

DOI: 10.3969/j.issn.1007-5461.2023.03.003

THz-ATR 技术检测生物医学样品的研究进展

王海青^{1,2}, 施卫^{1*}

(1 西安理工大学理学院, 陕西省超快光电技术与太赫兹科学重点实验室, 陕西 西安 710048;
2 宝鸡文理学院物理与光电技术学院, 宝鸡市微纳光电子与太赫兹技术重点实验室, 陕西 宝鸡 721016)

摘要: 太赫兹衰减全内反射 (THz-ATR) 光谱法含水样品检测技术具有无标记、无电离以及检测灵敏度高等优点, 在疾病标志物的定性识别和定量检测方面具有很大的应用潜力, 尤其对重大疾病的早期诊断和分阶段诊疗具有非常重要的现实意义。在简要介绍 THz-ATR 技术检测含水样品基本原理的基础上, 通过分析对比, 详细探讨了不同辐射源的 THz-ATR 光谱检测技术在生物医学检测方面的应用, 最后简要归纳了 THz-ATR 光谱检测技术的研究现状及未来发展趋势。

关键词: 光谱学; THz-ATR 光谱检测; 含水样品; 定性识别; 定量检测

中图分类号: O433 文献标识码: A 文章编号: 1007-5461(2023)03-00319-14

Research progress of THz-ATR technology for detecting biomedical samples

WANG Haiqing^{1,2}, SHI Wei^{1*}

(1 Key Laboratory of Ultrafast Photoelectric Technology and Terahertz Science in Shaanxi, Xi'an University of Technology, Xi'an 710048, China;
2 Baoji Key Laboratory of Micro-Nano Optoelectronics and Terahertz Technology, School of Physics and Opto-Electronic Technology, Baoji University of Arts and Sciences, Baoji 721016, China)

Abstract: THz-attenuated total reflection (THz-ATR) spectral detection technology for water-containing samples has the advantages of no labeling, no ionization and high detection sensitivity. It has great application potential in the qualitative and quantitative detection of disease markers, so it is of great practical significance for the early diagnosis and staged diagnosis and treatment of major diseases. On the basis of a brief introduction to the basic principles of THz-ATR technology for the detection of aqueous samples, the application of THz-ATR spectroscopy detection technology with different radiation sources in biomedical detection is analyzed and compared in detail. Finally, the research status and future development trend of THz-ATR spectral detection technology are briefly summarized.

Key words: spectroscopy; THz-ATR spectral detection; aqueous samples; qualitative identification; quantitative detection

基金项目: 科技部重点研发计划 (2017YFA0701005), 国家自然科学基金面上项目 (51807161, 62075179)

作者简介: 王海青 (1987 -), 女, 陕西凤翔人, 博士生, 讲师, 主要从事 THz 生物样品检测方面的研究。E-mail: wwanghaiqing@163.com

导师简介: 施卫 (1957 -), 浙江金华人, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事超快光电技术、THz 科学与技术等方面的研究。

E-mail: swshi@mail.xaut.edu.cn

收稿日期: 2023-03-01; 修改日期: 2023-03-29

*通信作者。

0 引言

THz 光谱在生物医学领域中关键物质的定性和定量鉴别方面有很大潜力,如癌症的早期诊断、血液指标检测等^[1-5]。然而,通常因目标物质特征谱检测受限于光谱系统信噪比不足,导致无法精确识别目标物质。影响生物医学样品检测信噪比的因素有:1) THz 光谱检测系统信噪比低;2) 样品中水对 THz 波的强吸收导致 THz 传输过程中的高损耗引起的样品信号信噪比不足;3) 非目标物质对样品信号的干扰导致目标样品信噪比不足而无法分辨^[6-8]。因此,有效提高含水样品检测信噪比才是实现生物医学样品定性定量检测的关键和根本问题所在。

目前,提高含水样品检测信噪比的主要技术手段有三方面:一是系统优化。传统的高压汞灯和 GaAs 光电导天线 (PCA) 频谱宽、稳定性好,但因其辐射功率低,THz 光谱对含水样品的检测信噪比仍不能满足生物医学样品定性识别、定量检测的需求^[9-12]。开发辐射功率高且稳定性好的 THz 辐射源是从源头上提高含水样品检测信噪比的手段,目前强场 THz 辐射技术主要是利用飞秒激光和非线性晶体的相互作用,通过波前倾斜的方法获得高强度的 THz 脉冲,辐射 THz 能量也可以达到百微焦的级别。以 LiNbO₃ 晶体为代表的比较成熟的高功率 THz 光谱系统已经在实验室得到应用^[13,14]。二是利用 THz 检测器件增强生物 THz 信号的传输。现有工作从原理上主要集中在利用倏逝波或增强局部 THz 场强的方法上,需要将自由空间中的 THz 波耦合成为倏逝波等形式,利用其倏逝场或局域场增强效应实现对微量的细胞或生物大分子的探测^[15-17]。衰减全内反射检测具有两方面的优势:① 可以检测对 THz 波吸收较强的物质。THz 波在 ATR 与样本界面处发生全内反射,产生倏逝波,倏逝波反射进入样品,光强损失小,因此可用于含水样品的 THz 高灵敏度检测。② 无需对样品进行预处理,不用严格控制检测样品的厚度,ATR 模式只需将样品与 ATR 棱镜表面贴合即可进行测量;另外,ATR 可对少量样品进行高灵敏度检测。三是利用算法去噪重建数据^[18,19]。对于一个含有噪声的信号,最简单的方式是采用多次求和取平均进行去噪,但这种方式的去噪效果非常有限;另一种是数据平滑方法,包括采用 N 点平均法为代表的常规方法和小波变换除噪法为代表的特殊方法,这种数据平滑方法可能牺牲部分信号信息。

本文基于辐射源的发展综述了太赫兹衰减全反射 (THz-ATR) 技术的发展,THz-ATR 检测技术可以显著地提高含水样品的检测信噪比及灵敏度,已经逐渐应用到生物分子、微生物以及细胞和组织的检测中。目前的含水样品检测基本都是利用水的敏感性定量检测,很难实现定性识别、定量检测的生物医学样品检测需求。通过采用高功率 LiNbO₃ 辐射源,极大地提高了 THz-ATR 系统的信噪比,实现了对低浓度乳糖水溶液的定性鉴别和定量检测,这种高功率、高灵敏度的 THz-ATR 光谱检测提供了快速、准确、低成本的含水生物样品检测方法。

1 THz-ATR 检测技术的原理和表征

1.1 THz-ATR 检测含水样品的原理

衰减全反射 (ATR) 是 20 世纪在红外光谱研究中广泛使用的一种技术,用于克服透射测量中难以进行检测的问题。21 世纪初随着 THz-TDS 的发展,自 2004 年日本京都大学的 Hirori 等^[20]首次提出基于全内反射棱镜结构的 THz-TDS 检测技术以来,科研人员综合 THz 光谱与 ATR 检测技术的优势进行了一系列研究。该设

计基于光的全反射原理,当光波从折射率较大的介质(棱镜材料)入射到折射率较小的介质(空气或者含水生物样品)时,若持续增大入射角使其满足 $\sin \theta_{in} > n_2/n_1$, 两介质分界面上所有的光均被反射回到原光密介质棱镜材料中,这种情况被称为全反射现象。在光疏介质和光密介质的分界面处有倏逝波产生^[21-23],如图 1 所示。倏逝波幅值在分界面垂直方向上呈指数形式衰减,其穿透深度可表示为

$$d_p = \frac{\lambda}{2\pi \sqrt{n_1^2 \sin^2 \theta - n_2^2}}, \quad (1)$$

式中: λ 表示入射光波的波长; n_1 、 n_2 分别表示两种介质的折射率,且满足 $n_1 > n_2$; θ 为入射角。从 (1) 式可以看出,倏逝波入射到样品中的穿透深度与 n_1 、 n_2 以及 θ 相关,一般与 λ 同数量级,表明 ATR 光谱可以提供距离界面微米级或者更薄层的光谱信息,即可用于微量生物样品检测。ATR 光谱与其他光谱相相对待测样品的要求较低,制样简单;测量区域小,可以实现实时检测;同时有着容易操作、无破坏性和测量结果准确等优点。

