

基于光腔衰荡光谱的便携式呼气异戊二烯分析仪性能评估

李青原, 李 静, 魏 鑫, 孙美秀*

中国医学科学院北京协和医学院生物医学工程研究所激光医学实验室, 天津 300192

摘要 呼气异戊二烯是一种内源性代谢产物, 其含量与人体血液中的胆固醇水平存在关联。但人体呼气影响因素众多, 寻找其与胆固醇水平诊断参数的定量相关性, 需要对选取的特定人群进行有效的呼吸气体分析(实时、在线、高灵敏度、高选择性、高精度的大量呼气数据获取)。光腔衰荡光谱(CRDS)是一种具有极高灵敏度、稳定性和选择性的光谱技术。采用目前市场在售的单波长紧凑型半导体紫外激光器, 搭建了一套基于CRDS的呼气异戊二烯分析仪, 该分析仪主要由激光系统、真空腔体、光电探测模块以及数据采集模块构成。线性拟合的结果显示所获得的衰荡信号接近单指数衰减($R^2=0.99839$), 符合朗伯-比尔定律。探究了不同信号平均次数对衰荡信号稳定性的影响, 综合考虑衰荡信号的稳定性和分析仪的响应时间, 采用128次作为实验过程中的信号平均次数。对呼气异戊二烯分析仪的性能进行了测试, 为了表征分析仪的稳定性, 持续测量了分析仪16 min的真空衰荡时间。使用氮气、空气和呼吸样本, 测量了呼气异戊二烯分析仪的重复性和响应速度。为了测试分析仪的线性度, 测量了不同粒子数密度的异戊二烯标准气体(10×10^{-9} , 30×10^{-9} , 50×10^{-9} , 100×10^{-9} , 200×10^{-9})的衰荡时间。最后分析了在224 nm测量异戊二烯存在的光谱干扰问题(NO, N_2O 和丙酮)。实验表明: 分析仪具有高的灵敏度(检测极限为 0.49×10^{-9})、良好的重复性、稳定性(0.48%)、近实时的响应速度(1秒测量一个数据)和良好的线性度($R^2=0.99313$), 将检测极限提高至现有水平的1/1000。研究证明基于CRDS的便携式呼气异戊二烯分析仪可实现对人体呼气异戊二烯的有效分析。

关键词 光谱学; 光腔衰荡光谱; 呼气异戊二烯; 痕量分析

中图分类号: O433 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2021)08-2415-05

引言

作为一种高丰度的内源性碳氢化合物, 异戊二烯(Isoprene, C_5H_8)广泛存在于人体的呼吸气体之中^[1], Jansson和Larsson于1969年报道了人体呼吸气体中异戊二烯的存在^[2], 含量约为 $(50 \sim 200) \times 10^{-9}$ ^[3]。研究表明, 异戊二烯含量与人体血液中的胆固醇水平存在关联^[4], 呼气异戊二烯含量会在不同的临床特定疾病和生理条件下发生变化, 例如年龄、性别、运动和肺癌^[5-6]等因素。迄今为止, 尚不能从个别研究中得出关于呼气异戊二烯水平与人体血液中的胆固醇水平的定量相关性。因此, 开发高灵敏度、高选择性、高精度、可以用于实时、在线呼气异戊二烯分析仪, 可以针对大规模特定人群进行呼气数据采集, 为呼气异戊二烯含量与人体血液中的胆固醇水平的定量相关性提供参考依据。

目前报道测量呼气异戊二烯的研究使用了气体传感器和光腔衰荡光谱(cavity ringdown spectroscopy, CRDS)。如Perez-Guaita等使用中空波导传感器实现了检测极限(limit of detection, LoD)为 106×10^{-9} ^[7]。Song等使用气体传感器测量异戊二烯的LoD为 420×10^{-9} ^[8]。基于紫外区的CRDS, Sahay等^[9]在266 nm处测量了异戊二烯, LoD为 4×10^{-6} 。由于异戊二烯在人体呼吸气体中含量较低, 要想实现高精度的呼气异戊二烯的检测, 至少需要达到 10^{-9} 量级的检测极限, 然而以上研究都没有达到理想的检测极限。

CRDS^[10]以其高灵敏度、高选择性、实时在线分析的特点, 为呼吸气体分析领域的研究提供了一种实现实时在线分析的可行性技术, 符合呼吸气体分析未来发展的需求, 相比于质谱技术, 它具有便携、操作简单的特性, 相比于电化学方法, 它具有高灵敏、高精度的特点, 这些优点使得CRDS十分适合于人体呼吸气体中的异戊二烯的实时在线测量。

