

Absorption and fate of orotic acid after topical application in different vehicles

M.C. MARTINI¹, M.F. BOBIN¹, H. FLANDIN², J. COTTE¹

1 - Laboratoire de Pharmacie Industrielle et de Technologie Parapharmaceutique 8 avenue Rockefeller 69008 Lyon France

2 - Centre de Recherche Appliquée en Dermobiochimie (C.E.R.A.D.) 51 rue Clément Marot 69007 Lyon France

Received: March 30, 1984

Key words: Orotic acid, Moisturization of the skin, Absorption orotic acid, Vehicles, Topical application

Synopsis

Orotic acid is used in topical applications in order to maintain the moisturization of the stratum corneum and epidermal layers.

In this work the rate of cutaneous absorption of orotic acid and its accumulation in organs were evaluated using three different vehicles: one W/O microemulsion, one O/W emulsion and one aqueous clear gel. The same quantity of labelled orotic acid $5\text{-}^3\text{H}$ was incorporated in each vehicle to obtain a radioactive concentration of $10\ \mu\text{Ci}/100\ \text{mg}$. The test substances were applied to the dorsal region of Sprague Dawley rats and the level of radioactivity was determined in skin, interscapular fat, muscle of the back paws, liver and kidneys, after 2, 6 and 24 hours.

At the same intervals, the distribution of radioactivity in cutaneous layers was studied in frozen section cut tangentially.

An accumulation of labelled sodium orotate in the dermal layers and then in fat and muscle was observed with the W/O microemulsion. Percutaneous absorption was more rapid from an aqueous vehicle such as an O/W emulsion or a clear gel. Nevertheless the total absorption was very small and less than 2% of the applied label was recoverable from the organs over 24 h.

Introduction

Orotic Acid (uracil-6 carboxylic acid) is present in cow and goat Lactoserum and is known as a vitamin - like substance with an antianaemic property (vitamin B₁₃). It is involved in the biosynthesis of pyridinic bases and has been used for different therapeutic assays. It has been proposed as a feed supplement, in combina-

Riassunto

L'acido orotico viene usato per applicazioni locali al fine di mantenere un buon livello di idratazione dello strato corneo e degli strati epidermici.

Nel presente lavoro si è valutato il tasso di assorbimento cutaneo dell'acido orotico e il suo accumulo negli organi usando tre differenti veicoli: una microemulsione A/O, una emulsione O/A, ed un gel trasparente. È stata incorporata in ciascun veicolo la stessa quantità di acido orotico marcato $5\text{-}^3\text{H}$ in modo da ottenere una concentrazione di radioattività di $10\ \mu\text{Ci}/100\ \text{mg}$. Le sostanze prova sono state applicate sulla regione dorsale di ratti del tipo Sprague Dawley e si è determinato il livello di radioattività della pelle, dei grassi interscapolari, del muscolo della parte posteriore della zampa, del fegato, dei reni, a 2, 6 e 24 ore dopo l'applicazione.

Agli stessi intervalli di tempo si è studiata la distribuzione della radioattività negli strati cutanei in sezioni longitudinali ottenute con un microtomo a congelamento.

Si è osservato un accumulo di orotato di sodio marcato negli strati dermici, nei muscoli e nei grassi trattati con la microemulsione A/O. L'assorbimento percutaneo si verifica più velocemente con i veicoli acquosi quali l'emulsione O/A o il gel trasparente. Tuttavia, l'assorbimento totale è stato molto debole e la quantità di sostanza marcata riscontrata negli organi dopo 24 ore è stata inferiore al 2% della quantità applicata.

Introduzione

L'acido orotico (acido uracil-6 carbossilico) è presente nel siero del latte di mucca e di capra ed è considerato una sostanza vitamino-simile avente effetto antianemico (vitamina B₁₃). Entra nella biosintesi

tion with methionine, to aid growth of calves.

However, it is also known that one per cent of orotic acid added to the diet of rats completely inhibits the synthesis of lipoproteins by the liver (1) (2).

Its effect is to maintain the moisturization of the stratum corneum and a more internal action depends on its percutaneous absorption. Limited studies have been done on its transport and distribution in the body after oral administration (3) and we have not found any paper about its cutaneous absorption.

Materials and methods

Labelled Raw Material

$5\text{-}^3\text{H}$ orotic acid with a radioactivity of 22.6 curies/mmol equ. 143 mCi/mg. was used as a saturated aqueous solution of Na orotate.

The radioactivity for each of the three vehicles was 10 $\mu\text{Ci}/100\text{ mg}$

Vehicles

Vehicles were formulated with the following ingredients.

