# 荧光光谱用于光动力疗法中光敏剂光漂白特性研究

王 雷1,顾 瑛1\*,李晓松1,刘凡光1,于常青2

11 中国人民解放军总医院激光医学科,北京 100853

21 北京理工大学光电工程系,北京 100081

**摘 要**应用荧光光谱技术研究溶液中血卟啉单甲醚(HMME)的光漂白与光产物生成。以 532 nm 倍频 Nd B YAG 激光器照射样品,功率密度为 100 mW # cm<sup>-2</sup>,以光学多通道分析仪(OMA)采集荧光光谱。照光 过程与荧光光谱采集同步进行。通过构建基本光谱与最小二乘拟合,由单条实测光谱中分解求得 HMME 荧光(613 nm)、光产物荧光(639 nm)及自体荧光的强度。HMME 初始浓度不超过 10 Lg # mL<sup>-1</sup>时符合荧光2浓 度线性函数关系。对照光过程的荧光光谱监测同时观察到 HMME 漂白、光产物生成与漂白,以及样品光学 特性变化引起的自体荧光强度起伏。光产物漂白后的二次产物引起样品光学特性显著改变。所建立的荧光 光谱探测系统与光谱分析方法可满足光敏剂漂白特性体外研究的需要,并为光动力治疗的剂量学在体监测 提供有效研究方法。

关键词 光动力疗法; 剂量学; 荧光光谱; 光漂白; 光产物; 血卟啉单甲醚 中图分类号: R31815 文献标识码: A 文章编号: 100020593(2007)102207206

# 引 言

光动力疗法(PDT)中,当前临床使用的大多数光敏剂均 遵循单线态氧(<sup>1</sup>O<sub>2</sub>)介导的 Typ&Ò型光动力作用机制。<sup>1</sup>O<sub>2</sub> 除对靶组织细胞产生光动力杀伤外,还使光敏剂分子发生自 敏光氧化反应,造成其不可逆的光漂白,导致具有光化学活 性的光敏剂浓度及单线态氧的生成速率降低。早期研究认 为,光敏剂的光漂白会降低 PDT 治疗效率,但同时又可保护 正常组织免受光动力损伤<sup>[1]</sup>。

直接影响 PDT 治疗效果的一个关键问题,是治疗剂量的精确量化与实时定量剂量学方法的建立。近年来的研究发现,<sup>1</sup>O<sub>2</sub> 介导的光敏剂光漂白与<sup>1</sup>O<sub>2</sub> 对靶组织的杀伤作用机制相同,所受到的各种影响因素也相同,光敏剂光漂白可用来综合衡量<sup>1</sup>O<sub>2</sub> 对靶组织的光动力作用剂量<sup>(2,8)</sup>。PDT 过程中,对光敏剂光漂白的在体荧光监测有望成为一种/ 隐性0 的实时剂量学方法<sup>[426]</sup>。光敏剂光漂白后光产物的生成机制同样为<sup>1</sup>O<sub>2</sub> 所介导,而且光产物本身可能也具有光动力活性,对PDT 治疗剂量产生影响<sup>[7]</sup>。因此,对光敏剂光漂白与光产物生成的荧光光谱监测已成为近年来 PDT 剂量学研究的热点问题<sup>[2011]</sup>。在 PDT 治疗中靶组织的荧光发射光谱中,光产物与光敏剂的荧光光谱互相重叠;治疗过程中,由于血流变

化等因素导致的组织光学特性改变,使得自体荧光强度也可能相应发生变化<sup>12</sup>,这些都对采用新型光谱分析方法提出 了要求。

血卟啉单甲醚(HMME)是一种有代表性的国产新型第 二代光敏剂,具有化学组分单一、性质稳定、单线态氧产率 高、组织清除迅速、避光期短等优点<sup>[1215]</sup>,已被我们成功应 用于鲜红斑痣等良性疾病的 PDT 治疗,其荧光光谱特性及 在光动力诊断(PDD)中的应用前景也受到国内研究者的关 注<sup>[1628]</sup>。近来,吴云霞<sup>[19]</sup>等曾用血卟啉衍生物作为肿瘤的光 动力诊断。本文对溶液环境中 HMME 的光漂白与光产物生 成进行了荧光光谱研究。

