

提高中红外光谱法检测血糖精度的途径^{*}

汪 燕^{1Δ} 李 宁¹综述 徐可欣²审校

1(天津大学 精仪学院 生物医学工程系,天津 300072)

2(天津大学 精密测试技术及仪器国家重点实验室,天津 300072)

摘要 中红外光谱法不使用任何试剂检测血糖浓度,但由于精度不够高,尚未应用于临床检测。本文从中红外光谱法测量血糖浓度的原理、技术出发,结合实验研究结果,从选取最佳研究波段、光谱处理方法、消除血液中其他成分干扰及改进系统硬件等四方面分析了当前中红外光谱法测血糖可以提高测量和预测精度的途径。针对四条途径,本文分别进行了以下实验:(1)严格确定在中红外区对葡萄糖浓度变化最灵敏的区域;(2)应用遗传算法筛选波长;(3)光谱正规化以提高仪器对样品测量的再现性;(4)使用高能量的CO₂激光器作为光源,实验测量结果提高至接近或达到临床检测的可接受水平。

关键词 中红外 血糖 衰减全反射 偏最小二乘法 遗传算法

Ways to Improve Measurement Accuracy of Blood Glucose Sensing by Mid-infrared Spectroscopy

Wang Yan¹ Li Ning¹ Xu Kexin²

1(Department of Biomedical Engineering, College of Precision Instrument &

Opto-electronics Engineering, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

2(State Key Laboratory of Precision Measuring Technology and Instruments, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract Mid-infrared(MIR) spectroscopy is applicable to blood glucose sensing without using any reagent, however, due to a result of inadequate accuracy, till now this method has not been used in clinical detection. The principle and key technologies of blood glucose sensing by MIR spectroscopy are presented in this paper. Along with our experimental results, the paper analyzes ways to enhance measurement accuracy and prediction accuracy by the following four methods: selection of optimized spectral region; application of spectra data processing method; elimination of the interference with other components in the blood, and promotion in system hardware. According to these four improving methods, we designed four experiments, i. e., strict determination of the region where glucose concentration changes most sensitively in MIR, application of genetic algorithm for wavelength selection, normalization of spectra for the purpose of enhancing measuring reproduction, and utilization of CO₂ laser as light source. The results show that the measurement accuracy of blood glucose concentration is enhanced almost to a clinical detection level.

Key words Min-infrared(MIR) Blood glucose Attenuated total reflection(ATR) Partial least squares(PLS) Genetic algorithms

1 引言

糖尿病是常见的内分泌代谢病,全世界有高达3%的人患有此病,因此对其诊断和治疗意义重大。为了更清楚地了解治疗效果,糖尿病人在诊疗期间经常要进行血糖浓度化验。现有条件下,医院的临床检验对血糖浓度的检测是通过生化试剂与血液或血

浆发生作用进行。中红外光谱法(Mid-infrared spectroscopy)可直接检测血糖浓度,分析速度快,不需任何试剂和预处理。作为一种绿色检测技术,它已经成为研究不同生物医学样本的有力方法,有着广泛的应用前景。运用中红外光谱法进行血糖无创伤检测的研究,亦具有很大的潜力。

2 中红外光谱法测量血糖浓度的技术特征

中红外光谱定量分析的理论基础是 Lambert-Beer 定律,通过检测样品在不同波段下的吸光度或

^{*} 国家自然科学基金资助项目(30170261);天津市自然科学基金资助项目(03350002)

^Δ 通讯作者。E-mail: wangyan@tju.edu.cn

透射系数测量血糖浓度。根据测量方式的不同,中红外光谱法测量血糖浓度可以分为反射法和透射法两种。反射法常利用衰减全反射 ATR (Attenuated total reflection) 技术,利用入射光和反射光能量的差异进行光谱测量;透射法则是通过测量血浆、血清或全血的透射率来测定糖的浓度,一般将样品涂到聚乙烯卡或玻璃片上干燥,避免光程长的改变和水分的影 响。

