

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

分担研究者 前川京子 (同志社女子大学薬学部)
研究協力者 花房美穂 (同志社女子大学薬学部)
松尾綾香 (同志社女子大学薬学部)
高橋知里 (同志社女子大学薬学部)
Mohammad Sofiqur Rahman (金沢大学大学院医薬保健学総合研究科)

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】

昨年度からの継続として、プロスタグランジン F2 α (PGF2 α) 類縁体の標準物質を2種追加で購入し、計12種の標準物質につきMS/MSのイオン検出強度が最大になるよう Selected reaction monitoring のトランジションの最適化を行った。試買したまつげ美容液64種について、前処理を行った後、本測定系で分析し、PGF2 α 類縁体の含有の有無を確認した。さらに、含有が確認された製品を対象に、内部標準法により各PGF2 α 類縁体を定量した。

【結果】

12種のPGF2 α 類縁体の標準物質を用いて内部標準法による検量線を作成したところ、0.1~5.0 μ Mの範囲で良好な直線性を示した。まつげ美容液64製品のうち、ビマトプロストを含有する製品は4製品であり、これらはグラッシュビスタとほぼ同量のビマトプロストを含有していた。その他、医薬品としては使用実績がない Bimatoprost isopropyl ester、Tafluprost ethyl amide Cloprostenol isopropyl ester を含む製品が、それぞれ1製品、2製品、5製品見出された。

【考察】

本邦で購入可能なまつげ美容液には、PGF2 α 誘導体を含有する製品があり、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ことが示された。本測定系は、まつげ美容液中に含有される PGF2 α 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。

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いる。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[1]。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。一方で、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。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

2 種の PGF2 α 合成誘導体、Tafluprost ethyl amide (TafEA)、及び Tafluprost (Taf)、さらに内標として用いる PGE2 isopropyl ester (PGE2IPE) は、Cayman Chemical 社 (Michigan, USA) より購入した。昨年度、購入済みのビマトプロストの重水素標識体を含む 10 種の PGF2 α 合成誘導体も併せて使用した。全標準物質のリストを表 1 に示す。それぞれを 1 μ M 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 $^{\circ}$ C

ブロックヒーター温度：400 $^{\circ}$ C

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 μm , 2.1 \times 150
mm

注入量 : 3 μL

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°C

B-2 試料の前処理とスクリーニング測定

LC-MS/MS 定性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 64 製品、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 μL 分取し、0.1%ギ酸を 740 μL 、及び重水素標準物質混合液 250 μL 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 0.1 μM 、PGE2 IPE を 0.8 μM 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。

B-3 定量分析

LC-MS/MS 定量分析のための試料の前処理は下記の通り行った。スクリーニング測定により各種 PGF2 α 合成誘導体を含むことが示されたまつげ美容液をそれぞれ 5-10 μL 分取し、0.1%ギ酸を 740-745 μL 、及び 1.0

μM PGE2 IPE を 250 μL を加え、全量を 1 mL とした。定量用検量線は、各 PGF2 α 合成誘導体を 0.05~10 μM の範囲内で段階希釈し、PGE2 IPE を 0.25 μM 含むように、0.1%ギ酸 : メタノール=3 : 1 の溶液で調整した。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。定量分析は、LC-MS8040 及び LC-MS8050 (島津製作所、京都) を用いた。

C. 研究結果

C-1. LC-MS/MS による測定系の構築

TafEA, Taf, PGE2 IPE について、標準物質を用いて MS のパラメーターの最適化を行った。決定した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 プリロッドバイアス電圧、コリジョンエネルギー、Q3 プリロッドバイアス電圧、及び保持時間を表 2 に示す。PGE2 IPE 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 1 に示す。

対象とした 12 種について、SRM クロマトグラムより求めた各標準物質と内標である PGE2 IPE のピーク面積比を用いて、各標準物質の検量線 (0.1~5 μM) を内部標準法により作成した (図 2)。標準物質の回帰直線の相関係数 (R^2) は全て 0.99 以上であり良好な直線性を示した。

