

VERGLEICH VON VERTEILUNG, NARKOTISCHER WIRKSAMKEIT UND METABOLISCHER ELIMINATION DER OPTISCHEN ANTIPODEN VON METHYLPHENOBARBITAL*†

H. BÜCH, W. BUZELLO, O. NEUROHR und W. RUMMEL

Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität des Saarlandes,
Homburg, Deutschland

(Received 20 June 1968; accepted 24 July 1968)

Abstract—Contrary to the optical antipodes of hexobarbital ($-$)-methylphenobarbital is a more potent anaesthetic than its ($+$)-isomere. However, ($+$)-methylphenobarbital is more readily taken up by brain tissue than its ($-$)-antipode and also, as observed with hexobarbital, the demethylation of the ($+$)-antipode is preferably enhanced by induction with phenobarbital. Hence, the differences in anaesthetic effectiveness of the optical isomeres of barbiturates are not necessarily related to their different patterns of distribution and metabolic inactivation.

N-ALKYLIerte Barbitursäuren, die wie Methylphenobarbital und Hexobarbital an C-5 zwei verschiedene Substituenten haben, sind Racemate. Die Racematspaltung über die diastereomeren *N*-Methylchininiumsalze gelang KNABE und Mitarb. bei einer Reihe von Barbiturat en, u.a. auch bei Hexobarbital und Methylphenobarbital.^{2, 3}

($+$)-Hexobarbital erwies sich im Tierversuch bei Hoffmeister,⁴ Wahlström⁵ und in eigenen Untersuchungen^{6, 7} mehrfach stärker narkotisch wirksam als ($-$)-Hexobarbital. Als mögliche Ursachen sind neben einer unterschiedlichen Verteilung der optischen Antipoden auch Unterschiede ihrer metabolischen Elimination zu diskutieren. Für Hexobarbital wurde bereits festgestellt, daß der stärker narkotisch wirksame ($+$)-Antipode anders verteilt und rascher metabolisch inaktiviert wird als der ($-$)-Antipode.^{6, 7}

In analogen Versuchsreihen mit ($+$)- und ($-$)-Methylphenobarbital wurde nun geprüft, inwieweit auch bei diesem Barbiturat stereospezifische Unterschiede hinsichtlich der narkotischen Wirksamkeit, der Verteilung und der metabolischen Elimination bestehen.

METHODE

Die Versuche wurden an 140–180 g schweren weiblichen Wistar-Ratten durchgeführt. ($+$)- und ($-$)-Methylphenobarbital wurden entweder in eine Schwanzvene (Injektionsdauer 5 sec.) oder ip. verabreicht. Zur Herstellung der Injektionslösungen wurden ($+$)- bzw. ($-$)-Methylphenobarbital mit äquimolaren Mengen NaOH

* Ein Teil der Ergebnisse wurde auf der 9. Frühjahrstagung der Deutschen Pharmakologischen Gesellschaft, Mainz 1968, vorgetragen.¹

† Für die Überlassung der optischen Antipoden der beiden Barbiturate sind wir Herrn Prof. J. Knabe und den Farbenfabriken Bayer zu Dank verpflichtet.

versetzt und in physiologischer Kochsalzlösung gelöst. Je nach Dosierung enthielten die Lösungen 0,5–1,5 % des jeweiligen Antipoden. Die spezifische Drehung $[\alpha]_D^{20}$ der verwendeten Isomere betrug beim Hexobarbital $+11,9^\circ$ bzw. $-12,2^\circ$ und beim Methylphenobarbital $+9,3^\circ$ bzw. $-9,0^\circ$.

Zur Prüfung der narkotischen Wirksamkeit wurde die Zeit vom Beginn der Injektion bis zur Toleranz der Seitenlage (Einschlafzeit) und die Dauer der Seitenlage (Schlafdauer) gemessen.