A - W/O Microemulsion

Caprylic/capric triglycerides	54.55 g
Sodium orotate (saturated aqueous solution)	5.45 g
Polysorbate 85	25.6 g
Polysorbate 80	6.4 g
Benzyl alcohol	8.0 g

B - O/W Emulsion

Glycol palmitate	5 g
Paraffin oil	5 g
Almond oil	5 g

delle basi piridiniche ed è stato utilizzato per differenti usi terapeutici. Ne è stato anche proposto l'uso come supplemento alimentare in combinazione con la metionina per favorire la crescita dei vitelli. Tuttavia, è noto che l'aggiunta di un 1% di acido orotico nella dieta dei ratti inibisce completamente la sintesi delle lipoproteine da parte del fegato (1, 2).

Il suo effetto è quello di mantenere l'idratazione dello strato corneo, mentre l'azione sistemica dipende dal suo assorbimento percutaneo. Pochi studi sono stati condotti sul trasporto e la distribuzione nel corpo dell'acido orotico dopo somministrazione orale (3) e non ci è stato possibile trovare alcun lavoro che trattasse del suo assorbimento cutaneo.

Materiali e metodi

Materia prima marcata

L'acido orotico, marcato $5\text{-}^3\text{H}$ avente una radioattività di 22,6 curies/m.mol equivalente a 143 mCi/mg, è stato utilizzato come soluzione acquosa satura di orotato di Na.

La radioattività per ciascuno dei tre veicoli era $10\mu\text{Ci}/100\text{ mg}$.

Veicoli

Sono stati formulati con i seguenti ingredienti:

A - Emulsione A/O

trigliceridi $\text{C}_8\text{-C}_{10}$	54,55 g
Orotato di sodio (soluzione acquosa satura)	5,45 g
Sorbitan (20) OE trioleato	25,6 g
Sorbitan (20) OE monooleato	6,4 g
Alcool benzilico	8,0 g

Myreth-4 myristate	10	g
Steareth-10	4	g
Preservative	0.1	g
Sodium orotate (saturated aqueous solution)	5.45	g
Water q.s.	100	g

C - Clear Gel

Carbomer 934	1	g
Sodium orotate (saturated aqueous solution)	5.45	g
Water	90	g
Triethanolamine q.s. in order to obtain a clear gel at pH 7.2		

B - Emulsione O/A

Etilen glicol monopalmitato	5	g
Olio di paraffina	5	g
Olio di mandorle	5	g
PEG-4-Miristiletere miristato	10	g
Alcool stearilico (10) OE	4	g
Conservante	0,1	g
Orotato di sodio (soluzione acquosa satura)	5,45	g
Acqua q.b.	100	g

C - Gel chiaro

Carbossivinil polimero	1	g
Orotato di sodio	5,45	g
Acqua	90	g
Trietanolamina q.b. per ottenere un gel trasparente a pH 7,2		

Animals

Three groups of 18 male Sprague Dawley rats weighing about 300 g were used. One day before the beginning of the experiment, the hair from the dorsal region was clipped from the animals. A few minutes before spreading the test substance, the animals were constrained in order to avoid the risk of oral absorption.

Topical application

Each group received formulation A, B or C: 0.25 g of the test substance were applied homogeneously to a 14 cm² hairless area which was defined with a polyethylene cylinder. At each time 2 h, 6 h, 24 h after spreading the product, six rats were killed. The skin of the test area, liver, kidneys, interscapular fats, and back paw muscles were collected and analysed.

Treatment of organs and tissues samples

Each sample was wiped clean of excess blood and then cut in thin pieces. The sample (40-50 mg) was weighed in liquid scintillation flasks, dissolved in 1 ml of

Animali

Sono stati utilizzati tre gruppi di 18 ratti maschi del tipo Sprague-Dawley del peso di circa 300 gr. ciascuno. Un giorno prima dell'esperimento è stata rasata la regione dorsale degli animali. Pochi minuti prima di distribuire la sostanza in esame si è adattato agli animali un sistema di contenzione per evitare il rischio di assorbimento orale.

Applicazione locale

A ciascun gruppo è stato applicato uno dei composti, A, B, o C; 0,25 gr. della sostanza in esame sono stati applicati omogeneamente su una zona priva di peli di 14 cm² preventivamente definita per mezzo di un cilindro in polietilene. La pelle, della zona studiata, il fegato, i reni, i grassi interscapolari e il muscolo della parte posteriore della zampa sono stati poi prelevati ed analizzati.

