

令和4年度厚生労働科学研究費補助金  
(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業)  
危険ドラッグと関連代謝物の有害作用評価と乱用実態把握に関する研究(21KC1003)

分担研究報告書

フェンタニル類似体の代謝挙動とフッ素位置異性体の識別に関する研究

分担研究者： 北市清幸 (岐阜薬科大学 薬物動態学研究室)  
研究協力者： 清水英徳 (岐阜県保健環境研究所 生活科学部)  
研究協力者： 岩木孝晴 (岐阜県保健環境研究所 生活科学部)  
研究協力者： 篠田範夫 (岐阜県保健環境研究所 生活科学部)  
研究協力者： 田中宏幸\*<sup>2</sup> (岐阜県保健環境研究所 生活科学部)  
研究協力者： 曾田 翠 (岐阜薬科大学 薬物動態学研究室)  
研究協力者： 森川美空 (岐阜薬科大学 薬物動態学研究室)  
研究協力者： 伊藤宏輔 (岐阜薬科大学 薬物動態学研究室)  
研究協力者： 岩井康晴 (岐阜薬科大学 薬物動態学研究室)

\*<sup>1</sup> 現所属：岐阜薬科大学 生態機能解析学大講座 免疫生物学研究室

【研究要旨】

[緒言] 近年、麻薬であるフェンタニル類似体が危険ドラッグとして海外で流通しており、我が国でもすでに 30 種類以上が規制対象となっている。依然、新規なフェンタニル類似体は合成、流通しており、それらの流通や乱用を防ぐための正確な検出方法の確立が求められている。しかしながら、その位置異性体は製品中における識別や摂取証明が困難である。そこで、本年度は、フェンタニル類似化合物である Fluorofuranylfentanyl (FFF)を用い、その位置異性体の測定方法の確立と *in vitro* 代謝実験を実施した。

[結果] 位置異性体である *o*-fluorofuranylfentanyl (*o*-FFF)、*p*-fluorofuranylfentanyl (*p*-FFF)、*m*-fluorofuranylfentanyl (*m*-FFF) をフェンタニル類似体のモデル化合物として使用した。その結果、FFF 位置異性体の識別は LC-MS/MS では各種カラムを使用しても困難であったが、GC-MS では 3 種の位置異性体が識別可能であることが明らかになった。ヒト肝ミクロソームに FFF 位置異性体を添加し、経時的に採取したサンプルを LCMS-IT-TOF にて測定し、代謝物の同定を行った。その結果、親化合物の半減期が 1 時間以内であること、いずれの異性体においても 3 種の第 I 相代謝物 [酸化的 N-脱アルキル化体 (M1)、一水酸化体 (M2)、アミド加水分解体 (M3)] の存在することが明らかになった。M1 は主要代謝物であり、3 種の FFF に共通するものであった。一方、M3 は 3 種の位置異性体において分離測定が可能であり、代謝物生成量比でも異性体間で差がみられることが確認された。

[考察] GC-MS では、3 種の FFF 位置異性体の親化合物の識別が行えることが可能であり、製品における親化合物の識別には GC-MS が利用可能であることが明らかになった。一方で、FFF 位置異性体はいずれも半減期が短く、FFF の摂取証明には親化合物ではなく、代謝物の情報を活用することが必要であることが示唆された。一方で、FFF 代謝物の解析結果より、FFF 摂取のマーカーとしては、FFF 由来のフラン環やアニリン環を持つ FFF に特徴的な主要代謝物である M1 の検出が有用であること、3 種の FFF 位置異性体の識別においては M3 の保持時間の違いと生成量比を活用できることが示唆された。以上の結果は、フェンタニル類似体の厳密な識別の基盤となる有用な情報を提供しており、我が国におけるフェンタニル類似体を含む危険ドラッグのまん延防止に貢献すると考えられる。

## A. 研究目的

近年、合成カチノン類や合成カンナビノイド以外にオピオイドへの関心が高まっており、フェンタニルとその類似体の乱用が世界各国で増加している<sup>1-3)</sup>。フェンタニルは製造が容易かつ安価であり、その化学構造を容易に組み替えることが出来るため<sup>4,5)</sup>、新規フェンタニル類似体が出現しやすい。日本においても、2022年12月現在、*b*-hydroxythiofentanyl や *furanylethylfentanyl* をはじめとした6種のフェンタニル類似体が指定薬物として規制されており、麻薬指定のものも含めると、日本で取り締まり対象のフェンタニル類似体は30種類以上にのぼっている<sup>6-8)</sup>。

Fluorofuranylfentanyl [N-(2, 3, or 4)-fluorophenyl)-N-[1-(2-phenylethyl)-4-piperidyl]furan-2-carboxamide or FFF] は2018年に初めて確認されたフェンタニル類似体であり<sup>9)</sup>、*furanylfentanyl* のアニリン環にフルオロ基が付加した構造をもつ化合物である (Fig. 1)。その *in vitro* 代謝プロファイルについて、*o*-fluorofuranylfentanyl (*o*-FFF)<sup>10)</sup> および *p*-fluorofuranylfentanyl (*p*-FFF)<sup>11)</sup> の報告があるが、*m*-fluorofuranylfentanyl (*m*-FFF) に関しては報告がなく、3種での比較はされていない。フェンタニル類似体はその種類により効力や毒性、法的位置が異なる可能性があり、これらを正確に識別することが重要である。実際に、フルオロ基を持つフェンタニル類似体については、その置換位置により効力が異なることが金森ら<sup>12)</sup>によって示されている。しかし、異性体については同じような保持時間やフラグメントパターンを持つため、その識別は困難であることが既報により指摘されており<sup>13-16)</sup>、異性体を識別するメソッドの開発は法医学や臨床毒物学において、非常に有用であると考えられる。

そこで、本研究では FFF 位置異性体の識別法の開発を目的とし、1) LC-MS、GC-MS を用いた FFF 位置異性体識別と、2) ヒト肝ミクロソーム (HLMs) を用いた *in vitro* 実験における代謝挙動の比較を行った。

