

激光诱导击穿光谱定量分析全血中的锂元素

任文心¹, 杨亮², 赵韩³, 王奕朦¹, 黄达¹, 戴鑫华⁴, 林庆宇¹

(1.四川大学机械工程学院, 成都 610065; 2.成都艾立本科技有限公司, 四川省成都市 611930; 3.四川大学华西临床医学院, 成都 610041; 4.四川大学华西医院实验医学科, 成都 610041)

摘要: 锂盐作为治疗重性抑郁障碍的药物, 长期服用存在中毒风险, 因此对患者血液中锂元素浓度进行实时监测至关重要。激光诱导击穿光谱(Laser-induced breakdown spectroscopy, LIBS)技术因其快速分析能力, 被广泛应用于元素分析。将 LIBS 技术与偏最小二乘法(Partial least squares, PLS)结合, 针对 45 组临床血液样品进行了锂元素的定量分析。在血浆和全血基质下分别构建了 PLS 定量模型, 并通过五折交叉验证优化了模型参数。结果显示, 基于血浆基质的模型预测性能更佳, 预测决定系数为 0.992, 预测均方根误差为 0.204 $\mu\text{g/mL}$, 相对标准误差为 2.14 %。LIBS 技术为临床血锂的快速检测评估提供了一种新的可能, 具有良好的应用前景。

关键词: 激光诱导击穿光谱; 血液; 锂元素; 定量分析; 偏最小二乘法

Quantitative Analysis of Lithium Element in Whole Blood Using Laser-induced Breakdown Spectroscopy

REN Wenxin¹, YANG Liang², ZHAO Han³, WANG Yimeng¹, HUANG Da¹, DAI Xinhua⁴,
LIN Qingyu¹

(1.School of Mechanical Engineering, Sichuan University, Chengdu 610065, China; 2.Chengdu Aliben Science & Technology Co., Ltd., Chengdu 61930, China; 3.West China School of Medicine, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 4.Department of Experimental Medicine, West China Hospital of Sichuan University, Chengdu 610041, China)

Abstract: Lithium salts, used as a treatment for major depressive disorder, pose a risk of toxicity when administered chronically, making real-time monitoring of lithium concentrations in patients' blood essential. Laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS), known for its rapid analytical capabilities, is widely used in elemental analysis. By combining LIBS technology with Partial Least Squares (PLS), quantitative analysis of lithium was conducted on 45 clinical blood samples.

PLS quantitative models were constructed separately for plasma and whole blood matrices, and model parameters were optimized through five-fold cross-validation. The results showed that the model based on the plasma matrix exhibited superior predictive performance, with a predictive coefficient of determination of 0.992, a predictive root mean square error of 0.204 $\mu\text{g/mL}$, and a relative standard error of 2.14%. LIBS technology offers a new possibility for rapid detection and assessment of clinical blood lithium, with promising application prospects.

Keywords: Laser-induced breakdown spectroscopy; Blood; Lithium element; Quantitative analysis; Partial least squares

血液快速检测是药物代谢监测的重要途径^[1]。锂 (Li) 盐是一种常用的情绪稳定剂, 被广泛用于双向情感障碍的临床治疗。然而, Li 盐的治疗用药剂量和中毒量相接近, 且副作用强, 不同患者个体对药物的敏感差异影响较大, 在临床中很难把控用药剂量^[2]。因此, 持续准确地监测患者血锂水平, 对及时发现 Li 中毒, 指导临床有效用药以及确保用药安全有至关重要的作用。当前, 对血锂的临床检测方法主要以原子发射光谱法和原子吸收光谱法 (Atomic absorption spectroscopy, AAS)^[3]。然而这些方法需要对全血临床样本进行酸化分离及化学消解, 普遍存在分析流程复杂、检测实验耗时久, 对血锂含量的快速、便捷监测能力不足^[4]。因此, 为确保患者用药的安全有效, 及时掌握血锂代谢水平, 研发更加简单快速的血锂水平检测方法至关重要。

