

RECHERCHE DE LA CAUSE DE L'INACTIVITE DE L'HYDROXPENTOBARBITAL

P. ALLAIN, P. CAILLEUX, G. LEBLONDÉL, A. PREMEL-CABIC et A. CAILLEUX

Laboratoire de Pharmacologie C.H.U., 49036 Angers, France

(Received 26 August 1974; accepted 11 February 1975)

Abstract—Hydroxypentobarbital, the major metabolite of pentobarbital, given to animals in high doses has no hypnotic properties. This fact could be explained by lack of entry into brain from blood or by true inactivity in spite of entry into brain.

The study of concentration of hydroxypentobarbital in liver and brain measured by gas chromatography after an administration of a high dose (800 mg/kg intraperitoneally) has shown that penetration in brain is slow and in addition that even when its concentration in brain is high (190 µg/g), hydroxypentobarbital is inactive as an hypnotic.

Dickert *et al.* [1] ont montré que l'hydroxypentobarbital, reconnu comme le principal métabolite du pentobarbital, est dénué d'effet hypnotique même à doses très élevées. Cette absence d'effet hypnotique de l'hydroxypentobarbital peut s'expliquer soit par un passage insuffisant dans le cerveau, soit par une inactivité réelle en dépit du passage dans le cerveau.

En étudiant l'évolution du taux d'hydroxypentobarbital dans le cerveau après administration d'une dose élevée, nous nous proposons de répondre à cette question.

METHODES

Nous envisagerons la synthèse et le dosage de l'hydroxypentobarbital avant de décrire l'expérimentation animale proprement dite.

Synthèse de l'hydroxypentobarbital. La synthèse a été effectuée d'après la méthode de Dickert *et al.* [1] en apportant toutefois une modification en vue d'améliorer la rapidité et le rendement de l'hydrogénéation catalytique: une pression de 50 atm a été utilisée au lieu de 3 atm; la réduction est alors complète au bout de 12 h. Les structures des différents produits ont été vérifiées au moyen des spectres infra rouge et r.m.n.

Dosage du pentobarbital et de l'hydroxypentobarbital par chromatographie en phase gazeuse. Aussitôt prélevés, le foie et le cerveau des souris sont plongés dans l'azote liquide, pesés et conservés à -20° jusqu'au moment du dosage.

1° **Préparation de l'échantillon à chromatographier.** L'organe prélevé est broyé dans une solution aqueuse de tungstate de sodium à 20% (3 ml pour le cerveau et 5 ml pour le foie). On introduit dans l'homogénat ainsi obtenu une solution étalon de méthohexital (50 µl d'une solution aqueuse de méthohexital à 0,3 mg/ml dans le cas du cerveau et 100 µl à 0,9 mg/ml dans le cas du foie).

La défécation est achevée par adjonction d'acide sulfurique (5 ml de H_2SO_4 0,66 N pour le cerveau et 5 ml de H_2SO_4 1,33 N pour le foie). Après centrifugation pendant 5 min à 3000 t/min, le surnageant est extrait par 10 ml d'éther. L'extrait éthéral est évaporé

à sec et méthylé à 57° pendant 4 min par 0,1 ml de sulfate diméthylé en présence de 2 ml d'une solution méthanolique à 10% d'eau saturée en carbonate de potassium.

L'excès de méthanol est évaporé et les barbituriques sont extraits deux fois par 1 ml d'hexane en présence de 1 ml de tampon acétate pH 6. Après évaporation de l'hexane, le résidu est repris par 100 µl de BSTFA et porté à l'étuve à 70° pendant 15 min. Après refroidissement, on injecte 1 µl de la solution