# 1 材料与方法

### 111 光敏剂

HMME(由第二军医大学五二三药物研究室提供),原 液浓度为 10 mg# mL<sup>-1</sup>。在暗室条件下,用 0 9% 生理盐水 稀释原液,配制成所需浓度的溶液样品,盛装于小号透明塑 料试管内。

### 112 激光照射与荧光激发

采用倍频NdBYAG准连续激光器(由天津医科大学生物 医学工程系提供),输出波长532 nm,脉冲频率1 kHz,脉宽

基金项目:北京市自然科学基金(3072012)资助

收稿日期: 200@05206, 修订日期: 200@0@08

作者简介: 王、雷, 1977 年生, 中国人民解放军总医院激光医学科博士后 \* 通讯联系人 @mail: yinggu@yahool.com © 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

25 ns, 通过光纤与扩束头输出。此光源兼有激光照射与荧光 激发功能, 荧光光谱采集与照光过程同步进行。照射光斑直 径 3 cm、功率密度 100 mW # cm<sup>-2</sup>。HMME 溶液样品 通过 试管架放于照射光斑内的固定位置。

#### 11.3 荧光光谱采集

应用光学多通道分析仪(OMA)采集荧光光谱,其主要 组成部分为 MS257 型光谱仪(美国 Oriel 公司产)与 Insta Spec<sup>™</sup> V型 ICCD(英国 Andor 公司产)。光谱仪的探测波长 范围设为约 590~ 735 nm. 光谱分辨率约为 0 37 nm。入射 狭缝后放置红色长波通滤光片,用以阻挡杂散激发光。荧光 采集光纤束由 13 根芯径 100 Lm 光纤组成, 在样品近端呈圆 形排列, 紧贴固定于样品试管侧面; 在样品远端呈直线排 列,通过耦合透镜与光谱仪入射狭缝相连。ICCD 置于光谱 仪的出射焦平面,其内部集成微通道板型第二代像增强器, 与像敏面阵采用光纤耦合。像敏面阵像素数为385@578、采 集光谱时工作于线阵模式、即将纵向 578 个像素进行合并。 接收到的荧光信号经控制卡进行 16 位 A/D转换后,输入并 存储在计算机中供后续处理。ICCD单次开门时间设为25 ms、并积分 20 次。

## 114 荧光光谱分析

HMME 溶液在照光过程中的荧光光谱主要由以下三部 分构成: HMME 荧光、光产物荧光及自体荧光背景。三种荧 光的基本光谱构建方法如下。

(1) 选配不含 HMME 的生理盐水溶液, 采集其荧光光谱 并相对峰值作归一化,获得自体荧光背景的基本光谱(见 图 1)。



图1中显示,由于滤光片的滤光作用,使自体荧光光谱 形状发生改变,形成 621 nm 处的平缓谱峰。图1 中的三条曲 线之间并非简单的乘法关系,这是由于:加入滤光片前,自 体荧光背景来源于样品及光纤;加入滤光片后的实测自体荧 光光谱中,除主要成分为透过滤光片的原有自体荧光外,还 包含滤光片本身受杂散激发光照射后的少量自体荧光。

(2)选配浓度为10Lg# mL-1的 HMME 溶液, 在照光过 程中所采集的典型荧光光谱具有 613, 639, 674 nm 三个特 征峰(见图,2)。将其扣减一定的自体荧光背景后进行 Loren 2 zian 光谱拟合。拟合结果中、613 与 674 nm 的两个 Lor entzi2 an 峰来自光敏剂的荧光发射; 639 nm 的 Lorentzian 峰代表 光产物的荧光发射,将其相对峰值作归一化即得光产物荧光 的基本光谱。选择在照光开始前采集的荧光光谱、扣减一定 的自体荧光背景并相对峰值作归一化。作为 HMME 荧光的 基本光谱。



构建好的三种荧光基本光谱见图 3。对于每条实测荧光 光谱 F<sub>Total</sub>(K),可表达为这三种基本光谱的线性叠加,如下 式

 $F_{T \text{ ctal}}(K) = I_{PS} f_{PS}(K) + I_{PP} f_{PP}(K) + I_{AF} f_{AF}(K)$ 其中, fps(K)、fpp(K)、fAF(K)分别为 HMME 荧光、光产物 荧光与自体荧光背景的基本光谱。将构建好的基本光谱代入 上式,并作最小二乘拟合,即可求得三种荧光各自的强度值 IPS, IPP, IAF .