激光诱导击穿光谱 (Laser-induced breakdown spectroscopy, LIBS) 是一种基于激光剥蚀产生等离子体发射光谱的元素分析技术, 被广泛用于食品检测、能源检测^[5]、海洋探测^[6]和生物学^[7]等多个领域, 具有分析速度快、无需复杂样本预处理等显著特点^[8], 可完成低取样量下的实时分析^[9]。对血液基质的快速检测是目前该技术研究热点之一, 尤其是集中在对血液中肿瘤标识物和血源性疾病的检测识别^[10]。Cheung 等^[11]首次采用 LIBS 测定了人血细胞中的 K 和 Na, 其结果的相对标准偏差小于 9%; Chu 等^[12]通过 LIBS 对不同患者血液样本进行直接分析, 结合极限学习机和随机森林算法诊断鼻咽癌, 准确率高达 98.33%; Berlo 等^[13]采用 LIBS 和机器学习相结合来区分 SARS-CoV-2 阳性和非阳性的供体血清, 准确率达到 95%。Feng 等^[14]使用便携式 LIBS 仪器快速定量分析血清中 K、Na 和 Ca 等电解质元素, 结果表现出极好的线性预测精度, 进一步证实 LIBS 仪器将是实时临床实践的优秀工具。LIBS 技术和机器学习算法相结合, 可快速获得复杂基质光谱数据和准确的定量结果, 从而提高对疾病发展的诊断能力, 辅助临床治疗。

本研究建立一种基于无需对临床血液样品进行复杂预处理的血锂浓度 LIBS 快速检测新方法, 在分析过程中无需离心分离, 可直接对全血进行分析, 结合偏最小二乘法 (Partial least squares, PLS) 建立 Li 元素的定量模型, 进而实现快速准确预测未知样品的血锂水平, 为未来临床床旁检测提供一种简便高效的新方法。

1 实验和材料

1.1 仪器与试剂

便携式激光诱导击穿光谱仪 (LIBS-Tracer, 成都艾立本科技有限公司); 原子吸收光谱仪 (PinAAcle 900T, 美国 PerkinElmer 公司)。

采血卡 (FAT 标准卡, Whatman, UK); 锂标准溶液 (GSB 04-1734-2004, 1000 $\mu\text{g/mL}$); 硝酸 (苏州晶锐化学有限公司); 双向情感障碍患者血液样本收集自四川大学华西医院。

1.2 实验装置

本研究所使用仪器为便携式激光诱导击穿光谱仪, 其工作原理示意如图 1 所示。该仪器采用 Nd:YAG 激光器, 波长为 1064 nm, 脉冲重复频率为 1 Hz, 脉冲能量为 100 mJ。仪器在 180~800 nm 波长范围内能提供 0.1 nm 的光谱分辨率。样品放置在 XYZ 三维样品台上, 通过激光剥蚀产生等离子体, 光纤探头接收等离子体中的光谱信号并传输至光谱仪, 光谱仪通过控制系统实现外触发同步。光谱仪延迟时间设置为 1.5 μs 。

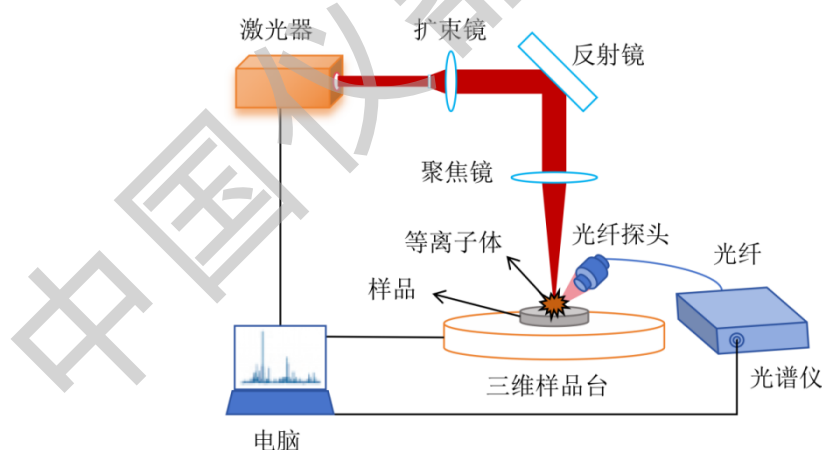


图 1 激光诱导击穿光谱装置示意图

Fig.1 Schematic diagram of laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS) device