Zum Studium der Verteilung wurde die Konzentration von Methylphenobarbital nach Gabe der optischen Antipoden in Serum, Gehirn und Leber bestimmt. Als Maß für die metabolische Elimination diente jeweils die Konzentration von Methylphenobarbital und seinem Demethylierungsprodukt in Serum und Leber nicht induzierter und induzierter Tiere. Zur Induktion wurden den Ratten an 4 aufeinanderfolgenden Tagen je 75 mg/kg Phenobarbital ip. injiziert.

Durch das Einhalten einer Pause von 72 Stunden nach der letzten Phenobarbital-Injektion war sichergestellt, daß bei Gabe der Barbiturat-Isomere kein Phenobarbital mehr zu erfassen war.

Nach Entbluten durch Herzpunktion wurde das Organ-material entnommen, gewogen und bei -30°C bis zur Analyse eingefroren.

Isolierung der Barbiturate aus dem Serum

1–2 ml Serum wurden mit M/15 Phosphatpuffer (pH 5,0) auf ein Volumen von 2,5 ml aufgefüllt und 2 mal mit 10 ml Äther 10 min geschüttelt. Die Ätherphasen wurden in 50 ml fassende Zentrifugengläser (\varnothing 30 mm) überführt und bei 40°C im Wasserbad abgedampft. Der Rückstand wurde mit einem Gemisch aus Aceton und Äther (1 : 1) gelöst und auf die Dünnschichtplatte aufgetragen.

Isolierung der Barbiturate aus Gehirn bzw. Leber

Das gesamte Gehirn bzw. 1,5–2 g Leber wurden mit 7 ml 0,2 M Tris-Puffer (pH 8,0) in der Kälte homogenisiert und 15 min bei 20000 g zentrifugiert. Das Sediment wurde erneut mit 6 ml Puffer geschüttelt und noch einmal zentrifugiert. Die vereinigten Überstände wurden nach Ansäuern mit 0,2 ml 5 n HCl 2 mal mit je 50 ml Chloroform 2 min ausgeschüttelt. Danach wurden die Chloroformphasen vereinigt, durch Papierfilter in Rundkolben überführt und abgedampft. Aus den Rundkolben wurden die Rückstände mit 3 mal 2 ml Äther in Reagenzgläser überführt. Nach Abdampfen des Äthers bei 40°C im Wasserbad wurde der Rückstand in 0,3 ml Methanol gelöst und das Reagenzglas verschlossen. 0,1 bzw. 0,15 ml dieser Lösung wurden quantitativ auf die Dünnschichtplatte aufgetragen.

Chromatographische Trennung und Bestimmung

Verwendung fanden nach der Methode von Stahl⁸ mit Kieselgel GF₂₅₄ (Merck) beschichtete Dünnschichtplatten. Als Fließmittel diente ein Gemisch aus Isopropanol/Chloroform/33 % Ammoniaklösung (60/30/10). Die Referenzsubstanzen Methylphenobarbital und Phenobarbital wurden als 0,2 %-ige methanolische Lösungen aufgetragen.

Die beiden Barbiturate erscheinen im uv-Licht auf der fluoreszierenden Kieselgelschicht als dunkle Flecken. Der R_f -Wert beträgt für Methylphenobarbital 0,67 und für Phenobarbital 0,50. Für die Bestimmung wurde das Kieselgel der betreffenden

Zonen abgelöst und mit 4,0 ml 0,1 n NaOH eluiert. Nach Abzentrifugieren des Kieselgels erfolgte die photometrische Messung des klaren Überstandes. Hierzu wurde für Methylphenobarbital die Extinktion bei 245 m μ und für Phenobarbital bei 250 m μ gegen einen analog gewonnenen Plattenleerwert bestimmt ($d = 1$ cm Spektralphotometer PQM II Zeiss).

