



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107110774 B

(45)授权公告日 2020.07.28

(21)申请号 201580070903.X

(72)发明人 A·阿波隆斯基 I·普佩扎

(22)申请日 2015.12.18

F·克劳斯 E·菲尔

(65)同一申请的已公布的文献号

(74)专利代理机构 永新专利商标代理有限公司  
72002

申请公布号 CN 107110774 A

代理人 郭毅

(43)申请公布日 2017.08.29

(51)Int.Cl.

G01N 21/35(2014.01)

(30)优先权数据

14004401.7 2014.12.23 EP

(56)对比文件

CN 102175636 A,2011.09.07,

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

CN 102175636 A,2011.09.07,

2017.06.23

CN 1614391 A,2005.05.11,

(86)PCT国际申请的申请数据

CN 101196467 A,2008.06.11,

PCT/EP2015/002562 2015.12.18

CN 103389287 A,2013.11.13,

(87)PCT国际申请的公布数据

Sheng Liu 等.Mid-infrared time-domain  
spectroscopy system with carrier-envelope  
phase stabilization.《Appl. Phys. Lett.》

W02016/102056 EN 2016.06.30

.2013,第103卷

(73)专利权人 马克斯-普朗克科学促进学会

审查员 彭倩筠

地址 德国慕尼黑

权利要求书4页 说明书10页 附图3页

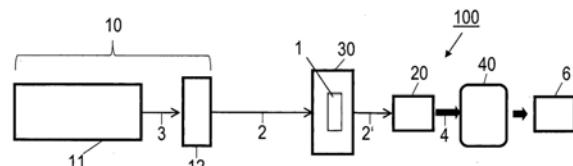
专利权人 路德维希-马克西米利安慕尼黑  
大学

(54)发明名称

用于测量光谱样品响应的方法和仪器

(57)摘要

一种测量生物样品(1)的光谱响应的方法，  
包括以下步骤：生成具有初始光谱的探测光；用所述探测光照射所述样品(1)，包括所述探测光与所述样品(1)的相互作用；光谱解析检测所述探测光，由于所述探测光与所述样品(1)的相互作用，所述探测光具有偏离所述初始光谱的改变后的光谱，所述改变后的光谱是所述样品(1)的光谱响应的特性，其中，所述探测光包括用fs激光源装置(10)生成的探测光脉冲(2)。另外，描述了光谱测量仪器，所述光谱测量仪器被配置用于测量生物样品(1)的光谱响应。



1. 一种测量样品(1)的光谱响应的方法,包括以下步骤:

-生成具有初始光谱并包括用fs激光源装置(10)生成的具有等于或低于100fs的脉冲持续时间的探测光脉冲的探测光,其中,初始光谱涵盖包括至少3μm的波长的波长范围,

-用所述探测光照射所述样品(1),包括所述探测光与所述样品(1)的相互作用,和

-光谱解析检测所述探测光,由于所述探测光与所述样品(1)的相互作用,所述探测光具有偏离所述初始光谱的改变后的光谱,所述改变后的光谱是所述样品(1)的光谱响应的特性,其中,

-检测步骤包括时域采样与所述样品(1)相互作用之后的所述探测光脉冲(2)的时间形状,并且基于与所述样品(1)相互作用之后的所述探测光脉冲(2)的时间形状的傅里叶变换来获得所述样品(1)的光谱响应,

其特征在于

-所述样品包括生物样品(1),

-所述探测光以50mW以上的平均功率被创造,

-在与所述生物样品(1)相互作用之后,所述探测光脉冲(2)中的每个包括与所述探测光脉冲的初始光谱对应的主脉冲和由所述生物样品(1)的吸收引起的在主脉冲后的时间尾部,其中,时域采样所述探测光脉冲(2)的时间形状的步骤包括对时间尾部进行采样。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述探测光脉冲(2)具有以下特征中的至少一个

-所述探测光脉冲(2)具有低于包括出现在所述改变后的光谱中的光谱响应特征的光谱的频率倒数宽度的脉冲持续时间,

-在照射所述样品(1)之前,所述探测光脉冲(2)具有低于50fs的脉冲持续时间,

-在照射所述样品(1)之前,所述探测光脉冲(2)具有50mW以上的平均功率,

-所述初始光谱涵盖至少一个频率倍频程,

-所述初始光谱涵盖以下波长范围:所述波长范围包括至少5μm的波长,和

-所述初始光谱是连续的或拟连续的光谱。

3. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中

-所述光谱响应是所述样品(1)的吸收光谱和反射光谱中的至少一个。

4. 根据权利要求1或2所述的方法,具有以下特征中的至少一个

-所述样品(1)包括固体、液体、气溶胶、气体和蒸汽中的至少一种,和

-所述样品(1)布置在多程室或增强腔中。

5. 根据权利要求1或2所述的方法,其中,所述fs激光源装置(10)包括

-产生驱动脉冲的驱动源(11),和

-通过所述驱动脉冲的脉冲内频率差生成所述探测光脉冲(2)的差频生成(DFG)单元(12)。

6. 根据权利要求1或2所述的方法,其中,所述fs激光源装置包括

-纤维激光器,

-Yb-YAG盘形激光器,或

-Ho-YAG盘形激光器。

7. 根据权利要求1或2所述的方法,其中

-所述时域采样步骤包括电光采样所述探测光脉冲(2),其中

-所述探测光脉冲(2)和采样脉冲(5)在电光探测元件(21)中以变化的时间关系叠加，用于对所述探测光的时间形状进行采样。

8. 根据权利要求7所述的方法，其中

-所述采样脉冲(5)包括用于生成所述探测光脉冲(2)的驱动脉冲(3)的部分，所述采样脉冲(5)以相对于所述探测光脉冲(2)变化的延迟被引导到所述电光探测元件。

9. 根据权利要求1或2所述的方法，包括另外的步骤

-评估来自受研究对象的所述样品(1)的光谱响应以获得诊断相关信息(6)。

10. 根据权利要求9所述的方法，其中，所述评估步骤包括以下中的至少一个

-基于所述改变后的光谱中的特定频段(7)来识别诊断相关物质，

-将所述改变后的光谱的至少一部分与先前用所述受研究对象的另一样品(1)收集的所有存储的光谱响应进行比较，和

-将所述改变后的光谱的至少一部分与其他对象的参考数据进行比较。

11. 根据权利要求2所述的方法，其中，在照射所述样品(1)之前，所述探测光脉冲(2)具有低于20fs的脉冲持续时间。

12. 根据权利要求2所述的方法，其中，在照射所述样品(1)之前，所述探测光脉冲(2)具有500mW以上的平均功率。

13. 根据权利要求2所述的方法，其中，所述初始光谱涵盖至少两个频率倍频程。

14. 根据权利要求2所述的方法，其中，所述初始光谱涵盖以下波长范围：所述波长范围包括至少3μm和/或至多15μm的波长。

15. 根据权利要求2所述的方法，其中，所述初始光谱涵盖以下波长范围：所述波长范围包括至多30μm的波长。

16. 一种被配置用于测量样品(1)的光谱响应的光谱测量仪器，包括

-fs激光源装置(10)，其被布置成用于生成具有初始光谱并包括具有等于或低于100fs的脉冲持续时间的探测光脉冲(2)的探测光，并用于利用探测光照射所述样品(1)，其中，初始光谱涵盖包括至少3μm的波长的波长范围，和

