

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：13601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06243

研究課題名(和文) ECL原理を利用した迅速・簡便な覚せい剤スクリーニング検査法の開発

研究課題名(英文) Development of simple primary screening method for methamphetamine based on electrochemiluminescence

研究代表者

高橋 史樹 (TAKAHASHI, Fumiki)

信州大学・先鋭領域融合研究群環境・エネルギー材料科学研究所・助教(特定雇用)

研究者番号：40754958

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：電気化学発光(ECL)原理を利用して、覚せい剤であるメタンフェタミン(MA)の簡便な検出法の開発を行った。ルテニウム錯体を発光プローブとして用いた場合、溶液にMAが含有すると、明瞭なECLが観測された。その反応機構の解析を行うため、MAに類似した化学構造を有する化学種についてECL挙動を系統的に調べた。得られた知見に基づいて、生体試料中のMAの一次スクリーニング法への可能性について検討するとともに、高感度のMA検出法への展開するため、電位変調法を用いた新しいECL検出法を提案した。

研究成果の概要(英文)：A primary screening method for methamphetamine (MA) as a stimulant drug was studied by electrochemiluminescence (ECL). The obviously ECL responses was measured in the presence of MA in sample solution when ruthenium complex was used as ECL probe. In order to observe the ECL reaction mechanism, the typical amphetamine type drugs were systematically measured. By the measurements, a simple and rapid screening method for MA is proposed in this study, and was applied in the determination of MA in biological samples with sensitivity based on potential modulation techniques.

研究分野：電気化学分析

キーワード：電気化学発光 メタンフェタミン 電位変調ポルタンメトリー

## 1. 研究開始当初の背景

薬物の乱用に起因する殺人等の凶悪犯罪や自動車事故が深刻な社会問題として提起されており、その対策が我が国の重要な課題となっている。その内、覚せい剤による事犯は、検挙人員で1万人を超え、全薬物事犯の80%以上を占めるため、薬物事犯の最重要課題と位置づけられている(H28.3 警察庁統計)。そのため、国内で通している覚せい剤であるメタンフェタミン (MA)を正確に検出することは、その不正使用の有無の判定に極めて重要である。

生体試料からの MA の検出法として、ガスクロマトグラフィー質量分析(GC-MS)法や液体クロマトグラフィー質量分析(LC-MS)法が高感度および選択的な測定法として一般的に行われている。しかし、その分析操作は比較的煩雑で、分析結果を得るまでに時間を要するなどの問題が挙げられていた。そこで、シモン試薬やマルキス試薬による呈色試験やイムノアッセイキットが現場での MA 検出の予備試験として行われてきた。ただし、これらの予備試験はコストの問題や、MA に対して偽陽性を示す化学種があることが示唆されていた。上記の予備試験法と組み合わせることで、MA の誤判定防止に向けた新しい検出原理の開発が求められてきた。

## 2. 研究の目的

電気化学発光(ECL)は電極反応に伴って発光する現象である。多くの蛍光化学種が ECL プロブとして利用できることが報告されているが、特にトリス(2,2'-ピピリジル)ルテニウム錯体( $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ )は、強い ECL 収率を示すことが知られている。この  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  錯体を含む溶液中にトリプロピルアミン(TPA)などの脂肪族アミン類物質を共存させ、 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  錯体の酸化電位を印加すると、電極表面から発光する。この一連の共反応物型の ECL 反応は、蛍光分析法と比べて、励起光源に由来するバックグラウンド信号がないため、高感度の分析法としての展開が期待されている。また、電気化学的にその発光を制御でき、検出システムを比較的小型化できる特長を有している。そのため共反応物型の ECL 反応として、アミン類、ビタミン類および含リンアミノ酸系除草剤などについて ECL を用いた分析法が多数報告されている。

その一方で、この ECL 法を利用した薬物分析への展開例は少なく、覚せい剤である MA の検出法への確立は行われていなかった。そこで、本研究課題では達成目標を以下のように設定した。

(1) ECL 強度は電極からの距離に大きく依存するため、再現性の高い測定システムの構築を行った。また、将来の MA 検出に向けて、微量サンプルに対応するための、マイクロ