## B. 研究方法

### 1. 親化合物における異性体識別

#### 1-1. LC-MS 分析条件

測定には LCMS-8045 triple quadrupole mass spectrometer (Shimadzu, Kyoto) を用いた。カラムは ZORBAX Eclipse Plus C8 (2.1×150 mm, 3.5 mm) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)、COSMOSIL 5C18-MS-II (2.0×150 mm, 5 mm) (NACALAI TESQUE INC., Kyoto)、COSMOSIL Cholester (2.0×150 mm, 5 mm) (YMC CO., LTD., Kyoto)、COSMOSIL πNAP (2.0×150 mm, 5 mm) (YMC CO., LTD., Kyoto)、YMC-Triart PFP (2.1×150 mm, 5mm) (YMC CO., LTD., Kyoto) の5種を用い、検討を行った。移動相には、(A) 0.1% formic acid in 精製水および (B) 0.1% formic acid in acetonitrile を用い、グラジエントの条件は、(B) 0-2 min: 10%、2-30 min: 10→60%、30-30.5 min: 60→100%、30.5-36 min: 100%、36-36.5 min: 100→10%、36.5-46 min: 10%とし、全体としての測定時間は46 minに設定した。また、カラム温度は40°C、流速は0.18 mL/minとした。3種類の位置異性体を含む FFF 混合溶液は acetonitrile に溶解して120 nmol/Lに調製し、インジェクト量は5 mLとして測定を行った。イオン化法としては positive electrospray ionization (ESI) mode を用いた。FFF と papaverine の MRM トランジションはそれぞれ *m/z* 393.2→188.10 及び *m/z* 340.15→202.10 とし、コリジョンエネルギーはそれぞれ22eV及び28eVに設定した。

#### 1-2. GC-MS 分析条件

測定は金森ら<sup>17)</sup>の方法をもとに行った。測定機器は TRACE 1310 GC/ISQ LT (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用い、カラムは DB-5MS (30×0.25 mm i.d., 膜厚0.25 mm) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)を用いた。昇温条件は、120°C (1 min)、120-310°C (15°C/min, 昇温)、310°C (4 min) とした。また、キャリアガスにはヘリウムを用い、流速は1.0 mL/minとした。イオン化法として Electron Ionization (EI) を用い、イオン化エネルギーは70 eVとした。3種類の位置異性体を含む FFF 混合溶液は ethyl acetate に溶解して0.2 mg/mLに調製し、インジェクト量は1.0 mLとして測定を行った。試料注入にはスプレットレス法を用いた。

## 2. In vitro 代謝試験

### 2-1. 分析条件

FFF の分析には HPLC-tandem-MS (Shimadzu, Kyoto)、LC カラムには ZORBAX Eclipse Plus C8 2.1×150 mm, 3.5 μm を使用した。

移動相には、(A) 0.1% formic acid in water および(B) 0.1% formic acid in acetonitrile を用い、有機溶媒比率 40 %のアイソクラティック条件で 5 分測定を行った。また、カラム温度は 40 °C、流速は 0.25 mL/min とし、測定サンプルのインジェクト量は 5 μL とし測定を行った。

FFF の代謝物推定には、LCMS-IT-TOF (Shimadzu, Kyoto)、LC カラムには ZORBAX Eclipse Plus C8 2.1×150 mm, 3.5 μm を使用した。

移動相には、(A) 0.1% formic acid in water および(B) 0.1% formic acid in acetonitrile を用い、グラジエントの条件は、(B) 0-2 min : 10%、2-40 min: 10→60%、40-46 min : 10%とし、測定時間は 46 分に設定した。また、カラム温度は 40 °C、流速は 0.18 mL/min とし、測定サンプルのインジェクト量は 5 μL とし測定を行った。LCMS-IT-TOF は、イオン化法として positive electrospray ionization (ESI) 法を用い、測定範囲を *m/z* 100-700 とし測定を行った。なお、イオン蓄積時間は 40 msec. とした。また、各プリカーサーアイソレーション幅は 1 Da とし、周波数は 45.0 kHz、CID エネルギーは 100 % で測定を行った。

### 2-2. データ解析

代謝物と考えられる溶出ピークから得られた MS<sup>2</sup> スペクトルのデータより、その構造を推定した。また、代謝物は溶出時間の早いものから順に命名した。最終的にすべての代謝物は以下の基準を満たすことを確認した。

- ① ブランクサンプル中に存在しない。
- ② 他の代謝物の同位体ではない。
- ③ プリカーサーイオンの精密質量が理論値から 5 ppm 範囲内である。
- ④ プロダクトイオンがプリカーサーイオンの部分構造として推定可能である。

### 2-3. ヒト肝ミクロソーム (HLMs) を用いたイン

### キュベーション

薬物の代謝反応は Erratico らの方法<sup>18)</sup>に一部改良を加えて行った。

100 mM リン酸緩衝液に NADPH Regenerating System Solution A および Solution B (終濃度 1.55 mM NADP<sup>+</sup>, 3.3 mM glucose-6-phosphate, 3.3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.4 U/mL glucose-6-phosphate dehydrogenase in sodium citrate)、acetonitrile に溶解させた FFF のストック溶液 (終濃度 12.5 μM) を添加した。前述の混液を反応開始前に 37 °C の水浴中で 5 分間インキュベートした後、100 mM のリン酸緩衝液で希釈した HLMs 溶液 (microsomal protein 終濃度 0.5 mg/mL) を添加して反応を開始させた。全量 1.4 mL の反応溶液を転倒混和した後、37 °C の水浴中でインキュベートした。

サンプル採取は HLMs 溶液を添加後、0, 10, 20, 30, 60, 90, 120 min に行い、反応溶液 200 μL を、1,200 μL の氷冷 acetonitrile 溶液へ添加することで代謝反応を停止させた。この溶液を遠心分離し (10 min, 12,000 rpm, 4 °C)、LCMS-IT-TOF 用サンプルでは上清を 400 μL 分取し 45 °C にて遠心乾固させた。LC-MS 用のサンプルは遠心分離後に 10 倍希釈したのちに 100 μL を分取し、これを 45 °C にて遠心乾固した。

### 2-4. サンプル調製

LC-MS を用いた分析には、遠心乾固したサンプルに acetonitrile 250 μL および IS である papaverine (終濃度 10 ng/mL) を含有する精製水 250 μL を添加し、超音波処理を行って再溶解させた後、フィルターろ過したものを測定に用いた。

LCMS-IT-TOF を用いた分析には、遠心乾固したサンプルに acetonitrile 100 μL および IS である papaverine (終濃度 500 ng/mL) を含有する精製水 100 μL を添加し、超音波処理を行って再溶解させた後、フィルターろ過したものを測定に用いた。

