

法規制薬物の分析と鑑別等の手法開発に向けた研究

研究代表者: 田中理恵 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 主任研究官

研究要旨: 近年, 様々な危険ドラッグが出現し, 令和 5 年 3 月時点で, 医薬品医療機器等法下, 指定薬物として規制されている薬物は 2420 種類となった. また, 指定薬物から麻薬に規制強化された薬物は 72 種類にも及ぶ. これら薬物は, 所持・使用が禁止されているが, 構造類似体が多く存在し, また, ほとんどの薬物において代謝物情報が未知であるため, 特に, 生体試料中薬物の鑑別は困難を極めている. 本研究は, 麻薬・向精神薬取締法, 覚せい剤取締法, 大麻取締法及びあへん法などで厳しく規制される薬物及び植物の効果的な鑑別法を薬物取締行政に提示するために, 実際に現場で法規制薬物の鑑定業務を行っている地方厚生局麻薬取締部の研究協力を得て実施する.

法規制薬物の鑑別に関する研究では, dextromethorphan (鎮咳去痰薬)もしくはエナンチオマーの levomethorphan (麻薬)を投与したラット毛髪試料等を用いて, SFE の条件検討を行い, キラルカラムを用いた LC-MS/MS による摂取識別法の検討を行った. その結果, Dextromethorphan 投与ラット毛髪実試料からの dextromethorphan 及び代謝物 3 化合物の SFE 条件を検討した結果, メタノールにトリフルオロ酢酸 1%, 水 5%を添加した modifier を 50%用い, 85°Cに加温して静的抽出を 1 時間行った条件が最も適していた. ラットもしくはヒトのコントロール試料に, dextromethorphan 及び代謝物 3 化合物を浸透させたモデル毛髪試料を用いて, 最適化した SFE 条件により各化合物の抽出率を検討した結果, いずれも 88-103%となり, ばらつき(RSD%)は 5.2%以下と良好な結果を示した. さらに, dextromethorphan もしくは levomethorphan 投与ラット毛髪実試料中の dextromethorphan/levomethorphan 及びそれらの代謝物を SFE で抽出し, キラルカラムを用いた LC-MS/MS により分離分析を行った. その定量値を既報の塩酸メタノール溶液抽出による定量値と比較した結果, (+)-3-HM は 42.5%であったが, 他化合物はいずれも 60%以上であった. SFE による分析結果は塩酸メタノール溶液抽出による結果よりも低い値であったが, すべての分析対象化合物が再現性よく検出された. また, 塩酸メタノール溶液抽出では抽出時間が 16 時間程度必要で, さらに溶媒留去, 再溶解, 固相抽出等の煩雑な操作が必要であるが, 今回検討した SFE は 1 試料につき 1 時間半程度で抽出可能であり, 煩雑な前処理も必要ない. 以上より, SFE は毛髪中の薬物及び代謝物を効率よく簡便に検出可能なスクリーニング手法として有用であると考えられた. 大麻尿試験において GC 注入口で誘導体化する Injection Port Derivatization (IPD) TMS 誘導体化法の検討を行った. また, CBD 代謝物の 7-Carboxy cannabidiol (7COOH-CBD), 7-Hydroxy cannabidiol (7-OH-CBD) 及び大麻尿鑑定の主な対象物質である THC-COOH を対象物質として選択し THC-COOH と CBD 代謝物を識別可能な大麻尿試験法について検討を行った. IPD-TMS 誘導体化のための GC 注入口条件を検討したところ, 注入口温度を 250°C, スプリット比を 1 : 1 に設定し, 試料溶媒にアセトニトリルを用いる条件を設定するに至った. さらに, この条件を用いて, 従来の加熱法による TMS 誘導体化の反応性と比較したところ, IPD-TMS 誘導体化は加熱法と同等の反応効率を有することを確認し, IPD-TMS 誘導体化を用いることで試験時間を大幅に短縮可能であることが示唆された. また, IPD-TMS 誘導体化法を用いた大

麻尿試験法を設計し、各物質を 40 ng/mL 含有する尿試料を用いて添加回収試験を実施したところ、本法における各物質の回収率は 7-OH-CBD が 39.3%, 7-COOH-CBD が 47.6%, THC-COOH が 103.5%となり、低濃度の大麻尿に対しても本法は対応可能であることが示唆された。インターネット上で流通する THC アナログの含有を標榜する製品の流通実態調査を行なった結果、THC のアルキル側鎖の長さが異なる化合物が多く検出された。これら化合物を製品より単離精製し各種スペクトルデータ(GC-MS, LC-MS, NMR)を測定した。その結果、THCV の含有を標榜する製品から Δ^8 -THCV と Δ^9 -THCV, THCB の含有を標榜する製品から Δ^8 -THCB と Δ^9 -THCB と、THCH の含有を標榜する製品から Δ^8 -THCH と Δ^9 -THCH を同定した。 Δ^9 -THC および Δ^8 -THC それぞれを効率的かつ高純度に合成できるルートの検討を行い、高純度標準品の確保を目指した。その結果、CBD を共通出発原料として、環化反応の反応条件を検討することで、100°C下では Δ^8 -THC が、-40°C下では Δ^9 -THC が優先的に合成されることを明らかにし、それぞれの化合物を分析用標品として提供した。また、合成化合物のコンピュータモデリングによる、カンナビノイド受容体への親和性評価を実施した。 Δ^8 -THC および Δ^9 -THC のコンピュータモデリング計算結果では、計算に用いた CB1 受容体-AM11542 複合体中の、カンナビノイド誘導体 AM11542 と同様に結合することが示唆された。また、CBD (-8.187 kcal/mol)と比較し、それぞれ Δ^8 -THC (-8.612 kcal/mol), Δ^9 -THC (-8.736 kcal/mol)と見積もられ、 Δ^8 -THC および Δ^9 -THC は同程度の結合力を示すことが示唆された。

法規制植物の鑑別に関する研究では、大麻草のテルペン合成酵素遺伝子の多様性に着目し、テルペン合成酵素遺伝子の配列情報を用いた大麻種(品種, 栽培種)の判別法を検討するために遺伝子を取得し、配列情報の調査を行った。大麻 8 試料(品種, 栽培種)から 2 種のテルペン合成酵素遺伝子断片を単離し、その配列比較を行った結果、各遺伝子はイントロン領域に大きく違いが見られ、それぞれ 2 つのタイプに分離された。

