

doi: 10.3788/gzxb20124101.0112

喇曼光谱对血糖的半定量分析

林漫漫^{1,2}, 牛丽媛^{1,2}, 覃赵军^{1,2}, 李雪^{1,2}, 邓洋鸽¹, 匡志鹏³, 刘军贤¹, 姚辉璐^{2,1}

(1 广西师范大学 物理科学与技术学院, 广西 桂林 541004)

(2 广西科学院 生物物理实验室, 南宁 530003)

(3 广西肿瘤防治研究所, 南宁 530021)

摘要: 血糖检测一般采用酶化和生化方法, 但这些方法都是有损破坏性的检测方法. 本文利用喇曼光谱技术来检测血糖浓度, 并且建一种新的数据分析方法来分析血糖的含量, 以探索一种无损、快速的血糖检测方法. 以小白鼠为实验模型, 麻醉的小白鼠在注射葡萄糖后半个小时开始抽取小鼠尾巴处的血液进行喇曼光谱的获取, 此后每间隔 15 min 对小鼠尾巴进行抽血并获取血液的喇曼光谱, 在每次测量小鼠血液喇曼光谱的同时用血糖仪来监测血糖浓度的变化情况以用来做参比. $1\ 125\ \text{cm}^{-1}$ 是葡萄糖的喇曼特征峰, 血液中的葡萄糖称为血糖, 因此我们把血液光谱中的 $1\ 125\ \text{cm}^{-1}$ 作为血糖峰, $1\ 549\ \text{cm}^{-1}$ 为血红蛋白的喇曼特征峰, 人体中的血红蛋白是稳定的, 所以本文以血红蛋白的峰 $1\ 549\ \text{cm}^{-1}$ 作为内标来研究血液喇曼光谱中血糖峰的强度. 结果表明 $1\ 125\ \text{cm}^{-1}/1\ 549\ \text{cm}^{-1}$ 的变化可以很好地与血糖变化相对应, 并且具有良好的线性关系. 利用喇曼光谱技术可以无损地对血糖进行半定量分析.

关键词: 喇曼光谱; 血糖; 无损

中图分类号: O433.5+4; Q6

文献标识码: A

文章编号: 1004-4213(2012)01-0112-4

0 引言

体内各组织细胞活动所需的能量大部分都来自于葡萄糖, 血糖必须保持一定的水平才能维持体内各器官和组织的需要, 因此血糖的监测非常重要, 但是目前医院对血糖的检测方法还都是对样品有损破坏性的检测方法. 这里探索一种新的分析血糖含量的方法, 喇曼光谱是一种产生于分子或者晶格振动能级的光子的非弹性散射光谱. 由于分子中不同化学键的振动方式分别导致喇曼光谱特征峰的强度、位置和线宽等不同, 因而从得到的喇曼光谱就可以推断出物质所含分子的结构与组成等^[1-4]. 喇曼光谱谱峰清晰尖锐, 喇曼峰强度和物质浓度成直接的线性关系^[5]. 因此可以利用喇曼光谱的这些特性来对物质进行定性、定量和无损分析. 已经有相关文献利用喇曼技术对血糖进行了无损定量的分析^[6], 但是它们的数据分析方法是比较复杂. 本文探索一种新的数据分析方法对血糖含量进行分析测量, 通过实验验证, 结果表明这种分析方法结合喇曼技术可以对血糖进行半定量分析.