#### 实验结果 2

#### 211 HMME 荧光2浓度关系

选配 11 种不同浓度的 HMME 溶液样品,浓度依次为 olis2in3, 14015e6,A71 18g19s 10se15e20 Lg#rmL1 在相同的荧 光激发与探测条件下,分别对其进行单次照光激发,并采集 荧光光谱[见图 4(a)]。对所测光谱数据进行 拟合,获得照光 初始时刻溶液样品中 H MME 荧光、光产物荧光及自体荧光 背景各自的强度值[见图 4(b)]。其中,H MME 荧光强度与 浓度间关系曲线的低浓度(< 10 Lg # mL<sup>-1</sup>) 部分见图 5。





(a): Original spectra; (b): Fitting results



### 212 HMME 光漂白监测

选配浓度为 10 Lg# mL<sup>-1</sup>的 H MME 溶液样品,对其进行激光照射,并同步采集荧光光谱。照光时间为 90 min,在 功率密度 100 mW# cm<sup>-2</sup>下,能量密度达 540 J# cm<sup>-2</sup>。对所 测光谱数据进行拟合,并将拟合结果均相对于初始时刻的 HMME 荧光强度作归一化,相对于照光能量密度绘制 HMME 光漂白曲线、光产物生成曲线及自体荧光变化曲线, 结果见图 6。在照光过程的前半段,选取 7 个能量密度点,即 0,30,60,90,120,180,240 J# cm<sup>-2</sup>,其所对应的荧光光 谱见图 7;在照光过程的后半段,选取 5 个能量密度点,即 306,354,420,480,540 J# cm<sup>-2</sup>,其所对应的荧光光谱见 图 8。



Fig 6 Leas2squares fitting for fluorescence spectra of HMME solution during irradiation



# 3 讨 论

0 min,在当光敏剂的荧光强度与浓度呈线性函数关系时,光敏剂 m<sup>·2</sup>。对所的荧光强度变化才能准确描述其浓度变化。因此,首先有必 tronic fublishing House. Alt rights reserved. http://www.chki.net 要对HMME 荧光强度与其浓度之间的对应关系进行研究。 结果显示。





(1)在所选浓度范围内,HMME 荧光强度随浓度升高而 递增的关系符合二项式函数[见图 4(b)]。此种递增关系在浓 度较低时(< 10Lg # mL<sup>-1</sup>)可视为线性(见图 5),而在浓度 较高时趋于平缓的非线性递增。这是由于高浓度 HMME 分 子之间的聚集作用会降低其荧光量子产率。如果浓度过高, 甚至会产生荧光淬灭。因此,对 HMME 溶液样品进行光漂 白监测实验时,初始浓度值应在满足荧光2浓度线性关系的 浓度范围内,此时 HMME 的荧光衰减过程才能够准确反映 其光漂白过程。

(2) 自体荧光背景强度随着 HMME 浓度增大而呈平缓 的线性升高[见图 4(b)]。这是由于,系统所探测到的自体荧 光背景主要来自光纤探头本身及其邻近微小区域内的试管壁 及生理盐水。随着 HMME 浓度增大,溶液的光学特性由透 明趋于浑浊,自体荧光受到 HMME 分子更多的反射与散 射,进入光谱仪的信号增强。因此,自体荧光背景强度随时 间的改变可以反映样品光学特性的动态变化。图 4(b)同时显 示,对于不同浓度的 HMME 溶液样品,其照光前的荧光光 谱中,含有不同强度的自体荧光背景,采用统一扣减相同自 体荧光背景的简单方法不可行,证明了采用光谱拟合方法的 必要性。 图 4(b)]。这说明由于各荧光光谱均采集于样品首次受光照 激发的初始状态,此时 H MME 光漂白与光产物生成可忽略 不计,光产物对荧光光谱的贡献很小。

关于此套荧光光谱采集系统与光谱拟合方法的应用,采 用一组 H MME 溶液光漂白监测实验的典型结果来说明。图 7 与图 8 显示,在照光过程中 H MME 溶液样品的荧光发射 光谱中,HMME 与光产物的荧光光谱互相交叉重叠,并均 叠加在自体荧光背景之上,且各自荧光强度均随照光时间呈 动态变化。我们根据各荧光成分的基本光谱,通过光谱拟合 方法,从实测荧光光谱数据中分解提取出 H MME 荧光衰 减、光产物荧光强度变化与自体荧光强度起伏等三方面信息 (见图 6)。