ERGEBNISSE

Narkotische Wirksamkeit

Nach iv. Applikation von 25 mg/kg Methylphenobarbital nehmen nur die Ratten Seitenlage ein, die das (–)-Isomere erhalten haben (Abb. 1). Sie verlieren sofort ihre Stell- und Haltere reflexe für 2–3 Minuten. Beim Hexobarbital erwies sich unter gleichen Versuchsbedingungen der (+)-Antipode als der wirksamere. Zum Vergleich wurden die früher schon veröffentlichten mit Hexobarbital gewonnenen Ergebnisse in die Abbildungen nochmals mitaufgenommen.

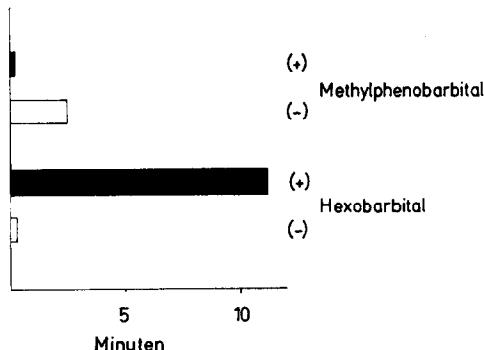


ABB. 1. Dauer der Seitenlage nach iv. Applikation von (+)- bzw. (–)-Methylphenobarbital und (+)- bzw. (–)-Hexobarbital (25 mg/kg) Angegeben sind Mittelwerte aus mindestens 10 Einzelversuchen. Nach (+)-Methylphenobarbital und (–)-Hexobarbital trat nur in einem Teil der Fälle Seitenlage und dann für weniger als 20 Sekunden ein.

$$\begin{array}{ll} \text{Standardabweichung f\"ur (–)-Methylphenobarbital} & \pm 1,2 \text{ min} \\ (+)-\text{Hexobarbital} & \pm 2,4 \text{ min.} \end{array}$$

Nach iv. 75 mg/kg Methylphenobarbital bewirkt das (–)-Isomere für 4–5 Stunden Seitenlage (Tab. 1). Nach Gabe der (+)-Verbindung fallen die Tiere nicht um, sondern sie sind bis zu 30 Minuten erregt. Später werden sie bei erhaltenen Stell- und Haltere reflexen schlaftrig, sie können aber geweckt werden.

Auch nach ip. Gabe von 100 mg/kg wird zwischen den Isomeren ein analoger Wirkungsunterschied beobachtet (Tab. 1).

Verteilung zwischen Serum, Gehirn und Leber

Das Verteilungsmuster 3 Minuten nach iv. Injektion von Methylphenobarbital (25 bzw. 75 mg/kg) und Hexobarbital (25 mg/kg) ist in Abb. 2 dargestellt.

Nach iv. Gabe von 75 mg/kg (+)-Methylphenobarbital liegt die Konzentration des Methylphenobarbitals im Gehirn rund 50% höher als im Serum. Bei gleicher Dosierung des (–)-Antipoden hingegen unterscheiden sich die Konzentrationen in Serum und Gehirn nicht voneinander. Im Serum ist die Methylphenobarbital-Konzentration nach Gabe des (–)-Antipoden höher als nach der gleichen Dosis des (+)-Antipoden

TABELLE 1. NARKOTISCHE WIRKSAMKEIT VON (+)- UND (-)-METHYLPHENOBARBITAL

		75 mg/kg iv.	100 mg/kg ip.
(+)	Einschlafzeit*		keine narkotische
(+)	Schlafdauer†		Wirkung
(-)	Einschlafzeit*	sofort	2-3 min
(-)	Schlafdauer†	4-5 Std.	>5 Std.

* Zeit vom Beginn der Injektion bis zur Toleranz der Seitenlage.

† Dauer der Seitenlage.

In jeder Gruppe wurden mindestens 8 Einzelversuche durchgeführt.

