

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580047024.1

[51] Int. Cl.

G01N 21/65 (2006.01)

G01N 21/49 (2006.01)

G01N 21/47 (2006.01)

A61B 5/00 (2006.01)

[43] 公开日 2008 年 1 月 30 日

[11] 公开号 CN 101115986A

[22] 申请日 2005.11.25

[21] 申请号 200580047024.1

[30] 优先权

[32] 2004.12.9 [33] GB [31] 0426993.2

[32] 2005.4.11 [33] US [31] 60/669,880

[86] 国际申请 PCT/GB2005/004529 2005.11.25

[87] 国际公布 WO2006/061565 英 2006.6.15

[85] 进入国家阶段日期 2007.7.23

[71] 申请人 科学技术设备委员会

地址 英国牛津郡

[72] 发明人 帕维尔·马陶谢克

安东尼·维廉·帕克

[74] 专利代理机构 北京三友知识产权代理有限公司

代理人 李 辉

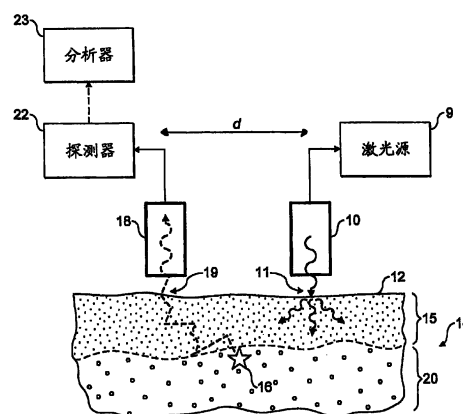
权利要求书 8 页 说明书 20 页 附图 12 页

[54] 发明名称

对次表面组织和液体的拉曼光谱分析

[57] 摘要

本发明涉及对次表面组织和液体的拉曼光谱分析。公开了用于在体内确定人体或动物体中的次表面组织或液体的特性的装置和方法。在表面上的一个或多个进入区提供入射辐射，并且从与所述进入区隔开的一个或多个收集区收集光。在所收集的光中探测拉曼特征，并且根据该拉曼特征得出深度相关信息。



1. 一种透过漫散射上覆组织在体内确定次表面组织或液体的一个或更多个特性的方法，所述方法包括以下步骤：

(a) 在所述上覆组织的表面上的进入区提供入射光；

(b) 从所述表面上的收集区收集在所述上覆组织内散射的光，所述收集区与所述进入区隔开；以及

(c) 在所收集的光中探测与所述入射光在光谱上相关的源自所述次表面组织的一个或更多个拉曼特征。

2. 如权利要求1所述的方法，所述方法还包括：根据所述拉曼特征来确定所述次表面组织或液体的所述特征。

3. 如权利要求1或2所述的方法，其中，所述次表面组织或液体包括骨骼、软骨、乳房组织以及血液中的一种。

4. 如权利要求1、2或3所述的方法，其中，所述上覆组织包括皮肤和指甲之一。

5. 如任一前述权利要求所述的方法，其中，所述探测步骤包括：对所收集的光进行光谱色散，以形成拉曼光谱。

6. 如权利要求1至4中任一项所述的方法，其中，所述探测步骤包括：对所收集的光进行过滤，以将所述拉曼光谱特征中的一个或更多个分开。

7. 如任一前述权利要求所述的方法，其中，所述收集步骤包括：按所述进入区和所述收集区之间的表面上的多个间隔收集光。

8. 如权利要求7所述的方法，其中，确定所述特性包括：将根据不同间隔的拉曼特征与所述上覆组织和次表面组织或液体内的不同深度或深度分布相关联。

9. 如权利要求7所述的方法，其中，确定所述特性包括：将根据不同间隔的拉曼特征相组合，以针对深度或深度分布进行选择。

10. 如任一前述权利要求所述的方法，其中，所述收集步骤包括：从与一共同进入区隔开不同距离的多个收集区收集光。

11. 如任一前述权利要求所述的方法, 其中, 一个或更多个收集区围绕进入区。

12. 如权利要求 11 所述的方法, 其中, 各收集区均为环, 并且所述散射光被多个收集用光纤收集, 所述多个收集用光纤围绕用于向所述进入区提供入射辐射的一个或更多个照射用光纤分布。

13. 如权利要求 1 至 9 中任一项所述的方法, 其中, 一个或更多个进入区围绕一共同收集区。

14. 如任一前述权利要求所述的方法, 所述方法还包括: 对布置在所收集的光的路径上的收集用光学器件进行调节, 来调节收集区与进入区之间的距离。

15. 如任一前述权利要求所述的方法, 所述方法还包括: 在所述收集区之外、所述上覆组织的表面附近布置一个或更多个反射镜元件以将光反射回所述组织中。

16. 一种在体内测量漫散射组织的次表面拉曼光谱的方法, 所述方法包括以下步骤:

a) 利用入射辐射的光探针照射所述组织;

b) 收集被所述组织散射的光; 以及

c) 对所收集的光的至少一部分进行光谱分离, 以探测一个或更多个拉曼光谱特征, 其中被所述组织散射的光是从所述组织的表面上的多个空间位置处收集的, 各空间位置距照射点的距离不同, 在各空间位置处收集的所述光的至少一部分被单独地进行光谱色散以形成多个拉曼光谱, 并且其中所述方法还包括下述步骤:

d) 对所述多个拉曼光谱进行分析以提取与所述组织的次表面区域的拉曼光谱有关的信息。

17. 如任一前述权利要求所述的方法, 其中, 收集到至少两个拉曼光谱并使用定标相减对其进行分析, 将在与所述照射点距离最近处收集的拉曼光谱从与所述照射点距离较远处收集的拉曼光谱中减去, 由此识别出所述组织的次层的拉曼光谱的特征。

18. 如权利要求 1 至 16 中任一项所述的方法, 其中, 针对所述组织

的表面的化学组成的拉曼光谱是已知的，并且通过从所收集的光的拉曼光谱中定标减去所述已知拉曼光谱来对所述拉曼光谱进行分析。

19. 如权利要求 1 至 16 中任一项所述的方法，其中，利用多元数据分析对所述多个拉曼光谱进行分析。

20. 如权利要求 19 所述的方法，其中，利用主成分分析对所述多个拉曼光谱进行分析。

21. 如权利要求 19 或 20 中任一项所述的方法，其中，在距所述照射点不同的距离处收集至少二十个拉曼光谱。

22. 如前述权利要求中任一项所述的方法，其中，以两个或更多个不同波长照射所述组织，并且所收集的光是拉曼光谱与荧光的组合，并且其中所述方法还包括从所收集的光中提取所述拉曼光谱的步骤。

23. 如前述权利要求中任一项所述的方法，其中，使所述组织、所述收集用光学器件和所述照射点或照射区域中的至少一个相对于其余的进行移动，从而能够在距所述照射点不同的距离处收集拉曼光谱。

24. 如权利要求 23 所述的方法，其中，提供其上安放有所述组织的可移动台，并安排所述探测光束来追踪所述组织的移动，由此所述组织相对于用于在距所述照射点不同的距离处收集散射光的固定的收集用光学器件进行移动。

25. 如权利要求 24 所述的方法，其中，所述散射光是从距所述照射点距离不同的点区域收集的。

26. 如权利要求 24 所述的方法，其中，所述散射光是从多条基本平行的线收集的，所述多条基本平行的线基本与从所述照射点测得的距离成横向。

27. 如权利要求 16 至 23 中任一项所述的方法，其中，使用光纤来提供所述探测光束，并使用围绕所述探测光束光纤排列成多个同心圆的光纤来收集所述散射光，由此在距所述照射点的不同半径处的同心环中收集所述散射光。

28. 如前述权利要求中任一项所述的方法，其中，结合使用光谱仪和电荷耦合器件照相机对所收集的光进行光谱色散。

29. 如前述权利要求中任一项所述的方法，其中，所述光探针或入射辐射是利用连续波激光器产生的。

30. 如权利要求 23 所述的方法，其中，所述光探针包括两个或更多个单独的波长并且是由一个或更多个激光器产生的。

31. 如权利要求 30 所述的方法，其中，所述光探针是由单个可调谐激光器产生的。

32. 如权利要求 30 所述的方法，其中，所述光探针的所述两个或更多个单独的波长是由两个或更多个对应的激光器产生的。

33. 如任一前述权利要求所述的方法，其中，所述入射辐射具有大于 600nm 的波长。

34. 如任一前述权利要求所述的方法，其中，所述入射辐射具有大于 800nm 的波长。

35. 一种确定患者在目标组织中是否有癌病变的方法，所述方法包括：

执行任一前述权利要求的步骤，以在所述目标组织中测量癌病变所特有的一个或更多个拉曼光谱特征；以及

基于所述拉曼光谱特征，确定所述患者在所述目标组织中是否有癌病变。

36. 一种确定患者是否有与该患者的骨骼组织有关的医学病变的方法，所述方法包括：

执行任一前述权利要求的步骤，以测量所述骨骼组织所特有的一个或更多个拉曼光谱特征；以及

根据所述拉曼光谱特征，确定所述患者是否有骨骼组织病变。

37. 一种在无外科手术介入的情况下对次表面组织或液体执行体内皮下检查的方法，所述方法包括：

利用探测光束照射表面组织；

从所述表面上的与所述探测光束隔开的一个或更多个收集区收集在所述表面下散射的光；以及

从所收集的光中探测一个或更多个拉曼光谱特征。

38. 如权利要求 37 所述的方法, 其中, 所述次表面组织或液体是骨骼、软骨、乳房组织以及血液中的一种。

39. 如权利要求 37 或 38 所述的方法, 其中, 所述收集区与所述探测光束不重叠。

40. 一种透过漫散射上覆组织在体内确定次表面组织或液体的一个或更多个特性的装置, 所述装置包括:

光源, 其被布置成在所述上覆组织的表面上的进入区提供入射光;

收集器, 其被布置成从所述表面上的收集区收集在所述上覆组织内散射的光, 所述收集区与所述进入区隔开; 以及

探测器, 其被布置成探测与所述入射光在光谱上相关的源自所述次表面组织或液体的一个或更多个拉曼特征。

41. 如权利要求 40 所述的装置, 所述装置还包括分析器, 所述分析器适于从所述拉曼特征推导出所述次表面组织或液体的一个或更多个特性。

42. 如权利要求 41 所述的装置, 所述装置适于根据所述进入区与所述收集区之间的多个间隔来收集光, 所述分析器适于组合根据所述多个间隔的拉曼特征, 从而针对一深度或深度分布进行选择。

43. 如权利要求 40、41 或 42 所述的装置, 其中, 所述次表面组织包括骨骼、软骨、乳房组织以及血液中的至少一种。

44. 如权利要求 40 至 43 中任一项所述的装置, 其中, 所述上覆组织包括皮肤和指甲中的至少一种。

45. 如权利要求 40 至 44 中任一项所述的装置, 其中, 所述探测器包括光谱仪, 所述光谱仪被布置成对所收集的光进行光谱色散以分离出所述拉曼特征。

46. 如权利要求 40 至 44 中任一项所述的装置, 其中, 所述探测器包括被布置成选择所述拉曼特征的一个或更多个滤波器。

47. 如权利要求 40 至 46 中任一项所述的装置, 其中, 所述进入区或所述收集区是围绕这两个区域中的另一个区域的环形区域。

48. 如权利要求 47 所述的装置, 所述装置还包括光学设置, 所述光

学设置适于可控地调节所述环形区域的直径。

49. 如权利要求 40 至 48 中任一项所述的装置，所述装置还包括蔽光装置，所述蔽光装置被布置成可控地调节所述进入区与所述收集区之间的间隔。

50. 如权利要求 40 至 48 中任一项所述的装置，所述装置还包括一个或多个反射镜元件，所述一个或多个反射镜元件被布置在所述一个或多个收集区和进入区之外且与所述上覆组织的表面邻近，用以将光反射回所述组织。

51. 一种对在漫散射组织内的不同深度处产生的拉曼光谱进行体内选择性测量的装置，所述装置包括：

光源（1），其利用入射辐射的探测光束来照射所述组织；

收集用光学器件，用于收集被所述组织散射的光，并将其传递到光谱仪；

探测装置，用于探测被所述光谱仪色散的光；

其中，所述装置适于在所述组织的表面上的多个空间位置处收集散射光，各空间位置距照射点的距离不同，并且所述光谱仪（2）对在各空间位置处收集的光的至少一部分单独地进行光谱色散以形成多个拉曼光谱，并且其中所述装置还包括分析器（4），所述分析器（4）用于从所述多个拉曼光谱中识别所述组织（6，7）的次层的拉曼光谱所特有的特征。

