

Note

Gaschromatographische Bestimmung von Hexobarbital und seines Metaboliten aus biologischem Material

HEINZ STEINBACH und WILHELM GIELEN

Pharmakologisches Institut der Universität Köln, Gleueler Str. 24, D-5000 Köln (B.R.D.)

(Eingegangen am 6. Dezember 1976; geänderte Fassung eingegangen am 31. März 1977)

Über die gaschromatographische (GC) Bestimmung von Hexobarbital und anderer Barbiturate ist in den letzten Jahren mehrfach berichtet worden^{1,2}. Die Autoren bestimmten das Hexobarbital nach der Extraktion aus biologischem Material mit Petroläther-Isoamylalkohol (100:1.5), eine Extraktionsmethode, die auch zur spektrophotometrischen Bestimmung von Barbituraten vielfach verwendet wird^{3,4}. Bei diesem Verfahren verbleibt der Metabolit, in diesem Falle die 5-(3'-Oxocyclohexen-1-yl)-3,5-dimethylbarbitursäure (3-Ketohexobarbital), weitgehend in der wässrigen Phase. Nur etwa zwei Prozent des metabolisierten Barbiturates fanden wir in der organischen Phase. Allerdings geht dieser geringe Anteil mit verdoppelter UV-Absorption in die Gesamtextinktion ein. Aus der wässrigen Phase konnten wir durch mehrmalige Chloroformextraktion den Metaboliten nahezu quantitativ gewinnen. Bei der Extraktion mit Essigsäureäthylester wird der Metabolit nur unvollständig erfasst, die besten Resultate werden mit Chloroform erzielt.

Die hier beschriebene Methode ermöglicht die Bestimmung der Pharmakokinetik des Hexobarbitals nicht nur durch quantitative Ermittlung der Abnahme des Hexobarbitals sondern auch durch gleichzeitige quantitative Ermittlung der Zunahme der Metabolitenkonzentration im biologischen Material.

MATERIAL UND METHODEN

Die Reagenzien wurden teils von Merck (Darmstadt, B.R.D.), von Serva (Heidelberg, B.R.D.) und Synochem (Hamburg, B.R.D.) bezogen. Hexobarbital und Hexobarbital-Na (Evipan®) waren Geschenke der Bayer A.G. (Leverkusen, B.R.D.). Alle Reagenzien waren analysenrein bzw. entsprachen den Anforderungen des DAB 7.

5-(3'-Oxocyclohexen-1-yl)-3,5-dimethylbarbitursäure wurde nach der Vorschrift von Tsukamoto *et al.*⁵ dargestellt: Schmelzpunkt 160-161°, 2,4-Dinitrophenylhydrazon: Schmelzpunkt 229°.

Männlichen Ratten (200-300 g) wurde 75 mg/kg Hexobarbital-Na in 0.9% NaCl i.p. verabreicht. 50 min nach der Applikation wurde 0.5 ml Blut sublingual entnommen, mit 3 ml 0.9% NaCl versetzt und nach der Zugabe von 50 µl (50 µg) Pentobarbital als interner Standard wurden die Erythrozyten in 10 min bei 2500 g herunterzentrifugiert. 3 ml des Überstandes wurden dann mit 0.5 ml 4 N HCl versetzt und nach der Zugabe von 4 ml Chloroform ausgeschüttelt. 3.5 ml der Chloroform-

phase wurden entnommen, 3 ml 0.2 M Na-Borat-0.1 N NaOH-Puffer (pH 10) wurden hinzugegeben und erneut ausgeschüttelt. Aus der wässrig-alkalischen Phase wurden dann, nach dem Ansäuern mit 1 ml 4 N HCl, das Hexobarbital und der Metabolit wieder in 5 ml Chloroform übernommen. Die Chloroformphase wurde über wenig Na_2SO_4 getrocknet und zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde in 5 μl Aceton aufgenommen, davon wurde 1 μl zur GC verwendet (s. Fig. 1).