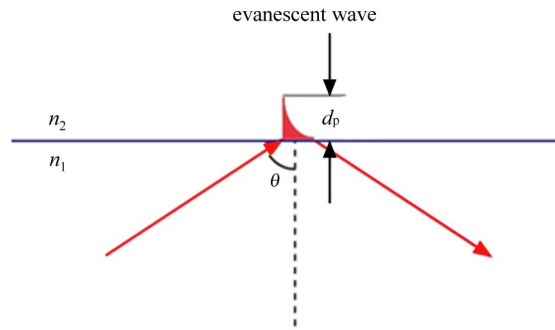


图 1 ATR 产生倏逝波的原理图

Fig. 1 Schematic diagram of evanescent wave generated by ATR prism

1.2 THz-ATR 光谱技术关键参数的提取

折射率和吸收系数都是表征含水样品比较常用的物理参数。为了评估含水生物样品对 THz 波的响应,通过快速傅里叶变换将测量的 THz 时域光谱转换为频域光谱,并根据频域 THz 光谱逐步计算样品的复折射率 ϵ 和吸收系数 $\alpha(\omega)$, 都是 THz 频率 ω 的函数。计算折射率 $\alpha(\omega)$ 的过程如下:

首先,计算样品和参考频域光谱电场幅值(分别为 E_{sam} 、 E_{ref}) 的比值,该比值等于样品和参考的菲涅耳反射系数(分别为 r_{sam} 、 r_{ref}) 之比,即

$$\frac{E_{sam}}{E_{ref}} = \frac{r_{sam}}{r_{ref}}. \quad (2)$$

然后, r_{sam} 、 r_{ref} 分别可以通过方程

$$r_i = \frac{\sqrt{\epsilon_{Si}} \sqrt{1 - (\epsilon_{Si}/\epsilon) \sin^2 \theta} - \sqrt{\epsilon} \cos \theta}{\sqrt{\epsilon_{Si}} \sqrt{1 - (\epsilon_{Si}/\epsilon) \sin^2 \theta} + \sqrt{\epsilon} \cos \theta} \quad (3)$$

来计算,下标 $i = sam, ref$ 。式中: ϵ_{Si} 是硅棱镜的介电常数,近似为 3.42; ϵ 是棱镜上表面检测物质的复介电常数; θ 为硅棱镜的上表面入射角,也就是全内反射角。对于测量的参考(充满氮气的空载 ATR 样品池), (3) 式中的 r_i 代表 r_{ref} , ϵ 近似为 1, 因此, r_{ref} 的值可通过等式直接计算; 对于空载 ATR 样品池测量, (3) 式中的 r_i 代表 r_{sam} , ϵ 是棱镜上表面的含水样品的复介电常数。由于 E_{sam} 和 E_{ref} 的比值和 r_{ref} 的值已知, 因此 r_{sam} 的值可通过

(2) 式直接计算。

最后, 将 r_{sam} 代入(3) 式获得样品的复介电常数 ε , 介电常数的实部 ε' 和虚部 ε'' 可分别表示为

$$\varepsilon'(\omega) = n^2(\omega) - k^2(\omega), \quad (4)$$

$$\varepsilon''(\omega) = 2n(\omega)k(\omega), \quad (5)$$

通过 (4)、(5) 式计算折射率 $n(\omega)$ 和消光系数 $k(\omega)$ 。最后, 通过将真空中的光速 c 代入等式来计算细胞样品的吸收系数

$$\alpha(\omega) = \frac{4\pi\omega k(\omega)}{c}. \quad (6)$$

2 THz-ATR 光谱的生物医学检测技术

目前的 THz 技术并不能满足人类日益丰富的生产与生活需求, 尤其在生物医学诊疗方面, THz 的应用由于水的强吸收而极为受限。大多数生物分子只能在液体环境中保持生物活性^[24-26], 因此检测含水生物分子具有至关重要的现实意义。目前的技术壁垒主要集中在以下三个方面: 1) 高效率、高稳定以及高光束质量的 THz 辐射源的匮乏; 2) 低损耗的 THz 波传导; 3) 核心器件和系统技术的匮乏。THz-ATR 技术应用在生物医学检测领域具有快捷、无损伤、检测灵敏度高等特点, 为了深入研究 THz-ATR 技术在生物分子、细胞和体液等不同层次的生物样品检测方面的应用, 进一步解决 THz-ATR 技术应用的关键问题, 国内外众多课题组开展了许多卓有成效的工作, 推动了 ATR 器件工艺、系统优化以及数据提取等方面的发展。下文以 THz-ATR 检测技术三种不同的 THz 辐射源为分类依据, 对 THz-ATR 应用于生物医学光谱检测技术的研究进展进行介绍。

2.1 基于高压汞灯辐射源的 THz-ATR 光谱对含水样品的检测

2004 年日本京都大学的 HiRoRi 等^[20]首次提出基于 ATR 棱镜结构的 THz 光谱检测技术。此后, 很多课题组竞相利用 THz-ATR 光谱对含水生物样品的检测进行了更为深入的研究。高压汞灯在 0.1~4 THz 的光谱范围内产生宽带连续太赫兹辐射, 辐射功率一般在 pW 量级^[27,28]。2011 年, 日本京都大学 Naito 等^[29]使用汞弧灯产生 THz 光源, 结合 ATR 的方法研究了原乳液在 THz 区域的吸收光谱与测量乳含量之间的相关性。用偏最小二乘法回归分析牛奶含量并预测乳脂肪、总固体、乳糖、乳蛋白、酪蛋白和体细胞, 结果证明 THz 光谱适用于预测乳脂肪、总固体和体细胞的含量, 如图 2(a) 所示。2012 年, 日本京都大学 Suhandy 等^[30]使用高压汞灯 THz 源, 结合 ATR 光谱进行了葡萄糖浓度测定的定量研究, 基于 THz 的傅立叶变换光谱仪获得不同浓度的葡萄糖溶液在波数 19.285~451.261 cm^{-1} 之间的吸收光谱, 使用原始和预处理光谱的偏最小二乘 (PLS) 回归, 开发了葡萄糖测定的校准模型。使用 Savitzky-Golay 二阶导数光谱的校正模型得到了比较满意的吸光度结果, 结果表明增加葡萄糖浓度导致吸光度下降, 如图 2(b) 所示。因此, ATR-THz 光谱结合有效的光谱校正方法可以实现快速测定水溶液中葡萄糖的浓度。

高压汞灯辐射源结合 ATR 光谱检测系统的特点是设备结构简单、便携、成本低, 其产生的光谱频谱宽, 但由于其光源的发散性、多色性以及能量散失性等缺点, 高压汞灯辐射 THz 的输出功率比较低, 得到 THz-ATR 的信号必须要经过复杂的校准处理。

2.2 基于 GaAs PCA 辐射源的 THz-ATR 光谱对含水样品的检测

随着超快激光技术及半导体技术的发展, THz 辐射源和探测技术蓬勃发展。GaAs PCA 辐射源具有稳定

高效的 THz 辐射性能、0.1~4 THz 的宽频辐射范围、较高的辐射功率 (可达几到几十 mW, 是汞灯的 1000 倍) 等优点, 已成为目前应用比较广泛的 THz 辐射源, 如商用的太赫兹时域光谱系统 Tera K15 (Menlo Systems GmbH, Munich, Germany)、T-RayTM 4000 (Picometrix, Michigan, USA)、TAS 7500SP (Advantest Co., Tokyo, Japan) 以及 Mini-z (Zomega Terahertz Corporation, Troy, USA) 中都采用 GaAs PCA 作为太赫兹源。GaAs PCA 辐射源结合 ATR 检测生物医学样品受到众多科研工作者的青睐。THz-ATR 技术可以极大地提高含水样品的检测信噪比及灵敏度, 已经逐渐应用到生物分子、微生物以及细胞和组织的检测中。

