

まつげ美容液に含まれるビマトプロスト等の医薬品成分の分析法の構築

分担研究者 前川京子 (同志社女子大学薬学部)
研究協力者 松尾綾香 (同志社女子大学薬学部)
花房美穂 (同志社女子大学薬学部)
高橋知里 (同志社女子大学薬学部)

研究要旨

【目的】

現在、メルカリなどのフリマアプリで、「まつげ美容液」などと銘打って出品されている製品が多数ある。広告のなかでは明確に「まつげ伸長促進」とは謳っていないものの、睫毛貧毛症を適応症としたグラッシュビスタ外用液剤の主薬成分であるビマトプロスト等を含有する医薬品相当の製品が、インターネット等を介して流通している可能性が指摘されている。しかし、その根拠となるデータは乏しく、取り締まりが難しい状況にある。今回、高速液体クロマトグラフィー 三連四重極型質量分析計 (HPLC-MS/MS) によりビマトプロスト及びその類縁体の測定系を構築し、試買したまつげ美容液への含有の有無を確認することを目的とした。

【方法】

ビマトプロストを含む 10 種のプロスタグランジン F_{2α} (PGF_{2α}) 類縁体の標準物質を購入し、MS/MS のイオン検出強度が最大になるよう Selected reaction monitoring (SRM) のトランジションの最適化を行った。HPLC の分析カラムと分離条件を検討し、HPLC-MS/MS による測定系を構築した。試買したまつげ美容液 1 種について、前処理を行った後、本測定系で分析し、PGF_{2α} 類縁体の含有の有無を確認した。

【結果】

10 種の PGF_{2α} 類縁体の標準物質を用いて検量線を作成したところ、0.1 ~ 5.0 μM の範囲で良好な直線性を示した。まつげ美容液モデルアイズ・モデラッシュを測定試料として、本測定系で分析した結果、ビマトプロストを含有することを確認した。

【考察】

今回、試買したまつげ美容液の 1 種にビマトプロストを含むことを HPLC-MS/MS 法で確認した。今後、その他の試買品の分析を進める予定である。本測定系は、まつげ美容液中に含有される PGF_{2α} 類縁体を同定・定量する有用な手段である。

A. 研究目的

現在、メルカリなどのフリマアプリで、「まつげ美容液」などと銘打って出品されている製品が多数ある。広告のなかでは明確に「まつげ伸長促進」とは謳っていないものの、睫毛貧毛症を適応症としたグラッシュビスタ外用液剤の主薬成分であるビマトプロスト等を含有する医薬品相当の製品が、インターネット等を介して流通している可能性が指摘されている。しかし、その根拠となるデータは乏しく、取り締まりが難しい状況にある。

眼圧下降作用を有するプロスタグランジン F₂α (PGF₂α) の合成誘導体であるビマトプロストは、開放隅角緑内障及び高眼圧症の治療薬である。まつげの成長は、ビマトプロストの有害事象として報告され、これが、まつげ貧毛症を適応症としたグラッシュビスタ外用液剤として、2008年に米国、2014年に日本で承認された。2011年に、米国で購入可能な6種のOTC化粧品(MD Lash Factor, Revitalas, LiLash, neuLash, Lashes to Die For, RapidLash)にPGF₂α類縁体が含有されている可能性が指摘された[1]。その後、アメリカ食品医薬品局(FDA)において、高速液体クロマトグラフィー 三連四重極型質量分析計(HPLC-MS/MS)により、31種の化粧品について、ビマトプロスト及びその類縁体15化合物を対象にその含有の有無が分析された[2]。この結果、31種のうち16種類の化粧品にビマトプロスト類縁体が4化合物(tafluprost ethyl amide, bimatoprost isopropylester, cloprostenolisopropyl ester, 17-phenyl trinor prostaglandin F₂α methyl amide)含有されていたことが報告されている。また、2016年のイタリア衛生研究所の報告に