Soluene 350 (Packard) and put in a drying chamber at 40° C during 180 h. After cooling, 15 ml of scintillant liquid was added to the digested tissue and the radioactivity was evaluated with a liquid scintillation system.

Treatment of the skin

The skin was cut from dermal to epidermal layers with a freezing microtome in order to obtain tangential sections. The sections (40 µm thick) were prepared in Solouene-350 in a drying chamber at 40° C for 18 h, ACSAmersham liquid was added and the sections were counted.

Results

Total skin

Two hours after topical application of the test substance, the level of radioactivity in the total skin was 50% of the initial quantity for the three vehicles. After 24 h the level of the radioactivity was still high. (Table I- Fig. 1).

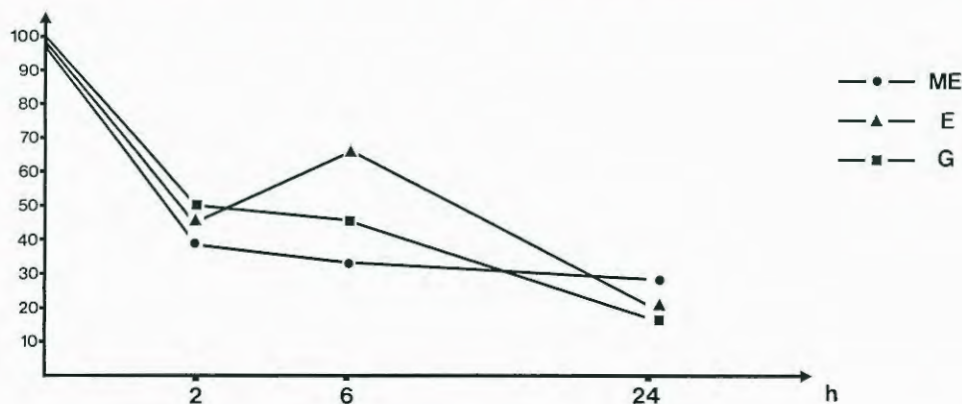


Fig. 1: Rate of radioactivity found in total skin in comparison to applied quantity.

Trattamento degli organi e dei tessuti

Ciascun campione, dopo essere stato tagliato in pezzi sottili, è stato pulito al fine di eliminare l'eccesso di sangue. Il campione (40-50 mg) è stato pesato direttamente in un contenitore per scintillazione liquida, dissolto in 1 ml di Soluene-350 (Packard) e mantenuto a 40° C per 18 ore. Dopo raffreddamento, si sono aggiunti 15 ml. di liquido per scintillazione al tessuto digerito e si è valutata la radioattività con il sistema a scintillazione liquida.

Trattamento della pelle

La pelle è stata tagliata lungo gli strati che vanno dal derma all'epidermide con un microtomo a congelamento per ottenere delle sezioni longitudinali. I campioni (40 µm di spessore) sono stati digeriti a gruppi di cinque con Soluene-350 in una camera a secco a 40° C per 18 ore; si è aggiunto il liquido ACS-Amersham ed è stata eseguita la conta.

Fig. 1: Grado di radioattività riscontrato nella cute in rapporto alla quantità di prodotto applicato.

Table I
Labelled orotic acid (in μCi) found in one gram of total skin
 (Applied quantity: $8.3 \mu\text{Ci/g}$ of skin)

Vehicle	2h	Time 6h	24h
W/O Microemulsion	3.5 ± 0.74	3.06 ± 0.75	2.3 ± 0.52
O/W emulsion	3.85 ± 1.6	5.17 ± 1.85	1.72 ± 0.41
Aqueous gel	4.09 ± 2.76	3.9 ± 1.52	1.15 ± 0.32

Distribution between Dermis and Epidermis

The distribution of sodium orotate into dermal and epidermal layers was different for each of the three vehicles even if the quantities recovered from the total skin were about the same (Fig. 2).

With the W/O microemulsion, 60% of labelled orotate was retained in the epidermal layers over the first hours of experiment. After 6 and 24 h there was only 40% of the labelled substance in the epidermal layers and 60% in the dermal layers.

With the O/W emulsion, cutaneous absorption of orotate seemed to be enhanced. Accumulation in the dermal layers was quick important (65% at the first hour) and remained the same for 6 hours. The level decreased by the 24th hour probably because of diffusion to the underlying tissues.

By contrast, the cutaneous absorption of orotate was slower with the clear gel; at all times, the quantities of labelled substance were always higher in the epidermal than in dermal layers.

