

“極限発光”蛍光色素液体ナノエマルジョンに基づく 極限感度カチオン・アニオンセンシング

久本 秀明

大阪府立大学大学院工学研究科

概要 本提案ではドナー、アクセプターで構成される“蛍光性色素液体”で蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)の極限感度を実現し、ナノエマルジョン作製と分子認識機能の付与で、海水中成分分析で重要なイオンの高感度分析を目指した。今回は特に Cl⁻に対する高選択的・高感度センシング実現を試みた。

色素液体薄膜に基づく基礎検討ではドナー色素液体(D)で作製した可塑化 PVC 膜の蛍光スペクトルおよびアクセプター色素液体(A)で作製した可塑化 PVC 膜の吸収スペクトルがよいオーバーラップを示し、FRET 系に応用できることを明らかにした。膜中に含ませる A, D の比率(A/D 比)の検討から、数 mol%のアクセプター添加で90%以上の FRET 効率を示すことを明らかにした。また、FRET 増幅効率も A/D 比が 2 mol%以下になると向上することを明らかにした。また、最適化条件で得られる蛍光強度を従来型の蛍光強度と比較すると、最大で約 22 倍高感度な蛍光を得られることを明らかにした。

アニオンセンシングへの応用ではプロトンとアニオンの協同抽出機構に基づくセンシングができることを明らかにした。一般に共同抽出型アニオンセンシングでは、アニオン種の疎水性の序列でイオン選択性が決まるため、ここでは塩化物イオン選択性を向上するためにイオン選択性電極用塩化物イオンフォアとして開発された Chloride ionophore IV を用いた。その結果、特に SCN⁻に対しては約 10 倍以上の選択性改善が見られた。今後、色素液体組成の検討からさらなる選択性向上が期待できる。

ナノエマルジョンの作製では作製時に添加する界面活性剤量を検討した結果、平均粒径約 78 nm のナノ粒子を作製できることを明らかにした。協同抽出に基づく応答性確認を行った結果、アニオン濃度一定条件での pH 変化、pH 条件一定でのアニオン濃度変化に対して良好なスペクトル変化が得られ、ナノエマルジョンにおいても協同抽出機構に基づくアニオンセンシングが実現できることを明らかにした。

今後、極限感度ナノエマルジョン作製・カチオン種への展開を継続し、さらなる高感度イオン分析の実現を図る。

1. 研究目的

本提案の目的は、ごく最近我々が見出した、“蛍光性色素液体”で蛍光共鳴エネルギー移動(以下 FRET と略す)の極限感度を実現し、ナノエマルジョン作製と分子認識機能の付与で FRET 型“極限感度イオンセンシング”を実現することにある。

具体的には海水中成分分析で重要な Na⁺, NH₄⁺, Cl⁻ に対する高選択的・高感度センシング実現を目指す。

FRET はドナー蛍光色素(D)とアクセプター蛍光色素(A)の間に働くエネルギー移動現象であり、多様な分子やイオンに対する化学センシングに応用されている。FRET のエネルギー移動効率は、D-A 間の物理的な分子間距離(～10 nm 程度)、配向因子および、D の蛍光スペクトルと A の吸収スペクトルのオーバーラップに依存する。通常は D・A を適切なリンカーで結合した分子で FRET センシングを行う。しかしながらこの場合、1 分子の A に対し、

1分子のDが対応したエネルギー移動となるため、オーバーラップの割合および配向因子の齟齬によってエネルギー移動効率が低下する。

一方、本研究ではごく最近我々が見出した“蛍光性色素液体”に着目した。これは疎水性アニオン性蛍光色素のカウンターカチオンを疎水性イオン液体のコンポーネントとして知られるテトラアルキルホスホニウムカチオンで置換した極限濃度の無溶媒液状化蛍光色素である。これをFRETアクセプター蛍光色素液体とし、FRETドナーの蛍光色素液体に微量添加してナノエマルジョン化した場合、以下の特徴から、アクセプター蛍光を利用するFRET型センサーの極限感度実現が期待できる。