C-2. 試料の前処理とスクリーニング測定

まつげ美容液 64 製品を対象としたが、2 製品で、A 液、B 液の 2 液に分かれていたため、66 サンプル中に PGF2 α 合成誘導体が含まれるか否かをスクリーニング測定によ

り確認した。PGF2 α 合成誘導体が含まれていた測定試料の SRM クロマトグラムの一部を図 3 に示した。ビマトプロストは、64 製品中 4 製品に含有が確認された。緑内障治療薬である Latanoprost、Travoprost 及び Taf を含む製品は検出されなかった。医薬品としては使用実績がない Bimatoprost isopropyl ester (Bima IE) を含む製品が 1 製品、Taf EA を含む製品が 2 製品、Cloprostenol isopropyl ester (Clo IE) を含む製品が 5 製品見出された。その他、15-keto Bimatoprost (15-keto Bima)、及び 17-phenyl trinor Prostaglandin F2 α methyl amide (17-PTPF2 α MA)を定量限界以下で含む製品がそれぞれ 4 製品、及び 2 製品、Bimatoprost free acid (Bima FA)をわずかに含む製品が 1 製品見出され、それぞれ自動酸化、及び合成段階の不純物または分解物と考えられた。

C-3. 定量分析

スクリーニング法により PGF2 α 類縁体を含むことが示されたまつげ美容液 12 製品を対象に含有される各 PGF2 α 類縁体を定量した。ビマトプロスト 0.03%を含有するグラッシュビスタ外用液剤中に含まれるビマトプロスト濃度は、0.285 mg/mL であり、表示含有濃度である 0.3 mg/mL とほぼ同量に算出された。まつげ美容液 4 製品に含まれるビマトプロストの濃度範囲は、0.240 - 0.361 mg/mL の範囲にあった。Bima IE 陽性サンプル 1 製品中の Bima IE の濃度は 0.183 mg/mL であり、Taf EA 陽性サンプル 2 製品中の Taf EA の濃度範囲は 0.008 - 0.193 mg/mL の範囲にあった。Clo IE 陽性サンプル 5 製品に含まれる Clo IE の濃度範囲は、0.007 - 0.119 mg/mL であった (図 4)。

D. 考察

今年度は、PGF2 α 合成誘導体 2 種を、LC-MS/MS を用いた測定系に追加した。Taf EA は、測定対象としたまつげ美容液に含有されていることがインターネット上の販売サイトに記載されていること、Taf は、ビマトプロスト、Latanoprost、Travoprost と同様に、医薬品として承認されていることから、両者の含有の有無を明らかにすることは意義があると考え、測定系に追加した。内部標準法による各 PGF2 α 合成誘導体の検量線は、0.1~5.0 μ M の範囲では、良好な直線性を示した。

構築した LC-MS/MS 系を用いて、12 種の PGF2 α 合成誘導体がまつげ美容液 64 製品に含まれているか否かを確認した。医薬品であるビマトプロストが含まれる製品は、4 製品であった。このうち、1 種は、容器に「RX only」とあり、ビマトプロストが 0.03%含有しているとの記載があった。この製品の定量値は、0.278 mg/mL であり、成分含量表記とほぼ一致した。残りの 3 製品には、ビマトプロスト含有の表示はなかった。

医薬品としては使用実績のない PGF2 α 合成誘導体に着目すると、64 製品のうち、計 8 製品に、定量可能な含量で Bima IE, Taf EA, Clo IE が含まれていた。このうち、容器または被包に含有表示があった製品は 3 種であり、5 種には含有表記がなかった。定量値は様々であったが、いずれも医薬品であるグラッシュビスタ (0.03%ビマトプロスト含有) より低値を示した。既報によると、アメリカ食品医薬品局 (FDA) は、31 種の化粧品のうち 16 種類の化粧品に Taf EA, Bima IE, Clo IE, 17-PTPF2 α MA が、それぞれ 91.6-141 μ g/g (Taf EA)、172-206 μ g/g (Bima IE)、27.4-

