

令和 2 年 6 月 24 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17776

研究課題名（和文）電気化学発光による新規覚せい剤検出原理の確立とスクリーニング分析法の開発

研究課題名（英文）Establishment of a new principle for the detection of methamphetamine by electrochemiluminescence and development of the screening method

研究代表者

高橋 史樹 (Takahashi, Fumiki)

信州大学・学術研究院理学系・助教

研究者番号：40754958

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、電気化学発光（Electrochemiluminescence, ECL）原理を利用して、覚せい剤であるメタンフェタミン（MA）を簡便に検出するためのシステムの構築および反応機構の解明を行った。トリス(2,2'-ビピリジル)ルテニウム錯体を発光プローブとして用い、MAおよびその類似化学種のECL挙動について比較検討することで一次スクリーニング法の創出に関する基礎研究を行った。また、電位変調法を組み合わせたECL検出システムについても検討し、簡便で高感度のMA検出方法の開発を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

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、その対策が我が国の大きな課題となっていた。特に覚せい剤による事犯は、検挙人員で1万を超えているため、簡便な検出方法の開発が求められていた。現在、国内で流通している覚せい剤の多くはメタンフェタミン（MA）であることから、本研究課題では電気化学発光（Electrochemiluminescence, ECL）法を用いた簡便な検出システムの構築と反応機構の解析を行った。ECL法を利用したMAの分析方法は法医学化学領域への展開例は限定的であったことから、分析化学の適用範囲の拡張に資する、独創的かつ有意義な研究と考えられた。

研究成果の概要（英文）：In this study, we have developed a system for the simple detection method of methamphetamine (MA), a stimulant drug, using the electrochemiluminescence (ECL) principle and elucidated the reaction mechanism. Tris(2,2'-bipyridyl) ruthenium (II) was used as ECL probe, the behavior of MA and the analogues were compared for foundation research on the development of a primary screening method. An ECL detection system with a potential modulation technique was also investigated and a simple and sensitive method for detecting MA was developed.

研究分野：分析化学

キーワード：電気化学発光 電位変調 薬毒物分析 超音波

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 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、その対策が我が国の大きな課題となっていた。特に覚せい剤による事犯は、検挙人員で1万を超えており、全薬物事犯の80%以上を占めるため、薬物事犯における重要課題と位置付けられていた[1]。このうち、国内で流通している覚せい剤のほとんどはメタンフェタミン(MA)であり、試料中に含まれるMAを正確に検出することが必要であった。MAの分析方法として質量分析計や赤外分光光度計と組み合わせたガスクロマトグラフィーや液体クロマトグラフィーが用いられ、極めて高い感度および精度を有する検出方法として実務上用いられている。しかし、これらの方法は比較的煩雑な操作を要し、多検体の試料を分析するためには長い検査時間が必要であった。そのため、多検体の試料からの覚せい剤の検出のための予試験を行う必要があり、呈色試験法やイムノアッセイキットが利用されていた。一方、これらの試験法は精度およびコストの課題が挙げられていた。そのため、異なる検出原理に基づく覚せい剤スクリーニング検出法の確立が必要であった。

電気化学発光(Electrochemiluminescence, ECL)は電気化学反応に伴って発光する現象である。トリス(2,2'-ピリジン)ルテニウム( )錯体( $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ )系のECL反応は、高いECL収率を示すため、代表的なエミッターとして最も広く研究されている。この $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ を含む溶液中に第三級アミンの*n*-トリプロピルアミンなどの脂肪族アミン類物質(共反応物質)が共存する場合、電気化学酸化過程を伴って発光する。このECL原理を用いて共反応物質を検出する分析法が多数報告されおり、特にアミン類を検出する場合には、従来の誘導体化反応を必要とする蛍光検出法に比べて、高い感度で検出できる可能性が示唆されている。しかし、この反応を利用した法科学分析への展開例は少なかったことから、分析領域の拡大を図るため、ECL原理に基づくMA分析法を提案した。