## C. 研究結果

### 1-1. LC-MS による位置異性体識別

5 つのカラムを用いた LC-MS における FFF 混合物のクロマトグラムを Fig. 2 に示す。いずれのカラムについても 3 つの分離したピークは確認されず、LC-MS において FFF 位置異性体は識

別されなかった。

## 1-2. GC-MSによる位置異性体識別

GC-MSを用いたFFF混合物のクロマトグラムを Fig. 3 に、MS<sup>2</sup> スペクトルを Fig. 4 に示す。クロマトグラムにおいてFFF混合物は3つのピークに分離され、その溶出順は *m*-FFF, *p*-FFF, *o*-FFF の順であった (Fig. 3)。MS<sup>2</sup> スペクトルについて、いずれの位置異性体においても *m/z* 95, 258, 301 のフラグメントが確認され、その強度に顕著な差は見られなかった (Fig. 4)。

## 2-1. FFF の半減期の算出

LC-MSにて測定した親化合物の未変化体の経時変化より、HLMsにおける *in vitro* 代謝半減期は *o*-FFF で  $53.6 \pm 3.3$  min、*m*-FFF で  $42.6 \pm 1.6$  min、*p*-FFF で  $29.9 \pm 2.4$  min となり、位置異性体間で半減期に違いが見られた (Fig. 5)

## 2-2. *In vitro* 実験における FFF の代謝経路

各 FFF 位置異性体の代謝物を Table 1 に示す。LCMS-IT-TOF の測定より、*o*-FFF の RT は 18.846 min、*m*-FFF の RT は 19.022 min、*p*-FFF の RT は 19.022 min であった。FFF の [M+H]<sup>+</sup> 分子イオンは *m/z* 393.1973 であり、いずれの位置異性体も *m/z* 146, 188, 272 のプロダクトイオンを生成した。

各 FFF 位置異性体の *in vitro* 代謝における経時変化を Fig. 6 に、FFF の代謝経路を Fig. 7 に示す。全ての位置異性体においてノル代謝物 M1、一水酸化体 M2、アミド加水分解生成物 M3 の3種類の第I相代謝物が検出された (Table 1)。また、第II相代謝物はいずれの位置異性体においても検出されなかった。*o*-FFF と *p*-FFF は既報において今回検出された第I相代謝物が確認されており<sup>10,11)</sup>、*m*-FFF もこれらの位置異性体と同様の代謝傾向を示した。

## 2-3. 代謝物の保持時間と生成量比の比較

*In vitro* 代謝実験により推定された3種類の第I相代謝物の内、M3においてそのRTに違いが見られ、2F-M3では18.963 min、3F-M3では19.549 min、4F-M3では17.909 minであった (Table 1)。この溶出順は、C18カラムを用いて分

離を行った既報の結果と一致している<sup>13,19,20)</sup>。

また、各位置異性体間での代謝物生成量比を Table 2 に示した。M1に対するM3の生成量比 (Table 2a)、M2に対するM3の生成量比 (Table 2b) では各位置異性体間で有意な差が確認された。M2に対するM1の生成量比 (Table 2c) は、*o*-FFFのみ他の位置異性体と有意な差が見られた。

## D. 考察

### 1) 親化合物における異性体識別

LC-MSでの親化合物識別検討において、C8カラム (Fig. 2a) および、C18カラム (Fig. 2b) を用いたクロマトグラムでは、FFF混合溶液のピークの先端は2つに割れた。なお、結果には示さないがC8カラムにて*o*-FFF、*m*-FFF、*p*-FFFを単独で測定した保持時間から考えると、前側のピークは*o*-FFFであり、後ろ側のピークは*m*-FFFと*p*-FFFが混在していると考えられる。

一方、Triart PFPカラム (Fig. 2c) ではピークが確認されなかった。これは、PFPカラムにおいて化合物とカラムの間に *p-p* 相互作用のみでなく双極子相互作用も働いたため<sup>21)</sup>、フルオロ基をもつFFFに対し強い保持を示し、測定時間内でFFFが溶出しなかったことが理由だと考えられる。実際、フルオロ基を含有するフェンタニル類の異性体識別に関しては、C18カラムやキラルカラムを用いLC-MS分離を行った既報も見られるが、いずれも異性体間にはわずかな保持時間の差しか見られず、クロマトグラム上での完全分離は困難であると考えられる<sup>10,22,23)</sup>。以上の結果より、5種類のカラムを用いたLC-MSにおける位置異性体識別の検討ではFFFを分離することができず、LC-MSを用いたFFF位置異性体の識別は困難であることが示唆された。

一方、GC-MSにおける親化合物識別検討では、クロマトグラムにおいて3種類の異性体が明確に分離できた (Fig. 3)。FFF位置異性体におけるGC-MSでの完全な分離は、私たちが知る限りこれが初めての報告である。フルオロ基を有する他のフェンタニル類似体である fluorobutyrylfentanyl、fluoroisobutyrylfentanyl、fluoromethoxyacetylfentanyl については、既報においてメタ異性体、パラ異性

体、オルト異性体の溶出順で GC-MS にて検出されていることが報告されている<sup>22)</sup>。本研究においても、FFF の溶出順はこの報告と一致していた。なお、MS2 スペクトルに関しては異性体間で顕著な差は見られず、MS2 スペクトルやその強度の違いを用いての親化合物の識別は困難であることが示唆された (Fig. 4)。以上より、FFF 親化合物の位置異性体識別には GC-MS のクロマトグラムを用いることが有用であると示唆された。

## 2) *In vitro* 実験

*In vitro* 代謝実験により、FFF 異性体の半減期がそれぞれ算出された。各異性体の半減期はいずれも 1 時間未満であり、FFF の親化合物はいずれの位置異性体においても体内で速やかに代謝され消失すると考えられた。そのため、FFF の摂取証明には親化合物ではなく、代謝物を用いた位置異性体の特定が重要であることが示唆された。

すべての位置異性体において、N-脱アルキル化により生成されるノル代謝物である M1、一水酸化である M2、アミド加水分解により生成される M3 が検出された (Fig. 7)。その経時変化 (Fig. 6) から、各異性体の代謝経路は同様であると考えられた。なお、第II相代謝物はいずれの位置異性体でも検出されなかった。いくつかの先行研究において、フェンタニル類似体についての HLMs や肝細胞を用いた *in vitro* 代謝実験系では、第II相代謝物の検出量はわずかであるか、検出されないことが報告されている<sup>24)</sup>。本研究においても、第II相代謝物は HLMs で生成されなかったか、その濃度が極めて低く検出限界以下であったと考えられる。