よると、米国よりインターネットを介して購入した7種のまつげ美容液をLC-MS/MSで分析した結果、一部にビマトプロストが含有されていた[3]。

しかし、本邦において、インターネット上で流通するまつげ美容液に、医薬品成分が含有されている製品が流通しているか否かは明らかでない。これまでに、独立行政法人国民生活センターは、まつ毛美容液による危害が急増していることを報道発表しており、インターネットショッピングモールで販売されている20銘の成分表示を調べた結果、20銘柄全てに、オタネニンジン根エキス、ナツメ果実エキス、センブリエキスなど様々な植物由来の成分が表示されていたと報告している[4]。また、一部の銘柄にはエタノールなどのアルコール類が成分として表示されていたことが明らかにされている。そこで、本研究ではインターネット上で広告・販売されているまつ毛美容液を試買し、ビマトプロストやその類縁体等の医薬品成分の含有の有無をHPLC-MS/MS分析で確認し、その流通の実態を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

B-1. LC-MS/MSによる測定系の構築

ビマトプロストの重水素標識体を含む10種のPGF₂α合成誘導体は、Cayman Chemical社(Michigan, USA)より購入した。標準物質のリストを表1に、その構造を図1に示す。それぞれを1 μMとなるようにメタノールで希釈し、標準溶液とした。これらを直接LC-MS8040(島津製作所、京都)に注入し、イオン検出強度が最大になるよう Selected reaction monitoring (SRM) のトラン

ジションの最適化を行った。その他の測定条件は下記の通りとした。

<MS 条件>

イオン化法：エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法

測定モード：ポジティブイオンモード

ネブライザーガス：窒素

ネブライザーガス流量：2 L/min

ドライニングガス：窒素

ドライニングガス流量：15 L/min

インタフェイス電圧：+4.5 kV (チューニングファイル値)

DL 温度：250

ブロックヒーター温度：400

最適化した SRM のパラメーターを用いて、各標準物質が分離し、感度よく検出される HPLC 条件を検討し、下記の通りとした。

<HPLC 条件>

移動相：(溶媒 A) 0.1% 酢酸 (溶媒 B) AcCN : MeOH = 4 : 1

カラム：Inertsil, ODS-EP 5 μ m, 2.1 \times 150 mm

注入量：3 μ L

流量：0.3 mL/min

タイムプログラム：0-15 min : 5-85% B, 15-20 min : 85% B, 20-20.10min : 85-5% B, 20.10-25min : 5% B

カラムオープン：40

B-2 試料の前処理と測定

LC-MS/MS 分析のための試料の前処理は下記の通り行った。まず、購入したまつげ美容液、グラッシュビスタ外用液剤(ポジティブコントロール)及び蒸留水(ネガティブコントロール)をそれぞれ 10 μ L 分取し、0.1% ギ酸を 740 μ L、メタノールを 240 μ L、及び

重水素標準物質混合液 10 μ L を加え、全量を 1 mL とした。重水素標準物質混合液は、Bimatoprost-d4、Travoprost-d4、Latanoprost-d4 をそれぞれ 10 μ M 含むようにメタノールで調整した。上記の混合溶液を、10 min 超音波処理した後、13000 rpm で 10 min 遠心し、上清を分取後、LC-MS/MS 測定に供した。

C. 研究結果

C-1. LC-MS/MS による測定系の構築

標準物質を用いた最適化により決定した MS 分析のプリカーサイオンの m/z 、プロダクトイオンの m/z 、Dwell 時間、Q1 プリロードバイアス電圧、コリジョンエネルギー、Q3 プリロードバイアス電圧、及び保持時間を表 2 に示す。Bimatoprost、Latanoprost、Travoprost は、それぞれの重水素体を最適化して得られたパラメーターを準用した。また Bimatoprost、15(R)-17-phenyl trinor Prostaglandin F2 α isopropyl ester (Bima IE)、17-phenyl trinor Prostaglandin F2 α methyl amide (17-PTPF2a MA)、及び 17-phenyl trinor Prostaglandin F2 α serinol amide (Bima SA)は、脱水体をプレカーサーイオンとした。

各標準物質につき、最適化したパラメーターを用いて LC-MS/MS 分析した際の SRM クロマトグラムを図 2 に示す。また SRM クロマトグラムより求めたピークの面積を用いて、各標準物質の絶対検量線 (0.1~5 μ M) を作成した (図 3)。標準物質の回帰直線の相関係数 (R²) は全て 0.99 以上であり良好な直線性を示した。