($P < 0,005$). Im *Gehirn* hingegen ist die Methylphenobarbital-Konzentration nach Verabfolgung des (+)-Isomeren höher als nach der gleichen Dosis des (-)-Isomeren ($P < 0,01$). Die Konzentration in der *Leber* ist nach Verabreichung des (+)-Isomeren 2,7 mal und nach Gabe des (-)-Isomeren 2,0 mal höher als im Serum. Die absoluten Konzentrationen in der Leber liegen für beide Isomere gleich hoch.

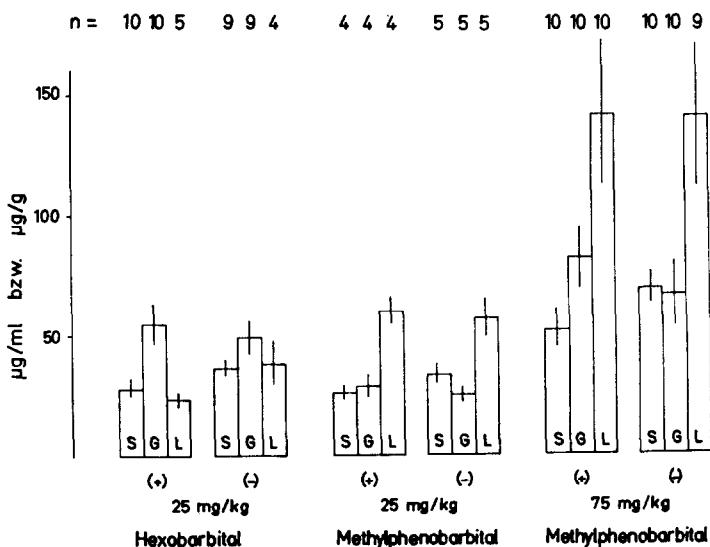


ABB. 2. Barbiturat-Konzentration in Serum (S), Gehirn (G) und Leber (L) 3 Minuten nach iv. Applikation von (+)- bzw. (-)-Methylphenobarbital und (+)- bzw. (-)-Hexobarbital.

Senkt man die Methylphenobarbital-Dosis auf 25 mg/kg iv., dann bleibt das Verteilungsmuster im Prinzip erhalten. Diese Werte können mit denen des Hexobarbitals, das iv. nicht höher dosiert werden konnte, direkt verglichen werden (Abb. 2): Bei beiden Fällen liegt die Konzentration im *Serum* nach Gabe des (-)-Isomeren höher als nach Applikation der (+)-Verbindung. Auch bei dieser Dosis wird die

höchste Konzentration an Methylphenobarbital in der Leber gefunden. Sie ist mehr als doppelt so hoch im Vergleich zu der Konzentration im Serum. Bemerkenswert ist, daß bei Hexobarbital eine derartige Anreicherung in der Leber nicht stattfand. Die Konzentration der (–)-Verbindung lag hier allerdings höher als nach Gabe des (+)-Isomeren. Es bestand jedoch beim Hexobarbital in beiden Fällen kein Unterschied zwischen der Konzentration in Serum und Leber.

Beim Hexobarbital fand sich die höchste Konzentration im Gehirn. Im Vergleich zum Serum lag die Konzentration im Gehirn nach Gabe des (+)-Isomeren 2 mal höher und nach Gabe des (–)-Isomeren 1,3 mal höher. Beim Methylphenobarbital liegt die Barbiturat-Konzentration nach Applikation der (+)-Verbindung im Gehirn ebenfalls geringfügig über derjenigen nach Applikation der (–)-Verbindung. Nur bei (+)-Methylphenobarbital ist nach 3 Minuten Konzentrationsausgleich zwischen Gehirn und Serum eingetreten. Der Quotient Konzentration im Gehirn/Konzentration im Serum liegt bei 1,1, während er nach (–)-Methylphenobarbital nur 0,7 erreicht.

Demnach wird von beiden Barbituraten jeweils die (+)-Verbindung, bezogen auf die Konzentration im Serum, ins Gehirn bevorzugt aufgenommen.

