生薬を用いた浴湯剤に関する研究 (第2報¹⁾): 黄連エキスの皮膚透過促進効果

難波恒雄,^a 関谷幸治,^a 遠子内明宏,^a 門田重利,^{*a}

畑中朋美,^b 片山和憲,^b 小泉 保^b

富山医科薬科大学 和漢薬研究所,^a 同・薬学部^b

Study on Baths with Crude Drug. II.¹⁾: The Effects of *Coptidis Rhizoma* Extracts as Skin Permeation Enhancer

Tsuneo NAMBA,^a Kouji SEKIYA,^a Akihiro TOSHINAI,^a

Shigetoshi KADOTA,^{*a} Tomomi HATANAKA,^b

Kazunori KATAYAMA^b and

Tamotsu KOIZUMI^b

Research Institute for Wakan-yaku,^a Faculty of Pharmaceutical Sciences,^b

Toyama Medical and Pharmaceutical University, 2630 Sugitani,

Toyama, 930-01, Japan

(Received March 6, 1995)

Skin permeation and its enhancing activity of *Coptidis Rhizoma* (*Coptis japonica* MAKINO) were studied in regard to its application as a bath agent. As a result, methanol extracts and three alkaloids (berberine, coptisine, and palmatine isolated from *Coptidis Rhizoma*) enhanced effectively the skin permeation of 5-fluorouracil, which is taken as a hydrophilic permeant. Furthermore, it was observed that diffusion coefficient is almost constant on the skin permeation of 5-fluorouracil and was also observed that these three kinds of alkaloids did not penetrate through the skin, but adsorbed into the skin. These results suggest that these three protoberberine type alkaloids increase the concentration of polar drugs in the skin and enhance the skin permeation similarly to surfactants.

Key words—*Coptidis Rhizoma*; berberine; coptisine; palmatine; skin permeation enhancer; bath agent

緒

言

前報では、浴湯剤に繁用される生薬の1つ、川芎の精油成分の皮膚透過及び、その皮膚透過促進効果について検討した。その結果、精油成分が皮膚透過し、精油中の *ligustilide*, *butylidenephthalide* が安息香酸 (脂溶性物質の指標) の皮膚透過を促進することを報告した。¹⁾

本報では、同様に浴湯剤に使用される黄連について検討した。黄連はキンポウゲ科のオウレン (*Coptis japonica* MAKINO) の根茎で、漢方では消炎、鎮痛、鎮静、止瀉、健胃整腸を目的として繁用されている。²⁾ また、黄連の主成分であるベルベリンには、抗菌、抗炎症作用が報告されている。^{3,4)} そこで黄連を浴湯剤として使用した場合に皮膚に対して何らかの影響を及ぼすものと推測し、黄連の主成分であるプロトベルベリン型の3種のアルカロイドについて、皮膚透過するか否かを明らかにするとともに、その皮膚透過促進効果についても脂溶性物質と水溶性物質の各モデル化合物を用いて検討した。

実 験 の 部

実験材料 生薬：黄連 (*Coptidis Rhizoma*) は *Coptis japonica* MAKINO (日本産) を栃本天海堂から購入。

試薬：コルチゾン、5-フルオロウラシルは、ナカライテスク株式会社から購入。シリカゲル C-200 は、和光純薬工業株式会社から購入し、カラムクロマトグラフィーに用いた。その他の試薬は特に指定がない限り特級試薬を用いた。

動物：Wistar 系雄性ラット 7 週齢を日本 SLC から購入した。

機器：HPLC は JASCO 880-AV で行い、JASCO 875UV で検出した。¹H-NMR スペクトルが超伝導 FT 核磁気共鳴装置 JEOL GX-400 で測定し、tetramethyl silane を内部標準に用いた。

プロトベルベリン型アルカロイドの単離 粗切り黄連 (495 g) をメタノールで加熱還流抽出を 3 回行い濾過後、減圧濃縮しエキスを得た。エキスの収量は 83.5 g であった。

アルカロイドの単離は糸川らの方法⁵⁾に従った。黄連メタノールエキス (50 g) をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、ベンゼン：酢酸エチル：*n*-プロパノール：メタノール：エチルアミン (8:4:2:1:1) の溶出溶媒を用いて、6 つのフラクションに分画した。各フラクション中のプロトベルベリン型アルカロイドの確認は、TLC を用いて展開溶媒に上記溶出溶媒を用いて標品との *R_f* 値と比較し分離を行い、コプチジン (1) (58.1 mg), ベルベリン (2) (3.4 g), パルマチン (3) (50.6 mg) を単離し、¹H-NMR によって確認した (Chart 1)。