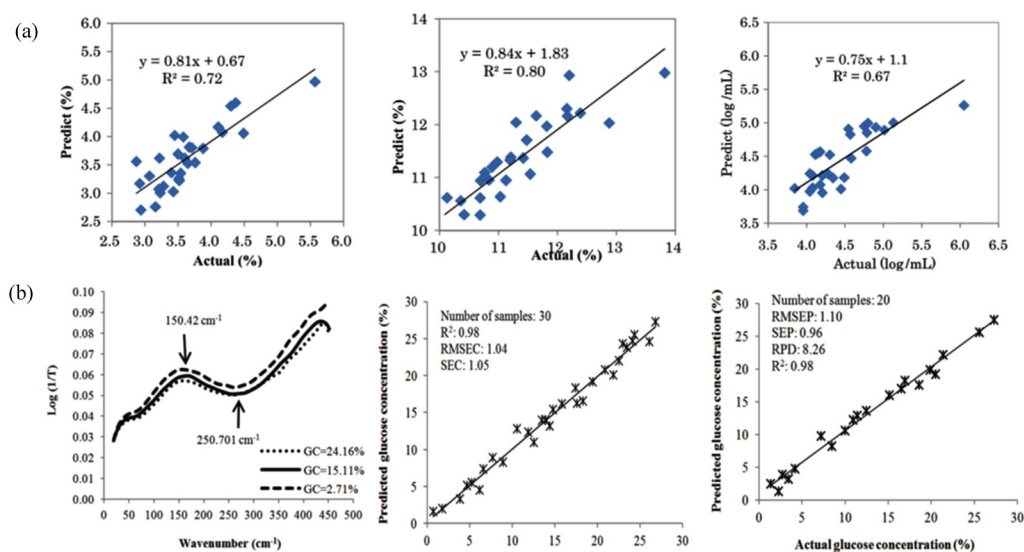


图2 (a) 乳脂肪、总固体和体细胞的验证模型^[29]; (b) 不同浓度葡萄糖溶液的 THz 光谱以及实际和预测葡萄糖浓度之间的散点图^[30]

Fig. 2 (a) Verification model of milk fat, total solid and somatic cells^[29]; (b) THz spectra of glucose solutions with different concentrations and scatter plot between actual and predicted glucose concentrations^[30]

2008年, Arikawa等^[31]提出了一种新的方法来表征蔗糖和海藻糖水溶液的水合状态的 THz 介电响应。如图 3(a) 所示, 水合状态可以从复杂的介电函数定量评估, 该介电函数由具有局部场校正的理论导出。如图 3(b) 所示, 使用 THz-ATR 光谱在二糖 (蔗糖和海藻糖) 水溶液中成功地评估了水合状态及其浓度依赖性, 为直接研究水合的皮秒动力学提供了新的工具。2013年, Takebe等^[32]使用 ATR 技术直接测量悬浮液中的硝苯地平颗粒, 如图 3(c) 所示, 硝苯地平晶体的吸收峰在光谱中相同的频率出现, 并且峰和基线值与硝苯地平晶体的含量成比例地偏移。此外, PLS 回归分析表明 ATR-THz 光谱可用于定量评价悬浮液中的硝苯地平晶体, 如图 3(d) 所示。然而, 在硝苯地平悬浮液中, 水分子强烈影响药物结晶度, 因此分析药物周围水的影响很重要。通过 THz-ATR 光谱能够直接评估悬浮液中的结晶度, 还可以观察硝苯地平悬浮液的 PH 和温度变化对药物的结晶态的影响。用于悬浮液分析的 THz-ATR 光谱的进一步研究将阐明液态水对药物结晶度影响的细节。

2014年, Shiraga等^[33]利用 THz-ATR 技术结合双界面模型用于确定培养的人类癌细胞 (DLD-1、HEK293 和 HeLa) 的复介电常数, 结果如图 4(a) 所示。皮秒和亚皮秒水动力学在测量细胞的复介电常数中占主导地位。与细胞外水相比, 低于 1.0 THz 的介电响应表征了癌细胞的特定水动力学。糖蛋白通常被认为是肿瘤标志物, 因为癌细胞比正常细胞消耗更多的糖蛋白。2019年, Huang等^[34]采用 THz-ATR 技术对浓度梯度从 0.2 mg/mL 到 50 mg/mL 的糖蛋白溶液进行检测, 发现吸收系数和浓度之间存在显著的非线性关系, 结果如图 4

(b) 所示。而且糖蛋白分子周围的动态水化壳层对吸收系数有影响,为了识别糖蛋白,通过复合多尺度熵 (CMSE) 方法获得特征,并通过 K-means 算法进行聚类。研究表明,CMSE 方法对分析糖蛋白 THz 光谱具有重要的指导意义,也为糖蛋白相关的肿瘤 THz 技术提供了更加可靠的算法。

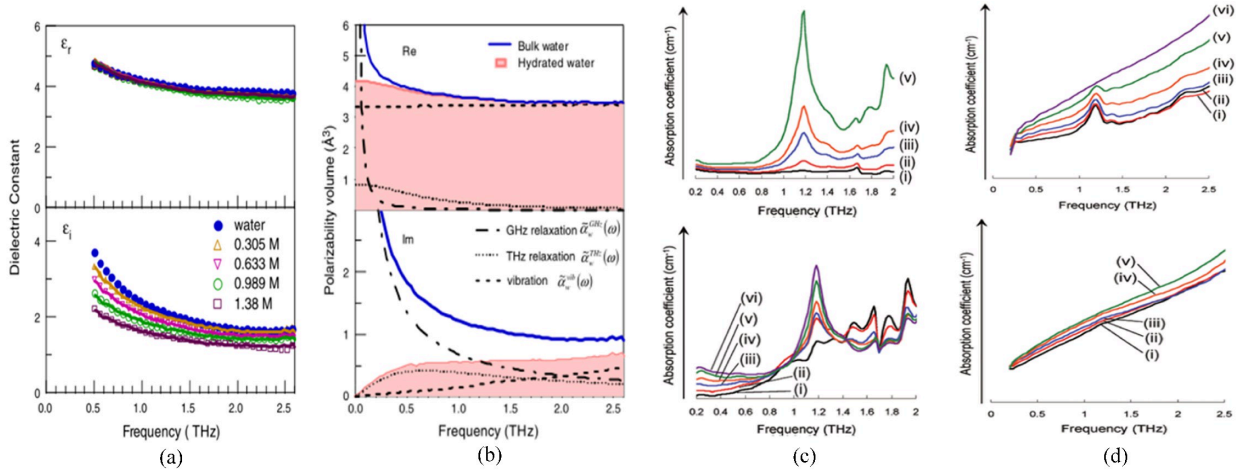


图3 (a) 不同浓度蔗糖水溶液的复介电常数^[31]; (b) 散水水分子和水合水分子的极化率^[31]; (c) 不同浓度下硝苯地平晶形和混合物的THz光谱^[32]; (d) 不同浓度的硝苯地平晶体和硝苯地平悬浮液的THz-ATR光谱^[32]

Fig. 3 (a) Complex dielectric constant of sucrose aqueous solutions with different concentrations^[31]; (b) Polarizability of bulk water and hydrated water^[31]; (c) THz spectra of nifedipine crystals and mixtures at different concentrations^[32]; (d) THz-ATR spectra of nifedipine crystals and nifedipine suspensions with different concentrations^[32]

2016年, Cherkasova等^[35]基于传统PCA辐射源的THz-ATR光谱,连续测量饮用葡萄糖后0~90 min的手掌皮肤的THz光谱,检测结果证明人体皮肤THz-ATR光谱的变化与血糖水平的变化相关。当血液中的葡萄糖浓度高于正常水平时,人手掌皮肤ATR信号的振幅增大、相位减小,如图5(a)所示。因此,使用THz-ATR光谱结果证明了体外无创实时测量血糖浓度的可能性。2016年, Takeya等^[36]为了评估THz光谱技术用于测定血液中药物浓度的可能性,基于传统GaAs PCA辐射源的THz-ATR光谱测量生理盐水中茶碱的水平,观察到反射THz波振幅随着茶碱浓度变化而变化,测量结果如图5(b)所示。这一结果是通过比较反射波振幅的简单测量获得的,表明使用THz-ATR测量来监测液体材料中药物的浓度变化是可能的。2017年, Zou等^[37]证明了THz-ATR时域光谱能够监测活的人类细胞的氧化应激反应,这是一种有效的非侵入性、无标记、实时和原位监测细胞死亡的方法。此外,定量测定了培养的活的人乳腺上皮细胞的介电常数和介电损耗 [检测结果见图5(c)],以及它们在高浓度 H_2O_2 诱导的氧化应激反应下的演变 [介电常数和介电损耗的检测结果见图5(d)]。检测结果最终通过荧光标记流式细胞仪测量并通过可见荧光成像得到了证实。

