

Zur perkutanen Resorption von Diäthylammoniumsalicylat und Salicylsäure- β -Hydroxiäthylester

R. Schäfer / D. Schäfer / W. Schäfer

Chemisches Institut Schäfer AG, Oberwil (Schweiz)

Die perkutane Resorption von Diäthylammoniumsalicylat und Salicylsäure- β -hydroxiäthylester in einem Schaumbad wurde mit den radioaktiv markierten Wirkstoffen in Tierversuchen gemessen. Die gefundenen Werte zeigten, daß bei dem getesteten Schaumbad in der angegebenen Verdünnung für ein Vollbad von 0,04% (\cong 40 μ g Salicylsäurederivate/ml im Bad) eine beachtliche Penetration von Salicylsäure ($102,4 \pm 4,1$ ng/ml Blut) nachgewiesen wurde. Der applizierte Salicylsäureester wurde nach der Resorption quantitativ zu Salicylsäure hydrolysiert und als solche im Blut nachgewiesen. Die schlechteren Penetrationswerte von Diäthylammoniumsalicylat ($16,8 \pm 1,2$ ng/ml Blut) waren zu erwarten, da Salze der Salicylsäure schlechtere Penetrationseigenschaften besitzen als die entsprechende freie Säure oder die Salicylsäureester.

1. Einleitung

Als ein Mittel bei Polyarthritiden acuta, hochfieberiger Polyarthritiden, subakuter Polyarthritiden, chronischer Polyarthritiden, Arthrosis deformans, Ischias, Lumbago, Muskelrheumatismus und Sehnenentzündungen gelten die Salicylsäure und ihre Derivate (Salicylsäureester) [18]. Heute werden Derivate der Salicylsäure als Natriumsalicylat oder Acetylsalicylsäure (Aspirin) per os 5 bis 7 g täglich verabreicht, um rasch das Fieber zu senken, Schmerzen zu lindern und Schwellungen zu reduzieren. Große perorale Dauerdosen werden jedoch oft vom Patienten schlecht vertragen, da Nebenwirkungen wie Übelkeit, Erbrechen, Ohrensausen nicht unbeträchtlich sind [18]. Aus diesem Grunde wurden als Ergänzung topische Darreichungsformen der Salicylsäure und ihrer Derivate in Form von Salben und Badezusätzen entwickelt.

Bereits durch länger zurückliegende Arbeiten ist bekannt, daß die freie Salicylsäure [2, 9, 12, 13, 19] und ihre Ester, speziell der Salicylsäure- β -hydroxiäthylester [2, 3, 4, 8, 12, 15], durch ihre Lipophilie eine relativ gute Permeation durch die äußere Haut aufweisen.

Ausgedehnte Versuche zeigten, daß die Beigabe von chemischen Reizmitteln oder Hyperämisierungsmitteln wie Capsicumextrakt, Campher, Chloroform oder Nikotinsäurebenzylester in Salben die Resorption von Salicylsäure oder Salicylsäureester durch die Haut wesentlich steigern [4, 9, 15]. Als physikalisches Reizmittel der Haut kommt heißes Wasser in Frage, was den Einsatz der Salicylsäure und ihrer Derivate in der Balneo-

The percutaneous resorptions of diethylammonium salicylate and salicylic acid- β -hydroxiethylester as constituent of a foam bath were measured on animals using radioactively labeled ingredients. The percutaneous resorption of the salicylic acid ester was high (blood level = 102.4 ± 4.1 ng/ml blood) when compared with the total concentration of the two salicylic acid derivatives in the used bath solution which was 40 μ g/ml. After percutaneous resorption the used salicylic acid ester was hydrolysed quantitatively into salicylic acid. The low blood levels of diethylammonium salicylate (16.8 ± 1.2 ng/ml blood) were expected because of the much lower percutaneous resorption of salts of salicylic acid as compared with free salicylic acid or salicylic acid esters.

therapie in Form wirksamer Badezusätze interessanter erscheinen läßt.