代謝物を用いた位置異性体識別では、代謝物 M3 において各異性体間で保持時間の違いが見られ、その溶出順は 4F-M3、2F-M3、3F-M3 の順であった。それぞれの保持時間の差は最も小さいものでも 0.5 分程度と十分な差がみられ、この代謝物の保持時間の差は FFF 位置異性体を識別する 1 つの指標になり得ると考えられる。なお、M3 は他のフェンタニル類似体の代謝物としても検出されることが報告されており<sup>24)</sup>、単独では FFF の摂取を証明することはできない。しかし、FFF や FFF に特有の代謝物である M1 が確認されている場合においては、代謝物 M3 の保持時間の違いは

FFF の位置異性体識別に利用可能であることが示唆された。

代謝物の生成量比を各異性体について比較したところ、M1 に対する M3 の生成量比 および、M2 に対する M3 の生成量比には各位置異性体間で有意な差が確認された。したがって、代謝物生成量比は各異性体の識別に利用可能であることが示唆された。これらの生成量比の違いには、各異性体におけるアミド加水分解生成物である M3 の生成されやすさの違いが影響していると考えられる。

また、*o*-FFF の M2 に対する M1 の生成量比は、*o*-FFF のみが他の位置異性体より有意に大きく、*o*-FFF では M1 が生成されやすいことが考えられた。M1 と M2 は FFF に特異的な代謝物であるため、これらの代謝物生成量の比較もまた *o*-FFF と他の異性体の識別に有用であることが示唆された。

## E. 結論

本研究では、フェンタニル類似体の 1 種である FFF の位置異性体の識別を目的とし、LC-MS、GC-MS を用いた親化合物における位置異性体識別検討と、HLMs を用いた *in vitro* 代謝実験による各異性体の代謝挙動の比較を行った。

LC-MS と GC-MS を用いた異性体識別検討の結果、FFF 位置異性体は LC-MS では分離できなかったが、GC-MS のクロマトグラムを用いることで全ての異性体を識別することが可能であった。したがって、製品中における親化合物の識別には GC-MS の利用が有用であると考えられた。

また、*in vitro* 代謝実験の結果、FFF の半減期はいずれの異性体も短く、FFF の摂取証明には、親化合物ではなく、代謝物の特定が有用であることが示唆された。FFF では異性体と同様に 3 種類の第I相代謝物が特定された。代謝物のうち、M3 の保持時間や代謝物生成量比は位置異性体間で明確な差が確認され、この情報は FFF の位置異性体識別に利用可能であることが示唆された。これらの結果は、GC-MS や標準品を利用できない場合の識別に役立つものであり、本年度取り扱った位置異性体のみならず、わずかに構造の異なるフェンタニル類似体の識別において、その代謝挙動を活用することが有用であることが示唆された。

## F.参考文献

- 1) United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC). Global Overview of Drug Demand and Supply. World Drug Report 2019 (United Nations publication, Sales No. E.19.XI.8). 2019: 1–77.
- 2) Vicknasingam B, Narayanan S, Singh D, Corazza O. Global strategy for New Psychoactive Substances: an update. *Curr Opin Psychiatry*. 2020; 33: 295-300.
- 3) O'Donnell J, Tanz LJ, Gladden RM, Davis NL, Bitting J. Trends in and Characteristics of Drug Overdose Deaths Involving Illicitly Manufactured Fentanyls - United States, 2019-2020. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2021; 70: 1740-1746.
- 4) Drug Enforcement Administration (DEA). Counterfeit Prescription Pills Containing Fentanyl: A Global Threat. 2016. <https://www.hsdn.org/?view&did=796541> (参照2022-8-18).
- 5) Butler DC, Shanks K, Behonick GS, Smith D, Presnell SE, Tormos LM. Three Cases of Fatal Acrylfentanyl Toxicity in the United States and a Review of Literature. *J Anal Toxicol*. 2018 Jan 1;42(1):e6-e11.
- 6) 厚生労働省. "麻薬の指定状況(令和3年9月8日現在)麻薬及び向精神薬取締法(第2条関係 74物質)". [https://www.mhlw.go.jp/bunya/iyakuhin/yakubuturanyou/dl/mayaku\\_torishimari\\_280915-01.pdf](https://www.mhlw.go.jp/bunya/iyakuhin/yakubuturanyou/dl/mayaku_torishimari_280915-01.pdf), (参照2021-12-27)
- 7) 厚生労働省. "麻薬の指定状況(令和3年9月8日現在)麻薬、麻薬原料植物、向精神薬及び麻薬向精神薬原料を指定する政令(第1条関係 147物質)". <https://www.mhlw.go.jp/content/11120000/000647611.pdf>, (参照2021-12-27)
- 8) 厚生労働省. 指定薬物名称・構造式一覧(令和4年6月28日現在). <https://www.mhlw.go.jp/content/11120000/000794078.pdf> (参照2022-8-19)
- 9) Krotulski A, Logan B. Ortho/Para-Fluorofuranylfentanyl Toxicology Analytical Report. NPS Discovery-Monographs. 2019. [https://www.npsdiscovery.org/wp-content/uploads/2019/05/FluoroFuranylfentanyl\\_012319\\_ToxicologyAnalyticalReport.pdf](https://www.npsdiscovery.org/wp-content/uploads/2019/05/FluoroFuranylfentanyl_012319_ToxicologyAnalyticalReport.pdf) (参照2022-8-18).
- 10) Rodriguez Salas J, Krotulski AJ, Newman R, Thogmartin JR, Mohr ALA, Logan BK. Concentrations of para-Fluorofuranylfentanyl in Paired Central and Peripheral Blood Collected during Postmortem Death Investigations. *J Anal Toxicol*. 2022; 46: 358-373.
- 11) Montesano C, Vincenti F, Fanti F, Marti M, Bilel S, Togna AR, Gregori A, Di Rosa F, Sergi M. Untargeted Metabolic Profiling of 4-Fluoro-Furanylfentanyl and Isobutyrylfentanyl in Mouse Hepatocytes and Urine by Means of LC-HRMS. *Metabolites*. 2021; 11: 97.
- 12) Kanamori T, Okada Y, Segawa H, Yamamuro T, Kuwayama K, Tsujikawa K, Iwata Y. T. Evaluation of Agonistic Activity of Fluorinated and Nonfluorinated Fentanyl Analogs on  $\mu$ -Opioid Receptor Using a Cell-Based Assay System. *Biol. Pharm. Bull*. 2021; 44: 159–161.
- 13) Angi C, Lurie IS, Marginean I. Analysis of fentanyl derivatives by ultra high performance liquid chromatography with diode array ultraviolet and single quadrupole mass spectrometric detection. *J Sep Sci*. 2019; 42: 1686-1694.
- 14) Bergh MS, Bogen IL, Wilson SR, Øiestad ÅML. Addressing the Fentanyl Analogue Epidemic by Multiplex UHPLC-MS/MS Analysis of Whole Blood. *Ther Drug Monit*. 2018; 40: 738-748.
- 15) Bergh MS, Bogen IL, Wohlfarth A, Wilson SR, Øiestad ÅML. Distinguishing Between Cyclopropylfentanyl and Crotonylfentanyl by Methods Commonly Available in the Forensic Laboratory. *Ther Drug Monit*. 2019; 41: 519-527.
- 16) Strayer KE, Antonides HM, Juhascik MP, Daniulaityte R, Sizemore IE. LC-MS/MS-Based Method for the Multiplex Detection of 24 Fentanyl Analogues and Metabolites in Whole Blood at Sub ng mL<sup>-1</sup> Concentrations. *ACS Omega*. 2018; 3: 514-523.
- 17) Kanamori T, Iwata Y. T, Tsujikawa K, Kuwayama K, Yamamuro T, Segawa H, & Inoue H., Simultaneous analysis of 18 compounds of fentanyl and its analogues by TLC, GC/MS, and LC/MS. *Jpn. J. Forensic Sci. Technol.*, 2016; 21: 139–147.
- 18) Erratico C, Negreira N, Norouzizadeh H, Covaci A, Neels H, Maudens K, van Nuijs AL., In vitro and in vivo human metabolism of the synthetic cannabinoid AB-CHMINACA, *Drug Test Anal.*, 2015; 7: 866–876.
- 19) Garneau B, Desharnais B, Laquerre J, Côté C, Taillon MP, Martin PY, Daigneault G, Mireault P, Lajeunesse A. A comprehensive analytical process, from NPS threat identification to systematic screening: Method validation and one-year prevalence study. *Forensic Sci Int*. 2021; 318: 110595.