收稿日期: 2020-07-20, 修订日期: 2020-11-15

基金项目: 中国医学科学院医学与健康科技创新工程基金项目(2018-I2M-AI-012)资助

作者简介: 李青原, 女, 1996年生, 中国医学科学院北京协和医学院生物医学工程研究所激光医学实验室硕士研究生

e-mail: liqingyuua@163.com *通讯作者 e-mail: meixiu_sun@126.com

本研究采用目前市场在售的单波长紧凑型半导体紫外激光器,选择 224 nm 的紫外激光作为呼气异戊二烯的探测光源,搭建了一套基于 CRDS 的呼气异戊二烯分析仪,测量了分析仪的典型光腔衰荡信号,对分析仪的稳定性、重复性、响应时间和线性响应等性能进行了评估。

1 实验部分

1.1 原理

本节简述 CRDS 的基本原理,使用两个高反镜构成一个高品质因数的光学谐振腔,让一束单纵模激光平行入射并在腔内来回反射,由于腔镜反射率极高,大于 99.9% 的激光都会在谐振腔内往复反射,只有不到 0.1% 的激光可以透射出腔外。根据 Beer-Lambert 定律,从第二个高反镜透射出来的激光强度将按照单指数规律衰减,拟合后可分别得到腔内为真空以及存在待测气体时的衰荡时间常数 τ_0 和 τ , 吸收强度 A 为

$$A = \sigma(\nu)nd = \frac{d}{c} \left(\frac{1}{\tau} - \frac{1}{\tau_0} \right) \quad (1)$$

式(1)中, c 为光速, $\sigma(\nu)$ 为气体样本在波长 ν 处的吸收截面, n 为物质的粒子数密度, d 为腔长。

采用背景扣除法^[11]测量呼气异戊二烯浓度,即在 224 nm 把空气看作人体呼吸的背景,从呼吸样本的吸收强度中扣除背景空气中某些干扰组分的有效吸收,交替测量背景空气和呼吸样本的衰荡时间 τ_{air} 和 τ_{breath} , 得到呼吸样本中异戊二烯的浓度,对式(1)变形后可以得到式(2)

$$n = \frac{1}{c \times \sigma(\nu)} \frac{\tau_{\text{breath}} - \tau_{\text{air}}}{\tau_{\text{air}}} \quad (2)$$

1.2 装置

呼气异戊二烯分析仪包括四个主要组成部分:激光系统、真空腔体、光电探测模块以及数据采集模块(见图 1)。使用 Nd:YAG 激光器(Powerlite DLS 8020, 美国)产生的 355 nm 激光对染料激光器(SpectraPhysics, 美国)进行泵浦,再经过二倍频后产生波长为 224 nm 的激光,脉宽 5~7 ns,单脉冲能量约为 10 μJ ,重复频率为 20 Hz。

真空腔体由长 50 cm 的不锈钢腔体(CRD Optics, 美国)一对,用来固定和调整反射镜准直的反射镜架(CRD Optics, 美国)以及一对高反镜(MLD, $R > 99.8\%$, 曲率半径 = 1 m)组成。不锈钢腔体内表面采用硅烷化惰性处理以避免气体残留带来的影响。镜架和反射镜之间采用 O 形胶圈进行密封和缓冲。衰荡腔上连接三个内径为 0.635 cm 的不锈钢管,分别接入气体样本、真空泵(SCROLLVAC SC5D, 德国)和压力传感器(MKS 870B, 美国)。使用两个三通阀控制气体样本和真空泵的不锈钢管的开关,将两个三通阀的第一个出口堵死,两个三通阀的第二个出口分别接入气体样本和真空泵,最后剩下的第三个出口连接两个不锈钢管。

使用光电倍增管(HAMAMATSU, 日本)采集衰荡信号,选择放大器将光电倍增管输出的高频电流信号转换为电压信号后,通过数字示波器(Tektronix, 美国)将信号数字化后传输至计算机,使用自行开发的集成化软件系统对衰荡信

号进行拟合,并完成数据收集和和处理。

高纯氮气(天津安兴工业气体, >99.999%),异戊二烯标准气体(大连大特气体),丙酮、一氧化氮和一氧化二氮标准气体均为北京氮普北分气体。人体呼出气体来自一名健康受试者。使用容积为 1 000 mL 的特氟龙气体采样袋收集和存储气体样本(北京浩辰天诚环保科技有限公司)。整个实验过程保持常温常压。

