

ステロイドの混入が疑われた化粧クリームの分析

五十嵐良明[#], 松村由美^{*}, 三輪麻紀子, 内野 正, 徳永裕司, 西村哲治

Analysis of Facial Cream Suspected to Contain Steroids

Yoshiaki Ikarashi[#], Yumi Matsumura^{*}, Makiko Miwa, Tadashi Uchino,
Hiroshi Tokunaga and Tetsuji Nishimura

A reputed facial cream available in the market was well known for its excellent moisturizing properties. However, an examination of the skin symptoms displayed by patients who have used this facial cream had led dermatologists to believe that the cream might contain steroids. It is a well-known fact that the addition of medicinal ingredients such as steroids to cosmetics is prohibited. We analyzed the commercially available facial cream used by the patients and found the presence of a steroid in the facial cream. The steroid was extracted from the cream with methanol, and injected into the ODS. The separation was archived using a mixture of tetrahydrofuran and water as the mobile phase. The retention times of the observed peaks were in accordance with those of methyl paraben, propyl paraben, and betamethasone valerate (BV). The BV sample obtained after elution was fractionated. The concentrated solution was spotted on a TLC plate and was developed using chloroform. We observed that the spot that became visible on spraying an alkaline tetrazolium blue solution corresponded to BV. The concentration of BV was determined by HPLC using an isocratic mobile phase comprising a mixture of methanol and water, and was found to be approximately 0.008-0.010%.

Keywords: steroid, betamethasone valerate, determination, facial cream, cosmetics

諸 言

アトピー性皮膚炎のため定期的に診察を受けていた患者が、あるとき顔面の紅斑が強く出現したため、医師の診察を受けてステロイド外用剤を処方された。しかし患者はこれを適用せず、代わりにインターネット上で話題となっている保湿クリームを購入し塗布した。後日受診の際に、患者は「クリームを塗布した翌日には顔面の紅斑症状が改善傾向であった。その後も常用した。」と医師に話したが、その顔面は血管収縮のためむしろ蒼白であった。患者自身も化粧クリームにしては高い効果に疑問があったため、医師の判断のもと、このクリームの使用を中止したところ、以前よりも皮膚症状が増悪してし

まい、ステロイドの内服治療を受けることとなった。

使用したクリームは植物のエキス成分が主で、紅斑がわずかに1日で消退するような即効性を有するとは考え難い。現在、化粧品は全成分表示が義務付けられ薬剤を配合することは禁止されているが¹⁾、今回の患者の皮膚症状やネット上のクリームに対する使用感からステロイドの含有が疑われた。副腎皮質ホルモンには強力な抗炎症作用と免疫抑制作用があり、これを配合したステロイド外用薬はアトピー性皮膚炎をはじめ種々の皮膚疾患の治療に用いられる²⁾。ステロイドはかなり効果の高い（強い）ものでも長期間塗り続けられない限り全身的な副作用は起きないが、塗布部位に血管が浮き上がって赤く見えたり皮膚が薄くなるなどの局所的な副作用が起きる。そのため、専門医は皮膚症状の重さ、部位、外用が必要な期間を考えて治療に用いるステロイド外用薬の強さと種類を決定する²⁾。

我々は、この化粧クリーム中にステロイドが含有されているかどうか分析した。種々の副腎皮質ホルモンを分離する液体クロマトグラフィー（HPLC）及び薄層クロ

[#] To whom correspondence should be addressed :
Yoshiaki Ikarashi; Kamiyoga 1-18-1, Setagaya, Tokyo
158-8501, Japan; Tel: 03-3700-1141 ext.255, Fax:
03-3707-6950; E-mail: ikarashi@nihs.go.jp

^{*} 京都大学大学院医学研究科 Kyoto University Graduate
School of Medicine

マトグラフィー (TLC) 条件を検討し、副腎皮質ホルモンとして吉草酸ベタメタゾン (betamethasone valerate, BV) をクリーム中に同定し定量を行ったので、その結果を報告する。

実験方法

1. 試薬

BVは和光純薬工業から購入した。他の副腎皮質ホルモン及び卵胞ホルモンは市販試薬として入手可能なものを分析対象とした。それぞれの略名及び入手先等をTable 1に示した。テトラヒドロフラン (THF) 及びメタノールは市販HPLC用を、クロロホルムは市販特級品を用いた。各物質はTHFまたはメタノールに溶解して標準溶液 (約1000 $\mu\text{g/ml}$) を調製し、順次希釈して用いた。メチルパラベン (4-hydroxybenzoic acid methyl ester, methyl paraben, MP) 及びプロピルパラベン (4-hydroxybenzoic acid *n*-propyl ester, propyl paraben, PP) についても同様に、メタノールに溶解して標準溶液を調製した。