Die zeitliche Abhängigkeit der Verteilung des (+)- und (–)-Methylphenobarbitals wurde nach 75 mg/kg iv. untersucht (Abb. 3). Die Barbiturat-Konzentration liegt im Serum nach Gabe des (+)-Isomeren während der Beobachtungszeit um durchschnittlich 15–20 % niedriger als nach Verabreichung des (–)-Isomeren. Auffällig ist die außerordentlich langsame Abnahme der Serumkonzentration. Die Konzentrationen in der Leber unterscheiden sich nach 3 Minuten (Abb. 2) und nach 60 Minuten (für

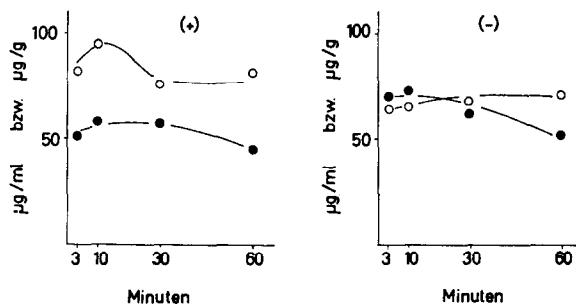


ABB. 3. Verlauf der Methylphenobarbital-Konzentration im Serum (●—●) und im Gehirn (○—○) nach iv. Gabe von 75 mg/kg (+)- bzw. (–)-Methylphenobarbital.

	Standardabweichung							
	3		10		30		60 Min.	
	(+)	(–)	(+)	(–)	(+)	(–)	(+)	(–)
Serum (µg/ml)	±8 P < 0,005	±7	±7 P < 0,05	±11	±8	±9	±4 P < 0,005	±5
Gehirn (µg/g)	±13 P < 0,01	±14	±5 P < 0,001	±17	±6	±11	±12 P < 0,01	±10
n	10	10	8	10	9	10	10	9

(+) = 145 ± 15 und für (–) = $128 \pm 13 \mu\text{g}/\text{g}$ Leber) nicht wesentlich voneinander. Der Unterschied zwischen den Werten für das Gehirn ist hingegen bis zu 10 Minuten nach Applikation statistisch gesichert. Nach 3 Minuten ist hier die Methylpheno-

barbital-Konzentration nach Applikation des (+)-Isomeren um mehr als 20%, nach 10 Minuten sogar um mehr als 45% höher. Bezogen auf die zugehörige Serumkonzentration wird (+)-Methylphenobarbital in der Beobachtungszeit um durchschnittlich mehr als das 1,5-fache im Gehirn angereichert. Demgegenüber liegt nach Gabe des (-)-Isomeren die Methylphenobarbital-Konzentration im Gehirn nur 60 Minuten nach der Injektion höher als im Serum.

Metabolische Elimination

Die Konzentration des Methylphenobarbital in Serum und Leber bei nicht induzierten und induzierten Ratten 10 Minuten nach ip. Verabfolgung von 100 mg/kg (+)- bzw. (-)-Methylphenobarbital sind in Tab. 2 wiedergegeben. Bei nicht induzierten Tieren ergaben sich weder für die Konzentrationen im Serum noch in der

TABELLE 2. METHYLPHENOBARBITAL-KONZENTRATION IN SERUM UND LEBER 10 MINUTEN NACH IP. GABE DES (+)- BZW. (-)-ISOMEREN

Die p-Werte für die Unterschiede beim (+)-Isomeren zwischen induzierten und nicht induzierten Ratten bzw. für die Unterschiede zwischen (+)- und (-)-Methylphenobarbital bei den induzierten Tieren sind jeweils <0,005.