52. 如权利要求 51 所述的装置，其中，所述分析器适于执行拉曼光谱之间的定标相减。

53. 如权利要求 51 所述的装置，其中，所述分析器适于对所述拉曼光谱进行多元数据分析。

54. 如权利要求 53 所述的装置，其中，所述分析器适于对所述拉曼光谱进行主成分分析。

55. 如权利要求 51 至 54 中任一项所述的装置，所述装置还包括可移动台，所述可移动台用于使所述组织、所述收集用光学器件和所述照射点中的至少一个发生相对移动，从而能够在距所述照射点不同的距离处收集拉曼光谱。

56. 如权利要求 55 所述的装置, 其中, 所述可移动台是可移动样本台, 并且其中设置有针对所述组织的移动来追踪所述探测光束的装置, 由此所述样本可相对于固定的收集用光学器件进行移动从而能够在距所述照射点的多个不同距离处收集散射光。

57. 如权利要求 51 至 54 中任一项所述的装置, 其中, 所述收集用光学器件包括围绕所述探测光束布置成多个同心圆的光纤。

58. 如权利要求 51 至 57 中任一项所述的装置, 其中, 所述光源是连续波激光器。

59. 如权利要求 51 至 58 中任一项所述的装置, 其中, 所述探测装置包括电荷耦合器件照相机。

60. 如权利要求 40 至 59 中任一项所述的装置, 其中, 所述入射辐射具有大于 600nm 的波长。

61. 如权利要求 40 至 60 中任一项所述的装置, 其中, 所述入射辐射具有大于 800nm 的波长。

62. 一种在无外科手术介入的情况下对次表面组织执行体内检查的医学皮下检查装置, 所述装置包括:

探测光束源, 其被布置成照射表面组织;

收集器, 其被布置成从所述表面上的与所述探测光束隔开的一个或更多个收集区收集在所述表面下散射的光; 以及

探测器, 其被布置成从所收集的光中探测一个或更多个拉曼光谱特征。

63. 如权利要求 62 所述的装置, 其中, 所述收集区与所述探测光束不重叠。

64. 如权利要求 62 或 63 所述的装置, 所述装置还包括分析器, 所述分析器被布置成根据所述拉曼光谱特征推导出所述次表面组织的一个或更多个特性。

65. 如权利要求 40 至 61 中任一项所述的装置, 所述装置被实现为内窥镜, 所述内窥镜通过自然的或经外科手术形成的孔进入从而在体内进行检查。

66. 一种诊断方法，所述诊断方法包括：使用如权利要求 1 至 39 中任一项所述的方法，从样本收集一个或多个拉曼光谱，所述样本由上覆组织的表面区域和与所述上覆组织不同的深层组织的次层区域构成。

67. 如权利要求 66 所述的诊断方法，所述诊断方法还包括：在所述一个或多个所收集的拉曼光谱中识别所述样本（6、7）的次层区域的拉曼光谱所特有的一个或多个特征，并且将所述一个或多个所识别的特征与从健康控制样本获得的特征进行比较。

对次表面组织和液体的拉曼光谱分析

技术领域

本发明涉及通过探测漫散射光的拉曼特征来确定体内次表面组织的特性的方法和装置。例如，所述方法和装置适于透过皮肤、指甲或其它表面组织来探测体内骨骼的拉曼光谱特征，而不需要通过切割或穿刺而使骨骼组织暴露出来。

背景技术

对骨骼和其它生物组织及活组织进行调查研究的领域包括各种各样的分析技术。已经发现评估特定患者、人或动物的骨骼质量或组织成分是很重要的，针对许多这样的情况而开发出了这些技术。例如，患骨质疏松症的人与正常人相比，骨折的风险显著增加。对退变性骨骼疾病（例如骨质疏松症）的诊断是很重要的，从而使患者可以调整他们的生活方式或寻求干预以降低骨折的显著风险。在肌骨组织研究中发现了另一示例。该领域的一个重要方面是使用仔细挑选的许多正常的并且在许多情况下是转基因动物对具有功能的组织成分和分子结构进行比较。

但是，至今为止，很少有利于检查骨骼的细节或其它组织的成分的非侵入性或最小侵入性方法。在对遗传疾病或代谢疾病的动物模型的研究中，标准的过程是牺牲动物并采集组织标本以供研究。显然优选的是，研究活动物并且使用导致最小不适或伤害的方法。在长时间监测组织变化的研究中，最能体验到这种需要。

显然，在检查人类患者时，牺牲过程并不是一种选择。当前用于评估骨骼质量的可用方法主要基于射线照相，特别是双能 X 射线吸收测量法（DEXA）。但是，这种技术仅能够测量骨骼的无机相（羟磷灰石），而有机相（主要是胶原 I）在很大程度上是不可见的。众所周知，骨骼的材料强度取决于胶原成分和羟磷灰石成分这两者。因此，DEXA 技术忽视

了评估骨骼质量所需的一个关键数据。至今为止，仅仅公知的用于获取有机（胶原）数据的过程涉及分析物理暴露出的骨骼或通过活组织切片而切下的样本。这两者通常都会使患者不适或疼痛。

红外和拉曼光谱法提供了丰富的与宽范围的组织和液体的生化状态有关的信息（例如，参见 US 6,681,133 或 WO 01/52739）。在骨骼分析中，例如，这些技术可以提供矿物/基质比、矿物结晶度、基质交联和机械负载所引起的可逆变化和不可逆变化的有关信息。不幸的是，利用这些方法进行的分析局限于表面研究，即对暴露骨骼的研究。红外辐射通常在被水完全吸收之前穿透到组织中不多于几个微米。近红外范围（700 至 850nm）穿透得更深，但是多重散射会导致失去详细空间信息。共焦显微镜法是一种用于探测样本深处的标准技术，但对于活组织被排除，因为密集的焦点产生局部加热和组织损害。此外，这种技术在诸如生物组织的漫散射介质中基本上效果较弱，在漫散射介质中，该技术仅对于大约十倍于光子在该介质中平均自由程的深度是实用的。

弹性散射光子已经用于在散射表面之下探测组分信息。例如，B.B.Das 等在 Rep. Prog. Phys. 60, 227 (1997) 中描述了一种使用时间选通（time gating）的方法。这种技术依赖于这样的事实，即光穿透漫散射介质花费的时间有限。因此，因此稍后将在较低的深度发生散射事件，因此监测散射信号随时间的变化从理论上讲应当提供关于在逐渐变深的深度处的散射中心的性质的信息。

用于提取对医学诊断至关重要的信息的拉曼光谱法的广泛应用促使研究一种能够测量次表面拉曼散射的系统。理论上讲，这种系统应当能够对皮下骨骼和软骨、软骨囊（cartilage sack）内的腰间盘组织、具有不同材料和功能特性的腱和韧带、由体内膜状覆层再次进行保护的内脏壁或食道组织进行成分分析。但是，Das 等的弹性散射技术不能直接延伸到拉曼光谱法。由于用于产生拉曼光的截面小得多，所以光子的非弹性散射是弱得多的过程。这导致了弱得多的信号。此外，拉曼信号更加易受发光或样本损害的干扰。

一种已经用于从拉曼散射获取深度信息的方法在下文中进行了描

述: Jun Wu 等所著的 “Three dimensional imaging of objects embedded in turbid media with fluorescence and Raman spectroscopy”, Appl. Optics 34 (18), 3425 (1995)。该论文描述了一种利用荧光衰减和拉曼散射的快速上升时间, 根据表面照射和散射光子的最早探测之间的时间延迟来推断深度信息的技术。设置一单光子探测系统以从被 1MHz 的脉冲激光束照射时开始监测来自样本表面的反向散射光子。光子到达时间针对多个脉冲照射的扩展, 显示出具有开始时间延迟, 它是散射对象的深度特性。

从 A. Carden 和 M.D. Morris, J. Biomed. Optics 5, 259(2000)中可显见使用非侵入性拉曼骨骼探测可以获得的益处, 其中来自骨骼的信号质量对于得出关于是否存在疾病的精准诊断是至关重要的。但是, 骨胶原的常规拉曼信号被不期望的来自覆层组织的拉曼信号掩盖, 因此, 通常借助活组织切片检查来获得与化学组成有关的数据。

已认识到需要一种执行次表面拉曼光谱法的另选非侵入性或最小侵入性方法。这种方法应该能够提供克服了 DEXA 的限制的更加灵活的体内分析技术的基础。具体而言, DEXA 在获取与骨骼成分相关的部分信息方面受到限制, 但是期望基于拉曼的技术的应用范围更加广泛。

发明内容

因而, 本发明的一个目的是提供一种能够提取体内组织和活组织(诸如骨骼组织)的次表面化学组成信息的基于拉曼光谱法的分析技术。本发明的另一目的是在不需要任何切割、穿刺或用于使目标次表面组织暴露出来的外科手术介入的情况下实现这种分析。

因此, 本发明提供了一种对次表面组织或液体进行皮下检查的方法, 所述方法包括: 利用探测光束照射表面组织; 从表面上的一个或更多个收集区或位置收集在所述表面下散射的光, 所述收集区与所述探测光束隔开; 以及从所收集的光中探测一个或更多个拉曼光谱特征。然后, 可以根据所述拉曼光谱特征得出生物学特性或化学特性。

更一般性地说, 本发明提供了一种透过漫散射上覆组织确定次表面组织或液体的一个或更多个特性的方法, 所述方法包括以下步骤: 在所

述上覆组织的表面上的进入区提供入射光；从所述表面上的收集区收集在所述上覆组织内散射的光，所述收集区与所述进入区隔开；以及在所收集的光中探测与所述入射光在光谱上相关的源自所述次表面组织或液体的一个或更多个拉曼特征。

所述上覆组织可以是皮肤或指甲，所述次表面组织或液体可以是骨骼、软骨、乳房组织或血液，但是也有许多其它应用，某些应用可能需要外科手术介入以暴露出用于遮盖和保护要研究的下层或器官的上覆层（诸如膜或粘液）。要研究的组织可以是液体形式，诸如血液、淋巴液或者关节内的液体、眼睛内的液体或膜之间的液体。

在许多情况下，单个进入区和收集区足以得到可用的拉曼光谱数据。在其它情况下，可以使用有不同物理间隔的一个或更多个进入区以及一个或更多个收集区，并且例如通过使用根据多个间隔的数据以优先选择所述次表面组织的拉曼信号，将如此获得的光谱数据进行组合，从而得到所述次表面组织的所需特性的更加精确的确定。

在中心进入区周围围绕或分布单个或多个收集区是有利的，因为这与简单移位的收集区相比提供了增大的收集面积。另选的是，可以使用在单个收集区周围围绕或分布的单个或多个进入区。同心环形或其它形状的进入区和收集区可能未被充分利用。例如，一圈紧密封装的端接光纤可能填充相关环的大约 60%。优选的是，光学利用收集环或进入环的至少 10%。

优选的是，相关的进入区和收集区不重叠。

本发明还提供了通过解释所确定的次表面组织的特性来对人或动物的医学状况进行诊断的相关方法。

本发明提供了用于确定次表面组织的一个或更多个特征的对应装置。

本发明还提供了一种测量漫散射组织的次表面拉曼光谱的方法，所述方法包括以下步骤：

- a) 利用光探针照射所述组织；
- b) 收集被所述组织散射的光；以及

c) 对所收集的光的至少一部分进行光谱分离，以探测一个或更多个拉曼光谱特征，

其中被所述样本散射的光是从所述样本的表面上的多个空间位置处收集的，各空间位置距照射点的距离不同，在各空间位置处收集的所述光的至少一部分被单独地进行光谱色散以形成多个拉曼光谱，并且其中所述方法还包括下述步骤：

d) 对所述多个拉曼光谱进行分析以提取与所述组织的次表面区域的拉曼光谱有关的信息。

因此，采用该方法，非破坏性地获得了光谱信息，该光谱信息可用于解释和确定漫散射组织在表面层下方的性质和组成。本发明有效地实现了对从所述样本得到的拉曼信号进行空间选通，从而将来自与表面层的组成不同的次表面层的拉曼信号隔离出来的方案。所述方法在此被称为空间偏移拉曼光谱法（SORS）。

将本发明用于在样本内的不同深度处具有一种或更多种不同化学组成的组织时，从在空间上自探测激光束的入射点偏移了不同量的区域收集拉曼光谱会得到一系列光谱（两个或更多个光谱），每个光谱都包括从所述组织内的不同深度发出的拉曼信号。所采集的该系列光谱所包括的从组织表面层和组织次表面层产生的拉曼信号的相对贡献不同。在收集该数据系列时，当信号收集点从探测激光束的入射点移开时，表面层信号的贡献减小得比由组织本体内更深层的不同组成所产生的信号的贡献要快得多。这使得能够直接地或者为了更高分离而通过对所收集的光谱集进行数值处理（例如多元数据分析或光谱彼此间的定标相减（scaled subtraction）），来提取较深的次表面组织的贡献。

在一个优选实施方式中，收集了两个或更多个拉曼光谱并利用定标相减对其进行分析，将从照射点处收集的或在距该照射点最近处收集的拉曼光谱从距该照射点较远处收集的拉曼光谱中减去，由此可以识别该组织的次层的拉曼光谱特征。