アルカリ性ブルーテトラゾリウム試液：日本薬局法一般試験法に従って調製した³⁾。ブルーテトラゾリウム (blue tetrazolium, 3,3'-(3,3'-dimethoxy-4,4'-biphenylene) bis(2,5-diphenyl-2H-tetrazolium chloride, 和光純薬工業) のメタノール溶液 (1→200) 1容量に、水酸化ナトリウムのメタノール溶液 (3→25) 3容量を加えた。

2. 試料

皮膚科医を通じて患者が使用していた化粧クリームを入手した。また、同じ製品を購入して分析に用いた。

3. 器具及び装置

超音波洗浄機：シャープマニファクチャリングシステム製UT205型

メンブランフィルター：Millipore社製Millex-FG (孔径0.20 μm , 直径13 mm, PTFE膜)

TLC用薄層板：Silica gel 60 F254 silanized, 薄層厚0.25 mm, 20×20 cm (Merck社製)

高速液体クロマトグラフ (HPLC)：島津製作所製LC-10AD型ポンプ2台にSPD-M20A型フォトダイオードアレイ検出器, CTO-10AC型カラムオーブン, SIL-10AD型オートサンプラーを連結して用いた。島津製作所製LCワークステーション (LC solution) によりHPLCのシステム制御、データ収集及び解析を行った。

4. 試験操作

4.1 試料溶液の調製

試料約0.5 gを量りとり、メタノール約9 mlを加えて

10分間超音波処理した後、さらにメタノールを加えて正確に10 mlとした。この溶液を10000 rpmで10分間遠心した後、上清を分取し、メンブランフィルターを通したものを試料溶液とした。

4.2 定性

4.2.1 HPLCによる定性

試料溶液10 μl を下記条件のHPLCに注入し、得られたクロマトグラム上の各ピークの保持時間及び紫外可視吸収スペクトルを、各種ステロイド及びパラベン標準溶液のものと比較した。

HPLC条件 1

カラム：CAPCELL PAK C18 UG120 (4.6 mm i.d. ×150 mm, 粒径5 μm , 資生堂)

カラム温度：40℃

移動相：A液：水, B液：THF

流速：1.0 ml/min

検出波長：254 nm及び205 nm

リニアグラジエントの条件

min	A (%)	B (%)
0	70	30
35	0	100
45	0	100

HPLC条件 2

カラム：CAPCELL PAK C18 UG120 (4.6 mm i.d. ×150 mm, 粒径5 μm , 資生堂)

カラム温度：40℃

移動相：メタノール-水 (7:3)

流速：1.0 ml/min

検出波長：254 nm

4.2.2 TLCによる定性

上記条件2のHPLCに試料溶液10 μl を注入し、対象物質 (BV) のピーク保持時間付近の溶出物を分取する操作を20回繰り返した。分取した溶出液はエバポレーターを用いて溶媒を除き、残留物を少量のメタノールに溶解し、TLC用試験溶液とした。各標準溶液 (約1000 $\mu\text{g/ml}$) については特に指示がない場合4 μl , TLC用試験溶液については20 μl 以上を薄層板にスポットした。クロロホルムを展開溶媒として約12 cm展開した後、薄層板を風乾し、紫外線 (254 nm) を照射して観察後、アルカリ性ブルーテトラゾリウム試液を均等に噴霧して、得られたスポットの位置 (Rf) を比較した。

4.3 定量

試料溶液10 μ lを上記条件2のHPLCに注入し、対象物質の保持時間に相当する位置のピーク面積を求めた。対象物質の標準溶液（0.1~100 μ g/ml）を用いてあらかじめ作成しておいた検量線から、試料溶液中の濃度（ μ g/ml）を求め、試料中の含有量（%）を算出した。

