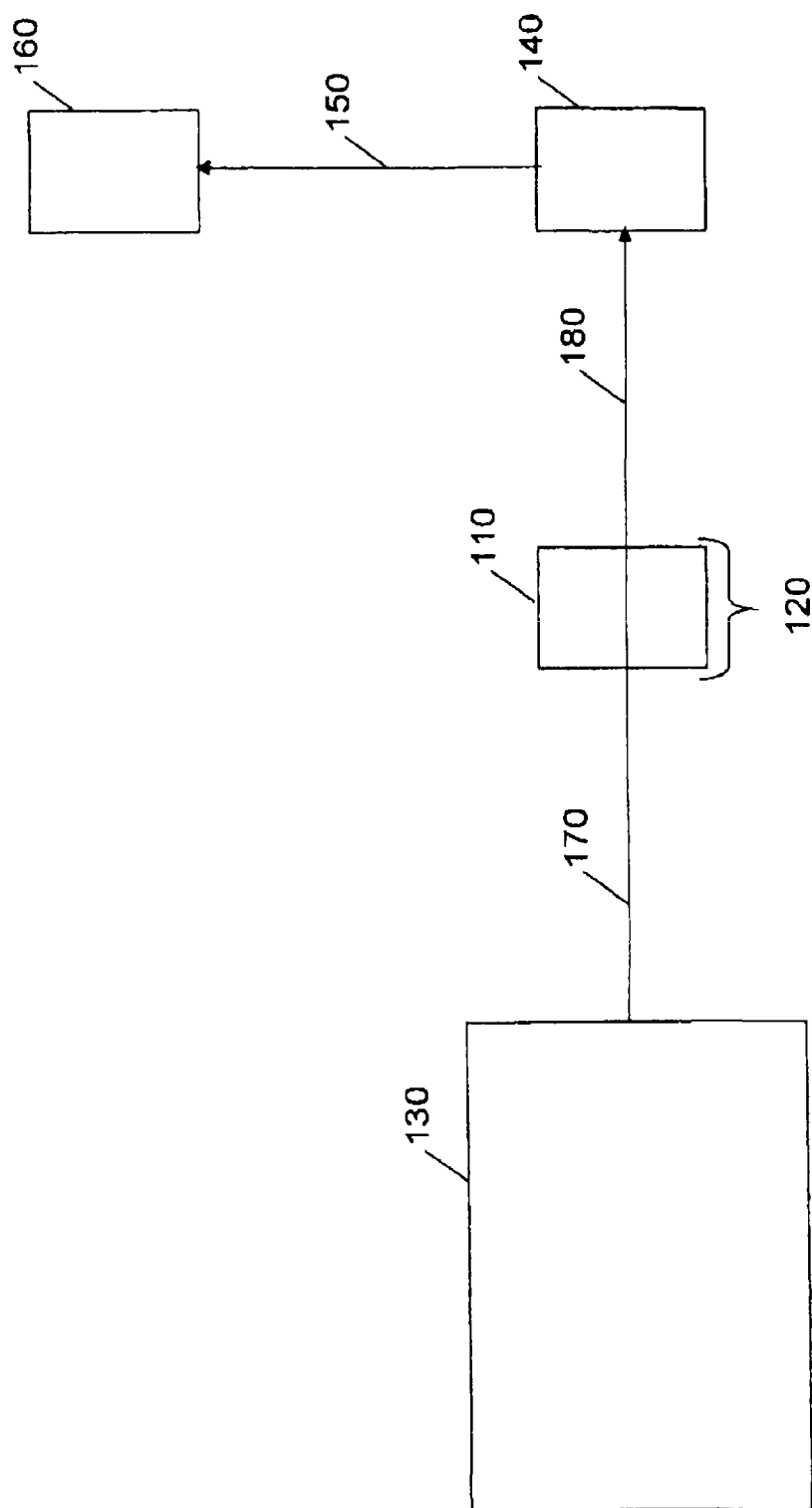


图 1A

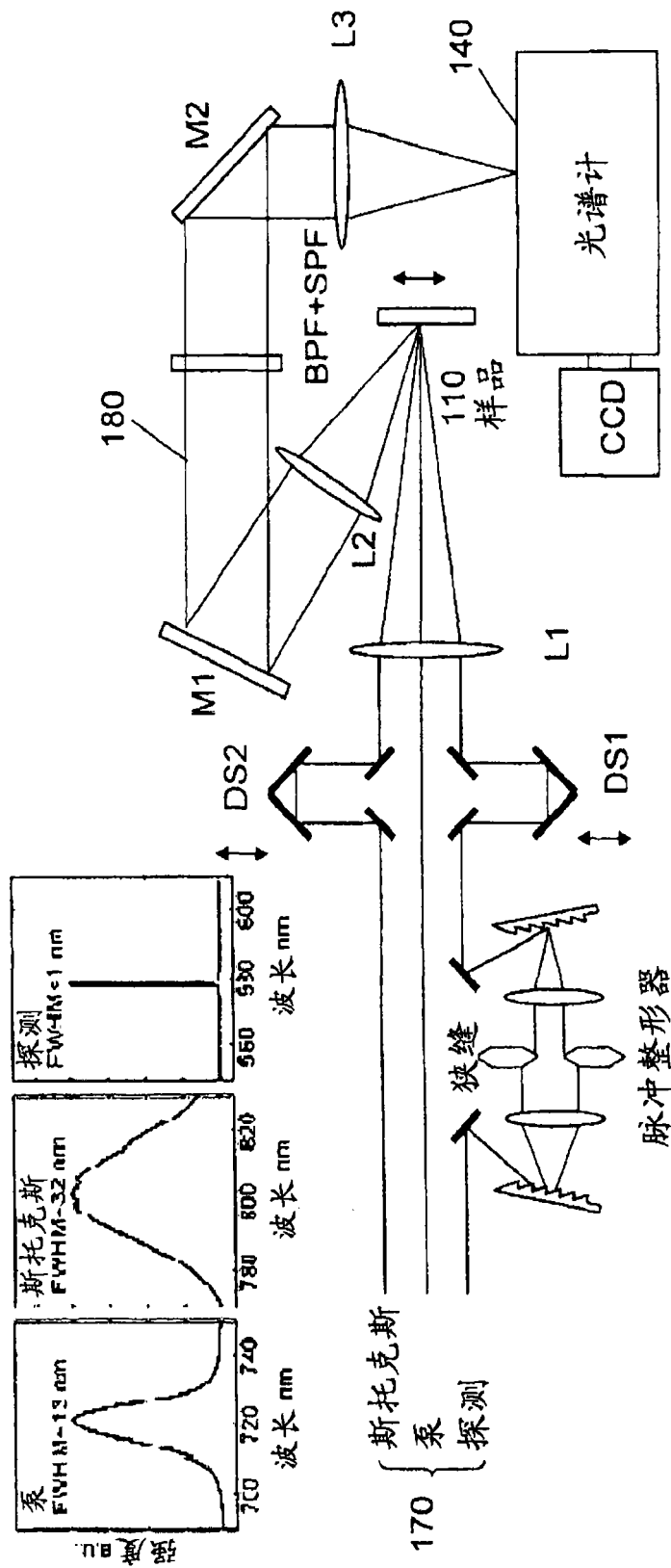


图 1B

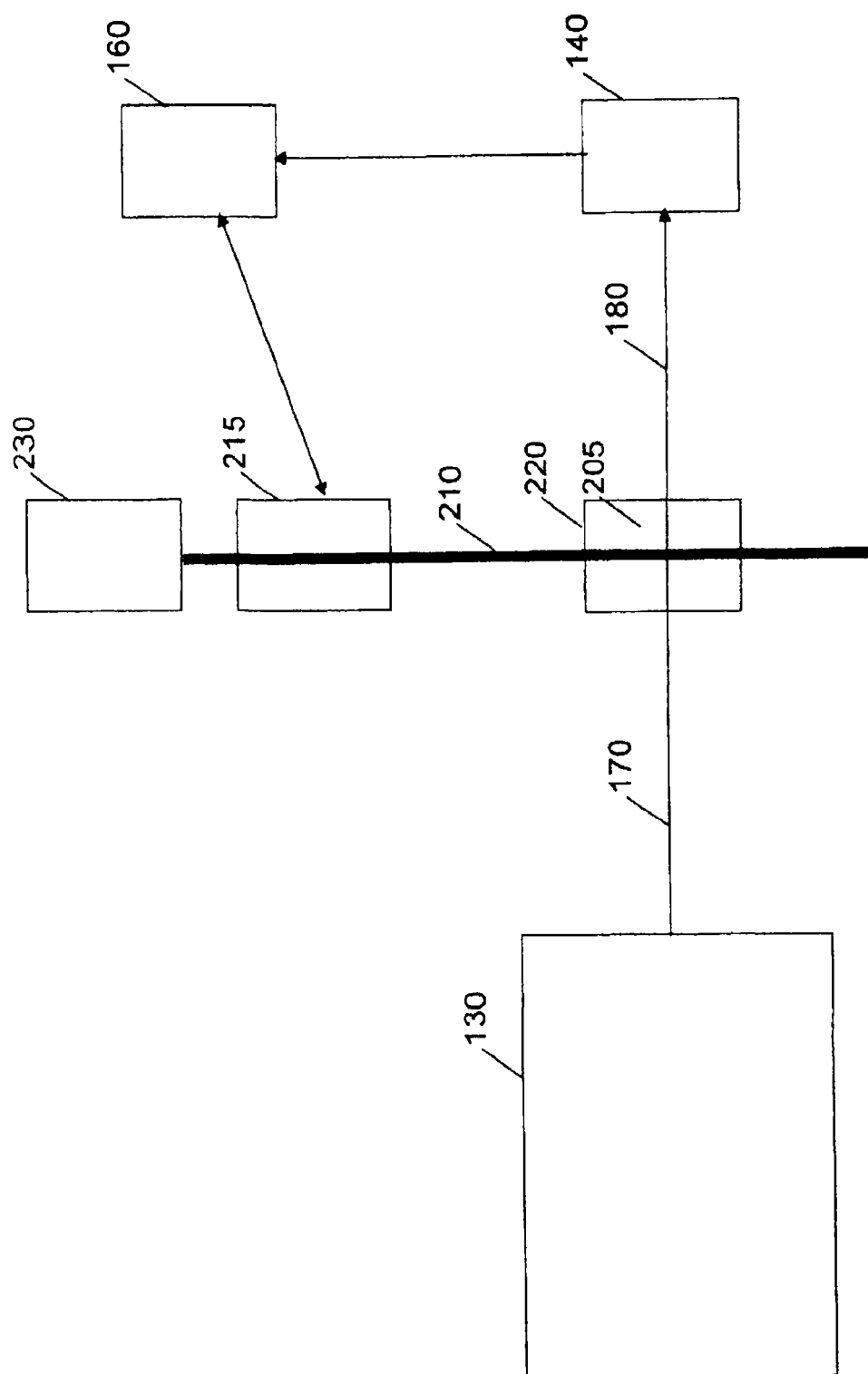