在另一另选例中，如果已知组织的表面的化学组成的拉曼光谱，则通过从所收集的拉曼光谱中定标减去该已知拉曼光谱，对所收集的

拉曼光谱进行分析。

在一另选的优选实施方式中，在距照射点不同的距离处收集至少 20 个拉曼光谱并采用多元数据分析对所述多个拉曼光谱进行分析。主成分分析可用作所述多元数据分析。

本发明的优选特征是以两个或更多个不同波长照射组织，其中所收集的光是拉曼光谱与荧光的组合，从而拉曼光谱可从所收集的光中提取出来。

所述组织、收集用光学器件与照射点中的至少一个可以相对于其余的移动，从而能够在距照射点不同的距离处收集拉曼光谱。例如，可以提供其上安放有对象肢体或头部的可移动台，并且安排探测光束来追踪所述肢体或头部的移动，由此所述对象组织相对于用于在距照射点不同的距离处收集散射光的固定的收集用光学器件进行移动。

可从距照射点不同的距离处的点区域收集散射光，或者可从基本上与从照射点测得的距离成横向的多条基本平行的线收集散射光。

另选的是，使用光纤提供探测光束，并可使用围绕所述探测光束光纤布置成多个同心圆的光纤来收集散射光，由此在距所述照射点的不同半径处的同心环中收集所述散射光。

理想的是，光探针大于 200 nm 且小于 2000 nm，并可由例如针对温度可调的一个或更多个准单色激光器或二极管激光器来产生。为了避免血红蛋白的吸收，所述光探针优选地大于 600nm，并且为了避免黑色素的吸收，波长优选地大于 800nm。

在一另选方面中，本发明提供了对在漫散射组织内的不同深度处产生的拉曼光谱进行选择测量的装置，所述装置包括：光源，其利用探测光束来照射组织；收集用光学器件，用于收集被所述组织散射的光，并将其传递到光谱仪；探测装置，用于探测被所述光谱仪色散的光；其中，所述装置适于在所述组织的表面上的多个空间位置处收集散射光，各空间位置距照射点的距离不同，并且所述光谱仪对在各空间位置处收集的光的至少一部分单独地进行光谱色散以形成多个拉曼光谱，并且其中所述装置还包括分析器，所述分析器用于从所述多个拉曼光谱中识别

所述组织的次层的拉曼光谱所特有的特征。

所述光源可由例如针对温度可调的一个或更多个准单色激光器或二极管激光器构成。

在另一另选方面中，本发明提供了一种诊断方法，所述诊断方法包括：使用如上所述的方法，从组织收集一个或更多个拉曼光谱，所述组织由上覆组织的表面区域和与所述上覆组织不同的深层组织的次层区域构成。

优选的是，在所述一个或更多个所收集的拉曼光谱中识别所述组织的次层区域的拉曼光谱所特有的一个或更多个特征，并且将其与从健康控制样本获得的特征进行比较。

上面阐述的方法和装置可以具体用于确定人体或动物体中的体内组织的特性，并用于确定组织的生物学特性。

本发明还提供了包括内窥镜的如上所述的装置，从而能够使用所描述的拉曼技术来研究皮下和内部组织或液体。

现在将参照附图仅通过实施例对本发明的实施方式进行说明。

附图说明

图1示出了本发明的原理，其中光源10的照射导致了体内骨骼组织处的拉曼散射16；

图2a至2c示出了本发明可以使用的一些不同的组织构造；

图3a至3c示出了不同的进入区和收集区的布置；

图4示出了使用光学装置50、54来改变环形收集区的直径的布置；

图5示出了使用反射镜60来增强拉曼光子的收集的应用；

图6a示出了用于与光谱探测器22连接的、进行次表面体内组织分析的光学头；

图6b示出了包含本发明的内窥镜；

图7a和7b示出了图6的光学头与连接器的平面详细图；

图8示意性地示出了根据本发明的分析装置，设置所述分析装置来提取在代表体内组织的样本的表面层下产生的拉曼光谱；

图 9 示出了根据本发明的用于收集空间偏移的拉曼光谱的点收集几何形状；

图 10 示出了根据本发明的用于收集空间偏移的拉曼光谱的同心圆收集几何形状；

图 11 示出了使用本发明的分析装置以不同偏移产生的两层样本的一系列拉曼光谱；

图 12 示出了图 11 的样本的拉曼光谱的绝对强度与偏移距离的相关性；

图 13 示出了图 12 的拉曼光谱相对于偏移距离的比率；

图 14 示出了缩放成与反式芪谱带的高度相同的同一两层样本的一系列拉曼光谱；

图 15 示出了图 14 的各光谱中的 PMMA 的贡献；

图 16 针对同一样本示出了反式芪拉曼信号与源自 PMMA 层的荧光的相对比率，其是空间收集偏移量的函数；

图 17 示出了使用根据本发明的分析装置获得的对同一样本的一系列拉曼光谱的 PCA 分析结果；以及

图 18 示出了使用根据本发明的分析方法获得的拉曼光谱针对同一样本进行简单减法处理的结果。

具体实施方式

现在参照图 1，在示意性截面图中示出了工作中的本发明的实施方式。使用包括激光器 9 或由激光器 9 提供的光源 10 来照射体内组织 14 的表面 12 的局部进入区，体内组织 14 在本实施例中由皮层 15 和下面的骨骼组织 20 组成。来自所述光源的入射辐射通过样本（尤其是上皮层）发生漫散射。一些辐射可被组织吸收，一些辐射可能会引起例如荧光发光，并且一些辐射通过组织表面 12 后未发生变化地再度显现。

入射辐射中较小比例的光子被非弹性散射，由此产生拉曼光子，例如如拉曼事件 16 所示。拉曼光子继而通过组织被漫散射。一些拉曼光子可被吸收，例如由此产生荧光，而一些拉曼光子穿过表面 12 后未发生变

化地显现，从而在收集器 18 处被收集。

拉曼光子经历第二次拉曼事件的可能性非常小。

例如使用探测器 22 中的滤波器或光谱仪以及适宜的传感器对收集的光进行分析，并且在分析器 23 中进一步使用所确定的拉曼光谱或光谱特征。所述探测器可以使用傅立叶变换而不是常规的色散分光技术。

通常，大部分拉曼光子将在光源 10 的附近产生，在此处入射辐射最强。例如通过使用与光源 10 相配的光学器件在光源 10 处收集光，可以对这些拉曼光子进行最好的探测。然而，随着距光源的距离的增加，源自光源附近的拉曼光子的强度要比源自距光源更远处的、特别是来自组织内较深处的拉曼光子的强度下降得更快。因此，通过将收集光的位置与组织被照射的位置隔开，可以实现对来自组织内较深处的拉曼光子的优选取样。

在图 1 中，拉曼事件 16 发生在次表面骨骼层 20 中或在其顶部。可以调整光源 10 与收集器 18 之间（或等价的进入区 11 与收集区 19 之间）的间隔 d 来选择特定深度。然而，在优选的实施方式中，以一定范围的间隔 d 收集光，分析器 23 用于根据所收集的光针对不同 d 值的拉曼特征来推断组织的深度相关特性。

可以通过对多个间隔的拉曼信号进行数值处理来优先选择特定层的拉曼信号。同样，可以通过类似的数值处理优选去除一层或更多层的拉曼信号。这种数值处理可以是根据不同间隔的信号简单加权比较或相减，或者可以使用更复杂的 PCA 技术。

在图 1 中，体内组织 14 在表皮组织 15 和骨骼组织 20 之间显示出明显的边界。图 2a 至 2c 中示出了一些其它组织构造。在图 2a 中，从表面层 30 至深层 32 存在渐变，深层 32 可以是漫散射型的或者可以是部分不透明或完全不透明的，在这些层之间的界面处产生代表层 32 的拉曼光子。在图 2b 中，表面层 30 与深层 32 被另外一透明或半透明层 34 隔开，该透明或半透明层 34 例如可以为充有体液的空间。图 2c 中示出了更为复杂的组织结构，其中，渐变或突变的次层 36 和 38 嵌入在表面层 30 之下或之内。

这里使用的拉曼技术和装置可以作为定位癌感染组织的独立技术或者在乳癌的情况下与诸如乳房 X 线照相术的现有技术相结合，从而应用于例如对癌组织的非侵入性检查。在针对乳癌的结合方法中，乳房 X 线照相术将用于识别乳房内的可疑区域，然后拉曼技术将用于探测该可疑区域并识别它们的性质。这可以缓解对活组织切片检查的需要，并提供了即时的结果，因此大大降低了患者的损伤。所描述的拉曼技术特别适于乳房的深层探测，因为与许多其它类型的组织相比，乳房组织表现出较长的光子散射路径长度以及较低的吸收系数。

在适当情况下，可以将拉曼装置组合到内窥镜装置中。这样，可以探测体腔，或者使用部分侵入性技术来探测优选不应受到破坏的身体区域，但是希望有能穿过周围组织或膜而进入这些区域的拉曼探测。这些区域例如为大脑（例如，用于识别阿茨海默症（Alzheimer's disease）和早老症(Hutchinson's disease)以及 CJD)、肝脏、心脏、肾、前列腺、静脉、神经系统、脊髓和膝盖骨。其它目标生理状况包括对肾和膀胱中的结石的性质的探测。

所描述的拉曼方法和装置也可以用于对血液特性的尤其是透过皮肤的非侵入性探测。在这种应用中，本发明用于去除源自皮肤的压倒性的拉曼和荧光信号，从而揭示来自血管中所包含的血液的下层信号。这样，可以检测并测量葡萄糖水平、氧合作用、微生物、胆固醇的类型和量以及诸如尿素、总蛋白质和白蛋白的其它血液成分。可以研究诸如淋巴液和眼泪的其它液体。

为了提高组织与光源和/或收集器之间的耦合，可以使用折射率匹配液体。也可将诸如丙三醇的折射率匹配液体沉积到组织中，以局部地并暂时地减少光子散射。这增加了所描述的技术的工作深度。可以将折射率匹配液体称为“对比剂”或“图像增强剂”。

可以使用各种几何形状以单个、多个或可变的间隔实现光的入射辐射和收集。在图 3a 中，样本表面上存在单个照射或进入区 40。与该照射区隔开的是单个收集点或区域 42，或者是多个区域，如虚线所示。另选的是，可以移动单个收集区或等效的照射区以提供可变间隔。

在图 3b 中, 单个照射区 40 被一环形收集区 44 或者被多个环形收集区或一可变半径的环形收集区所围绕, 如虚线所示。可以使用断环或与照射点距离相似的多个分离的区域来代替环形收集区。

在图 3c 中, 使用环形照射区 46 和中央收集点 48, 由此减小了产生给定数目的拉曼光子所需的入射辐射的局部强度。所述环的半径可以改变, 或者将所述环设置为具有一定范围的半径的多个环。也可使用由多个分离的照射区构成的断环, 所述多个分离的照射区分布在距收集中心点的距离相似的位置处。

通常, 在进入或收集区的比例尽可能大的条件下收集光或提供入射辐射是有利的。然而, 在实际的实施方式中, 覆盖率会受到限制。例如, 在环内排列圆柱光纤时, 10% 的覆盖率可能就已足够, 但优选的是 25%, 并且 60% 或更高也是可能的。

在简化的实施方式中, 通过靠近样本表面的单根光纤可以提供单个进入区, 利用收集用光纤的线性阵列可以提供多个收集区。光纤可类似地用于提供环形和其它构造的单个和多个固定间隔, 并且可使用多种机械装置来提供可变间隔。

为了提供可变半径的进入区或收集区, 还可以使用诸如图 4 中所例示的光学装置。可以调整位于组织与收集器之间的光学器件 50 和/或样本到探测器的距离, 以将来自组织表面的不同部分的光引导至与光源 10 同心的收集器 18 上。能够利用光学器件驱动器 54 沿轴向 52 平移的透镜装置 (和/或照射源以及拉曼收集器/探测器) 将来自半径变化的环形区域的光引导到收集器上, 但也可以设想其它构造。

在图 5 中示出了另一方面, 该方面可以用于上述任何一种配置。向样本表面提供一个或更多个反射镜元件 60。当入射辐射或拉曼辐射自组织出现而远离收集器 18 时, 这些反射镜元件使出现的辐射改变方向返回组织。这增大了入射辐射的强度, 因此增加了组织内拉曼光子的产生, 并且还增大了在收集器 18 处接收到的拉曼光子的比例。这些反射镜元件优选地不出现在靠近光源 10 或进入区的表面, 而是靠近收集区。

在另选实施方式中, 通过利用直接放置在组织表面上或者在还使用

其它成像光学器件的情况下放置在成像平面上的蔽光框 (mask), 可以使用非成像光学器件 (诸如在 Applied Optics 第 35 卷第 758 页中描述的非成像光学器件) 来实现更高的收集效率。该蔽光框挡住了组织的适当区域从而仅收集来自期望空间偏移的信号。蔽光优选地与诸如电荷耦合器件的探测器同步, 从而使来自该探测器的顺序读数与提供根据照射区和收集区之间的相应的顺序间隔所收集的光的蔽光框相关。所述蔽光可以是机械的, 并且还可以在成像光学器件与非成像型探测器之间进行。