2019年, Zhang等^[38]基于THz-ATR技术通过不同成纤维细胞和转移性黑色素瘤细胞密度来表征人工正常皮肤和黑色素瘤细胞。结果表明,在0.4~1.6 THz的频率范围内,黑色素瘤样品比有相同成纤维细胞密度的人造正常皮肤具有更高的折射率和吸收系数,并且这种对比度随着频率的增加而增加,具体检测结果见图6(a)。这主要是因为黑素瘤样品比人造正常皮肤具有更高的水含量,而黑素瘤含有更多水的主要原因是肿瘤细胞降低了胶原晶格的收缩。此外,与正常皮肤样品相比,黑素瘤样品的复折射率和介电常数有更大的变化。例如,当细胞密度从0.1 mol/mL升至1 mol/mL时,人造正常皮肤在0.5 THz下的折射率增加4.3%,而黑色素瘤样品的折射率增加8.7%。这表明成纤维细胞和黑色素瘤细胞对THz辐射的细胞反应显著不同。2020

年, Tang 等^[39]基于自制的 ATR 微流控池并结合 GaAs PCA 辐射的 THz-TDS 系统, 检测了单碱基突变的 DNA 分子。检测的目标 DNA 分子分别是正常血红蛋白基因、镰状细胞性贫血基因 (15 nt)、JAK2 基因野生型和来自镰状细胞性贫血和血小板减少症的 JAK2 V617F 基因突变 (39 nt)。结果表明, THz 光谱结合 ATR 微流控池可以识别单碱基突变的寡核苷酸片段, 并且单碱基突变的短寡核苷酸片段的识别效果优于长寡核苷酸片段, 检测结果如图 6(b) 所示。

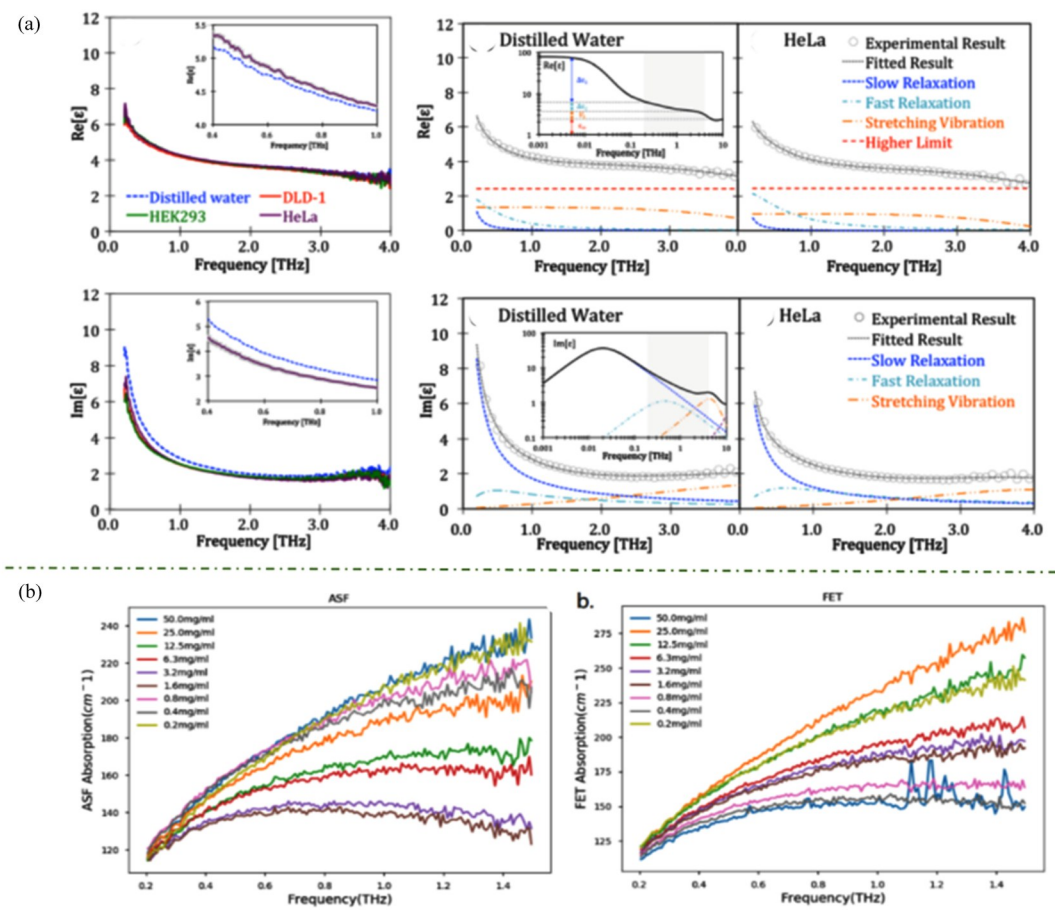


图 4 (a) 蒸馏水与 HeLa、DLD-1 和 HEK293 的复介电常数^[33]; (b) ASF 和 FET 的平均吸收光谱^[34]
 Fig. 4 (a) Real and imaginary parts of dielectric coefficients of distilled water, HeLa, DLD-1 and HEK293^[33];
 (b) Average absorption spectra of ASF and FET^[34]

2019 年, Akiyama 等^[40]使用 THz - ATR 光谱监控酸奶生产中的乳酸发酵。酸奶生产是在 ATR 棱镜上进行的, 在 1000 min 的发酵过程中测量 THz 吸收系数和 pH 值。如图 7(a) 所示, 在发酵过程中, 0.4、1.0、1.6 THz 的吸收系数随着时间增加都开始降低, 有两个拐点, 高频时时间吸收变化的绝对值比低频时大。然而, 归一化吸收系数在 0.4 THz 处较大。因为吸收系数随时间的变化与 pH 的时间变化相对应, 吸收的变化似乎是由乳酸发酵过程中乳成分的分解引起的。因此, THz 测量可以应用于酸奶生产中乳酸发酵的无损监测。2019 年, Wang 等^[41]提出了一种在没有细胞厚度的情况下, 结合单界面和双界面 ATR 模型来确定活细胞介电响应的方法。对活的胶质样细胞 (PC12、SVG P12 和 HMO6) 的实验结果表明, THz 区域中的介电响应与细胞数量、细胞内液体和细胞结构显著相关, 具体结果见图 7(b)。此外, 胶质瘤细胞 (C6 和 U87) 与胶质样细胞相比表现出不同的介电特性, 这可能是使用 THz 波诊断胶质瘤组织的一个原因。