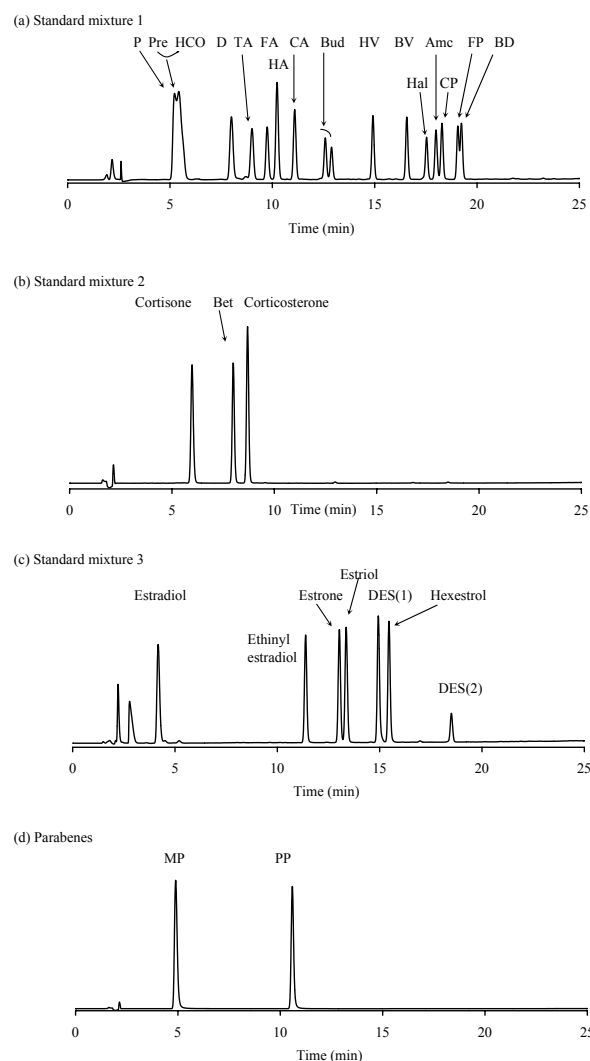


Fig. 1 HPLC chromatograms of steroids and parabens

The abbreviations used in the figure have been defined in Table 1. The chromatograms (a), (b), and (d) correspond to a methanol solution that contained approximately 100 μ g/ml of each chemical. These solutions were detected at 254 nm. The chromatogram (c) corresponds to a methanol solution that contained approximately 1000 μ g/ml of each chemical. The solution was detected at 205 nm.

HPLC conditions : column : Capcell Pak C18 UG120 (4.6 mm i.d. $\times$ 150 mm), column temperature : 40°C, mobile phase: solvent A = water, solvent B = THF (gradient time tables as mentioned in the text), flow rate : 1.0 ml/min, injection volume : 10 μ l.

結果と考察

1. HPLCによる試料中のステロイドの同定

いくつかのステロイドについては日本薬局方各条でHPLCによる定量法が収載されている³⁾。しかしながら、今回のように未知のステロイドを分析するにはそれぞれの条件で検討するには時間的に無理があり、その条件で他のステロイドが妨害しないのかについても確認する必要がある。さらに、日本薬局方に収載されていないステロイドについては、配合されていた場合、新たにHPLC条件を決定しなければならない。そこで、試料中のステロイドを定性するために、各種ステロイドが分離するHPLC条件を検討した。カラムとしてCAPCELL PAK C18 UG120を用い、移動相は水とTHFのリニアグラジエントとしたところ、今回検討したステロイドがほぼ分離する条件を設定できた。本条件における各ステロイド及びパラベン類のクロマトグラムをFig. 1に、それぞれのピークの保持時間をTable 1に示した。

エストラジオール等の卵胞ホルモンは254 nmにおける吸収がないため、205 nmでの検出が必要である。したがって、試料溶液中に卵胞ホルモンと副腎皮質ホルモ

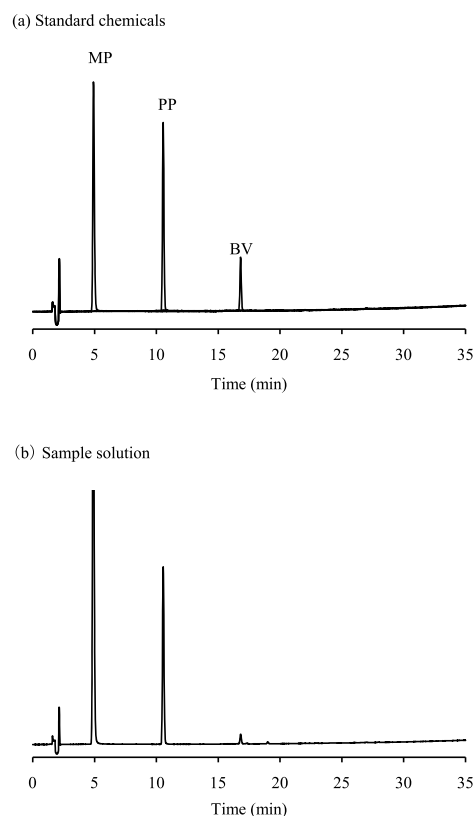


Fig. 2 HPLC chromatograms of (a) the standard chemical solution and (b) the extract from the facial cream

MP = methyl paraben, PP = propyl paraben, BV = betamethasone valerate.