### 2. 研究の目的

近年、研究代表者は $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ を発光プローブとして用いたECLについて、覚せい剤検出への応用に展開したところ、MAにECL活性があることを見出している。しかし、その反応機構の解析は完全には行われていなかった。また、この反応系におけるECLシグナルも比較的微弱で、高感度のMA検出法としての利用には制限があった。そこで、本研究では以下の達成目標を設定し、ECL原理に基づくMAの新しいスクリーニング技術の開発を行った。

#### (1) MA / $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 系のECL反応機構の解明

ECL反応は電極表面における電子移動反応に伴って生じるラジカル中間体と発光プローブが後続化学反応することで励起状態となり、発光する。観測されたECL強度から溶液中に存在するMA濃度を決定することができる。そのため、ECL反応機構を詳細に解明することがMAを正確に定量する上で重要である。そこで、MAと類似薬毒物成分とのECL応答の比較検討することで、MA /  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 系のECL反応機構の解明を行った。

#### (2) 電位変調法を用いた高感度ECL測定システムの構築と評価

$\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ をECLエミッターとした反応は脂肪族アミン類の高感度分析法として利用されており、その強度は一般的に、第一級、第二級、第三級アミン類の順に大きくなる。そのため、第二級アミンであるMAを共反応物として用いた場合にはECL強度は比較的小さい問題があった。そこで、高いS/N比でシグナルを検出することが可能であると報告されていた電位変調法をECL原理に適用することで、高感度のMA検出システムの構築と評価を行った。

#### (3) ECL法を利用したMA検出法の創出に向けた新しい反応場の設計

ECL反応は電気化学反応に付随する発光反応であるため、その反応過程で生じるラジカル中間体を効果的に生成することで、ECL反応を制御および高感度化に適用できると考えられた。そこで、超音波照射によるキャピテーションの発生によって局所的な高温・高圧の反応場下でのECL挙動について検討した。キャピテーションの条件で生成するヒドロキシルラジカル( $\cdot\text{OH}$ )の生成は共存する有機化学種を酸化的に分解することが知られている。この過程で生じる有機化学種由来のラジカル中間体がECL反応におよぼす影響を調べることで、新しいECL反応場として提案した。また、超音波の照射は電極界面における物質輸送の促進と、電極材料自身の再活性化できるなどの物理的な作用も有している。本研究では超音波照射下でのECL反応を新しいMA検出反応場として発展させるため、基礎的な知見の取得を行った。

### 3. 研究の方法

(1)  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ をECLプローブとして用いて、MAおよび類似する薬物群についてECL反応機構の詳細な解析を行った。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ECL計測システムを構築した(図1)。電極表面からの微弱発光は、本事業の補助によって整備した浜松ホトニクス社製H11901-01光電子増倍管、C10709低電圧電源及びC7319

アンブユニットと組み合わせた微弱発光計測モジュールによって、計測システムを構築した。通常の直流電位掃引法を用いた ECL 測定では、電極電位の制御やボルタムメトリーはポテンシヨスタットにより行い、得られた微弱発光は AD/DA 入出力ユニットによってデータ収集および解析を行った。

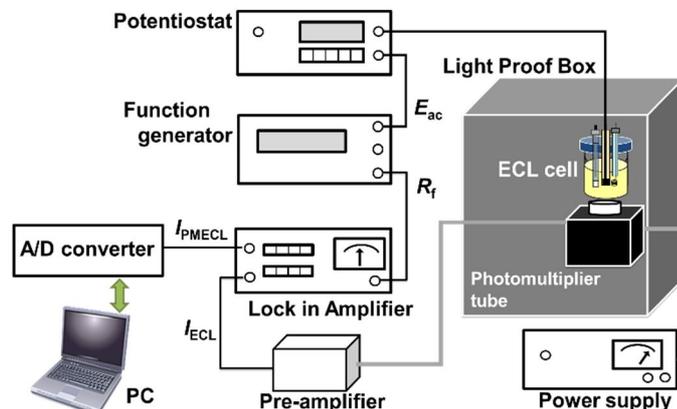


図 1. ECL および電位変調 ECL 計測システムの構成図。

(2) ファンクションジェネレータから発生させた交流電位を直流電位に重畳させた電位を電極に印加し、得られた発光信号をロックイン検出した。この電位変調 ECL シグナルを、ファンクションジェネレータからの参照信号と対応させることで、交流成分に対応した ECL シグナルを検出した。

