


最終報告書

¹⁴C-TM5509 の薬物動態試験業務 (¹⁴C-TM5509 のサルにおける胆汁中代謝物分析試験)

※TM5509とその代謝物の構造式、分子式及び分子量等はマスクを施している。
また、構造が推定可能と考えられるMSスペクトル、図等のページは削除してある (Fig 1-25,12-16,19-48、Appendix1-25等)。

2014年3月26日

積水メディカル株式会社
薬物動態研究所



試験番号 : AE-7246-G

試験表題 : ^{14}C -TM5509 の薬物動態試験業務 (^{14}C -TM5509 のサルにおける胆汁中代謝物分析試験)

試験委託者 : 東北大学 大学院医学系研究科
宮田 敏男

委託担当者 : 附属創生応用医学研究センター 分子病態治療学分野
段 孝
所在地 〒980-8575 宮城県仙台市青葉区星陵町 2-1
電話番号 022-717-8158
FAX 番号 022-717-8159

試験実施施設 : 積水メディカル株式会社 薬物動態研究所
所在地 〒319-1182 茨城県那珂郡東海村村松 2117 番地

運営管理者 : 薬物動態研究所 稲葉 厚弘

試験責任者 : 薬物動態研究所 野沢 耕平
電話番号 029-282-0232
FAX 番号 029-282-0109

試験期間 : 試験開始日 2013年11月15日
最終報告書提出日 2014年3月26日

試験実施者 : 薬物動態試験 岩田 敏明
小泉 菜都子
及川 祥江

当試験は「申請資料の信頼性の基準 (薬事法施行規則第 43 条)」に従い実施した。また、当試験方法及び操作は、積水メディカル株式会社 薬物動態研究所にて制定した標準操作手順書に従って行った。

なお、当最終報告書は当施設において実施された試験結果に基づき作成されたものに相違ない。

2014 年 3 月 26 日 野沢 耕平

目次

	頁
1 要約	6
2 試験目的	7
3 機器	7
4 試薬	7
5 標準物質	8
6 分析試料	9
7 試験方法	9
7.1 分析試料	9
7.2 前処理方法	10
7.3 分析条件	11
7.3.1 HPLC条件	11
7.3.2 LC/MS条件	11
7.4 代謝物プロファイリング	12
7.5 構造推定	12
8 試料の取扱い	13
8.1 試料の識別	13
8.2 試料の取扱い	13
9 放射能の測定方法	13
9.1 LSC	13
9.2 RAD	13
10 バックグラウンド値の設定	13
10.1 LSC	13
10.2 RAD	13
11 データ処理	14
11.1 データの表示	14
11.1.1 放射能回収率	14
11.1.2 HPLCプロファイル	15
11.1.3 MS及びMS ⁿ スペクトル	15
11.1.4 試料中未変化体及び代謝物の割合	15
11.2 統計学的解析	15
12 再試験及び再測定	15

13	予見することが出来なかった試験の信頼性に影響を及ぼす可能性のある事態及び試験計画書に従わなかった事項並びに試験計画書の変更.....	16
14	試験結果	16
14.1	代謝物プロファイル.....	16
14.1.1	標準物質	16
14.1.2	胆汁	16
14.1.3	肝臓	17
14.2	代謝物の構造解析.....	17
15	考察	21
16	資料保存	22
17	適用基準	22
18	適用ガイドライン	22
19	参考文献	22
20	TABLES AND FIGURES	23

1 要約

サルに ^{14}C で標識された TM5509 (標識位置:カルボキシル基の炭素原子) (以後 ^{14}C -TM5509 と略す) を単回経口投与して得られた胆汁及び肝臓中の代謝物の構造を推定した。

5 mg/kg 投与群, 20 mg/kg 投与群, 80 mg/kg 投与群及び 300 mg/kg 投与群の胆汁いずれにおいても, 未変化体 TM5509 が主成分の 1 つとして検出された他, 投与後 0~8 時間において, CB05 (酸化的脱塩素体とグルクロン酸抱合体の混合物), CB06 (グルクロン酸抱合体) 及び CB12 (環化体) が, 投与後 8~48 時間において CB01 (酸化体のグルクロン酸抱合体, 酸化体のグルクロン酸及び硫酸抱合体の混合物, 酸化及び水和された代謝物, 2 酸化及び水和された代謝物の混合物), CB03 (2 酸化及び水和された代謝物 2 種, 4'-sulfooxy TM5509, グルクロン酸抱合体, 酸化及び水和された代謝物の混合物) 及び CB06 がそれぞれ主代謝物として認められた。