The conditions during HPLC were the same as those described for Fig. 1.

Table 1 Retention time of chemicals tested

Chemical	Abbreviation	Company	Retention time (min)
β -Estradiol	Estradiol	Wako Pure Chemicals Industries, Ltd.	4.19
4-Hydroxybenzoic acid methyl ester	MP	Tokyo Kasei Kogyo	4.91
Prednisolone	P	Wako Pure Chemicals Industries, Ltd.	5.49
Prednisone	Pre	Wako Pure Chemicals Industries, Ltd.	5.54
Hydrocortisone	HCO	Wako Pure Chemicals Industries, Ltd.	5.68
Betamethasone	Bet	Wako Pure Chemicals Industries, Ltd.	5.97
Cortisone	Cortisone	Wako Pure Chemicals Industries, Ltd.	7.99
Dexamethasone	D	Wako Pure Chemicals Industries, Ltd.	8.01
Corticosterone	Corticosterone	Wako Pure Chemicals Industries, Ltd.	8.69
Triamcinolone acetonide	TA	Wako Pure Chemicals Industries, Ltd.	9.14
Fluocinolone acetonide	FA	MP Biomedicals, Inc. Ohio, USA	9.87
Hydrocortisone acetate	HA	Tokyo Kasei Kogyo	10.46
4-Hydroxybenzoic acid n-propyl ester	PP	Tokyo Kasei Kogyo	10.55
Cortisone acetate	CA	National Institute of Hygienic Sciences	11.26
Ethinylestradiol	Ethinylestradiol	Wako Pure Chemicals Industries, Ltd.	11.43
Budesonide	Bud	LKT Laboratories, Inc.	12.69 +13.02
Estrone	Estrone	Tokyo Kasei Kogyo	13.09
Estriol	Estriol	Wako Pure Chemicals Industries, Ltd.	13.44 +18.52
Diethylstilbestrol	DES	Tokyo Kasei Kogyo	14.88
Hydrocortisone 17-valerate	HV	Sigma-Aldrich, Inc.	15.08
Hexestrol	Hexestrol	Wako Pure Chemicals Industries, Ltd.	15.52
Betamethasone valerate	BV	Wako Pure Chemicals Industries, Ltd.	16.81
Halcinonide	Hal	Sigma-Aldrich, Inc.	17.74
Amcinonide	Amc	Sigma-Aldrich, Inc.	18.21
Clobetasol propionate	CP	Wako Pure Chemicals Industries, Ltd.	18.51
Flumethasone pivalate	FP	Sigma-Aldrich, Inc.	19.24
Betamethasone dipropionate	BD	Wako Pure Chemicals Industries, Ltd.	19.47

HPLC column: Capcell Pak C18 UG120 (4.6 mm i.d. $\times$ 150 mm), column temperature: 40°C, mobile phase: solvent A = water, solvent B = THF (gradient time tables as mentioned in the text), flow rate: 1.0 ml/min, detection wavelength: 254 nm, injection volume: 10 μ l.

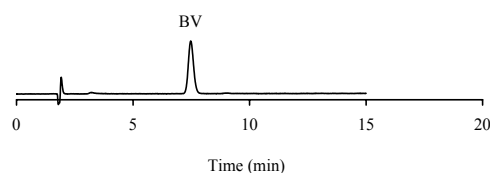
Budesonide and diethylstilbestrol had two peaks, respectively.