以上、本研究は、厚生労働省の薬物取締行政に直接貢献する研究であり、国の乱用薬物対策に即した内容となっている。

【分担研究者】

花尻(木倉) 瑠理:国立医薬品食品衛生研究所
生薬部室長

三澤 隆史:国立医薬品食品衛生研究所
有機化学部部長

緒方 潤:国立医薬品食品衛生研究所
生薬部主任研究官

【研究協力者】

杉江 謙一:九州厚生局麻薬取締部
鑑定課厚生労働技官

木口 昭夫:九州厚生局麻薬取締部
鑑定課課長

河村麻衣子 国立医薬品食品衛生研究所
生薬部

A. 研究目的

近年、様々な危険ドラッグが出現し、令和 5 年 3 月時点で、医薬品医療機器等法下、指定薬物として規制されている薬物は 2420 種類となった。また、指定薬物から麻薬に規制強化された薬物は 72 種類にも及ぶ。これら薬物は、所持・使用が禁止されているが、構造類似体が多く存在し、また、

ほとんどの薬物において代謝物情報が未知であるため、特に、生体試料中薬物の鑑別は困難を極めている。そこで、法規制薬物の鑑別法に関する研究では、主に生体試料中規制薬物及び代謝物の迅速で高感度、かつ選択性の高い鑑別法開発に焦点をあて、新規に開発された質量分析装

置等を用いた検討を行う。また、代謝情報がない規制薬物については、薬物とその代謝酵素のコンピュータモデリングを用いた代謝物予測を行い、入手困難な主要代謝物については合成を検討する。さらに、薬物が起因した救急搬送事例や死亡事例等より入手した血液、尿、毛髪等の実際のヒト生体試料を用いて、上述した分析法の有用性を評価するとともに、測定データを蓄積する。

本研究は、法規制薬物及び植物について効果的な鑑別を行うための手法を確立することを目的としており、現場の諸問題に対応できるように監視・指導麻薬対策課、麻薬取締部等と連絡を取り合いながら、実態に即した研究を行う点に特徴がある。

本研究では以下の検討を行なった。

法規制薬物の鑑別に関する研究では、dextromethorphan (鎮咳去痰薬) もしくはエナンチオマーの levomethorphan (麻薬) を投与したラット毛髪試料等を用いて、SFE の条件検討を行い、キラルカラムを用いた LC-MS/MS による摂取識別法の検討を行った。大麻尿試験において GC 注入口で誘導体化する Injection Port Derivatization (IPD) TMS 誘導体化法の検討を行った。また、CBD 代謝物の 7-Carboxy cannabidiol (7COOH-CBD), 7-Hydroxy cannabidiol (7-OH-CBD) 及び大麻尿鑑定の主な対象物質である THC-COOH を対象物質として選択し THC-COOH と CBD 代謝物を識別可能な大麻尿試験法について検討を行った。インターネット上等で流通する THC アナログの含有を標榜する製品の流通実態調査を行った結果、THC のアルキル側鎖の長さが異なる化合物が多く検出された。これら化合物を製品より単離精製し各種スペクトルデータ (GC-MS, LC-MS, NMR) を取得した。 Δ^9 -THC および Δ^8 -THC それぞれを効率的かつ高純度に合成できるルートの検討を行い、高純度標準品の確保を目指した。また、合成化合物のコンピュータモデリングによる、カンナビノイド受容体への親和性評価を実施した。

法規制植物の鑑別に関する研究では、大麻草のテルペン合成酵素遺伝子の多様性に着目し、テルペン合成酵素遺伝子の配列情報を用いた大麻種 (品種, 栽培種) の判別法を検討するために遺伝子を取得し、配列情報の調査を行った。

B. 研究方法

超臨界流体抽出 (SFE) を用いた毛髪試料中薬物の抽出法の検討

1. 生体試料

毛髪実試料として、dextromethorphan もしくは levomethorphan 投与ラットの毛髪試料 (5 mg/kg, 10 days, n=3) を使用した。また上記において、薬物投与前にあらかじめラット背部の毛を刈り取り、これをラットコントロール毛髪試料とした。毛髪試料は既報に従い洗浄、乾燥後、0.5 mm 程度に細片化して使用した。さらに SFE 条件検討用のラットおよびヒトのモデル毛髪試料を用意した。細片化したコントロールラット毛髪またはヒト頭髪 100 mg を、dextromethorphan および 3 代謝物 (dextrorphan, 3-MEM, 3-HM) の各 0.01 mg/mL メタノール混合溶液に浸漬し、常温で 24 時間振盪後、メタノール 20 mL を加えて 3 回洗浄し、風乾して作成した。

2. SFE 条件の検討

抽出には MV-10 ASFE システム (Waters 社製) を使用し、超臨界流体には二酸化炭素を用いた。細片化した毛髪試料を正確に量り取って、海砂、脱脂綿を入れた抽出管 (2 mL) に入れ、さらに IS として levallorphan 溶液を添加して密封し、SFE システムに設置して抽出操作を行った。操作は制御ソフト (クロムスコープ) により自動化され、最大 6 試料を連続抽出可能である。1 試料につき pre run, main, post run を 1 サイクルとし、main 抽出時に modifier を添加し、dynamic (動的抽出) - static (静的抽出) - dynamic と順番に切り替えて抽出を行った。抽出液を 50 mL チューブに集め、30°C に加温して窒素吹付により乾固させた。残渣にメタノールを約 5 mL 加え、降り混ぜて溶解し、フィルタ

ろ過後に LC-MS/MS で分析を行った。

SFE の条件検討は以下の点について行った。

- ① Modifier の種類
- ② 抽出温度, 時間, modifier 添加濃度
- ③ 試料量

抽出効率の確認には, LC-MS/MS の MRM モードを用いて対象化合物の分析を行い, 試料間のピーク面積比や, 既報の塩酸メタノール溶液抽出における定量値と比較を行った。

塩酸メタノール抽出は下記の通り, 既報に従って行った。毛髪試料 10 mg に塩酸メタノール溶液および IS 溶液を加え, 1 時間超音波抽出を行った後, 一晚室温放置した。ろ過後, 窒素気流下で溶媒を乾固させ, 蒸留水に溶解後, 固相抽出 (OASIS HLB, 3cc, 60 mg, Waters) を行い, 得られたメタノール溶出液を測定試料とした。