Methylphenobarbital	nicht induziert		induziert*	
	(+)	(-)	(+)	(-)
µg/ml im Serum	72 ± 10 n = 10	84 ± 12 n = 10	54 ± 7 n = 10	80 ± 12 n = 10
µg/g in der Leber	154 ± 21 n = 9	152 ± 23 n = 11	112 ± 13 n = 9	153 ± 20 n = 10

* Induktion: An 4 aufeinanderfolgenden Tagen je 75 mg/kg Phenobarbital ip.; danach 72 Stunden Pause bis zur Methylphenobarbital-Gabe.

Leber nennenswerte Unterschiede. Die Induktion hatte nur beim (+)-Isomeren eine Abnahme der Barbituratkonzentration in Serum und Leber um 25% zur Folge, während sich beim (-)-Isomeren nichts an den Verhältnissen änderte.

Das Resultat der quantitativen Bestimmung des *Phenobarbital*s, des Produktes der oxydativen Demethylierung, das nur bei den induzierten Ratten 10 Minuten nach

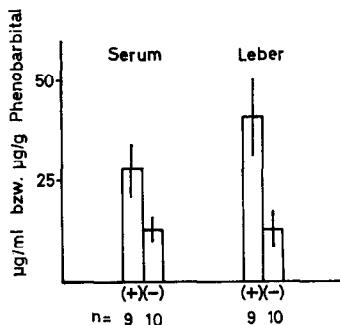


ABB. 4. Phenobarbital-Konzentration in Serum und Leber 10 Min. nach ip. 100 mg/kg (+)- bzw. (-)-Methylphenobarbital bei induzierten Ratten (Induktion s. Tab. 2 bzw. method. Teil).

Applikation in meßbarer Konzentration in Serum und Leber auftritt, ist besonders aufschlußreich (Abb. 4). Die Konzentration des Demethylierungsproduktes ist im Serum nach Gabe von (+)-Methylphenobarbital mehr als doppelt und in der Leber mehr als dreimal so hoch wie nach Gabe des (-)-Isomeren.

DISKUSSION

Die unterschiedliche Wirksamkeit von (+)- und (-)-Antipoden ist bei pharmakologisch hochwirksamen Aminen und ihren Antagonisten sehr geläufig. Für optisch aktive Barbiturate wurden derartige stereospezifische Unterschiede erstmals von Gibson⁹ nachgewiesen.

Es wird allgemein angenommen, daß für die unterschiedliche Wirksamkeit von optischen Isomeren die verschiedengradige, räumliche Entsprechung zwischen den Molekülen dieser Pharmaka und den Rezeptoren verantwortlich ist. Es gibt viele Indizien für die Richtigkeit dieser geläufigen Hypothese (Lit. s. bei 10). Bis vor kurzem fehlte aber, soweit zu sehen, ein so elementares Beweisstück wie die stereospezifische Verteilung von optischen Antipoden im Tier.^{11 7}

Wenn wie bei Hexobarbital der wirksamere Antipode gleichzeitig bevorzugt im Gehirn angereichert wird, dann ist man versucht, eine ursächliche Beziehung zwischen Verteilung und Wirksamkeit herzustellen. Die Tatsache aber, daß bei Methylphenobarbital im Gegensatz zum Hexobarbital nicht der (+)-, sondern der (-)-Antipode das narkotisch wirksamere Isomere ist—obwohl wie beim Hexobarbital auch beim Methylphenobarbital wiederum die (+)-Verbindung vom Gehirn bevorzugt aufgenommen wurde—lehrt eindeutig, daß hier kein ursächlicher Zusammenhang besteht.

Das gleiche gilt für den zweiten, theoretisch naheliegenden Versuch, die stärkere Wirksamkeit eines optischen Antipoden in ursächliche Beziehung zu seiner eventuell langsameren metabolischen Inaktivierung zu setzen.¹¹ Bei beiden Barbituraten wird das (+)-Isomere schneller in der Leber abgebaut als die (-)-Verbindung. Demnach ist bei Methylphenobarbital zufällig der weniger leicht inaktivierbare (-)-Antipode auch gleichzeitig der wirksamere, während beim Hexobarbital diese, einer derartigen theoretischen Erwartung entsprechende Kongruenz nicht existiert.