ECL 計測システムとすることで、簡便な検出法としての展開を試みた。

(2) MA/ $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 系の ECL 現象を解明するため、電気化学挙動を含めた反応機構の推測を行った。また、MA と構造が類似したアンフェタミン型の薬物群を ECL の共反応物として用い、その化学構造との関係を明らかにするとともに、MA の選択的な検出法としての展開を試みた。

(3) 尿などの実際の試料中には、目的とする化学種の他に多数の妨害成分が共存しているため、本 ECL 原理を直接 MA 検出法として適用することは難しい。そこで、簡便な溶媒抽出法と組み合わせた、水/有機溶媒/アルコール混和溶液中の MA の ECL 挙動について検討した。同時に、本法を高感度の MA 検出法として用いるために、電位変調 ECL 測定法への展開を試みた。

## 3. 研究の方法

(1) 作用電極と光ファイバの一端との距離と角度を固定化できる電気化学電解セルを構築した。このセルは約 1 mL の試料に対して正確な電気化学および ECL 応答を記録できることを確認するため、既存の ECL 計測システムとの比較を行うことで実験を行った。まずは TPA を共反応物として用いた  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  系の ECL 挙動を確認することで、実験を進行した。

(2) 構築した電気化学電解セルを用いて、MA の電気化学挙動をボルタノメトリーにより確認すると共に、 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 系の ECL 応答を測定した。従来、MA の電気化学挙動に関する知見はほとんど得られていなかったことから、今回、その電気化学挙動と ECL 挙動を同時に取得することで、反応中間体の存在などを理解できると考えられた。

(3) MA と構造が類似した化学種であるアンフェタミン(AM)、ジメチルアンフェタミン(DMA)およびメトキシフェタミン(MP)についても電気化学および ECL 挙動の確認を行った。これらの化学種の挙動について、MA と比較検討することで、ECL 反応に参与する反応中間体の構造を推定できると考えられる。また、その系統的な知見に基づいて、MA の一次スクリーニングへの展開を図った。

(4) 水/有機溶媒/アルコール混和溶液中の MA/ $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 系の電気化学および ECL 挙動を検討した。さらに、MA を添加した模擬尿資料について、溶媒抽出を用いて抽出した試料について同様の ECL 測定を行うことで、妨害成分の影響についての比較検討を行った。

## 4. 研究成果

(1) 先ず、構築した電解セルを用いて、リン

酸緩衝溶液(PBS)に 0.5 mM の  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  及び TPA を混合した後に、電極へ電位を印加したところ、明瞭な ECL が観測された。この電気化学および ECL 挙動は再現性の高い測定が可能であったことから、続いて、MA/ $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  系の ECL 測定を行った。その結果、 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  の酸化電位付近で電極表面からの明瞭な発光が認められた。この ECL 強度は MA の濃度に対して直線関係を示し、0.75  $\mu\text{g}/\text{mL}$  までの検出が可能であった ( $S/N = 3$ )。そこで、MA の電気化学挙動を再確認したところ、弱塩基性の条件下、MA はグラッシーカーボン電極上において、僅かに酸化されることが確認された。MA/ $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  系の ECL 反応は、電極反応により生成した MA ラジカルと、同時に生成している  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$  が反応することで、励起状態の  $^*\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  が生成し、発光する反応機構が提案された。

(2) MA と構造が類似した覚せい剤の AM についても同様に検討したところ、 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  に対する ECL 活性は認められなかった。本 ECL 法を用いることで MA と AM の選択的な検出が可能であると考えられる。一方、麻薬である DMA は  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  に対して強い ECL 活性を有することが認められた。これらの結果から、 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  系の ECL 活性は第一級アミン < 第二級アミン < 第三級アミンの順に大きくなることを確認された。そのため、MA と DMA を ECL のみで区別することは困難であった。しかし、同時に記録される DMA のボルタモグラムでは MA では観測されない酸化ピークが現れたため、それぞれの化学種の識別が可能であると考えられた。引き続き、医薬品成分である MP について検討した。電位掃引法を用いて電位を印加すると、MA と MP は共に電極表面から発光するため、単純な ECL 測定による識別は難しいことが分かった。しかし、MP の場合では  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  の酸化電位よりも更に高い電位を印加すると、MA には認められない新しい ECL ピークが現れることが見出された。MP の化学構造中ではベンゼン環にメトキシ基が置換しているため、その電子供与性によって、電極反応で生成したカチオンラジカルが安定化されることで、特徴的な ECL 挙動を示したと考えられた。以上の知見から、ECL 原理を利用した電気化学及び ECL 挙動を詳細に解析することで、MA の一次スクリーニング法としての展開についての可能性が示唆された。