違法薬物の GC/MS 分析における Injection Port Derivatization (IPD) TMS 誘導体化の有効性に関する検討 (カンナビノイド類の代謝物分析への応用)

1. 試薬および試料

7-COOH-CBD, 7-OH-CBD 及び THC-COOH の各 1 mg/mL のメタノール溶液は Sigma Aldrich® 社製のものを使用した。N, O-Bis (trimethylsilyl) trifluoroacetamide with 1% trimethylchlorosilane (以下 BSTFA) は Sigma Aldrich® 社製のものを使用した。健常人尿はフナコシ (株) から購入した。その他の試薬は特級品を使用した。

2. 装置及び器具

アルミブロック恒温槽 (TAITEC 社製, 型番: DTU-1CN), 10k ミニ遠心分離機 (ALLSHENG 社製, 型番: Mini-10k), Silicon Coating Tubes 2.0 mL (株) バイオメディカルサイエンス社製, 型番: bmb2200)

3. IPD-TMS 誘導体化

試料液 40 μ L に BSTFA 10 μ L を添加したものを GC/MS に注入した。

4. 加熱による TMS 誘導体化

試料液 40 μ L をガラスバイアルに入れ, BSTFA 10 μ L 加えた後, 80°C のアルミブロック恒温槽で 30 分間加熱した。反応後, 窒素気流により溶媒を蒸発乾固し, アセトニトリル 50 μ L に再溶解したものを GC/MS に注入した。

5. 尿試料の調製方法

40 ng/mL の 7-COOH-CBD, 7OH-CBD 及び THC-COOH を含有する尿試料を調製し, 添加回収試験に使用した。尿試料 1 mL を 2 mL のマイクロチューブに入れ, 0.2 mL の 10 N 水酸化カリウム添加し, 攪拌した後, 60°C の水浴で 30 分間加熱した。加熱後, 酢酸 0.2 mL を添加し, 抽出溶媒としてヘキサン・酢酸エチル混合液 (7:1) 0.5 mL を加え, 10 秒間攪拌した後, 遠心分離 (10, 000 rpm, 10 秒間) した。遠心分離後, 上層の有機層を分取した。同様の抽出操作を都合 3 回繰り返し, 分取した有機層は一つの試験管にまとめた。分取した有機層を窒素気流により乾固した後, アセトニトリル 40 μ L で再溶解し, BSTFA 10 μ L を添加したものを GC/MS に注入した。

新規麻薬類および危険ドラッグの標品合成に関する研究

合成に使用した試薬・溶媒類は試薬会社から購入したものをそのまま使用した。反応の追跡は薄層クロマトグラフィ (TLC) (Merck) にて行い, スポットの可視化は紫外線照射 (波長 254 nm), およびヨウ素蒸気または, 5w/v% リンモリブデン酸-エタノール溶液による染色にて行った。化合物精製のためのフラッシュカラムクロマトグラフィとしては, 中圧カラムクロマトグラフィ用充填カラム (Inject column / Hi-Flash column (山善)) を使用し, 検出器として UV 検出器 (254 nm) および蒸発光散乱検出器 (ELSD-100X (山善)) を備えた装置 (EPCLC-W-Prep2XY (山善)) を使用した。NMR は ECZ600 (JEOL 社) を使用し, 重クロロホルム (CHLOROFORM-D) を用いて室温にて測定した。化学シフト値 (δ , ppm) はテトラメチルシラン (TMS, 0 ppm), もしくは溶媒シグナルを用いて補

正した。質量分析はIT-TOF MS (Shimadzu 社)あるいは Single Quadrupole Detector (SQD) (Waters 社)を使用し、エレクトロスプレーイオン化法にて測定した。化合物の純度は ACQUITY UPLC (Waters)にて測定を行った。カンナビノイドと CB1 (5XRA) のドッキングシミュレーションは、Molecular Operating Environment (MOE) 2022.02 を使用して行った。ドッキング計算は一般的なドッキングの標準プロトコルを用いて実施し、CB1-AM11542 複合体の X 線構造 (5XRA) 中の AM11542 分子をリガンド結合領域として定義した。まず London dG score でランク付けした上位 30 ポーズに対して、力場精密化を行い、その後 GBVI/WSA dG 条件で再スコア化 (Refinement: induced fit) し、5 ポーズを抽出した。得られた計算結果のうち、最もエネルギーの低いドッキングスコア (kcal/mol) 結果を比較評価に使用した。

THC アナログ、THCV、THCB および THCH 含有を標榜するオイル製品中の成分の同定

令和 4 年度に入手した THC アナログの含有を標榜する 4 製品について GC-MS、LC-MS 分析を行った。未知成分については、NMR の解析により同定した。

1. 試料及び試薬

令和 3~4 年度に入手した THC アナログの含有を標榜するのうち 4 製品 (オイル 4 製品) を分析に供した。LC-MS の移動相に用いたアセトニトリルは HPLC グレードを使用した。その他の試薬は市販特級品を使用した。分析用標品としては、Cayman Chemicals (Ann Arbor, MI, USA)、Chiron (Trondheim, Norway) より購入した試薬を用いた。また、その他の化合物は、国立衛研において NMR 及び HR-MS 測定により同定したのものを用いた。抽出溶液の膜ろ過には、Ultrafree-MC (0.45 µm filter unit, Merck MILLIPORE 社製) を用いた。

2. MS 測定用試料の調製法

オイル製品は 1 mg を使用した。アセトニトリル 1 mL を加えて超音波下 10 分間抽出を行った後、

さらに膜ろ過を行い、不溶物を取り除いて測定試料とした。また、試料は適宜希釈して用いた。

3. 製品からの成分の単離

製品について、40mg をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し Hex-Hex:EtoAc 50:1-40:1-30:1-1:1 で溶出して成分を単離した。

大麻テルペン合成酵素遺伝子配列情報を用いた識別法の検討

分析試料として、メキシコ産系統種子 (1 粒) (M)、繊維用栽培種トチギシロ種子 (1 粒) (T)、大津産トチギシロ種子 (1 粒) (O)、大麻品種 “Hindu kush” (HK)、“MAZER” (MZ)、“Ultra skunk” (US)、“SHARMAN” (SN)、“Orange Bud” (OB) (各 1 粒) を用いた。