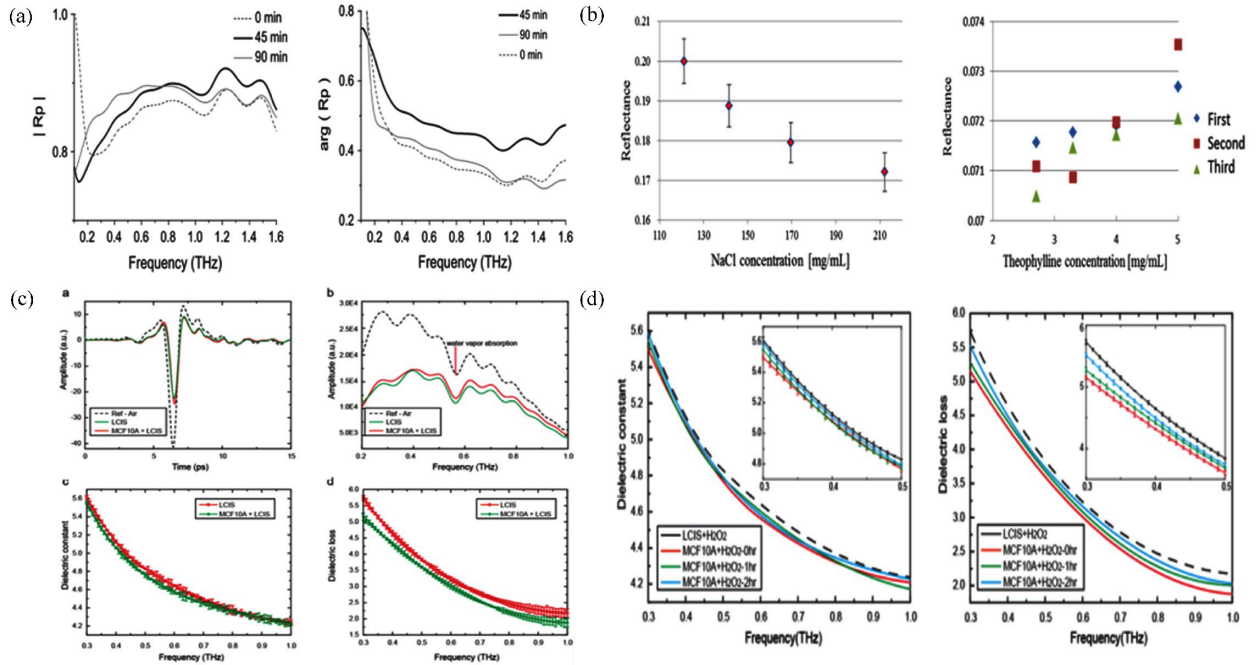


图5 (a) 摄入葡萄糖溶液后,不同时间(0、45、90 min)人体皮肤ATR光谱的振幅 $|Rp|$ 以及相位 $arg(Rp)$ 的变化^[35];
 (b) 0.164 THz处THz ATR光谱反射率与茶碱浓度的关系^[36];
 (c) LCIS培养溶液、MCF10A细胞(红色)和没有样品的参考ATR棱镜的THz时域波形、频谱、介电常数和介电损耗^[37];
 (d) 将MCF10A活细胞暴露和未暴露于10 mmol/L H_2O_2 在0、1、2 h后的介电常数和介电损耗的变化对比^[37]

Fig. 5 (a) The ATR amplitude $|Rp|$ and phase $arg(Rp)$ of human skin at different times (0, 45, 90 min) after ingesting the glucose solution ^[35]; (b) Relationship between THz- ATR spectral reflectance and theophylline concentration at 0.164 THz^[36]; (c) THz time-domain waveform, frequency spectra, dielectric constant and dielectric loss of LCIS culture solution, MCF10A cells and reference ATR prism without samples ^[37]; (d) The dielectric constant and dielectric loss of MCF10A living cells exposed and unexposed to 10 mmol/L H_2O_2 after 0, 1, 2 h were compared ^[37]

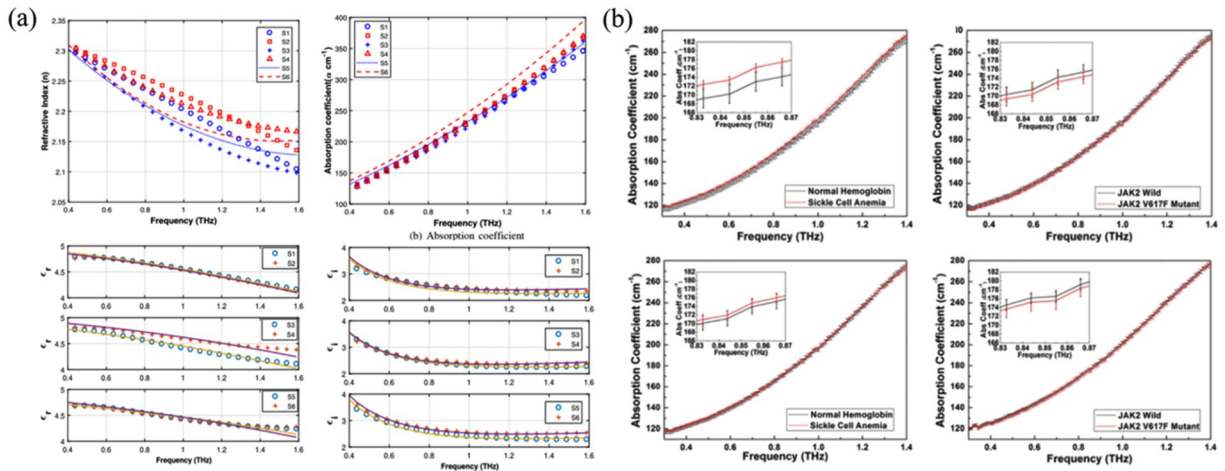


图6 (a) 人造正常皮肤和黑色素瘤样品的折射率和吸收系数以及复数介电常数^[38];
 (b) 浓度为5.0 g/L以及0.5 g/L的两种短链寡核苷酸和两种长链寡核苷酸的THz吸收光谱^[39]

Fig. 6 (a) Refractive index and absorption coefficient and complex permittivity of artificial normal skin and melanoma samples ^[38];
 (b) THz absorption spectra of two short-chain oligonucleotides and two long-chain oligonucleotides with concentrations of 5.0 g/L and 0.5 g/L ^[39]

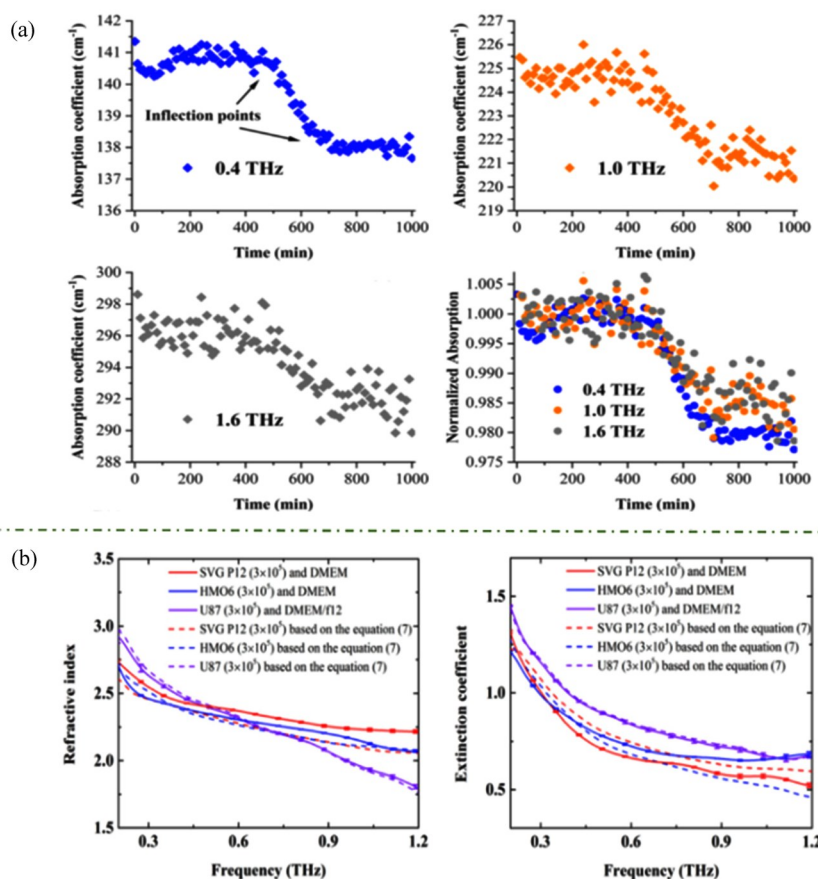


图 7 (a) 0.4、1.0、1.6 THz 下吸收系数随时间的变化^[40]; (b) SVG P12、HMO6、U87 细胞的复折射率和消光系数^[41]

Fig. 7 (a) Time variation of absorption coefficient at 0.4, 1.0, 1.6 THz ^[40]; (b) Complex refractive index and extinction coefficient of SVG P12, HMO6 and U87 cells ^[41]