Chart 1

皮膚透過実験 黄連メタノールエキス、コプチジン (1), ベルベリン (2), パルマチン (3) をそれぞれ 0.05% (w/v), 0.1% (w/v) の水溶液に調製し、ドナー (薬物供給) 溶液とした。アクセプター (薬物受容) 溶液は精製水を用いた。

皮膚は、ラットをペントバルビタール (50 mg/ml) 腹腔内投与による麻酔下で、腹部を除毛し、肋骨から腿部までの約 3 cm の円形で摘出後、真皮側に付着している脂肪をピンセットで除去して用いた。摘出した皮膚は、実験装置に装着するまで生理食塩水に浸しておいた。

拡散装置は、第 1 報¹⁾において使用したのと同じ Two-chamber 型垂直膜型拡散セル (東京湯島、石井商店から購入) を用いた。拡散実験は 40°C の一定条件下で行い、アクセプター側に透過する薬物量を経時的に HPLC で測定した。HPLC の測定条件は米田らの方法⁶⁾に従った。Column, ODS (4.6 mm×25 cm); mobile phase, CH₃CN:H₂O (55:45), 50 mM ドデシル硫酸ナトリウム, 37 mM 酒石酸; flow rate, 1.0 ml/min; detection UV at 340 nm; column temp., 40°C.

皮膚中アルカロイド成分の定量 コプチジン (1), ベルベリン (2), パルマチン (3) (各 0.1% 溶液) の皮膚透過実験終了後、拡散セルに装着した皮膚を採取し、皮膚中の各アルカロイド成分を定量した。採取した皮膚は蒸留水で洗浄した後、透過部位のみを切り取りメタノール

3.0 ml を加えホモジネート (Kine-matica 社, Polytron 超高速ホモジナイザー) した。遠心後 (12000 rpm, 3 min) 上清を採取し, この操作を 3 回繰り返した後, 溶媒を蒸発乾固させメタノール 0.5 ml 加え試料とした。定量は HPLC を用い, 皮膚透過実験の項に記載した条件で分析した。

皮膚透過促進実験 透過促進効果の指標として, コルチゾン (脂溶性薬物の標品) と 5-フルオロウラシル (水溶性薬物の標品) を用いた。これに黄連メタノールエキス, コプチジン (1), ベルベリン (2), パルマチン (3) をそれぞれ 0.05% (w/v), 0.1% (w/v) の濃度で水溶液として加え, ドナー側セルに 2.5 ml を添加した。

但し, コルチゾンと 5-フルオロウラシルは透過量を最大に評価するために, 懸濁状態で使用した。なお, コルチゾンの 40°C での溶解度は 0.3 mg/2.5 ml, 5-フルオロウラシルは 20.3 mg/2.5 ml であった。薬物の皮膚透過量は HPLC で測定した。コルチゾンの測定条件⁷⁾ は, column, ODS (4.6 mm×25 cm); mobile phase, CH₃CN:H₂O (30:70); flow rate, 1.0 ml/min; detection UV at 243 nm; column temp., 40°C で行い, 5-フルオロウラシルの測定条件⁸⁾ は, column, ODS (4.6 mm×25 cm); mobile phase, CH₃CN:H₂O (2:98), 0.1% リン酸 (pH 3); flow rate, 1.0 ml/min; detection UV at 265 nm; column temp., 40°C で測定した。

透過パラメータの算出 第 1 報と同様に, 皮膚を一枚膜と仮定し薬物を懸濁液の形で適用し (基剤中薬物濃度が常に一定), Fick の法則を用いて算出した。すなわち, 薬物の定常状態時の透過速度 (FLUX) は次のように表される。^{1,9-11)}

$$P = \text{FLUX} / C_s \quad (1)$$

$$D = L^2 / 6T \quad (2)$$

$$K = L \times P / D \quad (3)$$

上記の式を用いて, 拡散係数, 分配係数を算出した。

但し, C_s , ドナー溶液中薬物濃度; D , 拡散係数; L , 皮膚厚; T , ラグタイム; P , 透過係数; K , 分配係数とした。

統計処理 有意差検定は, Student's *t*-test で行った。

結 果

黄連エキス成分の皮膚透過

ドナー側に黄連メタノールエキス, コプチジン (1), ベルベリン (2), パルマチン (3) (0.05% あるいは 0.1%) を添加し, 皮膚透過成分を調べた。しかしながら, これら成分のアクセプター側への透過は認められなかった。