各果実 1 粒を用い、MM 300 (Qiagen) により粉砕した。粉砕した各種子は Maxwell 16 Tissue DNA purification kit (Promega) 中の溶出液に溶解し、Maxwell 16 (Promega) を用い DNA を抽出・精製した。回収 DNA 溶液各 300 mL 中の 1 mL を PCR 反応に用いた。

実験に用いたプライマーセットは Booth ら記載のものを用いた。反応溶液として、酵素には 0.05 mL Ex Taq Hot start version (Takara)、PCR 反応試薬には、5mL Ampdirect plus (Shimadzu)、各プライマー 10 pmol とし、全量 10 mL で PCR 反応を行った (95°C 3min; 98°C 10sec, 57°C 30sec, 72°C 120sec, 35cycles ; 72°C 10min)。アガロースゲル (0.8%) 電気泳動によりすべてのサンプルでバンドを確認されたもののみ、ダイレクトシーケンスを行った。ダイレクトシーケンスにより良好な結果が得られない場合は、PCR 反応溶液をポリエチレングリコール沈殿後、Mighty TA-cloning Kit (Takara) を用い、塩基配列を決定した。シーケンス反応には、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用い、解析は Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer を使用した。

C. 研究結果・考察

超臨界流体抽出(SFE)を用いた毛髪試料中薬物の抽出法の検討

1. SFE 条件の検討

ラット毛髪実試料を用いて、dextromethorphan およびその 3 代謝物の抽出における SFE 条件を検討した。また、回収率や再現性等の検討用に、ラットおよびヒトのモデル毛髪試料を使用した。

① Modifier の検討

メタノール、0.1%ギ酸添加メタノール、10mM 酢酸アンモニウム添加メタノール、アセトニトリル、アセトンの 5 種を超臨界二酸化炭素にそれぞれ 30%添加し、ラット毛髪実試料の抽出を行った。抽出物について、LC-MS/MS により測定を行い、MRM クロマトグラム上の dextromethorphan のピーク面積を算出した。Modifier としてメタノールを用いた際に得られるピーク面積値を 100 としたときの各 modifier 添加時のピーク面積比はそれぞれ 100, 100, 90, 20, 10 となり、メタノールを用いた場合に高い抽出効率が得られた。さらに、メタノールへの添加剤として、トリエチルアミン、ギ酸、トリフルオロ酢酸(いずれも 1%まで)および少量の Milli-Q 水(5%以内)を検討した結果、1%の酸および 5%の水を添加すると高い抽出率が得られた。

②抽出温度、時間、modifier 添加濃度

ラットモデル毛髪試料を用いて、塩酸メタノール溶液抽出時の各化合物濃度を 100 としたときの SFE 使用時の各濃度を抽出比として評価した。ラットモデル毛髪試料 10 mg を用いて、modifier として 1% ギ酸/ 5% Milli-Q 水含有メタノール溶液を 30%添加し、抽出温度を 60°Cあるいは 80°Cとして、45 分間の抽出を同一試料で 3 回繰り返し、各抽出液中の化合物濃度から抽出率を求めた。抽出時間は、dynamic 1 min -static 45 min -dynamic 1 min で 1 回とした。その結果、60°Cでは 1 回目の抽出で 40-55%、3 回目までの合計で 58-79%の抽出率を示した。80°Cに加温した場合は、1 回目で 52-75%、合計で 76-97%と抽出率の向上が確認できた。さらに条件の最適化を行ったところ、

modifier の添加濃度を 50%、加温を 85°C、抽出時間を static 60 分間に変更したところ、1 回で 89-102%の抽出率を得ることが可能であった。

③試料量

②で設定した SFE 条件でラット毛髪実試料 10 mg の分析を行ったところ、ラットモデル毛髪試料での検討結果と比較して、30 %程度低い値となった。これを改善するため、modifier の添加剤を 1%ギ酸から 1%トリフルオロ酢酸へ変更するとともに、試料量の検討を行った。その結果、実試料の試料量を 10 mg から 5 mg へと減らすことで、抽出効率をさらに高くすることが可能であった。

上記の検討結果を反映させた SFE 条件(詳細は方法項に記載)を用いて、ラットおよびヒトモデル毛髪試料を抽出した。SFE により分析を行った場合の各化合物濃度は、ラットおよびヒト試料ともに、塩酸メタノール溶液抽出における定量結果とほぼ同等であった。また、相対標準偏差(RSD %)は 5.2%以下となり、いずれも条件の最適化前と比較して改善していることが確認できた。ヒトモデル試料中の化合物濃度は、ラットと比較して 1/10 程度であったが、これはモデル毛髪試料作成時における、化合物溶液の毛髪内への浸透量の違いに起因していると考えられる。

今回、毛髪試料の SFE 条件検討において、コントロール毛髪試料に薬物溶液を浸透させたモデル毛髪試料を用いることで、化合物をコントロール試料に添加しただけの試料と比較して、より実試料に近い検討が可能であった。

2. SFE を用いた毛髪定量分析

最適化した SFE 条件を用いて、ラット毛髪実試料中の dextromethorphan/ levomethorphan および代謝物を抽出し、キラルカラム Chiral CD-ph column を用いた LC-MS/MS により定量分析を行った。検量線は、コントロール毛髪に化合物溶液を 0~100 ng/mg hair、IS 溶液を 5 ng/mg hair となるよう添加し、SFEによる抽出後、LC-MS/MS 分析を行い、MRM モードで作成した。真度、精度は 0.1, 10, 100 ng/mg hair (n=3)となるようコントロー

ル毛髪に化合物溶液を添加して検討した。なお、(-)-3-MEM および(-)-3-HM は、(+)-3-MEM および(+)-3-HM の検量線を用いて定量値を算出した。全化合物で検量線範囲の 1-100 ng/mg hair で良好な直線性が得られ、20%以内の真度、精度が得られた。

各濃度について、既報の塩酸メタノール溶液抽出による定量値と比較した結果、(+)-3-HM は 42.5%であったが、他化合物はいずれも 60%以上であった。塩酸メタノール溶液抽出と比較して、SFE の各化合物の抽出効率は低かったが、dextromethorphan および levomethorphan と共に、それぞれの 3 種類の代謝物も再現性よく検出されていた。SFE における抽出効率が低い理由のひとつとして、今回用いたラット毛髪は、洗浄・乾燥操作を行っても一定量の水分および油分が残存することから、超臨界流体で十分抽出しきれなかったことが考えられる。また、未変化体と代謝物では極性が異なり、双方の化合物の抽出に最適な条件を設定することが困難であることも考えられた。一方、既報の塩酸メタノール溶液抽出では抽出時間が 16 時間程度必要であり、乾固後の再溶解、固相抽出等の煩雑な操作が必要であったが、今回検討した SFE による抽出は 1 試料につき 1 時間半程度で可能であった。SFE による抽出は、毛髪中の薬物および代謝物を簡便に検出可能で、毛髪中薬物のスクリーニング法として優れていると考えられた。