Wir haben uns von den genannten Fakten ausgehend die Aufgabe gestellt, die in der Klinik beobachtete Wirksamkeit von Salicylsäure-haltigen Badezusätzen [18] durch Resorptionsstudien im Tierversuch mittels radioaktiv markierter Salicylsäureverbindungen quantitativ zu analysieren. Als Maß der perkutanen Resorption analysierten wir die Blutspiegelwerte von Salicylsäure und Salicylsäure- β -hydroxiäthylester an der Ratte.

2. Material und Methoden

Das verwendete Schaumbad* weist folgende Zusammensetzung auf:

100 g Schaumbad enthalten:

5,00 g	Salicylsäure- β -hydroxiäthylester
5,00 g	Diäthylammoniumsalicylat
1,00 g	Campher
4,00 g	Ol. Pini silvestris
0,372 g	Liquor Ammonii caustici
ad 100,00 g	Schaumgrundlage

In dieser Zusammensetzung übernehmen Campher und Ol. Pini silvestris die hyperämisierende Wirkung, was eine der Grundbedingungen für eine gesteigerte perkutane Resorption darstellt [9].

* Contrheuma-Schaumbad; W. Spitzner, Arzneimittelfabrik GmbH, Ettlingen/Baden

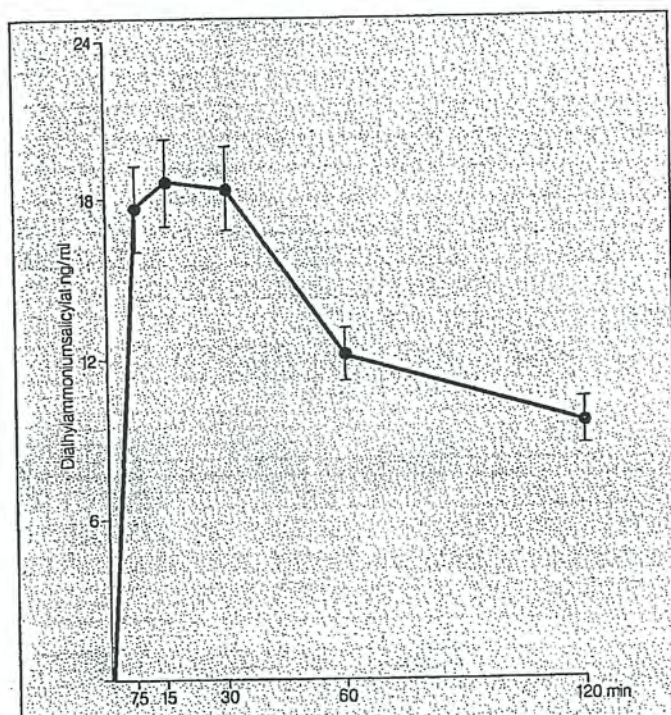
R. Schäfer et al., Zur perkutanen Resorption von Diäthylammoniumsalicylat und Salicylsäure- β -Hydroxiäthylester

2.1 Radioaktive Markierung von Diäthylammoniumsalicylat und Salicylsäure- β -hydroxiäthylester

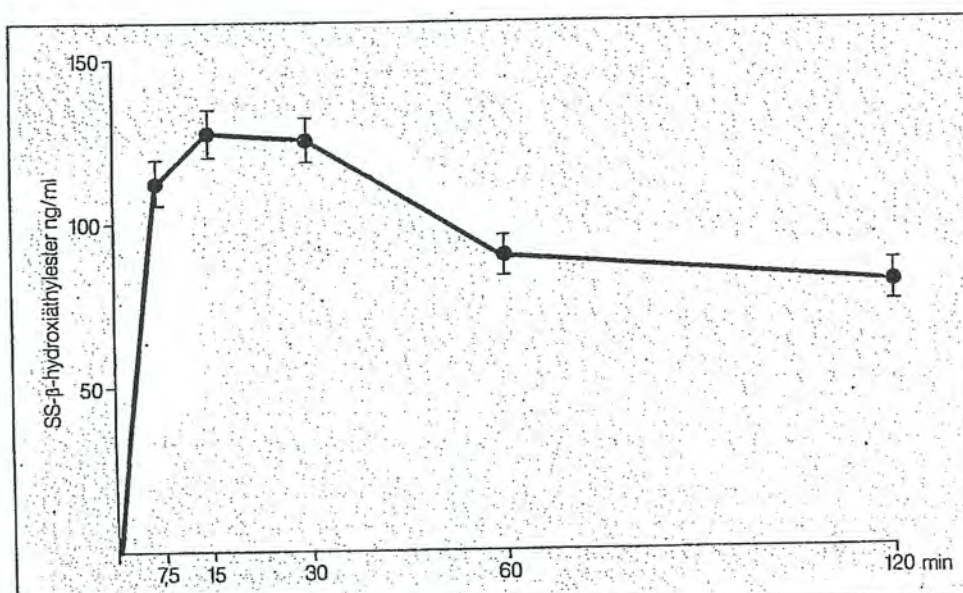
Die beiden angeführten Wirkstoffsubstanzen aus dem Contrheuma-Schaumbad wurden wie folgt radioaktiv markiert.