-检测器装置(20)，其被布置成用于在所述探测光与所述样品(1)相互作用之后，对所述探测光进行光谱解析检测，其中，所述检测器装置被配置成用于对由于所述探测光与所述样品(1)的相互作用而偏离于初始光谱的改变后的光谱进行光谱解析检测，所述改变后的光谱是所述样品(1)的光谱响应的特性，其中，所述检测器装置(20)被配置成用于时域采样与所述样品(1)相互作用之后的所述探测光脉冲(2)的时间形状，其中，基于与所述样品(1)相互作用之后的所述探测光脉冲(2)的时间形状的傅里叶变换来获得所述样品(1)的光谱响应，

其特征在于

-所述样品包括生物样品(1)，

-所述探测光脉冲以50mW以上的平均功率被创造，

-在与所述生物样品(1)相互作用之后，所述探测光脉冲(2)中的每个包括与所述探测光脉冲的初始光谱对应的主脉冲和由所述生物样品(1)的吸收引起的在主脉冲后的时间尾部，其中，所述检测器装置(20)被配置为使得时域采样所述探测光脉冲(2)的时间形状包括对时间尾部进行采样。

17. 根据权利要求16所述的光谱测量仪器,其中,所述fs激光源装置(10)适于生成具有以下特征中的至少一个的所述探测光脉冲(2)

-所述探测光脉冲(2)具有低于包括出现在所述改变后的光谱中的光谱响应特征的光谱的频率倒数宽度的脉冲持续时间,

-所述探测光脉冲(2)具有低于50fs的脉冲持续时间,

-所述探测光脉冲(2)具有50mW以上的平均功率,

-所述初始光谱涵盖至少一个频率倍频程,

-所述初始光谱涵盖以下波长范围:所述波长范围包括至少5μm的波长,和

-所述初始光谱是连续的光谱。

18. 根据权利要求16或17所述的光谱测量仪器,所述光谱测量仪器还包括以下中的至少一个

-样品保持装置(30),其被布置成用于容纳所述样品(1),其中,所述fs激光源装置(10)、所述样品保持装置(30)和所述检测器装置(20)相对于彼此布置成使所述检测器装置(20)能够检测所述样品(1)的吸收和反射光谱中的至少一个,和

-多程室或增强腔,所述多程室或增强腔被布置成用于使所述探测光脉冲多次通过所述样品(1)。

19. 根据权利要求18所述的光谱测量仪器,其中

-所述样品保持装置(30)适于容纳作为固体、液体、气溶胶、气体和蒸汽中的至少一种的所述样品(1)。

20. 根据权利要求16或17所述的光谱测量仪器,其中,所述fs激光源装置(10)包括

-产生驱动脉冲(3)的驱动源(11),和

-通过所述驱动脉冲(3)的脉冲内频率差来生成所述探测光脉冲(2)的差频生成(DFG)单元(12)。

21. 根据权利要求16或17所述的光谱测量仪器,其中,所述fs激光源装置包括

-纤维激光器,

-Yb-YAG盘形激光器,或

-Ho-YAG盘形激光器。

22. 根据权利要求16或17所述的光谱测量仪器,其中

-所述检测器装置(20)包括具有电光探测元件(21)的电光采样单元,用于采样与所述样品(1)相互作用之后的所述探测光的时间形状。

23. 根据权利要求22所述的光谱测量仪器,其中

-所述fs激光源装置(10)包括分束器(13),所述分束器(13)用于提供用于生成所述探测光脉冲(2)的驱动脉冲(3)的部分作为采样脉冲(5),和

-延迟单元(14)被布置成用于以相对于所述探测光脉冲(3)变化的延迟在所述电光探测元件(21)处提供所述采样脉冲(5)。

24. 根据权利要求16或17所述的光谱测量仪器,所述光谱测量仪器还包括

-计算装置(40),其被配置成用于评估来自受研究对象的所述样品(1)的光谱响应并获得诊断相关信息(6)。

25. 根据权利要求24所述的光谱测量仪器,其中,所述计算装置(40)包括以下中的至少

一个：

-基于所述改变后的光谱中的特定频带识别诊断相关物质的滤波器单元，

-第一比较单元，所述第一比较单元将所述改变后的光谱的至少一部分与先前用所述受研究对象的另一个样品(1)收集的所存储的光谱响应进行比较，和

-第二比较单元，所述第二比较单元将所述改变后的光谱的至少一部分与其他对象的参考数据进行比较。

26. 根据权利要求17所述的光谱测量仪器，其中，所述探测光脉冲(2)具有低于20fs的脉冲持续时间。

27. 根据权利要求17所述的光谱测量仪器，其中，所述探测光脉冲(2)具有500mW以上的平均功率。

28. 根据权利要求17所述的光谱测量仪器，其中，所述初始光谱涵盖至少两个频率倍频程。

29. 根据权利要求17所述的光谱测量仪器，其中，所述初始光谱涵盖以下波长范围：所述波长范围包括至少3μm和/或至多15μm的波长。

30. 根据权利要求17所述的光谱测量仪器，其中，所述初始光谱涵盖以下波长范围：所述波长范围包括至多30μm的波长。

## 用于测量光谱样品响应的方法和仪器

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种测量生物样品的光谱响应的方法。特别地，本发明涉及一种通过用宽带探测光照射样品并感测由探测光与样品的相互作用而产生的探测光的光谱变化，来测量光谱响应的方法，如同一种测量探测光在样品处的吸收和/或反射的方法。另外，本发明涉及一种用于测量生物样品的光谱响应的光谱测量仪器，所述光谱测量仪器特别是包括宽带光源，所述宽带光源用于利用探测光照射样品；和检测器装置，所述检测器装置用于光谱解析检测由探测光与样品的相互作用而产生的探测光的变化。可在样品的光谱中应用本发明，特别是用于分析样品的组成和/或状况。可分析的生物样品包括例如来自人或动物生物体的样品或取自自然环境的样品。

### 背景技术

[0002] 为说明关于以下技术的背景技术，所述技术用于分析物质样品，特别是生物样品用于诊断目的，参考了以下现有技术文献：

[0003] [1]B.de Lacy Costello et al., “A review of the volatiles from the healthy human body”, J.Breath Res.8,014001 (2014) ;

[0004] [2]T.H.Risby et al., “Current status of clinical breath analysis”, Appl.Phys.B 85,421–426 (2006) ;

[0005] [3]W.Cao et al., “Breath analysis:Potential for clinical diagnosis and exposure assessment”, Clinical Chemistry 52,800–811 (2006) ;

[0006] [4]US 2012/0266653 A1;

[0007] [5]US 7,101,340 B1;

[0008] [6]WO 2011/117572 A1;

[0009] [7]US 5,222,495;

[0010] [8]US 8,022,366 B2;

[0011] [9]US 6,236,047 B1;

[0012] [10]US 7,403,805 B2;

[0013] [11]US 7,203,345 B2;

[0014] [12]EP 0,680,273 B1;

[0015] [13]P.Dumas et al., “Adding synchrotron radiation to infrared microspectroscopy:what's new in biomedical applications?” TRENDS in Biotechnology 25,40 (2006) ;

[0016] [14]I.Znakovskaya et al., “Dual frequency comb spectroscopy with a single laser”, Opt.Lett.39,5471 (2014) ;

[0017] [15]A.Sponring et al., “Release of volatile organic compounds from the lung cancer cell line NCI-H2087 In Vitro”, Anticancer Research 29,419 (2009) ;