1.3 实验方法

本研究对不经分离消解等预处理的全血样本进行分析, 随机抽取 45 例双向情感障碍患者的血液样本为研究对象, 所有患者均根据医嘱用药, 用药时间均在 1 个月以上。抽取患者

EDTA-K2 抗凝静脉血，取血时间为末次服药后 12 小时，采用临床常用的血卡为基底材料，将血卡粘贴在四氟乙烯底板上制成样品板。取 2.0 μL 血液样品滴加在血卡上，用卤素灯快速烘干 ($\sim 1 \text{ min}$)，干燥后形成圆点状血斑，在每个血斑样品表采集光谱数据。为减小激光能量波动对定量结果的影响，每个谱图分别由 5 次重复测量的光谱平均所得，每个血斑样品均随机选取 65 个不同位点的光谱分析。采用原子吸收标准方法分别对全血样本和经分离处理后的血浆样本进行分析，用于结果的对比分析。实验过程如图 2 所示。本研究符合《赫尔辛基宣言》，并获得了四川大学华西医院伦理委员会批准。

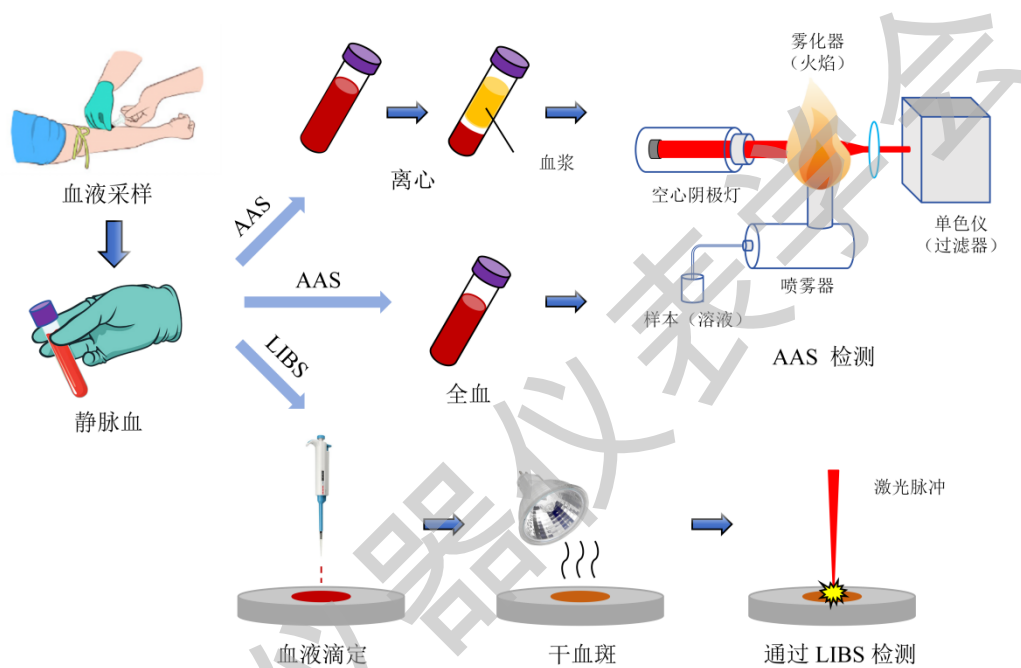


图 2 血锂检测样品制备步骤及整体实验流程

Fig.2 Preparation steps of sample and overall experimental procedures for blood lithium detection

2 结果与讨论

2.1 定量模型构建的参数优化

从全血样本的 LIBS 光谱图中可以看出 (见图 3)，血液中的 Mg、Ca、K、Na 和 Li 等元素的特征谱线清晰可见，LIBS 对全血样本的定性分析能力突出。然而，Li 位于 670.776 nm 和 670.791 nm 处的两条特征发射谱线自身相互重叠，位于 610.354 nm 和 610.365 nm 处的另外两条特征谱线与 Ca 610.272 nm 处的特征谱线相互干扰，这些光谱重叠会导致单变量线性回归定量模型难以获得理想定量结果，而多变量回归模型考虑了多个解释变量之间的相互关系，综合考虑了多个因素对响应变量的影响，减少了由于忽略其他潜在因素而导致的误差，更全面地捕捉了系统的复杂性和多样性，因此，本研究以 605~675 nm 光谱带作为输入，