图 6a 示出了本发明的实际实施方式, 该实施方式包括通过光纤束 72 而连接到探测器 22 的光学头 70。光学探测的结果被送入膝上型计算机或其它计算机 23, 该膝上型计算机或其它计算机 23 对拉曼特征进行分析以推断组织 14 的特性。在 (未按比例绘制的) 图 7a 的平面示意图中示出了光学头 70 的细节。一束光源光纤 74 端接在所述头的中央区域中。这些光源光纤嵌入在诸如环氧树脂的填充物 76 中, 并被环形间隔元件 78 围绕。收集用光纤 80 端接在围绕所述间隔元件的环形区域中, 也嵌入在一填充物中, 并被外套管围绕。该配置适于包括上述各种反射镜和光学装置。

在该特定实施方式中, 各光纤具有直径为 $200\text{ }\mu\text{m}$ 的芯以及使光纤厚度达到 $230\text{ }\mu\text{m}$ 的包层。内束由七根光源光纤 74 构成, 外束由 26 根收集用光纤 80 构成。使间隔物 78 具有能够将收集用光纤 80 与所述头的中心隔开约 3 mm 的大小, 并且使收集用光纤的末端近似均匀地分布在关于所述中心半径恒定的环形区域内。该收集用光纤应当适于执行光学或近红外拉曼操作, 并且可由二氧化硅制成。

照射用光纤和收集用光纤距光学头约 100 cm 远地端接在图 7b 示意性例示的连接器中。所述连接器提供六根照射用光纤和二十六根收集用光纤以连接到图 6 的探测器 22 中, 该探测器 22 包括在 827 nm 处工作的光源照射准单色激光器和 Kaiser Holospec 光学分析器。

在图 6b 中将本发明实现为内窥镜。插入管 90 用于通过自然的或经外科手术形成的孔 92 而进入人体或动物体。照射用纤维和收集用纤维端接在探测头 (未显示) 中, 并通过插入管而穿回到控制手柄 94。可以在

控制手柄中或在相连的探测器单元 22 中执行光学探测。

图 8 中示出了用于识别来自体内次表面组织的深度特定拉曼光谱的另一空间选通分析装置的示意图。下面描述的特征和改变可以适当地应用于已经讨论过的更一般性的实施方式。该装置通常包括激光器 101、拉曼探测装置 102、103 以及分析器 104。使用功率为 12mW 的诸如二极管激光器的准单色激光器（在组织分析的情况下，优选地在 827nm 处工作）产生所述装置的探测光束 105，利用常规光学器件将该探测光束 105 导向样本。该样本具有表面层 106 和化学组成与所述表面层不同的较深层 107。

图 8 中示出的实际配置是实验性的。样本的各层构成了实际体内组织的模型，并且为了方便起见而安放在工作台上。但是，替换成具有很小改动的真实体内组织是简单明了的。在当前的展示中，使用在 514nm 处工作的氩离子激光器。

对于该装置，使用佩林布洛卡棱镜（Pellin-Broca prism，未示出）来阻挡激光等离子体线。所述装置包括焦距为 1 m 的透镜 108，该透镜 108 用于在样本上以法向入射角将激光束弱聚焦成直径为 300 μm 的点。通过使用光圈值（f-number）约为 1 的直径为 2" 的收集透镜 109 按反向散射几何形状收集由于照射样本而产生的拉曼光，并利用透镜 109 按 2.5 的放大倍率将其成像在光谱仪 102（其是拉曼探测装置的一部分）的狭缝上。优选地使用传统成像光谱仪 102（例如光圈值为 6.3 的 Spex TriplemateTM）使拉曼光色散并将该拉曼光成像在 CCD 照相机 103 上。照相机 103 优选地是用液氮冷却的背照式深耗尽层 CCD 照相机（例如 Andor，DU420-BU2 (250 nm) 1024 \times 255 有效像素）。这种照相机在拉曼光谱区域中的 CCD 量子效率为大约 65% 并且其像素尺寸为 26 μm \times 26 μm 。将光谱仪 102 的末级狭缝宽度设定为 120 μm 。跨 20 像素纵向合并（bin）CCD 以保持收集侧的空间选择性。

将样本 106、107 安放在 x-y-z 微定位台 110 上，所述微定位台 110 包括受控驱动器（未示出），该受控驱动器可将所述台与末级光学器件一起（在图 8 中垂直地）移动以使激光束相对于样本的入射点固定在样本上。在该构造中，拉曼探测装置 102、103 总是从空间中的固定成像区

中收集反向散射拉曼移位光子，并且在泵浦光束（pump beam）入射点保持固定在其在样本表面上的位置处的同时在整个该成像区中对样本进行扫描。也可使用滤波器（未示出）来阻挡任何残余弹性散射探测激光到达光谱仪 102。使用从探测光束入射点横向偏移的点收集，来部署上述 SORS 装置（图 9）。另选的是，可以使用可移动台或其它移动控制装置来实现一个或更多的样本、照射点和拉曼探测装置之间的相对移动。

针对光学行为与分层漫射体内组织相似的测试样本对利用与上述装置相似的装置的拉曼光谱进行收集，在该测试样本中，第一层 106 由宽 1 cm、高约 4 cm 的光径为 1 mm 的比色管（cuvette）构成，该比色管具有定制的熔融石英前窗口和后窗口，填充有直径约为 20 μm 的 PMMA(聚(甲基丙烯酸甲酯))球体。在填充期间，通过在比色皿（cell）上进行机械拍打，将所述球体松散地塞在该比色皿中以消除任何较大的空隙。该第一层之后是第二层 107，该第二层 107 由光径为 2 mm 的另一比色皿构成，该另一比色皿中填充有利用钵和杵研磨的反式苈细粉。使用这些比色管是为了提供简单的样本处理方法，它们并不是所述装置的必要特征。

在探测激光束入射到使第一层 106 位于最上层的样本上的情况下，利用一基本点收集几何形状来收集使用在此处描述的 SORS 方法的空间偏移拉曼光谱，其中从自探测光束的入射点横向移位的点进行收集（图 9）。如图 9 所示的收集几何形状的点代表本发明的方法的最简实施方式。另一方面，图 10 中所示的不需要使用 x-y 定位台的同心圆几何形状有利地获得高得多的收集效率，但是需要使用光纤以使各圆成像在光谱仪狭缝上的不同高度处，使得在色散后它们在 CCD 103 上的像能够被成像在分离的水平条纹上，使光谱在 CCD 上的垂直位置对应于样本表面上的相对于探测光束入射点的给定偏移收集距离。在 Jiaying Ma 和 Dor Ben-Amotz 的题为“Rapid Micro-Raman Imaging using Fiber-Bundle Image Compression”（Applied Spectroscopy 第 51 卷，第 12 号，1997 年）的文章中描述了使用光纤束来收集拉曼光谱，通过引用将其内容合并于此。

当然，显而易见的是，可以采用其它的另选收集几何形状，同时仍然可实现根据本发明的空间偏移拉曼光谱收集。

另外,在不进行样本照射时,可收集表示背景和装置噪声的“样本上(above the sample)”拉曼光谱。然后可以从拉曼光谱集合中减去该“样本上”拉曼光谱,以从光谱中去除噪声。

当采用谐振拉曼技术来获取拉曼光谱,由此入射探测光束的波长被调谐为与待研究材料的发色团(chromophore)相匹配时,拉曼信号会被由于电子激励而产生的荧光(冷光)淹没。例如,在对骨骼的室温研究或体内研究中将激发出荧光,但在较冷的样本中更可能激发出磷光。类似地,金属系的拉曼探测常常会激发出室温磷光。

在这种情况下,利用 SORS 法可以在两个或更多个激光波长处使拉曼光谱恢复(recover)。这依赖于下述事实:荧光背景的光谱轮廓通常不依赖于激励波长,而拉曼光谱依赖于激励波长。因此,在两个或更多个不同的照射波长下在距照射点相同的空间距离处收集的光谱可以彼此相减,以给出拉曼谱带处于其中的导数型图,并且可以对其进行数学处理以给出看起来更真实的拉曼光谱。在 S. E. J. Bell, E. S. O. Bourguignon 和 A. C. Dennis 的题为“Subtracted shifted Raman spectroscopy (SSRS) method”(Analyst, 1998, 123, 1729-1734)的文章中描述了用于识别拉曼谱带的该技术。该技术还被称作如 P. Matousek, M. Towrie 和 A. W. Parker II.在同名论文(Raman Spec., 33, 128-242(2002))中所描述的移位激励拉曼差技术(Shifted Excitation Raman Difference technique (SERD)),通过引用将其内容合并于此。

可借助分立的激光器或借助单个激光器(诸如二极管激光器)来产生两个或更多个波长的入射辐射,其输出例如通过温度调节而改变。所需波长差通常约为拉曼谱带的一半宽度,通常约为 5 cm^{-1} 至 10 cm^{-1} 。

图 11 中示出了在相对于拉曼收集点和激光在样本表面上的入射点的空间偏移度变化的情况下测定的针对上述测试样本的一组拉曼光谱。为了进行比较,还显示了在各单独的测量中测得的纯层(pure layer)的拉曼光谱。图 11 中的顶部光谱是纯反式芪的光谱,而底部光谱是纯 PMMA 的光谱。在零偏移(0 mm)时测得的光谱表示使用常规拉曼仪器通常将获得的拉曼光谱。显然,该光谱包含来自样本顶层和底层的可感知贡献,

并且在空间偏移光谱中顶层的贡献随偏移距离而逐渐减小。对于实际应用，在需要恢复底层的纯谱处，顶层信号可能表示对于下层的拉曼信号来说不可接受的失真。当拉曼收集点与探测光束入射点之间的横向偏移增大时这两个信号之间的逐渐分离可使用 SORS 方法清楚地实现，并且可从所例示的数据集中清楚地观察到。在 $>2\text{mm}$ 的距离处（图 11 中从上数的第三个光谱），可以实现下层拉曼信号对顶层拉曼信号的比率的一个数量级的改善。

图 12 示出了个体光谱的绝对拉曼强度对空间偏移的依赖性。该数据是通过将两个强反式芪谱带（ 1575 cm^{-1} 、 1595 cm^{-1} 、 1632 cm^{-1} 和 1641 cm^{-1} 处）和 PMMA 的谱带（约 809 cm^{-1} 、 1455 cm^{-1} 和 1728 cm^{-1} 处）进行数值拟合而获得的。该曲线图清楚地展示了，当拉曼收集点从探测照射区侧向移动（即，横向偏移增大）时，来自底层的拉曼信号要比来自顶层的拉曼信号减小得慢得多。这导致了底层对顶层的总体相对拉曼强度比随着空间偏移的增大而提高，如图 13 所示。

为了将使用本发明的方法和装置针对上述测试样本而实现的对比度提高进行量化，获取在偏移为 3.5 mm 处的具有较长获取时间（1000 秒）的拉曼光谱。图 14 示出了该光谱以及按比例缩放成与反式芪谱带的高度相同的按零偏移获取的拉曼光谱。通过从这些光谱中减去纯反式芪光谱，获得了 PMMA 在个体光谱中的贡献（参见图 15）。通过将它们拟合，我们得出，通过将顶层光谱成分去除，下层的对比度提高了 15 倍。另一个显著的观察结果是，使用该空间选通方法而获得的信噪比相比于其它替代方法更好。

在零偏移的条件下测得的由 1 mm PMMA 层造成的拉曼反式芪信号的总衰减约为 80。然而，通过进一步改进收集效率：例如通过采用图 10 所示的圆形收集几何形状，或通过使用较小的光圈数和较高吞吐量的光谱仪，同样在常规拉曼光谱法中不可避免地存在的通过漫射过程而导致的该信号损失可以得到有效弥补。

图 16 展示了本发明的空间选通分析装置和方法的另一有用特征。该分析装置能够抑制下层拉曼光谱中的荧光，如果该荧光源自顶层的话。

图 16 所示的曲线给出了反式芪拉曼信号与源自 PMMA 层的荧光的相对比率,以及荧光的绝对强度(其为空间收集偏移的函数)。通过引入 2.5 mm 的位移,反式芪拉曼强度相对于荧光强度被提高了约 2 倍。

在需要对从表面层和次表面层获得的数据进行比在原始光谱内可直接实现的分离更大的分离的情况下,通过使收集点和探测发起点偏移,可以使用图 8 的分析器 104 进行多元数据分析过程。利用 SORS 收集的数据特别适合多元数据分析,这是因为如果想应用该方法,就仍然需要在各种偏移量处测得的拉曼光谱的集合。为了实现有效的数值分解,该集合内的光谱的数目理想地至少应当比样本中存在的层的数目高一个数量级。为证明该点,采用主成分分析(PCA)形式的多元分析。