黄連エキス成分の皮膚透過促進効果

ドナー側に皮膚透過の指標物質として脂溶性のコルチゾン, あるいは水溶性の 5-フルオロウラシルを黄連のメタノールエキス, コプチジン (1), ベルベリン (2), パルマチン (3) と共に添加し, 皮膚透過促進効果を定常状態での皮膚透過速度と比較し検討した。

まず, コルチゾン及び 5-フルオロウラシルの皮膚透過に対する 0.1% 黄連メタノールエキスの影響を調べたところ, 5-フルオロウラシルではコントロールに比し, 有意に促進効果が認められた (Fig. 1)。

しかし, コルチゾンにおいては影響が認められなかった。次に 0.05% メタノールエキス, 及

Fig. 1. Effect of the Methanol Extract of Coptidis Rhizoma on the Penetration of (a) 5-Fluorouracil and (b) Cortisone

Fig. 2. Effect of the Methanol Extract of Coptidis Rhizoma, Coptisine (1), Berberine (2) and Palmatine (3) on the Permeation Rate of Cortisone through Rat Skin

Each value represents mean $\pm$ S.D. ($n=3$). Significantly different from control group; $*p < 0.05$.

びコプチジン (1), ベルベリン (2), パルマチン (3) (各々0.05 及び 0.1% 溶液を用いた) のモデル物質に対する影響を検討した。その結果, コルチゾンは0.1% コプチジン溶液により有意な促進効果が得られた (Fig. 2)。また, 5-フルオロウラシルでは0.05%, 0.1% 黄連メタノールエキ

Fig. 3. Effect of the Methanol Extract of Coptidis Rhizoma, Coptisine (1), Berberine (2) and Palmatine (3) on the Permeation Rate of 5-Fluorouracil through Rat Skin

Each value represents mean $\pm$ S.D. ($n=3$). Significantly different from control group; * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

ス, 0.1% コプチジン (1), 0.05%, 0.1% ベルベリン (2), 0.1% パルマチン (3) 溶液により有意な促進効果が得られた (Fig. 3).

皮膚中アルカロイド成分の定量

皮膚透過促進実験終了後, 促進効果を顕著に示したコプチジン (1), ベルベリン (2), パルマチン (3) (各 0.1% 溶液) について, 皮膚中のアルカロイド成分を測定した. その結果, コプチジン (1), ベルベリン (2), パルマチン (3) は共に抽出した皮膚中に確認された (Table 1). なお, アルカロイド成分の量は皮膚の単位体積あたりの量として示した.

透過パラメータの算出

上記のデータを拡散モデルにより解析し, 分配係数及び拡散係数を算出した. その結果, 5-フルオロウラシルの拡散係数はほぼ一定であり, 促進効果を示したものは (3) 式より算出した分配係数がコントロールに比し有意に増加することが確認された (Table 2).

Table 1. Concentration of Protoberberine Type Alkaloids in Rat Skin after Application of Donor Solutions

Donor solution	Concentration ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$)
1 (0.10%)	124 $\pm$ 14.4
2 (0.10%)	117 $\pm$ 13.0
3 (0.10%)	64.4 $\pm$ 2.8

Skin was exposed to alkaloid solutions for 10 h. Each value represents mean $\pm$ S.D. of three experiments.

考 察

今回の実験より, 黄連中のアルカロイド (コプチジン (1), ベルベリン (2), パルマチン (3)) の皮膚透過は認められなかった. 一般に皮膚における脂溶性物質の透過性は高いが, 極性物質の透過性は低いことが知られている. 本研究で用いたアルカロイドはいずれもプロトベルベリン型の陽イオン性物質であるため, 皮膚透過性が低かったものと推察される. しかし, いずれのアルカロイドも皮膚内に分布することが確認されたことは, これらアルカロイドが皮膚中の

Table 2. Partition Coefficient and Diffusion Coefficient for the Permeation of 5-Fluorouracil with Coptidis Rhizoma Extract and Three Kinds of Alkaloids