違法薬物の GC/MS 分析における Injection Port Derivatization (IPD) TMS 誘導体化の有効性に関する検討(カンナビノイド類の代謝物分析への応用)

1. IPD-TMS 誘導体化における GC 注入口条件の検討

7-COOH-CBD, 7-OH-CBD 及び THC-COOH の IPD-TMS 誘導体化のため、GC 注入口条件を検討した。

1-1. 試料溶媒の選択

溶媒は無極性溶媒のヘキサン、極性溶媒の酢酸エチル及びアセトニトリル、誘導体化試薬の BSTFA を選択した。7-COOH-CBD, 7-OH-CBD, THC-COOH について、各種溶媒を用いて 10 µg/mL の試料液を調製し、同試料液 40 µL に BSTFA 10 µL を添加したものを GC/MS で測定した結果、全ての溶媒で十分に TMS 誘導体化反応が進行し、7-COOH-CBD 及び 7-OH-CBD については TMS が 3 つ付加した 7-COOH-CBD-3TMS, 7-OH-CBD-3TMS, THC-COOH については TMS が 2 つ付加した THC-COOH-2TMS が検出された。次に各種溶媒を用いて 100 µg/mL の試料液を調製した結果、ヘキサン溶媒では 7-OH-CBD のみが誘導体化された。他方、酢酸エチル、アセトニトリル、BSTFA を溶媒として用いた場合、全ての物質の TMS 誘導体化が十分に進行した。

溶媒による IPD-TMS 誘導体化への影響は、溶媒ごとの極性が要因であると考えられた。すなわち、極性溶媒のアセトニトリル、酢酸エチルでは IPD-TMS 誘導体化が進行するが、他方、ヘキサンのような無極性溶媒は IPD-TMS 誘導体化を促進しないという性質があるものと推測された。さらに、7-OH-CBD のみ、ヘキサン溶媒で TMS 誘導体化が進行していたことから、特にカルボキシル基への IPD-TMS 誘導体化には極性溶媒が適していると考えられた。また、これら溶媒における各物質 TMS 誘導体のピーク面積を比較したところ、BSTFA を用いた際に全ての TMS 誘導体で最もピーク面積は低くなった。他方、アセトニトリルと酢酸エチルの場合、7-OH-CBD と THC-COOH の TMS 誘導体においてピーク面積に差はみられなかったが、7-COOH-CBD の TMS 誘導体においてはアセトニトリルの方がピーク面積は高くなった。

以上のことから、IPD-TMS 誘導体化における溶媒として、アセトニトリルを選択することとした。

1-2. 注入口温度の設定

GC 注入口温度を 200, 220, 250, 280 及び 300°C、スプリット比を 20:1 に設定し、10 µg/mL の 7-COOH-CBD, 7-OH-CBD 及び THC-COOH の

アセトニトリル溶液 40 μL に BSTFA 10 μL を添加したものを GC/MS で測定した。その結果、全ての注入温度において、各物質の TMS 誘導体化は十分に進行し、そのピーク面積も全温度において一定であった。次にスプリット比 1:1 における GC 温度の影響について検証した結果、全物質で温度上昇によりピーク面積は上昇し、250°C 以降で一定となった。

以上のことから、上記範囲の GC 注入温度において、各物質の IP-TMS 誘導体化は十分に進行することが示唆され、スプリット比 1:1 における 7-COOH-CBD と THC-COOH のピーク面積上昇を考慮すると、GC 注入温度は 250°C 以上に設定することが望ましいと考えられた。

1-3. スプリット比の設定

10 $\mu\text{g/mL}$ のアセトニトリル溶液 40 μL に BSTFA 10 μL を添加したものを GC/MS で測定した。その際に、GC 注入温度は 250°C に設定し、GC 注入のスプリット比を 1:1, 5:1, 10:1, 20:1, 30:1 及び 50:1 に設定した。各スプリット比におけるカラムへの試料導入量を算出し、各物質の TMS 誘導体のピーク面積との関係を検証した。カラム導入量は試料注入量 1 μL をカラム流量 1 mL/min と各スプリット流量の総和により除すことで算出した。その結果、カラムへの試料導入量と各物質の TMS 誘導体ピーク面積の間には強い相関関係があることが確認された。このことから、全てのスプリット比において、IPD-TMS 誘導体化の反応効率は一定であることが推測された。さらに、各スプリット比における 7-OH-CBD のピーク面積に対する 7-COOH-CBD 及び THC-COOH とのピーク面積比を検証した。その結果、スプリット比が低いほど 7-COOH-CBD/7-OH-CBD と THC-COOH/7-OH-CBD が高くなる傾向があり、7-COOH-CBD と THC-COOH は低スプリット比により感度が上昇することが確認された。これは両物質が 7-OH-CBD よりも揮発性が低く、高スプリット比ではインサート内の試料滞留時間が短く、十分に気化されていないことが原因であると考えられた。

以上のことから、IPD-TMS 誘導体化における GC 注入のスプリット比については、全ての物質がより高感度に検出可能な 1:1 に設定することとした。

2. IPD-TMS 誘導体化と加熱法の比較

IPD-TMS 誘導体化の有効性を検証するため、汎用される加熱法との比較を行った。各物質につき 10 $\mu\text{g/mL}$ のアセトニトリル溶液を試料液とした。加熱法については「4 加熱による TMS 誘導体化」に従い試料調製を行い、GC/MS で測定した。なお、加熱法について、試料液中の BSTFA により GC/MS 注入時に IPD が引き起こされるため、加熱反応後の反応液を一度、窒素乾固する工程を入れている。GC/MS の条件として、スプリット比を 1:1, 5:1, 10:1, 20:1, 30:1 及び 50:1 に設定し、各誘導体化法における各物質 TMS 誘導体のピーク面積の挙動を比較した。その結果、窒素乾固していることから、加熱法での各物質のピーク面積は IPD より若干小さくなるが、両者のピーク面積の挙動はほぼ一致していた。加熱法では全物質が TMS 誘導体化された状態で GC/MS に注入されるため、IPD と加熱法のピーク面積挙動が一致するという事は、全スプリット比において IPD-TMS 誘導体化は従来の加熱法と同等の反応性を示すと考えられた。以上のことから、7-COOH-CBD, 7-OH-CBD 及び THC-COOH の IPD-TMS 誘導体化は従来の加熱法と同等の反応性を有し、かつ加熱法で要する 30 分の反応時間も省略できることから、各物質の TMS 誘導体化法として有用であることが示唆された。

