

Application News

No. A491

光吸収分析
Spectrophotometric Analysis

蛍光色素インドシアニンググリーンの長波長域蛍光スペクトル測定

Fluorescence Spectrum Measurement in Long Wavelength Region for Fluorescence Dye Indocyanine Green

医学・生化学分野では、特定分子にラベル化する蛍光色素を用いた病変部位等の観察がよく行われています。蛍光色素のインドシアニンググリーンは 810 nm 近辺という近赤外域に蛍光を持ちます。近赤外光は生体を透過しやすい光であるため生体内部の観察に適しており、そのためこの色素はよく使用されます。

従来の分光蛍光光度計では 750 nm 以上の領域を測定することは困難でしたが、今回開発した島津分光蛍光光度計 RF-6000 は、200 nm ~ 900 nm という広い範囲を測定することができます。さらに本装置は自動スペクトル補正機能を有しているため装置間で比較できるデータを自動で得ることができます。今回 RF-6000 を使用して、インドシアニンググリーンの測定を行いましたのでご紹介します。

M. Sugioka



Fig. 1 分光蛍光光度計 RF-6000
RF-6000 Spectrofluorophotometer

■装置、3次元スペクトル測定

Instrument and Three Dimensional Spectrum Measurement

Fig. 1 に RF-6000 の外観を示します。RF-6000 は、自動スペクトル補正機能を有しており、スペクトル（蛍光/励起）に含まれる装置固有の特性（装置関数）を除いた補正スペクトルを自動で取得します。従来装置では測定したスペクトルから装置関数を除くのにデータ処理操作が必要でしたが、RF-6000 ではその手間が不要となりました。補正スペクトルは異なる装置間で比較できるデータとなります。

インドシアニンググリーン粉末を純水に溶かし、1.3 mg/L 濃度の水溶液を調整しました。まず最適な励起波長を調べるため、LabSolutions RF ソフトウェアの「3D スペクトル」機能を使用し、3次元スペクトルを測定しました。3次元スペクトルは、励起波長を順次変えながら蛍光スペクトルを測定し、マッピング画像として表示したものです。測定結果を Fig. 2 に、測定条件を Table 1 に示します。横軸が蛍光波長 Em、縦軸が励起波長 Ex に対応します。本測定に要した時間はわずか 5 分です。この 3次元スペクトルは補正スペクトルから成ります。

Fig. 2 のピーク付近で蛍光が出ています。ピーク位置の座標は (Em 808 nm, Ex 780 nm) であり、本試料は 780 nm の励起波長で最も強い蛍光が出ていることがわかります。

3次元スペクトルの任意の座標で蛍光スペクトルや励起スペクトルを自由に切り取ることができます。ピーク位置での各スペクトルを取得した結果を Fig. 3 に示します。A 線で切り取ったものが蛍光スペクトルに、B 線で切り取ったものが励起スペクトルに対応します。この結果から、蛍光ピーク波長は 808 nm、最適励起波長は 780 nm であることがわかります。

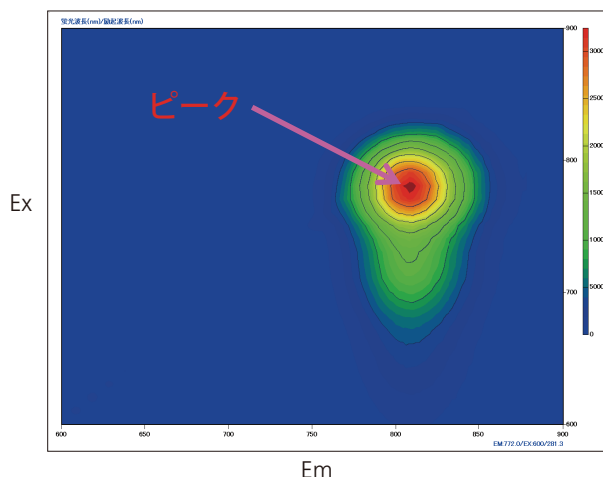


Fig. 2 インドシアニンググリーンの 3次元スペクトル
Three Dimensional Spectrum for Indocyanine Green

Table 1 3次元スペクトルの測定条件
Analytical Conditions for Three Dimensional Spectrum

使用装置	: 分光蛍光光度計 RF-6000
スペクトルの種類	: 3次元スペクトル
測定波長範囲	: Em: 600 ~ 900 nm, Ex: 600 ~ 900 nm
スキャン速度	: 2000 nm/min
波長間隔	: Ex 10 nm, Em 2 nm
バンド幅	: Ex 5 nm, Em 5 nm
感度	: High