Tissues and organs

Radioactivity in organs was very low in relation to the amount initially applied but it increased from 0.2 to 2% in 24 hours (Table II)

Accumulation in the liver and kidneys

Risultati

Pelle totale

Due ore dopo l'applicazione locale della sostanza in esame, il livello di radioattività della cute intera era pari al 50% della quantità iniziale per tutti e tre i veicoli. Dopo 24 ore, il livello di radioattività era ancora alto (Tabella I - Figura 1).

Distribuzione Derma-Epidermide

La distribuzione di orotato di sodio negli strati del derma e dell'epidermide era differente per ciascuno dei tre veicoli anche se le quantità rilevate nella pelle «in toto» erano quasi le stesse (Figura 2).

Con la microemulsione A/O, durante le prime ore dell'esperimento, veniva trattenuto negli strati dell'epidermide il 60% di orotato marcato. Dopo 6 e 24 ore soltanto il 40% della sostanza marcata risultava presente negli strati dell'epidermide, e il 60% negli strati del derma.

L'emulsione O/A sembra favorire l'assorbimento cutaneo dell'orotato. La quantità assorbita negli strati del derma ha raggiunto subito un livello significativo (65% nella prima ora) ed è rimasto allo stesso livello per sei ore. Il livello è diminuito alla ventiquattresima ora probabilmente a causa di una diffusione negli strati di tessuto sottostanti.

Al contrario, con il gel trasparente l'as-

reached a peak 6 hours after the cutaneous application in the O/W emulsion or the clear gel, but not until 24 hours after application in the W/O microemulsion. The more interesting finding was that the accumulation of the labelled substance in fats and muscles occurred very quickly and at a five times higher level when the vehicle was the W/O microemulsion.

Discussion

After oral administration, orotic acid appears in the blood, the liver, the kidney in 3 to 6 hours. After 24 hours, there was no more orotic acid in the kidney tubules (3). Percutaneous absorption seems also to be very rapid from aqueous vehicles such as a clear gel or an O/W emulsion. The water soluble active substance is transported easily through the capillary flow.

The situation is different when sodium

sorbimento cutaneo di orotato è stato più lento; la quantità di sostanza marcata rilevata negli strati dell'epidermide è risultata sempre più alta di quella presente negli strati del derma.

Tessuti ed organi

Negli organi, la radioattività è risultata molto debole in confronto alla quantità di sostanza marcata applicata localmente all'inizio dell'esperimento ma è aumentata dallo 0.2 al 2% in 24 ore (Tabella II). L'accumulo nel fegato e nei reni è risultato molto alto 6 ore dopo l'applicazione cutanea dell'emulsione O/A e con il gel trasparente, ma solo 24 ore dopo l'applicazione della microemulsione A/O. È interessante osservare come l'accumulo di sostanza marcata nei grassi e nei muscoli sia avvenuto molto rapidamente e sia cinque volte più alto quando si utilizzano l'emulsione O/A ed il gel al posto

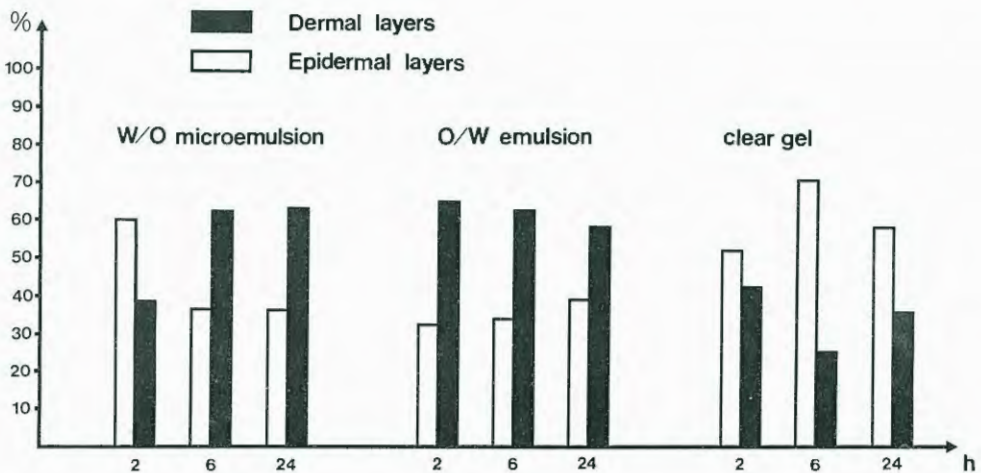


Fig. 2: Distribution of orotic acid in dermal and epidermal layers from different vehicles. (The radioactivity is evaluated as a percentage of quantity found in total skin).

