第 9 回ジェネリック医薬品品質情報検討会
資料 9-3

セファゾリンナトリウム注射用製剤の不純物に関する検討結果

国立医薬品食品衛生研究所薬品部

はじめに

第 2 回ジェネリック医薬品品質情報検討会において、後発医薬品注射剤における純度試験結果を報示し、注射用セファゾリンナトリウムでは、後発品では先発品には認められない不純物があったと報告した。抗生物質に関しては、品質に対する懸念が多く報告されていることから、局方の HPLC 条件を用いて分離したピークの構造決定が可能な装置の必要性を提案し、島津製作所により構築された Co-sense システム-LCMS-IT-TOF システムを用いて、より詳細な比較を試みた。

同システムでは、一次元目分離では、通常の局方の条件下で分離し、不純物ピークの出現時間にバルブを切り替えて、分取用ループ中に不純物を分取する。ループに分取した試料はトラップカラムに保持し、脱塩する。トラップカラム内の試料を、二次元目のカラム-LCMS に導入して分析した。

１．試験製剤

試験に使用した製剤を表１に示した。

表１．製剤リスト

		ロットNo.		
製剤番号	製品名	日局条件	EP条件	製造販売元
1(先発)	セファメジンα注射用1g	A057F01	B017F01	アステラス製薬株式会社
2	ラセナゾリン注射用1g	8R154	9R123	日医工ファーマ株式会社
3	タイセゾリン注射用1g	910365		大洋薬品工業株式会社
4	セフマゾン注射用1g	09G07		ニプロファーマ株式会社

２．試薬

試験に使用した試薬を以下に示した。

東京化成　　セファゾリンナトリウム
　　セファゾリン類縁物質 5-Methyl-1,3,4-thiodiazole-2-thiol (MMTD)
　　セファゾリン類縁物質 7-Aminocephalosporanic Acid (7-ACA)

３．分析条件

3-1.日本薬局方

日本薬局方の注射用セファゾリンナトリウムの純度試験に準じて行った。

3-1-1. HPLC 法

検出器：紫外吸光光度計（測定波長 254nm）

移動相：リン酸水素二 Na・十二水和物 2.27g、クエン酸一水和物 0.47ｇ、水 935ｍL、アセトニトリル 65mL

カラム: Chemco Pak nucleosil C18(4x150mm, 10μm)、カラム温度:25℃、

分析時間 15min、流速 2.4mL/min

＊質量分析を行うため、試料注入量のみ変更した（5mg/mL を 5μL→20mg/mL を 3μL)。

3-1-2. 質量分析

試料注入量 10μL、分取ループ：250μLx2 本、分取時間：各 0.1min、

分取カラム：nomura chemical devolosil guard catridge column C30-UG(4.0x10mm)

二次元目条件　流速:0.15ml/min、分析時間 20 分、A=0.1%HCOOH, B=ACN(0min=0%,5min=60%, 5.5min=60%, 6min=0%)、二次元目カラム：SHIM-PAK FC-ODS(2.0x150,3μm) 、

カラム温度:25°C、質量分析器設定：イオン化モード ESI+/－

3-2. 欧州薬局方

3-2-1. HPLC 法

欧州薬局方（EP）のセファゾリンナトリウム原薬の純度試験に準じ、下線の 2 箇所を変更して分析を行った。

検出器：紫外吸光光度計（測定波長 254nm）

移動相：A=リン酸水素二 Na・十二水和物 7.27g/L、リン酸二水素 K1.86 g /L, B=アセトニトリル （リン酸塩飽和濃度に極めて近い条件のため、塩濃度を半量に変更した）

グラジエント：0-2min=2%, 2-4min=2-15%, 4-10min=15-40%, 10-11.5min=40-65%, 11.5-12min=65%, 12-15min=65-2%, 15-20min=2%、

カラム：Chemco　Pak nucleosil C18(4.0x125mm, 3um)、カラム温度:45℃、

流速：0.6mL/min（装置の圧力限界のため、約半流量に変更）、試料注入量 5μL

3-2-2. 質量分析

試料注入量 3μL、分取ループ：80μLx2 本、分取時間：各 0.2min、

分取カラム：nomura chemical devolosil guard catridge column C30-UG(4.0x10mm)

二次元目条件　流速:0.15ml/min、分析時間 20 分、A=0.1%HCOOH, B=ACN(0min=0%,5min=60%, 5.5min=60%, 6min=0%)、 二次元目カラム : SHIM-PAK FC-ODS(2.0x150,3μm) 、カラム温度 : 45°C、

質量分析器設定：イオン化モード ESI+/－

４．試料調製

4-1. 日本薬局方

製剤 1g 力価（１瓶）に日局移動相 5mL を加えて溶解、この 1/5vol に移動相を加えて 10mL にしたものを試料とした（＝20mg/mL）。注入量 3μL。→日局規格試験の 2.4 倍量に相当

4-2. 欧州薬局方

4-2-1. MS 分析

製剤 1g 力価（１瓶）に EP 移動相 5mL を加えて溶解、この 1/5vol に移動相を加えて 10mL にしたものを試料とした（＝20mg/mL）。注入量 3μL。

4-2-2. 不純物ピークの比較

MS 分析用の 20mg/mL を EP 移動相で 8 倍希釈した（＝2.5mg/mL）。注入量 5μL。

５．データ解析方法

5-1. HPLC クロマトグラム

各製剤の試験を３回繰り返し、ピーク面積の算出は、３回測定の平均値を用いた。一部の小さいピークは手動でピーク認識を行った。

5-2. 質量分析

5-2-1. MS スペクトルの判断基準

再現性（2 回）をもつ明確なスペクトルを検出できたスペクトルとした。

5-2-2. 再キャリブレーション

質量分析前に m/z のキャリブレーションは行っているが、日局条件の結果は既知のデータ全体がプラスにシフトしていたことから、メインピーク(セファゾリン)をもとに、再キャリブレーションを行った。EP では行っていない。

5-2-3. 化合物の同定基準

以下に該当するものを同定とした。

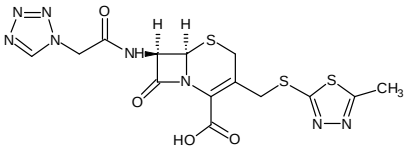
既知化合物：親イオンが+および-モードで検出され、かつ予測可能な開裂パターンの娘イオンがひとつ以上検出され再現性（2 回）が取れた分子

未知化合物：親イオンが+および-モードで検出され、かつ MS/MS スペクトルが検出され、再現性（2 回）が取れた分子

5-3. 未知ピーク解析

LCMSsolution（島津製作所）、MS fragmenter（ACD/富士通）を用いた。

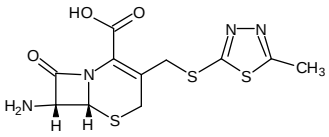
Cefazolin



Molecular Formula	= $C_{14}H_{14}N_8O_4S_3$
Formula Weight	= 454.50716
Monoisotopic Mass	= 454.030011 Da
[M+H]+	= 455.037287 Da
[M-H]-	= 453.022735 Da

(6*R*,7*R*)-3-[[(5-methyl-1,3,4-thiadiazol-2-yl)sulfanyl]methyl]-8-oxo-7-[(1*H*-tetrazol-1-ylacetyl)amino]-5-thia-1-azabicyclo[4.2.0]oct-2-ene-2-carboxylic acid

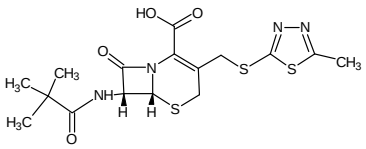
A



Molecular Formula	= $C_{11}H_{12}N_4O_3S_3$
Formula Weight	= 344.43298
Monoisotopic Mass	= 344.00715 Da
[M+H]+	= 345.014427 Da
[M-H]-	= 342.999874 Da