C-2. 試料の測定

試買したまつげ美容液のうち、個人輸入を代行するオオサカ堂から購入したモデルアイズ・モデラッシュを測定試料として選

択した。まず初めに、本製品を選択した理由は、ビマトプロスト配合と明記されていたためである。また、ポジティブコントロールとしてグラッシュビスタ外用液剤を、ネガティブコントロールとして蒸留水を、測定試料とした。各測定試料のSRMクロマトグラムの一部を図4に示した。グラッシュビスタ外用液剤とモデルアイズ・モデラッシュにビマトプロストが含まれていることを確認した。検量線から求めたビマトプロスト濃度は、グラッシュビスタ外用液剤が0.44 mg/mLと、モデルアイズ・モデラッシュが0.47 mg/mLとなり、理論値である0.3 mg/mLより、高く算出された。その他、モデルアイズ・モデラッシュには、15-keto Bima、及び17-PTPF2a MAがわずかに含まれており、それぞれ自動酸化、及び合成段階の不純物と考えられた。その他、測定したPGF2 α 類縁体は、モデルアイズ・モデラッシュには含まれていないことを確認した(図5)。

D. 考察

今年度は、ビマトプロストやその類縁体10化合物につき、LC-MS/MSを用いた測定系を構築した。検量線は、0.1~5.0 μ Mの範囲では、良好な直線性を示したが、上限を10.0 μ M、さらに20.0 μ Mとあげると、MSの検出器の飽和するためか、直線性は悪くなる傾向が認められた(data not shown)。グラッシュビスタ外用液剤には、1 mL中ビマトプロスト0.3 mg含有するとされ、これは721.8 μ Mに相当する。今回は、前処理段階で試料を100倍希釈して測定したため、設定した検量線の範囲(0.1 μ M~5.0 μ M)を超える結果となった。このため外挿で定

量値を求めたところ、本剤に含まれるビマトプロストは、理論値より高い濃度で算出された。今後、定量値の真度を上げるためには、前処理段階で試料の希釈倍率を上げる必要である。一方で、試買したまつげ美容液には、グラッシュビスタ外用液剤より低い濃度のPGF2 α 類縁体が含有されている場合や、まつげ美容液に含まれる種々の添加剤により、MSのイオンサプレッションが起きることも考えられる、そこで、まず、PG類含有の有無を本希釈倍率でスクリーニングした後、含有が認められたもののみ、適当な希釈倍率で、定量を行うことが有効と考えた。また、定量においては、試料中の添加剤によるイオンサプレッションの補正のために、内部標準物質を添加した内標準法を用いることが望ましいと考えられた。

今回、構築したLC-MS/MS系を用いて、モデルアイズ・モデラッシュにビマトプロストが含まれることを確認した。今後、他の試買まつげ美容液の解析を進める予定である。

E. 結論

試買したまつ毛美容液に、ビマトプロストやその類縁体等の医薬品成分が含まれているか否かを確認する目的で、PGF2 α 類縁体10化合物につき、LC-MS/MS分析系を構築した。モデルアイズ・モデラッシュにビマトプロストが含有されていることを確認した。今後、その他の試買品の解析を進める予定である。

F. 引用文献

1. Jones D., Enhanced Eyelashes: Prescription and Over-the-Counter Options. Aesth Plast

- Surg (2011) 35:116–121.
2. Wittenberg JB et al., Determination of prostaglandin analogs in cosmetic products by high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1359 (2014) 140–146.
 3. Marchei E et al., High Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry Measurement of Bimatoprost, Latanoprost and Travoprost in Eyelash Enhancing Cosmetic Serums. *Cosmetics* 2016, 3(1), 4; <https://doi.org/10.3390/cosmetics3010004>
 4. 2019年8月8日:公表 独立行政法人国民生活センター「まつ毛美容液による危害が急増！ - 効能等表示の調査もあわせて実施 - 」 http://www.kokusen.go.jp/pdf/n-20190808_2.pdf

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

表1 標準物質のリスト

名称	略称	Cayman社 Item No.
17-phenyl trinor Prostaglandin F2 ethyl amide-d4	Bimatoprost-d4	316820
17-phenyl-13,14-dihydro trinor Prostaglandin F2 -d4 isopropyl ester	Latanoprost-d4	10006556
16-m-trifluoromethylphenoxy tetranor PGF2 isopropyl ester-d4	Travoprost-d4	9000936
15-keto-17-phenyl trinor Prostaglandin F2 ethyl amide	15-keto-Bima	10010405
17-phenyl trinor Prostaglandin F2	BimaFA	16810
15(R)-17-phenyl trinor Prostaglandin F2 isopropyl ester	BimalE	16825
(+)-cloprostenol isopropyl ester	Clo IE	10010016
17-phenyl trinor Prostaglandin F2 methyl amide	17-PTPF2a MA	10010351
17-phenyl trinor Prostaglandin F2 serinol amide	Bima SA	10004237
17-trifluoromethylphenyl trinor Prostaglandin F2 ethyl amide	17 - CF ₃ PTPF2a	10010061