(3) ECL 法について、MA を添加した尿試料への応用について検討した。MA を実際の尿試料へ添加し、ECL 測定を行ったところ、MA の有無によらず ECL が観測される結果が得られた。尿試料中には生体由来の妨害成分が共存するため、多量に試料中に存在していたアスコルビン酸が ECL 測定に対して正の妨害を示したことが分かった。そこで、酢酸エチルを用いた溶媒抽出法によって、尿試料から MA をアルカリ性条件下で抽出し、PBS/

### (A) Conventional DC ECL responses

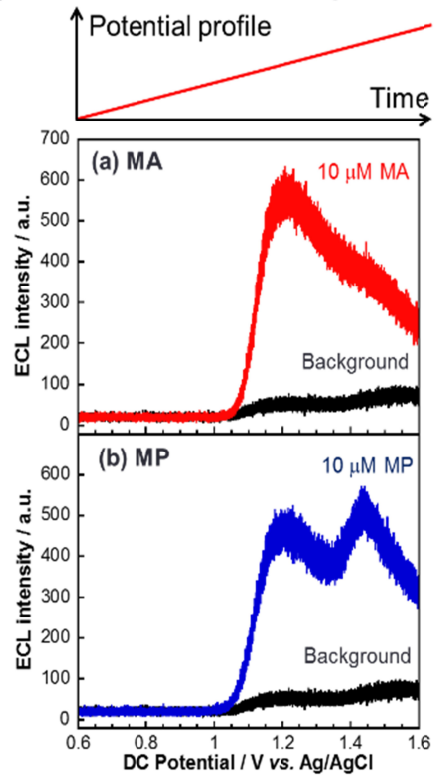


図 1 電位掃引法を用いて測定したときの 0.50 mM  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  を含む PBS(pH 9.0) の ECL 挙動。

### (B) PMECL responses

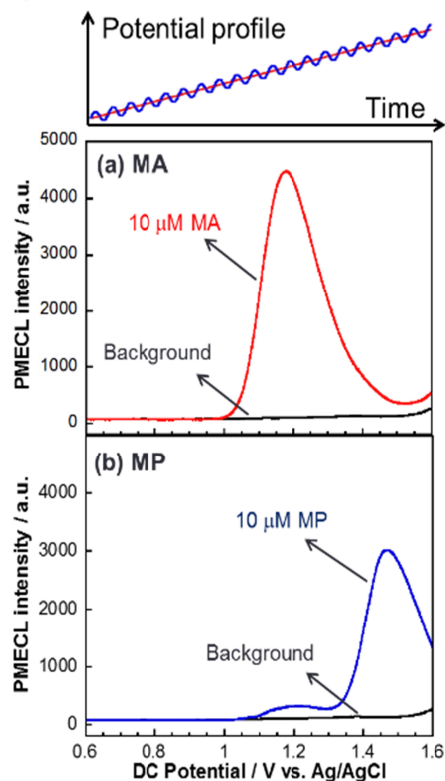


図 2 電位変調法を用いて測定したときの 0.50 mM  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  を含む PBS(pH 9.0) の ECL 挙動。

メタノール溶液で混和した溶液について ECL 測定を行った。その結果、試料中に含まれるアスコルビン酸の妨害を除去して検出できることが分かった。さらに、PBS/酢酸エチル/メタノール系では、通常の PBS のみの系の ECL 測定に比べて、ECL 強度が変化することが確認された。有機溶媒である酢酸エチルがラジカル中間体の安定性を向上させることで、その寿命が長くなり、ECL 強度が上昇したと考えられた。この ECL 強度と酢酸エチルの混合比には大きな関係性があり、定量的に解析することでラジカルの寿命等の知見が得られることが示唆された。