将使用此处描述的 SORS 方法和装置生成的在图 8 中表示的 PMMA 与反式芪双层系上获取的大约二十个拉曼光谱输入 MatlabTM R11(The Mathworks Inc., Natick, MA)中,并利用内建脚本和本地编写的脚本进行处理。对原始数据集进行奇异值分解后生成的十个最大本征矢量包含在 PCA 循环中。该数据集中不包括 PMMA 与反式芪的纯谱,并且不进行基线校正。

当需要对表面层和次表面层的光谱特征进行完全分离时,多元数据简化技术是有优势的。这些数据简化技术还提供将各层的光谱特征分离的手段,所述层可能具有中度至高度的光谱重叠或者在其中由于纯成分的光谱不可得或不可知而导致个体成分对谱带包络的贡献不可知。

图 17 中示出了由多元分析得出的恢复因子。该过程将这样收集的拉曼光谱清楚地分解为两个单层(即 PMMA(顶层)和反式芪(底层))的纯谱。通过以 $\text{ca. } 1595 \text{ cm}^{-1}$ 谱带(像素 730)为目标来恢复纯反式芪的因子,并且通过以 $\text{ca. } 809 \text{ cm}^{-1}$ 谱带(像素 80)为目标来恢复纯 PMMA 的因子。冷光背景因子可根据原始输入光谱之一构建。使用通常用于基线校正的迭代多项式拟合运算法(Lieber CA 和 Mahadevan-Jansen A 2003)来生成该因子。在该情况下,利用三阶多项式的 100 个拟合循环被用于生成所述基线。该基线用作代表冷光背景的因子。然后将这三个因子用于重构误差小于 3%的数据集。

尽管在上述实施例中收集了二十个分离的拉曼光谱，但在可以进行个体拉曼光谱的定标相减的情况下，需要少至 2 或 3 个光谱。即使采用多元数据分析，尽管优选的是对至少一个因子（其数目大于要识别的成分的数目）进行分析，但是使用较小的数据集（例如约 10 个光谱）也常常可以成功地进行这种分析。

以下是本发明人用于解释在此描述的分析方法和装置的功效的当前理论。该理论得到由本发明人进行的蒙特卡罗（Monte Carlo）散射建模研究的支持，该研究得出的结果与实验非常好地符合。随着收集点的空间偏移，光子迁移效应的随机性质导致来自不同层的拉曼信号的相对含量发生变化。迁移光子实质上在介质内经历了“随机行走(random walk)”，且光子的方向在沿着传播距离的每个传输长度中都被随机化。当从样本表面上的探测光束入射的点处收集拉曼信号时，由于探测光子的密度在样本的曝光点处最高，因此光谱包含的来自顶层的信号贡献相对较大。随着样本深度的增加，当光子强度经光子漫射过程而逐渐减弱时，探测强度快速减小。此外，在样本较深层处产生的拉曼光在传播回表面时会发生散射并经历相同的漫射。因此，这导致了在较深样本层产生的拉曼光谱的强度进一步减弱。该效应导致：与以相同几何形状针对被探测的光学透明介质而收集的信号相比，当从样本表面上的探测光束入射点处收集信号时，收集到的在样本表面产生的拉曼光子的比例基本大于在较深样本层产生的拉曼光子的比例。

然而，当从自探测光束入射点横向偏移的点处收集拉曼光时，样本内探测光的强度沿样本深度变得更为均等地分布。这是因为入射光首先必须从探测入射点通过样本侧向传播到收集区，并且在途中通过光子漫射而随机化。因此，在从探测入射点偏移的位置处收集的散射拉曼信号所包含的较深层信号的比例大于从探测光束入射点收集的光谱中的该比例。

所描述的空间选通分析装置和方法因此提供了用于从漫散射介质内的个体层中提取纯拉曼信号的极为有力但简单的手段。被探测样本的深度可以大大超过传输长度，而传输长度对传统的共焦拉曼显微镜法却设

置了深度限制。在上述实施例中，介质的传输长度估计为 200 μm 。重要的是，所述装置和方法可以“盲目”地使用，即不需具有关于各层的化学成分的任何先验知识。该技术因而对于工业和医疗应用中对漫散射材料的敏感次表面非破坏性探测具有理想的先决条件。

在已知样本仅由组成不同的两个层（诸如体内皮层和骨骼层）构成的情形下（如果这是未知的，则可从纯 PCA 直接获得该信息），所述方法和装置可用于提取个体层的纯信号而无需涉及多元数据分析技术。这在两层的两个光谱均包括不重叠的可识别谱带的情况下是可能的。在该情况下，可使用简单的定标相减将各个体层的光谱彼此分离。在该处理中，通过利用两个不同的空间偏移量所测得的两个光谱的定标相减，消除一个拉曼成分，所述定标相减抵消了该处理中的一个光谱成分或另一个光谱成分。图 18 中示出了该简单提取过程的结果。该分析中使用的光谱是采用零偏移和 2 mm 的偏移测得的。尽管可适用性要求满足上述条件，但结果显然令人满意。相反，上述的 PCA 分析可在不知道样本的不同层的组成的情况下使用。

因此，很显然并非在所有情况下都需要利用本发明生成完整的拉曼光谱。在对所涉及材料或要被探测的组分有一定的了解时，例如使用一个或更多个带通滤波器对各拉曼光谱特征进行的探测也可以利用在此描述的 SORS 方法和装置来完成。

通常情况下对两层的“抑制”或分离的确切程度取决于多种参数。这些参数包括顶层的厚度、下层基质（matrix）的厚度、探测光束的直径、确切的收集几何形状、使用的探测光的波长以及介质的传输长度。对于非侵入性次表面探测，凭经验可以认为理想的偏移应当达到上覆介质的厚度或数个厚度。此外，为了使该技术有效，光束直径应当小于顶层的厚度。一般说来，顶层越薄且下层基质越厚，越有利于将两个成分更好地光谱分离。

由此，本发明特别适合用在非侵入性医学诊断应用。但是，探测光子或拉曼光子的任何程度的吸收将导致来自样本表面的拉曼信号的总产生量减少。因此，为了使 SORS 分析有效，在基本上无任何吸收的波长

处进行测量是重要的。在活组织的情况下，在 NIR（约 800nm）中的血红蛋白吸收区（>600nm）外很好地满足了这一条件。因此，对于活组织而言，优选的激光源产生波长至少为 600nm 的光。产生 800nm 以上的光的激光源也是适当的，因为这降低了黑色素对入射光的吸收。此外，在该波长处，骨骼组织具有相对较低的荧光。

但是，对本发明而言，不必使用波长为 514nm 或者大于 600nm 的光。探测波长的选择实质上是在深度刺穿（其随波长的变长而改善）与探测器的量子效率（波长越短该值越高）之间进行的权衡。如前所述，在此使用的探测器 3 是基于硅技术的背照式深耗尽层 CCD 探测器。选择该探测器是因为其具有目前可得到的最佳灵敏度和信噪比，但也可以使用其它探测器。较长的波长避免了激励拉曼光谱中的 H₂O 模，但针对 Si 探测的截止限制为 1.1 μm。InGaAs 探测器可在较长的波长下使用，但这些探测器目前具有降低的灵敏度。

作为 SORS 分析的潜在医学应用的实施例，众所周知，从骨骼组织测得的拉曼光谱表示其生化状态。光谱中的峰表示矿物组分（例如磷酸盐、碳酸盐、氢氧化物以及间隙和残留水分子）和有机材料（主要是胶原基质）。因此，如果在骨骼结构中存在异常，则矿物峰和胶原峰的相对强度将会与正常的不同。

产生在漫散射基质中埋藏的化学特定的信号的技术适用于许多医学应用。实际上，可预想到，次表面信息的非破坏性提取将具有如下的医学应用：对嵌入损害的检测，以及对肿瘤、皮肤和血液组分的评估。

使用本发明的方法和装置，可以从大大超过常规共焦显微镜法能够达到的深度的深度处取回充分纯的拉曼光谱。此外，本发明的优势在于，本发明与连续波（cw）激光光束的使用相兼容并适于工业和医疗应用中的远程监视。