(6*S*)-7-amino-3-[[(5-methyl-1,3,4-thiadiazol-2-yl)sulfanyl]methyl]-8-oxo-5-thia-1-azabicyclo[4.2.0]oct-2-ene-2-carboxylic acid

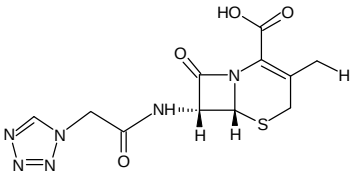
B



Molecular Formula	= $C_{16}H_{20}N_4O_4S_3$
Formula Weight	= 428.5494
Monoisotopic Mass	= 428.064665 Da
[M+H]+	= 429.071942 Da
[M-H]-	= 427.057389 Da

(6*S*)-7-[(2,2-dimethylpropanoyl)amino]-3-[[(5-methyl-1,3,4-thiadiazol-2-yl)sulfanyl]methyl]-8-oxo-5-thia-1-azabicyclo[4.2.0]oct-2-ene-2-carboxylic acid

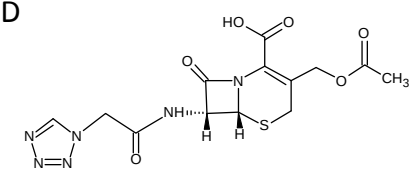
C



Molecular Formula	= $C_{11}H_{12}N_6O_4S$
Formula Weight	= 324.31578
Monoisotopic Mass	= 324.064073 Da
[M+H]+	= 325.071349 Da
[M-H]-	= 323.056796 Da

(6*R*,7*S*)-3-methyl-8-oxo-7-[(1*H*-tetrazol-1-ylacetyl)amino]-5-thia-1-azabicyclo[4.2.0]oct-2-ene-2-carboxylic acid

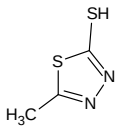
D



Molecular Formula	= $C_{13}H_{14}N_6O_6S$
Formula Weight	= 382.35186
Monoisotopic Mass	= 382.069552 Da
[M+H]+	= 383.076829 Da
[M-H]-	= 381.062276 Da

(6*R*,7*S*)-3-[(acetyloxy)methyl]-8-oxo-7-[(1*H*-tetrazol-1-ylacetyl)amino]-5-thia-1-azabicyclo[4.2.0]oct-2-ene-2-carboxylic acid

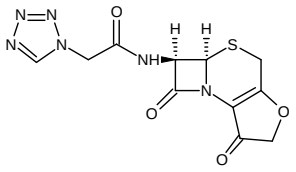
E



Molecular Formula	= $C_3H_4N_2S_2$
Formula Weight	= 132.20726
Monoisotopic Mass	= 131.981588 Da
[M+H]+	= 132.988865 Da
[M-H]-	= 130.974312 Da

5-methyl-1,3,4-thiadiazole-2-thiol

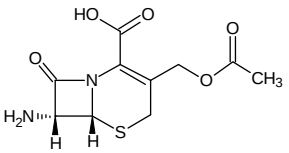
G



Molecular Formula	= $C_{11}H_{10}N_8O_4S$
Formula Weight	= 322.2999
[M+H]+	= 323.055699 Da
[M-H]-	= 321.041146 Da

N-[(5a*R*,6*R*)-1,7-dioxo-1,4,6,7-tetrahydro-2*H*,5a*H*-azeto[2,1-*b*]furo[3,2-*d*][1,3]thiazin-6-yl]-2-(1*H*-tetrazol-1-yl)acetamide

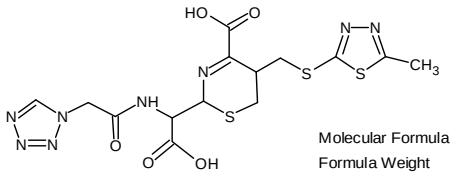
H



Molecular Formula	= $C_{10}H_{12}N_2O_5S$
Formula Weight	= 272.27768
Monoisotopic Mass	= 272.046691 Da
[M+H]+	= 273.053968 Da
[M-H]-	= 271.039415 Da

(6*R*,7*R*)-3-[(acetyloxy)methyl]-7-amino-8-oxo-5-thia-1-azabicyclo[4.2.0]oct-2-ene-2-carboxylic acid

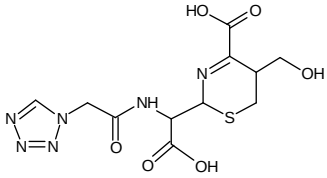
I



Molecular Formula	= $C_{14}H_{16}N_8O_5S_3$
Formula Weight	= 472.52244
[M+H]+	= 473.047852 Da
[M-H]-	= 471.033299 Da

(2*R*,5*R*)-2-{(*R*)-carboxy[(1*H*-tetrazol-1-ylacetyl)amino]methyl}-5-[[(5-methyl-1,3,4-thiadiazol-2-yl)sulfanyl]methyl}-5,6-dihydro-2*H*-1,3-thiazine-4-carboxylic acid

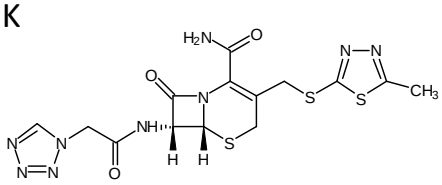
J



Molecular Formula	= $C_{11}H_{14}N_6O_6S$
Formula Weight	= 358.33046
Monoisotopic Mass	= 358.069552 Da
[M+H]+	= 359.076829 Da
[M-H]-	= 357.062276 Da

(2*R*,5*S*)-2-{(*R*)-carboxy[(1*H*-tetrazol-1-ylacetyl)amino]methyl}-5-(hydroxymethyl)-5,6-dihydro-2*H*-1,3-thiazine-4-carboxylic acid

K



Molecular Formula	= $C_{14}H_{15}N_9O_3S_3$
Formula Weight	= 453.5224
Monoisotopic Mass	= 453.045995 Da
[M+H]+	= 454.053272 Da
[M-H]-	= 452.038719 Da

(6*R*,7*R*)-3-[[(5-methyl-1,3,4-thiadiazol-2-yl)sulfanyl]methyl}-8-oxo-7-[(1*H*-tetrazol-1-ylacetyl)amino]-5-thia-1-azabicyclo[4.2.0]oct-2-ene-2-carboxamide