1. 無溶媒であるため、D-A分子間距離を極端に短くできる
2. 多様な配向の多量D分子がA分子に近接するため、配向因子を最大化できる
3. D/A比が極端に大きいため、FRET最大化とアンテナ効果が期待できる

そこで本研究では蛍光性色素液体の特徴を最大限に活用した極限感度FRET型蛍光化学センシングの新原理を確立し、高選択的イオン認識分子を活用した極限感度イオンセンシングを実現する。本研究ではまずCl⁻に対するセンシング薄膜を作製して原理検証および基礎検討を行い、ナノエマルジョン化を試みる。

2. 研究方法

2.1 ドナー(非変色性蛍光色素分子)およびアクセプター(変色性蛍光色素分子)の設計・合成・液化

ドナー・アクセプターとして、Fig.1の分子を合成した。アクセプターは、疎水性フルオレセイン誘導体である。ドナーは、変色に関与する官能基を持たず、アクセプター吸収スペクトルとのオーバーラップの大きなエキシマ蛍光スペクトルを持つピレン誘導体である。これらを疎水性ホスホニウム塩との化学量論的イオン交換で蛍光性色素液体とした。

2.2 合成した液化蛍光色素の薄膜化とFRET効率の検討

2.1で合成したドナー・アクセプター蛍光色素液体のモル比(D:A = 1000:1~0.1:1)を変えた可塑化ポリ塩化ビニル(PVC)薄膜をスピコート法で作製した。蛍光スペクトルからFRET効率、アクセプター蛍光の励起スペクトルからアンテナ効果を算出した。また、水溶液中試料応答の基礎検討として、酸・塩基溶液に対する最小および最大蛍光強度のデータをドナー励起・アクセプター励起でそれぞれ取得し、その蛍光強度の比較から、感度向上の倍率を定量的に評価した。

2.3 アニオンセンシングの評価

2.2で評価した可塑化PVC薄膜にアクセプターと等モルのイオン認識分子を導入し、実際の化学センシング性能を評価した。ここでは塩化物イオノフォア(Chloride ionophore IV)を用い、各種イオン溶液に対する蛍光応答データを取得した。イオン選択性等の性能を定量的に評価した。

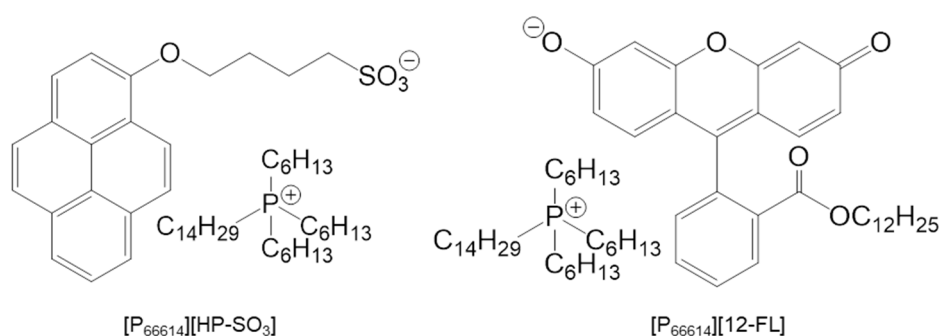


Fig.1 Chemical structures of donor ([P₆₆₆₁₄][HP-SO₃]) and acceptor ([P₆₆₆₁₄][12-FL]) molecules

2. 4 アニオンセンシングナノエマルジョンの作製

色素液体および界面活性剤(F-127)をテトラヒドロフラン(THF)に溶解し、一定流量で水溶液に攪拌しながら加えた。THFを留去し、ナノエマルジョン溶液を得た。粒径を動的光散乱法で評価した。また、アニオン応答特性を評価した。

3. 結果と考察

3. 1 色素液体薄膜のスペクトル変化特性

Fig.2 に用いたドナー色素液体(D)で作製した可塑化PVC膜の蛍光スペクトルおよびアクセプター色素液体(A)で作製した可塑化PVC膜の吸収スペクトルを示す。ピレン骨格のエキシマ発光がフルオレセイン骨格の吸収に対しよいオーバーラップを示している。