80 mg/kg 投与群の肝臓中には未変化体 TM5509 が主成分の 1 つとして検出された他, CL04 (CB01), CL05 (CB03 の 4 種+酸化体のグルクロン酸抱合体の混合物) が主代謝物として認められた。

2 試験目的

^{14}C -TM5509 をサルに単回経口投与して得られた胆汁及び肝臓中の代謝物分析を行い、主要代謝物の構造を高分解能 LC/MS により推定した。

3 機器

機器名		仕様	製造元
液体シンチレーションカウンター (LSC)		2500TR, 2700TR	PerkinElmer
放射能検出器 (RAD)		525TR, 625TR	PerkinElmer
HPLC		LC-10A _{VP} シリーズ	島津製作所
LC/MS システム	HPLC	LC-20A シリーズ	島津製作所
	MS	LTQ Orbitrap XL	Thermo Fisher Scientific
超低温フリーザー		CLN シリーズ	日本フリーザー
冷蔵庫	NP シリーズ		日立製作所
	HR シリーズ		ホシザキ電機
冷凍庫	HF シリーズ		ホシザキ電機
冷凍冷蔵庫		453S2	日立アプライアンス
微量高速遠心機		CF15R	日立工機
マイクロピペット		4910 型	Eppendorf AG
電子天秤		XS205DU	メトラー・トレド
超音波洗浄器		VS-150	アズワン
小型超純水製造装置		Milli-Q Labo	Merck
小型冷却遠心機		CF7D2	日立工機
ロータリーエバポレーター		N-1000 型	東京理化工機
振盪器		SA-31	ヤマト科学
フラクションコレクター		RETRIEVER IV	TELEDYNE ISCO

4 試薬

試薬	規格	Lot No.	製造元
シンチレーター FLO-SCINT II	-	82-13161	PerkinElmer
シンチレーター HIONIC-FLUOR	-	55-13131	PerkinElmer
		55-13291	
		55-13411	
組織溶解剤 SOLUENE-350	-	24-13161	PerkinElmer
蒸留水	LC/MS 用	508G3067	関東化学
		601G3021	
酢酸	LC/MS 用	TLF1977	和光純薬工業
	特級	410N1155	関東化学
酢酸アンモニウム	特級	M2P4325	ナカライテスク

試薬	規格	Lot No.	製造元
アセトニトリル	LC/MS 用	AWG0026 AWE2653	和光純薬工業
	HPLC 用	509H1428	関東化学
	特級	503H1803	
メタノール	特級	508B1015 510B1012	関東化学
	HPLC 用	509B1167	関東化学
2-プロパノール	HPLC 用	509H1565	関東化学
N-メチル-2-ピロリジノン	特級	305N1068	関東化学
エタノール	特級	509H1892	関東化学
トルエン	特級	404N1181	関東化学

5 標準物質

TM5509

Lot No. : TMC-001

保存条件 : 気密容器, 遮光下, 冷蔵

入手日 : 2013年9月25日

供給元 : 東北大学

3'-hydroxy TM5509

Lot No. : NH-2

保存条件 : 気密容器, 遮光下, 冷凍

入手日 : 2013年11月27日

4'-hydroxy TM5509

Lot No. : NH-1

保存条件 : 気密容器, 遮光下, 冷凍

入手日 : 2013年11月27日

4'-sulfoxy TM5509

Lot No. : NH-28 (UM5)