(3) 430 kHz の超音波照射下における ECL 測定を行った。超音波照射によるキャビテーション現象に由来する  $\cdot\text{OH}$  が ECL 反応に与える影響について評価するため、局所麻酔薬であるリドカインを代表化学種として用いた  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  系の ECL 測定システムを構築し、基礎的な知見を得た。

#### 4. 研究成果

(1) 構築した電解セルを用いて、MA と類似化学種であるフェネチルアミン系の薬毒物の電気化学および ECL 挙動について比較検討した。0.50 mM の  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  を含むリン酸緩衝溶液 (PBS) に (A) アンフェタミン、(B) MA および (C) ジメチルアンフェタミンをそれぞれ混合した後、電位を印加した際の電流応答および ECL 応答を図 2 に示す。第二級アミン骨格を有する MA が溶液中に共存した場合には  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  の酸化電位付近 (+1.2 V vs. Ag/AgCl) で明瞭な発光が認められたことから、MA 検出法としての利用が期待された (図 2 (B); 下段)。また、アンフェタミンの場合では電極表面からの発光が認められなかったことから、ECL 測定によって MA とアンフェタミンを識別して検出できることが示唆された。一方で、第三級アミン骨格を有するジメチルアンフェタミンでは MA と比較して強い ECL 活性を有したことから単純に ECL 反応を比較検討するのみでは区別して検出することは出来なかった。そこで、同時に記録されるサイクリックボルタモグラム (電流応答) に着目したところ、ジメチルアンフェタミンの場合では第三級アミンの酸化に由来する +0.8 V 付近での酸化ピーク電流が観測されることが分かった (図 3 (C); 上段)。これらの結果から、ECL 応答と電流応答を相補的に解析することで第一級アミンであるアンフェタミン、第二級アミンである MA および第三級アミンであるジメチルアンフェタミンの識別法として利用できることが分かり、化学構造中のアミノ骨格が反応に関与していることが推察された。MA は電気化学的な活性は低い、一部は電極上で酸化されることでプロト

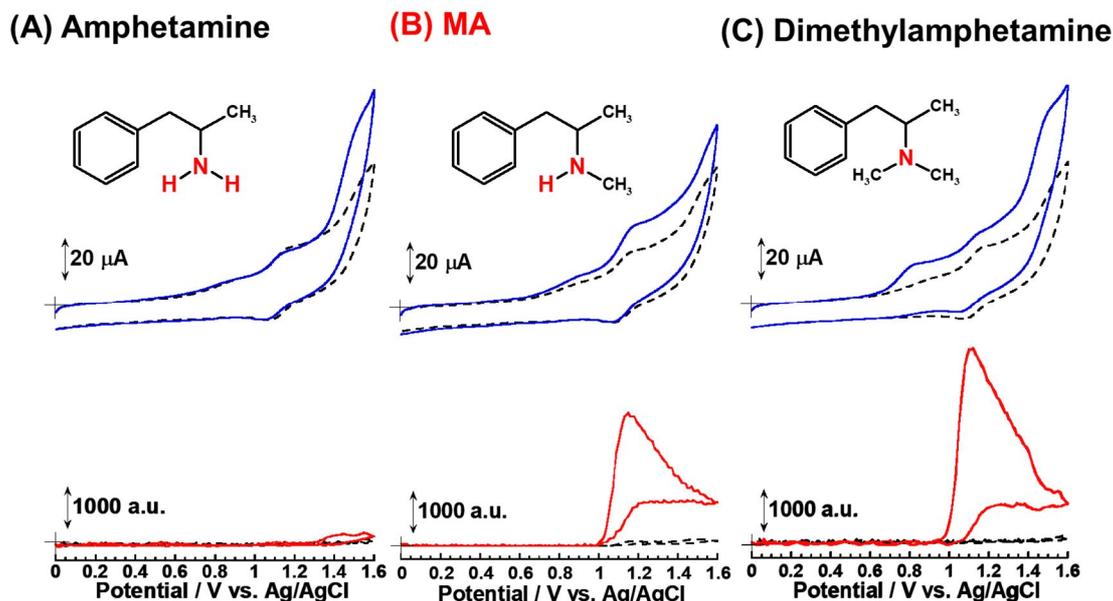


図 2  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  系における覚せい剤と類似麻薬等の (上段) 電気化学および (下段) 電気化学発光挙動。