[0018] [16]M.Diem et al., “Molecular pathology via IR and Raman spectral

imaging”, J.Biophoton.6,855 (2013) ;

[0019] [17]W.Parz et al., “Time-domain spectroscopy of mid-infrared quantum cascade lasers”, Semicond.Sci.Technol.26 (2011) 014020;

[0020] [18]WO 2007/121598 A1;

[0021] [19]US 2013/0221222 A1;

[0022] [20]B.Bernhardt et al., “Mid-infrared dual-comb spectroscopy with 2.4 $\mu$ m Cr<sup>2+</sup>:ZnSe femtosecond lasers”, Appl.Phys.B (2010) 3; 和

[0023] [21]Sh.Liu et al., “Mid-infrared time-domain spectroscopy system with carrier-envelope phase stabilization”, Appl.Phys.Lett.103,181111 (2013)。

[0024] 在医学中,迫切需要在早期阶段对疾病进行微创、快速、可靠和成本有效的诊断(筛查),并监测其对治疗的反应。众所周知,分析包括从身体排出的体液和气体的生物样品,非常适合于此目的,因为它们含有大量的人的健康状态的化合物特性。已知有约1760种不同的这样的成分,特别是呼出气中的874种,皮肤散发中的504种,尿液顶部空间中的279种,血液中的130种,粪便中的381种以及唾液中的353种[1]。重要的是,一些化合物只存在于液相中,一些存在于气相和液相中。特别地,呼吸气溶胶潜在地富含大量化合物。

[0025] 人类细胞的分子组成的结构的任何变化总是导致细胞本身的或细胞本身的代谢散发的中红外(MIR:mid-infrared)吸收光谱的变化。因此,光谱中的小的改变提供了早期检测和诊断许多疾病的手段。疾病的经统计学证实的光谱轨迹将为其早期诊断提供可靠的“指纹”信息。

[0026] 在经典诊断中,生物样品的化合物通过化学分析或通过气相色谱法与质谱法结合[2,3]来检测。然而,这些方法i)不允许快速分析,ii)可改变或甚至破坏一些化合物,和iii)对DNA的结构中的构象变化(这可在质量上不产生任何变化地,引发严重疾病)无法知晓。

[0027] 另外,已经提出了许多光谱方法来检查体液和气体[4-12,16]。在[4]中,仅提出气体分析,而实际上所有相(气体、液体、固体、气溶胶)都可有助于诊断知识。在[5]中,提出了通过cw激光器对呼吸进行光谱分析,因此可用的光谱数据点的数量及其信息值非常有限的。在[6]中,使用窄范围的波长,并且仅检测三种气体,这限制了对糖尿病的诊断范围。

[0028] [7]和[8]中描述了处理体液、例如血液或唾液的光谱分析的其他常规方法。专利[7]提出了通过比较血液中两个紧密间隔波长的吸收的无创血液分析。在[8]中,提出了一种紧凑的MIR光谱仪用于测量血糖(葡萄糖)和其他血液和体液分析物。它由调制的热发射器和低分辨率光谱仪组成,所述低分辨率光谱仪包含四分之一波片作为干涉滤光片。

[0029] 在[9]中使用在1100至5000nm范围内的波段的漫反射辐射,以通过化学计量技术确定血液分析物的浓度。另一种技术使用放置在眼睛之上的接触装置来研究结膜和泪液膜中的光谱变化[10]。为此目的,采用来自眼睛本身的热辐射或由光纤所提供的外部辐射。[11]中使用光谱学通过分析来自人体组织的近红外辐射的反射来识别个体。在[12]中,将含有光纤束的导管插入胃肠道中,以便检测荧光和通过其内含物对光的吸收。

[0030] 作为一个普遍的缺点,没有常规方法能够提供原则上可获得的关于人的健康状况的完整信息。常规技术专门使用单一相仅用于诊断。另外,它们在整个的MIR带宽内仅使用窄的光谱范围,并且它们不足够敏感以检测疾病的光谱指示中的微小变化。换句话说,已知

的方法仅提供获取完整分子指纹的一小部分,甚至具有不足以可靠地识别和诊断疾病的灵敏度和信噪比。

[0031] 最近,已经探究了使用同步加速器辐射用来对细胞以各种不同排序进行光谱成像 [13]。这种辐射是宽带,比热源强大约两个数量级。然而,应用同步加速器用于常规诊断和用于筛查大量患者似乎不实用。

[0032] 在分析生物样品仅用于诊断目的时,没有上述限制。对例如环境样品或激光介质的其他光谱研究具有类似的缺点,特别是关于敏感性、选择性和对可用信息的有限使用方面。

[0033] 作为示例,[17]公开了量子级联激光器 (QCL:quantum-cascade-laser) 的光谱研究。为测量增益和吸收,用具有MIR范围内的波长的10fs激光脉冲照射QCL,并且利用电光检测使用时域光谱设备来研究QCL的光谱响应。常规方法的应用仅限于研究强吸收QCL材料。由于使用Ti-蓝宝石激光器,激光脉冲具有低强度,使得能够排除弱吸收的测量。另外,激光脉冲具有窄带特性,导致限制了对于在宽波长范围内具有光谱特征的其他材料的研究。

[0034] [18]中公开了通过有机材料中的光学校正,Ti-蓝宝石激光器的用于产生相应于62μm至230μm的范围内的波长的1.3至4.8THz范围内的THz辐射的另一应用。根据[19],使用Ti-蓝宝石激光器研究了大约6μm的窄频率范围。由于激光设备的窄波长范围、低辐射强度和有限的稳定性,这些传统技术不适合材料的有效光谱宽带表征。

[0035] [20]中描述了用于研究气体样品的双梳状光谱。该方法仅限于在2.3μm至2.6μm之间的窄波长范围内的FTIR测量,在ppm范围内仅达到低灵敏度。再次,这种技术不适用于研究在宽波长范围内具有光谱特征的材料。

[0036] 如[21]中所公开的,可基于Er:在1050nm、1350nm和1550nm的三个波长下的纤维激光发射来产生8μm至12μm范围内的MIR辐射。该技术需要复杂的环路控制,导致了MIR辐射的受限制的适用性。

## 发明内容

[0037] 本发明的第一目标是提供一种测量样品的光谱响应的改进方法,其能够避免传统技术的限制或缺点。特别地,本发明的第一目的是提供具有增加的灵敏度、改进的信噪比(SNR)、增强的选择性和/或改进的覆盖扩展的光谱范围、例如中红外光谱范围(MIR)内的能力的测量方法。本发明的第二目的是提供一种改进的光谱测量仪器,其适于测量样品对探测光照射的光谱响应,其中,所述光谱测量仪器能够避免常规技术的限制和缺点。特别地,光谱测量仪器能够在灵敏度、SNR、选择性和/或宽带覆盖方面提供改进。

[0038] 分别通过包括独立权利要求的特征的光谱响应测量方法和光谱测量仪器相应地解决了这些目的。本发明的优选实施例和应用来自从属权利要求。

[0039] 根据本发明的第一总体方面,通过测量生物样品的光谱响应的方法来解决上述目的,其中,用fs(飞秒)激光源装置生成探测光脉冲(电磁辐射的脉冲),将所述探测光脉冲引导到待研究的样品,并在与所述样品相互作用后检测探测光脉冲。探测光脉冲提供具有初始光谱的探测光,所述初始光谱由探测光脉冲的频率分量形成。术语“初始光谱”是指在与样品相互作用之前,探测光脉冲的光谱组成。由于利用fs激光源装置产生探测光脉冲,初始光谱是连续的或拟连续的光谱,其形状由fs激光源装置的输出(可选地与DFG和/或脉冲压