Fig.3(a)は(D)で作製した薄膜に(A)を0-5 mol%添加していった際の、励起波長 350nm における蛍光スペクトル変化である。(D)の蛍光強度変化から計算されるFRET効率(E_F)を Fig.3(b)に示す。過去に報告されたモデル⁽¹⁾での計算結果を合わせて示している。計算では90%以上の効率を示すのに3-4 mol%のアクセプターが必用であったのに対し、実験では約0.5-1 mol%程度で高効率な値が得られた。これは、モデルでは(D)濃度の効果は考慮されていないのに対し、本実験では(D)濃度が極端に大きいこと、また、実験では可塑化PVC膜の液膜性により、(A)が(D)中を拡散できるために(D)(A)間の相互作用が相対的に大きいことに起因すると考えられる。Fig.3(c)は薄膜の励起スペクトルから計算した蛍光増幅効率(AE)である。ここではA/D比が2 mol%以下になると増幅効率が上がることがわかる。

実際に、FRET型の蛍光強度が同量の(A)を通常の可塑剤に溶解させて作製した可塑化PVC膜と比較してどの程度になるかを評価した結果が Fig.3(d)である。これを見ると、いずれのA/D比においても(D)を励起して(A)の蛍光を見るFRET型の方が、(A)を直接励起して得られる蛍光強度よりも大きく、A/D比が約0.5 mol%程度のところに極大値を示していることがわかる。極大値以降に蛍光強度の下がる要因は、(A)濃度の増加に伴って、濃度による蛍光量子収率低下の寄与が入ってくるためと考えられる。この図から、今回提案したFRET型蛍光を示すセンシング系は従来型センシング系に対し、最大で約22倍大きな蛍光強度が得られるとわかった。

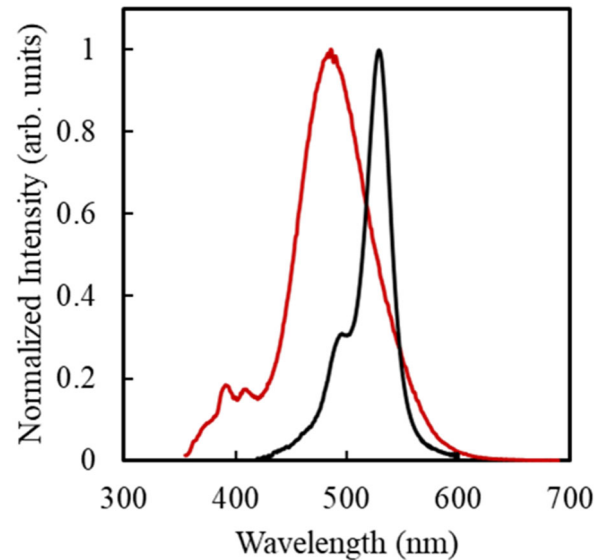


Fig. 2 Normalized fluorescence spectrum of the PVC membrane composed of 90 wt% [P66614][HP-SO₃] without an acceptor (λ_{ex} = 350 nm) (red), and the normalized absorption spectrum of [P66614][12-FL] in the PVC membrane (black).

3. 2 アニオンセンシングへの応用

上記の検討から、本提案で開発した FRET 型蛍光検出では従来型よりも著しく高感度な検出を実現できることがわかった。ここではこのセンシング系をアニオンセンシングに応用した。Fig.4 にアニオンセンシングの応答モデルの模式図を示す。有機相(Org.)は(D) (黄色)および(A) (赤)で構成されており、プロトンとアニオンが協同抽出された際、(A)へのプロトン付加が起こり、(A)の発蛍光が抑制される。したがって、一定 pH 条件でアニオン濃度が変化すると抽出量が変化するため、アニオンセンシングできることを原理としている⁽²⁻³⁾。一般に共同抽出型アニオンセンシングでは、アニオン種の疎水性の序列でイオン選択性が決まり、いわゆるホフマイスター順列⁽⁴⁾に従った選択性となる。そこでここでは塩化物イオン選択性を向上するため、イオン選択性電極用塩化物イオンフォアとして開発された Chloride ionophore IV⁽⁵⁾を用いることとした (Fig. 5)。