Fig. 2: Distribuzione dell'acido orotico negli strati dermici ed epidermici con diversi veicoli.

Table II
Radioactivity (counts/min) for 1 gram of tissue or organ

Vehicle	Tissue or Organ	2h	6h	24h
W/O Microemulsion	Liver	3932 ± 562	9816 ± 1448	26000 ± 5407
	Kidney	6154 ± 1898	8918 ± 1350	10108 ± 1770
	Fats	22027 ± 3176	11969 ± 2540	20587 ± 3681
	Muscle	28188 ± 4375	7851 ± 1889	10579 ± 4643
O/W Emulsion	Liver	2844 ± 758	18176 ± 4875	20177 ± 4372
	Kidney	4570 ± 691	16129 ± 3043	17364 ± 4760
	Fats	5849 ± 1119	16022 ± 2678	16616 ± 3618
	Muscle	3568 ± 638	19284 ± 6531	18504 ± 5070
Clear Gel	Liver	12414 ± 4360	20912 ± 5778	14557 ± 3030
	Kidney	6565 ± 1064	23407 ± 6080	17968 ± 3816
	Fats	6059 ± 1326	23818 ± 5432	19756 ± 4150
	Muscle	4958 ± 899	14355 ± 3116	19981 ± 4391

orotate is incorporated into a W/O microemulsion. In this case, the water soluble substance is enclosed inside the micromicelles and realises a new active liposoluble material. This could explain the fast and durable accumulation of salified orotic acid in fats.

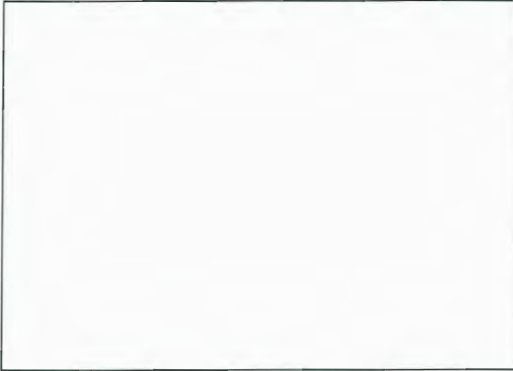
Thus, the penetration of orotic acid into cutaneous layers is faster from aqueous vehicles such as O/W emulsion or clear gel. A W/O microemulsion leads to a slow diffusion with accumulation of the active substance in the dermal layers because of its slow resorption. In any case, the percutaneous absorption of orotic acid is very weak and its accumulation in organs in 24 hours is less than 2% of the applied quantity.

della microemulsione A/O.

Discussione

Dopo somministrazione orale, l'acido orotico appare nel sangue, nel fegato e nei reni in un tempo che va da 3 a 6 ore. Dopo 24 ore, non si riscontra più presenza di acido orotico nei tubuli renali (3). L'assorbimento percutaneo, inoltre, sembra molto veloce con veicoli acquosi quali un gel trasparente o una emulsione O/A. La sostanza attiva solubile in acqua viene trasportata facilmente attraverso il sistema capillare.

Diversamente avviene quando l'orotato di sodio viene incorporato in una microemulsione A/O. In questo caso la sostanza, solubile nell'acqua, viene racchiusa dentro le micromicelle e diviene un nuovo materiale attivo liposolubile. Questo potrebbe spiegare il fenomeno di accumulo veloce e duraturo nei grassi dell'acido orotico salificato.



In conclusione, la penetrazione di acido orotico negli strati cutanei è più veloce quando esso viene incorporato in un veicolo acquoso quale una emulsione O/A o un gel trasparente. Una microemulsione A/O porta ad una diffusione lenta con un accumulo della sostanza attiva negli strati del derma a causa di un lento riassorbimento. Tuttavia, l'assorbimento percuteaneo dell'acido orotico è molto debole ed il suo accumulo negli organi in 24 ore è più basso del 2% della quantità totale applicata.

REFERENCES

1. Rajaram O.V., Fatterpaker P, Sreenivasan A. (1974). Involvement of lipoproteins in the absorption and transport of α -tocopherol in the rat *Biochem. J.* **140**, 509-516.
2. Windmueller H.G., Levy R.I., (1967): Total inhibition of hepatic β -lipoprotein production in the rat by orotic acid *J. Biol. Chemistry* **242**, 2246-2254
3. Chen Ch., Su H.S., (1961): Histochemical study on orotic acid. *The J. of Vitaminology* **7**, 309-316.