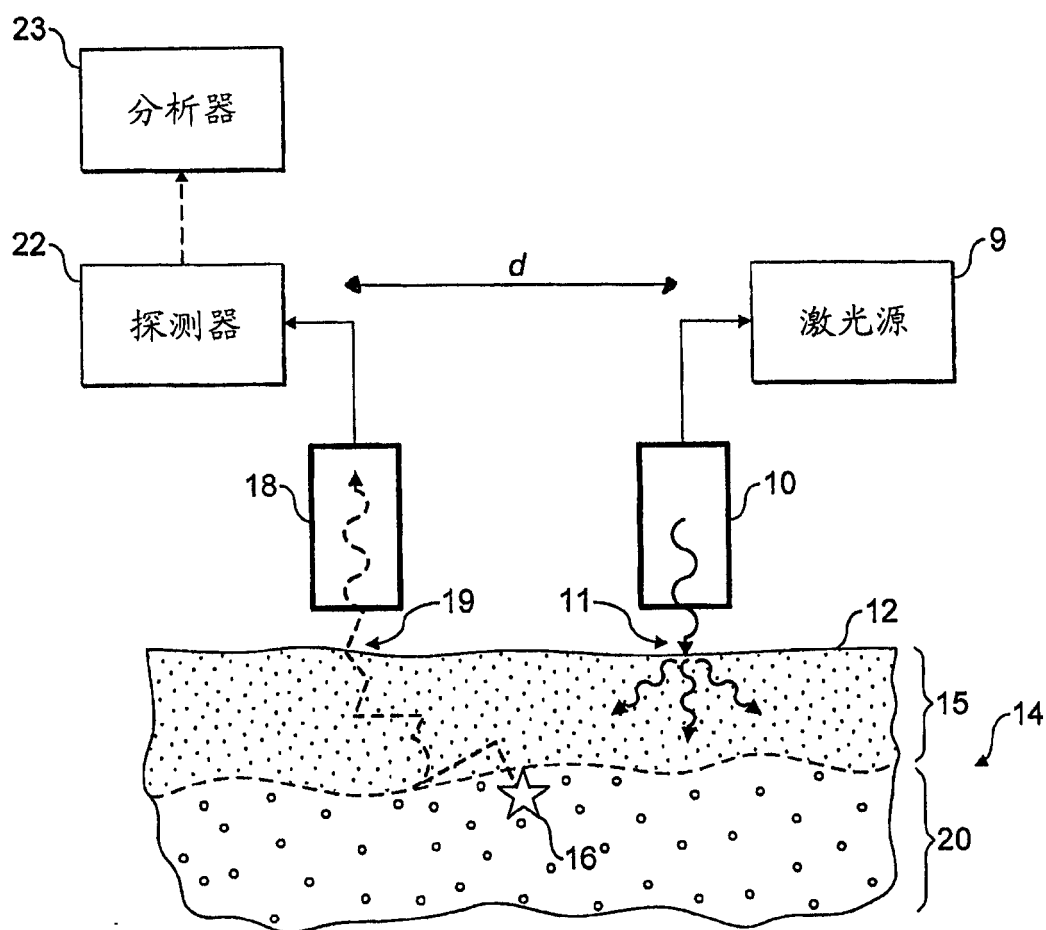


图 1

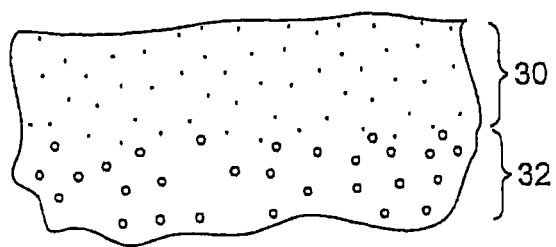


图 2a

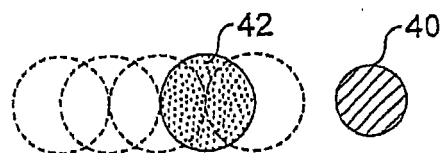


图 3a

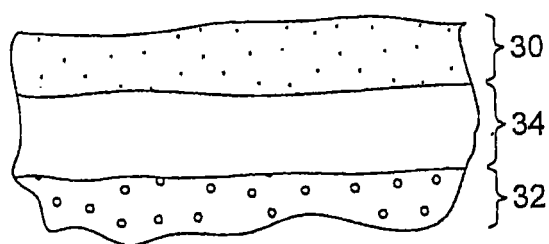


图 2b

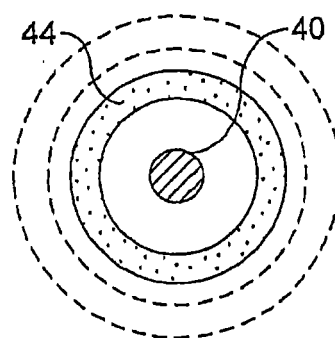


图 3b

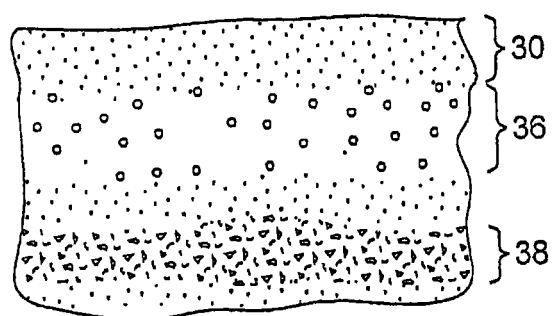


图 2c

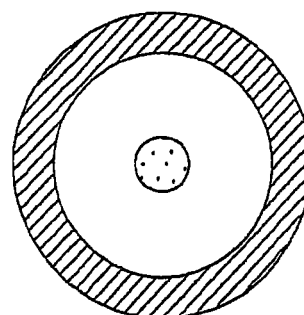


图 3c

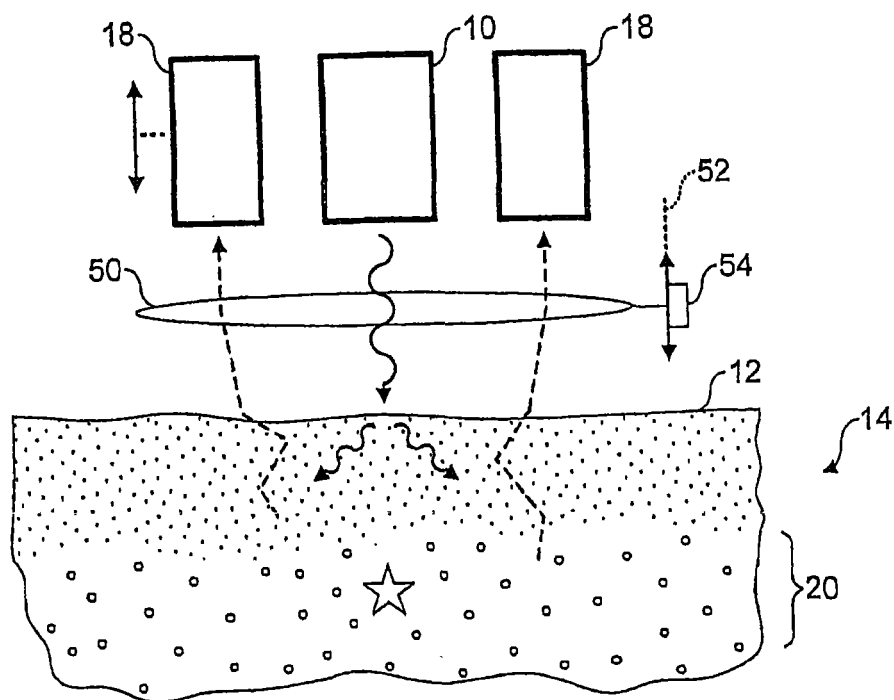


图 4

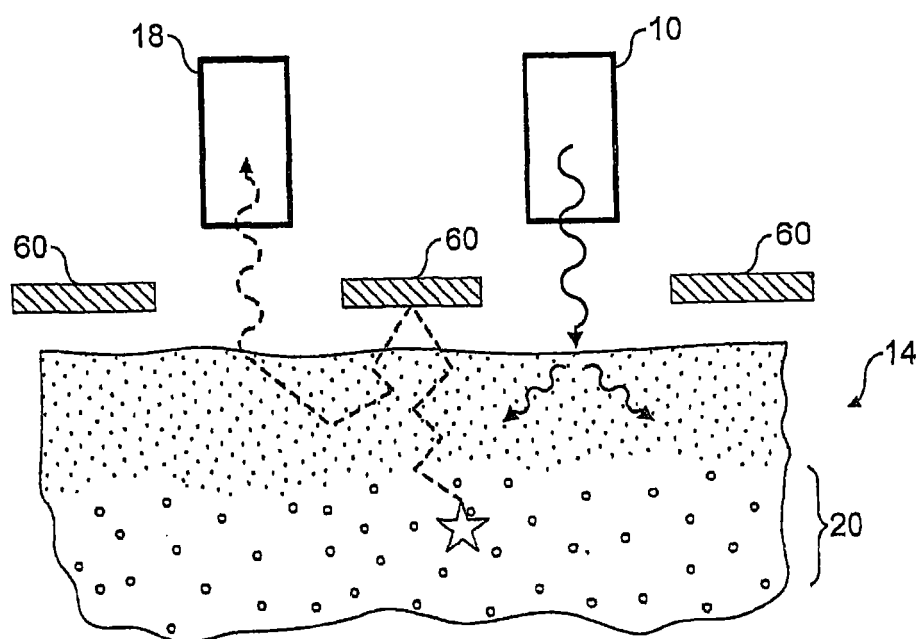


图 5

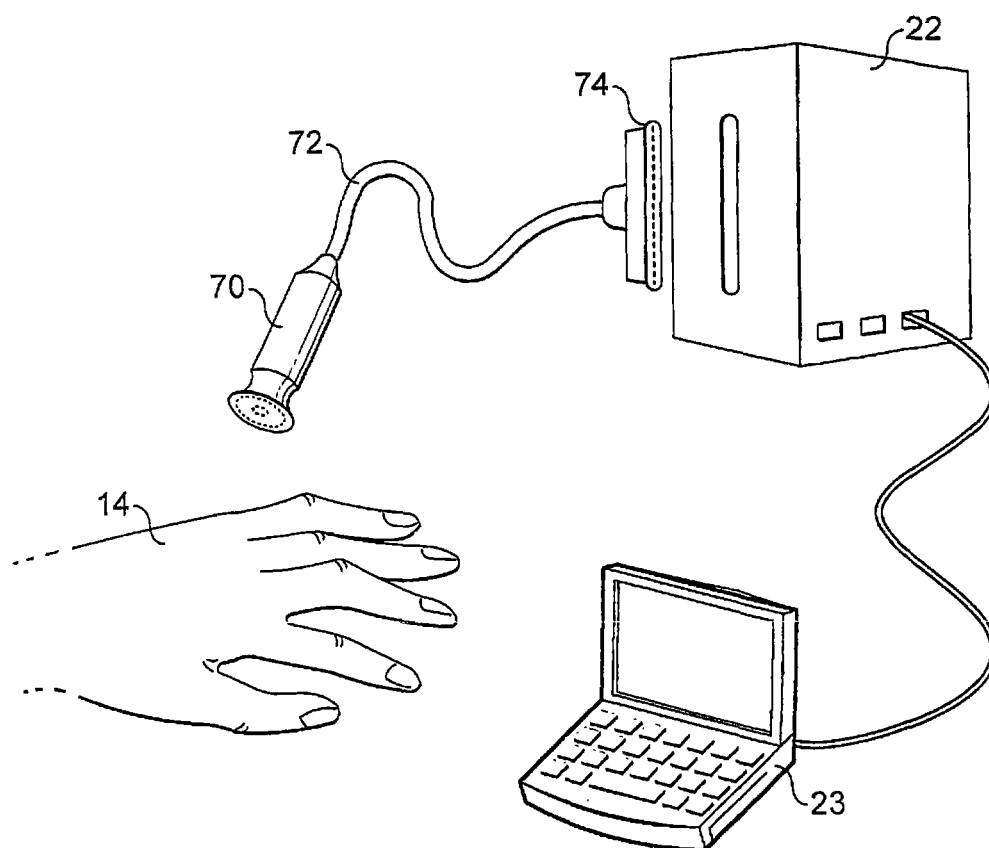


图 6a

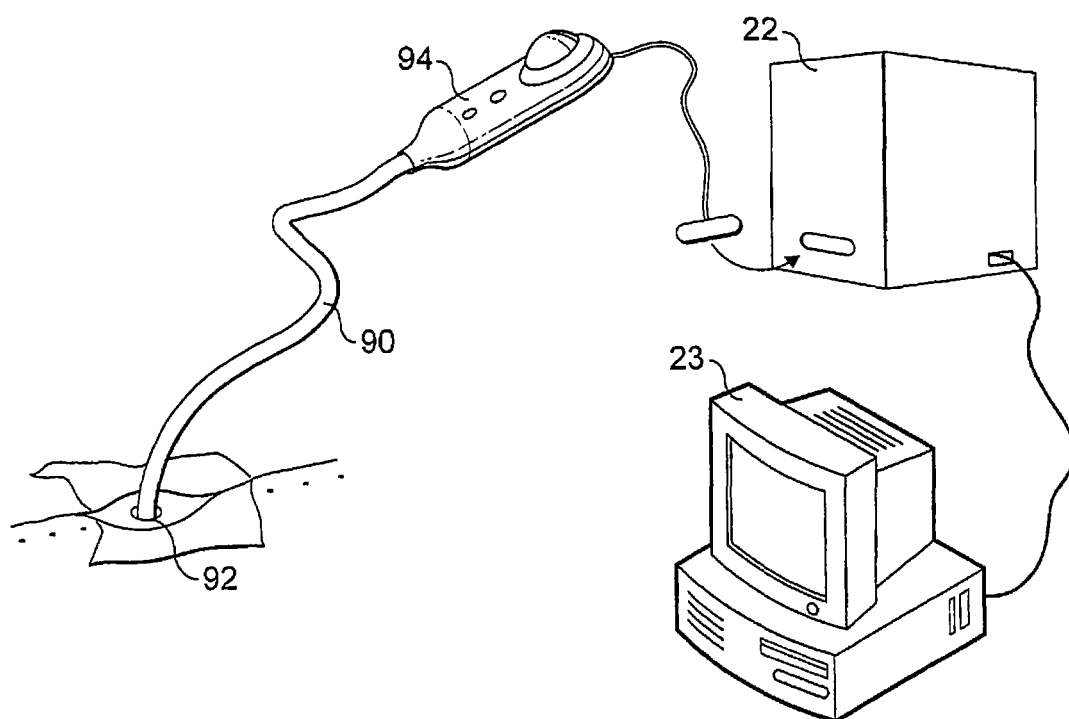


图 6b

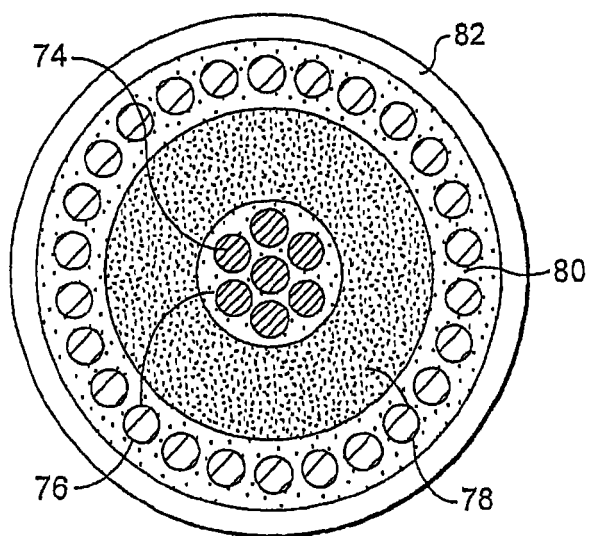


图 7a

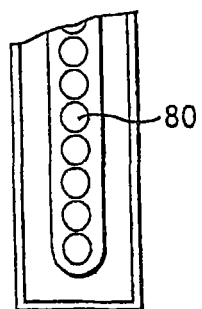
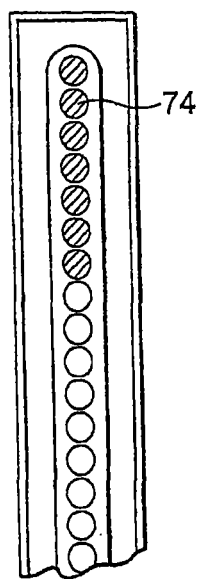