本文测量了不同葡萄糖溶液浓度的喇曼光谱,

发现 $1\ 125\ \text{cm}^{-1}$ 为葡萄糖的特征峰, 这与相关的文献相符^[7-8]. 同时又测量了不同血糖浓度的血液的喇曼光谱, 从这些血液的喇曼光谱中观察到它们都含有 $1\ 125\ \text{cm}^{-1}$ 峰, $1\ 125\ \text{cm}^{-1}$ 是葡萄糖的特征峰, 血液中的葡萄糖称为血糖, 因此把血液中的 $1\ 125\ \text{cm}^{-1}$ 峰定为血糖峰, 在血液光谱中 $1\ 549\ \text{cm}^{-1}$ 为血红蛋白峰^[9], 人体中的血红蛋白含量是稳定的, 因此本文选取 $1\ 549\ \text{cm}^{-1}$ 血红蛋白峰作为内标来分析血糖的含量. 所获得的血液光谱以 $1\ 549\ \text{cm}^{-1}$ 做归一化, 在实验过程中测量血液喇曼光谱的同时用血糖仪对小鼠的血糖进行测量用来做参比. 实验结果表明 $1\ 125\ \text{cm}^{-1}$ 峰的相对强度与血糖实际值的变化趋势是一样的, 而且它们之间存在良好的线性关系, 这种线性相关性达到了 0.94 以上, 这种结果证实了利用这种分析方法喇曼光谱在一定程度上是可以反映血糖浓度的.

1 实验部份

1.1 材料与方法

分别精确称取 0.019 8 g、0.396 g、1.98 g、1 g、2 g 的葡萄糖, 然后再加蒸馏水分别稀释成 1 mmol、

基金项目: 国家自然科学基金(No. 60868002, No. 31060128, No. 0760278)、广西自然科学基金(No. 2011GXNSFA018143)和广西研究生创新基金(No. 201106020702M40)资助

第一作者: 林漫漫(1988-), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为喇曼光谱在生物医学中的应用. Email: linmanman66@163.com

责任作者/通讯作者: 姚辉璐(1972-), 男, 研究员, 主要研究方向为生物物理和光谱分析. Email: yaohl@163.net

收稿日期: 2011-08-30; **修回日期:** 2011-10-28

20 mmol、100 mmol、10% (0.56×10^3 mmol)、20% (1.62×10^3 mol) 的葡萄糖溶液,配置好的葡萄糖溶液进行喇曼光谱的获取,每次不同浓度的葡萄糖溶液获取 5~10 个光谱,积分时间 15 s.

SPF 级 KM 雄性小鼠,重量为 18~22 g,实验前小鼠经过 24 h 的断粮不断水的饥饿处理.然后给饥饿处理过的小鼠进行腹腔注射葡萄糖,半个小时之后从小鼠尾巴处取血立刻进行血液喇曼光谱的测量.之后每间隔 15 min 测一次喇曼光谱,每次收集 3~5 个光谱,每个光谱获取时间积分 15 s.同时利用血糖仪(GT-1810 型,ARKRAY Factory, Inc.)对所采集的血样测其血糖值.

1.2 数据分析

实验所收集到的光谱分别在 Origin8.0、Raman Baseline 以及自编的软件中进行减背景、平滑、基线校正、平均、归一化,之后观察 1125 cm^{-1} 的相对强度与血糖实际值的对应情况.

1.3 实验装置

如图 1 所示,一束二极管激光穿过干涉滤波片、针孔、二向色镜,然后被引入到倒置显微镜中,样品的喇曼散射光通过同一显微物镜之后,穿过陷波滤波片和针孔,然后聚焦到耦合 CCD 的光谱仪的入口处进行收集. CCD 把所收集到的光谱的信号转化为数字信号,在电脑中以光谱的形式表示出来.具体装置描述见文献[10].

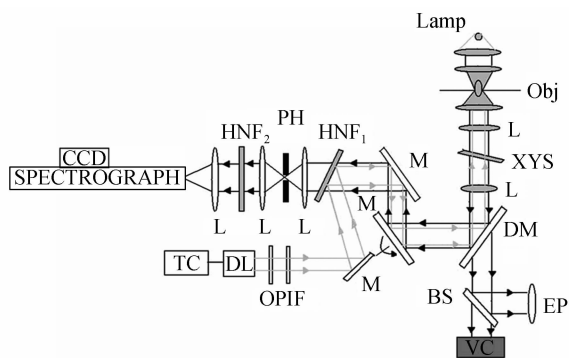


图 1 实验装置

Fig. 1 Scheme of experimental setup

2 实验结果与讨论

图 2 为浓度分别为 20% (1.26×10^3 mmol)、10% (0.56×10^3 mmol)、100 mmol、20 mmol、1 mmol 葡萄糖溶液和纯水的喇曼光谱,从图中可以看到当葡萄糖溶液浓度为 1 mmol、20 mmol 时,葡萄糖溶液的喇曼光谱与纯水的光谱是基本相同的,葡萄糖的特征峰在此浓度范围内并没有出现,原因是葡萄糖的浓度过低而致使喇曼系统检测不到,而当葡萄糖溶液浓度为 100 mmol、10% ($0.56 \times$