Fig.6(a)に、イオンフォア分子を含まない可塑化PVC膜の、水溶液中塩化物イオン濃度変化に伴う蛍光強度変化を示す。(D)の励起波長である350 nmの励起において、約550 nmに現れる(A)の蛍光強度が減少していることがわかる。異なる濃度の各種アニオンに対してプロットした

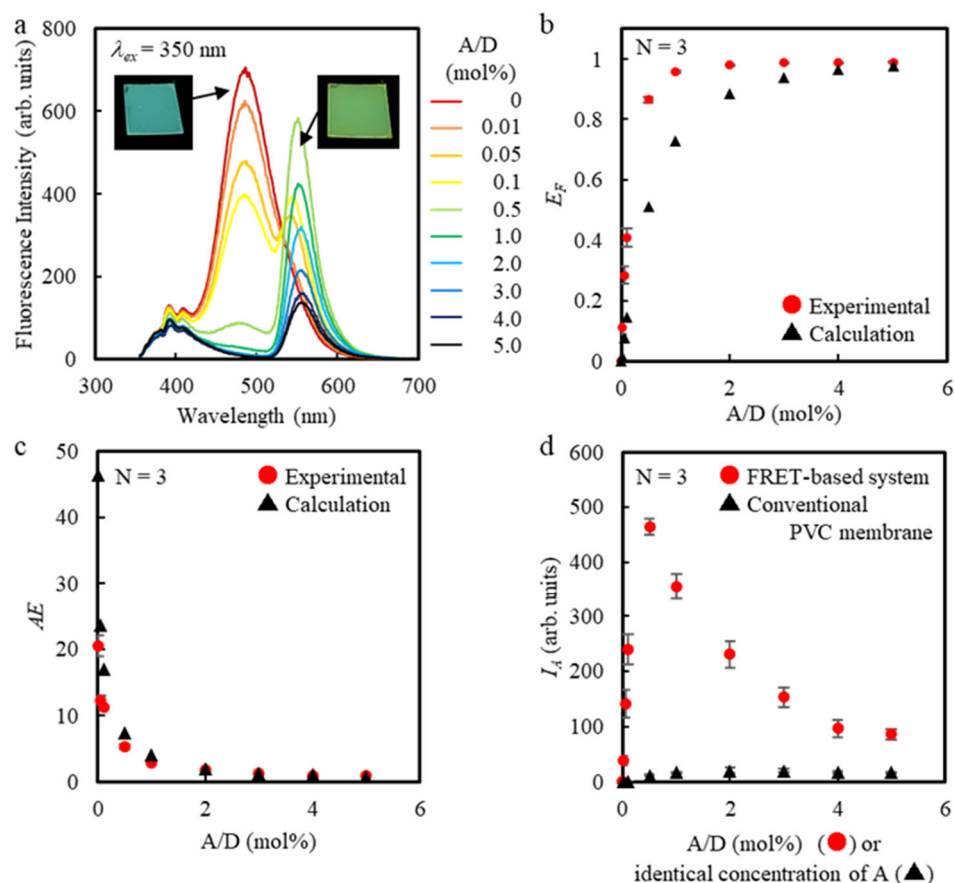


Fig. 3 (a) Fluorescence spectra of the PVC membrane composed of [P66614][HP-SO₃] containing 0–5 mol% [P66614][12-FL] and photographic images taken at 0 mol% and 0.5 mol% [P66614][12-FL] doping. (b) FRET efficiency of the PVC membrane (red circles: calculations from the experimental values, black triangles: theoretical calculations. Error bar shows the standard deviation with 3 replicated measurements). (c) Antenna effect of the PVC membrane (red circles: calculations from the experimental values, black triangles: theoretical calculations. Error bar shows the standard deviation with 3 replicated measurements). (d) Fluorescence intensity of the acceptor (red circles: in the PVC membrane using [P66614][HP-SO₃] as a plasticizer ($\lambda_{ex} = 350$ nm), black triangles: in the PVC membrane corresponding [P66614][12-FL] concentration using NPOE as a plasticizer ($\lambda_{ex} = 530$ nm)). Error bar shows the standard deviation with 3 replicated measurements.