Besonders beachtenswert erscheint die Feststellung, daß zwischen Methylphenobarbital und Hexobarbital eine Übereinstimmung hinsichtlich der bevorzugten Anreicherung des (+)-Antipoden im Gehirn einerseits und seiner Inaktivierung in der Leber andererseits besteht, während bei Hexobarbital die (+)- und bei Methylphenobarbital die (-)-Verbindung die narkotisch wirksamere Form ist. Die Frage, welche sterischen Voraussetzungen für eine derartige Umkehrung bei so nahe verwandten Molekülen verantwortlich sind, erscheint besonders faszinierend. Erste Versuche mit den beiden von Knabe synthetisierten optischen Isomeren eines Hexobarbitalhomologen,¹² dessen Methylgruppe an C-5 gegen eine Äthylgruppe ausgetauscht wurde, ergaben bereits, daß es zu einer Umkehrung hinsichtlich der Wirksamkeit kommt, d.h. daß bei diesem Barbiturat wie beim Methylphenobarbital der (-)-Antipode narkotisch viel wirksamer als die (+)-Verbindung ist.¹³

Es ist zu erwarten, daß es gelingt, durch systematische chemische Abwandlung dieser Barbituratmoleküle an C-5 die Gesetzmäßigkeiten der Beziehung zwischen der räumlichen Struktur und der narkotischen Wirksamkeit zu erfassen.

Zammenfassung—Im Gegensatz zu den Verhältnissen bei Hexobarbital ist bei Methylphenobarbital der (–)-Antipode stärker narkotisch wirksam als der (+)-drehende. Auch bei Methylphenobarbital wird der (+)-gegenüber dem (–)-Antipoden bevorzugt vom Gehirn aufgenommen und nach Induktion mit Phenobarbital bevorzugt demethyliert. Die unterschiedliche Verteilung und metabolische Inaktivierung optischer Barbiturat-Isomere kann nicht zur Erklärung ihrer unterschiedlichen narkotischen Wirksamkeit herangezogen werden.

LITERATUR

1. H. BÜCH, W. RUMMEL, W. BUZELLO und O. NEUROHR, *Arch. exp. Path. Pharmak.*, **260**, 99 (1968).
2. J. KNABE und R. KRÄUTER, *Arch. Pharmaz.* **298**, 1 (1965).
3. J. KNABE und K. PHILIPSON, *Arch. Pharmaz.* **299**, 231 (1966).
4. F. HOFFMEISTER, Farbenfabriken Bayer AG, Elberfeld, persönl. Mitteilung (1966).
5. G. WAHLSTRÖM, *Life Sci.* **5**, 1781 (1966).
6. H. BÜCH, W. RUMMEL und U. BRANDENBURGER, *Arch. exp. Path. Pharmak.* **257**, 270 (1967).
7. W. RUMMEL, U. BRANDENBURGER und H. BÜCH, *Med. Pharmac. exp.* **16**, 496 (1967).
8. E. STAHL, *Dünnenschichtchromatographie*. Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1962).
9. W. R. GIBSON, W. J. DORAN, W. C. WOOD and E. E. SWANSON, *J. Pharmac. exp. Ther.* **125**, 23 (1959).
10. A. H. BECKETT, *Fortschritte d. Arzneimittelforsch* (Ed. E. JUCKER), vol. I, p. 455. Birkhäuser Verlag, Basel und Stuttgart (1959).
11. K. SCHMID, W. RIESS and H. KEBERLE, *Isotopes in experimental Pharmacology* (Ed. LLOYD J. ROTH), p. 383. University of Chicago Press, Chicago and London (1965).
12. J. KNABE, D. STRAUSS und C. URBAHN, unveröffentlicht.
13. Eigene unveröffentlichte Befunde (1968).