10^3 mmol)、20% (1.26×10^3 mmol) 时,在光谱中出现了 1125 cm^{-1} 葡萄糖特征峰,并且这个峰的强度随着葡萄糖浓度的增大而增大.图 3 为不同血糖浓度血液的喇曼光谱.在图中各个血糖浓度的血液光谱中可以很明显地看到 1125 cm^{-1} 峰,但是这些光谱的血糖浓度都在 20 mmol 以下.根据以上测量的葡萄糖溶液的喇曼光谱得到的喇曼系统检测范围,是测不到血液中的血糖峰的.但是从图 3 中可以很明显地看到 1125 cm^{-1} 峰,导致这一结果的原因还有待进一步探讨.然而可以确定在血液光谱中 1125 cm^{-1} 峰为血糖峰,并选用血红蛋白峰 1549 cm^{-1} 作为血液的内标.实验中主要研究 1125 cm^{-1} 峰与 1549 cm^{-1} 峰强度的比值同血糖实际值之间的对应关系.图 4 是在显微镜下观察的小鼠血液的图像.

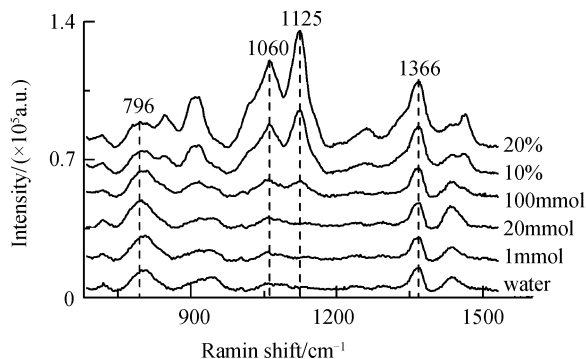


图 2 不同葡萄糖溶液浓度的喇曼光谱

Fig. 2 The Raman spectra of different concentrations of glucose solution

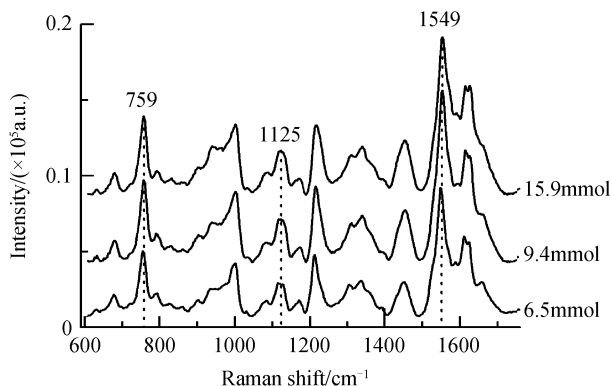


图 3 不同血糖浓度血液的喇曼光谱

Fig. 3 The Raman spectra of different concentrations of blood glucose

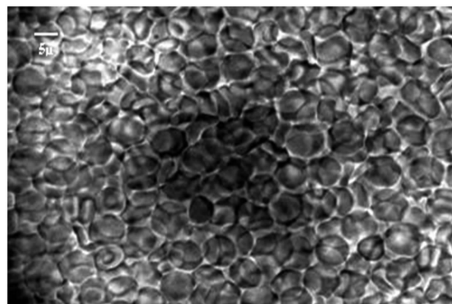


图 4 小鼠血液图像

Fig. 4 The picture of rat blood

为了得到归一化后血糖峰 1125 cm^{-1} 的相对强度,本文自编了一个基线校正、归一化的程序,用其进行基线校正和归一化处理.图5就是使用该软件对不同血糖浓度的平均血液光谱归一化处理后的结果.从图中可以看出 1125 cm^{-1} 血糖峰相对强度的变化与血糖浓度的变化成正相关关系.