缩相结合),例如由特定的振荡器和/或放大器处理来确定,由fs激光源装置实现。

[0040] 由于利用fs激光源装置生成探测光脉冲,因此初始光谱是宽带光谱,其涵盖包括感兴趣的多个光谱带(光谱响应特征)的光谱范围。由于与样品的相互作用,探测光脉冲得到偏离初始光谱的改变后的光谱。术语“改变后的光谱”是指探测光脉冲与样品相互作用之后的光谱组成。改变后的光谱包括初始光谱的由包括在样品中的成分的至少一个光谱带(光谱线)所改变后的光谱形状。优选地,改变后的光谱包括样品中包括的一个或多个成分的多个光谱带。在探测光与样品相互作用之后通过光谱解析检测探测光,可感测至少一种成分的所有光谱带。改变后的光谱,特别是改变后的光谱与初始光谱之间的差异,优选地通过样品产生的光谱带的位置、相对幅度和/或光谱相位是样品的光谱响应的特性。

[0041] 根据本发明的第二总体方面,上述目的通过一种适于测量生物样品的光谱响应的光谱测量仪器(光谱仪)来解决,其中,所述光谱测量仪器包括:探测光源,所述探测光源用于利用具有初始光谱的探测光照射受研究的样品;和检测器装置,所述检测器装置用于光谱解析检测与样品相互作用之后的探测光脉冲。根据本发明,探测光源包括被配置用于生成fs探测光脉冲的fs激光源装置。

[0042] 有利地,通过提供结合有本发明的以下主要特征的fs激光源装置,来解决上述目的。首先,使用fs探测脉冲提供涵盖感兴趣的整个光谱范围的宽带辐射,特别是在研究生物样品,例如用于诊断目的的情况下。所述fs探测脉冲具有涵盖以下光谱范围的初始光谱,所述光谱范围允许激发样品成分中的,特别是样品中包含的有机分子中的振动跃迁和/或转动跃迁。由于fs探测脉冲的宽带光谱,因此样品的光谱响应可如同特定的光谱带图案(光谱“指纹”)被检测。对于样品成分,光谱响应在光谱带图案中的光谱带的光谱位置和光谱带的相对强度方面是特定的。其次,与常规技术相比,fs激光源装置提供具有高功率的探测光脉冲和照射的超短脉冲时间结构,允许以无与伦比的灵敏度检测窄光谱带(分子指纹的构成部分)。fs探测光脉冲的功率与热宽带源的功率和同步加速器源的功率相比分别提高了至少4个和2个数量级。特别地,与常规技术相比,增加的探测光脉冲功率和超短脉冲持续时间允许以基本上降低的SNR来检测光谱响应。第三,使用fs激光源装置允许应用快速光谱技术来检测探测光的改变后的光谱。可基本上提高分析速度,这在研究生物样品的领域中特别是一个优势。另外,操作的便利性使得可做到在实际条件下利用本发明技术,例如甚至在医院或医生的实践中采用本发明的诊断应用。

[0043] 根据本发明的可组合或子组合实现的优选实施例,探测光脉冲具有以下脉冲特性中的至少一个。根据第一优选变型,探测光脉冲的脉冲持续时间低于由光谱响应特征跨越的光谱(特别是样品的光谱中,即探测光的改变后的光谱中出现的一个或一个以上光谱带)的频率倒数宽度。由于这种关系,促进了用时域计量技术去检测探测光。如果基于与样品相互作用后的探测光脉冲的时间结构的时间采样来光谱解析检测具有改变后的光谱的探测光,如果提高的SNR、无噪声背景出现在探测光脉冲的脉冲持续时间之后的时间范围内,那么可在提高的SNR下,优选地甚至在无噪声背景下检测光谱响应特征的尾部。

[0044] 根据另外的优选变型,fs探测光脉冲具有等于或低于100fs、优选50fs,特别是优选等于或低于20fs、例如10fs的脉冲持续时间。有利地,利用这些脉冲持续时间,产生了宽带探测光。另外,受研究的典型样品的光谱响应特征仅在探测光脉冲持续时间之外的时间范围内影响探测光脉冲的时间结构。

[0045] 另外,可通过缩短驱动脉冲持续时间的近红外(NIR:near infrared)来增加探测光脉冲的平均功率。因此,根据本发明的优选的另外的变型,优选地以50mW以上,特别地优选500mW以上,例如达到5W的平均功率创造探测光脉冲。

[0046] 探测光脉冲的短脉冲持续时间还影响初始光谱的光谱带宽。因此,根据本发明的另外的优选变型,初始光谱具有覆盖至少一个频率倍频程,特别优选的至少两个频率倍频程的光谱带宽。因此促进了检测样品的特定分子指纹。

[0047] 优选地,光谱带宽覆盖中红外(MIR)范围。根据本发明的特别优选的实施例,初始光谱涵盖以下波长范围,所述波长范围包括至少5μm,特别地优选至少3μm和/或至多15μm,特别地优选至多30μm的波长。这些波长范围相应于涵盖受研究样品的光谱响应特征的频率范围。由于高辐射功率和有机分子的强振动/旋转吸收带,因此特别是3μm至10μm、3μm至20μm或3μm至30μm的MIR波长范围激光光谱提供了定量检测最小浓度的成分的优点。

[0048] 作为本发明的另外的优点,fs激光源装置可包括能够提供以下的任何可用的激光源设备,即能够提供具有根据本发明的特定应用所选取的功率和光谱和时间特征的,优选具有上述脉冲特性中的至少一个的fs探测光脉冲。根据本发明的优选实施例,fs激光源装置包括驱动源和差频生成(DFG:difference frequency generation)单元的组合,所述驱动源产生驱动脉冲(基波),所述差频生成单元适于通过驱动脉冲的脉冲内频率差产生探测光脉冲。

[0049] 驱动源是激光源,发射具有例如低于1ps,优选低于500fs的持续时间的驱动脉冲。驱动脉冲包括经受脉冲内DFG的频率分量,导致与驱动脉冲相比,光谱范围内扩大量数的频率分量,降低的频率(增加的波长)。DFG输出的功率与驱动脉冲的输入强度的平方成比例。作为通过DFG生成探测光脉冲的本质优点,探测光脉冲的时间结构在驱动脉冲的时间结构上得到改善。最终出现在驱动脉冲的时间结构中的伴峰被非线性DFG处理抑制。探测光脉冲的无伴峰时间结构对于在检测光谱样品响应中降低SNR具有特别的优点。可选地,用fs激光源装置,例如用驱动源和DFG单元的组合产生的fs探测光脉冲,可经受用于抑制时间结构中残留伴峰的另外的脉冲清除技术。另外,可使用DFG工艺,其包括再循环增强腔中的基本脉冲,从而导致几瓦特相干宽带MIR辐射探测光脉冲以数量级地超过现有技术MIR源的性能。