ンとが共存しそれらがクロマトグラフィーで類似の位置に溶出するとしても、254 nmを検出波長として選択すれば卵胞ホルモンは副腎皮質ホルモンの定量に対し妨害をしないことがわかった。Budesonide (Bud) と diethylstilbestrol (DES) はそれぞれ2本のピークが検出された。本グラジエント条件でのBVの保持時間は16.8分であった。

クリームから得た試料溶液のクロマトグラムをFig. 2に示した。主なピークは初期に出てくる大きな2本と16分付近の小さなピークであった。それぞれのピークの保持時間は約4分のものがmethyl paraben (MP) に、約11分のものがpropyl paraben (PP) に、約16分のものがBVにはほぼ一致した。クリームの配合成分の表示にはMPとPPの記載があり、これらの配合が確認できた。

次に、移動相をメタノール-水 (7:3) に変更した。MP及びPPの保持時間はそれぞれ約2.4分、3.4分、BVは約7.5分となり、試料溶液でも同様の位置にそれぞれピークが出現した (Fig. 3)。試料溶液のそれぞれのピークのUVスペクトルを観察した。保持時間7.5分のピーク (peak 3) のUVスペクトルをBV標準溶液のそれと比較したところ、両者は241 nmに極大吸収をもつ類似のスペクトラム形状を示した (Fig. 4)。

(a) Betamethasone valerate (BV)



(b) Sample solution

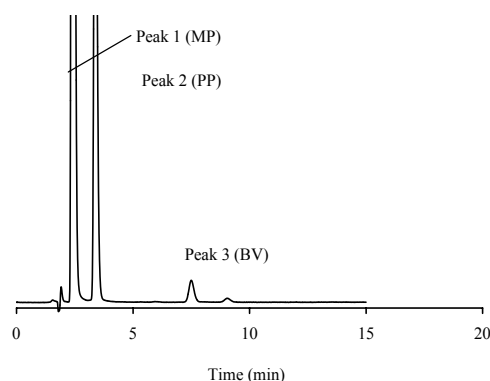


Fig. 3 HPLC chromatograms of BV and the sample solution
(a) chromatogram for a solution of 10.6 μ g/ml BV in methanol,
(b) chromatogram for a solution of approximately 1 g of cream dissolved in 10 ml of methanol.

MP = methyl paraben, PP = propyl paraben.

The mobile phase comprised methanol and water in the ratio 7:3.
The remaining HPLC conditions were as described for Fig. 1.