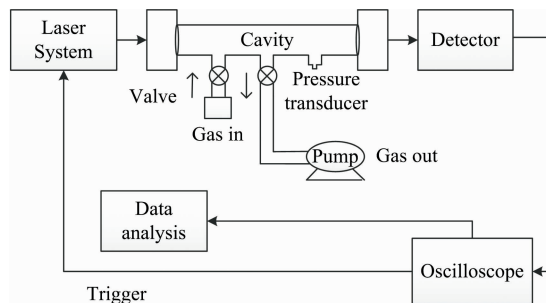


图 1 呼气异戊二烯分析仪示意图

Fig. 1 Schematic of the breath isoprene analyzer

2 结果与讨论

2.1 呼气异戊二烯分析仪的典型衰荡曲线

为了确保腔体内气体吸收遵守朗伯-比尔定律,本节对呼气异戊二烯分析仪的真空下的衰荡信号进行了测量。图 2(a)显示了在真空下记录的典型衰荡信号,呈现指数衰减。对拟合段进行对数运算,将图 2(a)中的 X 轴和 Y 轴之间的关系从指数函数变为线性函数,在图 2(b)中,拟合结果显示良好的线性度,表明该分析仪获得的衰荡信号接近单指数衰减($R^2 = 0.99839$),符合朗伯-比尔定律。

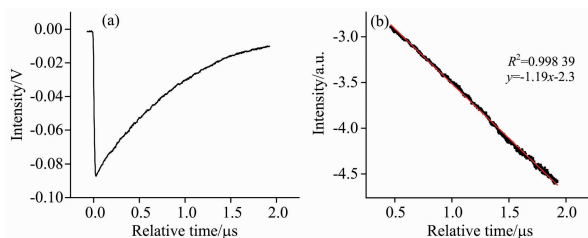


图 2 典型真空衰荡曲线的单指数拟合

(a): 典型真空衰荡曲线;

(b): 对图 2(a)数据的线性拟合

Fig. 2 The fitting of the data of typical ringdown decay waveform under vacuum

(a) The typical ringdown decay waveform under vacuum;

(b) The fitting of the data in Figure 2 (a)

2.2 平均次数对呼气异戊二烯分析仪稳定性的影响

由于光电检测器和示波器的分辨能力有限,在信号采集的过程中会引入电子噪声,实验中通过对信号平均来降低噪声影响,平均后的信号稳定性更好。然而并不是信号平均次数越多越好,随着信号的平均次数增大,增大的数据量会降低传输处理速度,出现延迟反应。

为了找到合适的平均次数,记录了腔体为真空状态时,

衰荡信号在 6 种平均次数下的分析仪稳定性, 分别如图 3 (a—f) 所示, 其中横坐标为数据个数, 纵坐标为衰荡时间。表 1 给出了 6 种平均次数下的衰荡时间均值、标准差和相对标准差, 相对标准差代表了分析仪的稳定性, 定义为一段时间内衰荡时间常数的标准差与均值之比。当信号平均次数为 2 时, 可以看见衰荡时间明显的波动, 稳定性随着平均次数的增大而增大, 当信号平均次数为 128 时, 稳定性已经达到了 0.36%, 当信号平均次数为 512 时, 稳定性最高, 为 0.14%。一般认为, 当衰荡信号的稳定性在 5% 以下, 已经达到一个良好、稳定、可以使用的状态。综合考虑衰荡信号的稳定性和分析仪的响应时间, 采用 128 次作为实验过程中的信号平均次数。

表 1 不同平均次数的衰荡信号稳定性

Table 1 Ringdown signal stability under six average times

Average time	Mean value / μs	Standard deviation / μs	Relative standard deviation/%
2	0.819 52	0.013 6	1.66
16	0.815 94	0.008 01	0.98
64	0.816 87	0.005 55	0.68
128	0.819 00	0.002 95	0.36
256	0.817 39	0.002 25	0.27
512	0.821 97	0.001 16	0.14