保存条件 : 気密容器, 遮光下, 冷凍

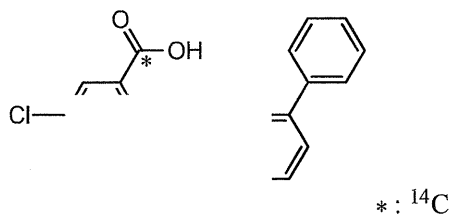
入手日 : 2013年11月27日

6 分析試料

^{14}C -TM5509 をサルに投与 (AE-7245-G) して得られた試料を使用した。

保存条件： 気密容器，遮光下，超低温フリーザー内

^{14}C -TM-5509：



7 試験方法

7.1 分析試料

胆汁；

<代謝物プロファイリング>

各個体から得られた以下の試料を分析した。

群	投与量 (mg/kg)	頭数	時点	検体数
1	5	3	0~8 時間 8~48 時間	各 1
2	20	3		
3	80	3		
4	300	3		

8~48 時間の試料は，採取量比に応じて各個体ごと容量比で混合した。

<代謝物構造推定>

各群の試料を採取量比に応じて混合し，以下の試料を分析した。

群	投与量 (mg/kg)	時点	検体数
1	5	0~48 時間	各 1
2	20		
3	80		
4	300		

肝臓；

<代謝物プロファイリング，代謝物構造推定>

以下の試料¹⁾を分析した。

群	投与量 (mg/kg)	時点数	検体数
3	80	48 時間	1

1) 各個体から一部採取した肝臓を合わせ，2 倍量の生理食塩水を加えて調製したホモジネート (AE-7245-Gで調製)

7.2 前処理方法

胆汁；

試料 (200 μ L) に HPLC 移動相 A (200 μ L) を加え，遠心分離 (4°C, 1,800 \times g, 10 min) 後の上清を HPLC あるいは LC/MS 測定試料とした。

希釈後の試料及び遠心後の上清をそれぞれ 50 μ L を採取し，シンチレーター-HIONIC-FLUOR を 10 mL 加え転倒混和した後に，放射能を LSC で 2 分間測定した。

肝臓；

試料 (2 mL) にエタノール (6 mL) を加え振盪 (10 min) した後，遠心分離 (4°C, 1800 \times g, 10 min) し上清を採取した。残渣には，水 (1 mL) を加え懸濁し，エタノール (6 mL) を加え，同様に振盪・遠心分離し上清を採取した。残渣の水による懸濁，エタノール添加，振盪・遠心分離，上清採取の操作を再度行った後，採取したすべての上清を合わせ，エタノールで定容 (25 mL) した。定容した上清から 1 mL を採取し，シンチレーター-HIONIC-FLUOR を 10 mL 加え転倒混和した後に LSC で放射能を 2 分間測定した。残余の上清を濃縮乾固した後，下記の再溶解溶媒で順番に溶解し，それぞれの再溶解液を合わせ，遠心分離 (4°C, 8800 \times g, 5 min) 後の上清を HPLC あるいは LC/MS 測定試料とした。測定試料から 25 μ L を採取し，シンチレーター-HIONIC-FLUOR を 10 mL 加え転倒混和した後に LSC で放射能を 2 分間測定した。なお，エタノール抽出後の残渣は組織溶解剤 SOLUENE-350 2 mL に溶解させた後にトルエンで定容 (10 mL) し，そのうちの 1 mL を採取し，シンチレーター-HIONIC-FLUOR を 10 mL 加え転倒混和した後に LSC で放射能を 2 分間測定した。

再溶解溶媒 (各 200 μ L)

溶媒 1) *N*-methyl-2-pyrrolidinone / 初期移動相 (1 : 4)

溶媒 2) 水 / メタノール (1 : 1)

溶媒 3) *N*-methyl-2-pyrrolidinone / メタノール / 水 (1 : 1 : 1)

初期移動相 : 0.1%酢酸含有の 10 mmol/L 酢酸アンモニウム / アセトニトリル (95 : 5)

7.3 分析条件

7.3.1 HPLC条件

カラム : XBridge Shield RP18, 5 μ m, 4.6 mm I.D. \times 250 mm L (Waters)

移動相 : A; 10 mmol/L ammonium acetate containing 0.1% acetic acid
B; Acetonitrile

グラジエント :

Time (min)	0	5	20	35	45	45.1	60
B%	5	5	40	90	90	5	5

流速 : 1.0 mL/min

カラム温度 : 40°C

UV 検出 : 260 nm

放射能検出 : RAD (14 C) [胆汁分析時]