图 6 显示, HMME 荧光衰减所揭示出的光漂 白过程相 对于能量密度呈指数衰减曲线,其漂白速率在低能量密度时 为最高,并随能量密度增大而逐渐降低;低能量密度时,光 产物含量由初始时刻的接近于 0 开始显著增高,并在能量密 度约为 140 J # cm<sup>-2</sup>时达到最大值,之后随能量密度增大而 呈平缓下降,说明其在不断生成的同时自身也会发生漂白, 其含量变化是生成与漂白过程的综合结果;在照光过程的前 半段,自体荧光背景强度起伏很小,稳定在 HMME 初始荧 光强度的 0 16倍左右,而在照光过程的后半段,自体荧光背 景强度呈接近于线性的持续增强,到照光结束时增至 HMME 初始荧光强度的约 0 45 倍。需要指出的是,图 6 所 示光产物的相对荧光强度变化曲线虽然可以准确描述其生成 过程,但并不代表其相对于初始时刻 HMME 的实际浓度水 平,这是因为光产物与 HMME 在激发波长处的吸收截面与 荧光量子产率均不同。

图 7 与图 8 中的荧光光谱对图 6 中的光谱拟合定量结果 作了定性展示。在照光过程的前半段(见图 7),随着照光过 程的持续,HMME 在 613 与 674 nm 处的荧光特征峰强度下 降,且在 639 nm 处出现新荧光峰并持续增强,显示HMME 不断漂白,并伴随有新光产物的生成及漂白;在光谱两侧边 缘处荧光强度的小幅下降,是HMME 荧光下降与光产物荧 光增强的叠加结果,自体荧光背景强度基本稳定,说明光产 物对自体荧光的反射与散射特性与HMME 相近,HMME 向光产物的物质转化对溶液光学特性影响很小。

与之形成对比的是,在照光过程的后半段(见图 8),随 着照光时间延长,所测光谱的三个荧光特征峰强度均下降, 说明 HMME 在持续漂白,光产物的生成减少,漂白开始占 主导;三个荧光峰两侧的荧光强度出现与荧光峰相反的显著 增强趋势,说明自体荧光背景强度明显升高。定量拟合结果 显示(见图 6),在40 min 的照光时间内(能量密度点 1~5)自 体荧光背景强度呈单调线性的持续稳定升高。可以推测,随 着 HMME 与光产物的进一步漂白,溶液中光产物漂白后生 成的二次产物逐渐增多,其对自体荧光背景具有强反射与散 射作用,光产物向二次产物的物质转化使溶液光学特性明显 改变。同时,在所测荧光光谱中没有出现新的荧光特征峰, 说明此二次产物的荧光特性大幅降低。由于在照光过程的前 半段自体荧光背景强度较低,稳定在 HMME 荧光强度的

◎(3)各浓度下,光产物的荧光强度值均低至接近于.0[见し:16%左右,在照光过程后半段二次产物生成对自体荧光背量。

的抬高作用比较显著。因此, 在良好的暗室条件下获得低的 初始自体荧光背景, 不但可减小其对 HMME 与光产物荧光 的干扰, 还有利于更加突出其自身携带的光产物漂白与二次 产物生成的信息。有关 HMME 的光产物及其二次产物的确 定种类与理化特性, 以及它们在 HMME 介导 PDT 的剂量学 中所起的作用, 还需结合高压液相色谱等化学分析手段作深 入研究。

实验结果显示[见图 4(a)],各浓度下所测的 HMME 荧 光光谱均具有比较鲜明的形状特征;如图 4(b)的各浓度下, HMME 荧光强度均显著高于自体荧光背景强度(约为 4~ 515倍)。如果改进暗室实验条件,还可进一步降低背景强 度。这说明 532 nm 绿光虽然对 HMME 的荧光激发效率与 紫或紫外光相比不是最高,但仍具有相当的荧光激发能力, 结合超高灵敏度 ICCD 的使用,可以实现 HMME 的微弱荧 光探测。

此外, 实测光谱的荧光主峰能够较好地保持近似于原始 线型的光谱形状[见图 4(a),图 7],也与滤光片的使用有关。 图 1 显示,当不使用滤光片时,自体荧光背景光谱为探测窗 口外短波长处的自体荧光峰向长波长一侧的单调下降延拓; 当加入滤光片后,其作用除阻挡杂散激发光外,还使自体荧 光背景的光谱形状发生改变,减轻其对 HMME 荧光光谱主 峰两侧的不对称抬高,从而减小了实测荧光光谱的畸变程 度。与此同时,滤光片的加入还可显著滤去自体荧光背景在 短波长一侧的强度最高部分,同时对 HMME 在 613 nm 处 的荧光发射主峰透过率达 84%,不影响对 HMME 荧光的有 效探测。因此滤光片的使用有利于降低自体荧光背景强度, 突出 HMME 荧光信息。