获得光谱之后,中红外光谱分析可采用特征峰或化学计量学方法。对于血液这样一个复杂基质,糖的吸收峰受到其他成分的影响较大,所以常采用化学计量学方法。该方法对样品光谱和其浓度参数进行关联,建立预测模型,然后通过预测模型和未知浓度的样品光谱数据来预测浓度。常用的分析方法有多变量偏最小二乘法 PLS (Partial least square),它对多波长进行分析,能有效地从复杂的光谱中提取化学信息。

中红外光谱法测血糖的精度在不断提高之中。1989 年,Heise 等^[1,2]采用中红外 ATR 测量方式结合多变量数据建模方法,分别对血浆和全血中的葡萄糖含量进行了比较细致的研究,定量建模的结果分别是 22.0 mg/dl 和 19.8 mg/dl。随后他们对实验装置、参考值测定和建模方法等方面进行改进^[3],葡萄糖的测量精度提高到了 10.4 mg/dl。其他小组单次测量的最佳结果达到标准误差 6.3 mg/dl^[4]。

尽管如此,利用中红外光谱法测血糖仍处于实验室研究阶段,尚未取代生化方法应用于临床检测中,主要因为检测精度与临床要求还存在差距,多次测量的结果不够理想。本文从四方面分别探讨提高检测精度的途径。

3 提高中红外光谱法检测血糖精度的途径

3.1 选取最佳研究波段

血液是一个复杂的基质,其中的多成分光谱会产生谱峰重叠。为了通过数学方法准确提取葡萄糖吸收的微弱信息,选择葡萄糖的特征波段进行研究,可以大大改进预测质量。

对葡萄糖特征波段的选择最初是通过对比血液的光谱和单一成分的光谱来完成的。Zeller 等^[5]研究 12 500~500 cm^{-1} 波段,将血液光谱与水、葡萄糖溶液的光谱对比得到葡萄糖的五个吸收峰,其中 1 040 cm^{-1} 外的葡萄糖吸收峰不与血液中其他成分的吸收峰重叠,在此频率下预测可以得到理想的结

果。1 109 cm^{-1} 波段下,灵敏度很高且有典型的 C-O-C 振动出现,血红蛋白的吸收可以通过软件除掉。1 085、1 160、1 365 cm^{-1} 波段均有其它成分的峰与葡萄糖的吸收峰重叠,但可通过将该波段的吸收峰和干扰成分在其他波段的单一吸收峰的强度作比值得到血糖浓度。

1988 年 Haaland 和 Thomas^[6]提出 PLS 第一载荷向量 (First loading vector) 与分析物中单一成分的一阶光谱近似一致。2002 年 Kim 等^[4]应用这一点选取具有交互验证最小标准差 (SECV) 的区域作为成分的最优光谱区。他们得到的最佳波段为 1 149~985 cm^{-1} ,较 Heise 等^[3]用特征相关谱选取的要窄,然后用包含 1 043 和 1 082 cm^{-1} 两个波段区域的光谱建模,得到了理想的预测结果,交互验证的标准误差为 6.3 mg/dl,预测误差为 4.16%,在临床可接受范围 (10%) 之内。为了确定在中红外区对葡萄糖浓度变化最灵敏的区域,我们对葡萄糖水溶液和全血进行了双光束中红外 ATR 光谱测量,得到的吸收峰集中在 1 200~900 cm^{-1} 波段,二者均有五个吸收峰,位置分别为 1 152 cm^{-1} 、1 108、1 080、1 035 和 993 cm^{-1} 。实验中配置了血浆+生理盐水+糖(以血浆+生理盐水为背景)、全血+生理盐水+糖(以全血+生理盐水为背景)系列。结果表明,无论是血浆系列还是全血系列,因加入的葡萄糖而引起的吸光度的变化都在 1 108、1 080 和 1 035 cm^{-1} 三个波长处最为明显,即这三个波长处对葡萄糖浓度变化最为灵敏。