図１　セファゾリンとセファゾリン類縁物質の構造式

（EP より）

＊E（MMTD)と H(7-ACA)は市販されている試薬あり

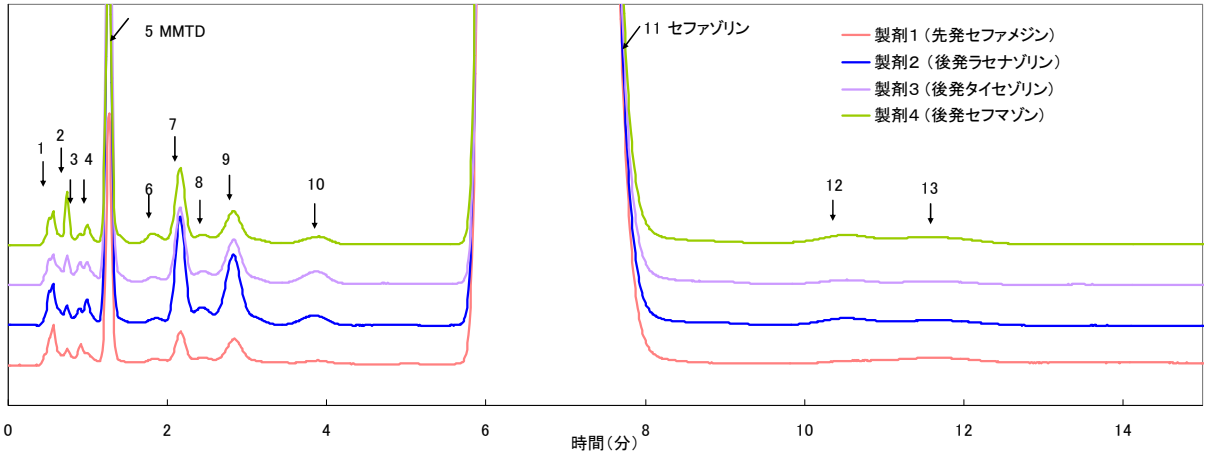
６．結果

6-1. 日本薬局方条件

6-1-1.　HPLC 法

各製剤を HPLC により分析した結果、主成分ピークを含めて 13 個のピークを検出した（図 2）。過去の報告には、後発品には先発品には見られない不純物が含まれる[1,2]とされたが、13 個のピークは、先発品でも見いだされ、全ての製剤から検出された。不純物の面積値を比較すると、先発品より後発品の方が大きい傾向が認められたが（表 2）これら不純物ピークはすべての製剤において規格内であった（それぞれのピーク 1.5%以下、合計 2.5%以下）。

図 2 注射用セファゾリンナトリウム製剤の HPLC クロマトグラム



セファゾリン類縁物質（試薬）と製剤のクロマトグラムを比較した結果、保持時間よりピーク 5 は MMTD と考えられた。7-ACA に一致するピークは見当たらなかった。

表２　注射用セファゾリンナトリウムのメインピーク以外のピーク面積のセファゾリン面積に対する割合（%）

ピークNo.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	13	有効成分以
溶出時間(分)	0.56	0.73	0.90	0.99	1.26	1.81	2.16	2.44	2.82	3.87	10.50	11.80	外の総area%
1	0.05	0.01	0.02	0.01	0.19	0.01	0.04	0.01	0.05	0.01	0.02	0.05	0.46
2	0.05	0.02	0.01	0.02	0.39	0.02	0.16	0.04	0.17	0.03	0.05	0.04	1.01
3	0.05	0.02	0.02	0.03	0.48	0.02	0.12	0.03	0.12	0.04	0.03	0.03	0.98
4	0.04	0.03	0.01	0.02	0.27	0.02	0.11	0.02	0.09	0.02	0.06	0.06	0.75

日局規格：セファゾリン以外のピーク面積1.5以下、それらの合計面積2.5%以下

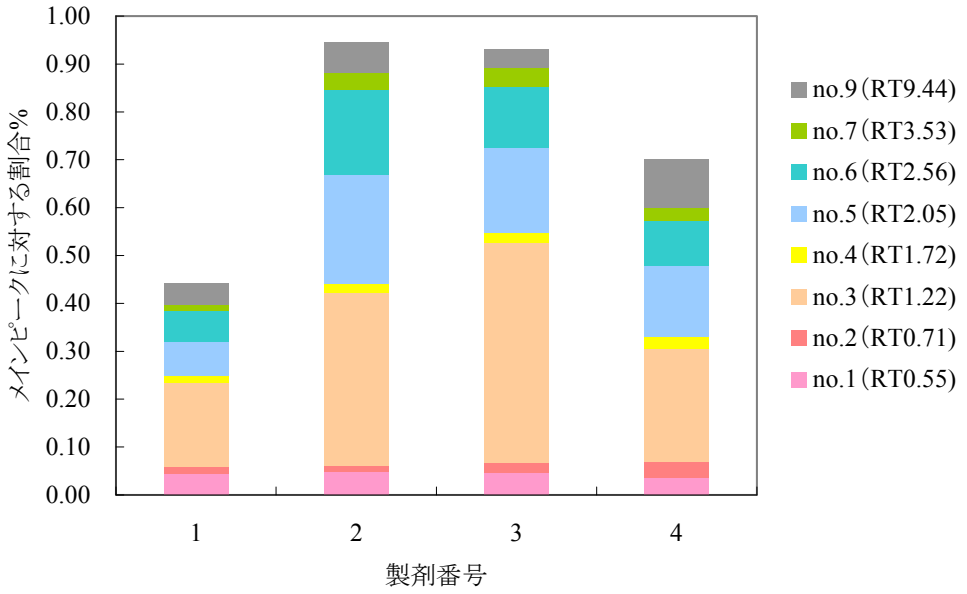


図３　注射用セファゾリンナトリウムのメインピーク以外のピーク面積のセファゾリン面積に対する割合（%）

6-1-2. 質量分析

島津製作所の Co-sense システム-LCMS-IT-TOF を用いて、HPLC 法で検出された不純物ピークを分取し、質量分析を行ったところ、図２の 5 つのピーク（5、7、9、10、11）について、良好な MS スペクトルを得た。測定結果を図１にある化合物と照らし合わせて解析し、ピーク 11：セファゾリン、ピーク 5：類縁物質 E、ピーク 7 ：類縁物質 G、ピーク 9：類縁物質 I と予想された（表３）。

ピーク 10 はリストにはない分子量の分子であった。LCMSsolution (島津)を使った精密質量による推定から $C_{13}H_{18}N_8O_4S_3$（セファゾリンとの差は C-1H4）の組成式（表４）を得たが、セファゾリンに類似した構造式は推定できなかった。

表３　検出された MS スペクトルの m/z 値と予測される化合物名

ピークno.	MSスペクトル(m/z) MS→MS2→MS3	化合物
5	133→99	類縁物質E
7	645, 323→280, 156	類縁物質G
9	474→341→298	類縁物質I
10	447→224,165	未知
11	909, 455→323→156	セファゾリン