3. IPD-TMS 誘導体化における検出限界、定量下限及び検出限界

設定した注入条件を用い、各物質の IPD-TMS 誘導体化における検出限界および定量下限を検証した。その際、GC/MS の測定モードは SCAN を用いた。その結果、各物質 TMS 誘導体ともに検出限界は 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 、定量下限 1 $\mu\text{g/mL}$ であった。また、1~50 $\mu\text{g/mL}$ の濃度範囲で検量線を作成したところ、全物質 TMS 誘導体につき

$r=0.999$ 以上の良好な相関性が得られた。なお、本 GC 注入口条件を用いた IPD-TMS 誘導体化において、7-COOH-CBD の THC-COOH への変換は確認されなかった。

4. 尿試料への IPD-TMS 誘導体化の応用

大麻尿試験への IPD-TMS 誘導体化の適応を検討するため、40 ng/mL の 7-COOH-CBD, 7-OH-CBD 及び THC-COOH を含有する尿試料を調製し、添加回収試験を実施した。その際の GC 注入口条件は注入口温度を 250°C, スプリット比を 1:1 に設定した。なお、本添加回収試験において、尿中の夾雑成分の影響を避けるため GC/MS の測定モードは SIM を用いた。尿試料の測定においても IPD-TMS 誘導体化反応は進行し、7-OH-CBD, 7-COOH-CBD 及び THC-COOH の TMS 誘導体もそれぞれ分離され、識別が可能であった。また、クロマトグラム上の各 SN 比は 7-OH-CBD-3TMS が 188, 7-COOH-CBD-3TMS が 85, THC-COOH-2TMS が 143 となり 40 ng/mL と低濃度の尿試料についても良好な感度を得られた。さらに、本実験で採用した前処理法における各物質の回収率は 7-OH-CBD が 39.3%, 7-COOH-CBD が 47.6%, THC-COOH が 103.5%であった。CBD 代謝物の回収率が THC-COOH よりも低くなったのは、各 CBD 代謝物の化学構造にある2つの水酸基により、THC-COOH よりも水溶性が高くなり、液液抽出時の有機層への分配性が低下したことが要因であると考えられた。そのため、本前処理で採用した抽出溶媒については、溶媒の種類や混合比率の検討を行い、CBD 代謝物の回収率を改善する必要があると考えられた。一方、一般的に使用される大麻尿のスクリーニングキットのカットオフ値は 50 ng/mL であることを考慮すると、本試験法でも大麻尿試験に十分に対応可能であると考えられた。

以上のことから、大麻尿試験においても CBD 代謝物、THC-COOH への IPD-TMS 誘導体化は応用可能であることが示唆された。また、IPD-TMS 誘導体化を用いた各物質を識別可能かつよ

り迅速な大麻尿試験法を構築した。

新規麻薬類および危険ドラッグの標品合成に関する研究

・ Δ^8 -THC の合成

CBD (997 mg, 3.17 mmol) のトルエン溶液 (50 mL) にパラトルエンスルホン酸一水和物 (161 mg, 0.84 mmol) を加え、100°C にて 16 時間攪拌した。反応溶媒を減圧留去した後に、水を加え、酢酸エチルで 3 回抽出した。合わせた有機層を硫酸ナトリウムで乾燥させた後に濃縮し、粗精製物を得た。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (n -ヘキサン/トルエン = 4:1) にて精製し、 Δ^8 -THC を淡茶色油状物質として得た (371 mg, 収率 37%)。

・ Δ^9 -THC の合成

CBD (0.944 g, 3.0 mmol) のジクロロメタン溶液 (60 mL) を -78°C に冷却し、三フッ化ホウ素ジエチルエーテル錯体 (555 μ L, 4.5 mmol) を加えた。反応液を -40°C に昇温し、40 時間攪拌した。反応液に、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (3 mL), 水 (20 mL) を加えて反応を停止させ、反応溶液を室温へと昇温した。生成物をジクロロメタン (20 mL) で 3 回抽出し、合わせた有機層を硫酸ナトリウムで乾燥させた後に濃縮し、粗生成物を得た。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (n -ヘキサン:トルエン = 60:40-45:55) にて 2 度精製し、 Δ^9 -THC を褐色油状物質として得た (0.292 g, 収率 31%)。

・ コンピュータモデリングについて

Δ^8 -THC および Δ^9 -THC のコンピュータモデリング計算結果では、計算に用いた CB1 受容体-AM11542 複合体中の、カンナビノイド誘導体 AM11542 と同様に結合することが示唆された。また、CBD (-8.187 kcal/mol) と比較し、それぞれ Δ^8 -THC (-8.612 kcal/mol), Δ^9 -THC (-8.736 kcal/mol) と見積もられ、 Δ^8 -THC および Δ^9 -THC は同程度の結合力を示すことが示唆された。

THC アナログ, THCv, THCB および THCH 含有を標榜するオイル製品中の成分の同定

分析を行った危険ドラッグ 4 製品から 6 種類の新規流通化合物を同定した。

製品 A は GC-MS では保持時間 8.33 分に主成分とみられる化合物 **1** のピークが検出された。LC-MS ではそれぞれ保持時間 18.2 分に m/z 287 $[M+H]^+$ のピークが観測された。NMR 分析の結果、化合物 **1** は Δ^8 -THC の 3 位のアルキル側鎖がペンチルでなくプロピルである構造 (6aR,10aR)-6a,7,10,10a-tetrahydro-6,6,9-trimethyl-3-propyl-6H-dibenzo[b,d]pyran-1-ol (Δ^8 -tetrahydrocannabivarin, Δ^8 -THCV) であると同定した。さらに GC-MS では保持時間 8.59 分に、LC-MS では保持時間 27.8 分にマイナー成分とみられる化合物 **2** のピークが検出された。LC-MS では m/z 287 に $[M+H]^+$ のピークが観測され、GC-MS で m/z 286 に分子イオンも観測されたが、そのマススペクトルは化合物 **1** と異なっていた。 Δ^9 -THCV の標準品と一致したため化合物 **2** は、6aR,7,8,10aR-tetrahydro-6,6,9-trimethyl-3-propyl-6H-dibenzo[b,d]pyran-1-ol (11 α -hexahydrocannabinol, Δ^9 -THCV) であると同定した。