通过确定对葡萄糖浓度变化最灵敏的区域,为下一步的分析奠定了基础。采用该波段进行建模和预测,可以大大提高预测精度。

3.2 改进光谱处理方法

为提高预测精度,需要改进传统的算法,消除血液 中其他成分干扰,可通过改进建模方法和光谱正规化来实现。传统的偏最小二乘方法具有较强的抗干扰能力,可全波段或根据相关性选取某波段参与建模,但最小二乘法是将成分浓度和 IR 吸收系数做线性近似,而测量过程中有许多因素导致实际关系偏离线性,如检测器响应非线性,光的偏离,样本浑浊和样本不均引起的多次散射;吸收峰位置偏移及峰宽变化,导致不同成分间的相互作用。

人工神经网络 ANN (Artificial neural network) 方法可以做很好的非线性近似,尤其当输入是正交时,效果更好。它可以将光谱数据和浓度做很好的非线性近似。PLS 方法产生正交得分矩阵且需要较

少的主成分,可以为 ANN 方法提供输入参数。Phasant 等^[7]将二者相结合,在1 500~750 cm⁻¹范围建立定标模型,将全血中葡萄糖浓度的预测精度由单独用PLS方法得到的21.5 mg/dl提高至15.6 mg/dl,并且对测量血浆中各成分含量的各种多元数据建模方法进行了较为全面的比较,指出PLS结合ANN方法比单纯的PLS方法预测结果更好。

随着对 PLS 方法的深入研究和应用,通过特定方法筛选特征变量有可能得到更好的定量校正模型。筛选特征变量一方面可以简化模型,更主要的是由于不相关或非线性变量的剔除,可以得到预测能力更强的校正模型。王宏等^[8]在光谱数据建模中把研究和应用较为广泛的遗传算法用于波长的筛选,筛选后的波长变量作为输入参数,由PLS方法建立分析校正模型。对1 200~900 cm⁻¹波段建模,采用遗传算法对波长进行两次优选,用第一次选得37个波长点以及第二次选得14个波长点分别建立校正模型,结果如表1所示。

表 1 全血建模结果
Table 1 Modeling result of whole blood

波长数	C. RMSEP(mg/dl)	相关系数
76(全部波长)	14.49	0.59
37(第一次优选)	12.96	0.69
14(第二次优选)	10.56	0.80

由表1可以看出,引入遗传算法对波长点进行优化选择,不但大大减少了建模波长点个数,进而减少光谱数据采集量和数据处理的运算量,对建模精度起到了显著的改善作用。最后全血实验的建模结果为RMSEP为10.56 mg/dl,相关系数为0.80。如果以此次实验40个全血样品葡萄糖浓度参考值的均值94.46 mg/dl作为实测真值,则14个波长点所建立模型的相对误差约为10.56/94.46=11%,已经接近了医院临床对血糖浓度测量误差10%的要求。

3.3 消除血液中其他成分干扰

消除漂移和其它误差因素如水的吸收和蛋白质含量不同等的干扰主要通过通过对光谱进行正规化。一方面采用定标曲线校正基线漂移和消除血液中其他成分的干扰,Kajiwara 等^[9]以口腔黏膜中的葡萄糖为研究对象,计算了1 033 cm⁻¹和2 920 cm⁻¹处吸收峰差值的二阶导数的定标曲线,得到升高的葡萄糖浓度和1 033 cm⁻¹处的口腔黏膜的吸收光谱二阶导数之间好的相关性($r=0.910$),消除了ATR反射镜的固定引起的基线漂移以及人体中其他成分光谱对该吸收峰的影响。血清和全血中红血球、血清白蛋白等会影响葡萄糖的吸收,并引起基线上升,计算相对值的方法可以消除这些影响。

另一方面可选取某吸收峰作为参比校正光谱,消除基线漂移和成分干扰,沈韬等^[10]以1 404 cm⁻¹处吸收峰作参比,结果表明人手指的中红外光谱1 123 cm⁻¹校正后谱带的相对强度与人的血糖浓度同步变化,相关系数达到0.984。这表明葡萄糖特征谱带的相对强度变化可作为人体血糖值的一个数量指标,同时证明用FT-IR中红外光导纤维法进行人体血糖的非损伤性测定和监测血糖变化在原理及技术上均是可行的。