2.1.1 (carboxyl- ^{14}C)-Salicylsäure (50 mCi/mMol, Radiochemical Center, Amersham) wurde mit einer äquivalenten Menge Diäthylamin neutralisiert.

2.1.2 0,02 mMol Salicylsäure- β -hydroxiäthylester wurden in absolutem Alkohol gelöst und in Gegenwart eines Austauschkatalysators über einer trägerfreien Tritiumgasatmosphäre ($50 \text{ Ci}^3\text{H}_2$) unter Rühren in einem geschlossenen Glasgefäß während 48 Stunden bei Zimmertemperatur markiert (Austausch kovalenter C-H-Atome).



a



b

Nach Entfernen des radioaktiven Tritiumgases und des größten Teils des Alkohols wurde das Gemisch auf eine präparative Silicagel-G-Platte aufgetragen und mit dem Laufmittel Benzol/Methanol/Essigsäure = 45:8:4 chromatographiert. Nach erfolgter Radioautographie für 12 Stunden wurde der radioaktive Fleck mit einem Rf-Wert von 0,81, welcher dem Salicylsäure- β -hydroxiäthylester entspricht (dies wurde mit unmarkierter Substanz auf der gleichen Platte evaluiert), von der DC-Platte abgekratzt und die reine, markierte Substanz durch Chloroformextraktion vom Silicagel isoliert. Durch die Reinigung wurden radioaktive Zerfallsprodukte vom Ester abgetrennt. Die spezifische Aktivität des gereinigten Salicylsäure- β -hydroxiäthylesters betrug 85 mCi/mMol.

2.2 Badeansätze

13,8 μg ($5 \mu\text{Ci} \approx 1,1 \cdot 10^7 \text{ dpm}$) (carboxyl- ^{14}C)-Salicylsäurediäthylammoniumsalz und 18,2 μg ($8,5 \mu\text{Ci} \approx 1,83 \cdot 10^7 \text{ dpm}$) (^3H)-Salicylsäure- β -hydroxiäthylester wurden mit 2 μl (= 2 mg) Badekonzentrat zusammen in 5 ml deionisiertem Wasser verdünnt. Gemäß der Rezeptur des verwendeten Schaumbades enthalten die 5 ml Badewasser total 113,8 μg Diäthylammoniumsalicylat und 118,2 μg Salicylsäure- β -hydroxiäthylester. Diese Verdünnung entspricht einem normalen Schaumbadanatz mit einem Gehalt von 0,04% an Badekonzentrat entsprechend 40 ml auf 100 l Wasser, welches der Applikationskonzentration gleichkommt.