LSC (14 C) [肝臓分析時]

分析時間 : 60 min

肝臓分析時は、HPLCからの溶出液を18秒毎に分取し、シンチレーターHIONIC-FLUOR 4 mLを加え転倒混和した後にLSCで放射能を2分間測定した。

7.3.2 LC/MS条件

<LC 条件>

7.3.1項記載の条件

HPLC 溶出液を分岐し、1/10 を MS に、9/10 を放射能測定に用いた。

<MS 条件>

ESI (+)

Spray voltage : 4.0 kV

Capillary temperature : 350°C

Vaporizer temperature : - (not set)

Sheath gas : 55 arb

Auxiliary gas : 10 arb

Sweep gas : 0 arb

Activation type* : CID

Normalized collision energy* : 35%

ESI (-)

Spray voltage :	3.0 kV
Capillary temperature :	350°C
Vaporizer temperature :	- (not set)
Sheath gas :	40 arb
Auxiliary gas :	5 arb
Sweep gas :	0 arb
Activation type* :	CID
Normalized collision energy* :	35%

*: set at (MSⁿ) measurement

7.4 代謝物プロファイリング

<カラム回収率の確認>

放射能検出を RAD で行う場合は、HPLC 溶出液を回収し、シンチレーター-HIONIC-FLUOR により 250 mL に希釈した。希釈した HPLC 溶出液から 10 mL を採取し、シンチレーター HIONIC-FLUOR 5 mL を加え放射能を LSC で 2 分間測定した。胆汁は各群 1 頭の各時点の試料の分析時に実施した。

放射能検出を LSC で行う場合は、分取した各フラクションの放射能 (dpm) の総和を分析時に回収された放射能とした。

<放射能ピークの付番>

HPLC 分析で得られた放射能ピークに保持時間順に番号を付けた。(例: CB01, Cynomolgus monkey Bile 01)。

<TM5509 及びその代謝物の比率及び排泄率>

TM5509 及びその代謝物の試料中の比率及び排泄率を 11.1.4項に従い算出した。

7.5 構造推定

LC/MS により分析した。

<TM5509 及びその代謝物の同定>

保持時間、分子量、組成式、MS (MSⁿ) スペクトルを標準物質と比較した。

<TM5509 及びその代謝物の構造推定>

注目する代謝物ピークについて、MS スペクトルより分子量、組成式を推定し、MSⁿ スペクトルによりそれらの構造を推定した。

<代謝物の付番>

放射能ピークと同じ名前を付けた。同一ピークで複数の代謝物が検出された場合は、数字の後にアルファベットを付けた (例 : CB01a)。

8 試料の取扱い

8.1 試料の識別

試料は容器に試験番号、動物番号、採取時間及び試験名を直接記載、もしくは記載したラベルを貼付して識別した。

8.2 試料の取扱い

残余の試料は超低温フリーザーで保存した。なお、試験終了後に廃棄する。

9 放射能の測定方法

9.1 LSC

試料をガラスバイアルに採取し、シンチレーター-HIONIC-FLUOR を加え、放射能 (dpm) を 2 分間測定した。なお、計数効率の補正は外部標準線源法により行った。測定値がバックグラウンドを下回った場合は零とした。

9.2 RAD

HPLC 溶出液にシンチレーター-FLO-SCINT II を移動相の 3 倍の流速で送液しながら混合し、6 秒積算で放射能 (cpm) の計測を行った。

10 バックグラウンド値の設定

10.1 LSC

バックグラウンド放射能 (dpm) は各測定で水を測定し、その値を用いた。なお、HPLC からの溶出液を 18 秒毎に分取する際には、初期移動相を測定 (n=3) し、その平均値を用いた。

10.2 RAD

標準物質を分析した際の計数値の平均を用いた。

11 データ処理

11.1 データの表示

11.1.1 放射能回収率

前処理時の放射能回収率 (Recovery, %) 及びカラム回収率 (Column recovery%) は以下の計算式により算出した。

胆汁；

$$\text{Recovery (\%)} = A / B \times 100$$

A : 希釈した試料の上清中放射能 (dpm)