构建 Li 元素的 PLS 多变量回归模型, 有望更好地适应血液复杂基质下 Li 元素分析的特殊情况, 提供更可靠的分析结果。PLS 算法是在多元回归和主成分分析的基础上发展而来的一种分析方法, 尤其适用于小样本分析, 对多重共线性具有强鲁棒性。在构建 PLS 定量模型时, 随机选择 30 组血液样本的光谱数据作为训练集, 10 组血液样本作为测试集, 其余 5 组作为验证集。验证集不参与模型的训练与优化, 只用于最终检验模型的定量效果。

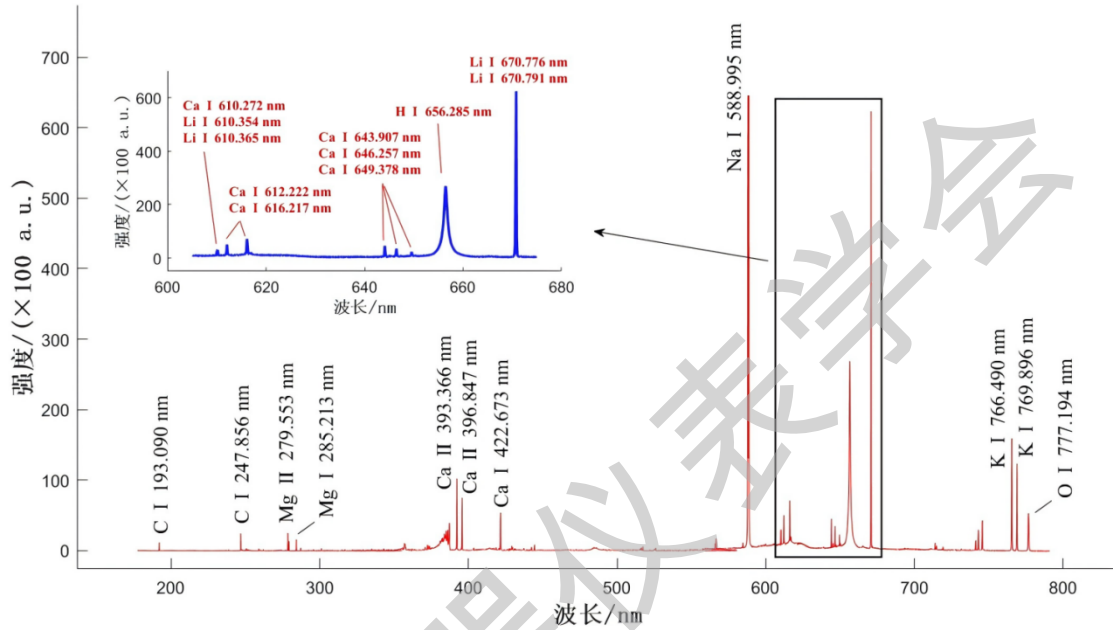


图 3 全血样品的全光谱图像以及包含 Li 元素特征谱线的光谱带区域

Fig.3 Full spectrum image of whole blood sample along with the spectral band regions containing characteristic lines of Li element

PLS 算法的参数优化对定量模型性能提升至关重要, 合适的参数能够提高模型的准确性和鲁棒性。潜变量个数是影响 PLS 模型定量效果的关键因素, 最佳潜变量数的优化可以有效防止过拟合, 提高模型的泛化能力。本研究在低样本量的情况下, 选择 5 折交叉验证方法进行潜变量优化, 通过计算交叉验证均方根误差 (Root mean square error of cross validation, RMSECV) 后选择最小值所对应的数值确定最佳潜变量数。均方根误差和总的均方根误差平均值 RMSECV 的计算公式如下:

$$RMSEV_i = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^n (y_j^i - \hat{y}_j^i)^2}{n}} \quad (1)$$

$$RMSECV = \frac{\sum_{i=1}^5 RMSEV_i}{5} \quad (2)$$

其中, y_j^i 和 \hat{y}_j^i 分别表示第 i 折交叉变量第 j 个样本的实际含量和预测含量; n 为每一折交叉验证时验证集样本的数量。

图 4 展示了潜变量个数在 1~23 范围内的 Li 元素含量 PLS 定量模型交叉验证结果。由图 4 可知, 基于血浆样品中 Li 元素含量所建立的 PLS-血浆 (PLS-Plasma) LIBS 模型和基于全血样品中 Li 元素含量所建立的 PLS-全血 (PLS-Whole Blood) LIBS 模型均在潜变量数为 6 时达到了最低的 RMSECV 值 (分别为 0.5877 和 0.5672), 故优化 PLS 算法中潜变量数为 6。

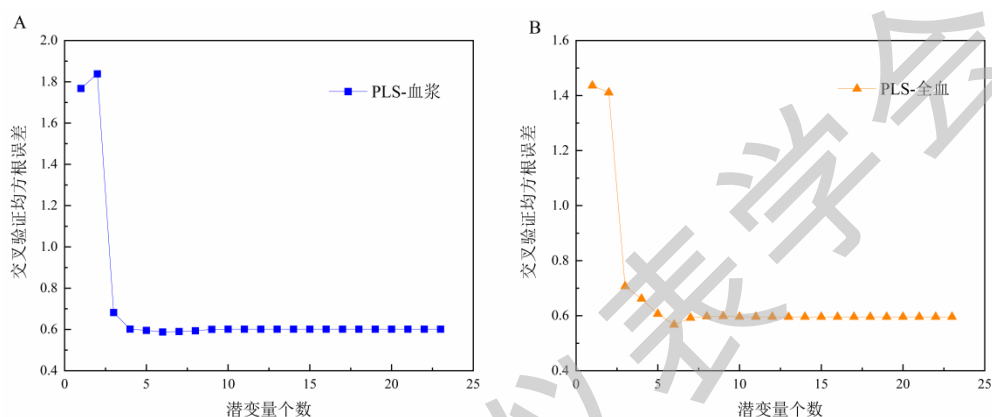


图 4 基于偏最小二乘法 (PLS) 构建的 (A) PLS-血浆 LIBS 模型和 (B) PLS-全血 LIBS 模型在不同潜在变量数下交叉验证的均方根误差 (RMSECV)

Fig.4 Root mean square error (RMSECV) of cross-validation of (A)PLS-Plasma LIBS model and (B)PLS-Whole Blood LIBS model based on partial least squares (PLS) with different numbers of latent variable

2.2 定量模型构建及评估

分别以血浆中 Li 元素含量为血锂浓度定标值构建 PLS-血浆模型和以全血中 Li 元素含量为血锂浓度定标值构建 PLS-全血模型, 所得到的定标曲线如图 5 所示, 结果显示 PLS-血浆模型的预测决定系数达到 0.9923, PLS-全血模型的预测决定系数为 0.9844。