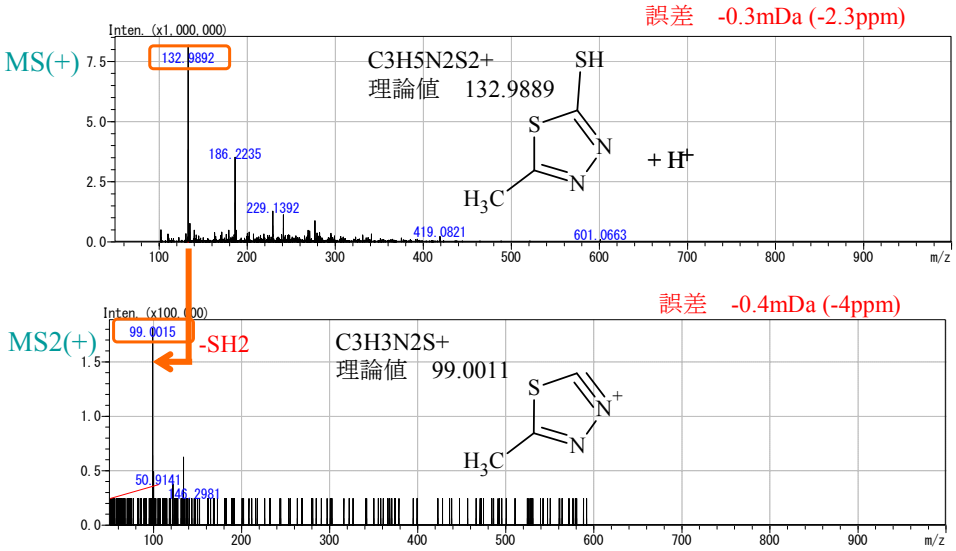
下線のm/z値は構造予測ができているもの（図4参照）

表４　未知スペクトルの精密質量を用いて推定された組成式

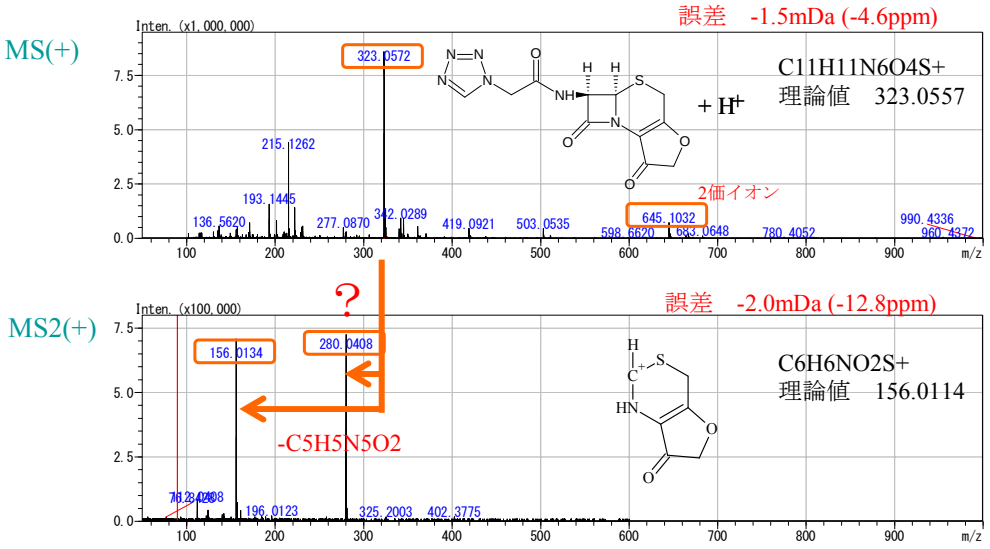
ピークno.	組成式	実測値m/z	理論値m/z	誤差mDa	誤差ppm
10	C13H18 N8O4S3	447.0676	447.0686	-1.0	-2.24