B : 希釈した試料中の放射能 (dpm)

肝臓；

$$\text{抽出率 (\%)} = C / (C + D) \times 100$$

C : 抽出上清中放射能 (dpm)

D : 抽出残渣中放射能 (dpm)

$$\text{再溶解率 (\%)} = E / F \times 100$$

E : 測定試料中放射能 (dpm)

F : 乾固した上清中放射能 (dpm)

$$\text{Recovery (\%)} = G \times H / 100$$

G : 抽出率 (%)

H : 再溶解率 (%)

カラム回収率；

$$\text{Column recovery (\%)} = I / J \times 100$$

I : 分析時間中に回収した放射能 (dpm)

J : HPLC に注入した放射能 (dpm)

値	小数点以下桁数	
	表示	四捨五入位置
Recovery (%)	1	2
Column recovery (%)	1	2

11.1.2 HPLCプロファイル

ラジオクロマトグラムは、RAD で測定した場合は FLO-ONE 3.65 (PerkinElmer) で解析し、LSC で測定した場合は Microsoft Excel 2003 (Microsoft) で解析した。

11.1.3 MS及びMSⁿスペクトル

各成分の MS 及び MSⁿ スペクトルは Xcalibur 2.1.0 (Thermo Fisher Scientific) で解析した。

11.1.4 試料中未変化体及び代謝物の割合

HPLC 分析において、HPLC 分析時間内に溶出した放射能の総和に対する検出された TM5509 及びその代謝物の割合 (% on HPLC) を求めた。検出限界はバックグラウンドの 3 倍とし、ピークが明確でない場合にも、N.D. (not detected) とした。

試料中の TM5509 及びその代謝物の割合 (% in sample) 及びそれらの胆汁排泄率 (% of dose) を算出した。

$$\% \text{ in sample} = K \times L / 100$$

K : % on HPLC

L : Recovery (%)

$$\% \text{ of dose (\%)} = M \times N / 100$$

M : % in sample

N : 胆汁排泄率 (% of dose) (AE-7245-Gより引用)

値	小数点以下桁数	
	表示	四捨五入位置
% in sample (%)	1	2
% of dose	1	2

11.2 統計学的解析

統計学的解析は実施しなかった。

12 再試験及び再測定

試験期間中に再試験及び再測定はなかった。

13 予見することが出来なかった試験の信頼性に影響を及ぼす可能性のある事態 及び試験計画書に従わなかった事項並びに試験計画書の変更

予見することが出来なかった試験の信頼性に影響を及ぼす可能性のある事態、及び試験計画書に従わなかった事項は発生しなかった。なお、当該試験において、以下の試験計画書変更書を発行した。

試験計画書変更書 (No.1) 2013年12月19日 発行

試験計画書変更書 (No.2) 2014年2月17日 発行

試験計画書変更書 (No.3) 2014年2月21日 発行

14 試験結果

14.1 代謝物プロファイル

14.1.1 標準物質

標準物質のUVクロマトグラムを Figure 1に示す。

TM5509, 3'-hydroxy TM5509, 4'-hydroxy TM5509 及び 4'-sulfooxy TM5509 は、それぞれ保持時間 32.3 分, 31.1 分, 29.9 分及び 27.2 分に検出された。

14.1.2 胆汁

放射能回収率を Table 1に、ラジオクロマトグラムを Figure 2から Figure 9に示す。各代謝物 (放射能ピーク) の試料中の放射能に対する割合及び投与放射能に対する割合を Table 3及び Table 4に示す。

第1群の投与後 0~8 時間において、TM5509 は試料中放射能の 7.9% (1.0% of dose) 認められ、主代謝物として、CB05, CB06 及び CB12 がそれぞれ試料中放射能の 11.1% (1.4% of dose), 21.9% (2.7% of dose) 及び 13.1% (1.6% of dose) 認められた。

第1群の投与後 8~48 時間において、TM5509 は試料中放射能の 8.5% (2.8% of dose) 認められ、主代謝物として、CB01, CB03 及び CB06 がそれぞれ試料中放射能の 30.8% (10.0% of dose), 12.7% (4.1% of dose) 及び 12.7% (3.9% of dose) 認められた。