- 20) Adamowicz P, Bakhmut Z, Mikolajczyk A. Screening procedure for 38 fentanyl analogues and five other new opioids in whole blood by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Appl Toxicol.* 2020; 40: 1033-1046.
- 21) YMC CO., LTD. HPLC DATA SHEET ペンタフルオロフェニル (PFP) 基結合型カラム「YMC-TriartPFP」の特長－異性体分析や極性化合物分析への応用－. <https://www.ymc.co.jp/data/tech/145.pdf> (参照2022-10-3)
- 22) Kanamori T, Iwata Y. T, Segawa H, Yamamuro T, Kuwayama K, Tsujikawa K, Inoue H. Characterization and differentiation of positional isomers of fluoro-fentanyl analogs by a combination of instrumental analyses. *Jpn. J. Forensic Sci. Technol.* 2019; 24: 123-133.
- 23) Qin N, Shen M, Xiang P, Wen D, Shen B, Deng H, Qiang H, Song F, Shi Y. Determination of 37 fentanyl analogues and novel synthetic opioids in hair by UHPLC-MS/MS and its application to authentic cases. *Sci Rep.* 2020; 10: 11569.
- 24) Watanabe S, Vikingsson S, Roman M, Green H, Kronstrand R, Wohlfarth A. In Vitro and In Vivo Metabolite Identification Studies for the New Synthetic Opioids Acetylfentanyl, Acrylfentanyl, Furanylfentanyl, and 4-Fluoro-Isobutyrylfentanyl. *AAPS J.* 2017; 19: 1102-1122.
- 2) 北市 清幸、松尾 桃花、山崎里桜、森理人、伊藤秀、田外秀俊、曾田翠、兒玉幸修、佐々木均. 乱用抵抗性製剤開発ガイドライン案の作成に向けた各種製剤学的 in vitro 試験法の実施. 2022 年度アルコール・薬物依存関連学会合同学術総会. 仙台/ハイブリッド, 2022 年 9 月 8-10 日.
- 3) 伊藤宏輔: フェンタニル類似体の摂取証明に向けた識別法の開発に関する研究. BPCNP4 学会合同年会. 東京, 2022 年 11 月 4-6 日
- 4) Y. Oida, M. Morikawa, K. Itoh, K. Iwai, T. Iwaki, M. Soda, H. Shimizu, H. Tanaka, N. Shinoda, K. Kitaichi. The establishment of the method to differentially identify the isomers of a fentanyl analogue, fluorofuranylfentanyl. CINP 2023. Montreal, May 6-10, 2023.

#### H.知的財産権の出願・登録状況

特記事項なし

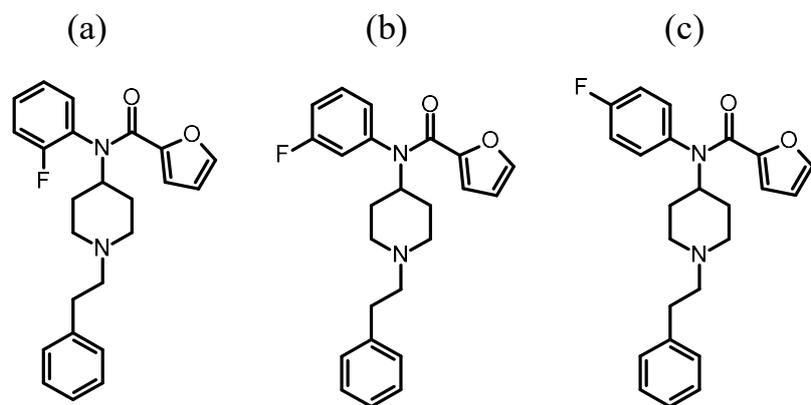
#### G.研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 北市 清幸、松尾 桃花、山崎里桜、森理人、伊藤秀、田外秀俊、曾田翠、兒玉幸修、佐々木均. 乱用抵抗性製剤の作製に向けた製剤学的検証. *日本アルコール・薬物医学会雑誌* in press.