2.3 Perkutane Resorptionsstudien

Insgesamt 18 männliche Wistar-Ratten (45 g Nüchtern-Körpergewicht, Futterentzug 20 Stunden vor Versuchsbeginn bei Verbleib von Wasser ad libitum) wurden auf dem Rücken rasiert und depiliert. Danach kamen sie in Halterungsröhrchen mit externer Luftzufuhr, in die von oben herab auf die rasierte Stelle ein Zylinder mit abschließender Silikonweichdichtung gespannt wurde, der mit einem ebenfalls gasdichten Deckel versehen war. Der Zylinder hatte eine Grundfläche von 6 cm^2 , und dementsprechend besaß die Permeationsfläche auf

Abbildungen 1a und 1b Blutkonzentrationen der perkutan resorbierten Salicylsäurederivate zu verschiedenen Zeiten während des Bad-Haut-Kontaktes. Die Hautresorptionsfläche betrug 6 cm^2 ($n = 3$). Mittelwerte \pm Standardfehler. SS = Salicylsäure

R. Schäfer et al., Zur perkutanen Resorption von Diäthylammoniumsalicylat und Salicylsäure- β -Hydroxiäthylester

der rasierten Rattenhaut die gleiche Größe. Die Systemtemperatur betrug konstant 37 °C.

Durch Vorversuche ($n = 3$) wurde ermittelt, in welcher Zeit nach Badapplikationsbeginn maximale Werte von (carboxyl- ^{14}C)-Salicylsäurederivat und (^3H)-Salicylsäurederivat im Blut meßbar waren. Nach Einfüllen des Wassers (5 ml) mit den markierten Komponenten der kompletten Badkombination wurden nach 7,5, 15, 30, 60 und 120 Minuten während des Bad-Haut-Kontaktes 50 μl Blut aus der Schwanzvene entnommen und die Gesamtradioaktivität durch Flüssigkeitszintillationsmessung bestimmt. Der Standardfehler betrug 9% für das ^{14}C -markierte Salicylsäurederivat und 6% für das Tritium-markierte Salicylsäurederivat.

In der Hauptversuchsserie (experimentelle Anordnung wie oben beschrieben) wurde, zur Zeit der maximalen Blutspiegelwerte der Salicylsäurederivate, 15 Tieren je 0,5 ml Blut entnommen. Zur Bestimmung des Standardfehlers wurde jeder Blutprobe ein 20- μl -Aliquot zur Messung der Gesamtradioaktivität abgezweigt. Er betrug 7% für das ^{14}C -markierte Salicylsäurederivat und 4% für das Tritium-markierte Salicylsäurederivat. Die vereinigten Blutproben (7,5 ml) wurden mit 0,5 mg unmarkiertem Diäthylammoniumsalicylat und 0,5 mg unmarkiertem Salicylsäure- β -hydroxiäthylester, 30 ml Wasser und 10 ml konzentrierter Salzsäure versetzt. Danach wurde das Gemisch fünfmal mit je 25 ml Chloroform/ n -Butanol = 9:1 für jeweils 10 min extrahiert. Nach diesem Procedere wurden 97,3% der Gesamtradioaktivität aus der wäßrigen Phase extrahiert. Die vereinigten Chloroform/Butanol-Auszüge wurden mit Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel durch Vakuumdestillation quantitativ entfernt. Der Rückstand wurde in wenig Alkohol aufgenommen und auf DC-Platten aufsteigend chromatographiert.

Träger: Präparative DC-Fertigplatten Kieselgel 60_{F254}
 Fließmittel: Benzol/Methanol/Essigsäure = 45:8:4
 Laufzeit: 75 min
 Trennstrecke: 12 cm
 Rf-Werte: Salicylsäure : 0,68
 Salicylsäure- β -hydroxiäthylester : 0,81

Nach 6tägiger Radioautographie wurden die Flecken mit einem Rf-Wert von 0,68 resp. 0,81 quantitativ von der DC-Platte entfernt und deren Radioaktivität quantitativ durch Szintillationsmessungen bestimmt. Die gemessenen Werte sind aufgezeichnet in Nanogramm Substanz/ml Blut, was aus der gemessenen Radioaktivität nichtmetabolisierter Isotope (deshalb die chromatographische Auftrennung) mit der spezifischen Aktivität der markierten Komponente berechnet wurde (unter Berücksichtigung der Verdünnung der Aktivität mit der im Bad entsprechend nichtmarkierten Substanz). Alle Resultate sind als arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler angegeben. Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe des t-Tests nach Student [16].