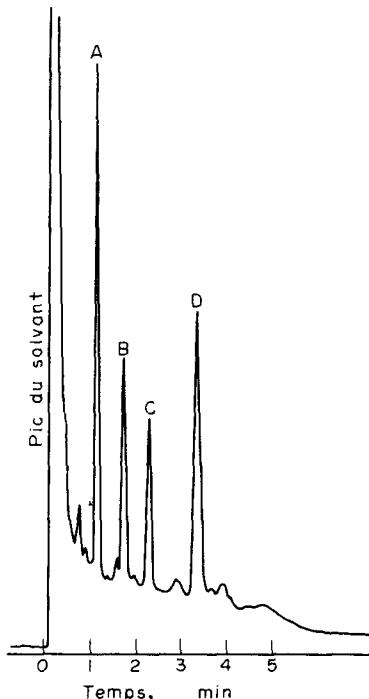


Fig. 1. Analyse chromatographique du pentobarbital et de l'hydroxypentobarbital dans le foie d'une souris. Pics: A, pic de l'ionol, stabilisateur ajouté à l'éther d'extraction; B, pic de pentobarbital; C, pic de l'étalon, le méthohexital; D, pic de l'hydroxypentobarbital. Colonne: SE-30 5% sur chromosorb W 80-100 mesh Température en programmation de 170 à 200° à raison de $6^{\circ}/\text{min}$.

de BSTFA dans un chromatographe Intersmat, série IGC 15, équipé en ionisation de flamme. La séparation des produits est effectuée sur une colonne en acier inoxydable de 1,50 m de longueur et 2 mm de dia. int., remplie par du chromosorb W AW DMCS 80-100 mesh imprégné par 5% de SE-30 (Fig. 1).

Les conditions opératoires sont les suivantes: température de l'injecteur et du détecteur: 240°; température de four: programmation de 6°/min de 170° à 200°; débit du gaz porteur (azote): 10 ml/min.

La mesure du rapport des hauteurs des pics du pentobarbital et de l'hydroxypentobarbital par rapport à l'étoile permet, par lecture d'une droite d'étalement, de déterminer la quantité de barbituriques contenus dans le foie ou dans le cerveau.

Les courbes étalons sont obtenues en introduisant dans un homogénat de cerveau ou de foie, des quantités connues de pentobarbital, d'hydroxypentobarbital et d'étoile.

Expérimentation animale. Des souris SWISS mâles, d'un poids moyen de 20 g ont été utilisées. Le pentobarbital (Nembutal) et l'hydroxypentobarbital ont été administrés par voie intrapéritonéale aux doses respectives de 40 et 800 mg/kg.

Les taux de pentobarbital ou d'hydroxypentobarbital ont été mesurés dans le foie et le cerveau à des temps déterminés après l'injection intrapéritonéale (4, 12 et 36 min pour le pentobarbital; 4, 12, 36, 72, 108 et 324 min pour l'hydroxypentobarbital). Le sommeil a été recherché par appréciation de la perte du réflexe de redressement. Au moins six souris par lot ont été utilisées.

RESULTATS

Les résultats obtenus sont rassemblés dans la Fig. 2. Les taux de pentobarbital dans le foie et le cerveau sont sensiblement identiques, ce qui indique un passage rapide du pentobarbital dans le cerveau où il dépasse le taux de 25 µg/g après une administration de 40 mg/kg i.p., dose suffisante pour provoquer un effet hypnotique.

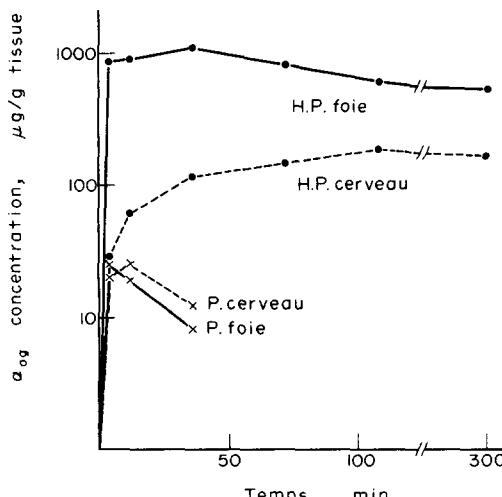


Fig. 2. Taux d'hydroxypentobarbital (H.P.) dans le foie (●—●) et le cerveau (●—●) après injection intrapéritonéale de 800 mg/kg. Taux de pentobarbital (P.) dans le foie (×—×) et le cerveau (×—×) après injection intrapéritonéale de 40 mg/kg.

Après une injection intrapéritonéale de 800 mg/kg, l'hydroxypentobarbital atteint dans le foie à la 12e min une concentration de plus de 1200 µg/g, alors que le taux maximum dans le cerveau n'est obtenu qu'à la 108e minute et est de 190 µg/g soit environ six fois moins que dans le foie. A cette dose, à aucun moment, l'hydroxypentobarbital n'a provoqué d'effet hypnotique.