ン脱離を伴って MA ラジカルが生成している。生成した MA ラジカルと電気化学酸化によって同時に生成している  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$  が後続化学反応することで励起状態の  $^*\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  が生成し、発光する反応メカニズムを提案した。また、ジメチルアンフェタミンの応答は矩形波ポルタンメトリーを用いた電気化学測定によって高感度に検出できることを確認したことから、ECL 分析法と組み合わせることでフェネチルアミン系の薬毒物の一次スクリーニング分析法が提案された。

(2) 図3 (A)は0.50 mMの  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  を含む PBS に 10  $\mu\text{M}$  の MA (上段) および類似医薬品成分のメトキシフェナミン (MP; 下段) を含む溶液に電位掃引法により電位を印加した場合の ECL プロファイルをそれぞれ示す。MA は +1.2 V 付近で一つの ECL ピークを有するシグナルが観測されたのに対し、MP の場合では +1.45 V 付近にも ECL ピークを示す特徴的な応答を示した。この高電位側の ECL シグナルを検出することで MA と MP を識別して検出することが推察された。しかし、低濃度領域における ECL 応答の差異は明瞭ではなかったことから、単純な直流 ECL 測定では二つの化学種の識別は困難であった。そこで、ECL 応答の感度の向上とシグナルの分解能の改善を目的とした電位変調 ECL 測定を行った。図3 (B) は、10 Hz の周波数、100 mV の振幅の交流

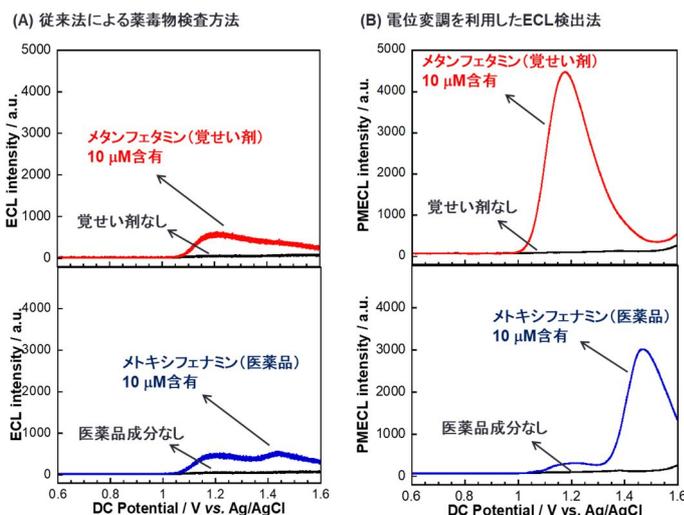


図3 メタンフェタミン(覚せい剤)とメトキシフェナミン(医薬品:ドーピング薬物)のECL分析結果。電位変調 ECL 分析による結果の方が 10 倍以上の S/N 比で検出・識別できた。

成分を直流電位に重畳させた際に得られた ECL シグナルについて、交流成分をロックイン検出した結果を示す。通常の直流 ECL 測定の場合と比較して、S/N 比を 10 倍以上向上して検出でき、MA の高感度検出法としての利用が期待された。また、MA の場合では +1.2 V においてピークが現れたのに対して、MP を共反応物に用いた場合では +1.45 V にピークシグナルが観測された。それぞれのピークシグナルは直流 ECL 測定の場合と比較して、高い分解能で検出が可能であったことから、MA と MP の識別法として有用であることが示唆された。