図４　MS スペクトルと化合物の開裂パターン予測

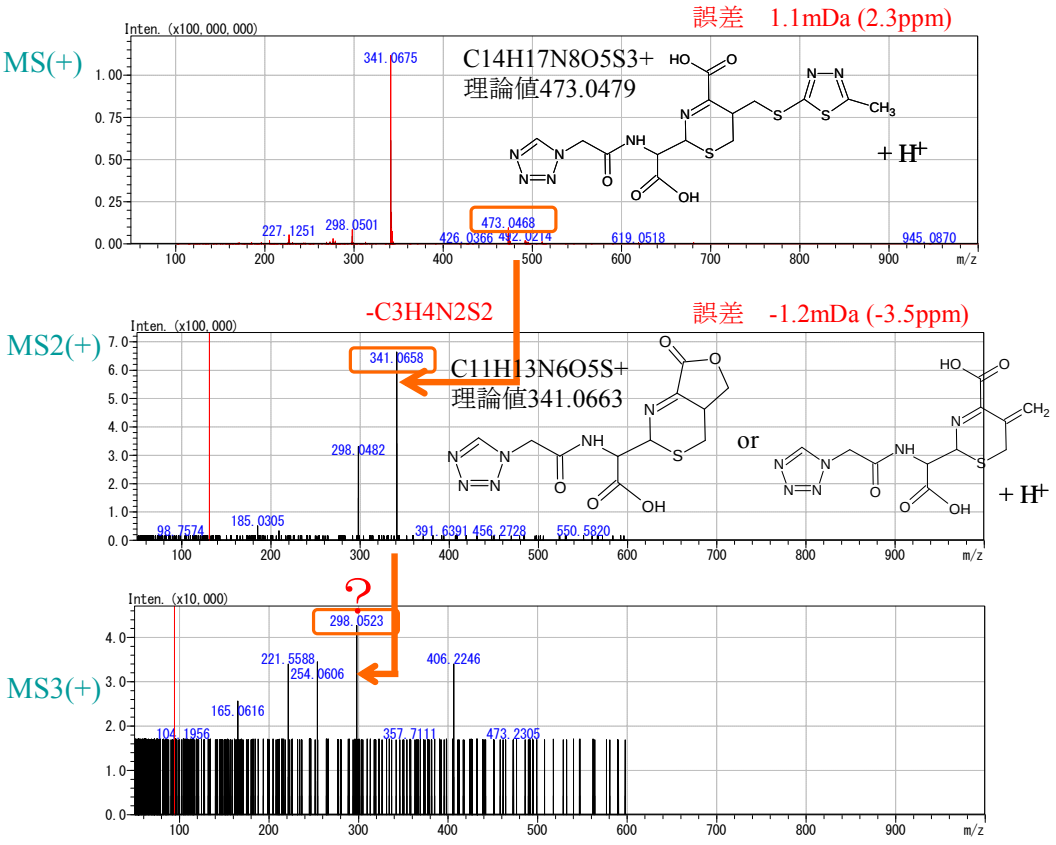
（a）ピーク５：類縁物質 E



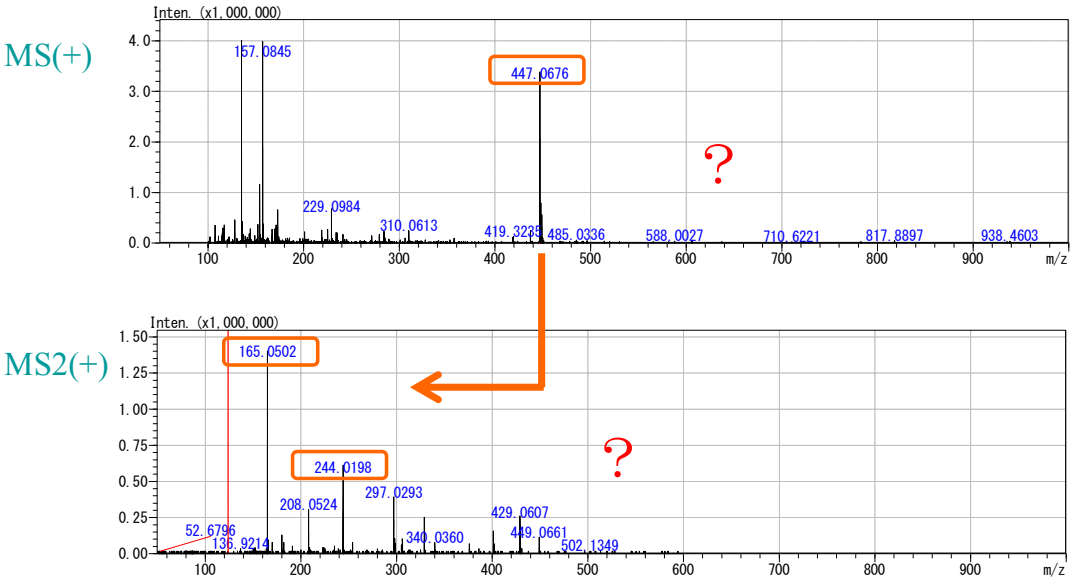
（b）ピーク７：類縁物質 G



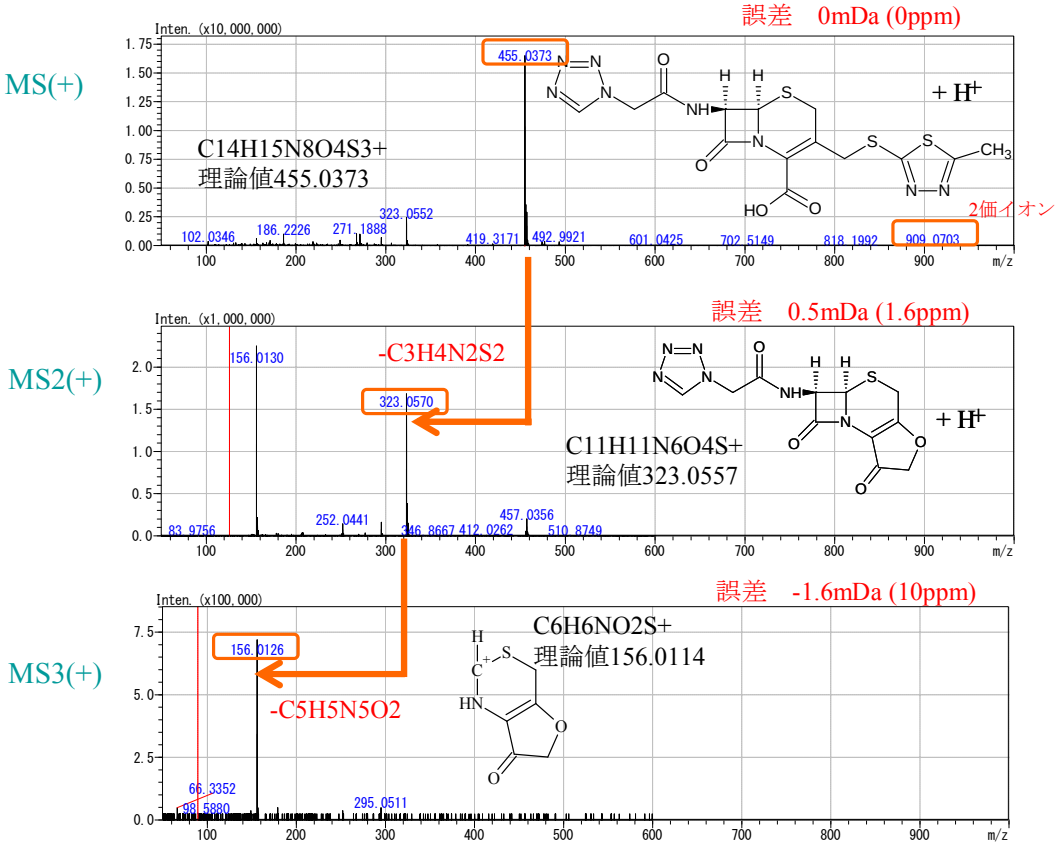
(c) ピーク 9：I



(d) ピーク 10：未知物質



（e）ピーク 11：セファゾリン



＊赤枠で囲まれたスペクトル（m/z 値）は、5-2-1.にある明確に検出されたスペクトルを示している。

6-2. 欧州薬局方条件

6-2-1.　HPLC 法

各製剤を HPLC により分析した結果、主成分ピークを含む１２個のピークを検出した（図５）。日局と比較して、グラジエントプログラムであるこの HPLC 条件では、セファゾリンのメインピークに隠れていたと思われるいくつかのピークが新たに検出された（ピーク 8～11）。

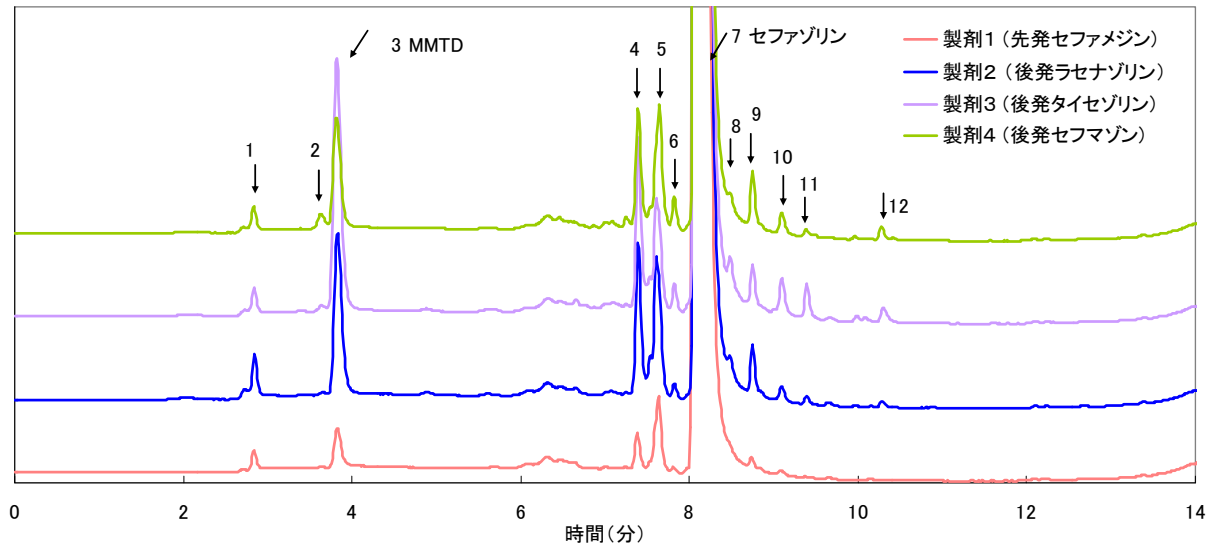


図５　注射用セファゾリンナトリウム製剤の HPLC クロマトグラム

メインピーク 7 は頭打ちしており、EP の記載にあるように、1/100 の試料濃度（セファゾリン 0.025mg/mL）を分析した際のメインピークを１として、ピーク面積を算出した（表５および図６）。すべての製剤は規格を満たしていた。先発と後発を比較すると、日局条件と同様に、後発品の含有量が多い傾向を示している。

表５　注射用セファゾリンナトリウムのメインピーク以外のピーク面積のセファゾリン面積に対する割合（%）

ピークNo.	1	2	3	4	5	6	8	9	10	11	12	有効成分以外の総area%
溶出時間(分	2.84	3.65	3.83	7.39	7.62	7.84	8.49	8.76	9.11	9.40	10.30	
1	0.02	0.00	0.06	0.04	0.11	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.25
2	0.04	0.00	0.26	0.17	0.22	0.01	0.01	0.05	0.02	0.01	0.01	0.80
3	0.03	0.01	0.42	0.20	0.20	0.03	0.02	0.04	0.04	0.03	0.02	1.02
4	0.03	0.02	0.18	0.15	0.21	0.03	0.00	0.05	0.03	0.01	0.01	0.73