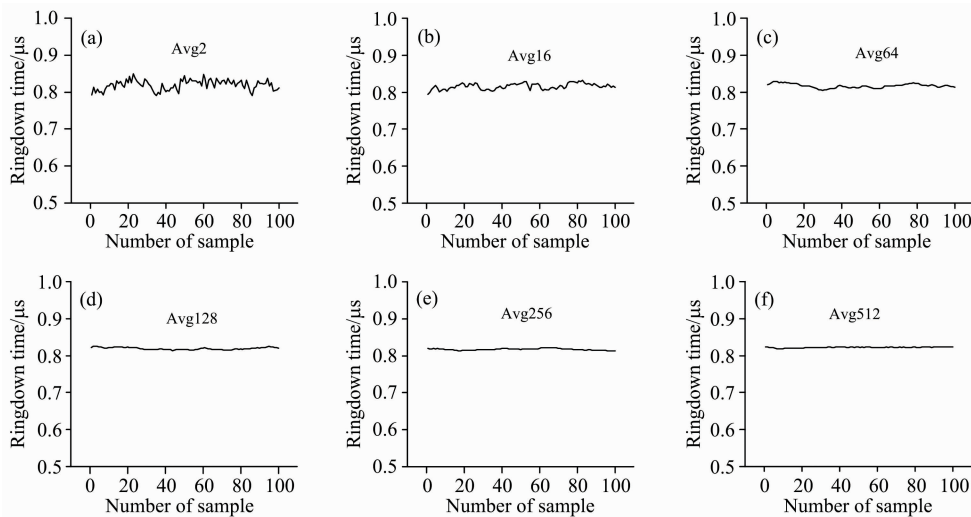


图 3 不同信号平均次数腔衰荡时间稳定性

(a): 平均次数为 2; (b): 平均次数为 16; (c): 平均次数为 64; (d): 平均次数为 128; (e): 平均次数为 256; (f): 平均次数为 512

Fig. 3 Ringdown signal stability under six average times

(a): Average time is 2; (b): Average time is 16; (c): Average time is 64; (d): Average time is 128; (e): Average time is 256; (f): Average time is 512

2.3 稳定性与检测极限

图 4 为持续测量了 16 min 的真空衰荡时间常数, 所得数据的平均值为 0.908 μs , 标准差为 0.004 39 μs , 稳定性为

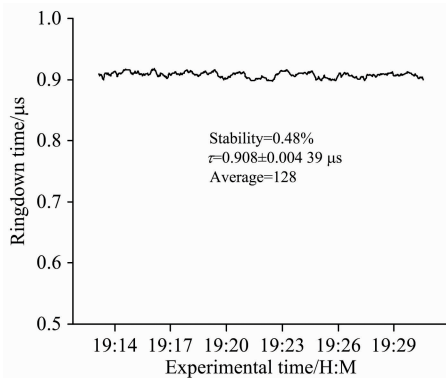


图 4 呼气异戊二烯分析仪稳定性

Fig. 4 Evaluation of the ringdown baseline stability of the breath isoprene analyzer

0.48%。使用 3σ 准则确定分析仪的 LoD 为 0.49×10^{-9} , 提高为以往研究的 1/1 000, 足以满足临床测量需求。此外, 降低对高反镜反射率的要求可以实现大幅减少仪器成本的目标, 在本实验中当高反镜的反射率为 99.5% 时, 仍然可以实现 1.35×10^{-9} 的检测极限。

2.4 重复性和响应速度

测量了呼气异戊二烯分析仪对不同样本(氮气、空气和呼吸样本)的实际响应, 每个样本均测试两次, 由图 5 可见分析仪对于同一种气体的响应始终保持一致, 当腔体再次恢复到真空时, 衰荡时间仍然可以恢复到同一水平。并且在频繁的抽气和进气过程中, 气压的急剧变化并没有影响谐振腔的稳定。另外, 从图 5 中可见, 每次改变气体种类时, 每个单位的上升沿和下降沿很陡, 变化的过程在数秒内达到了稳定, 说明分析仪的响应速度很快。因此, 该分析仪具有良好的重复性、稳定性以及近实时的响应速度(数秒量级)。