当前,我们在鲜红斑痣的 HMME2PDT 临床实践中以 532 nm 绿光作为治疗光源。其与红光相比,对 HMME 光动 力效应的激发效率高,并且在皮肤组织内的穿透深度适中, 在损伤浅层病变微血管靶区的同时,有利于保护深层正常血 管组织,达到良好的组织选择性治疗效果。因此,在 HMME 光漂白特性研究中以 532 nm 绿光作为照射光源,具有临床 针对性和实际应用意义。

在对溶液样品进行光敏剂光漂白特性研究时,如果采用 荧光分光光度计与所需激光照射光源相结合的常规技术平 台,荧光激发采集与激光照射交替进行,照光过程中断频繁 (据文献报道, PDT 照光中断会改变样品中的氧含量),且样 品需在两种仪器间来回移放,不但操作繁琐,还对实验结果 影响很大。我们所建立的荧光光谱采集系统采用高探测灵敏 度、高光谱分辨率 OMA 系统作为荧光光谱采集装置,并以 532 nm 绿光作为单一光源,使其在用于激光照射的同时还 兼有荧光激发功能,而不使用独立的紫光或紫外荧光激发光 源。此方法除可以简化系统、方便操作、降低成本外,还具 有以下优点:在激发荧光时不引入额外光剂量,也不必中断 照光过程,从而不会影响光漂白特性的实验结果和光动力作 用效果,因此可以任意缩小光谱采集的时间间隔。激光照射 与荧光光谱采集同步原位进行、互不干扰,实现照光过程中 样品荧光光谱的/在线0式动态监测。特别是以后将此系统应 用于对鲜红斑痣 PDT 临床治疗的剂量学在体荧光监测时, 在能够随时探测荧光光谱的同时,既不干扰和中断正常的治 疗过程,又可避免紫外激发光对病人频繁照射的副作用。

## 4 结 论

将荧光光谱技术用于对溶液环境中 HMME 光漂白特性 的研究。532 nm 绿光兼作激光照射与荧光激发光源,能够有 效激发 HMME 荧光,满足探测需要,同时可使照光过程与 荧光激发采集同步进行、互不影响。通过构建受光照时 HMME 溶液的基本荧光光谱,并据此采用光谱拟合方法, 可由实测荧光光谱中分解求得 HMME 荧光、光产物荧光及 自体荧光强度。

对 HMME 荧光2浓度关系的研究证明,浓度不超过 20 Lg# mL<sup>-1</sup>时,HMME 荧光强度相对于浓度呈二项式递增关 系,当浓度低于 10 Lg# mL<sup>-1</sup>时可视为满足荧光2浓度线性 递增关系,溶液样品中 HMME 的初始浓度应位于此区间。 对HMME 溶液的光漂白监测实验,通过对实测光谱的拟合 分析,可获得以下三方面信息:HMME 荧光衰减反映其漂 白过程;光产物荧光强度变化反映其生成与漂白;自体荧光 背景强度起伏反映样品光学特性的变化,照光过程后期自体 荧光背景强度的升高源自于光产物漂白后的二次产物生成。

本文所建立的荧光光谱监测系统与光谱分析方法,既可 作为体外研究光敏剂光漂白与光产物生成特性的有效技术手 段,又为进一步的工作将其用于鲜红斑痣 PDT 治疗剂量学 的临床在体研究奠定基础。

### 参考文献

- [1] Boyle D G, Potter W R. Photochem. Photobiol., 1987, 46: 997.
- [2] Georgakoudi I, Nichols M G, Foster T H. Photochem. Photobiol., 1997, 65: 135.
- [3] Wilson B C, Patterson M S, Lilge L. Lasers Med. Sci., 1997, 12: 182.
- [4] Hadjur C, Lange N, Rebstein J, et al. J. Photochem. Photobiol. B: Biol, 1998, 45: 170.
- [5] Rotomskis R, Streckyte G, Bagdonas S. J. Photochem. Photobiol. B: Biol, 1997, 39: 167.
- [6] Rotomskis R, Streckyte G, Bagdonas S. J. Photochem. Photobiol. B: Biol, 1997, 39: 172.
- [7] Konig K, Schneckenburger H, Ruck A, et al. SPIE, 1994, 2133: 226.
- [8] Finlay J C, Mitra S, Patterson M S, et al. Phys. Med. Biol., 2004, 49: 4837.
- 9 Dysart J.S. Patterson M.S. Phys. Med. Biol. 2005, 50: 2597 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