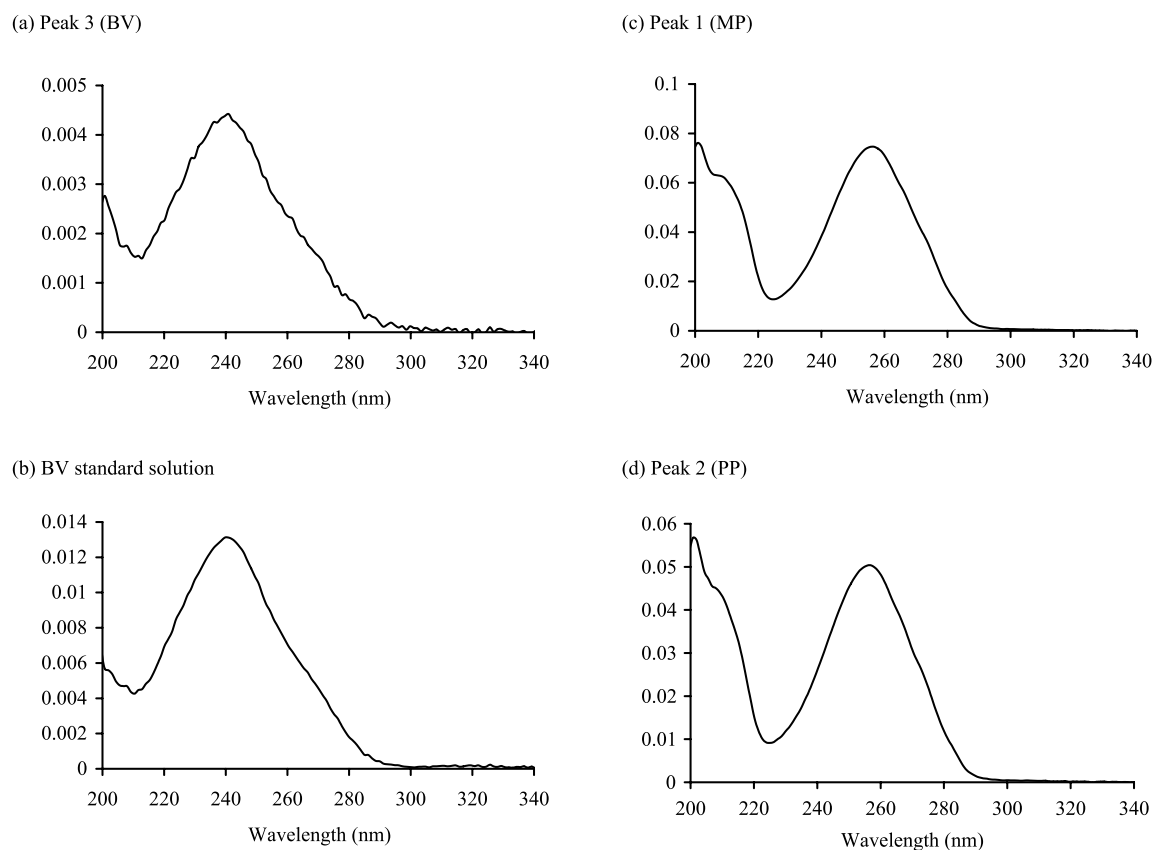


Fig. 4 Ultraviolet absorption spectra of the standard BV solution and sample solutions

Spectra (a), (c), and (d) indicate the peaks 1-3 of the sample solutions, while (b) indicates the peak of a solution of 10.6 $\mu\text{g/ml}$ BV in methanol.

The conditions during HPLC were the same as those described in Fig. 3.

2. TLCによる試料中のステロイドの同定

日本薬局方でBVの純度試験として採用されているTLCの条件³⁾によって確認を試みた。BVをクロロホルム-メタノール混液で展開したところ、BVのスポットは展開溶媒の上端付近まで上昇した。これは、修飾されたシリカゲルのTLC薄層板を用いていることが原因と思われる。そこで、展開溶媒をクロロホルムに変更して適切な位置にスポットがくるようにした。試料溶液20 μl をスポットし展開した後、ステロイド骨格に反応するアルカリ性ブルーテトラゾリウム試液を噴霧した。MP及びPPは紫外線照射で確認できるものの、アルカリ性ブルーテトラゾリウム試液で発色しなかった。同時に試験したBVをはじめとする各ステロイド標準溶液では赤紫色に発色したスポットが見られたが、試料溶液にはBVに相当する位置にスポットを確認できなかった (Fig. 5)。これは、試料溶液中のBVの濃度が検出限界以下であるためと思われる。

次に、HPLCを用いて試料溶液からBVのみを分離し、これを濃縮してTLCにスポットし確認することにした。分離に用いたHPLCの移動相はメタノール-水 (7:3) と

し、試料溶液を注入後、BVの保持時間7.5分付近のピーク (peak 3) を分画した。このTLC試験溶液でも発色は薄いもののBV標準溶液とはほぼ同位置に赤紫色のスポットが認められた (Fig. 6)。BV標準溶液のスポット量を変えてTLC試験溶液での発色の程度と同程度になるようにしたところ、スポットの位置は完全に一致した (Fig. 6)。BVを含むステロイドのTLC展開溶媒としては、クロロホルムの代わりに酢酸エチル-ジクロロメタン (1:1~1:2) が可能であり、スポットのテーリングが若干改善した。塩素系溶媒を使用しない場合は分離度が低下した (データ未掲載)。

以上、HPLCでBVの保持時間に一致するピークはTLCでもBVと一致しステロイド骨格を有することがわかった。したがって、試料には副腎皮質ホルモンのBVが配合されていたと結論した。

3. 検量線と定量

今回のクリームはTHFには完全に溶解し、メタノールにもほとんどが溶解し、遠心による沈殿物はごくわずかであった。BVはメタノールによく溶解することから、

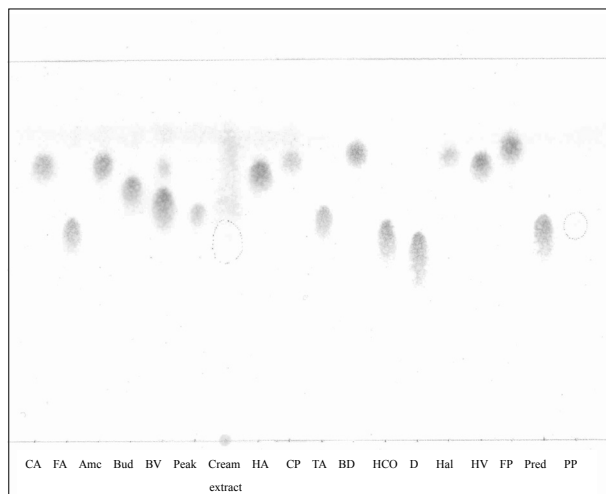


Fig. 5 Thin-layer chromatograms of the steroid and the sample solution

Cream extract : Approximately 1 g of cream was dissolved in 10 ml of methanol.