2019年, Cao等^[42]利用 THz-ATR 检测和分析人大肠癌细胞系的技术, 研究了两种大肠癌细胞株 DLD-1 和 HT-29 在不同浓度水溶液中的 THz 吸收光谱特性, 具体结果见图 8(a)。与正常细胞系相比, 观察到了不同的光谱特征, 讨论了基于吸收系数、折射率、复介电常数的实部和虚部、介质损耗角正切等不同参数的识别结果。这项研究有助于通过在医学应用中使用 THz-TDS 光谱快速和即时地检测液体样品。2021年, Hu等^[43]采用 THz-ATR 光谱分别研究了酪氨酸 (Tyr) 对映体 (L-和 D-Tyr) 和外消旋体 (DL-Tyr) 在水溶液中的性质, 吸收谱见图 8(b)。THz-ATR 光谱还可以测定具有不同极性的 L-Tyr 和 D-Tyr 的水溶液的手性异构体手性, 无需预先知道异构体的手性, 以确定分子的手性。

2021年, Zhou等^[44]利用 THz-ATR 光谱来探测葡萄糖诱导的智能水凝胶水合状态的变化。随着葡萄糖水溶液浓度的增加, 观察到智能水凝胶的 THz 吸收系数和水合状态 (通过称重计算) 都显著增加, 检测结果如图 9(a) 所示。对于葡萄糖水溶液的检测, 这种方法优于单个 THz-ATR 装置, 并表现出合适的灵敏度、理想的选择性和良好的可重复使用性。2022年, Liao等^[45]报告了可以使用 THz-ATR 光谱以无标记、非侵入性和快速的方式评估生物活性成分对活的神经胶质瘤细胞的影响。测量的人神经胶质瘤细胞 (U87) 的 THz 吸收系数随着人参皂苷 Rg3(G-Rg3) 浓度在 0~50 mol/L 范围内增加, 这可以解释为 G-Rg3 恶化了细胞状态, 如图 9(b) 所示。这些结果证实了利用 THz 时域 ATR 光谱在体外检测 G-Rg3 对胶质瘤细胞作用的有效性。因此, 展示的技术为评估生物活性成分对细胞的功效或帮助筛选细胞靶向药物开辟了一条新的途径。

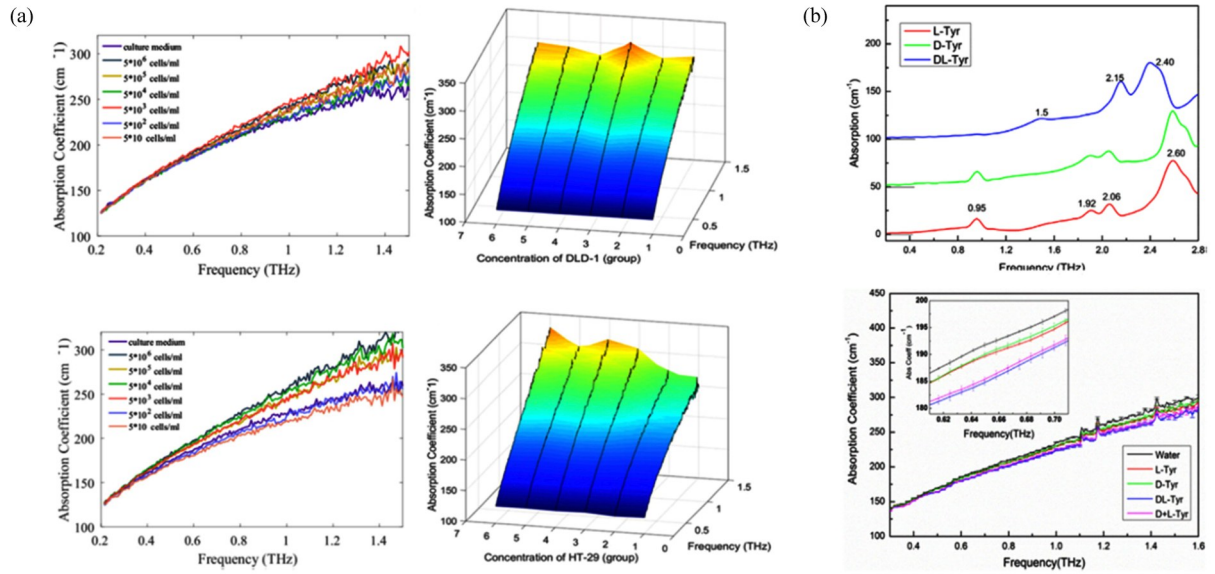


图8 (a) 肠癌细胞株 DLD-1 和 HT-29 在不同浓度水溶液中的 THz 吸收光谱^[42]; (b) 酪氨酸 (Tyr) 对映体 (L-和 D-Tyr) 和外消旋体 (DL-Tyr) 在水溶液中的 THz-ATR 光谱^[43]

Fig. 8 (a) THz absorption spectra of colon cancer cell lines DLD-1 and HT-29 in different concentration solutions^[42];

(b) THz-ATR spectra of tyrosine (Tyr) enantiomers (L- and D-Tyr) and racemate (DL-Tyr) in aqueous solution^[43]

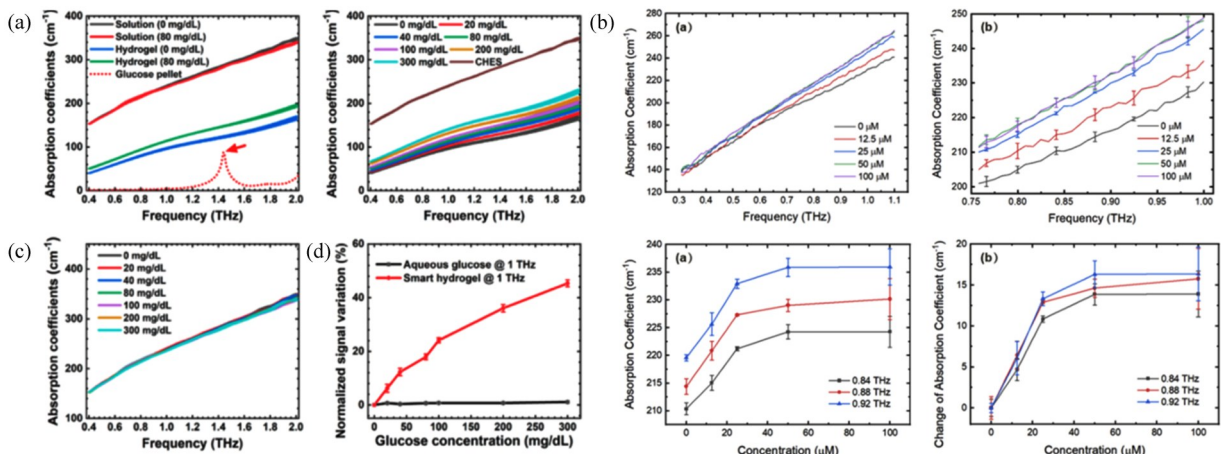


图9 (a) 葡萄糖颗粒、含水葡萄糖 (0 mg/dL 对 80 mg/dL) 和智能水凝胶在含水葡萄糖 (80 mg/dL) 中达到溶胀平衡之前和之后的吸收光谱的比较^[44]; (b) 用不同浓度的 G-Rg3 处理 24 h 的 U87 细胞的 THz 吸收系数和 U87 细胞在特定频率下的

THz 吸收系数分析^[45]

Fig. 9 (a) Comparison of the absorption spectra of the glucose pellet, aqueous glucose (0 mg/dL versus 80 mg/dL) and smart hydrogels before and after reaching swelling equilibrium in aqueous glucose (80 mg/dL)^[44]; (b) THz absorption coefficient of U87 cells treated with different concentrations of G-Rg3 for 24 h and THz absorption coefficient of U87 cells at a specific frequency^[45]

2.3 基于高能铷酸锂辐射源的 THz-ATR 光谱对液相样品的检测

由于高能汞灯和 LT-GaAs PCA 辐射源辐射功率相对较低, 目前的含水样品检测基本都是利用水的敏感性定量检测, 很难实现定性识别、定量检测的生物学样品检测需求。由于高功率 THz 辐射源和高灵敏度探测设备的限制, 含水生物样品的检测仍然面临着巨大的挑战。对于低浓度的水性生物样品, 最大的挑战是