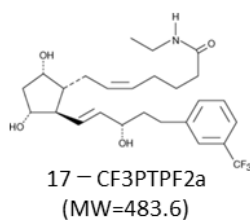
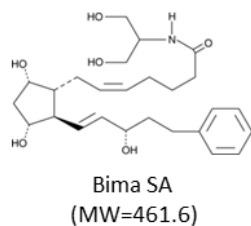
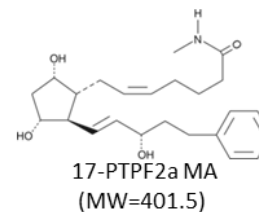
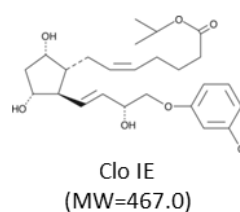
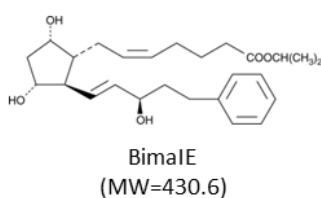
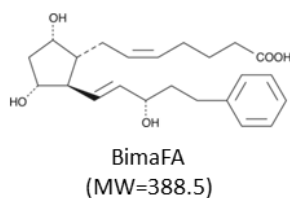
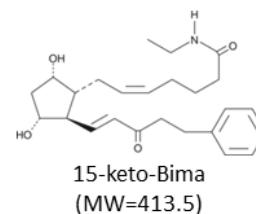
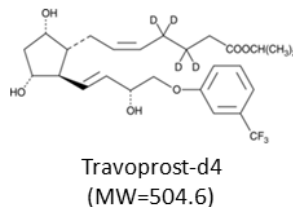
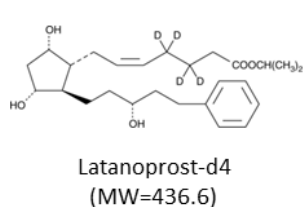
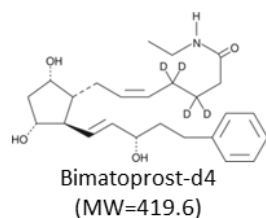


図1 標準物質の構造

表2 標準物質のHPLC-MS/MS測定パラメーター

化合物	プレカーサイオン (m/z)	プロダクトイオン (m/z)	トランジションの種類	極性	Dwell時間 (msec)	Q1プリロッド コリジョン Q3プリロッド			保持時間 (分)
						バイアス電圧 (V)	エネルギー (V)	バイアス電圧 (V)	
Bimatoprost-d ₄ -H ₂ O+H	402.3	366.2	定量イオン	positive	10	-10	-12	-24	10.4
	402.3	91.1	確認イオン	positive	10	-10	-53	-14	
Latanoprost-d ₄ +H	437.3	341.2	定量イオン	positive	10	-14	-17	-21	13.6
	437.3	401.3	確認イオン	positive	10	-14	-11	-17	
Travoprost-d ₄ +H	505.3	325.2	定量イオン	positive	10	-24	-10	-21	13.8
	505.3	253.2	確認イオン	positive	10	-22	-13	-24	
Bimatoprost-H ₂ O+H	398.3	362.2	定量イオン	positive	10	-10	-12	-24	10.4
	398.3	91.1	確認イオン	positive	10	-10	-53	-14	
Latanoprost+H	433.3	337.2	定量イオン	positive	10	-14	-17	-21	13.6
	433.3	397.3	確認イオン	positive	10	-14	-11	-17	
Travoprost+H	501.3	321.2	定量イオン	positive	10	-24	-10	-21	13.8
	501.3	249.2	確認イオン	positive	10	-22	-13	-24	
15-keto Bima+H	414.3	105.1	定量イオン	positive	10	-13	-39	-17	10.8
	414.3	396.3	確認イオン	positive	10	-13	-12	-26	
Bima FA-H	387.2	343.2	定量イオン	negative	10	26	19	26	10.7
	387.2	193.3	確認イオン	negative	10	26	27	21	
Bima IE-H ₂ O+H	413.25	131.1	定量イオン	positive	10	-13	-24	-22	13.1
	413.25	91.1	確認イオン	positive	10	-13	-56	-14	
Clo IE+H	467.2	321.25	定量イオン	positive	10	-14	-9	-20	13.7
	467.2	249.25	確認イオン	positive	10	-26	-13	-25	
17-PTPF2a MA-H ₂ O+H	384.25	348.2	定量イオン	positive	10	-22	-12	-22	9.9
	384.25	91.1	確認イオン	positive	10	-22	-55	-14	
Bima SA-H ₂ O+H	444.25	408.25	定量イオン	positive	10	-14	-14	-27	9.1
	444.25	92.15	確認イオン	positive	10	-25	-23	-14	
17-CF ₃ PTPF2a EA+H	484.3	466.2	定量イオン	positive	10	-10	-11	-21	11.8
	484.3	430.2	確認イオン	positive	10	-10	-15	-29	