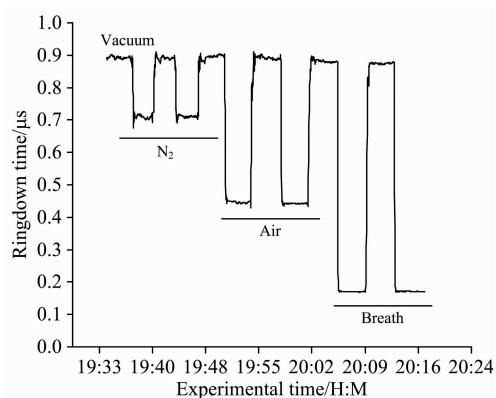


图 5 呼气异戊二烯分析仪的重复性和响应速度

Fig. 5 The breath isoprene analyzer shows good reproducibility and fast response

2.5 线性度

为了测试呼气异戊二烯分析仪的线性度,测量了不同粒子数密度的异戊二烯标准气体的衰荡时间,计算出相应的吸收强度,并记录每点的误差幅度。每个粒子数密度均重复测量 50 次。测量结果如图 6 所示,横轴显示异戊二烯标准气体的粒子数密度介于 $(10 \sim 200) \times 10^{-9}$,纵轴为相应的吸收强度,二者之间的线性相关系数为 0.993 13,图中五个测试点的误差棒的不确定度为 $\pm 2\%$,证明该分析仪对不同粒子数密度的异戊二烯标准气体具有线性响应特性。

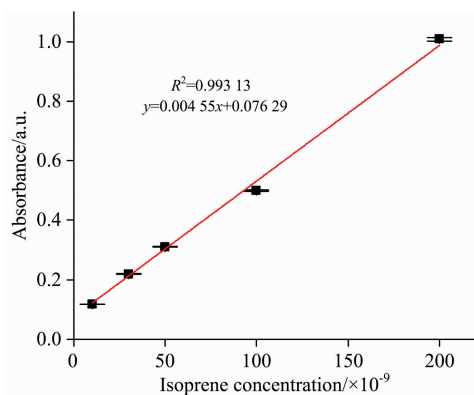


图 6 呼气异戊二烯分析仪对不同粒子数密度的异戊二烯标准气体的线性响应

Fig. 6 Linear response to various standard isoprene concentrations measured by the breath isoprene analyzer

2.6 不同气体分子在 224 nm 的吸收情况

为了进一步验证可能存在的对异戊二烯测量的光谱干扰问题,实验中测量了以下几种腔体状态在 224 nm 下的吸收情况:当腔体为真空时,以及当腔内分别充入 N_2 、 1×10^{-6}

NO 、 $20 \times 10^{-9} N_2O$ 、 3×10^{-6} 丙酮、背景空气、 50×10^{-9} 异戊二烯、一位健康受试者的呼吸气体至一个大气压,其中使用的 NO 、 N_2O 和丙酮标准气体的浓度代表了这三种气体在人体呼出气体中的含量。如图 7 所示,当腔内为真空时,吸收强度近乎为零($0.002 29 \times 10^{-3}$)。当 N_2 充入腔内,吸收强度为 $0.308 18 \times 10^{-3}$,由于 N_2 在此处并无吸收,此时吸收强度是由于瑞利散射导致的,如果气体分子没有吸收,那么它们在同一波长处的散射损耗是相同的,因此将腔内充满 N_2 至一个大气压的吸收强度($0.308 18 \times 10^{-3}$)作为基线吸收强度。将 $1 \times 10^{-6} NO$ 、 $20 \times 10^{-9} N_2O$ 和 3×10^{-6} 丙酮充入腔体后,吸收强度分别为 0.313×10^{-3} , 0.437×10^{-3} 和 0.316×10^{-3} ,与基线吸收强度相比, NO 、 N_2O 和丙酮在 224 nm 没有明显的吸收,微弱的吸收可以忽略不计,因此,可以认为在 224 nm 的吸收主要是由于异戊二烯导致的。充入背景空气的吸收强度(2.105×10^{-3})小于 50×10^{-9} 异戊二烯的吸收强度(5.34×10^{-3}),说明异戊二烯在此处具有很强的吸收。充入一个大气压的呼吸气体造成的吸收最强,为 10.16。以上分析证实了使用背景扣除法,该分析仪能够在 224 nm 测定实际人呼出气体中的痕量异戊二烯。