水的强吸收会掩盖样品的吸收峰,导致水性样品难以识别和定量。高强度的THz辐射功率可以显著提高含水样品反射信号的信噪比,从而极大提高含水样品的检测精度。 LiNbO_3 晶体具备较高非线性光学系数和品质因子,对太赫兹波的吸收也很低,当激光输入为2 W时,太赫兹辐射功率可高达500 μW ,其频谱范围一般为0.1~2 THz。高功率 LiNbO_3 辐射的强场THz穿过ATR棱镜,并在ATR-样品界面发生全反射并产生倏逝波,该倏逝波延伸到水性样品中并与之相互作用,从而实现微量样品的高灵敏检测。高功率THz-ATR光谱显示出比普通THz光谱高100倍的灵敏度。因此,大功率THz-ATR光谱既能保证水样检测的信噪比,又能提高检测灵敏度,对于低浓度水样的检测具有显著优势。施卫教授课题组^[46]近期设计并搭建了一套高能 LiNbO_3 辐射源的THz-ATR光谱仪,能够动态地将液体生物样品THz检测信号的信噪比维持在40~60 dB。这种高功率THz-ATR光谱可以实现最低浓度为0.292 mol/L的 α -乳糖水溶液的类型鉴定和定量检测,此外,吸收峰位置与 α -乳糖水溶液的浓度呈线性反比关系,但高、低浓度样品的吸收峰位置变化率差异很大,具体检测结果如图10所示。通过大功率THz-ATR技术,实现了对低浓度乳糖水溶液的定性鉴别和定量检测,这种高功率、高灵敏度的THz-ATR光谱检测为血液、尿液指标等疾病标志物提供了快速、准确、低成本的检测方法,也为生物医学样品的精细化和深入检测提供了新的思路。

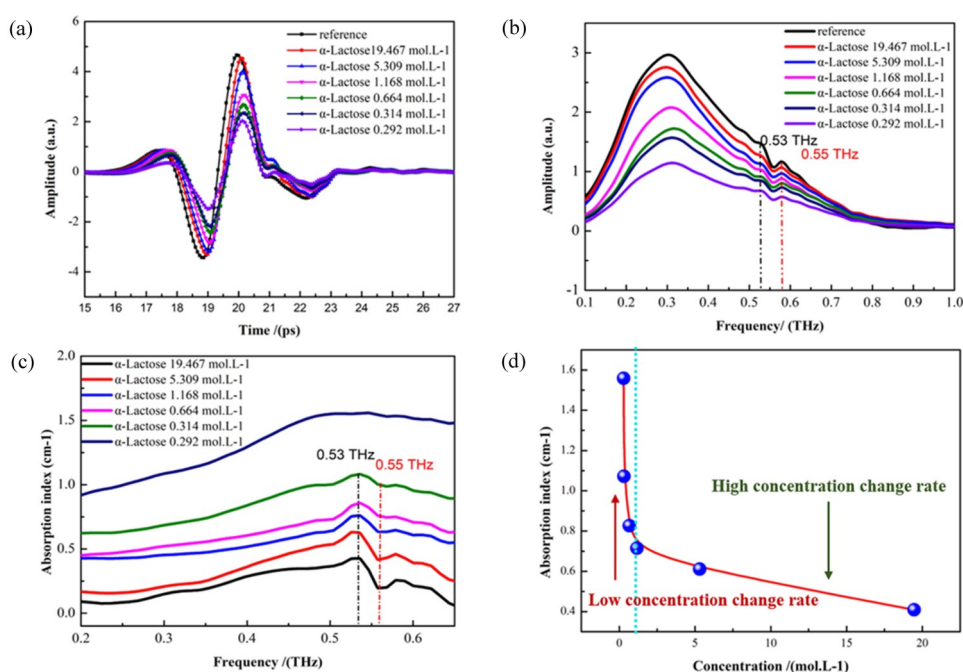


图10 不同浓度 α -乳糖样品的高功率THz-ATR光谱^[46,47]。(a)时域光谱;(b)相应的频域频谱;(c)特征吸收光谱;(d)不同浓度 α -乳糖溶液吸收峰位置的变化率

Fig. 10 High-power THz-ATR spectra of α -lactose samples with different concentrations^[46,47]. (a) Time-domain spectra; (b) The corresponding frequency-domain spectra; (c) Characteristic absorption spectra; (d) The change rate of absorption peak position with different concentrations of α -lactose solution

3 结论与展望

THz-ATR 检测技术经过了近二十年的发展,在含水生物样品检测方面已经有相当深入的研究,相关技术也展示了巨大的潜在优势。THz 波在 ATR 和样品界面发生全内反射产生倏逝波,倏逝波与样品相互作用

极大地降低了光强损失,可以对高吸收性的液体样品进行高灵敏度检测。另外,无需任何标记和样品预处理即可对少量样品进行高灵敏度检测,极大地提升了检测效率。

根据辐射源的发展对 THz-ATR 技术的发展进行了梳理总结,结果表明,稳定高效的 THz 辐射源结合高灵敏度的 ATR 检测器件,可以显著地提高含水样品的检测信噪比及灵敏度,已经逐渐应用到生物分子、微生物以及细胞和组织的检测中。但 THz-ATR 检测技术对样品信号是一种全面的增强,而不是单一标志物的增强,目前的含水样品检测基本都是利用水的敏感性定量检测,很难实现定性识别、定量检测的生物学样品检测需求。通过高功率 LiNbO₃ 辐射源,极大地提高了 THz-ATR 系统的信噪比,实现了对低浓度 α -乳糖水溶液的定性鉴别和定量检测,这种高功率、高灵敏度的 THz-ATR 光谱检测为血液、尿液指标等疾病标志物提供了快速、准确、低成本的检测方法,也为生物医学样品的精细化和深入检测提供了新的思路。未来有望通过有效的数据去噪技术,实现低功率、宽光谱的 THz-ATR 定性定量识别。

参考文献:

- [1] Wang L P, Wu X, Peng Y, *et al.* Quantitative analysis of homocysteine in liquid by terahertz spectroscopy [J]. *Biomedical Optics Express*, 2020, 11(5): 2570-2577.
- [2] Shi W, Wang Y Z, Hou L, *et al.* Detection of living cervical cancer cells by transient terahertz spectroscopy [J]. *Journal of Biophotonics*, 2021, 14(1): e202000237.
- [3] Liu Y, Zhao G Z, Zhou Q, *et al.* Terahertz time-domain spectroscopy detection and analysis of butyl hydroxy anisole [J]. *Chinese Journal of Quantum Electronics*, 2016, 33(6): 641-646.
刘英, 赵国忠, 周倩, 等. 丁基羟基茴香醚的太赫兹时域光谱检测与分析 [J]. 量子电子学报, 2016, 33(6): 641-646.
- [4] Liao Y S, Zhang M K, Tang M J, *et al.* Label-free study on the effect of a bioactive constituent on glioma cells *in vitro* using terahertz ATR spectroscopy [J]. *Biomedical Optics Express*, 2022, 13(4): 2380-2392.
- [5] Torii T, Chiba H, Tanabe T, *et al.* Measurements of glucose concentration in aqueous solutions using reflected THz radiation for applications to a novel sub-THz radiation non-invasive blood sugar measurement method [J]. *Digital Health*, 2017, 3: 2055207617729534.
- [6] Peng Y, Shi C J, Zhu Y M, *et al.* Terahertz spectroscopy in biomedical field: A review on signal-to-noise ratio improvement [J]. *Photonix*, 2020, 1(1): 1-18.
- [7] Naftaly M. Metrology issues and solutions in THz time-domain spectroscopy: Noise, errors, calibration [J]. *IEEE Sensors Journal*, 2013, 13(1): 8-17.
- [8] Peng Y, Shi C J, Wu X, *et al.* Terahertz imaging and spectroscopy in cancer diagnostics: A technical review [OL]. *BME Frontiers*, 2020, <https://doi.org/10.34133/2020/2547609>.
- [9] Shumyatsky P, Alfano R R. Terahertz sources [J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2011, 16(3): 033001.
- [10] Hangyo M. Development and future prospects of terahertz technology [J]. *Japanese Journal of Applied Physics*, 2015, 54(12): 120101.
- [11] Hafez H A, Chai X, Ibrahim A, *et al.* Intense terahertz radiation and their applications [J]. *Journal of Optics*, 2016, 18(9): 093004.
- [12] Bogue R. Sensing with terahertz radiation: A review of recent progress [J]. *Sensor Review*, 2018, 38(2): 216-222.