[0050] 有利地,多个驱动源是可用的,其可被包括在fs激光源装置中。优选地,驱动源包括光纤激光器和盘形激光器(例如Yb-YAG盘形激光器或Ho-YAG盘形激光器)中的一种。这些类型在提供具有高功率和重复率的驱动脉冲方面具有优点。作为示例,Yb-YAG盘形激光器是包括Yb-YAG盘的激光振荡器,所述激光振荡器通过克尔透镜锁模产生驱动脉冲,其中心波长为1030nm,重复率为100MHz,脉冲持续时间为300fs,所述激光振荡器允许产生具有低于20fs的脉冲持续时间和5μm至15μm的光谱宽度的探测光脉冲。作为另外的替代方案,fs激光源装置可包括另一个振荡器-放大器组合,例如MOPA(主振荡器功率放大器:master oscillator power amplifier)激光系统,所述MOPA激光系统通过非线性晶体中生成光学参量来产生探测光脉冲。

[0051] 发射中心波长等于2μm或大于2μm的驱动脉冲的驱动源,特别是克尔透镜锁模Ho-YAG盘形激光器,在增加探测光脉冲的带宽和平均功率方面具有特别的优点。与例如Yb-YAG盘形激光器相比,光子能减少,从而降低了DFG单元中非预期的双光子吸收的风险。因此,可减小DFG单元的光学非线性晶体的厚度,使得增加的带宽可用于DFG处理的相位匹配。特别

地,使用平均波长等于或大于 $2\mu\text{m}$ 的驱动脉冲允许在DFG单元中提供DFG晶体,所述DFG晶体具有的厚度使得由DFG工艺产生的探测光脉冲具有在 $3\mu\text{m}$ 到 $30\mu\text{m}$ 的范围内的带宽。

[0052] 术语“光谱响应”是指样品对用探测光脉冲照射的任何响应,这导致探测光脉冲的光谱变化。有利地,可感测不同类型的光谱响应,其可根据样品的可用的测量几何和/或条件来选择。根据本发明的优选应用,光谱响应包括样品的吸收光谱和反射光谱中的至少一个。优选地,用透明样品、例如透明液体收集吸收光谱,而优选地用固体、非透明样品收集反射光谱。可选地,可通过调整检测几何来测量吸收和反射光谱。探测光脉冲的时间特征不受与样品的相互作用的影响。

[0053] 本发明不限于样品的某种物理条件。根据本发明的优选应用,样品可包括固体,例如生物细胞、细胞组、细胞培养物、或生物体的组织;液体,例如血液或其他体液、可选地稀释;气溶胶,例如从生物体有机体发出的,例如包括液滴痕迹的呼吸、气体和蒸气中的至少一种。由于本发明方法的高灵敏度,可甚至利用极度稀释的样品,如气溶胶、气体或蒸汽、和/或极小的样品(如单个生物细胞)来测量光谱响应。

[0054] 优选地,光谱测量仪器包括被配置用来容纳样品的样品保持装置。所述样品保持装置具有以下形状和结构,所述形状和结构根据待研究的样品的条件进行选择。根据优选示例,用于容纳固体或液体样品的样品保持装置可包括如进行常规光谱测量所述使用的小容器。如果探测光脉冲与样品,例如与气相样品或稀释的液体的相互作用较弱,那么可能需要探测光脉冲多次通过样品来提高SNR。这可通过将样品设置在多程室中来实现。所述多径单元可被包括在波束路径中以显著地提高SNR。作为替代的可能的改进,样品可布置在增强腔中。增强腔可提供具有显著更小体积的大路径长度,充分地改进有效收集有关气体样品。另一方面,在凝聚阶段,吸收物质的密度高出许多数量级。因此,吸收长度短,通常为一毫米中的一小部分。在这种情况下,样品保持装置被配置成用于将优选具有等于或低于 $1\text{mm}$ 的厚度的层状样品,容纳在例如层厚度低于 $50\mu\text{m}$ ,特别是低于 $20\mu\text{m}$ 的层状小容器中。固体或液体样品可以大孔径的亚毫米薄片的形式制备而存放在薄IR-透射性基底之上(在固体样品的情况下)或夹在两个IR-透射性基底之间(在液体样品、如血液或唾液的情况下)。根据另外的替代方案,样品保持装置可适用于探测光的全反射,从而获得渐逝波与样品的相互作用。

[0055] 可选择被照射的样品种体积的横向尺寸以最大化SNR,特别是在凝相样品中:指示疾病的物质通常以非常低的平均浓度存在。然而,它们的浓度在受影响的细胞中可能是明显的。因此,通过将探测光脉冲束紧紧聚焦以接近指示疾病的细胞(指示剂)的尺寸并扫描激光束穿过样品的孔径,可显著增强SNR。以这种方式,指示剂数量与被照射的样品种体积中的健康细胞数量的比率被最大化,因此SNR也被最大化。

[0056] 应注意的是,对于实现本发明,样品保持装置不是严格必需的。在本发明测量样品的光谱响应期间,样品可被包括在生物体或技术工艺或环境条件下。特别地,可通过直接照射生物体的一部分、例如皮肤或呼吸,以及通过检测吸收或反射中的光谱响应,来检测细胞或组织的光谱响应。

[0057] 可使用各种光谱技术用于光谱解析检测与样品相互作用后的探测光脉冲。检测器装置可包括分散元件的组合,例如单色仪和传感器被布置用于光谱响应数据的串行收集,而优选地是利用光谱响应数据的并行收集进行检测。标准的方法是如广泛用于获取分子吸收光谱所使用的,例如傅立叶变换红外光谱(FTIR:Fourier-transform infrared

spectroscopy)。结合平衡检测并用双频梳实现(可从单个激光源获得,参见参考文献[14]),它允许快速测量透过样品的或由样品反射的宽带探测光脉冲的光谱分量的幅度的小变化。

[0058] 根据本发明的优选实施例,检测步骤包括探测光脉冲的时域采样用于获得其时间形状与时间形状的傅里叶变换。有利地,探测光脉冲的时间形状的傅里叶变换直接提供样品的光谱响应。时域采样不仅提供样品的光谱响应中的光谱分量的幅度,而且还提供光谱分量的相位信息。该相位信息携带关于光谱响应的重要补充信息、例如样品的吸收特性。时域采样包括例如电光采样(EOS:electro-optic sampling)探测光脉冲。EOS光谱提供对透过样品或由样品反射的MIR探测脉冲的电场波形的直接时间解析访问,产生-当傅里叶变换时-由透过或反射的信号中的谐振吸收而引起的幅度和相位上的光谱变化。

[0059] 作为附加的优点,时域采样提供了对光谱响应的无背景测量。在时域中,分子跃迁的窄吸收线在发射信号中引起了主脉冲后的长波。由于(i)其与输入辐射(探测光脉冲)的完全时间分隔限于由吸收引起的拖尾信号的长度/持续时间的瞬间,和(ii)在时域采样中,特别是EOS中的时间解析检测,因此该尾部包含有关吸收线的所有(幅度和相位)信息,并且可针对零背景进行测量。

[0060] 根据本发明的特别优选的应用,待研究的样品包含来自人或动物生物体的生物样品。测量样品的光谱响应以获得关于生物体的诊断相关信息。术语“诊断相关信息”是指可用于提供或验证医学诊断的,关于样品,特别是其组成,与参考样品相比的差异,或样品的随时间变化的任何信息。因此,根据本发明的优选实施例,测量方法包括评估样品的光谱响应的步骤,以获得诊断相关信息。在装置特征方面,光谱测量仪器的优选实施例优选地包括适于处理光谱响应并提供诊断相关信息的计算装置。有利地,诊断相关信息可输出给本发明技术的用户、例如医生。随后,用户可考虑诊断相关信息来提供诊断。