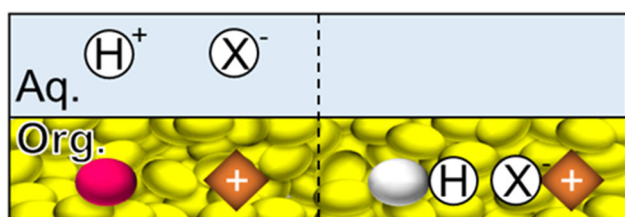


Fig. 4 Coextraction model used for anion sensing, where proton and anion are co-extracted into organic phase, and fluorescence intensity of acceptor decreases upon protonation of acceptor dye molecule

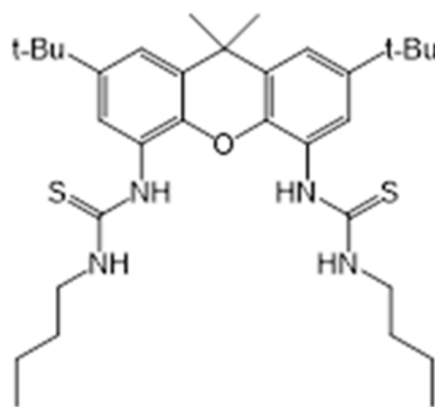


Fig. 5 Chemical structure of chloride ionophore IV

検量線が Fig.6(b)である。これを見ると、Cl⁻よりも Br⁻、SCN⁻に対してより低濃度から応答していることがわかる。これは上述のようによく知られたアニオンの疎水性の序列であり、同じ価数のイオンでは大きなイオンが、より抽出されることに起因する。

次に塩化物イオノフォアである Chloride ionophore IV を (A)と等モル添加した可塑化PVC膜を用いた場合の結果を Fig.6(c)(d)に示す。蛍光スペクトルとしては塩化物イオン濃度の増加に伴う同様のスペクトル変化が見られたが、検量線として比較すると、相対的に Br⁻、SCN⁻との間隔が

狭まっており、イオノフォアを用いない場合と比較して塩化物イオン選択性が改善されていることがわかる。今回の実験では、(D) (A)ともにテトラアルキルホスホニウムカチオンとの塩であり、有機相自体が大量のアニオン交換体で構成されているため、当初、少量((D)に対し約 0.5 mol% 程度)の添加ではイオノフォアの効果は少ないと予想されたが、特に SCN⁻に対しては約 10 倍以上の改善が見られていることから、今後、色素液体組成の検討からさらなる選択性向上が期待できる。