第2群の投与後 0~8 時間において、TM5509 は試料中放射能の 7.8% (0.4% of dose) 認められ、主代謝物として、CB05, CB06 及び CB12 がそれぞれ試料中放射能の 11.0% (0.5% of dose), 29.8% (1.8% of dose) 及び 13.9% (0.9% of dose) 認められた。

第2群の投与後 8~48 時間において、TM5509 は試料中放射能の 4.3% (1.5% of dose) 認められ、主代謝物として、CB01, CB03 及び CB06 がそれぞれ試料中放射能の 26.4% (9.5% of dose), 15.0% (5.5% of dose) 及び 10.1% (3.6% of dose) 認められた。

第3群の投与後0～8時間において、TM5509は試料中放射能の4.7% (0.6% of dose) 認められ、主代謝物として、CB05, CB06及びCB12がそれぞれ試料中放射能の16.2% (2.7% of dose), 24.6% (3.2% of dose) 及び16.4% (2.3% of dose) 認められた。

第3群の投与後8～48時間において、TM5509は試料中放射能の4.0% (1.2% of dose) 認められ、主代謝物として、CB01, CB03及びCB06がそれぞれ試料中放射能の25.3% (6.8% of dose), 13.8% (4.0% of dose) 及び11.2% (3.2% of dose) 認められた。

第4群の投与後0～8時間において、TM5509は試料中放射能の4.2% (0.5% of dose) 認められ、主代謝物として、CB05, CB06及びCB12がそれぞれ試料中放射能の28.6% (3.4% of dose), 21.1% (2.3% of dose) 及び19.2% (2.2% of dose) 認められた。

第4群の投与後8～48時間において、TM5509は試料中放射能の4.6% (1.4% of dose) 認められ、主代謝物として、CB01, CB02, CB03及びCB06がそれぞれ試料中放射能の19.2% (5.7% of dose), 15.0% (4.5% of dose), 8.5% (2.5% of dose) 及び14.9% (4.5% of dose) 認められた。

14.1.3 肝臓

放射能回収率をTable 2に、ラジオクロマトグラムをFigure 10に示す。各代謝物(放射能ピーク)の試料中の放射能に対する割合をTable 5に示す。

第3群の投与後48時間において、TM5509は試料中放射能の8.9%認められ、主代謝物として、CL04及びCL05がそれぞれ試料中放射能の15.5%及び16.3%認められた。

14.2 代謝物の構造解析

標準物質のLC-MSⁿにおけるUVクロマトグラム及びMSクロマトグラムをそれぞれFigure 11及びFigure 12に、各標準物質のMS (MSⁿ) スペクトルをFigure 13からFigure 16に示す。胆汁を分析した際のラジオクロマトグラム及びMSクロマトグラムをFigure 17及びFigure 19からFigure 26に、肝臓を分析した際のラジオクロマトグラム及びMSクロマトグラムをFigure 18及びFigure 27に、各代謝物のMS (MSⁿ) スペクトル(代表例)をFigure 28～Figure 48に示す。また、各試料における代謝物の精密質量情報をTable 6からTable 10に、推定構造一覧をTable 11に示す。

標準物質TM5509は保持時間32.4分に検出され、[M-H]⁻として m/z を示し、主なフラグメントイオンとして、 m/z を生成した(Figure 16)。胆汁中のCB09及び肝臓中のCL09に[M-H]⁻として m/z が検出され、標準物質TM5509と同様のフラグメンテーションを示したため(Figure 45)、CB09及びCL09はTM5509と同定された。検出されたフラグメンテーションの帰属をAppendix 4及びAppendix 22に示す。

標準物質 4'-sulfooxy TM5509 は保持時間 27.5 分に検出され、 $[M-H]^-$ として m/z を示し、主なフラグメントイオンとして、 m/z を生成した (Figure 13)。胆汁中のCB03b及び肝臓中のCL05bに $[M-H]^-$ として m/z が検出され、標準物質 4'-sulfooxy TM5509 と同様のフラグメンテーションを示したため (Figure 34)、CB03b及びCL05bは 4'-sulfooxy TM5509 と同定された。検出されたフラグメンテーションの帰属を Appendix 1 及び Appendix 11 に示す。