图 2

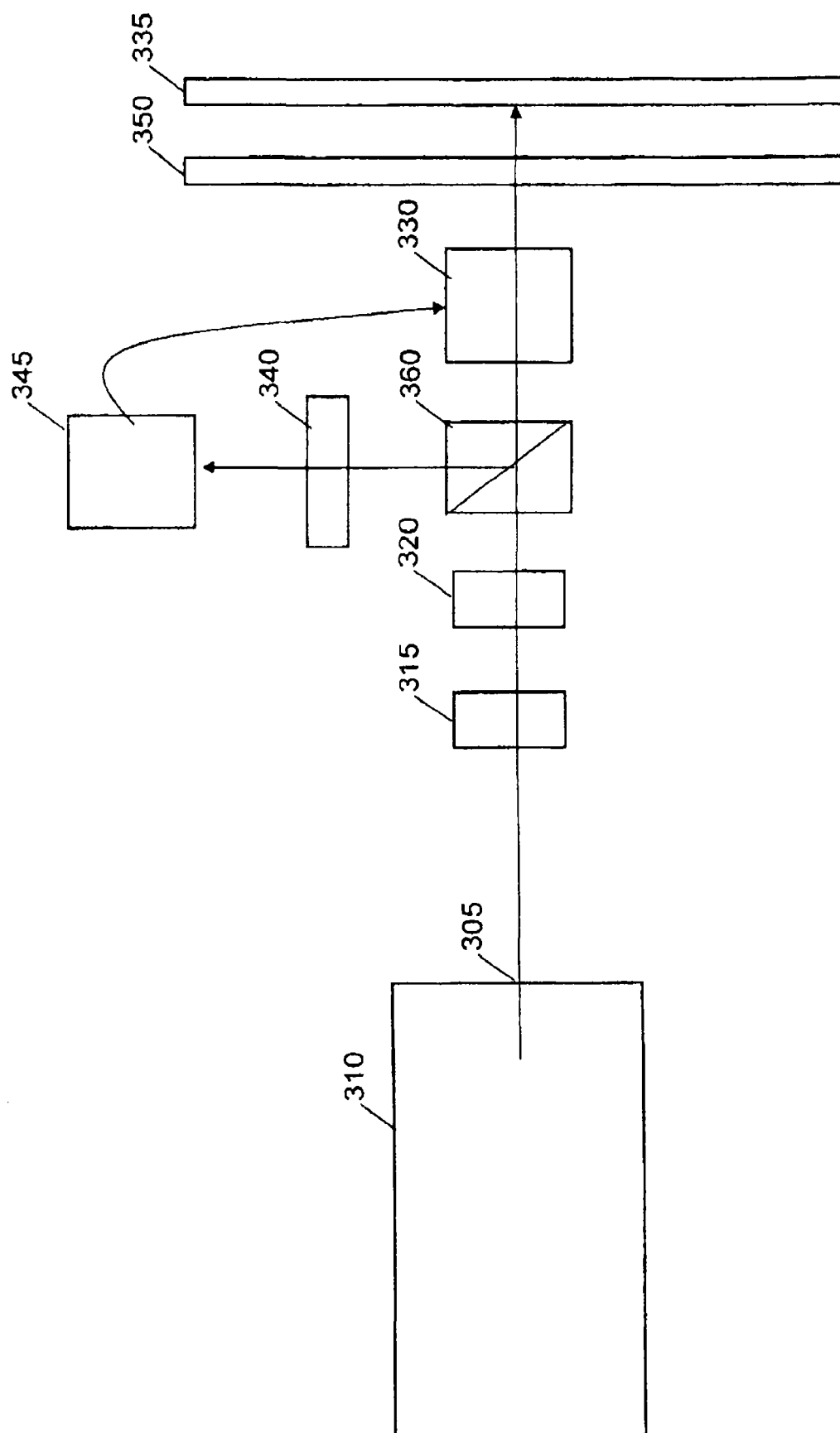


图 3

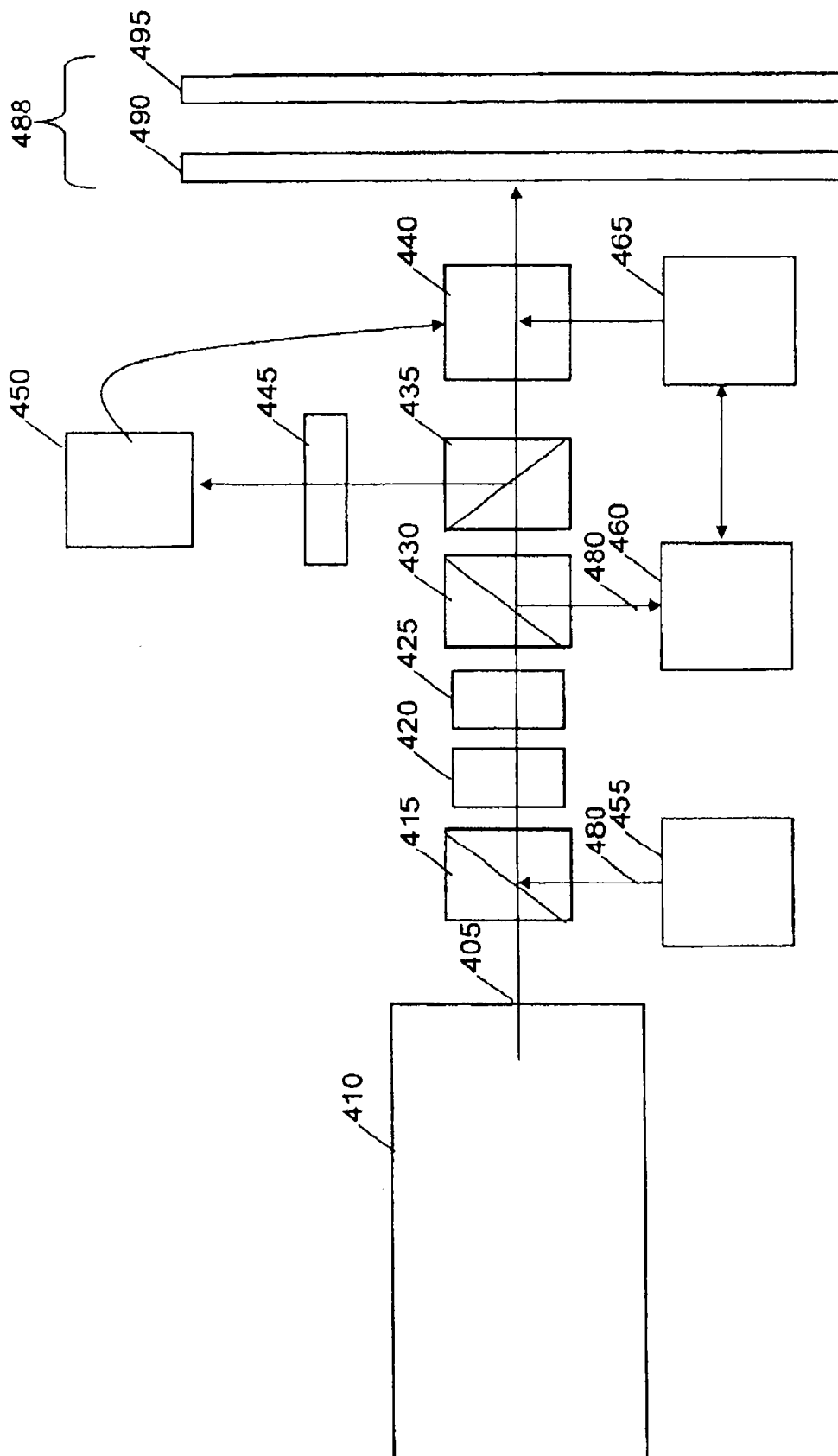


图 4

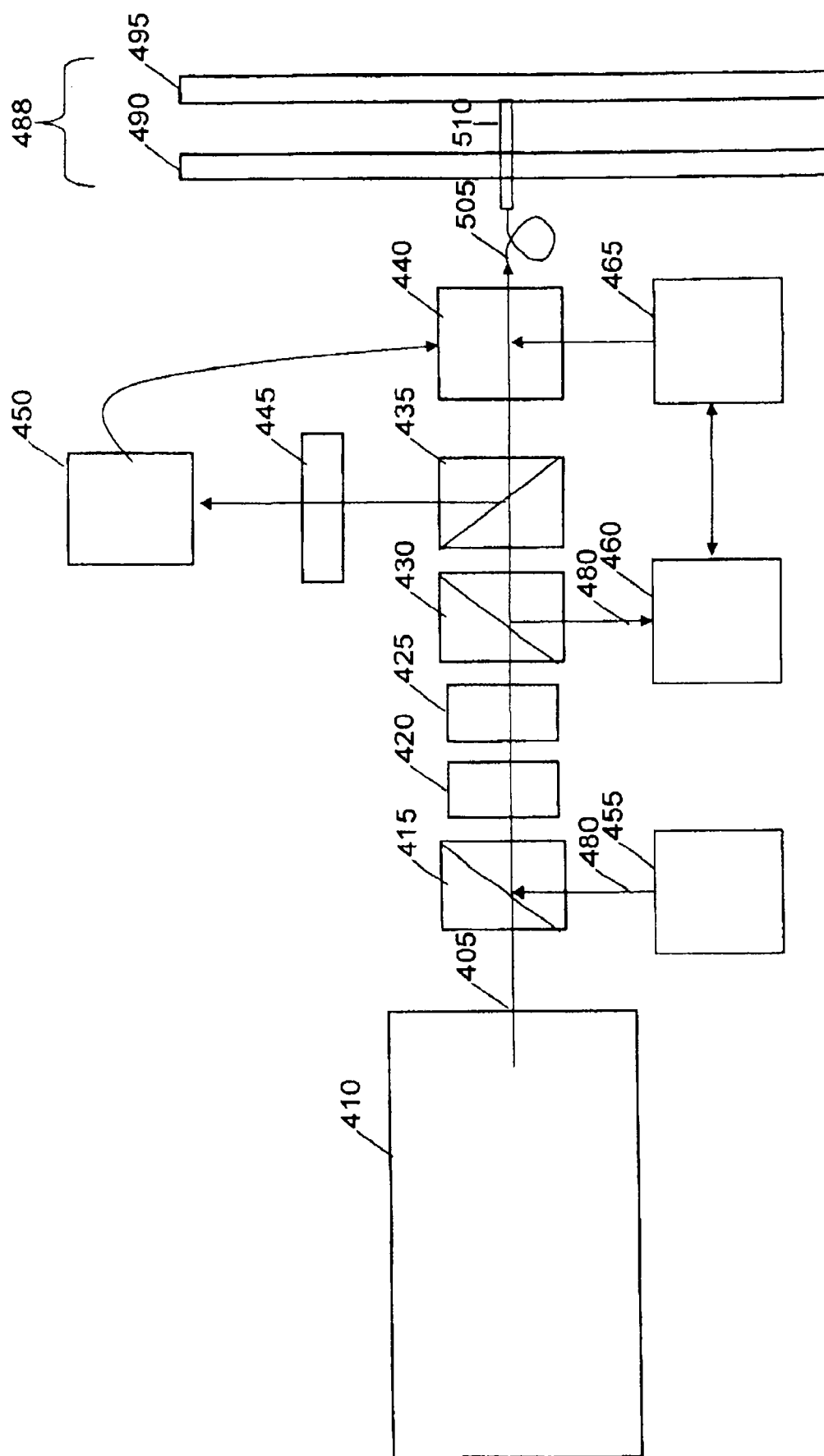


图 5

专利名称(译)	使用相干喇曼技术及其校准技术用于医疗诊断和治疗目的		
公开(公告)号	CN101605494A	公开(公告)日	2009-12-16
申请号	CN200780044146.4	申请日	2007-10-29
[标]发明人	IW亨特尔 S索马鲁 S拉方丹 PA安克蒂尔		
发明人	I·W·亨特尔 S·索马鲁 S·拉方丹 P·A·安克蒂尔		
IPC分类号	A61B5/00		
CPC分类号	A61B5/412 A61B5/418 A61B5/415 A61B5/0066 A61B5/0075		
代理人(译)	杨晓光 周良玉		
优先权	60/855032 2006-10-27 US 60/855033 2006-10-27 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

提供了系统和方法以使用喇曼光谱学进行无创、实时、连续分子检测和量化样品或动物体中的分子种。可以应用这样的系统和方法识别可量化在体中发现的分子种，这对于产前诊断、检测深层皮肤感染、进行脑脊液评价、测量动脉血气、血糖、心脏生物标志物、肌酐流量都非常有用。连续实时地无创量化这样的分子种可以使得治疗过程显著地比现有方法更具有吸引力。