製品 B は GC-MS では保持時間 9.76, 10.13 分にマイナー成分とみられる化合物 **3** と主成分とみられる化合物 **4** のピークが検出された。LC-MS ではそれぞれ保持時間 20.8, 20.3 分に m/z 301 に $[M+H]^+$ のピークが観測された。化合物 **3** と **4** の NMR 分析の結果、それぞれ Δ^8 -THC と Δ^9 -THC のアルキル側鎖がペンチルでなくブチルである構造であることがわかった。以上の結果より、製品 B に含有される化合物 **3** を *trans*-3-butyl-6aR,7,10,10a-tetrahydro-6,6,9-trimethyl-6H-dibenzo[b,d]pyran-1-ol (Δ^8 -tetrahydrocannabutol, Δ^8 -THCB), 化合物 **4** を *trans*-3-butyl-6aR,7,8,10a-tetrahydro-6,6,9-trimethyl-6H-dibenzo[b,d]pyran-1-ol (Δ^9 -tetrahydrocannabutol, Δ^9 -THCB) と同定した。

製品 C は主成分の CBN の他に、GC-MS では

保持時間 12.6 分、LC-MS では保持時間 28.2 分にマイナー成分とみられる化合物 **5** のピークが検出された。LC-MS では m/z 329 に $[M+H]^+$ のピークが観測され、GC-MS で m/z 328 に分子イオンも観測された。化合物 **5** の NMR 分析の結果、 Δ^8 -THC のアルキル側鎖がペンチルでなくヘキシルである構造であることがわかった。以上の結果より、製品 C に含有される化合物 **5** の (6aR,10aR)-3-hexyl-6a,7,10,10a-tetrahydro-6,6,9-trimethyl-6H-dibenzo[b,d]pyran-1-ol (Δ^8 -tetrahydrocannabihexol, Δ^8 -THCH) であると同定した。

製品 D は GC-MS では保持時間 13.0 分に主成分とみられる化合物 **6** のピークが検出された。LC-MS では保持時間 25.2 分に m/z 329 $[M+H]^+$ のピークが観測された。NMR 分析の結果、化合物 **6** は Δ^9 -THC の 3 位のアルキル側鎖がペンチルでなくヘキシルである構造 (6aR,10aR)-3-hexyl-6a,7,8,10a-tetrahydro-6,6,9-trimethyl-6H-dibenzo[b,d]pyran-1-ol (Δ^9 -tetrahydrocannabihexol, Δ^9 -THCH) であると同定した。なお製品 D は主成分の Δ^9 -THCH の他に、GC-MS では保持時間 13.0 分、LC-MS では保持時間 25.8 分にマイナー成分の Δ^8 -THCH (**5**) のピークも検出された。

以上、4 種類のオイル状危険ドラッグ製品について、それぞれの成分を同定した。

大麻テルペン合成酵素遺伝子配列情報を用いた識別法の検討

各分析試料 (8 種) から抽出した DNA を用い、既報のプライマーセットを用い PCR を行った。すべての分析試料でバンド (PCR 産物) が同サイズで確認できたもののみ塩基配列を調べ、それらの類似性を検索した。プライマーセット CsTPS7FN および CsTPS9FN で、すべての試料から産物が得られた。CsTPS7FN で得られた PCR 産物のアライメント (60~407bp) はイントロン領域に大きな変異がみられ、2 種のタイプの類似配列がメキシコ産系統以外から得られた (A タイプ, B タイプ)。大きくは 2 タイプに分けられ本遺伝子のヘテロ接合

度は高い結果であった。CsTPS9FN で得られた PCR 産物のアライメント(78~520bp)ではイントロン領域に大きな変異がみられ、2 種のタイプの類似配列が4種から得られた。

本研究では大麻のテルペン合成酵素遺伝子の多様性に着目し、その配列の違いによる大麻種の判別法の検討を行った。既報のプライマーセット 8 種を用い、PCR を行ったがすべての試料から産物が得られたのは 2 種のみであった。カンナビノイド合成酵素に比べ、大麻のテルペン合成酵素の DNA 情報が少なく、縮重プライマーの作成ができなかった点がある。一方で、今回得られた配列は Finola で得られた 9 種のテルペン合成酵素が基になっているが、テルペン合成酵素 Finola_TPS7 は Finola_TPS8 (類似度 92%)と類似しており、今回の結果においても Finola_TPS7 類似配列として示したが、Finola_TPS8 とも類似している点は詳細に調査する必要がある。これらはカンナビノイド合成酵素 (THCAS, CBDAS, CBCAS)と類似した点である。近年、大麻のゲノム解析、量的形質遺伝子座解析においてカンナビノイド合成とテルペン合成は同一の遺伝子座に位置していることが指摘されている。大麻のカンナビノイドの多様性はこの染色体位置に依存した遺伝子重複によって起こっていることが指摘されており、同様のことがテルペン合成にも起こっていると示唆される。それはテルペン合成酵素のコピー数とリンクしていると考えられる。コピー数の多さは、その遺伝子の配列情報を用いた遺伝子型判別法に不利である。近年、大麻のマリファナ/ヘンプ判別法として報告されている遺伝子型判別法では EU における認定ヘンプ種子の 35%がマリファナと判定されると報告されている。一方で、カンナビノイド合成酵素とテルペン合成酵素の DNA 配列の大きな違いはイントロンの有無であり、イントロンを有するテルペン合成酵素はより多くの多様性を許容でき、大麻種だけでなく産地などにおける多様性をその DNA 情報に反映でき、判別法には有効とも考えられた。