Donor site solution		Partition coefficient	Diffusion coefficient ($\times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{h}$)
Control		9.24 $\pm$ 3.18	1.31 $\pm$ 0.26
Methanol Ext. (0.05%)		17.8 $\pm$ 2.4*	1.14 $\pm$ 0.09
(0.10%)		22.1 $\pm$ 4.9*	1.11 $\pm$ 0.09
1	(0.05%)	12.4 $\pm$ 2.6	1.44 $\pm$ 0.09
	(0.10%)	32.7 $\pm$ 9.7*	1.07 $\pm$ 0.18
2	(0.05%)	16.7 $\pm$ 10.3	1.41 $\pm$ 0.47
	(0.10%)	30.8 $\pm$ 7.5*	1.24 $\pm$ 0.28
3	(0.05%)	4.91 $\pm$ 0.58*	1.88 $\pm$ 0.18*
	(0.10%)	23.7 $\pm$ 8.8*	1.13 $\pm$ 0.25

Each value represents mean $\pm$ S.D. ($n=3$). Significantly different from control group; * $p < 0.01$.

内因性成分とのイオン性の結合を通して長時間皮膚内に貯留する可能性を示唆している。¹²⁾

モデル物質の皮膚透過促進効果について、水溶性薬物の 5-フルオロウラシルの皮膚透過は 0.1% の黄連メタノールエキスで有意な促進効果が認められ、コプチジン (1)、ベルベリン (2) も同様な効果が確認されたことから、黄連中の促進物質の本体にはこれらアルカロイドが寄与すると推察される。プロトベルベリン型アルカロイドはプラス電荷を帯びた窒素原子を中心に、外側に親油性基を有することから界面活性作用を持つと考えられ、抗菌作用があることも報告されている。³⁾

なお、皮膚透過に及ぼす界面活性剤の影響は既に多くの検討が行われており、^{13,14)} 一般的に陽イオン性界面活性剤は他の界面活性剤に比べ高い促進作用を示すことが知られている。^{15,16)}

さらに Michael-Baruch らは、陽イオン性界面活性剤である塩化ベンザルコニウムが促進効果を示したことを報告している。¹⁷⁾ また塩化ベンザルコニウムや塩化ベンゼトニウムなどの陽イオン性界面活性剤は抗菌活性を示す逆性石鹼として用いられ、窒素原子にプラスの電荷を有することは周知のことである。塩化ベンザルコニウムは濃度に依存して透過係数を増加させるが、ラゲタイムの変化があまり見られないことから、拡散係数は一定であると推測される。本研究において、透過促進効果を示した黄連メタノールエキスの 0.05% 及び 0.1%、コプチジン (1) の 0.1%、ベルベリン (2) の 0.05% 及び 0.1%、パルマチン (3) の 0.1% はいずれも 5-フルオロウラシルの皮膚中の拡散係数に対して影響はなく (Table 2)、分配係数が増加し、皮膚中濃度が高まることで皮膚吸収性を向上させることが確認された。したがって、上記アルカロイド類は陽イオン性界面活性剤と機構面でも同一の機序で、透過促進をもたらすものと考えられる。

唯一、パルマチン (3) の 0.05% によって 5-フルオロウラシルの拡散係数が増加し、分配係数が減少したのは、本成分が濃度依存的な皮膚透過促進効果を示さず、0.05% でむしろ 5-フルオロウラシルの皮膚透過速度を減少させた結果によるものと考えられる。

また、本実験で用いた黄連メタノールエキス中のコプチジン (1)、ベルベリン (2)、パルマチン (3) の濃度は低く、これら 3 種のプロトベルベリン型アルカロイドの相互作用も考えられる。さらに、これらのアルカロイド以外にも数種のプロトベルベリン型アルカロイドが黄連中に存在し、²⁾ 本実験結果からコプチジン (1)、ベルベリン (2)、パルマチン (3) による 5-フルオロウラシルの皮膚透過促進効果が示唆されたことにより、他のプロトベルベリン型アルカロイド成分においても促進効果への寄与が考えられる。したがって、含有アルカロイド成分の透過