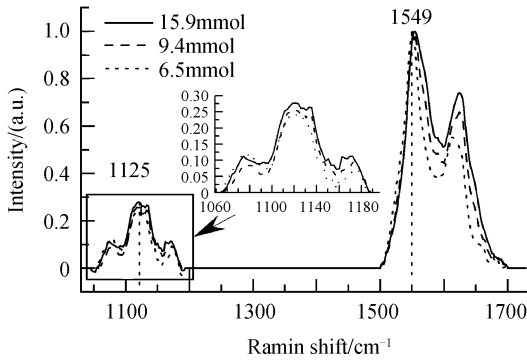


图5 基线校正、归一化后的血液光谱
Fig. 5 The blood spectra baseline after corrected and normalized

把实验中测得的不同血糖浓度的血液光谱都经过上述处理,得到 1125 cm^{-1} 的相对强度值,如表1所示,表1中血糖值是小鼠注射葡萄糖半个小时之后每间隔 15 min 用血糖仪测得实际血糖值. 1125 cm^{-1} 血糖峰的相对强度值对应的是血液喇曼光谱经过平均、基线校正、以 1549 cm^{-1} 归一化处理后得到的 1125 cm^{-1} 的相对强度值.从表1中我们也可以看出 1125 cm^{-1} 峰的相对强度与血糖值的变化成正相关关系,当血糖值增大时, 1125 cm^{-1} 的相对强度增大,当血糖值减小, 1125 cm^{-1} 的相对强度也相应的减小.图6可直观地展现这种关系,这表明了用喇曼光谱得到的血糖峰的相对强度随时间的变化与小鼠实际血糖值随时间的变化趋势大致相同.这也说明了用喇曼技术得到的血糖峰的相对强度值同样也可以反映小鼠的血糖含量的变化.

表1 实际血糖值与 1125 cm^{-1} 相对强度对应表
Table1 Actual blood glucose values corresponding to 1125 cm^{-1} relative intensity

Time/min	Blood glucose/mmol	1125 cm^{-1} relative intensity
30	4.8	0.239 51
45	5.6	0.241 54
60	8.4	0.253 96
75	12.1	0.258 16
90	15.9	0.274 2
105	9.4	0.255 72
120	7.2	0.251 52
135	6.5	0.245 49
150	6.2	0.244 53

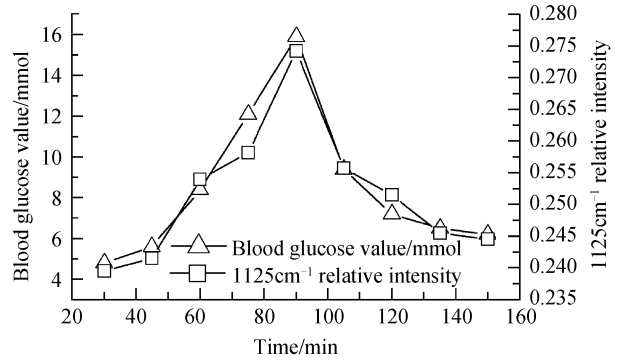


图6 血糖值与 1125 cm^{-1} 的相对强度值对应图
Fig. 6 The figure of Actual blood glucose values corresponding to 1125 cm^{-1} relative intensity

图7为 1125 cm^{-1} 的相对强度与对应的实际血糖值的曲线拟合情况,通过这个拟合图看出血糖实际值与 1125 cm^{-1} 相对强度值有很好的线性关系,它们的线性相关性(R-Square)为 0.94,进一步得到实际血糖值和血液光谱 1125 cm^{-1} 的相对强度值之间的关系能够用线性方程来表示,即: 1125 cm^{-1} 的相对强度 = $0.227 + \text{实际血糖值} \times 0.003$.因此如果得到了血液的喇曼光谱,通过一系列数据分析可得到 1125 cm^{-1} 相对强度,然后再根据其线性相关度和线性方程可以实现对血糖的半定量分析.图7可直观地表达这种关联.