標準物質 4'-hydroxy TM5509 は保持時間 30.1 分に検出され、 $[M-H]^-$ として m/z を示し、主なフラグメントイオンとして、 m/z を生成した (Figure 14)。胆汁中のCB07及び肝臓中のCL08aに $[M-H]^-$ として m/z が検出され、標準物質 4'-hydroxy TM5509 と同様のフラグメンテーションを示したため (Figure 43)、CB07 及びCL08aは 4'-hydroxy TM5509 と同定された。検出されたフラグメンテーションの帰属を Appendix 2 及び Appendix 20 に示す。

標準物質 3'-hydroxy TM5509 は保持時間 31.2 分に検出され、 $[M-H]^-$ として m/z を示し、主なフラグメントイオンとして、 m/z を生成した (Figure 15)。胆汁中のCB08及び肝臓中のCL08bに $[M-H]^-$ として m/z が検出され、標準物質 3'-hydroxy TM5509 と同様のフラグメンテーションを示したため (Figure 44)、CB08 及びCL08bは 3'-hydroxy TM5509 と同定された。検出されたフラグメンテーションの帰属を Appendix 3 及び Appendix 21 に示す。

CB01aは 5 mg/kg投与群の胆汁において保持時間 24.5 分に検出され、 $[M-H]^-$ として m/z .08662 を示し、組成式は $C_{20}H_{30}O_{10}$ と推定された。主なフラグメントイオンとして、 m/z を生成した (Figure 28)。CB01aは酸化体のグルクロン酸抱合体と推定された。CB01aは肝臓中においても検出された (CL04a)。検出されたフラグメンテーションの帰属を Appendix 5 に示す。

CB01bは 5 mg/kg投与群の胆汁において保持時間 24.7 分に検出され、 $[M-H]^-$ として m/z .04361 を示し、組成式は $C_{20}H_{30}O_{13}S$ と推定された。主なフラグメントイオンとして、 m/z を生成した (Figure 29)。CB01bは酸化体のグルクロン酸および硫酸抱合体と推定された。CB01bは肝臓中においても検出された (CL04b)。検出されたフラグメンテーションの帰属を Appendix 6 に示す。

CB01cは 5 mg/kg投与群の胆汁において保持時間 24.8 分に検出され、 $[M-H]^-$ として m/z .06431 を示し、組成式は と推定された。主なフラグメントイオンとして、 m/z を生成した (Figure 30)。CB01cは酸化及び水和された代謝物と推定された。

CB01cは肝臓中においても検出された (CL04c)。検出されたフラグメンテーションの帰属を Appendix 7に示す。

CB01dは 5 mg/kg投与群の胆汁において保持時間 24.9 分に検出され、 $[M-H]^-$ として m/z .05947 を示し、組成式は $C_{20}H_{32}O_6$ と推定された。主なフラグメントイオンとして、 m/z 175 を生成した (Figure 31)。CB01dは 2 酸化及び水和された代謝物と推定された。CB01dは肝臓中においても検出された (CL04d)。検出されたフラグメンテーションの帰属を Appendix 8に示す。

CB02 は 5 mg/kg投与群の胆汁において保持時間 25.4 分に検出され、 $[M-H]^-$ として m/z 175 を示し、組成式は $C_{20}H_{32}O_6$ と推定された。主なフラグメントイオンとして、 m/z 175 を生成した (Figure 32)。CB02 は酸化及び水和された代謝物と推定された。検出されたフラグメンテーションの帰属を Appendix 9に示す。

CB03aは 5 mg/kg投与群の胆汁において保持時間 26.4 分に検出され、 $[M-H]^-$ として m/z .05859 を示し、組成式は $C_{20}H_{32}O_6$ と推定された。主なフラグメントイオンとして、 m/z 175 を生成した (Figure 33)。CB03aは 2 酸化及び水和された代謝物と推定された。CB03aは肝臓中においても検出された (CL05a)。検出されたフラグメンテーションの帰属を Appendix 10に示す。