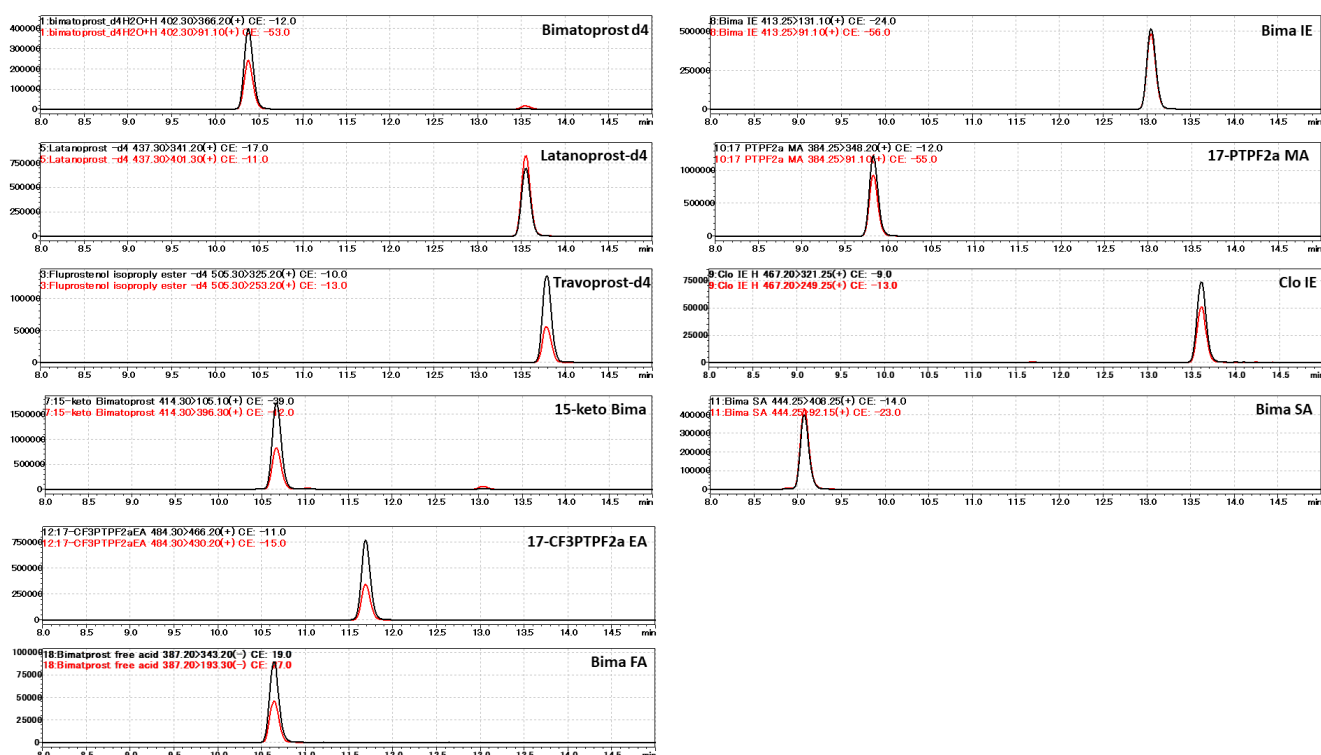


図2 各標準物質のSRMクロマトグラム

黒色が定量チャンネルを、赤色が確認チャンネルを示す

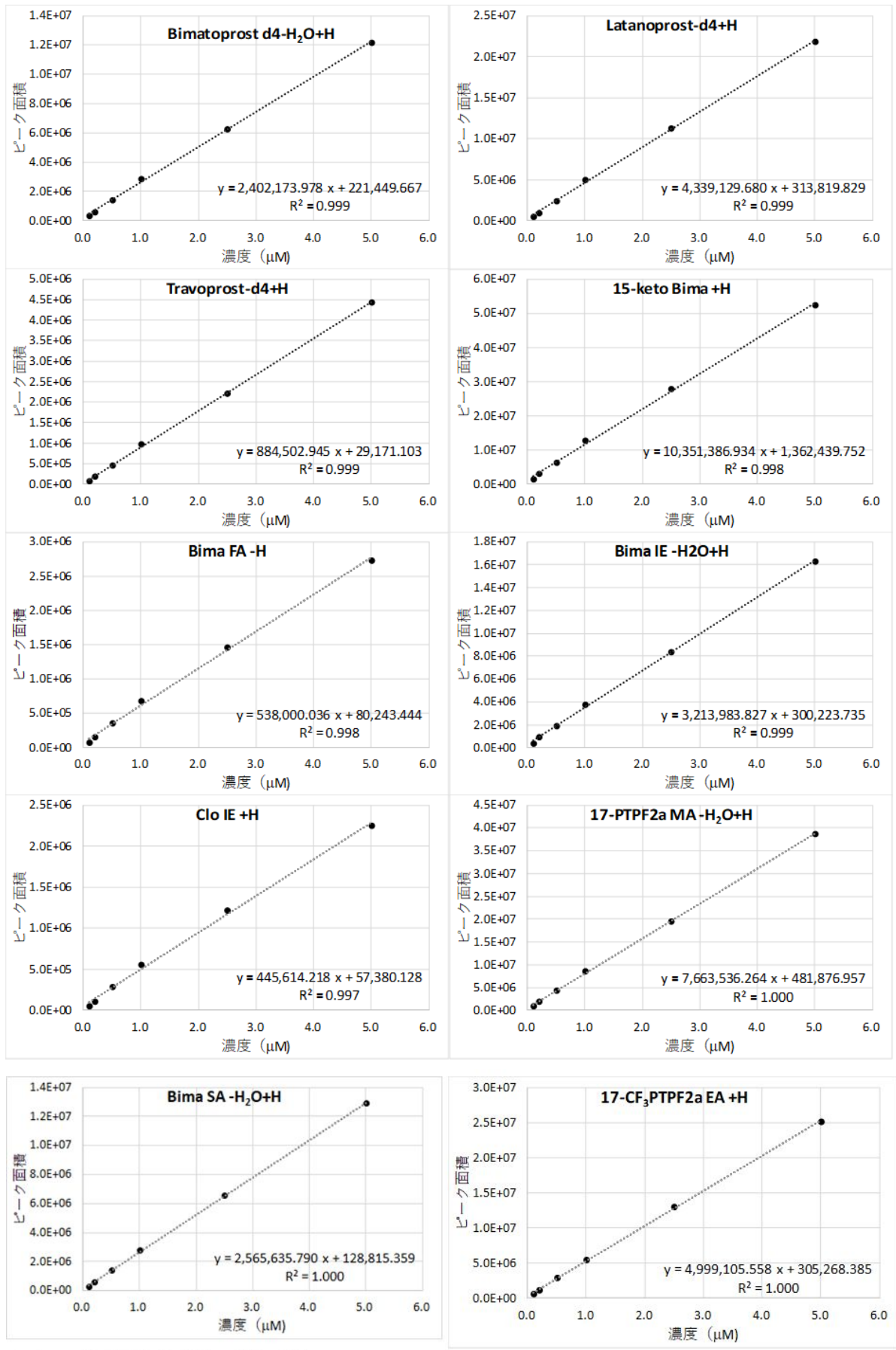