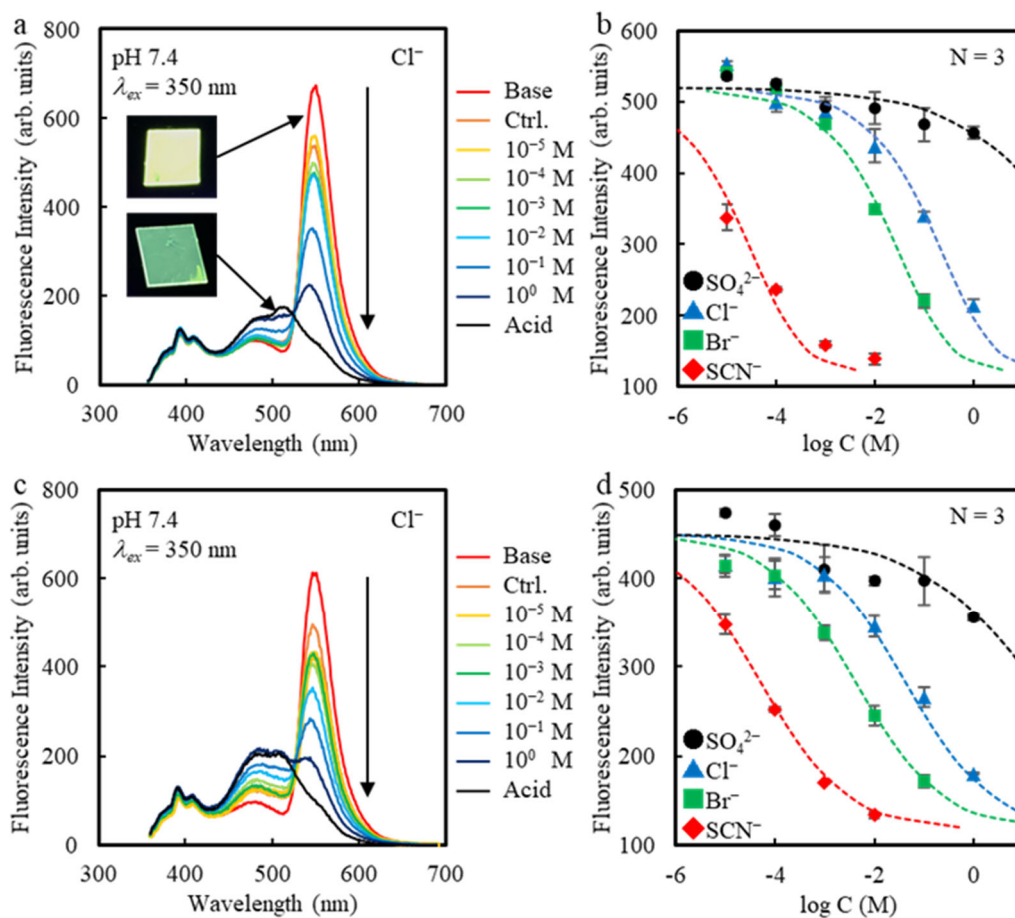


Fig. 6 (a) Fluorescence spectra of the PVC membrane composed of 90 wt% [P₆₆₆₁₄][HP-SO₃] containing 0.5 mol% [P₆₆₆₁₄][12-FL] with various chloride concentrations under a constant pH (pH 7.4 50 mM HEPES-NaOH buffer). (b) Response curve for each anion (red circles: sulfate, blue triangles: chloride, green squares: bromide, and red diamonds: thiocyanate). Error bar shows the standard deviation with 3 replicated measurements. (c) Fluorescence spectra of the PVC membrane composed of 90 wt% [P₆₆₆₁₄][HP-SO₃] containing 0.5 mol% [P₆₆₆₁₄][12-FL] and chloride ionophore IV with various chloride concentrations under a constant pH (pH 7.4 50 mM HEPES-NaOH buffer). (d) Response curve for each anion with chloride ionophore IV (red circles: sulfate, blue triangles: chloride, green squares: bromide, and red diamonds: thiocyanate). Error bar shows the standard deviation with 3 replicated measurements.

3.3 色素液体ナノエマルジョンの作製とアニオン応答性評価

ここではナノエマルジョンの作製を検討した。Fig.1 右に示すフルオレセイン誘導体を用い、THF 溶液を水に分散させて作製した。ここでは THF に添加する界面活性剤 (F-127) 量とエマルジョン粒径の関係を、動的光散乱法 (DLS) にて評価した。Fig.7(a)に結果を示す。F-127 無添加の場合には液体も濁り、約 600 nm クラスの大きなサイズとなったのに対し、少量でも F-127 を加えると透明な溶液となり、100 nm 程度のサイズまで小さなナノエマルジョンを作製できることが分かった。最適化の結果、色素液体:界面活性剤の重量比率が 8 mg:10 mg の場合に、平均粒径約 78 nm のナノ粒子を作製できることが分かった (Fig.7(b))。