3. Ergebnisse und Diskussion

Die Vorversuche ergaben, daß der qualitative Verlauf

der perkutanen Resorption von Diäthylammoniumsalicylat (Abb. 1a) und Salicylsäure- β -hydroxiäthylester (Abb. 1b) ähnlich war. Bereits nach 7,5 min Resorptionszeit betrug die Blutkonzentrationen von Diäthylammoniumsalicylat 94,6% (= 17,6 ng/ml Blut) und von β -Hydroxiäthylester 89,1% (= 114 ng/ml) der maximalen Wirksubstanzwerte im Blut. Letztere wurden nach 15 min erreicht und fielen über 2 Stunden auf 51,6% (Diäthylammoniumsalicylat) bzw. auf 64% (β -Hydroxiäthylester) ab (Abb. 1a und 1b).

Im Unterschied zu Bädern mit anderen Substanzen, z.B. Terpenen [17], scheint der Depoteffekt der Haut, bedingt durch die geringere Lipophilie, größer zu sein, so daß noch Stunden nach dem Bad Salicylsäurederivate aus der Haut an das Blut abgegeben werden. Dadurch liegt die Halbwertszeit für diese Salicylsäurederivate weit über 120 min, während sie für Terpene (bei gleicher Hautresorptionsfläche von 6 cm²) nur 15 bis 30 min beträgt. In Badversuchen am Menschen wurden für Salicylderivate ähnliche Halbwertszeiten von etwas über 2 Stunden gefunden [5, 7, 14].

Basierend auf den Vorversuchen, führte man an 15 Tieren die Blutentnahme 15 min nach Badapplikation durch. Nach der sauren Extraktion der markierten Wirkstoffe aus den vereinigten Blutproben wurden 97,3% der Gesamtradioaktivität in der organischen Lösungsmittelpphase gefunden. Nach erfolgter Chromatographie und Radioautographie konnte nur ein einziger radioaktiv markierter Fleck auf der Dünnschichtplatte identifiziert werden, welcher die Tritium- und ^{14}C -Isotope enthielt und mit Salicylsäure den gleichen R_F-Wert aufwies. Aus diesen Ergebnissen kann der Schluß gezo-

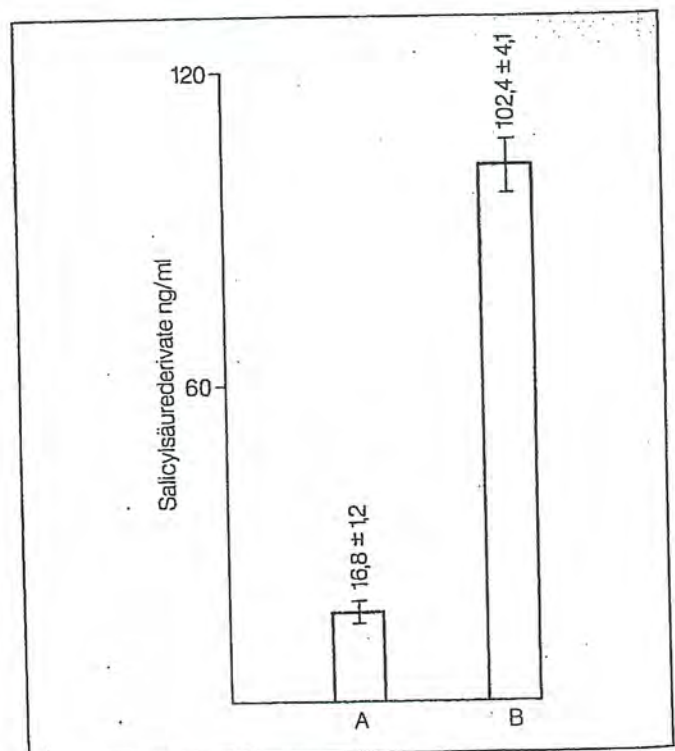


Abbildung 2 Blutkonzentrationen von Diäthylammoniumsalicylat (A) und Salicylsäure- β -hydroxiäthylester (B) nach 15 min Bad-Haut-Kontakt. Hautresorptionsfläche: 6 cm²; Mittelwerte \pm Standardfehler von $n = 15$

gen werden, daß 15 min nach Badapplikation der Ester quantitativ zur Salicylsäure gespalten wurde.