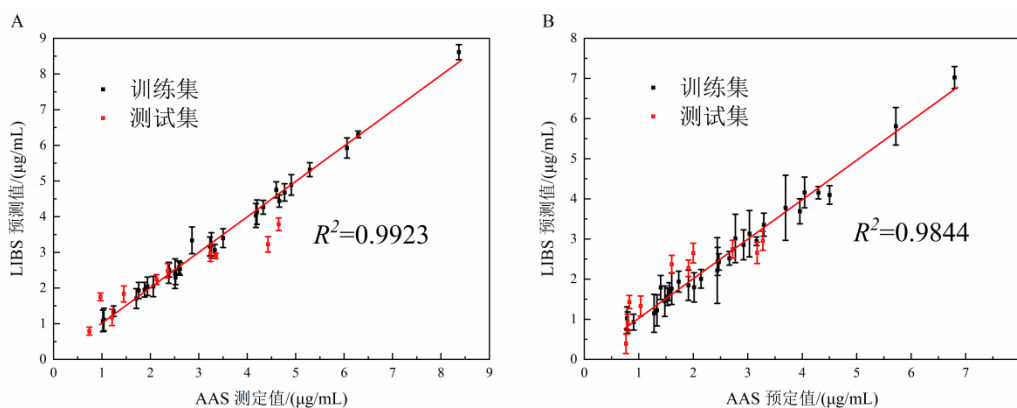


图5 (A) PLS-血浆和 (B) PLS-全血定量模型的预测结果

Fig.5 Prediction results of (A) PLS-Plasma and (B) PLS-Whole Blood quantitative models

为进一步评估模型的准确性和有效性，以预测均方根误差（Root mean square error of prediction, RMSEP）和测试集的相对偏差（Relative standard deviation, RSD）作为评价指标，对模型预测结果进行准确性及精密度评价，其计算公式如下：

$$RMSEP = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)^2}{N}} \quad (3)$$

$$RSD = \frac{1}{\bar{y}^{\text{test}}} \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i^{\text{test}} - \bar{y}^{\text{test}})^2}{n-1}} \quad (4)$$

其中， y_i 和 \hat{y}_i 分别表示第*i*个样本中Li元素的实际含量和所有预测的平均浓度；*N*为训练集样品数目；*n*为同一个样品的光谱数量； y_i^{test} 和 \bar{y}^{test} 分别表示测试数据集第*i*张谱图中Li元素的预测含量和所有预测含量的平均值。

根据计算，PLS-血浆模型的RMSEP值为0.204 µg/mL，PLS-全血模型的RMSEP值为0.728 µg/mL；PLS-血浆模型定量结果的RSD值为2.14%，PLS-全血模型定量结果的RSD值为3.45%。本方法中以血浆测试为定标值的PLS算法体现了高的决定系数，对实际数据的拟合程度较好。PLS-血浆模型相较于PLS-全血模型获得了更优的预测决定系数、更低的RMSEP以及更小的测试集样品的RSD。因此，基于血浆定标值所建立的LIBS模型对全血中锂元素定量分析效果更佳，尤其是表现出了优异的定量精度和稳定性。在实验过程中，血液样本暴露在空气中会发生氧化或分解，且血液中的血细胞可能会随着时间变化而发生凝聚或沉降，这些因素都会或多或少地影响血液样本的稳定性，从而导致不同时间测定样品会产生较大差异。

2.3 定量模型的应用验证

选定未参与 PLS 定量模型训练的剩余 5 组血液样本，进行定量模型性能应用验证，并将预测的 Li 元素含量值通过标准方法 AAS 测量结果进行对比分析，结果如表 1 所示。

表 1 PLS 定量模型的应用验证结果与原子吸收光谱 (AAS) 结果比较

Table 1 Comparison of application validation results of PLS quantitative model and atomic absorption spectroscopy (AAS) results

序号 No.	血浆中 Li 含量的测定结果		全血中 Li 含量的测定结果	
	Detection results of Li in plasma/($\mu\text{g/mL}$)		Detection results of Li in whole blood/($\mu\text{g/mL}$)	
	AAS	LIBS	AAS	LIBS
1	2.51	2.49	1.943	1.984
2	3.50	3.62	2.865	2.976
3	3.91	4.11	3.507	3.445
4	4.12	4.26	3.394	3.421
5	4.66	4.65	3.346	3.499

由表 1 可知，无论是 PLS-血浆模型还是 PLS-全血模型，对于血液中 Li 元素浓度预测结果的误差都较小。这说明 PLS 模型在处理 LIBS 数据时能够准确地分析样本中 Li 元素含量变化，表现出较好的定量预测性能。本研究初步验证了 LIBS 技术测定血液中 Li 元素浓度的可行性，在后续工作中将继续研究样本中的特定特征，探索模型性能在不同样本之间的差异，提高模型的泛化性和预测准确性。