Si l'on compare les résultats obtenus avec le pentobarbital et son métabolite hydroxylé, on constate que ce dernier atteint dans le cerveau—dans nos conditions expérimentales—un taux sept à huit fois plus élevé que celui du pentobarbital. On peut donc déduire que l'hydroxypentobarbital est pratiquement dénué d'effet hypnotique, même lorsqu'il atteint des concentrations élevées dans le cerveau.

DISCUSSION

Nous avons utilisé l'hydroxypentobarbital sous forme racémique sans chercher comme Christensen *et al.* [2] à évaluer l'activité relative des isomères. Le seul critère d'efficacité biologique retenu a été l'effet hypnotique apprécié par la perte du réflexe de redressement et aucune étude des éventuelles propriétés sédatives ou anticonvulsivantes de l'hydroxypentobarbital n'a été envisagée. L'utilisation d'une dose très élevée d'hydroxypentobarbital (800 mg/kg i.p.) nous a paru la méthode la plus rapide pour apprécier le passage de la barrière hématoencéphalique tout en ayant des chances d'atteindre des taux élevés dans le cerveau. Le remplacement d'un hydrogène sur le carbone 3 de la chaîne isopentyl du pentobarbital par un groupe hydroxyle conduit à une nouvelle molécule qui passe très difficilement la barrière hématoencéphalique et se révèle inefficace alors qu'elle atteint, moyennant l'administration d'une dose très forte, une concentration élevée dans le cerveau.

Ni les études physico-chimiques consacrées aux barbituriques par Jeffrey *et al.* [3], Bolton [4], Craven [5], Bideau *et al.* [6] et Bobranski [7] ni les recherches de relations entre la structure et l'activité effectuées par Hansch et Anderson [8] n'ont permis de saisir le mode d'action intime des hypnotiques barbituriques. Voet et Rich [9] ont souligné l'importance des liaisons hydrogène et la possibilité de formation de complexes entre les barbituriques et l'adénine. Le mécanisme par lequel le remplacement d'un hydrogène par un hydroxyle fait perdre à la molécule de pentobarbital ses propriétés hypnotiques reste donc à préciser.

Remerciements—Nous adressons nos remerciements à Monsieur Riobé, Directeur de Recherche au CNRS, pour nous avoir permis d'utiliser certains appareils de son Laboratoire lors de la synthèse de l'hydroxypentobarbital et à Madame Courtin pour la qualité de son aide technique.

Ce travail a bénéficié d'une aide de l'INSERM CRL n° 73.1.111.9.

BIBLIOGRAPHIE

1. Y. J. Dickert, P. J. Shea et L. P. McCarty, *J. med. Chem.* **9**, 249 (1966).
2. H. D. Christensen, L. Barnett et F. I. Carroll, *J. Pharm. Sci.* **62**, 2722 (1973).
3. G. A. Jeffrey, S. Ghose et J. O. Warwick, *Acta Cryst.* **14**, 881 (1961).

4. W. Bolton, *Acta Cryst.* **16**, 166 (1963).
5. B. M. Craven, *Acta Cryst.* **17**, 282 (1964).
6. J. P. Bideau, L. Marly et J. Housty, *C.R. Acad. Sci. Paris*, **269**, série C, 549 (1969).
7. B. Bobranski, *Roczn. Chemii* **43** (1971).
8. C. Hansch et S. M. Anderson, *J. med. Chem.* **10**, 745 (1967).
9. D. Voet et A. Rich, *J. Am. chem. Soc.* **94**, 5888 (1972).

Résumé—L'hydroxypentobarbital, principal métabolite du pentobarbital est dépourvu d'effet hypnotique même lorsqu'il est administré à doses élevées à l'animal. Cette absence d'effet hypnotique pouvait s'expliquer soit par une pénétration insuffisante dans le cerveau soit par une inactivité réelle en dépit de la pénétration dans le cerveau. L'étude du taux d'hydroxypentobarbital dans le foie et le cerveau après injection intrapéritonéale de 800 mg/kg a montré que ce métabolite traverse mal la barrière hématoencéphalique et qu'en outre il est véritablement inactif car lorsque, moyennant l'injection d'une dose très élevée, il atteint dans le cerveau la concentration de 190 µg/g (soit un taux sept à huit fois plus élevé que celui du pentobarbital) aucun effet hypnotique n'apparaît.