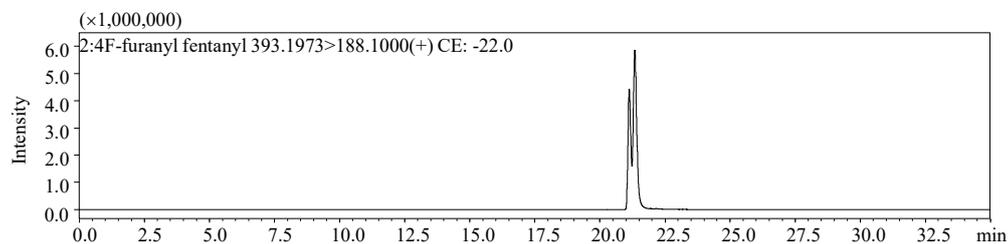
##### 2.学会発表

- 1) 森川美空: フェンタニル類似体 Fluorofuranylfentanyl の異性体識別と代謝物の同定に関する研究. 日本薬学会第 142 年会. 名古屋, 2022 年 3 月 25-28 日

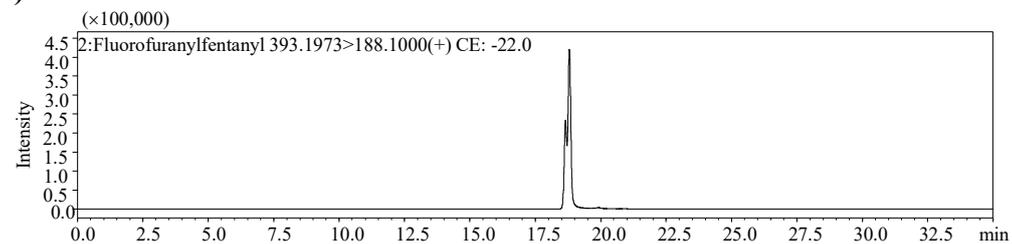


**Fig. 1** Chemical structures of (a) *o*-FFF, (b) *m*-FFF and (c) *p*-FFF.

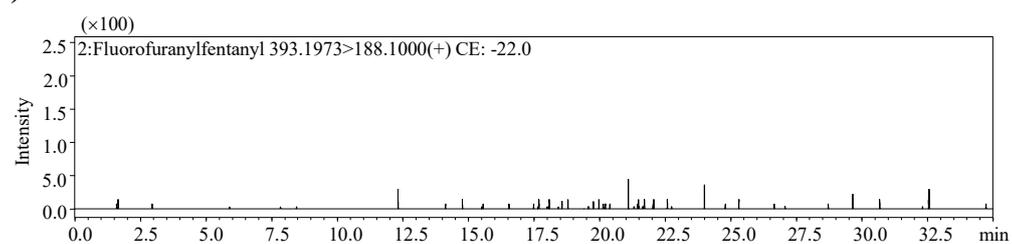
**(a) C8**



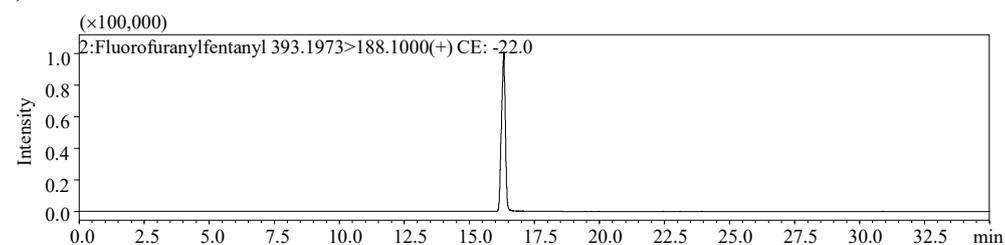
**(b) C18**



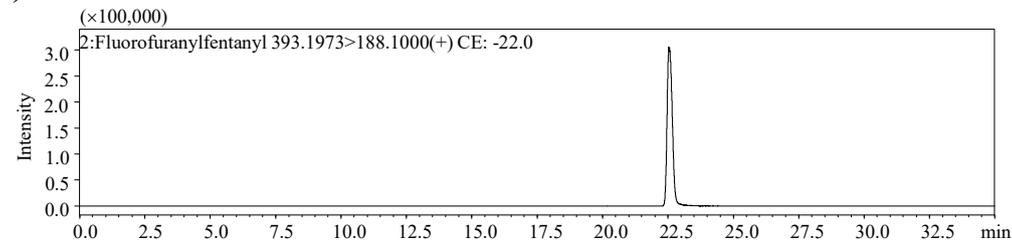