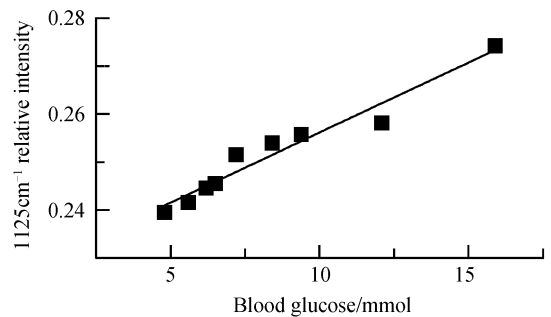


图7 1125 cm^{-1} 的相对强度值与血糖值的拟合曲线
Fig. 7 The Fitting curve of Actual blood glucose values corresponding to 1125 cm^{-1} relative intensity

3 结论

本文应用喇曼系统对血糖含量进行分析,选用 1549 cm^{-1} 血红蛋白峰作为内标并以它来进行归一化,研究不同血糖浓度时的 1125 cm^{-1} 的相对强度值.实验结果表明 1125 cm^{-1} 的相对强度值的变化与实际测得对应血糖值的变化趋势基本一致,并且发现血液喇曼光谱的血糖峰的强度和实际测得的血糖值有良好的线性关系,其线性相关系数达到了 0.94 以上,得出它们之间的线性方程: 1125 cm^{-1} 的相对强度 = $0.227 + \text{实际血糖值} \times 0.003$.这表明,利用喇曼技术可以分析得到血糖的大致含量.之前,已

经有实验证明,喇曼技术可以用于活体实验^[11-12],我们下一步的工作将是测量活体小鼠的血液的喇曼光谱,进而分析喇曼光谱,探究活体中血液的血糖峰是否存在及其与血红蛋白峰强度的比值能否反映血液中血糖的含量.这将为研究无创血糖检测打下良好的基础.