我们在对血浆和全血中葡萄糖浓度预测的研究中发现,全血实验的再现性较差,可能存在某种漂移。通过采用光谱正规化的方法,以不同葡萄糖浓度的四条谱线中1 035 cm⁻¹处吸光度差值的最大值为基准做一点正规化处理,来消除漂移的影响,所得结果见图1(a),由图可以看出,四条谱线形状虽然类似,但以一点为基准做正规化后重合性效果并不是很好。再以1 170 cm⁻¹和960 cm⁻¹两个波数处的吸光度差值做两点正规化处理,所得结果见图1(b),由图可以看出,以两点做正规化后四条谱线的重合效果较好,即便仪器对于全血测量的再现性不好,仍有可能利用数学的方法来加以校正,从而提高预测精度。

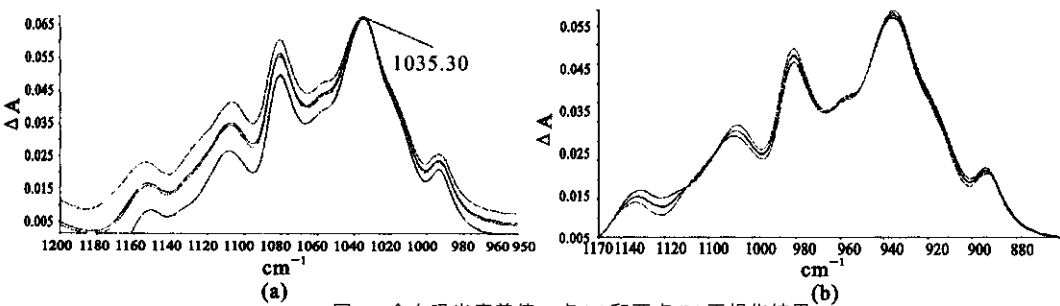


图 1 全血吸光度差值一点(a)和两点(b)正规化结果
Fig 1 One point (a) & Two points (b) normalization of absorption difference of whole blood

万方数据

3.4 改进测量硬件

因为CO₂激光器发射出的光能量较高,使用CO₂激光器代替FT光源可以显著提高仪器测量血糖浓度的信噪比,从而提高检测精度。CO₂激光器的特征波长范围约为1 087~926 cm⁻¹,在葡萄糖的1 106、1 080和1 033 cm⁻¹三个吸收峰中,1 080 cm⁻¹和1 033 cm⁻¹两个波数在此波长范围内,而且与CO₂激光器的两个特征波数1 079.9 cm⁻¹和1033.6 cm⁻¹基本匹配,这说明用CO₂激光器可以代替FT光源。

Kaiser^[11]最早提出利用CO₂激光器作为红外光源结合ATR测量方式对血液中的生化指标进行测量的方法,Mendelson等采用单一波长和最小二乘建模方法对猪血^[12]及人血^[13]中的葡萄糖含量进行了测量,精度分别可以达到20.2 mg/dl和17.0 mg/dl。

我们的实验硬件系统中采用美国Access Laser公司的最新专利产品Lasy 4G型CO₂激光器,它的设计上克服了传统CO₂激光器尺寸过长不便应用的缺点,输出波长可调谐。为了克服CO₂激光器输出功率稳定性不高的缺点,在测试系统中采用双光路设计来消除这种影响。由于10 μm左右的中红外光不能透过玻璃、石英等常规材料,我们采用在红外波段具有低吸收特性的硒化锌(ZnSe)晶体作为实现双光路设计的分束器,透射光作为测量光,反射光作为参考光。应用CO₂激光器1 080 cm⁻¹波数的激光对HATR样品池中的蒸馏水样品连续测量10次,将测量路与参考路的比值结果的标准偏差与均值的比定义为信噪比,则本系统对蒸馏水的测量信噪比可计算为0.00068607/1.32861749=0.00051638,也就是说,测量信噪比约为万分之五,高于FT-IR光谱仪的测量信噪比。