**(c) Triart PFP**



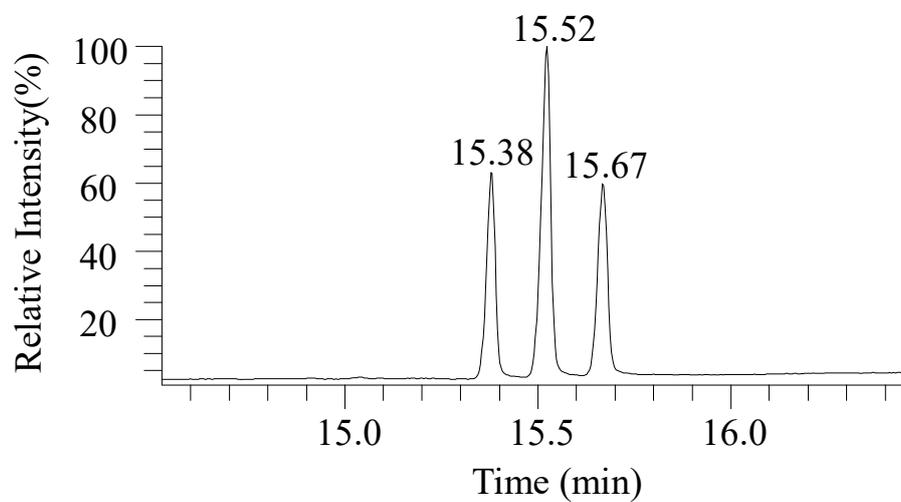
**(d) Cholester**



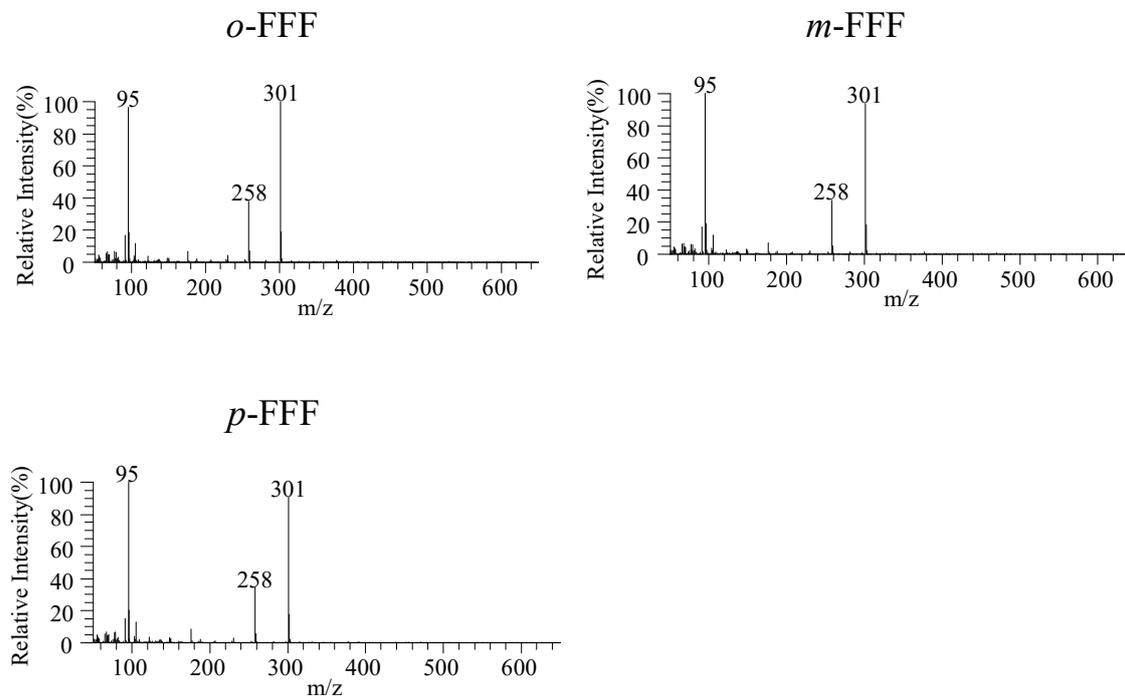
**(e)  $\pi$ NAP**



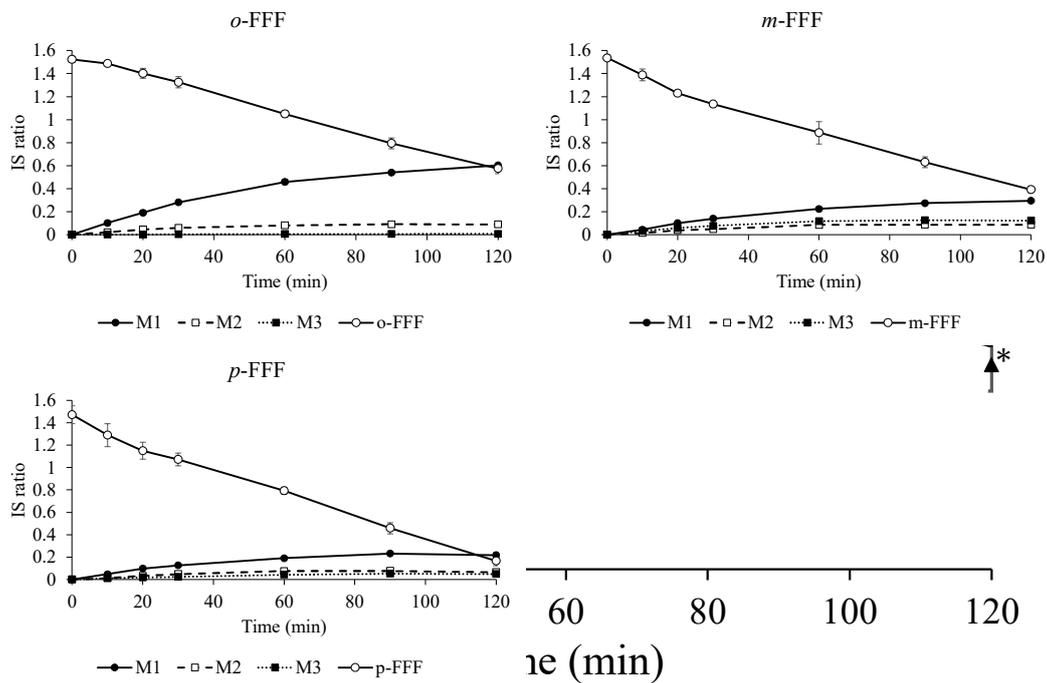
**Fig. 2** Typical chromatograms of the mixture of FFFs using LC-MS



**Fig. 3** Typical chromatogram of the mixture of *m*-FFF (15.38 min), *p*-FFF (15.52 min) and *o*-FFF (16.67 min) using GC-MS