EP規格：セファゾリン以外のピーク面積1%以下、それらの合計面積3.5%以下

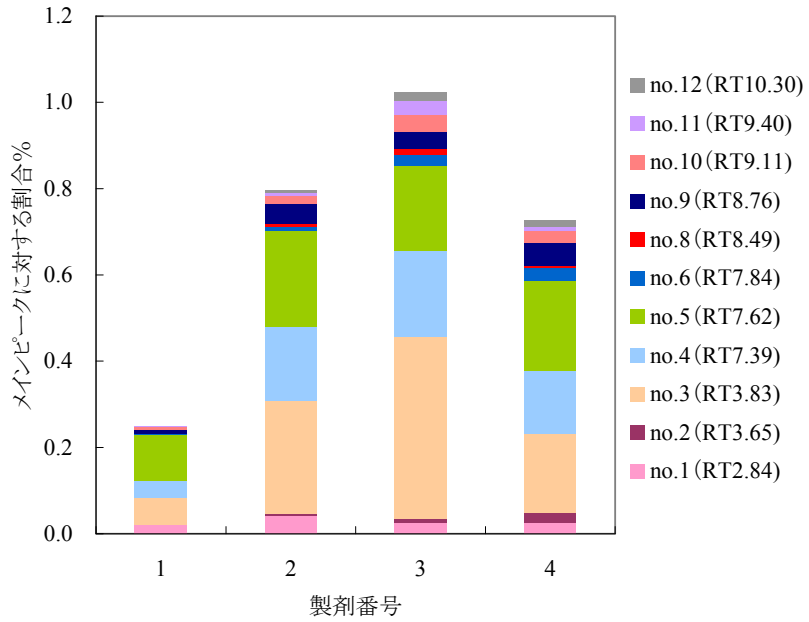


図６　注射用セファゾリンナトリウムのメインピーク以外のピーク面積のセファゾリン面積に対する割合（%）

6-2-2. 質量分析

HPLC 法で検出された不純物ピークを分取し、質量分析を行ったところ、図６の７つのピーク（3～7、10、11）について、良好な MS スペクトルを得た。測定結果を図１のリストと照らし合わせて、解析し、既知不純物４種と未知化合物２種が検出された（表６、図７）。クロマトグラム上で、大きく見えるピーク 3、4、5 が、日局条件で見られた類縁物質ピーク 5、7、9（E,G,I）と同じ化合物であることがわかった。ピーク６と１１について、島津ソフトウェアを使った精密質量による推定から表７の組成式を得たが、セファゾリンの構造式に類似した構造式は推定できなかった（表７）。ピーク６の組成式は類縁物質 A と同じであるが、MS/MS スペクトルが A の予測される開裂とは一致しなかった。

表６　検出された MS スペクトルの m/z 値と予測される化合物名

ピークno.	MSスペクトル(m/z) MS→MS2→MS3	化合物
3	133→99	類縁物質E
4	645, 323→280, 156	類縁物質G
5	943, 474→341→298	類縁物質I
6	345→185	未知
7	455→323, 156→112	セファゾリン
11	601→558→468	未知
12	429→297→269, 167, 139	類縁物質B

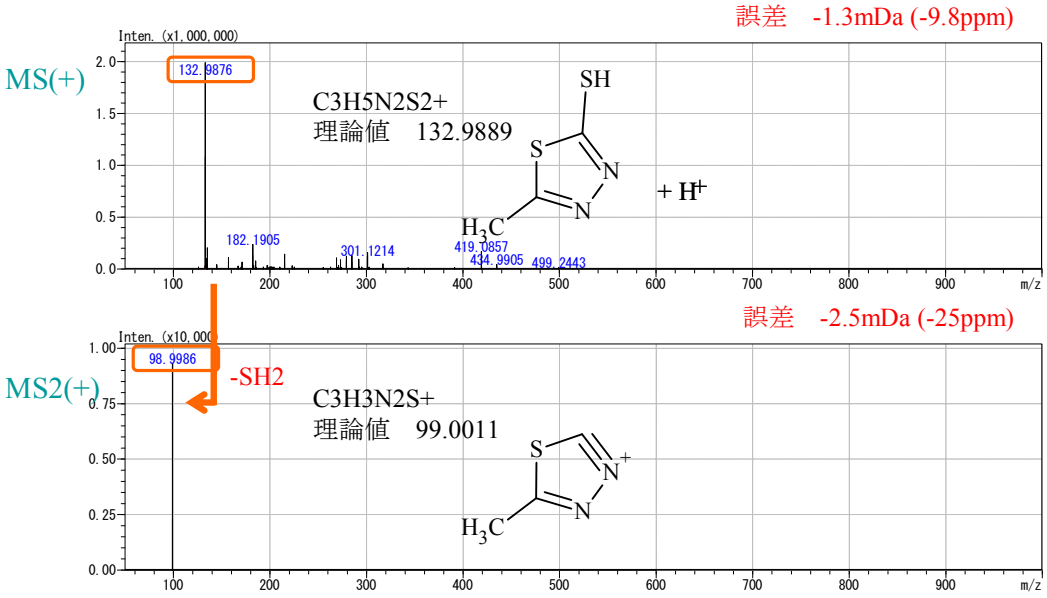
下線のm/z値は構造予測ができているもの（図7参照）

表７　未知スペクトルの精密質量を用いて推定された組成式

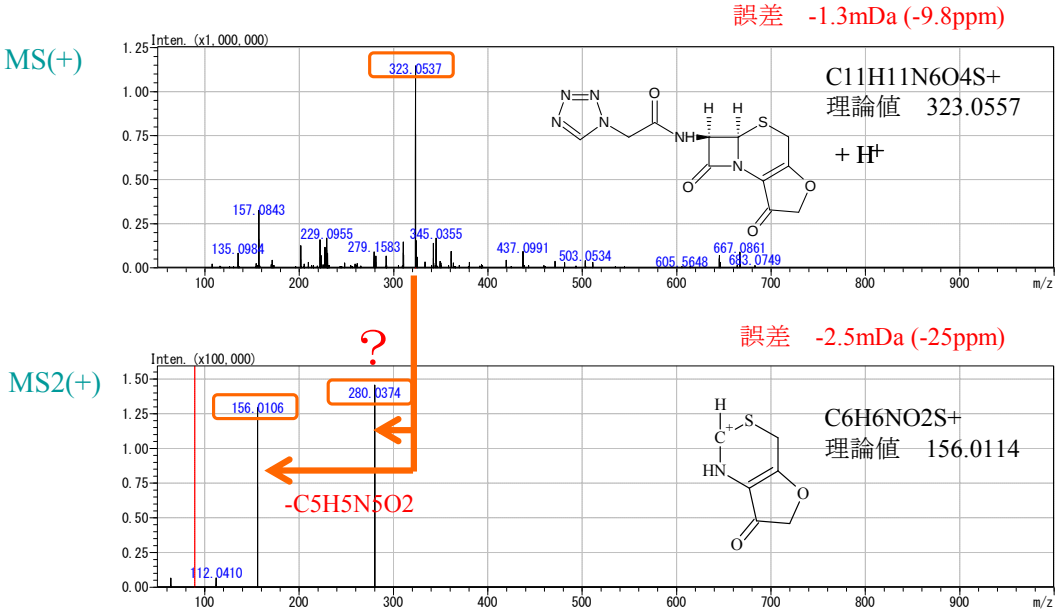
ピークno.	組成式	実測値m/z	理論値m/z	誤差mDa	誤差ppm
6	C11H12N4O3S3	345.0125	345.0144	-1.9	-5.51
11	C26H20N2O9S3	601.0397	601.0404	-0.7	-1.16
11	C22H16N8O7S3	601.0397	601.0377	2.0	3.33