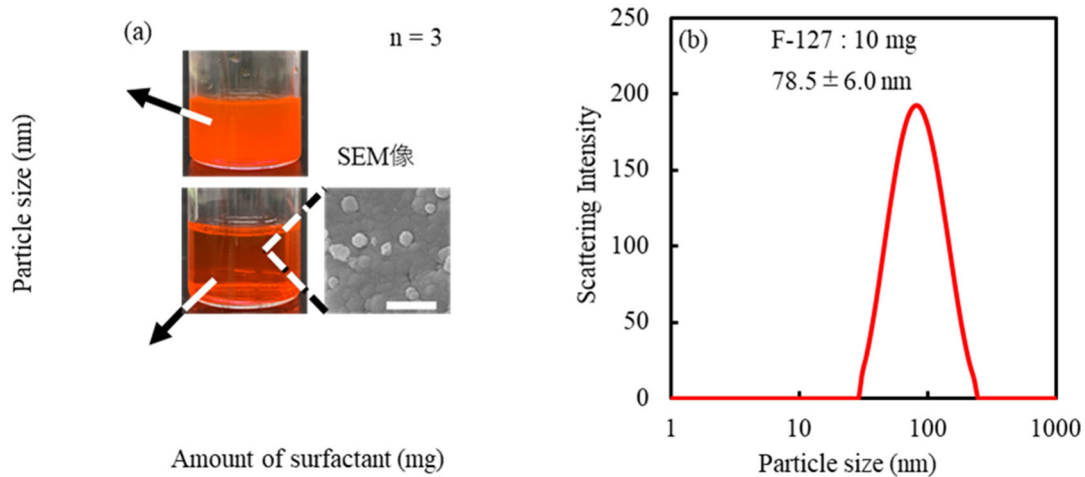


Fig.7 (a) Particle size dependence on the added amounts of surfactant (F-127) to the THF solution containing $[P_{6614}][12-FL]$. (b) Particle size distribution after optimization.

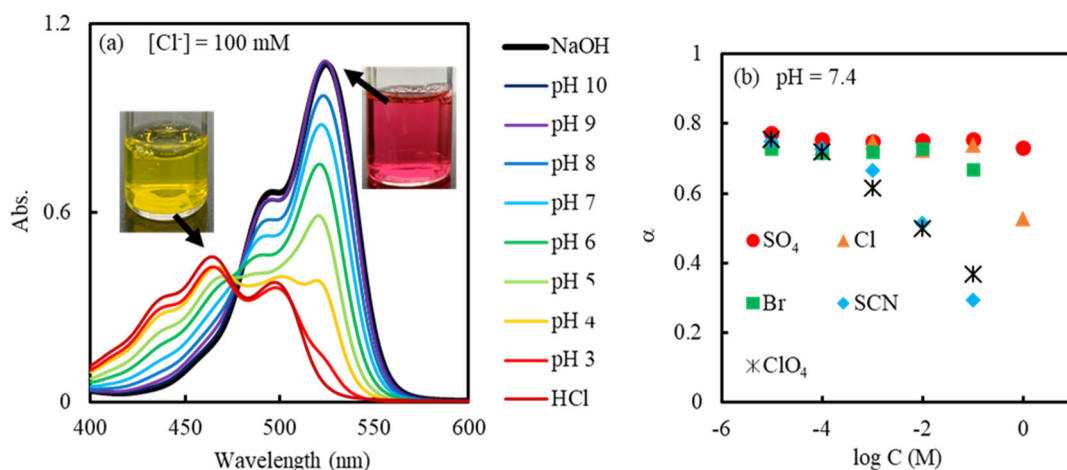


Fig.8 (a) pH-dependent absorption spectra of nano emulsion composed of $[P_{6614}][12-FL]$ under constant anion concentration. (b) Anion response curves of nanoemulsion composed of $[P_{6614}][12-FL]$ under constant pH.