90.0 µg/g (Clo IE)、132-297 µg/g (17-PTPF2α MA) 含有されていたことを報告している [2]。我々が分析した製品には、17-PTPF2α MA を除く Taf EA, Bima IE, CloIE が LC/MS/MS により定量可能な含量で含まれており、これらの医薬品相当の製品がインターネット等を介して本邦に流通していると考えられる。

E. 結 論

まつげ美容液に含まれる可能性がある PGF2α類縁体 12 種の LC/MS/MS による測定系を構築した。試買したまつげ美容液 64 製品にこれらの PGF2α類縁体が含まれているか否かを明らかにし、含有物質の定量を行った。

F. 引用文献

1. 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
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.

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
花房 美穂、松尾 綾香、Rahman Sofiqur Mohammad、Shu Zhu、スタッフ 由紀

子、山下 陽夏、高橋 知里、吉田 直子、秋本 義雄、松下 良、木村 和子、前川 京子、まつげ美容液に含まれるピマトプロスト等の医薬品成分の分析 日本薬学会第 141 年会 (2021.3.28、オンライン)

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 購入標準物質のリスト

名称	略称	Cayman社 Item No.
17-phenyl trinor Prostaglandin F2 α ethyl amide-d4	Bimatoprost-d4	316820
17-phenyl trinor Prostaglandin F2 α ethyl amide	Bimatoprost	16820
17-phenyl-13,14-dihydro trinor Prostaglandin F2 α -d4 isopropyl ester	Latanoprost-d4	10006556
16-m-trifluoromethylphenoxy tetranor PGF2 α isopropyl ester-d4	Travoprost-d4	9000936
15-keto-17-phenyl trinor Prostaglandin F2 α ethyl amide	15-keto-Bima	10010405
17-phenyl trinor Prostaglandin F2 α	BimaFA	16810
15(R)-17-phenyl trinor Prostaglandin F2 α isopropyl ester	BimalE	16825
(+)-cloprostenol isopropyl ester	Clo IE	10010016
17-phenyl trinor Prostaglandin F2 α methyl amide	17-PTPF2 α MA	10010351
17-phenyl trinor Prostaglandin F2 α serinol amide	Bima SA	10004237
17-trifluoromethylphenyl trinor Prostaglandin F2 α ethyl amide	17-CF ₃ PTPF2 α	10010061
tafluprost ethyl amide	TafEA	9000843
tafluprost	Taf	10005440
Prostaglandin E2 isopropyl ester	PGE2IPE	10384

表2 標準物質のHPLC-MS/MS測定パラメーター

化合物	プレカーション (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 (m sec)	Q1プリロッドバイアス電圧 (V)	コリジョンエネルギー (V)	Q3プリロッドバイアス電圧 (V)	保持時間 (分)
Taf EA +H	438.2	418.2	定量イオン	positive	20	-17	-10	-28	11.70
	438.2	288.1	確認イオン	positive	20	-17	-15	-30	
Taf +H	453.2	339.2	定量イオン	positive	20	-22	-9	-22	14.40
	453.2	433.2	確認イオン	positive	20	-22	-8	-19	
Prostaglandin E2 isopropyl ester -H ₂ O +H(内標)	377.2	299.2	定量イオン	positive	20	-20	-14	-19	13.80
	377.2	317.2	確認イオン	positive	20	-20	-12	-21	