(4) MA の化学構造は第二級のアミン骨格を有するため、その ECL 強度は第三級のアミン類と比べた場合、低いことが確認された。そのため、通常の電位掃印法による ECL 測定では MA に対する検出感度が比較的低い問題があった(図 1)。また、MP に対する ECL 挙動の差異も明瞭ではなかったことから、MA の識別法としての利用は困難であると予想された(図 1(a), (b))。そこで、ECL 原理を用いた、MA の検出感度の向上とシグナルの分解能の改善を目的として、電位変調(PM)法を利用した ECL 測定系を新たに構築し、MA および MP/Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>系の ECL 挙動について検討した。直流電位上に、特定の交流電位を重畳させ、その交流成分に対応する微小 ECL 信号をロックインアンプにより検出した結果を図 2 に示す。PMECL 測定を用いることで、通常の ECL 測定に比べて 10 倍以上の高い感度で MA を測定できることが分かり、約 0.050 µg/mL までの検出が可能であった(図 2(a))。さらに、PMECL 測定では、通常の電気化学測定の結果と比べてシャープな ECL シグナルを得ることができた。一方、MP を共反応物として用いた場合では、MA とは異なる PMECL 挙動を示し、シグナルの分解能の向上が達成された(図 2(b))。この PMECL 測定による分解能の向上によって、従来の電気化学測定では不明瞭であった、MA と MP の識別を達成できることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計 8 件)

高橋 史樹、清水 亮、新田 咲、金 継業、電位変調法を利用した電気化学発光によるメタンフェタミンの高感度検出法の開発と応用、日本法科学技術学会第 22 回学術集会、2016 年 11 月 10 日～2016 年 11 月 11 日、東京

高橋 史樹、清水 亮、新田 咲、金 継業、水/有機溶媒混合溶液中におけるルテニウム錯体(Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>)/メタンフェタミン系の電気化学発光挙動の解析、日本分析化学会第 65 年会、2016 年 9 月 14 日～2016 年 9 月 16 日、北海道、札幌

新田 咲、清水 亮、金 継業、高橋 史樹、電位変調-電気化学発光法を利用したメトキシフェタミン鎮咳成分の高感度検出法の開発と応用、日本分析化学会第 65 年会、2016 年 9 月 14 日～2016 年 9 月 16 日、北海道、札幌

Fumiki Takahashi, Saki Nitta, Hirosuke Tatsumi, Jiye Jin, Teruo Hinoue, Development of Primary Screening Method for Methamphetamine (MA) Based on Electrochemiluminescence (ECL) and Characterization of Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>/MA ECL System, August 28 – September 1, 2016, The 54<sup>th</sup> Annual Meeting of the International Association of Forensic Toxicologists (TIAFT2016), Brisbane, Australia

高橋 史樹、新田 咲、巽 広輔、金 継業、樋上 照男、電気化学発光(ECL)を利用したメタンフェタミンのスクリーニング検査法の開発と ECL 反応機構の解析、日本法中毒学会第 35 年会、2016 年 6 月 30 日～2016 年 7 月 1 日、大阪

新田 咲、巽 広輔、金 継業、樋上 照男、高橋 史樹、ルテニウム錯体 (Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>) を用いたメトキシフェタミン鎮咳成分の電気化学及び電気化学発光挙動の解析、第 76 回日本分析化学討論会、2016 年 5 月 28 日～2016 年 5 月 29 日、岐阜

Fumiki Takahashi, Masanori Matsuoka, Jiye Jin, Teruo Hinoue, Effect of Ultrasound on Electrochemiluminescence of Tris (2,2'-bipyridine) ruthenium with Various Coreactants, November 5 – 7, 2015, The 36<sup>th</sup> Symposium on Ultrasonic Electronics (Use2015), Ibaraki, Japan

高橋 史樹、新田 咲、北野 拓磨、巽 広輔、金 継業、樋上 照男、電気化学発光(ECL)を利用した覚せい剤の選択検出法の開発と ECL 反応機構の解析、日本分析化学会第 64 年会、2015 年 9 月 9 日～2015 年 9 月 11 日、福岡 [展望とトピックス]

[産業財産権]

○出願状況(計 1 件)

名称：薬物の検出方法  
発明者：高橋史樹、金継業  
権利者：信州大学  
種類：特許  
番号：特願 2017-032781  
出願年月日：2017 年 2 月 24 日  
国内外の別：国内

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

高橋 史樹 (TAKAHASHI, Fumiki)

信州大学・先鋭領域融合研究群環境・エネルギー材料科学研究所・助教（特定雇用）  
研究者番号：40754958