[0061] 本发明在诊断中的应用具有以下特别优点。本发明允许在所有可能的样品相:气体、液体、固体和气溶胶中确定疾病的光谱轨迹。发明人已经发现,与常规技术相比,本发明能够访问指示疾病的化合物的整个分子指纹,因此提供了能够检查所有与身体的健康状况相关的气体、流体和固体的普遍适用的技术。用飞秒激光器实现,可提供样品的加热或消融(指甲、头发、皮肤、血液、尿液等),以允许在气相中进行测量,其中可检测出由于分子结构中的变化而导致的线强度或位置的最小变化。作为突出的应用示例,通过本发明可分析和利用(例如通过类似于[15]中所述的仪器)血液中含有的由癌变细胞释放的不稳定有机化合物用于早期癌症检测。由于其高速度,本发明允许在短时间尺度上进行时间依赖性测量,重要的是当在不同时刻释放化合物时。光谱仪的快速运行也可有利于手术期间的快速蒸发光谱法([16])。

[0062] 这种诊断方法完全没有任何风险,一旦被批准,则完美地适用于早期(即频繁)筛查各种慢性疾病。由于其非创伤性本质,它将有助于持续监测治疗,提供关于其功效的重要信息。该方法可显著减少医疗诊断所花费的时间和精力,以及减少患者的不便。其可应用于广泛的疾病,例如肺病、各种癌症、肾功能障碍和代谢紊乱。本发明中提出的诊断技术的速度、便利性和相对低的成本使其适合于大量人群的常规检查,从而可改善整个人群的健康状况。如果光谱响应足以基于具体指纹识别样品中的单个物质的存在,则不需要化学上分析样品中的单个物质。

[0063] 有利地,光谱响应评估可包括可单独地或组合地实现的各种测量。根据第一变型,诊断相关物质可基于改变后的光谱中出现的具体的光谱带(位置、幅度和/或相位)来识别。为此,计算装置可包括适于分析改变后的光谱中的特定频带的出现和特征的滤波器单元。

[0064] 根据另外的变型,评估步骤可包括将改变后的光谱的至少一部分与先前用同种受研究的对象的另一样品所收集的存储的样品响应进行比较的步骤。换句话说,可收集改变后的光谱的时间序列,并且可通过识别改变后的光谱的时间序列中的具体变化来获得诊断相关信息。为此,计算单元可包括第一比较单元,该第一比较单元适于将当前检测的改变后的光谱的至少一部分与先前检测的至少一个存储的样品响应进行比较。

[0065] 根据又一变型,评估步骤可包括将改变后的光谱的至少一部分与其他对象的参考数据进行比较的步骤。其他对象可包括例如健康或非健康的生物体,参考数据可分别代表健康或疾病状态的光谱响应特征。因此,计算单元可包括第二比较单元,所述第二比较单元适于将当前检测的改变后的光谱的至少一部分与参考数据进行比较。特别地,可对从患者处提取的大量样品进行测量,并与从健康人处收集获得的相应数据进行比较。两组之间的统计学上的显着差异将允许建立可靠的受观察疾病的指示。对患者样品的仔细统计分析,例如使用主成分分析(PCA:principal components analysis),然后将允许在短时间内确定关于他/她的状况的诊断相关信息。

[0066] 本发明的特别优选的特征可总结如下。(a)以在将超过MIR同步加速器源的几个数量级的功率级别上生成涵盖 $3\mu\text{m}$ 至 $30\mu\text{m}$ 的整个分子指纹区域的飞秒多倍频程MIR连续体,和(b)由于使用低噪声检测器测量VIS/NIR采样信号,以超过现有技术的FTIR光谱仪几个数量级的灵敏度和信噪比,使用其进行无背景测量完全吸收引起的信号(包括幅度和相位信息),构成了本发明提供的关键创新。有利的是,本发明可与用于噪声抑制和快速数据采集(诸如分别为平衡检测和双梳状照明)的成熟的技术相结合,将会首次在单次测量中提高对完整的振动分子指纹的记录。

## 附图说明

[0067] 下文参照附图描述本发明的其它优点和细节,附图如下:

[0068] 图1:根据本发明的光谱测量仪器的第一实施例;

[0069] 图2:根据本发明的光谱测量仪器的其它实施例的特征;

[0070] 图3:用于感测样品的光谱响应的电光采样的示意性图示;

[0071] 图4:包括样品的光谱带的改变的探测光脉冲光谱的示意性图示;和

[0072] 图5:用于检测样品的光谱响应的无背景感测时间尾部的图示。

## 具体实施方式

[0073] 下文中示例性参考fs激光源装置的特定示例并且应用电光采样来对本发明的优选实施例进行描述。要强调的是,本发明不限于所描述的实施例。特别地,可改变fs激光源装置以提供本说明书中详述的探测光脉冲。另外,EOS方法可由另一光谱技术、如FTIR光谱替代。示例性参考了本发明的优选应用以提供诊断相关信息。要强调的是,本发明不限于生物样品的研究,而是可用其他样品、如环境样品进行实施。

[0074] 图1示意性地示出根据本发明的光谱测量仪器100的第一实施例,其包括fs激光源

装置10、采样保持装置30、检测器装置20和计算装置40。fs激光源装置10包括驱动源11、如结合有纤维展宽级和啁啾镜式压缩机的Yb-YAG-盘形激光谐振器；和DFG单元12。驱动源11产生驱动脉冲3，例如中心波长为1030nm，脉冲持续时间为300fs，重复率为100MHz。DFG单元12包括光学非线性晶体，如基于LiGaS的晶体，其被布置用于生成脉冲内差频。探测光脉冲2是在DFG单元12处的输出，所述探头光脉冲2具有由根据驱动脉冲3的脉冲内频率分量之间的差频的频率分量形成的初始光谱。根据所述示例，探测光脉冲2具有范围为3μm至30μm的初始光谱。

[0075] 样品保持装置30容纳待研究的样品1。根据优选的示例，样品保持装置包括容纳样品1的单通道或多通道小容器。样品保持装置30可包括如从常规光谱技术已知的，包括样品供应和/或热处理装置的样品保持器。

[0076] 检测器装置20通常包括近红外检测器，其被配置用于光谱解析感测由于探测光脉冲2与样品1的相互作用而具有改变后的光谱的探测光脉冲2'。优选地，检测器装置20适于使用例如FTIR技术或EOS技术并行收集光谱响应数据(见图2)。

[0077] 计算装置40通常包括具有计算单元和可选的滤波和/或比较单元的基于微型计算机的控制。另外，计算装置40可包括具有来自健康或非健康参考对象的参考数据的数据库。用计算装置40评估利用检测器装置20检测到的光谱响应4，以提供诊断相关信息6，例如关于样品1中存在或不存在预定物质的信息。

[0078] 图2示意性地示出本发明的光谱测量仪器100的优选实施例的另外的特征，所述光谱测量仪器100包括fs激光源装置10、样品保持装置30、检测器装置20和计算装置40。图2的实施例适于对与样品1相互作用之后的探测光脉冲2'的时间形状进行电光采样。为此，fs激光源装置10包括半透明分束器元件13、例如半透明分束镜，所述半透明分束镜将驱动脉冲3的一部分作为采样脉冲5经由延迟线14引导到检测器装置20。检测器装置20被配置成用于使用采样脉冲5对探测光脉冲2'的时间形状进行电光采样(见图3)。