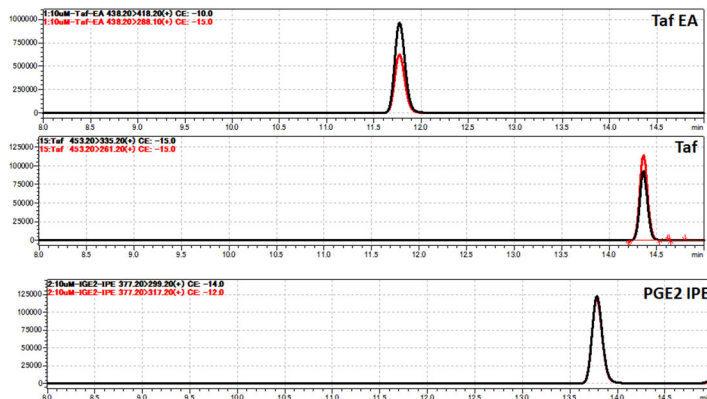


図1 各標準物質のSRMクロマトグラム

黒色が定量チャンネル、赤色が確認チャンネルを示す

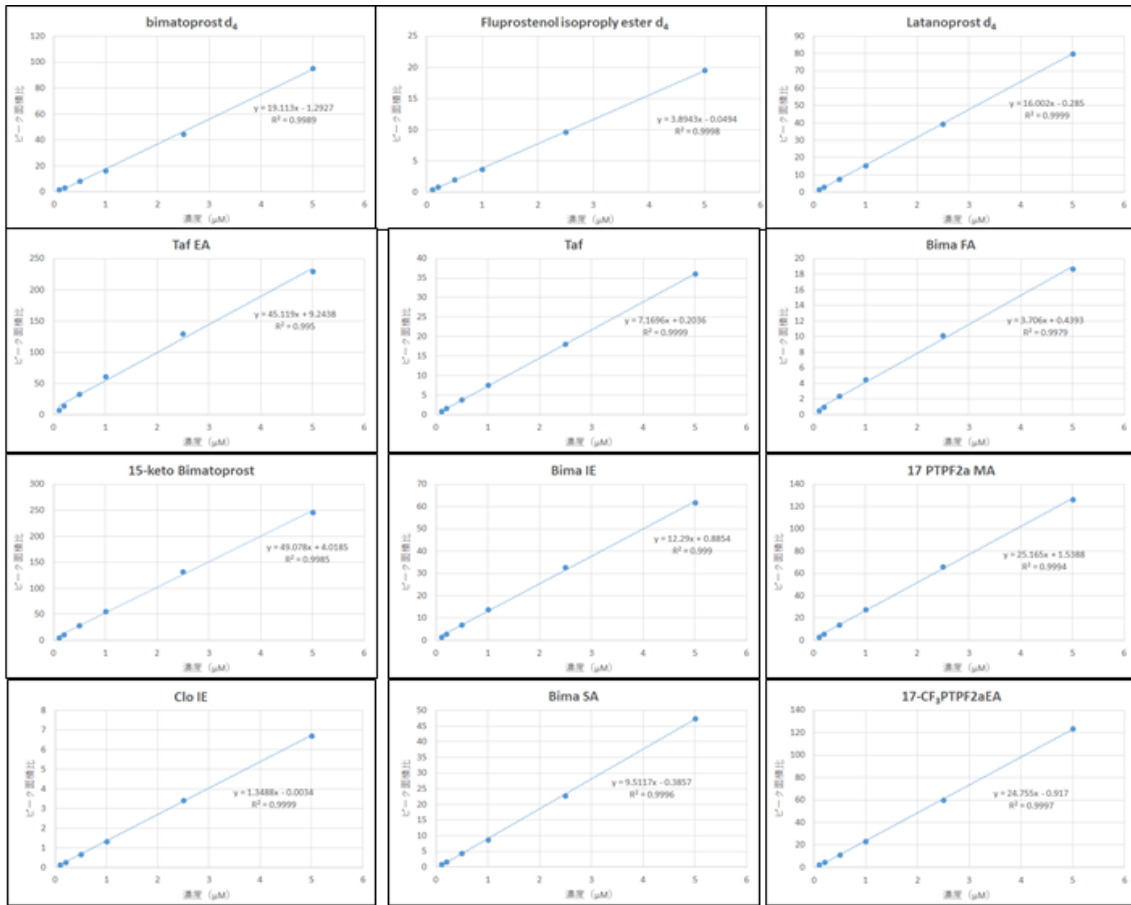


図2 内部標準法による各標準物質の検量線