図７　　MS スペクトルと化合物の開裂パターン予測

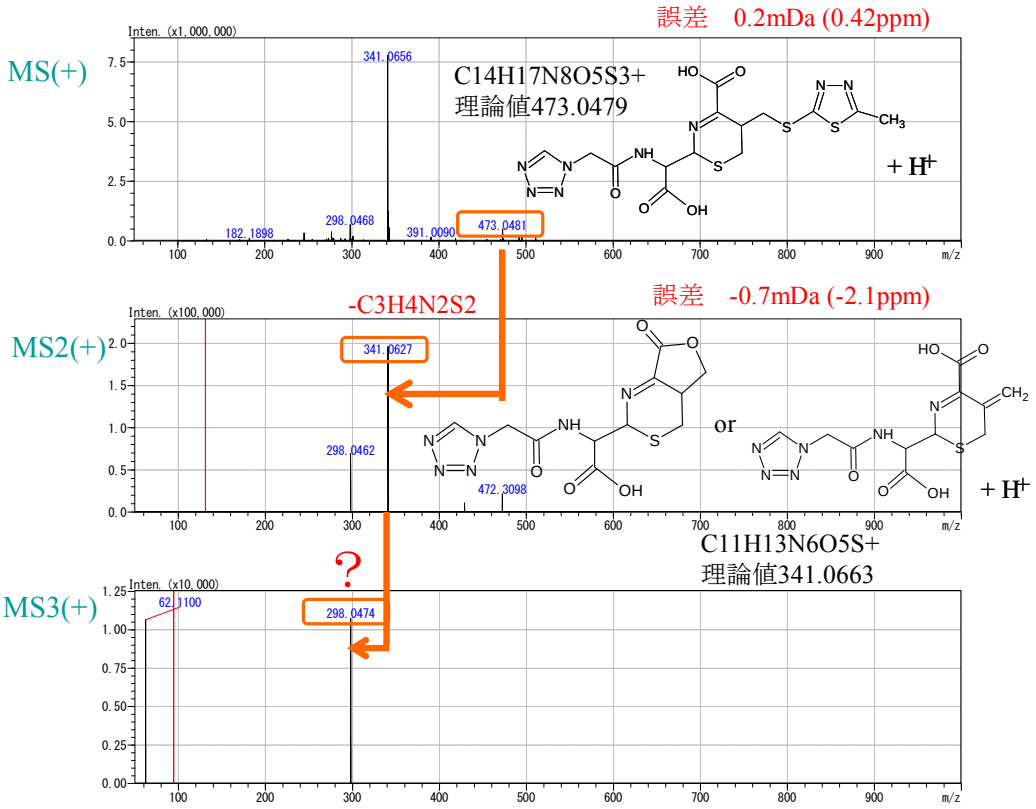
(a)　ピーク３：類縁物質 E



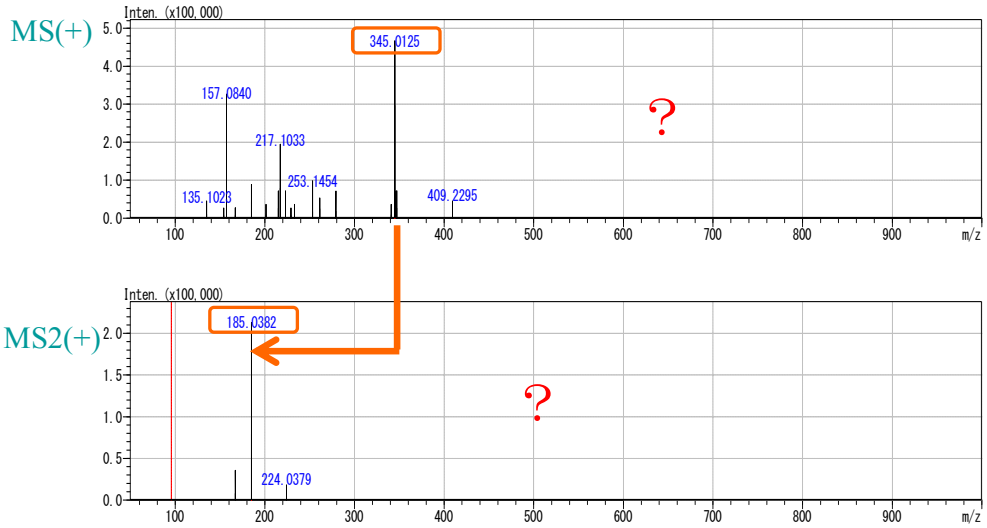
(b)　ピーク４：類縁物質 G



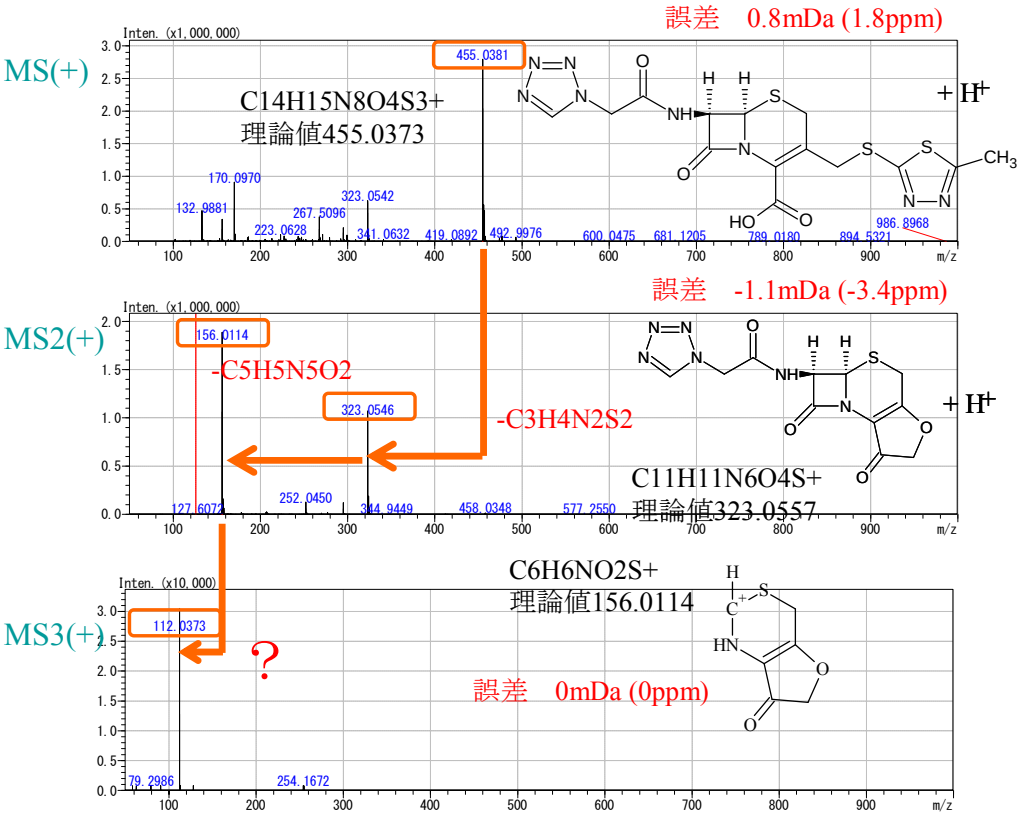
(c) ピーク 5：類縁物質 I



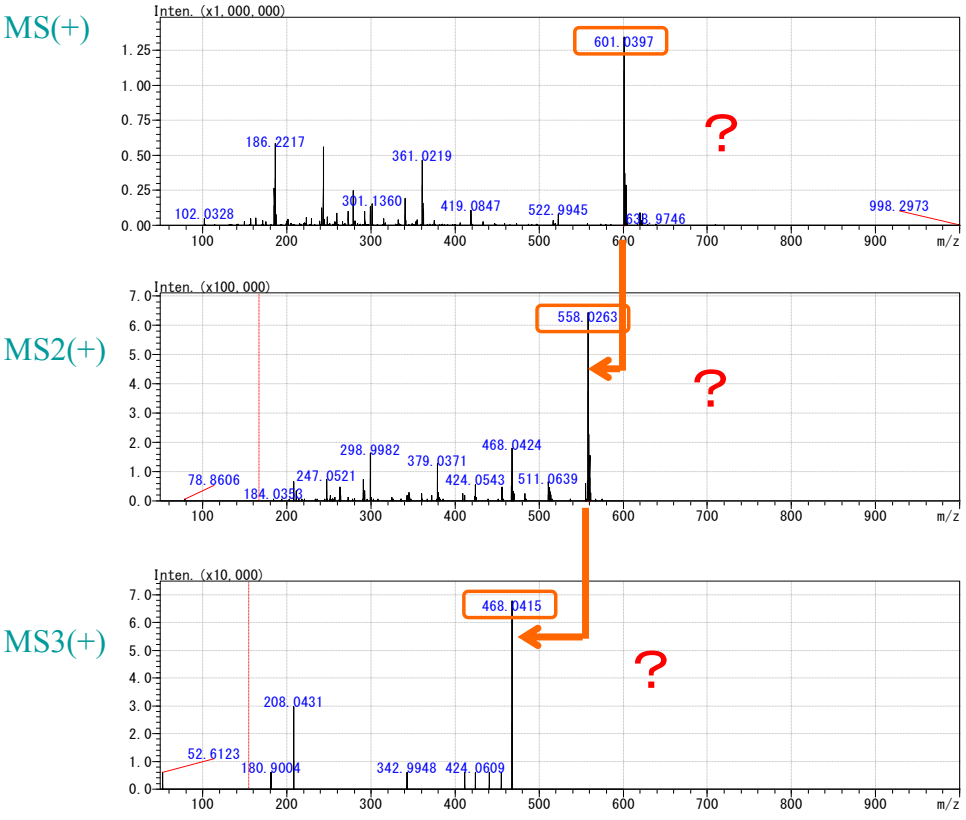
(d) ピーク 6：未知



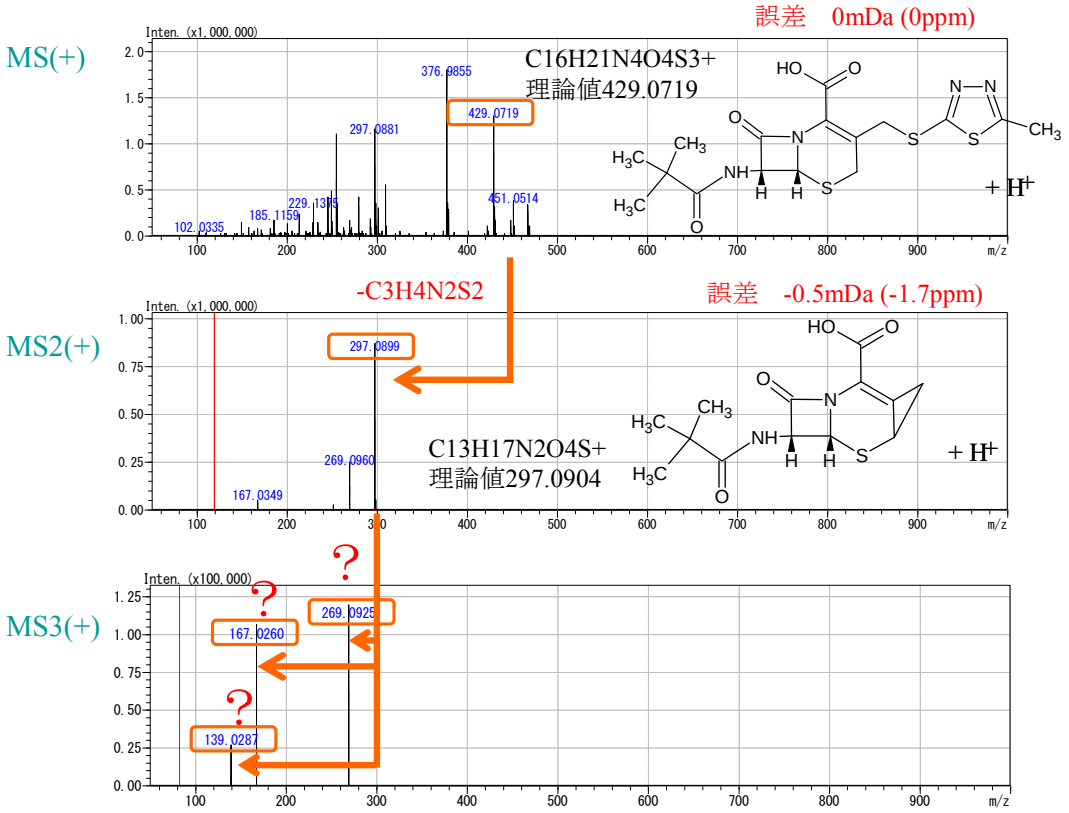
(e) ピーク 7 ：セファゾリン



(f) ピーク 11 ：未知



（g）ピーク 12：類縁物質 B



7．考察

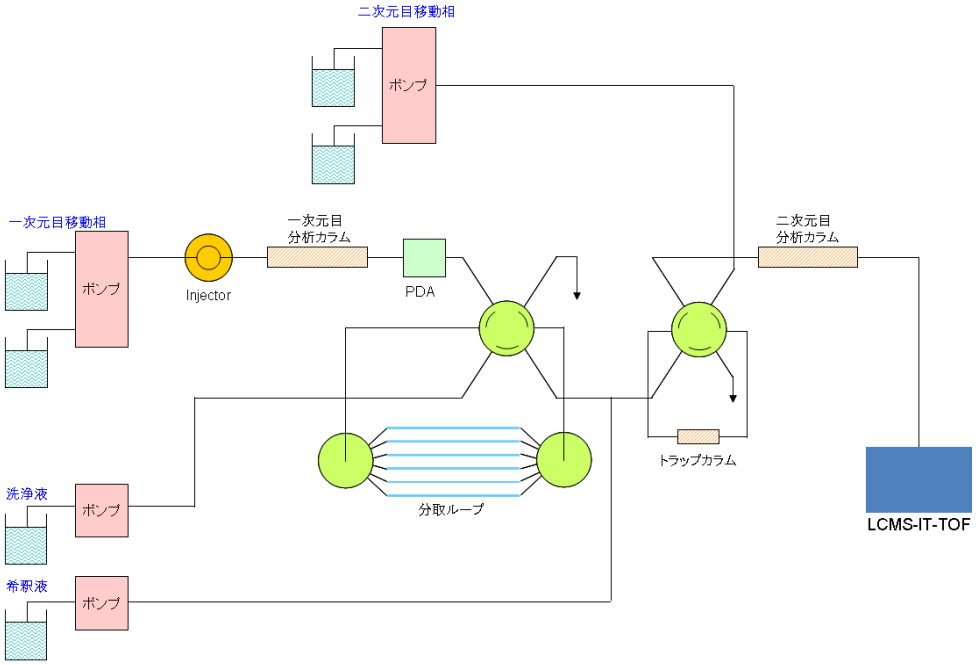
日局条件、EP 条件どちらでも、すべての製剤は規格を満たしていた。また先発品と後発品のクロマトグラムパターンは類似しており、含まれる不純物の種類にも大きな差がないと思われる。

両方の分析条件において主に見られたピークは、これまでの報告 [1,2] でも報告されている不純物ピークであり、今回、質量分析によって、これらが 3 つの類縁物質(E,G,I)であるという結果を得た。また、それ以外に検出されたピークは、0.05%以下を定量限界とすると、ほぼ検出限界に近い量しか含まれていない。そのなかで、日局条件では未知物質を 1 種、EP 条件では類縁物質 B および未知物質 2 種を検出した。未知物質についても、今後、他の研究から詳細な構造情報が得られれば、既知の物質として、質量分析で検出可能な化合物になると思われる。

参考文献

1. 京都府保険衛生研究所「注射剤の純度試験結果報告」
2. 木村康浩他，注射用セファゾリンナトリウム製剤の先発医薬品と後発医薬品における品質比較，医療薬学，34, 573 (2008)

参考：LCMS 装置見取り図



Co-senseシステム―LCMS-IT-TOF (島津製作所)