(3) ECL 反応は、本質的に電極表面で生成したラジカル化学種と発光化学種である  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  の酸化体である  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$  が後続化学反応することで発光する現象である。そのため、ECL 反応に関与するラジカル化学種を効率よく供給できるシステムを設計することで、新しい反応場としての展開が期待される。そこで、局所的な高温・高圧反応場を形成することができると報告された 430 kHz の超音波照射下での ECL 測定を行った。超音波のキャビテーションが生成している条件では水分子が熱分解され、 $\cdot\text{OH}$  と水素ラジカルが連続的に供給されている[2]。このうち、 $\cdot\text{OH}$  は特に高い酸化力を有しているため、溶液中に存在している有機化学種と反応し、反応性の高い中間体の生成を経て分解生成物となる。この反応中間体が ECL 強度を増加させることが出来ることが推察された。今回、 $\cdot\text{OH}$  による酸化分解が起こりやすいと考えられたリドカインを代表化学種とした際の ECL 挙動について、超音波照射の影響を調べた。

まず、リドカインの  $\cdot\text{OH}$  による分解過程を調査した。0.50 mM 含むリン酸緩衝液に 430 kHz の超音波を照射した後、本研究課題によって整備したガスクロマトグラフィー-質量分析装置を用いて、生成した化学種を特定した。50 W の出力の超音波を間接照射した場合には、リドカインの分解に伴って 2,6-xylylidine が生成することが分かった。超音波キャビテーションによって生成した  $\cdot\text{OH}$  がリドカインの化学構造中のアミド結合を開裂することで 2,6-xylylidine が生成したと考えられた。この過程で、反応中間体ラジカルが生成していることが示唆されたことから、ECL 反応に与える影響を調べた。

リドカインを含む溶液に  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  を pH 11 の PBS 条件下で電位掃引により電位を印加すると、ECL 応答を示すことが確認され、+1.2 V と +1.45 V 付近にピークを有する ECL プロファイルが得られた。+1.2 V における ECL は、リドカインの第三級アミン部位の酸化によって生じた中間体が同時に電気化学反応によって生成している  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$  と後続化学反応することで発光する反応ルートが提案された。一方、+1.45 V 付近の高電位領域では、リドカイン自身が電気化学酸化によって分解し、反応中間体ラジカルが ECL 反応する複雑な反応機構が推測された。そこで、反応中間体ラジカルを *in-situ* で供給できる条件の 430 kHz の超音波照射下での ECL 測定を行ったところ、ECL 強度が著しく増加することが分かった。しかし、超音波照射下では ECL 反応に加えて、ソノルミネッセンスによるバックグラウン

ドシグナルが発生するため、正確な反応機構の考察が困難であった。そこで、高い  $S/N$  比でシグナルを検出できる電位変調 ECL 測定と組み合わせたところ、超音波照射下においてもリドカイン/Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>系の ECL を明瞭に検出できることが可能であった。電位変調 ECL 測定結果は、+1.2 V 付近の ECL 強度が著しく増大した一方で、+1.45 V 付近の ECL 強度は相対的に減少した。分解生成物である 2,6-xylydine は ECL 活性を示さなかったことから、超音波反応場中で *in-situ* 生成した・OH がリドカインを酸化し、その反応中間体ラジカルが+1.2 V 付近の ECL 反応に寄与したことが考えられた。以上の結果から、超音波を用いることで、電気化学的にマイルドな条件で ECL 測定を行うことが出来る可能性が示唆された。この現象はキャビテーション誘起による新しい ECL 反応場として、薬毒物分析法への展開が期待された。

(4) その他、本研究課題の遂行中において、効果的な薬毒物抽出法についても検討を行った。高周波加熱抽出法は従来、高分子化合物中の添加物分析などに用いられているが、本研究では爪資料中の薬毒物の抽出方法として利用した。ガラス管に爪資料と抽出溶媒を加えた後に封印し、パイロオイルをらせん状に巻きつけた上でパイロライザにより高周波加熱した。爪資料に対して、230 °C のパイロライザを用いた場合、効果的に取り込まれていたカフェインを抽出溶媒に溶出できることを確認し、液体クロマトグラフィー-質量分析によってスクリーニング分析できることが分かったことから、この抽出方法を ECL 分析に展開するための検討を行っている。