- [13] Moriguchi Y, Tokizane Y, Takida Y, *et al.* High-average and high-peak output-power terahertz-wave generation by optical parametric down-conversion in MgO: LiNbO₃ [J]. *Applied Physics Letters*, 2018, 113(12): 121103.
- [14] Nawata K, Hayashi S, Ishizuki H, *et al.* Effective terahertz wave parametric generation depending on the pump pulse width using a LiNbO₃ crystal [J]. *IEEE Transactions on Terahertz Science and Technology*, 2017, 7(5): 617-620.
- [15] Mu N, Yang C Y, Xu D G, *et al.* Molecular pathological recognition of freshly excised human glioma using terahertz ATR spectroscopy [J]. *Biomedical Optics Express*, 2021, 13(1): 222-236.
- [16] Soltani A, Jahn D, Duschek L, *et al.* Attenuated total reflection terahertz time-domain spectroscopy: Uncertainty analysis and reduction scheme [J]. *IEEE Transactions on Terahertz Science and Technology*, 2016, 6(1): 32-39.
- [17] Soltani A, Busch S F, Plew P, *et al.* THz ATR spectroscopy for inline monitoring of highly absorbing liquids [J]. *Journal of Infrared, Millimeter, and Terahertz Waves*, 2016, 37(10): 1001-1006.
- [18] Takagi S, Takahashi S, Takeya K, *et al.* Influence of delay stage positioning error on signal-to-noise ratio, dynamic range, and bandwidth of terahertz time-domain spectroscopy [J]. *Applied Optics*, 2020, 59(3): 841-845.
- [19] Qiao X L, Zhang X M, Ren J J, *et al.* Mean estimation empirical mode decomposition method for terahertz time-domain spectroscopy de-noising [J]. *Applied Optics*, 2017, 56(25): 7138-7145.
- [20] Hirori H, Yamashita K, Nagai M, *et al.* Attenuated total reflection spectroscopy in time domain using terahertz coherent pulses [J]. *Japanese Journal of Applied Physics*, 2004, 43(10A): L1287-L1289.
- [21] Gu Y Q, Li S Y, Xu Y H, *et al.* The effect of magnetic field on the hydration of cation in solution revealed by THz spectroscopy and MDs [J]. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2019, 582: 123822.
- [22] Huang Y X, Singh R, Xie L J, *et al.* Attenuated total reflection for terahertz modulation, sensing, spectroscopy and imaging applications: A review [J]. *Applied Sciences*, 2020, 10(14): 4688.
- [23] Ryu M, Ng S H, Anand V, *et al.* Attenuated total reflection at THz wavelengths: Prospective use of total internal reflection and polariscopy [J]. *Applied Sciences*, 2021, 11(16): 7632.
- [24] Cherkasova O P, Nazarov M M, Shkurinov A P, *et al.* Terahertz spectroscopy of biological molecules [J]. *Radiophysics and Quantum Electronics*, 2009, 52(7): 518-523.
- [25] Smolyanskaya O A, Chernomyrdin N V, Konovko A A, *et al.* Terahertz biophotonics as a tool for studies of dielectric and spectral properties of biological tissues and liquids [J]. *Progress in Quantum Electronics*, 2018, 62: 1-77.
- [26] Son J H. *Terahertz Biomedical Science & Technology* [M]. Boca Raton, Florida: CRC Press, 2014: 153-168.
- [27] Shumyatsky P, Alfano R R. Terahertz sources [J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2011, 16(3): 033001.
- [28] Charrada K, Zissis G, Aubes M. Two-temperature, two-dimensional fluid modelling of mercury plasma in high-pressure lamps [J]. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 1996, 29(9): 2432-2438.
- [29] Naito H, Ogawa Y, Shiraga K, *et al.* Inspection of milk components by terahertz attenuated total reflectance (THz-ATR) spectrometer equipped temperature controller [C]. *IEEE/SICE International Symposium on System Integration (SII)*, Japan, *IEEE*, 2012: 192-196.
- [30] Suhandy D, Suzuki T, Ogawa Y, *et al.* A quantitative study for determination of glucose concentration using attenuated total reflectance terahertz (ATR-THz) spectroscopy [J]. *Engineering in Agriculture, Environment and Food*, 2012, 5(3): 90-95.
- [31] Arikawa T, Nagai M, Tanaka K. Characterizing hydration state in solution using terahertz time-domain attenuated total reflection spectroscopy [J]. *Chemical Physics Letters*, 2008, 457(1-3): 12-17.
- [32] Takebe G, Kawada Y, Akiyama K, *et al.* Evaluation of drug crystallinity in aqueous suspension using terahertz time-domain attenuated total reflection spectroscopy [J]. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2013, 102(11): 4065-4071.
- [33] Shiraga K, Ogawa Y, Suzuki T, *et al.* Characterization of dielectric responses of human cancer cells in the terahertz region [J]. *Journal of Infrared, Millimeter, and Terahertz Waves*, 2014, 35(5): 493-502.

- [34] Huang P, Huang Z, Lu X, *et al.* Study on glycoprotein terahertz time-domain spectroscopy based on composite multiscale entropy feature extraction method[J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2020, 229: 117948.
- [35] Cherkasova O, Nazarov M, Shkurinov A. Noninvasive blood glucose monitoring in the terahertz frequency range [J]. *Optical and Quantum Electronics*, 2016, 48(3): 217.
- [36] Takeya K, Muto K, Ishihara Y, *et al.* Monitoring theophylline concentrations in saline using terahertz ATR spectroscopy [J]. *Applied Sciences*, 2016, 6(3): 72.
- [37] Zou Y, Liu Q, Yang X, *et al.* Label-free monitoring of cell death induced by oxidative stress in living human cells using terahertz ATR spectroscopy [J]. *Biomedical Optics Express*, 2017, 9(1): 14-24.
- [38] Zhang R, Yang K, Yang B, *et al.* Dielectric and double Debye parameters of artificial normal skin and melanoma [J]. *Journal of Infrared, Millimeter, and Terahertz Waves*, 2019, 40(6): 657-672.
- [39] Tang M J, Zhang M K, Xia L P, *et al.* Detection of single-base mutation of DNA oligonucleotides with different lengths by terahertz attenuated total reflection microfluidic cell [J]. *Biomedical Optics Express*, 2020, 11(9): 5362-5372.
- [40] Akiyama K, Horita K, Sakamoto T, *et al.* Monitoring the progress of lactic acid fermentation in yogurt manufacturing using terahertz time-domain-attenuated total-reflection spectroscopy [J]. *Journal of Infrared, Millimeter, and Terahertz Waves*, 2019, 40(11): 1160-1167.
- [41] Wang Y Y, Jiang Z N, Xu D G, *et al.* Study of the dielectric characteristics of living glial-like cells using terahertz ATR spectroscopy [J]. *Biomedical Optics Express*, 2019, 10(10): 5351-5361.
- [42] Cao Y Q, Chen J N, Huang P J, *et al.* Inspecting human colon adenocarcinoma cell lines by using terahertz time-domain reflection spectroscopy [J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2019, 211: 356-362.
- [43] Hu M D, Tang M J, Wang H B, *et al.* Terahertz, infrared and Raman absorption spectra of tyrosine enantiomers and racemic compound [J]. *Spectrochimica Acta Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2021, 254: 119611.
- [44] Zhou J, Wang X M, Wang Y X, *et al.* A novel THz molecule-selective sensing strategy in aqueous environments: THz-ATR spectroscopy integrated with a smart hydrogel [J]. *Talanta*, 2021, 228: 122213.
- [45] Liao Y S, Zhang M K, Tang M J, *et al.* Label-free study on the effect of a bioactive constituent on glioma cells *in vitro* using terahertz ATR spectroscopy [J]. *Biomedical Optics Express*, 2022, 13(4): 2380-2392.
- [46] Shi W, Li C H, Wang H Q, *et al.* Quantitative detection of THz-ATR spectra of aqueous samples under strong-field terahertz wave [J]. *iScience*, 2023, 26(1): 105871.
- [47] Wang H, Shi W, Hou L, *et al.* Detection of the minimum concentrations of α -lactose solution using high-power THz-ATR spectroscopy[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2023, 11: 1-7.