D. 結論

本研究は、法規制薬物及び植物について効果的な鑑別を行うための手法を確立することを目的としており、令和 4 年度は以下の研究を行なった。法規制薬物の鑑別に関する研究では、dextromethorphan もしくはエナンチオマーの levomethorphan を投与したラット毛髪試料等を用いて、SFE の条件検討を行い、キラルカラムを用いた LC-MS/MS による摂取識別法の検討を行った。Dextromethorphan 投与ラット毛髪実試料からの dextromethorphan 及び代謝物 3 化合物の SFE 条件を検討した結果、メタノールにトリフルオロ酢酸 1%、水 5%を添加した modifier を 50%用い、85°Cに加温して静的抽出を 1 時間行った条件が最も適していた。ラットもしくはヒトのコントロール試料に、dextromethorphan 及び代謝物 3 化合物を浸透させたモデル毛髪試料を用いて、最適化した SFE 条件により各化合物の抽出率を検討した結果、いずれも 88-103%となり、ばらつき(RSD%)は 5.2%以下と良好な結果を示した。さらに、dextromethorphan もしくは levomethorphan 投与ラット毛髪実試料中の dextromethorphan/levomethorphan 及びそれらの代謝物を SFE で抽出し、キラルカラムを用いた LC-MS/MS により分離分析を行った。その定量値を既報の塩酸メタノール溶液抽出による定量値と比較した結果、(+)-3-HM は 42.5%であったが、他化合物はいずれも 60%以上であった。SFE による分析結果は塩酸メタノール溶液抽出による結果よりも低い値であったが、すべての分析対象化合物が再現性よく検出された。また、塩酸メタノール溶液抽出では抽出時間が 16 時間程度必要で、さらに溶媒留去、再溶解、固相抽出等の煩雑な操作が必要であるが、今回検討した SFE は 1 試料につき 1 時間半程度で抽出可能であり、煩雑な前処理も必要ない。以上より、SFE は毛髪中の薬物及び代謝物を効率よく簡便に検出可能なスクリーニング手法として有用であると考えられた。大麻尿試験におい

て GC 注入口で誘導体化する IPD-TMS 誘導体化法の検討を行った。また、CBD 代謝物の 7COOH-CBD, 7-OH-CBD 及び大麻尿鑑定の主な対象物質である THC-COOH を対象物質として選択し THC-COOH と CBD 代謝物を識別可能な大麻尿試験法について検討を行った。IPD-TMS 誘導体化のための GC 注入口条件を検討したところ、注入口温度を 250°C、スプリット比 1 : 1、試料溶媒にアセトニトリルを用いる条件を設定するに至った。この条件を用いて、従来の加熱法による TMS 誘導体化の反応性と比較したところ、IPD-TMS 誘導体化は加熱法と同等の反応効率を有することを確認し、IPD-TMS 誘導体化を用いることで試験時間を大幅に短縮可能であることが示唆された。また、IPD-TMS 誘導体化法を用いた大麻尿試験法を設計し、各物質を 40 ng/mL 含有する尿試料を用いて添加回収試験を実施したところ、本法における各物質の回収率は 7-OH-CBD が 39.3%、7-COOH-CBD が 47.6%、THC-COOH が 103.5%となり、低濃度の大麻尿に対しても本法は対応可能であることが示唆された。インターネット上で流通する THC アナログの含有を標榜する製品の流通実態調査を行った結果、THC のアルキル側鎖の長さが異なる化合物が多く検出された。これら化合物を製品より単離精製し各種スペクトルデータ(GC-MS, LC-MS, NMR)を測定した。その結果、THCV の含有を標榜する製品から Δ^8 -THCV と Δ^9 -THCV, THCB の含有を標榜する製品から Δ^8 -THCB と Δ^9 -THCB と、THCH の含有を標榜する製品から Δ^8 -THCH と Δ^9 -THCH を同定した。 Δ^9 -THC および Δ^8 -THC それぞれを効率的かつ高純度に合成できるルートの検討を行い、高純度標準品の確保を目指した。その結果、CBD を共通出発原料として、環化反応の反応条件を検討することで、100°C下では Δ^8 -THC が、-40°C下では Δ^9 -THC が優先的に合成されることを明らかにし、それぞれの化合物を分析用標品として提供した。また、合成化合物のコンピュータモデリングによるカンナビノイド受容体への親和性評価を

実施した。 Δ^8 -THC および Δ^9 -THC のコンピュータモデリングの結果、計算に用いた CB1 受容体-AM11542 複合体中の、カンナビノイド誘導体 AM11542 と同様に結合することが示唆された。また、CBD (-8.187 kcal/mol)と比較し、それぞれ Δ^8 -THC (-8.612 kcal/mol)、 Δ^9 -THC (-8.736 kcal/mol)と見積もられ、 Δ^8 -THC および Δ^9 -THC は同程度の結合力を示すことが示唆された。

法規制植物の鑑別に関する研究では、大麻草のテルペン合成酵素遺伝子の多様性に着目し、テルペン合成酵素遺伝子の配列情報を用いた大麻種(品種, 栽培種)の判別法を検討するために遺伝子を取得し、配列情報の調査を行った。大麻 8 試料(品種, 栽培種)から 2 種のテルペン合成酵素遺伝子断片を単離し、その配列比較を行った結果、各遺伝子はイントロン領域に大きく違いが見られ、それぞれ 2 つのタイプに分離された。

以上、本研究は、厚生労働省の薬物取締行政に直接貢献する研究であり、国の乱用薬物対策に即したものと考えられる。

E. 健康危険情報

特になし。

F. 研究発表

学会発表

1. 田中理恵, 花尻(木倉)瑠理: インターネット上で流通するオイル製品中の THC アナログの同定, 日本薬学会第 143 年会 (2023.3.26, 札幌)
2. 河村麻衣子: 超臨界流体抽出を用いた高効率なラット毛髪試料中薬物抽出法の検討. 日本薬学会第 142 年会 (2022.3.25-28, Web 開催)

論文発表

1. 田中理恵, 水谷佐久美, 河村麻衣子, 瀧野裕之, 川原信夫, 花尻(木倉)瑠理, LC-Q-TOF-MS を用いた大麻草 (*Cannabis sativa* L.)

の cannabinoid 11 成分の分析. , *薬学雑誌*,
143, 411–418 (2023).

2. Kurohara T., Ito T., Tsuji G., Misawa T., Yokoo H., Kawamura M., Shoda T., Hanajiri-Kikura R., Demizu Y. Comprehensive synthesis of 20 fentanyl derivatives for use as reference materials., *Heterocycles*, **106**, 82-93 (2023).