Peak: The fractionated sample from cream extract using HPLC was concentrated by evaporation. The residue was dissolved in a small amount of methanol.

Standard steroid solutions (1 mg/ml) were spotted with 4 μ l on a silica gel plate, and the cream extract and peak were spotted with 20 μ l, respectively.

The TLC plate was made of precoated silanized silica gel 60 F254 (layer thickness of 0.25 mm). Chloroform was used as the developing solvent. The developing spots were visualized by spraying them with an alkaline tetrazolium blue solution.

試料溶液にはクリーム中の全量のBVが抽出されて溶解していると考えられた。実際、試料をTHF溶液またはメタノール溶液として分析したところ、両溶液でのBVの定量値は一致した（データ未掲載）。したがって、メタノールを用いた試料溶液の調製は単なる試料の溶解と見なされることから、添加回収試験は実施しなかった。試料溶液の調製中におけるBVの安定性については検討していないが、溶液の調製からHPLCへの注入は1日中に実施していること、及び後述する検量線に問題がないことから、BVの分解は無視できると考え、試料からも十分定量的に回収できているとした。

メタノール-水 (7:3) を移動相としたHPLC条件でBVの定量を行った。BVは0.1~100 μ g/mlの濃度範囲においてピーク面積との間に良好な直線関係が認められた (Fig. 7)。本検量線を用いて試料溶液中のBVを定量したところ、購入品及び分析依頼品に0.008%~0.010%含まれていた。また、MPは平均0.119%, PPは平均0.047%含まれていた (Table 2)。

4. 違反事例への対応

化粧品中のステロイドの分析法としては、BV, hydrocortisone (HCO), dexamethasone (D) 及びtriamcinolone

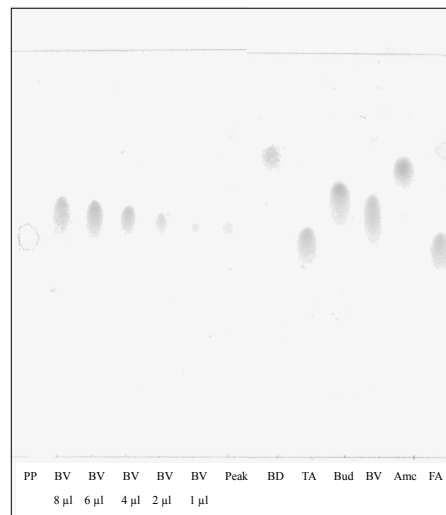


Fig. 6 The difference in the Rf values of the BV spots depended on the amount of spotting on TLC plate

Peak: Twenty μ l of the fractionated and concentrated sample solution was spotted.

BV : standard BV solutions (1 mg/ml) of different volumes that varied from 1 to 8 μ l were spotted.

The other abbreviations indicate the steroids listed in Table 1.

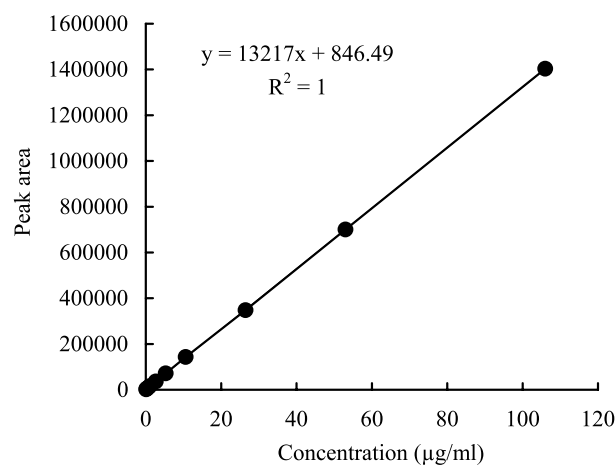


Fig. 7 Calibration curve of BV

Table 2 Concentration of chemicals in the facial cream

Cream		Concentration (%)		
		BV	MP	PP
Purchase	Exp.1	0.001	0.124	0.052
	Exp.2	0.008	0.114	0.045
Request		0.009	0.119	0.045

BV = betamethasone valerate.

MP = methyl paraben (4-hydroxybenzoic acid methyl ester).