图 7b

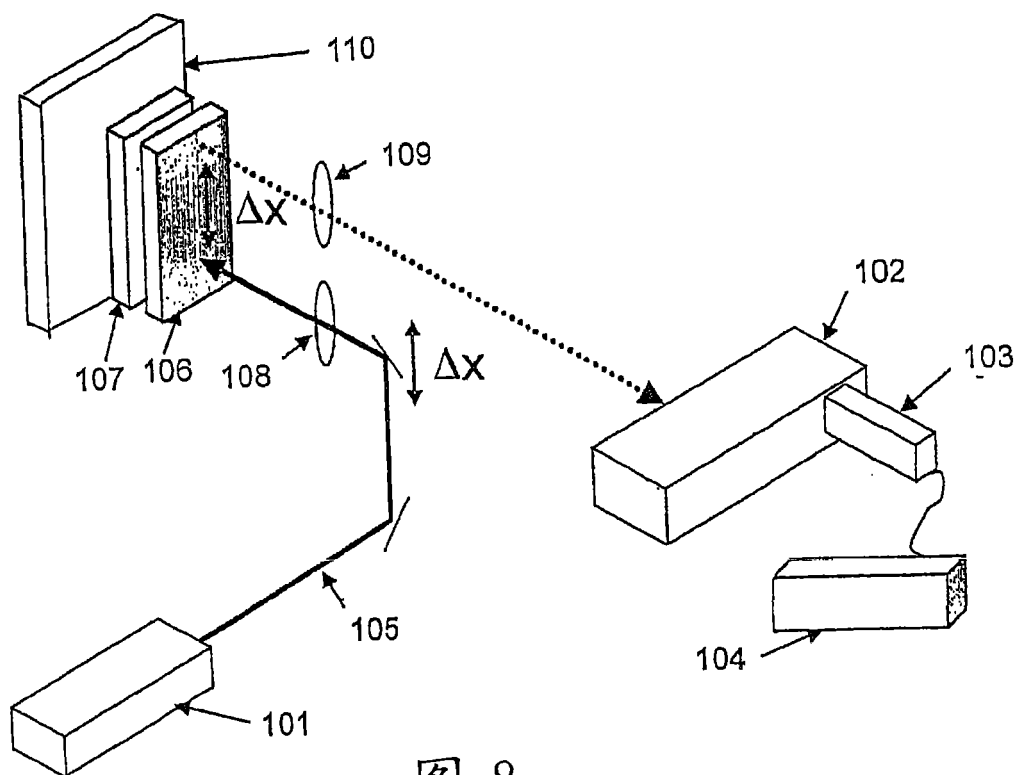


图 8

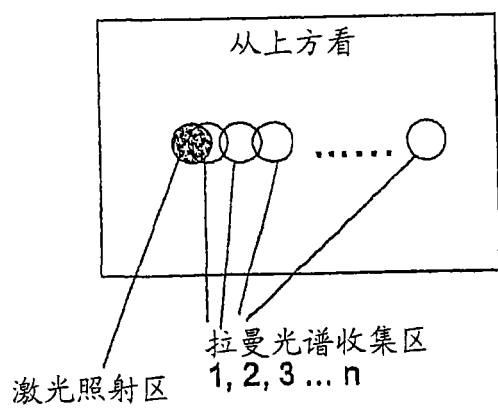


图 9

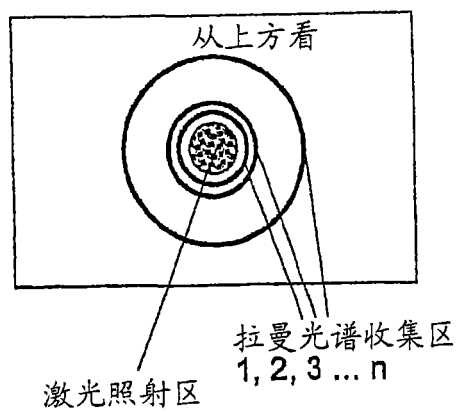


图 10

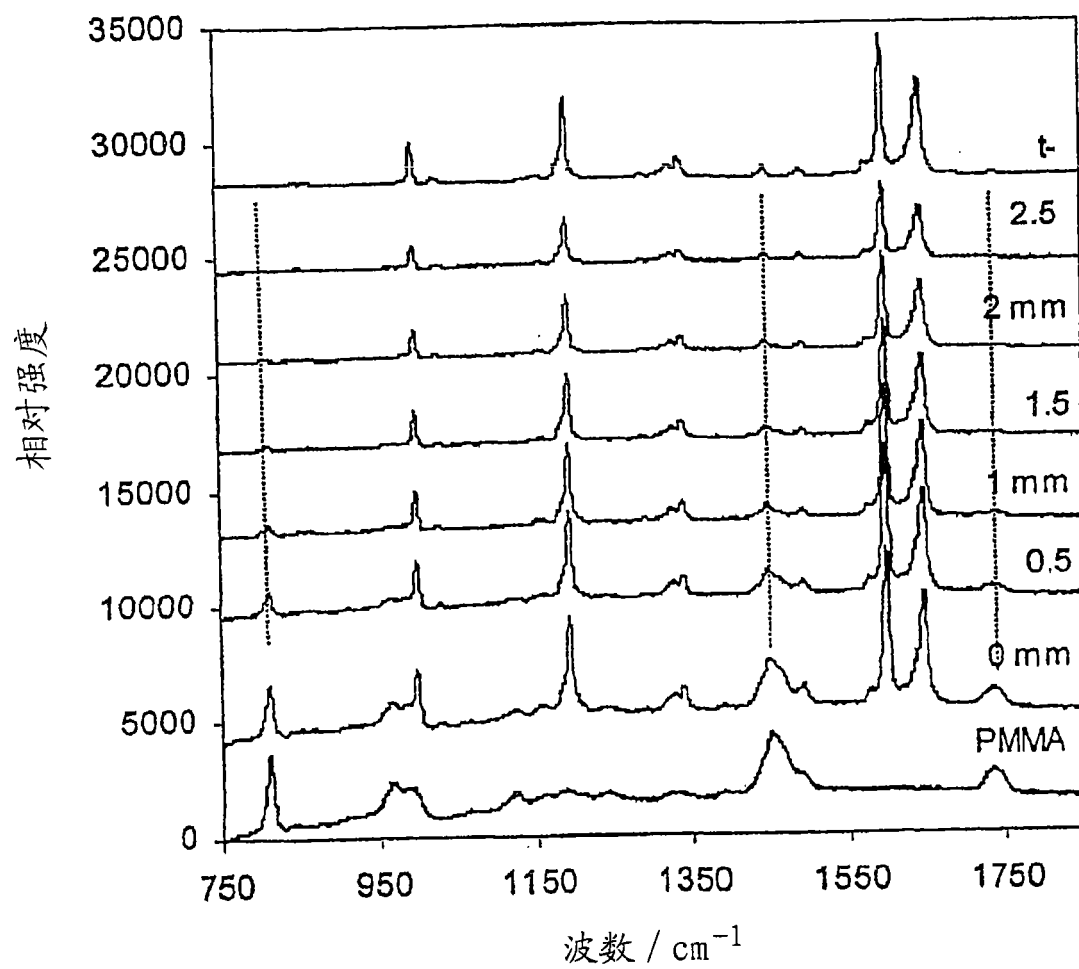


图 11

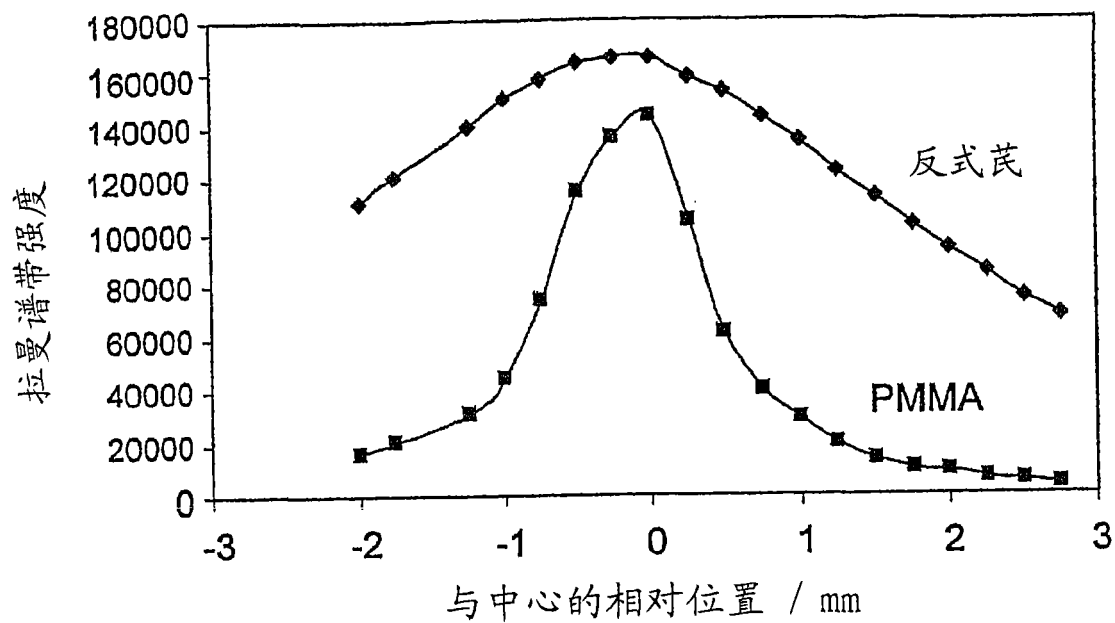


图 12

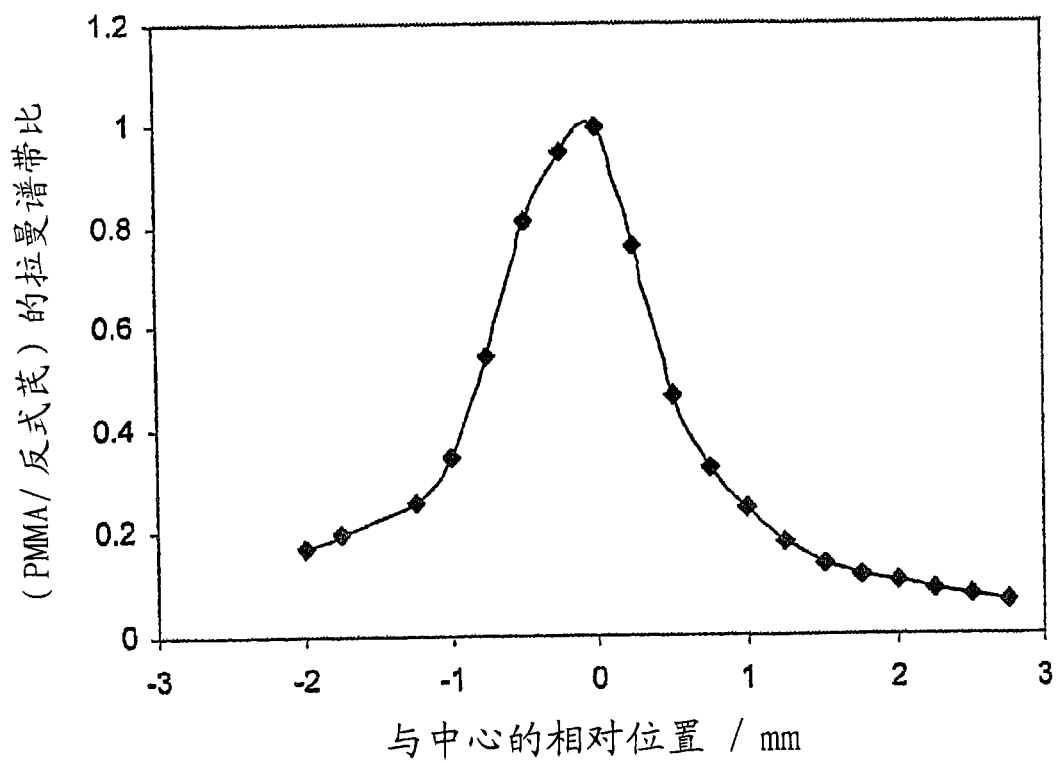


图 13

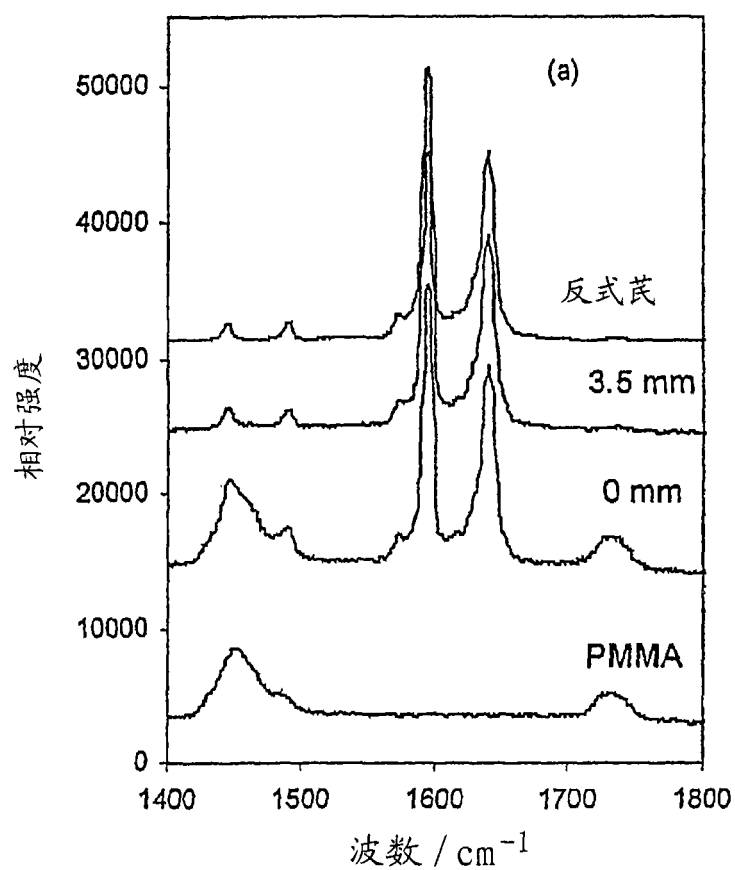


图 14

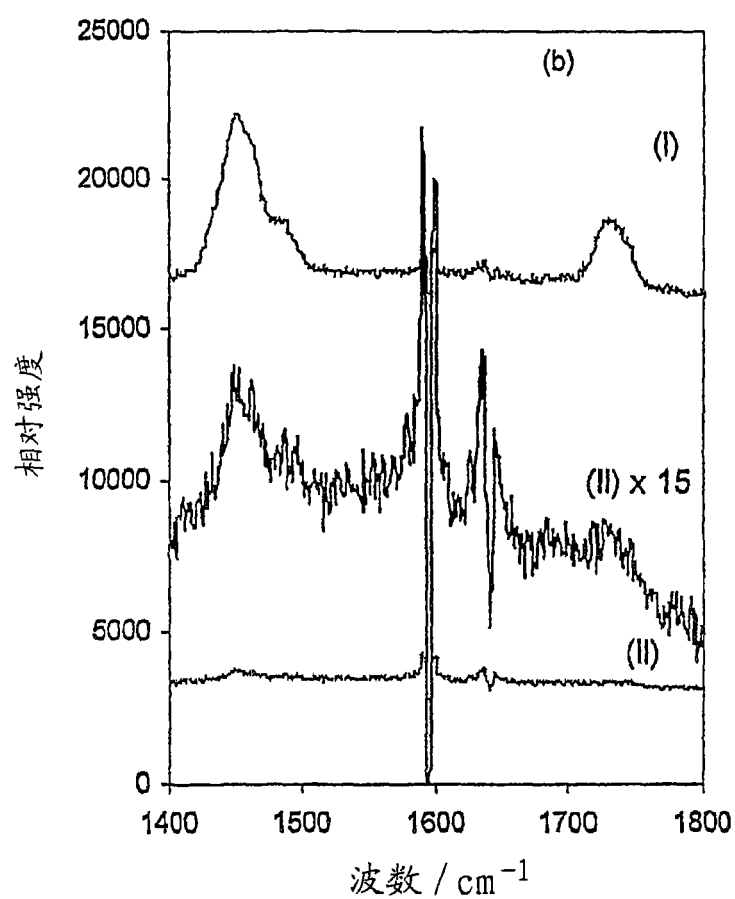


图 15

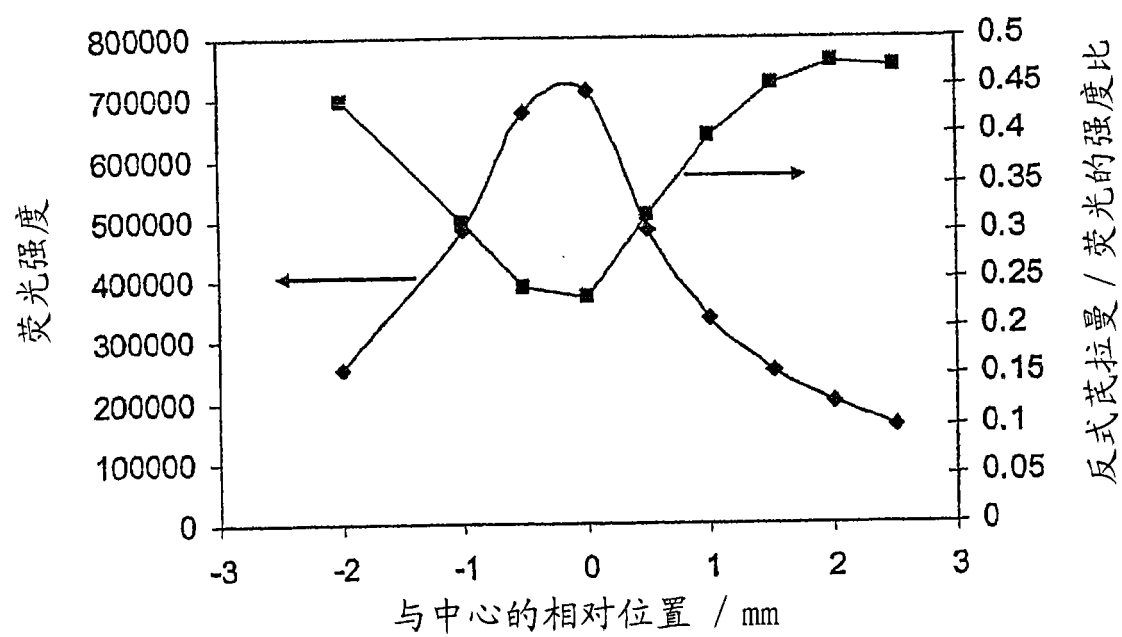


图 16

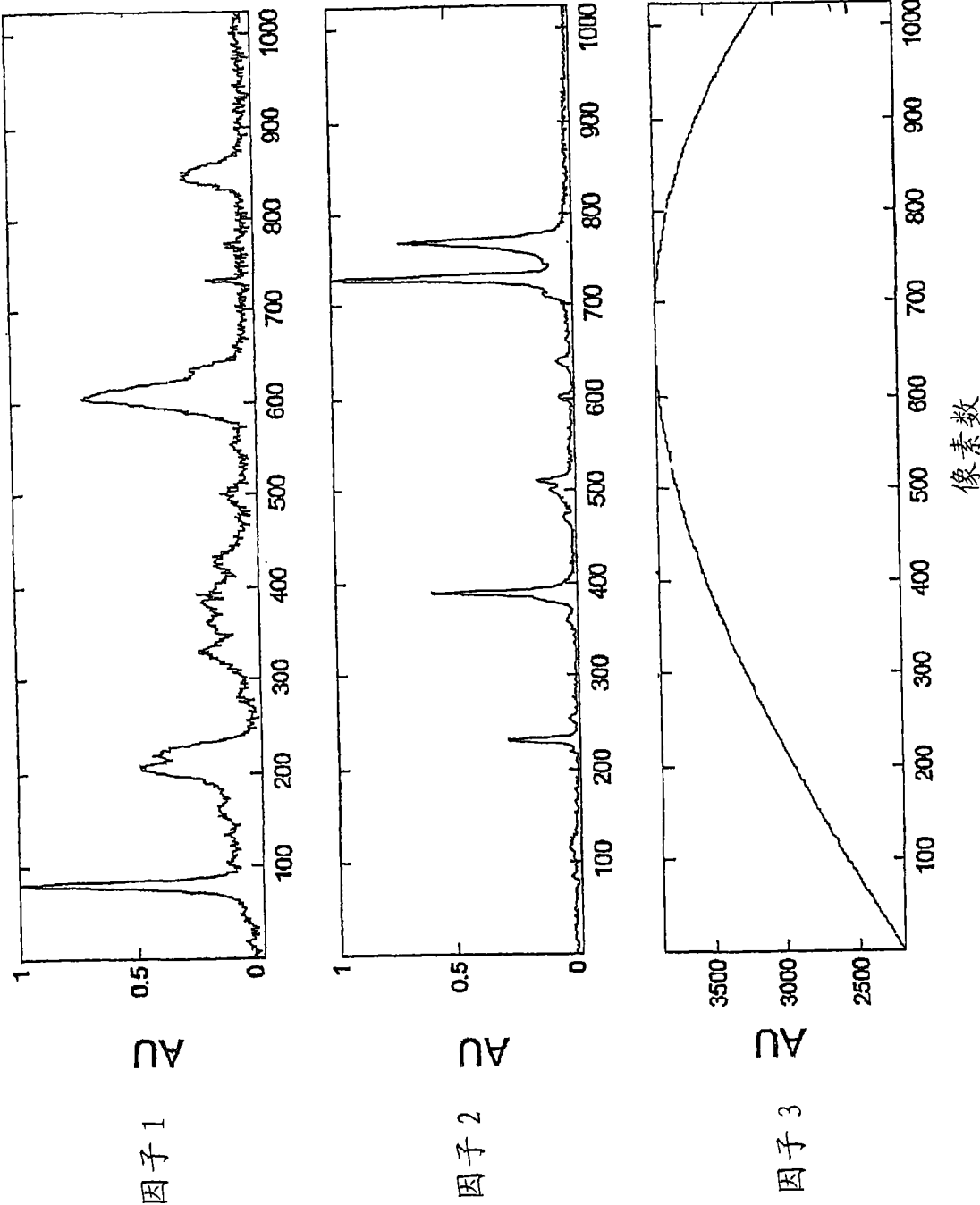


图 17

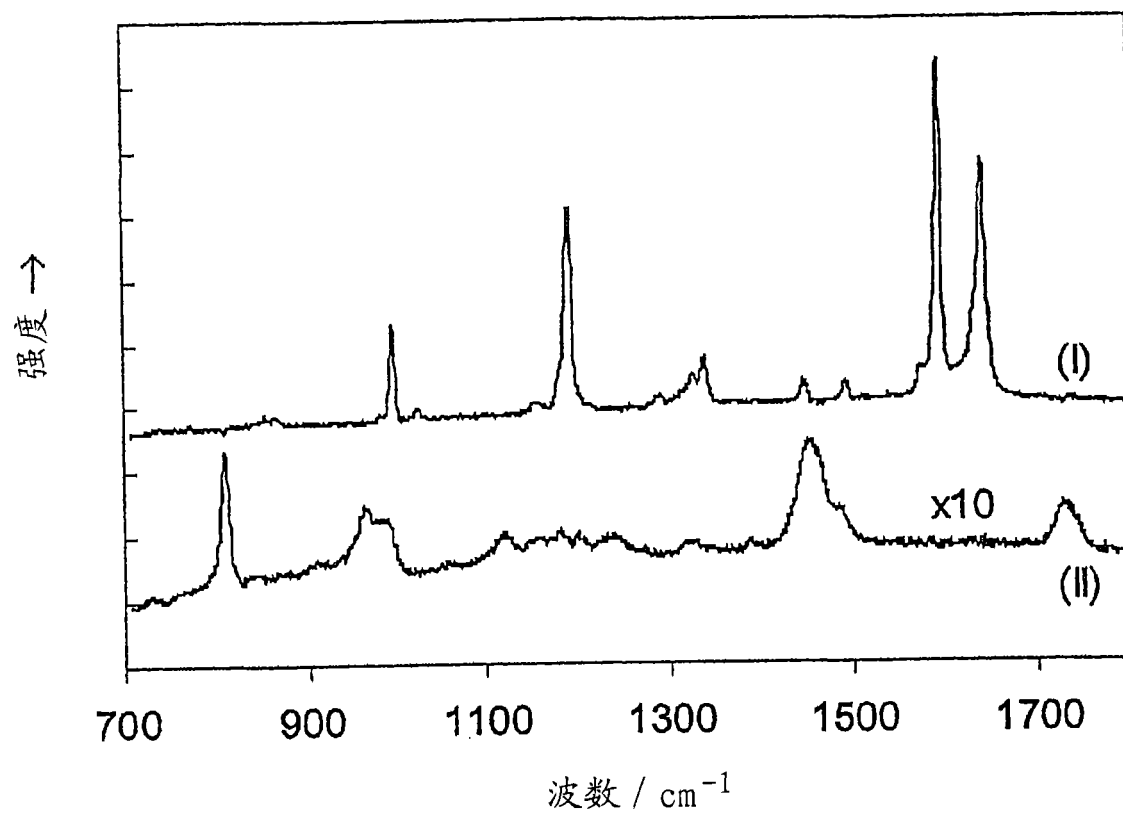


图 18

专利名称(译)	对次表面组织和液体的拉曼光谱分析		
公开(公告)号	CN101115986A	公开(公告)日	2008-01-30
申请号	CN200580047024.1	申请日	2005-11-25
[标]申请(专利权)人(译)	科学技术设备委员会		
申请(专利权)人(译)	科学技术设备委员会		
当前申请(专利权)人(译)	科学技术设备委员会		
[标]发明人	帕维尔·马陶谢克 安东尼·威廉·帕克		
发明人	帕维尔·马陶谢克 安东尼·威廉·帕克		
IPC分类号	G01N21/65 G01N21/49 G01N21/47 A61B5/00 A61B5/103		
CPC分类号	A61B5/441 A61B5/0071 G01N21/65 A61B5/0059 A61B5/4504 G01N2021/656 A61B5/0075		
代理人(译)	李辉		
优先权	2004026993 2004-12-09 GB 60/669880 2005-04-11 US		
其他公开文献	CN101115986B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及对次表面组织和液体的拉曼光谱分析。公开了用于在体内确定人体或动物体中的次表面组织或液体的特性的装置和方法。在表面上的一个或多个进入区提供入射辐射，并且从与所述进入区隔开的一个或多个收集区收集光。在所收集的光中探测拉曼特征，并且根据该拉曼特征得出深度相关信息。