CB03cは 5 mg/kg投与群の胆汁において保持時間 26.8 分に検出され、 $[M-H]^-$ として m/z .05976 を示し、組成式は $C_{20}H_{32}O_6$ と推定された。主なフラグメントイオンとして、 m/z 175 を生成した (Figure 35)。CB03cは 2 酸化及び水和された代謝物と推定された。CB03cは肝臓中においても検出された (CL05c)。検出されたフラグメンテーションの帰属を Appendix 12に示す。

CL05dは 80 mg/kg投与群の肝臓において保持時間 27.2 分に検出され、 $[M-H]^-$ として m/z .08526 を示し、組成式は $C_{20}H_{32}O_6$ と推定された。主なフラグメントイオンとして、 m/z 175 を生成した (Figure 36)。CL05dは酸化体のグルクロン酸抱合体と推定された。検出されたフラグメンテーションの帰属を Appendix 13に示す。

CB03dは 5 mg/kg投与群の胆汁において保持時間 27.3 分に検出され、 $[M-H]^-$ として m/z .09138 を示し、組成式は $C_{20}H_{32}O_9$ と推定された。主なフラグメントイオンとして、 m/z 175 を生成し

た (Figure 37)。CB03dはグルクロン酸抱合体と推定された。検出されたフラグメンテーションの帰属を Appendix 14に示す。

CB03eは 5 mg/kg投与群の胆汁において保持時間 27.5 分に検出され、 $[M-H]^-$ として m/z 06424 を示し、組成式は $C_{10}H_{16}O_5$ と推定された。主なフラグメントイオンとして、 m/z 406 を生成した (Figure 38)。CB03eは酸化及び水和された代謝物と推定された。検出されたフラグメンテーションの帰属を Appendix 15に示す。

CB04 は 5 mg/kg投与群の胆汁において保持時間 27.9 分に検出され、 $[M-H]^-$ として m/z 08594 を示し、組成式は $C_{10}H_{16}O_{10}$ と推定された。主なフラグメントイオンとして、 m/z 406 を生成した (Figure 39)。CB04 は酸化体のグルクロン酸抱合体と推定された。CB04 は肝臓中においても検出された (CL05e)。検出されたフラグメンテーションの帰属を Appendix 16に示す。

CB05aは 5 mg/kg投与群の胆汁において保持時間 28.5 分に検出され、 $[M-H]^-$ として m/z 09241 を示し、組成式は $C_{12}H_{18}O_4$ と推定された。主なフラグメントイオンとして、 m/z 406 を生成した (Figure 40)。CB05aは酸化的脱塩素体と推定された。CB05aは肝臓中においても検出された (CL06a)。検出されたフラグメンテーションの帰属を Appendix 17に示す。

CB05bは 5 mg/kg投与群の胆汁において保持時間 28.8 分に検出され、 $[M-H]^-$ として m/z 09144 を示し、組成式は $C_{12}H_{18}O_9$ と推定された。主なフラグメントイオンとして、 m/z 406 を生成した (Figure 41)。CB05bはグルクロン酸抱合体と推定された。CB05bは肝臓中においても検出された (CL06b)。検出されたフラグメンテーションの帰属を Appendix 18に示す。

CB06 は 5 mg/kg投与群の胆汁において保持時間 29.7 分に検出され、 $[M-H]^-$ として m/z 09155 を示し、組成式は $C_{12}H_{18}O_9$ と推定された。主なフラグメントイオンとして、 m/z 406 を生成した (Figure 42)。CB06 はグルクロン酸抱合体と推定された。CB06 は肝臓中においても検出された (CL07)。検出されたフラグメンテーションの帰属を Appendix 19に示す。

CB10 は 20 mg/kg投与群の胆汁において保持時間 37.0 分に検出され、 $[M-H]^-$ として m/z 09213 を示し、組成式は $C_{12}H_{18}O_9$ と推定された。主なフラグメントイオンとして、 m/z 406 を生成した (Figure 46)。CB10 はグルクロン酸抱合体と推定された。検出されたフラグメンテーションの帰属を Appendix 23に示す。