PP = propyl paraben (4-hydroxybenzoic acid n-propyl ester).

acetone (TA) 等を対象としてpost-column誘導体化するHPLC 法がある⁴⁾。鎌田らは6種の副腎皮質ホルモンをHPLCで分析している⁵⁾。Hájkováらはクリーム中のMP、PP及びhydrocortisone acetate (HA) の分析をHPLCで行っている⁶⁾。今回、我々はより多くのステロイドを誘導体なしに分離分析できるHPLC及びTLC法を開発し、製品に適用することができた。

低濃度のtriamcinolone acetone (TA) を含有する植物性クリームはアトピー患者の炎症を低減するとの報告がある⁷⁾。同様にアトピーモデルのヘアレスマウスを用いた実験系でもdexamethasone (D) などは皮膚症状の改善は見られるものの皮膚の厚さが薄くなる副作用があり保湿剤で十分との報告もされている⁸⁾。このように、ステロイドはアトピー等皮膚の炎症症状の治療には薬剤として有効であり、今回のクリームによる患者の皮膚反応も容易に説明できる⁹⁾。化粧品成分の安全性に関してはMPやPPのようなパラベン類が懸念されているが¹⁰⁾、今回は未表示成分での健康被害の危険性があったということ、特にそれがステロイドという薬剤であったことで非常に大きな問題である。BVはステロイドの薬効強度を5段階に分けると3番目のストロングのレベルで代表的な外用剤の濃度は0.12%である⁷⁾。クリームに検出されたBVは0.008%～0.010%と外用剤に比べれば少量であり^{11,12)}、重篤な副作用が出ることはないと思われる。

今回の結果を受けてクリーム製造会社に対して立ち入り検査が行われ、押収された同じ製品にもBVが含有されていることが判明した¹²⁾。その後、クリーム中へのBVの混入の原因は、原料として納入された油脂にBVが使われていたためとわかり¹³⁾、同原料を使用した他の化粧品についても今回の試料と同様に回収指導となった¹⁴⁾。

消費者は化粧品の購入に際し、製品の成分表示や機能性等について情報を集め、雑誌やインターネット等で評判の良いものをきっかけにすることも多くなっている。インターネットショップは小規模な宣伝と体制で製品の販売ができるということから多くの業者が参入しているが、その製品の評判が販売実績に大きく影響する。化粧品成分については製造業者が自由に選択し製品に配合できることから、今回のように効果をもたせるため薬剤を加える等化粧品基準に違反するようなことが今後も起こるかもしれない。製造業者は責任を持って製品を提供することが必要である。

文 献

- 1) Notification of No.331 of Ministry of Health and Welfare (2000)
- 2) <http://www.toyama.med.or.jp/gunsi/taka/>

[iryoutisiki.com/iryoutisiki.htm#top](http://www.iryoutisiki.com/iryoutisiki.htm#top)

- 3) Ministry of Health, Labour and Welfare. The Japanese Pharmacopoeia, Fifth Edition. (2006)
- 4) Di Pietra, A.M., Andrisano, V., Gotti, R. and Cavrini, V.: *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **14**, 1191-1199 (1996)
- 5) Kamata, K., Kan, T., Yoshihara, T. and Harada, H.: *J. Toxicol. Environment. Health*, **28**, 341-345 (1982)
- 6) Hájková, R., Solich, P., Dvořák, J. and Šícha, J.: *J. Pharmaceut. Biomed. Analysis*, **32**, 921-927 (2003)
- 7) Pellanda, C., Weber, M., Bircher, A. and Surber, C.: *Dermatology*, **211**, 338-340 (2005)
- 8) Matsumoto, K., Mizukoshi, K., Oyobikawa, M., Ohshima H., Sakai, Y. and Tagami, H.: *Skin Res. Technol.*, **11**, 209-217 (2005)
- 9) A guideline for the treatment of atopic dermatitis. http://www.kyudai-derm.org/atopy/fuhyo_3.html
- 10) Prusakiewicz, J.J., Harville, H.M., Zhang, Y., Ackermann, C. and Voorman, R.L.: *Toxicology*, **232**, 248-256 (2007)
- 11) Pharmaceuticals and Medical Device Agency. <http://www.info.pmda.go.jp/kaisyuu/kaisyuu2007-2-2924.html>
- 12) Yamanashi Prefecture. http://www.pref.yamanashi.jp/pref/data_file/store_file/200803/file_1204627242828.pdf
- 13) The Sankei Shimbun & Sankei Digital. <http://sankei.jp.msn.com/life/lifestyle/080311/sty0803112048007-n1.htm>
- 14) Fukui Prefectural Government. <http://www.pref.fukui.lg.jp/doc/imu/yakumu/houdousiryoku.html> <http://www.pref.fukui.lg.jp/doc/imu/yakumu/houdousiryoku2.html>