[0079] 可选地，可提供另一个分束器元件15、例如半透明分束镜，如图2中的虚线所示，其将驱动脉冲3的一部分引导到样品1。驱动脉冲3的这一部分可用于脉冲加热液体或固体样品，使得样品物质被烧蚀并转化成气相，被探测光脉冲3照射。该烧蚀技术可应用于从生物体，即生物体的外部获取的样品。

[0080] 图3示出电光采样探测光脉冲2'的时间形状的另外的细节。用驱动源11生成的NIR驱动脉冲3被分成两部分。主要部分(>功率的90%)经由固定延迟线16偏转到DFG单元12。固定延迟线16被布置用于补偿采样脉冲5的增加的光束路径长度。利用DFG单元12，驱动脉冲3被转换成具有宽带中红外(MIR)特性的探测光脉冲2。探测光脉冲2通过吸收样品1，然后它们被引导到检测器装置20的电光晶体21。电光晶体21是光学非线性晶体、例如具有 $x^2$ 非线性的GaSe。

[0081] 驱动脉冲3的另一部分作为采样脉冲5经由可移动延迟线14被引导到电光晶体21。具有改变后的光谱的探测光脉冲2'和采样脉冲5以不同时间延迟地在电光晶体21处叠加。通过电光晶体21的采样脉冲5的偏振状态由探测光脉冲2'的电场改变。通过利用延迟驱动单元(未示出)改变两个脉冲之间的延迟，探测光脉冲2'在电光晶体21处被采样。具有改变的偏振状态的采样脉冲5通过沃拉斯顿棱镜22将具有采样脉冲5的两个正交极化偏振分量的子脉冲5.1和5.2分离。携带不同偏振分量的子脉冲5.1和5.2由包括例如光电二极管的检

测器元件23和24感测。协调,即校准检测器元件23和24使得检测器元件23和24的检测器信号之间的差与探测光脉冲2'的电场成比例。因此,在使用可移动延迟线14改变相互延迟的情况下,检测器信号差直接提供探测光脉冲2'的时间形状。

[0082] 时间形状的傅里叶变换,即检测器信号差的傅里叶变换产生如图4和图5所示的,样品1的光谱响应。如从EOS方法的常规应用中已知的那样,可由控制单元实现控制延迟驱动单元改变延迟线14处的相互延迟,校准检测器元件23、24的检测器信号,收集检测器信号,以及计算傅立叶变换。控制单元可作为单独的电路(未示出)或计算单元40(参见图1、2)的一部分来实现。

[0083] 图4和图5分别示出使用EOS方法获得的频域光谱和时域信号的示例。图4中,在通过吸收样品之后,显示出探测光脉冲2'(MIR激光光谱)的在500至2000cm<sup>-1</sup>的频率范围(波长范围20μm至5μm)内的改变后的光谱。为说明原理,仅示出两条吸收线7。电光采样随后生成脉冲的在时域中的场,这实质上是光谱的傅里叶变换,如图5A所示。它包括一个所谓的中心突发脉冲8,所述中心突发脉冲8相当于探测光脉冲的宽的初始光谱;随后是由于窄的吸收线7造成的长尾部9。图5B未按比例示出具有中心突发脉冲8的信号,以显示尾部9的特征。有利的是,该信号的傅里叶逆变换是复数,不仅包括如普通傅里叶变换光谱中的吸收线7的功率谱,而且还包括光谱相位。所示的脉冲以20ps的时间延迟进行采样,这等于1.7cm<sup>-1</sup>的光谱分辨率。两个图的垂直刻度都是任意单位。

[0084] 图5示出根据本发明的无背景测量。由于是在中心突发脉冲结束后对时间范围进行采样,那么检测是在零背景,即没有由探测光脉冲引起的噪声,的情况下实现的。用具有ps范围内的脉冲持续时间的宽带同步加速器照射无法获得这种优势。因此,光谱带的时间形状的尾部将被同步加速器探测光叠加。

[0085] 在傅里叶变换被采样的时间形状之后,可进一步处理样品1的光谱响应以获得诊断相关信息6(参见图1、2)。该进一步的处理可由计算装置40完成。吸收线7的光谱特征可通过光谱响应进行滤波处理来获得。可识别人的健康状况的化合物特性的特定频带。另外,可将光谱响应与先前用相同生物体收集的数据和/或用其他的、健康或非健康对象收集的参考数据进行比较。