参考文献

- [1] LIANG Er-jun, LIANG Hui-qin. Study on the properties and phase transition in laser quenching and cladding layers by Raman spectroscopy[J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2006, **33**(1): 120-123.
梁二军,梁会琴.激光淬火及覆层性能与物相变化的喇曼光谱研究[J].中国激光,2006,**33**(1):120-123.
- [2] LI Zi-da, TAO Zhan-hua, MENG Ling-jing, et al. Sorting economic microorganisms by using optical manipulation and Raman microspectroscopy[J]. *Acta Photonica Sinica*, 2011, **40**(5): 722-727.
李自达,陶站华,孟令晶,等.分选特殊产物微生物的喇曼光谱法[J].光子学报,2011,**40**(5):722-727.
- [3] YAO Hui-lu, WANG Gui-wen, HE Bi-juan, et al. Raman spectra of single blood cells[J]. *Jorunal of Jinan University (Sci & Tech)*, 2005, **19**(4): 328-330.
姚辉璐,王桂文,何必娟,等.单个红细胞的喇曼光谱研究[J].济南大学学报(自然科学版),2005,**19**(4):328-330.
- [4] WANG Gui-wen, YAO Hui-lu, HE Bi-juan, et al. Raman microspectroscopy of single blood platelets[J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2007, **27**(7): 1347-1350.
王桂文,姚辉璐,何必娟,等.单个血小板的喇曼光谱分析[J].光谱学与光谱分析,2007,**27**(7): 1347-1350.
- [5] LI Yan, MENG Ling-jing, LIU Jun-xian, et al. Gelatinization process of single rice starch particle using laser tweezers Raman spectroscopy system[J]. *Acta Photonica Sinica*, 2010, **39**(7): 1323-1329.
李艳,孟令晶,刘军贤,等.喇曼光谱法测定单个大米淀粉颗粒糊化过程的实时研究[J].光子学报,2010,**39**(7):1323-1329.
- [6] ANNIKA M K E, THOMAS G S, JEANKUN O, et al. Raman spectroscopy for noninvasive glucose measurements [J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2005, **10**(3): 1114-1122.
- [7] WU Xiao-qiong, ZHENG Jian-zhen, LIU Wen-han, et al. Quantitative determination of glucose by internal standard laser Raman spectra[J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2007, **27**(7): 1344-1346.
吴小琼,郑建珍,刘文涵,等.激光喇曼光谱内标法测定葡萄糖液浓度[J].光谱学与光谱分析,2007,**27**(7):1344-1346.
- [8] LI Zi-da, WANG Gui-wen, QIU Jian, et al. Simultaneous quantitative determination of ethanol and glucose in mixtures using Raman spectroscopy and multivariate analysis [J]. *Journal of Instrumental Analysis*, 2010, **29**(11): 1145-1148.
李自达,孟令晶,刘军贤,等.喇曼光谱同时测定乙醇和葡萄糖的方法研究[J].分析测试学报,2010,**29**(11): 1145-1148.
- [9] SATISH R, ŠTEFAN B, BENJAMIN C, et al. Raman study of mechanically induced oxygenation state transition of red blood cells using optical tweezers[J]. *Biophysical Journal*, 2009, **96**(1): 209-216.
- [10] YAO Hui-lu, TAO Zhan-hua, AI Min, et al. Raman spectroscopic analysis of apoptosis of single human gastric cancer cells[J]. *Vibrational Spectroscopy*, 2009, **50**(2): 169-324.
- [11] OKAGBARE P I, ESMONDE-WHITE F W L, GOLDSTEIN S A, et al. Development of non-invasive Raman spectroscopy for in-vivo evaluation of bone graft osseointegration in a rat model[J]. *Analyst*, 2010, **135**(12): 3142-3146.
- [12] HUANG Zhi-wei, TEH Seng Khoon, ZHENG Wei, et al. Integrated Raman spectroscopy and trimodal wide-field imaging techniques for real-time in vivo tissue Raman measurements at endoscopy[J]. *Optics Letters*, 2009, **34**(6): 758-760.

Semi-quantitative Analysis of Blood Glucose Using Raman Spectroscopy

LIN Man-man^{1,2}, NIU Li-yuan^{1,2}, QIN Zhao-jun^{1,2}, LI Xue^{1,2},

DENG Yang-ge¹, KUANG Zhi-peng³, LIU Jun-xian¹, YAO Hui-lu^{2,1}

(1 College of Physics and Technology, Guangxi Normal University, Guilin, Guangxi 541004, China)

(2 Laboratory of Biophysics, Guangxi Academy of Sciences, Nanning 530003, China)

(3 Guangxi Institute of Cancer Prevention and Control, Nanning 530021, China)

Abstract: The measurement of blood glucose are enzymatic and biochemical methods which are destructive. Raman technique is used to detect blood glucose and a new data analysis method is established to analyse blood glucose concentration, which is a noninvasive and rapid blood glucose tests. Using mice as experimental models, Raman spectra of blood taken from the tails are acquried half an hour after injection of glucose. Raman spectra are collected every 15 minutes and accompanied by blood glucose meter to get the blood glucose value to be reference. $1\ 125\ \text{cm}^{-1}$ is characteristic peak of glucose and glucose in blood is called blood glucose, so $1\ 125\ \text{cm}^{-1}$ is chosen as the peak of blood glucose in the Raman spectra of blood. $1\ 549\ \text{cm}^{-1}$ is characteristic peak of hemoglobin which is stable in the body, so $1\ 549\ \text{cm}^{-1}$ is used to be internal standard to research $1\ 125\ \text{cm}^{-1}$ intensity. The result shows that the change of $1\ 125\ \text{cm}^{-1}/1\ 549\ \text{cm}^{-1}$ may well correspond with changes in blood glucose and they have a good linear relationship. The experiments show that this Raman technique can reflect the changes of blood sugar levels noninvasive.

Key words: Raman spectroscopy; Blood glucose; Noninvasive