4 结 语

目前,在选取研究最佳波段、光谱数据分析、消除干扰和改进硬件等几个主要方面,中红外光谱法检测血糖浓度的精度存在很大的可提高空间。单次测量的结果已经接近或达到临床检测的可接受水平,通过几个方面的改进,可以进一步提高多次测量的重复性。

另外,中红外光谱法测血糖正向无创检测的方向发展,作为一种绿色检测技术,它代替试剂法应用于临床检测中,有着乐观的应用前景。

参 考 文 献

1 Janatsch G, Kruse JD, Heise HM, *et al.* Multivariate calibration of assays in clinical chemistry using attenuated total reflection infrared spectroscopy of human blood plasma. *Anal Chem*,1989; 61(18) : 2016

2 Heise HM, Marbach R, Janatsch G, *et al.* Multivariate determination of glucose in whole blood by attenuated total reflection infrared spectroscopy. *Anal Chem*,1989; 61(18) : 2009

3 Heise HM, Marbach R, Koschinsky TH, *et al.* Multi-component assay for blood substrates in human plasma by mid-Infrared spectroscopy and its evaluation for clinical analysis. *Appl Spectrosc*, 1994;48(1) : 85

4 Kim YJ and Yon G. Multi-component assay for human serum component-optimized spectral region selected by a first using mid-infrared transmission spectroscopy based on loading vector analysis in partial least-squares regression. *Appl. Spectrosc.*, 2002;56(5) : 625

5 Zeller H, Novak P, Landgraf R. Blood glucose measurement by infrared spectroscopy. *The International Journal of Artificial Organs*, 1989;12(2) : 129

6 Haaland DM, Thomas EV. Partial least squares methods for spectral analyses, 1. Relation to other quantitative calibration methods and the extraction of qualitative information. *Anal Chem*, 1988;60 : 1193

7 Phashant B, Mendelson Y, A. Peura R, *et al.* Multivariate determination of glucose in whole blood using partial least-squares and artificial neural networks based on mid-infrared spectroscopy. *Appl. Spectrosc*, 1993; 47(8) : 1214

8 Wang H, Li QB, Liu ZY, *et al.* Application of genetic algorithms in fundamental study of non-invasive measurement of human blood glucose concentration with near infrared spectroscopy. *Chinese Journal of Anal Chem*, 2002; 30(7) : 779[王 宏,李庆波,刘则毅等. 遗传算法在近红外无创人体血糖浓度测量基础研究中的应用. *分析化学*,2002,30(7) : 779]

9 Kajiwara K, Uemura T, ishikawa H, *et al.* Noninvasive measurement of blood glucose concentrations by analyzing Fourier transform infrared absorbance spectra through oral mucosa. *Med&. Biol Eng Comut*, 1993;31 : 17

10 Shen T, Peng Q, Weng SF, *et al.* Study on noninvasive measurement of blood glucose with FTIR mid-infrared fiber optics technique. *Spectroscopy and Spectral Analysis*,1996;16 (3) : 39[沈 韬,彭 卿,翁诗甫等. 傅立叶变换中红外光谱法用于非损伤性血糖测定的研究. *光谱学与光谱分析*,1996;16 (3) : 39]

11 Kaiser0. Method for determining the contents of metabolic products in the blood, United States Patent, 4,169,676, Oct. 2, 1979

12 Mendelson Y, Clermont A, Peura RA, *et al.* Blood glucose measurement by multiple sttenuated total reflection and infrared absorption spectroscopy. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 1990;37(5) : 458

13 Clermont A, Lin B, Peura RA, *et al.* In vitro blood glucose measurement using a CO₂laser based attenuated total reflection technique. 9th Annual Conference of the Engineering in Medicine and Biology Society, CH2513-0/87/0000-0792, IEEE 1987