[0086] 本发明的公开于上文描述、附图和权利要求中的特征,其单独地以及组合地或子组合地,对于实现本发明的各种实施例具有重要意义。

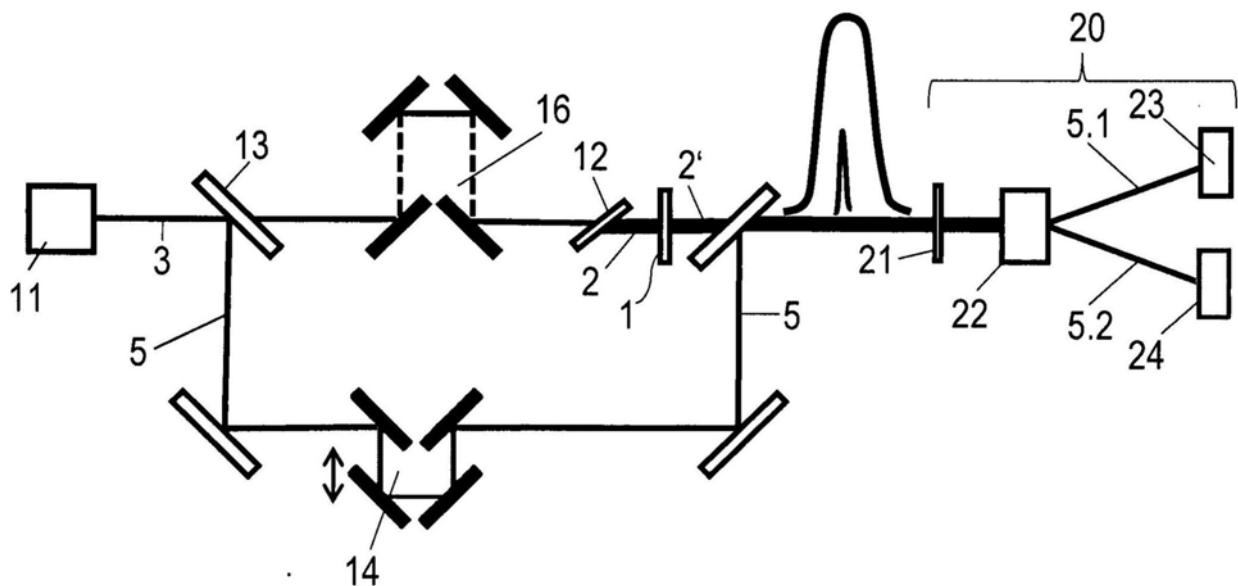
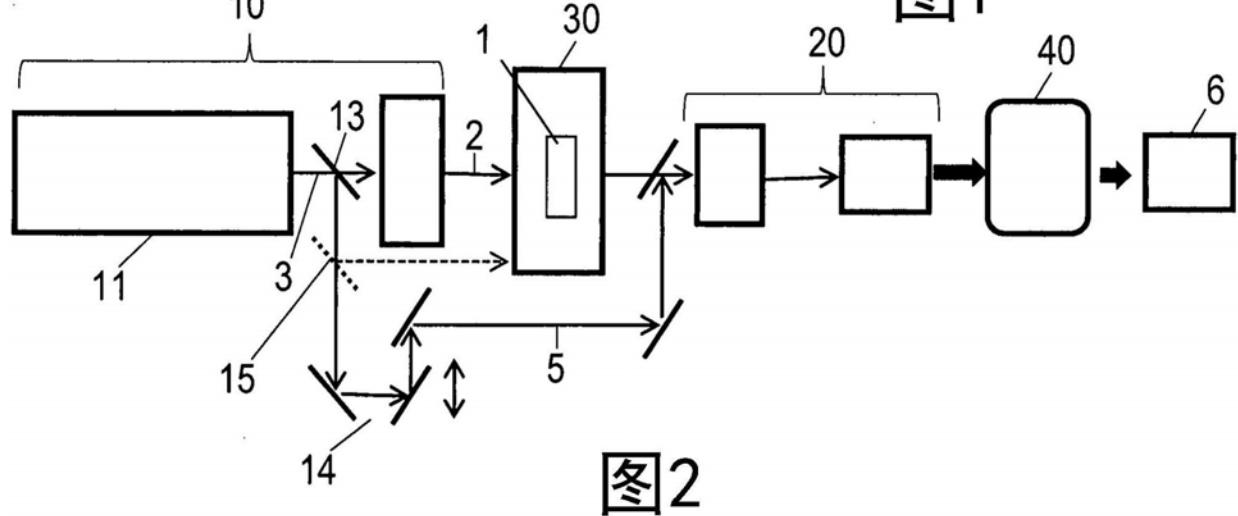
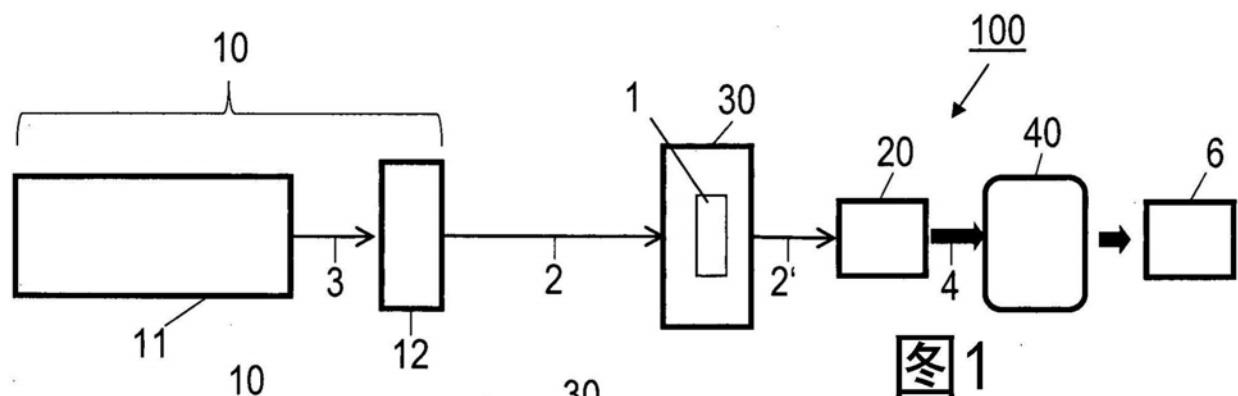


图3

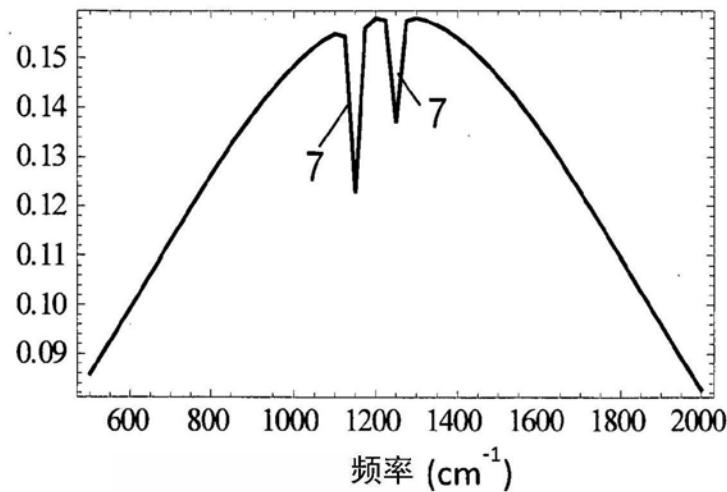


图4

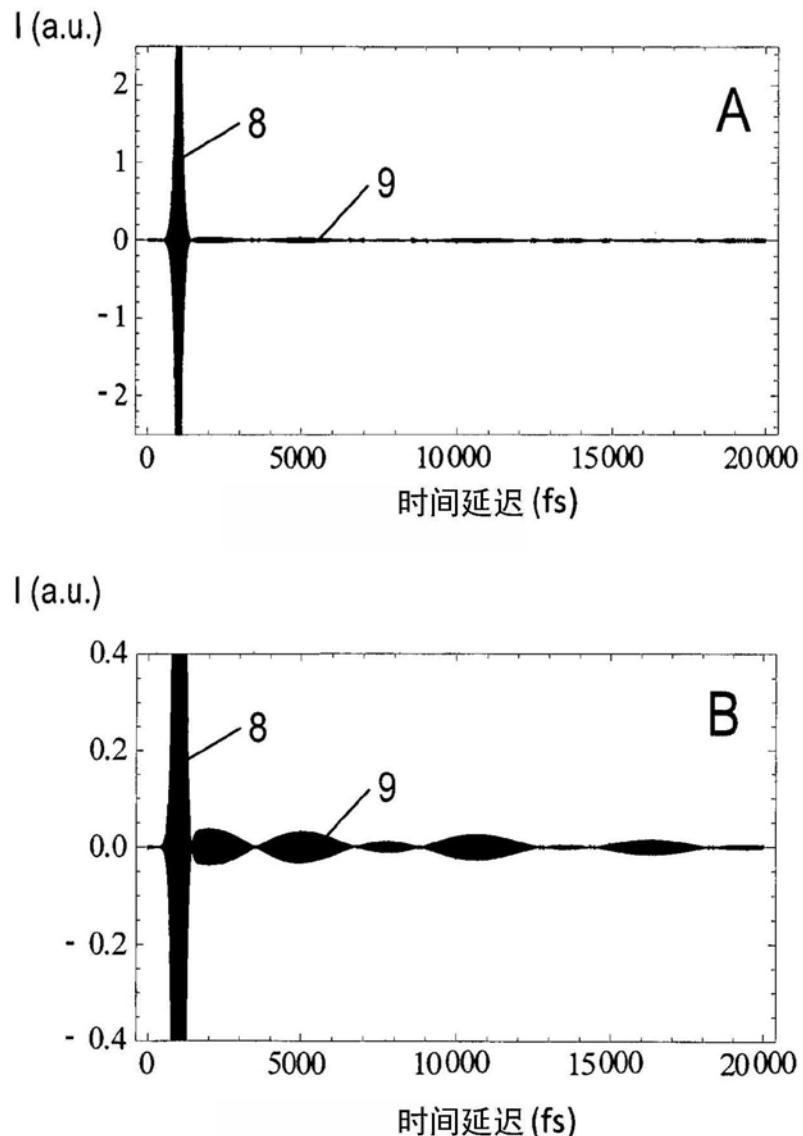


图5