次に、Fig.4に示した協同抽出に基づく応答性確認を行った。Fig.8(a)は塩化物イオン濃度を 100 mM で一定とし、pH を変化させたときのナノエマルジョン溶液のスペクトル変化を示す。フルオレセイン部位のプロトン化に伴うスペクトル変化があることがわかる。一方、Fig.8(b)は、pH を一定とし、アニオン濃度を変化させたときのスペクトルから最大吸収波長での吸光度を規格化してプロットしたものである。これらの結果から、ナノエマルジョンにおいても Fig.4 に示した協同抽出機構で応答していることが明確に示された。また、ナノエマルジョンに基づくアニオンセンシングが実現できていることがわかる。

4. まとめと今後の課題

本提案では“蛍光性色素液体”を用いて蛍光共鳴エネルギー移動(以下 FRET と略す)の極限感度を実現し、ナノエマルジョン作製と分子認識機能の付与に基づく FRET 型 “極限感度イオンセンシング”実現を目指した。薄膜を用いた(D)(A)比率の検討から、本提案では最大で約 22 倍の高感度化が実現できることを示した⁶⁾。また、イオノフォア分子の利用でイオン選択性も制御できることが分かった。さらに、ナノエマルジョン化の検討から、薄膜同様のアニオン応答性があることを明らかにした。

今後、極限感度ナノエマルジョンをカチオン種へ展開し、さらなる高感度イオン分析の実現を図る。

5. 文献

- (1) Trofymchuk, K.; Reisch, A.; Didier, P.; Fras, F.; Gilliot, P.; Mely, Y.; Klymchenko, A. S. *Nat. Photonics* 2017, 11, 657–663.
- (2) Bakker, E.; Bühlmann, P.; Pretsch, E. *Chem. Rev.* 1997, 97, 3083–3132.
- (3) Hisamoto, H.; Miyashita, N.; Watanabe, K.; Nakagawa, E.; Yamamoto, N.; Suzuki, K. *Sens. Actuators, B* 1995, 29, 378–385.
- (4) Hofmeister, F.; *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.*, 1888, 14, 247.
- (5) Xiao, K. P.; Bühlmann, P.; Nishizawa, S.; Amemiya, S.; Umezawa, Y. *Anal. Chem.* 1997, 69, 1038–1044.
- (6) Mizuta, T.; Sueyoshi, K.; Endo, T.; Hisamoto, H. *Anal. Chem.* 2021, 93, 4143–4148)

High Sensitivity Cation / Anion Sensing Based on "Extreme Emission" Fluorescent Dye Liquid Nanoemulsion

Hideaki Hisamoto

Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering,
Osaka Prefecture University

Summary

In this work, highly selective and sensitive sensing method for ions was developed by using the "fluorescent dye liquid" composed of donors and acceptors realizing the ultimate sensitivity of fluorescence resonance energy transfer (FRET). Furthermore by preparing the nanoemulsion using the dye liquid, highly-sensitive sensing of important ions in seawater component was tried. In particular, highly sensitive sensing for Cl^- was demonstrated as an example.

In the fundamental study based on the dye liquid thin film, the fluorescence spectrum of the plasticized PVC film prepared with the donor dye liquid (D) and the absorption spectrum of the plasticized PVC film prepared with the acceptor dye liquid (A) showed good overlap, and clarified the applicability to the FRET system. Based on the examination of the ratio of A and D contained in the film (A / D ratio), it was clarified that a maximum of approximately 22 times higher sensitivity fluorescence can be obtained.

Application to ion sensing enabled the anion sensing based on the coextraction mechanism of protons and anions. In the case of coextraction type anion sensing, ion selectivity is generally determined by the order of hydrophobicity of anion species. Therefore, Chloride ionophore IV was applied as a chloride ionophore to improve chloride ion selectivity. As a result, selectivity improvement of about 10 times or more was observed especially for SCN^- . In the future, further improvement in selectivity can be expected from the examination of the dye liquid composition.

Concerning the nanoemulsification, examining the amount of surfactant clarified that nanoemulsions with an average particle size of about 78 nm can be obtained under optimized condition. As a result of confirming the response based on the coextraction, good spectral changes were obtained, and even in nanoemulsions, anions sensing based on the coextraction mechanism successfully worked. Further continuation of present work would lead to the development of extremely sensitive nanoemulsions for detecting cations of interest.