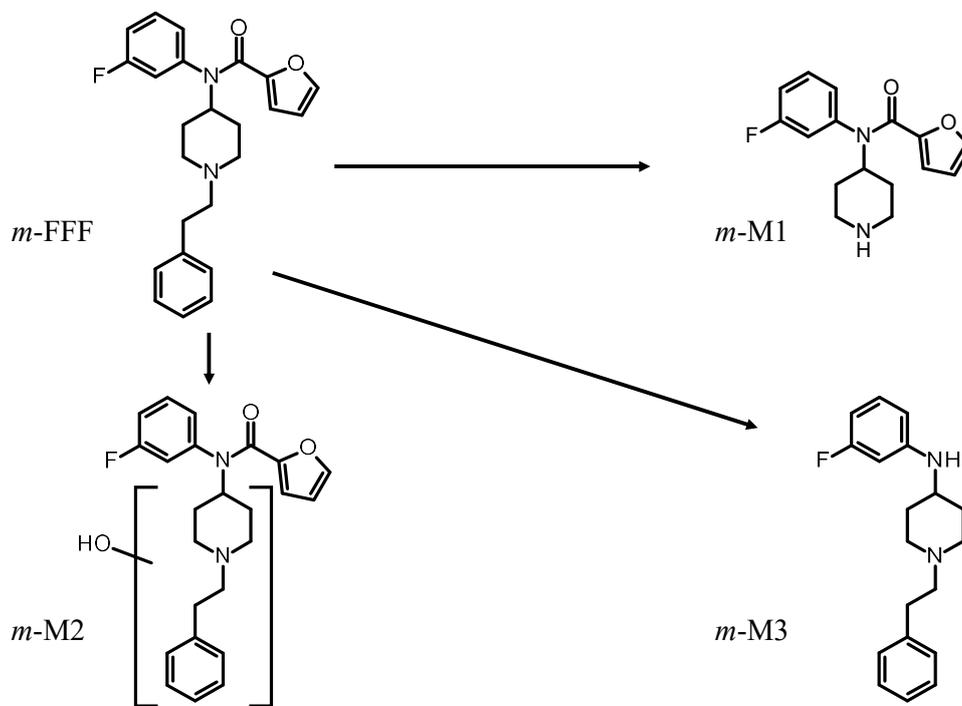


**Fig. 4** MS<sup>2</sup> spectra of *o*-FFF, *m*-FFF and *p*-FFF using GC-MS



**Fig. 6** Production of the metabolites of FFFs in HLMs  
 Each data represents mean  $\pm$  SD (n=6). \*p < 0.05 vs. *m*-FFF (Student's t-test).

Table 1 FFFs and their metabolites in HLMs



**Fig. 7** Proposed metabolic pathways of *m*-FFF

Table 1 FFFs and their metabolites in HLMs

Parent compound and Metabolites	Proposed metabolic pathway	Formula	Measured [M+H] <sup>+</sup> (m/z)	Theoretical [M+H] <sup>+</sup> (m/z)	Mass error (ppm)	RT(min)	Measured fragments (m/z)
<i>o</i> -FFF	Parent	C <sub>12</sub> H <sub>13</sub> FN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	393.1973	393.1973	0.0	18.846	146 188 272
<i>m</i> -FFF			393.1987	393.1973	3.6	19.022	146 188 272
<i>p</i> -FFF			393.1974	393.1973	0.3	19.022	146 188 272
<i>o</i> -MI	Oxidative N-dealkylation	C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> FN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	289.1347	289.1347	0.0	12.050	206
<i>m</i> -MI			289.1340	289.1347	2.4	12.285	206
<i>p</i> -MI			289.1339	289.1347	2.8	12.461	206
<i>o</i> -MI	Hydroxylation	C <sub>12</sub> H <sub>13</sub> FN <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	409.1925	409.1922	0.7	17.089	144 186 204 391
<i>m</i> -MI			409.1921	409.1922	0.2	17.381	174 186 204 391
<i>p</i> -MI			409.1924	409.1922	0.5	17.381	186 204 258 391
<i>o</i> -ME	Amide hydrolysis	C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> FN	299.1925	299.1918	2.3	18.963	188
<i>m</i> -ME			299.1918	299.1918	0.0	19.549	105 188
<i>p</i> -ME			299.1912	299.1918	2.0	17.909	105 188

Table 2 The metabolite production ratio of FFFs; (a) the production ratio of M3 to M1, (b) the production ratio of M3 to M2 and (c) the production ratio of M1 to M2.

Time (min)	The production ratio of M3 to M1 *			P value **		
	<i>o</i> -FFF	<i>m</i> -FFF	<i>p</i> -FFF	<i>o</i> -FFF vs. <i>m</i> -FFF	<i>m</i> -FFF vs. <i>p</i> -FFF	<i>o</i> -FFF vs. <i>p</i> -FFF
10	ND	0.72 ± 0.101	0.26 ± 0.096	ND	0.004	0.009
20	ND	0.58 ± 0.051	0.18 ± 0.038	ND	< 0.001	0.001
30	0.011 ± 0.0006	0.55 ± 0.050	0.19 ± 0.017	< 0.001	< 0.001	0.003
60	0.010 ± 0.0087	0.52 ± 0.019	0.22 ± 0.022	< 0.001	< 0.001	< 0.001
90	0.012 ± 0.0036	0.46 ± 0.049	0.22 ± 0.006	< 0.001	< 0.001	< 0.001
120	0.012 ± 0.0060	0.41 ± 0.011	0.23 ± 0.038	< 0.001	< 0.001	< 0.001

Time (min)	The production ratio of M3 to M2 *			P value **		
	<i>o</i> -FFF	<i>m</i> -FFF	<i>p</i> -FFF	<i>o</i> -FFF vs. <i>m</i> -FFF	<i>m</i> -FFF vs. <i>p</i> -FFF	<i>o</i> -FFF vs. <i>p</i> -FFF
10	ND	2.16 ± 0.30	0.93 ± 0.199	ND	0.004	0.001
20	ND	1.50 ± 0.20	0.55 ± 0.031	ND	< 0.001	< 0.001
30	0.052 ± 0.004	1.60 ± 0.17	0.49 ± 0.014	< 0.001	< 0.001	< 0.001
60	0.057 ± 0.049	1.39 ± 0.12	0.56 ± 0.043	< 0.001	< 0.001	< 0.001
90	0.069 ± 0.023	1.45 ± 0.18	0.68 ± 0.071	< 0.001	0.002	< 0.001
120	0.076 ± 0.035	1.41 ± 0.16	0.76 ± 0.048	< 0.001	0.002	< 0.001

Time (min)	The production ratio of M1 to M2 *			P value **		
	<i>o</i> -FFF	<i>m</i> -FFF	<i>p</i> -FFF	<i>o</i> -FFF vs. <i>m</i> -FFF	<i>m</i> -FFF vs. <i>p</i> -FFF	<i>o</i> -FFF vs. <i>p</i> -FFF
10	4.99 ± 0.86	3.01 ± 0.20	3.83 ± 0.85	0.018	0.179	0.174
20	4.35 ± 0.51	2.60 ± 0.16	3.04 ± 0.59	0.04	0.281	0.043
30	4.83 ± 0.51	2.92 ± 0.07	2.64 ± 0.17	< 0.001	0.058	0.002
60	5.72 ± 0.18	2.65 ± 0.19	2.53 ± 0.33	< 0.001	0.592	< 0.001
90	6.01 ± 0.24	3.18 ± 0.22	3.07 ± 0.36	< 0.001	0.682	< 0.001
120	6.86 ± 0.96	3.43 ± 0.39	3.37 ± 0.71	0.004	0.913	0.007

\*Mean ± SD (n=3). \*\*p < 0.05 (Student's t-test).