図3 各標準物質の検量線

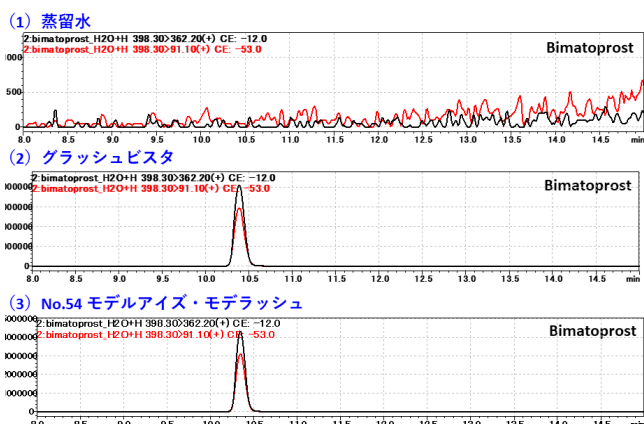
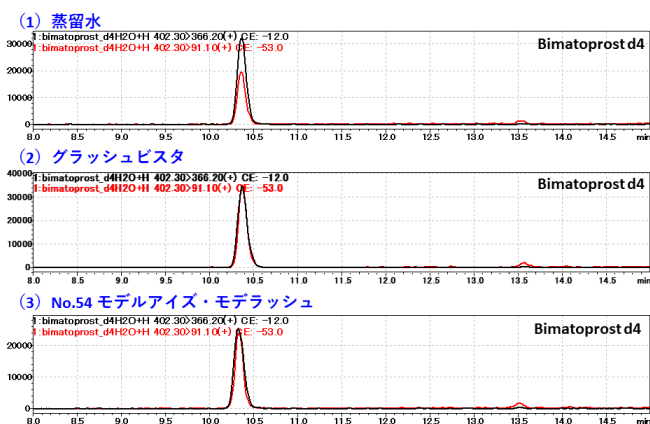


図4 測定サンプルのSRMクロマトグラム

黒色が定量チャンネルを、赤色が確認チャンネルを示す