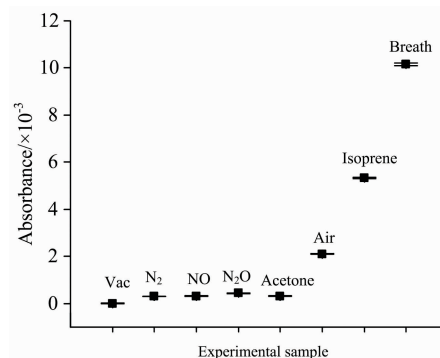


图 7 吸收强度对比

Fig. 7 Comparison of absorbance

3 结论

基于目前市场在售的单波长紧凑型半导体紫外激光器,搭建了一套基于 CRDS 的呼气异戊二烯分析仪,该分析仪主要由激光系统、真空腔体、光电探测模块以及数据采集模块构成。该呼气异戊二烯分析仪具有高的灵敏度、重复性、稳定性、近实时的响应速度和良好的线性度($R^2 = 0.993 13$)。同时分析了在 224 nm 测量异戊二烯存在的光谱干扰问题(NO 、 N_2O 和丙酮)。研究表明基于 CRDS 的便携式呼气异戊二烯分析仪可实现对人体呼气异戊二烯的有效分析,适合于开展大规模的人体呼气实验,为呼气异戊二烯含量与人体血液中的胆固醇水平的定量相关性提供参考依据。

References

- [1] Phillips M, Herrera J, Krishnan S, et al. Journal of Chromatography B, 1999, 729(1-2): 75.
- [2] Jansson B O, Larsson B T. The Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 1969, 74(6): 961.
- [3] Arendack B. Journal of Breath Research, 2008, 2(3): 037007.

- [4] Karl T, Prazeller P, Mayr D, et al. *Journal of Applied Physiology*, 2001, 91(2): 762.
- [5] Kinoyama M, Nitta H, Watanabe A, et al. *Journal of Health Science*, 2008, 54(4): 471.
- [6] Ligor M, Ligor T, Bajtarevic A, et al. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 2009, 47(5): 550.
- [7] Perez-Guaita D, Kokoric V, Wilk A, et al. *Journal of Breath Research*, 2014, 8(2): 026003.
- [8] Song H, Liu J, Lu H, et al. *Nanotechnology*, 2020, 31(16): 165503.
- [9] Sahay P, Scherrer S T, Wang C. *Sensors*, 2013, 13(7): 8170.
- [10] SONG Shao-man, YAN Chang-xiang(宋绍漫, 颜昌翔). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 2020, 40(7): 2023.
- [11] Sun M X, Jiang C Y, Gong Z Y, et al. *Review of Scientific Instruments*, 2015, 86(9): 095003.

Performance Evaluation of a Portable Breath Isoprene Analyzer Based on Cavity Ringdown Spectroscopy

LI Qing-yuan, LI Jing, WEI Xin, SUN Mei-xiu*

Laser Medicine Laboratory, Institute of Biomedical Engineering, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Tianjin 300192, China

Abstract Breath isoprene is an endogenous metabolite whose concentration is related to human blood cholesterol level. However, numerous factors are influencing human breath. It is necessary to conduct effective breath analysis in selected specific populations (access large breath data with real-time, online, high sensitivity, high selectivity, and high accuracy). Cavity ringdown spectroscopy (CRDS) is a highly sensitive, highly stable, and highly selective spectral technique. In this paper, a breath isoprene analyzer based on CRDS was constructed considering the single-wavelength integrated semiconductor UV laser currently on the market. The breath isoprene analyzer mainly comprised of laser source, vacuum cavity, photodetector, and data acquisition. The fitting result showed good linearity indicating that the ringdown signal obtained by this analyzer was close to the single exponential decay ($R^2=0.99839$), and obeyed Lambert-Beer's law. Effects of different average times on ringdown signal stability were evaluated. Considering the stability of the ringdown signal and the response time of the analyzer comprehensively, 128 times was used as the average time during the experiment. Subsequently, the performance of the breath isoprene analyzer was investigated. Ringdown times of 16 min under vacuum were measured continuously. The repeatability and response of the breath isoprene analyzer were examined. We measured the ringdown times of standard isoprene gas with different density of particle (10×10^{-9} , 30×10^{-9} , 50×10^{-9} , 100×10^{-9} , 200×10^{-9}) to calculate the linearity of the analyzer. At last, the spectral interference (NO, N₂O and acetone) at 224 nm was discussed. The experiment shows that: the ringdown breath analyzer has high sensitivity (limit of detection is 0.49×10^{-9}), good repeatability, stability (0.48%), near real-time response (1 datum per second) and good linearity ($R^2=0.99313$). The improved LoD in this paper is about 1/1 000 of the current LoD. The portable breath isoprene analyzer based on CRDS could realize the effective analysis of isoprene in actual human breath.

Keywords Spectroscopy; Cavity ringdown spectroscopy; Breath isoprene; Trace analysis

(Received Jul. 20, 2020; accepted Nov. 15, 2020)

* Corresponding author