#### < 引用文献 >

- [1] 令和元年度版 薬物乱用のない社会を, 2019.
- [2] J. Jin, H. Kumeta, F. Takahashi, Y. Asakura, Sensitive Detection of Hydroxyl Radical Production in Ultrasonic Field with an Electrochemiluminescence Optical Sensor, Chemistry Letters, 38 (2009) 292-293.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takahashi Fumiki, Shimizu Ryo, Nakazawa Tomoyuki, Jin Jiye	4. 巻 63
2. 論文標題 Potential-modulated electrochemiluminescence of a tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(II) / lidocaine system under 430kHz ultrasound irradiation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Ultrasonics Sonochemistry	6. 最初と最後の頁 104947 ~ 104947
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ultsonch.2019.104947	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takahashi Fumiki, Kobayashi Masaru, Kobayashi Atsushi, Kobayashi Kanya, Asamura Hideki	4. 巻 23
2. 論文標題 High-Frequency Heating Extraction Method for Sensitive Drug Analysis in Human Nails	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 3231 ~ 3231
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules23123231	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takahashi Fumiki, Nitta Saki, Shimizu Ryo, Jin Jiye	4. 巻 36
2. 論文標題 Electrochemiluminescence and voltammetry of tris(2,2'-bipyridine)ruthenium (II) with amphetamine-type stimulants as coreactants: an application to the discrimination of methamphetamine	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Forensic Toxicology	6. 最初と最後の頁 185 ~ 191
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11419-017-0388-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中澤 朝之, 松田 和真, 清水 亮, 高橋 史樹
2. 発表標題 分子インプリントポリマーと組み合わせた電気化学発光によるリドカイン麻酔薬の選択検出
3. 学会等名 第50回 中部化学関係学協会支部連合秋季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中山 朝之, 高橋 史樹, 金 継業
2. 発表標題 CdTe量子ドットを用いる共反応物型電気化学発光反応の分光電気化学的考察
3. 学会等名 第50回 中部化学関係学協会支部連合秋季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中澤 朝之, 松田 和真, 清水 亮, 高橋 史樹
2. 発表標題 リドカイン麻酔薬の選択検出を指向した分子インプリントポリマーの合成と評価
3. 学会等名 日本分析化学会第68年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中 竜太郎, 森角 祐馬, 金 継業, 高橋 史樹
2. 発表標題 電磁誘導法による無接点給電システムを用いたルミノール/過酸化水素系電気化学発光挙動
3. 学会等名 第79回日本分析化学討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋 史樹, 片山 達彦, 池澤 徹哉, 新田 咲
2. 発表標題 電気化学発光法を用いた簡便なメタンフェタミン分析チップの開発
3. 学会等名 日本法科学技術学会第24回学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 清水 亮、金 継業、高橋 史樹
2. 発表標題 超音波照射条件下でのルテニウム錯体/リドカイン系の電気化学発光挙動
3. 学会等名 第49回中部化学関係学協会支部連合秋季大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中澤 朝之、清水 亮、金 継業、高橋 史樹
2. 発表標題 油水分系における共反応物型ルテニウム錯体の電気化学発光挙動
3. 学会等名 第37回分析化学中部夏期セミナー・第12回近畿支部平成夏季セミナー
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 清水 亮、高橋 史樹、金 継業
2. 発表標題 Ru(bpy) <sub>3</sub> <sup>2+</sup> /リドカイン系の電気化学発光反応に対する超音波照射効果の検討
3. 学会等名 第37回分析化学中部夏期セミナー・第12回近畿支部平成夏季セミナー
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高橋 史樹、清水 亮、金 継業
2. 発表標題 リドカイン麻酔薬を共反応物とした[Ru(bpy) <sub>3</sub> ] <sup>2+</sup> 系の電気化学発光反応における超音波照射の影響
3. 学会等名 第26回日本ソノケミストリー討論会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 高橋 史樹、新田 咲、清水 亮
2. 発表標題 電位変調法と組み合わせた電気化学発光を利用したメタンフェタミンの一次スクリーニング分析法の開発
3. 学会等名 第36回日本法中毒学会（招待講演）
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 薬物検出システム	発明者 金継業、高橋史樹、 ロイドテイサート ン、柴田路子、原哲	権利者 信州大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2017-174488	出願年 2017年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

<p>第一回信州高遠分析セミナー  <a href="http://science.shinshu-u.ac.jp/~chem/bunseki/daily.html">http://science.shinshu-u.ac.jp/~chem/bunseki/daily.html</a></p>
---

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----