3 结论

本研究以临床血液样本为实验对象，在较低的取样量下，通过 LIBS 技术结合 PLS 算法构建了血锂定量模型，并对比了基于血浆及全血两种定标值的模型差异。相较于当前临床中所用的检测技术，LIBS 技术具有快速便捷的技术优势，有望实现床旁检测，在快速检测血液 Li 元素含量中具有良好的应用前景。本研究为未来 LIBS 技术在医学检测方面的应用提供了参考，后续将深入对比不同定量算法的模型差异性，考虑不同实验条件和样本处理方式对结果的影响，并结合更大样本量的验证，进一步提高 LIBS 技术在血液成分定量方面的可靠性和稳定性，从而扩大 LIBS 技术在临床医学的应用范围。

参考文献:

- [1] Nordberg M, Nordberg G F. Trace element research-historical and future aspects[J]. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 2016, 38: 46-52.
- [2] Baldessarini, Ross J; Tondo, Leonardo; Davis, Paula; Pompili, Maurizio; Goodwin, Frederick K; Hennen, John. Decreased risk of suicides and attempts during long-term lithium treatment: A meta-analytic review. *Bipolar Disorders*. 2006, 8 (5p2): 625–39.
- [3] Lelièvre P, Sancey L, Coll J L, et al. The multifaceted roles of copper in cancer: a trace metal element with dysregulated metabolism, but also a target or a bullet for therapy[J]. *Cancers*, 2020, 12(12): 3594.
- [4] Haraguchi H. *Metallomics: Integrated Biometal Science* [M]. Ogra Y, Hirata T. Metallomics. Tokyo: Springer, 2017: 3-39
- [5] 倪明辉,李燕,易镇鑫等.激光诱导击穿光谱(LIBS)在煤质检测中的应用现状[J].*中国无机分析化学*,2022,12(04):80-88.
- [6] Fortes, F. J.,Guirado, S.,Metzinger, A.,Laserna, J. J.. A study of underwater stand-off laser-induced breakdown spectroscopy for chemical analysis of objects in the deep ocean[J]. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*,2015,30(5).
- [7] Wei L ,XiaoHe Z ,KunPing L , et al.Laser-induced fluorescence:Progress and prospective for in vivo cancer diagnosis[J].*Chinese Science Bulletin*,2013,58(17):2003-2016.
- [8] GuoLianBo,ZhangDeng,Sun Lan Xiang,Yao Shun Chun,ZhangLei,Wang Zhen Zhen,Wang Qian Qian,Ding Hong Bin,LuYuan,HouZongYu,WangZhe. Development in the application of laser-induced breakdown spectroscopy in recent years: A review[J]. *Frontiers of Physics*,2021,16(2).
- [9] 林庆宇, 段忆翔. 激光诱导击穿光谱:从实验平台到现场仪器[J]. *分析化学*, 2017,45(09):1405-1414.
- [10] 侯泽海,郭连波,汪威良等.激光诱导击穿光谱技术在生物医学中的研究进展[J].*激光与光电子学进展*, 2023, 60(24): 50-62.
- [11] Cheung, N.-H.; Yeung, E.S. Distribution of Sodium and Potassium within Individual Human Erythrocytes by Pulsed-Laser Vaporization in a Sheath Flow. *Anal. Chem.* 1994, 66, 929–936.
- [12] Chu, Y.; Chen, T.; Chen, F.; Tang, Y.; Tang, S.; Jin, H.; Guo, L.; Lu, Y.F.; Zeng, X.

Discrimination of nasopharyngeal carcinoma serum using laser-induced breakdown spectroscopy combined with an extreme learning machine and random forest method. *J. Anal. At. Spectrom.* 2018, 33, 2083–2088.

[13] Berlo, K.; Xia, W.; Zwillich, F.; Gibbons, E.; Gaudiuso, R.; Ewusi-Annan, E.; Chiklis, G.R.; Melikechi, N. Laser induced breakdown spectroscopy for the rapid detection of SARS-CoV-2 immune response in plasma. *Sci. Rep.* 2022, 12, 16–140.

[14] Zhongqi F ,Shuaishuai L ,Tianyu G , et al.Electrolyte Analysis in Blood Serum by Laser-Induced Breakdown Spectroscopy Using a Portable Laser[J].*Molecules*,2022,27(19):6438-6438.

中国仪器仪表杂志