促進効果, 及びアルカロイド成分間の相互作用については今後検討する必要がある。

一方, コルチゾンについては黄連メタノールエキス, 黄連中のアルカロイドによっても有意な促進効果は認められなかった。これはコルチゾンが脂溶性で元来皮膚透過性が高いために, 黄連成分による促進効果が表れなかったものと推察される。また, 0.1% のコプチジン (1) の添加によって, 著しくコルチゾンの皮膚透過速度が増加した (Fig. 2)。さらに, 5-フルオロウラシルの皮膚透過においてもコプチジン (1) が最も高い促進効果を示した (Fig. 3)。一般的に薬物の皮膚透過経路には polar route と nonpolar route が存在し,¹⁸⁻²⁰⁾ イオンや極性の高い薬物は主に polar route を経路として透過すると報告されていることから,²⁰⁾ 5-フルオロウラシルも polar route を経て皮膚透過すると推測される。したがって, コプチジン (1) が polar route に参与することによって, コルチゾンの透過が増加したとも考えられる。また, 黄連メタノールエキスによるコルチゾンの皮膚透過において, コントロールに比し有意な差は認められなかったものの, その皮膚透過速度は増加する傾向が確認された。このことは, 先の 5-フルオロウラシルについての考察を含めプロトベルベリン型アルカロイド成分間の相互作用を示唆するものである。

以上の結果から, 黄連中に含まれるプロトベルベリン型アルカロイドは皮膚透過されず皮膚表面に吸着あるいは皮膚内に貯留し, 水溶性薬物の皮膚透過を促進するという知見が得られた。よって, 黄連を浴湯剤として使用した場合, 比較的極性の高いアルカロイドが温水中に溶出され他の生薬の水溶性薬効成分の皮膚透過性を高める可能性が示唆される。

引用文献

- 1) 難波恒雄, 関谷幸治, 門田重利, 服部征雄, 片山和憲, 小泉 保, 薬誌, **112**, 638 (1992).
- 2) 難波恒雄, “和漢薬百科図鑑 [I],” 保育社, 大阪, 1994, pp. 154—158.
- 3) 桑野重昭, 生薬, **24**, 1 (1970).
- 4) 大塚紘司, 藤村 一, 沢田徳之助, 後藤 實, 薬誌, **101**, 883 (1981).
- 5) Ikuta A., Itokawa H., *Shyoyakugaku Zasshi*, **37**, 195 (1983).
- 6) 米田諒典, 山形悦子, 宮浦雅子, 華 龍津, 水野瑞夫, 生薬, **41**, 205 (1987).
- 7) Katayama K., Takahashi O., Matsui R., Morigaki S., Aiba T., Kakemi M., Koizumi T., *Chem. Pharm. Bull.*, **40**, 3097 (1992).
- 8) Morimoto Y., Sugibayashi K., Hosoya K., Higuchi W. I., *Int. J. Pharmaceut.*, **32**, 31 (1986).
- 9) Flynn G. L., Yalkowsky S. H., Roseman T. J., *J. Pharm. Sci.*, **63**, 479 (1974).
- 10) Bret B., *J. Pharm. Sci.*, **74**, 718 (1985).
- 11) 小泉 保, “医薬品速度論,” 山名月中編, 南江堂, 東京, 1979, pp. 117—148.
- 12) Wearley L. L., Tojo K., Chienj Y. W., *J. Pharm. Sci.*, **79**, 992 (1990).
- 13) Cappel M. J., Kreuter J., *Int. J. Pharmaceut.*, **69**, 155 (1991).
- 14) Ashton P., Walters K. A., Brain K. R., Hadgraft J., *Int. J. Pharmaceut.*, **87**, 261 (1992); *idem, ibid.*, **87**, 265 (1992).
- 15) Cooper E. R., *J. Pharm. Sci.*, **73**, 1153 (1984).
- 16) Stoughton R. B., “Psoriasis,” ed. by Farber E. H., Grune and Stratton, New York, 1982, pp. 346—398.
- 17) Michael-Baruch E., Shiri Y., Cohen S., *J. Pharm. Sci.*, **83**, 1071 (1994).
- 18) Kazt M., Poulsen B. J., “Handbook of Experimental Pharmacology,” Vol. 28, ed. by Eichler

-
- O., Farah A., Herken H., Weich A. D., Academic Press, New York, 1971, pp. 103—174.
- 19) Scheuplein R. J., *J. Invest. Dermatol.*, **48**, 79 (1967).
- 20) Barry B. W., "Dermatological Formulations," Marcel Dekker, New York, 1983, pp. 95—126.