- [10] Robinson D J, H S de Bruijn, W J de Wolf, et al. Photochem. Photobiol., 2000, 72: 794.
- [11] Robinson D J, H S de Bruijn, N van der Veen, et al. Photochem. Photobiol., 1999, 69: 61.
- [12] Robinson D J, H S de Bruijn, N van der Veen, et al. Photochem. Photobiol., 1998, 67: 140.
- [13] GU Ying, LI Jun2h eng, WANG Kai, et al(顾 瑛, 李峻亨, 王 开, 等). Chinese J. of Chinese Laser Medicine and Surgery(中国激光 医学杂志), 1996, 5(4): 201.
- [14] LIU Fan2guang, GU Ying, FU Qiu2tao, et al(刘凡光, 顾 瑛, 富秋涛, 等). Chinese J. of Chinese Laser Medicine and Surgery(中国激 光医学杂志), 2001, 10(1): 9.
- [15] GU Ying, LIU Fan2 guang, WANG Kai, et al(顾 瑛, 刘凡光, 王 开, 等). Chinese J. of Chinese Laser Medicine and Surgery (中国激 光医学杂志), 2001, 10(2): 86.
- [16] LI Bu2hong, XIE Shu2sen, LU Zu2kang(李步洪, 谢树森, 陆祖康). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2002, 22 (6): 902.
- [17] LI Bu2hong, LU Zu2kang, XIE Shu2sen(李步洪, 陆祖康, 谢树森). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2003, 23 (2): 331.
- [18] YU Chang qing, LIU Jie, DOU Xia ming, et al(于常青,刘杰,窦晓鸣,等). Spectroscopy and Spectral Analysis (光谱学与光谱分析), 2003, 23(6): 1150.
- [19] WU Yun2 xia, XING Da(吴云霞, 邢 达). Spectroscopy and Spectral Analysis (光谱学与光谱分析), 2005, 25(10): 1630.

# Fluorescence Spectroscopy Study on Photobleaching Properties of Photosensitizers in Photodynamic Therapy

WANG Lei<sup>1</sup>, GU Ying<sup>1\*</sup>, LI Xia&song<sup>1</sup>, LIU Fan2guang<sup>1</sup>, YU Chang2qing<sup>2</sup>

- 1. Department of Laser Medicine, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China
- 2. Department of Optical Engineering, Beijing Institute of Technology, Beijing 100081, China

Abstract The photobleaching and formation of photoproduct of hematoporphyrin monomethyl ether (HMME) was investigated in solution by fluorescence spectroscopy. Irradiation was performed by 532 nm double? frequency Nd B YAG laser at a fluence rate of 100 mW # cm<sup>-2</sup>, meanwhile the collection of fluorescence spectra was implemented an by optical multi2channel analyzer (OMA). Utilizing the basis spectra constructed and least2square fitting, the intensity of HMME fluorescence (613 nm), photo2 product fluorescence (639 nm) and autofluorescence can be resolved respectively from the single measured spectrum. The corre2 lation between fluorescence intensity and the concentration of HMME is consistent with linear function at concentrations not exceeding 10 Lg# mL<sup>-1</sup>. Monitoring the fluorescence spectroscopy during irradiation, three kinds of information were obtained, including photobleaching of HMME, formation and bleaching of photoproduct, as well as variation to fluorescence intensity due to the change of sample optical properties. Product generated by bleaching of photoproduct causes significant in sample optical properties. The implementation of fluorescence spectroscopy measurement and spectral analysis method presented here can be utilized effectively for both ex vivo investigation of photobleaching characteristics of photosensitizer and in vivo monitoring for dosimetry in photodynamic therapy.

Keywords Photodynamic therapy; Dosimetry; Fluorescence specroscopy; Photobleaching; Photoproduct; Hematoporphyrin monomethyl ether

(Received May 6, 2006; accepted Aug. 8, 2006)

\* Corresponding author