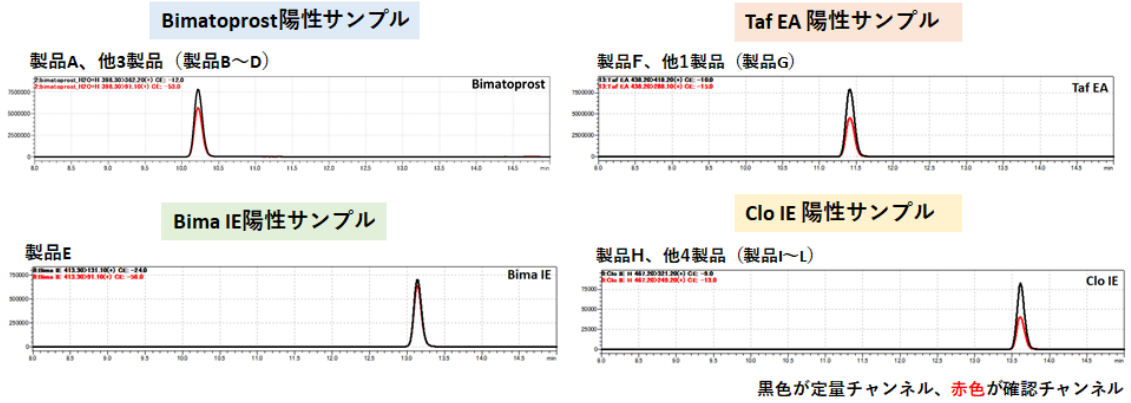


図3 スクリーニング法により検出されたまつ毛美容液に含まれるPGF2 α 類縁体

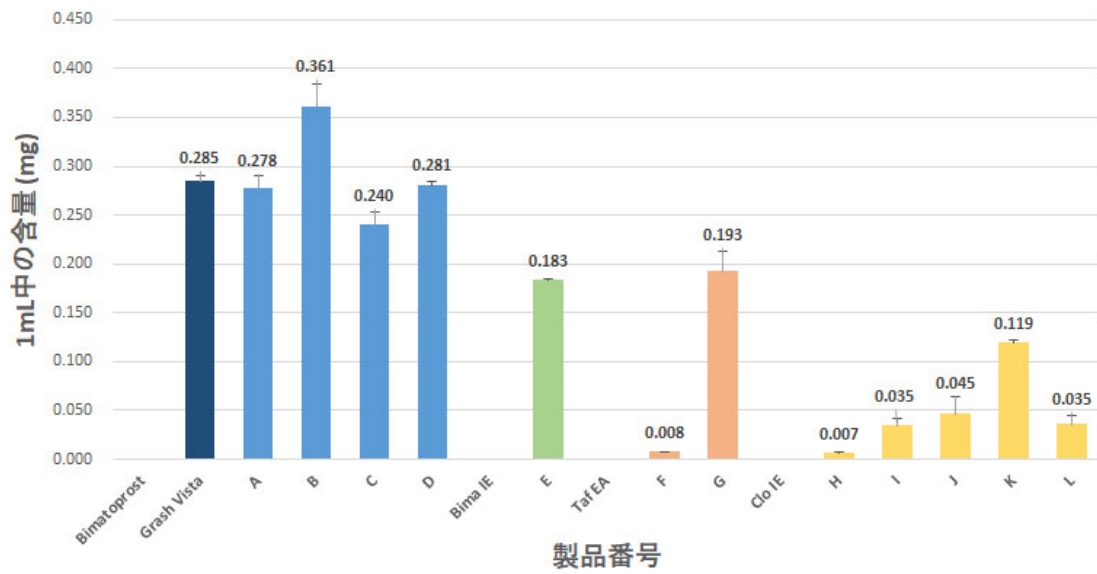


図4 まつ毛美容液に含まれるPGF2 α 類縁体の定量