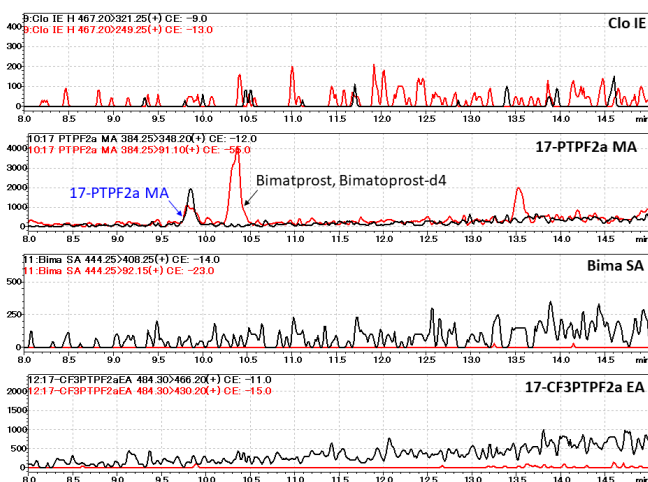
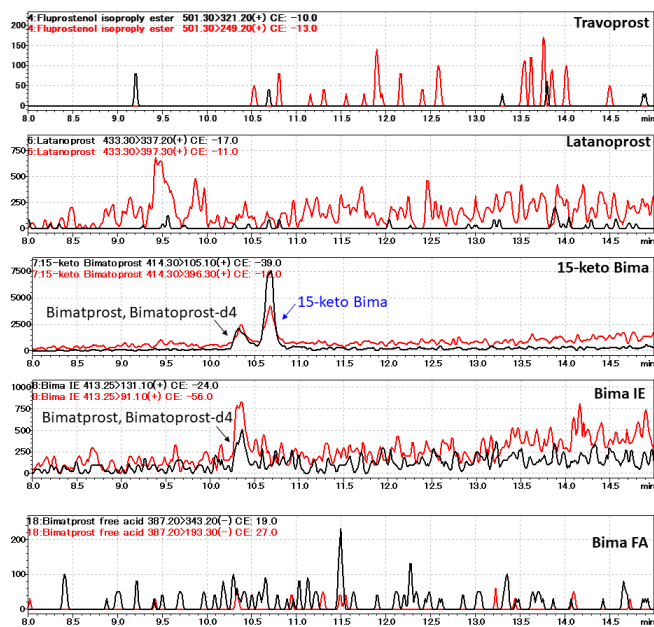


図5 モデルアイズ・モデラッシュにおける各PGF2 α 類縁体のSRMクロマトグラム