Die GC wurde an einem Hewlett-Packard 5700 A Gaschromatographen, ausgerüstet mit einem Flammenionisationsdetektor (FID), durchgeführt. Die Säule war aus Edelstahl, sie hatte die Abmessung 16 in. \times 1/8 in., sie war gefüllt mit 10% Silicongummi UCW 982 auf Chromosorb W-HP (80-100 mesh). Beide Präparate wurden von Hewlett-Packard (Avondale, Pa., U.S.A.) bezogen. Die Trägergasmenge betrug für Stickstoff 30 ml/min, für Wasserstoff 24 ml/min und für Luft 250 ml/min. Die Säulentemperatur blieb bei 170° konstant, die Injektortemperatur war 250°, die Detektortemperatur betrug ebenfalls 250°. Ein Gaschromatogramm mit Testsubstanzen nach diesen Bedingungen zeigt Fig. 2.

Die quantitative Auswertung erfolgte aus einer Eichkurve, die nach Zugabe von gleichen und unterschiedlichen Mengen Hexobarbital und 3-Ketohexobarbital zum Blut und nachfolgender Aufarbeitung in der beschriebenen Weise erhalten wurde. Dabei zeigte es sich, dass bei Verwendung eines FID, nach Ausmessung der Peakhöhen Mengen von 5 μg bis zu 300 μg des Hexobarbitals und des 3-Ketohexo-

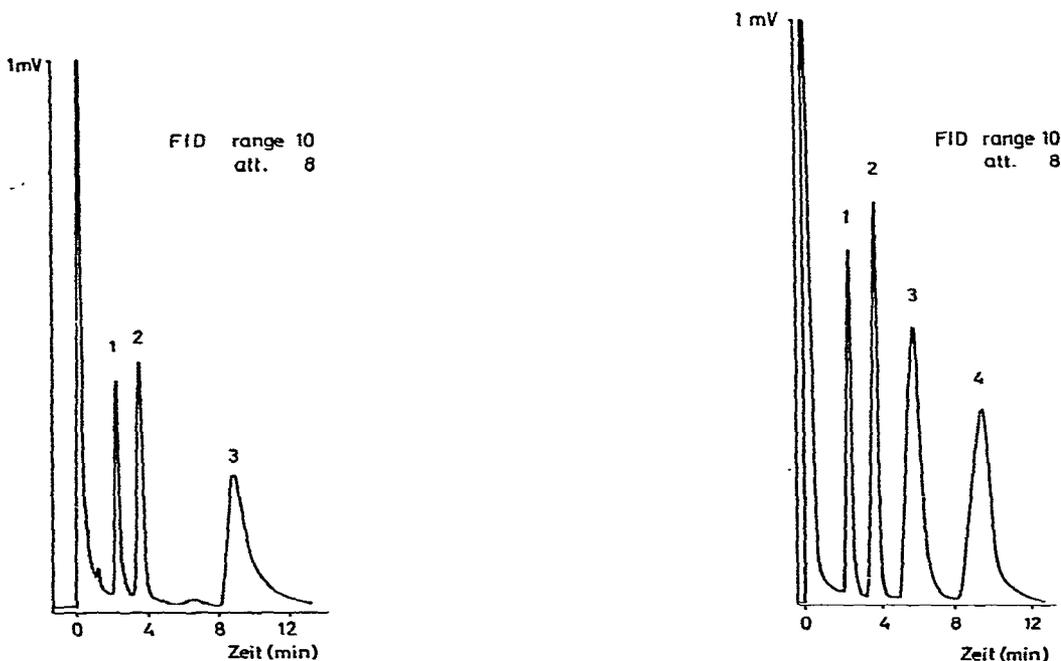


Fig. 1. Gaschromatogramm des Barbituratextraktes aus dem Blut, 50 min nach i.p. Applikation. 1 = Pentobarbital, als interner Standard; 2 = Hexobarbital; 3 = 3-Ketohexobarbital.