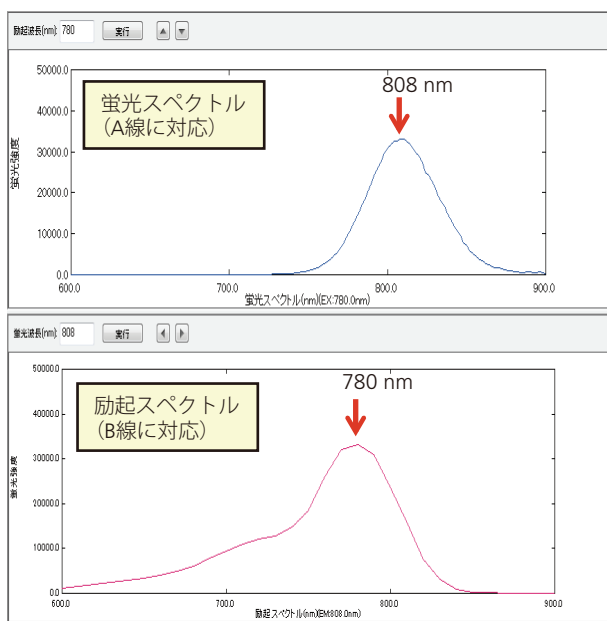
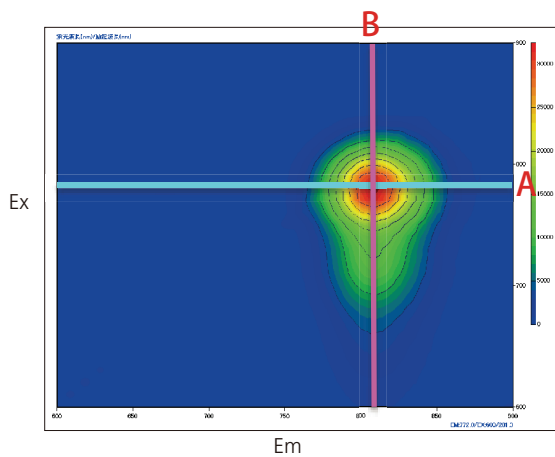


Fig. 3 3次元スペクトルから取得した蛍光スペクトルと励起スペクトル
Fluorescence Spectrum and Excitation Spectrum Taken from Three Dimensional Spectrum

■ 蛍光スペクトル測定 Fluorescence Spectrum Measurement

LabSolutions RF ソフトウェアの「スペクトル」機能を使用し、蛍光スペクトルをスキャン速度 200 nm/min で測定した結果をピーク検出結果とともに Fig. 4 に示します。測定条件を Table 2 に表示しました。長波長域まで感度よく測定できていることがわかります。水色の領域が今回新たに測定できるようになった波長領域（750 nm ~ 900 nm）です。

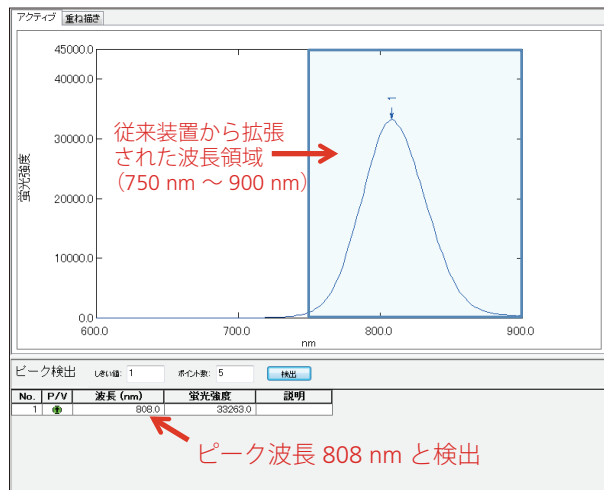


Fig. 4 蛍光ピーク検出
Fluorescence Peak Pick

Table 2 蛍光スペクトル測定の測定条件
Analytical Conditions in Fluorescence Spectrum Measurement

測定範囲	: 分光蛍光光度計 RF-6000
スペクトルの種類	: 蛍光スペクトル
励起波長	: 780 nm
測定波長範囲	: 600 nm ~ 900 nm
データ間隔	: 2.0 nm
スキャン速度	: 200 nm/min
バンド幅	: Ex 5 nm, Em 5 nm
感度	: High

■ まとめ Conclusion

RF-6000 は、200 nm ~ 900 nm という広い範囲を測定することができる装置です。RF-6000 を用いることで、従来装置では困難であった 810 nm 付近に蛍光ピークを持つインドシアニングリーンを感度よく測定することができました。また自動スペクトル補正機能を有しているため、リアルタイムに正しいスペクトルを得ることができます。測定範囲の広がった RF-6000 を使用することで新しいアプリケーションの作成が可能となります。