Geht man davon aus, daß der Blutspiegel der Wirkstoffe ein Maß für die perkutane Resorption ist, so ergibt sich folgendes Bild: Der β -Hydroxiäthylester der Salicylsäure (Abb. 2) penetriert wesentlich besser durch die Haut (102,4 ng/ml Blut) als Diäthylammoniumsalicylat (Abb. 2) (16,8 ng/ml Blut). Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch andere Autoren (Zusammenfassung in [7]).

Da der Ester während der Resorption quantitativ zur Salicylsäure hydrolysiert wird, stellt dieses Derivat für die topische Applikation die idealere Form dar als Salze der Salicylsäure [1, 6, 10, 11]. Der Blutwert der Salicylsäure ist bezüglich der applizierten Badkonzentration (40 μ g Salicylsäurederivate/ml Bad) relativ hoch, wenn man aus diesem Experiment den Gesamtgehalt bei einem Tiervollbad (120 cm²/Ratte) und der Totalmenge Blut (4 ml/Ratte) extrapoliert. Der Blutspiegel an Salicylsäure wäre nach 15 min 9,5 μ g pro Tier bzw. 2,4 μ g/ml Blut.

Die hier untersuchten Derivate der Salicylsäure werden im Tierversuch schnell resorbiert und lassen auch den in der Literatur [8] aufgewiesenen möglichen Rückschluß zu, daß bei der Anwendung am Patienten ein ähnlich rasches Resorptionsverhalten stattfindet. Als

begleitende Therapie im rheumatischen Formenkreis, ohne die bekannten gastrointestinalen Nebenwirkungen, wäre dann solch eine Salicylsäure-Badanwendung als sinnvoll anzusehen.

Danksagung

Dank gebührt der Firma W. Spitzner, Arzneimittelfabrik GmbH, Ettlingen, welche durch ihre großzügige finanzielle Unterstützung die Durchführung der Versuche ermöglicht hat.

Literatur

- [1] Arita T., R. Hori, T. Anmo, M. Washitake, M. Akatsu, T. Yajima: Chem. Pharm. Bull. 18, 1045 (1970)
- [2] Benzinger T., R. Wyrsh: Klin. Wschr. 44, 1734 (1933)
- [3] Brown E. W., W. O. Scott: J. Pharmacol. exp. Ther. 50, 373 (1934)
- [4] Cöppicus H.: Orthopäd. Praxis 11/8, 588 (1975)
- [5] Drexel H.: Therapiewoche 30 (43), 7013—7023 (1980)
- [6] Hanano M.: Chem. Pharm. Bull. 7, 300 (1959)
- [7] Hangarter W.: Die Salicylsäure und ihre Abkömmlinge. Schattauer, Stuttgart — New York 1974
- [8] Impens E.: Arch. Physiol. 120, 1 (1907)
- [9] Kionka H.: Klin. Wschr. 34, 1570 (1931)
- [10] Kionka H.: Klin. Wschr. 10, 1570 (1931)
- [11] Loveday D. E.: J. Soc. Cosmet. Chem. 12, 224 (1961)
- [12] Moncorps C.: Arch. exp. Path. u. Pharm. 163, 377 (1931)
- [13] Nothmann M., M. Wolff: Klin. Wschr. 8, 302 (1933)
- [14] Pratzel H.: Arch. Dermatol. Res. 264, 124 (1979)
- [15] Pütter J.: Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 11, 1721 (1970)
- [16] Sachs L.: Angewandte Statistik, 4. Aufl., Springer, 1974
- [17] Schäfer D., W. Schäfer: Pinimenthol-Bad-Arbeit (im Druck)
- [18] Schneider H.: Dissertation der Med. Fak. der Uni Heidelberg 1940
- [19] Schulze W., K. Reiff: Arch. klin. exper. Dermatol. 205, 53 (1957)