Fig. 2. Gaschromatogramm von Barbituraten nach Angaben im Text. 1 = Pentobarbital; 2 = Hexobarbital; 3 = Phenobarbital; 4 = 3-Ketohexobarbital.

barbitals erfasst werden können. Die GC Darstellung des Verhältnisses von Hexobarbital zu 3-Ketohexobarbital entsprach im angegebenen Konzentrationsbereich stets den vorgegebenen Mengen (s. Fig. 3).

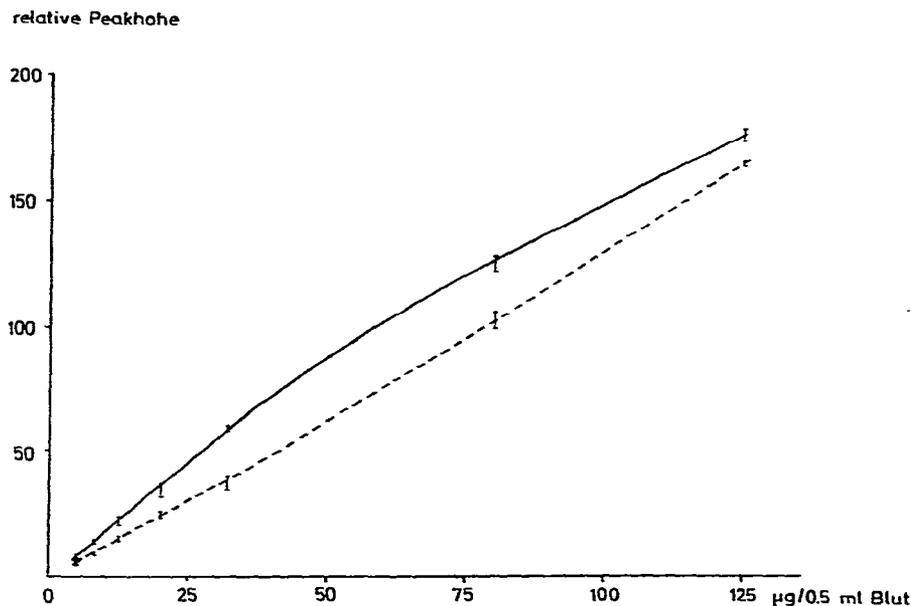


Fig. 3. Peakhöhe in Relation zum internen Standard (Pentobarbital), mit Nahrungsstandardabweichung der Mittelwerte von 2 GC Bestimmungen von je 2 Blutproben je Dosiswert. —, Hexobarbital; —, 3-Ketohexobarbital.

DISKUSSION UND ERGEBNISSE

Die hier beschriebene Methode erlaubt die schnelle, quantitative und gleichzeitige Bestimmung des Hexobarbitals und auch seines hauptsächlichsten Metaboliten, der 5-(3'-Oxocyclohexenyl)-3,5-dimethylbarbitursäure (3-Ketohexobarbital). Die Mitnahme eines internen Standards ermöglicht die quantitative Auswertung. Durch Standardisierung der Aufarbeitungsmethode können im Blut, im Leberhomogenat oder im 9000 g Überstand eines Leberhomogenates die Konzentrationen beider Verbindungen bis hinunter zu $5\ \mu\text{g}$ bei Verwendung eines FID bestimmt werden. Die Wiederaufnahme der Stoffe aus der organischen in die wässrige Phase bei alkalischem pH bewirkt eine weitgehende Abtrennung störender Begleitstoffe. Wegen der geringen Flüchtigkeit der zu analysierenden Stoffe eignet sich eine kurze Säule. Eine Derivatisierung der Substanzen ist nicht erforderlich, sie würde den zeitlichen Aufwand erhöhen, ohne das Resultat zu verbessern.

Bei der hier beschriebenen Methode wird zum ersten Mal der Metabolit mit-erfasst, so dass die pharmakokinetischen Daten nicht allein aus der Abnahme des Hexobarbitals ermittelt werden können. Ein entsprechendes Verfahren ist unseres Wissens bisher nicht beschrieben worden. Die Abnahme an Hexobarbital entspricht

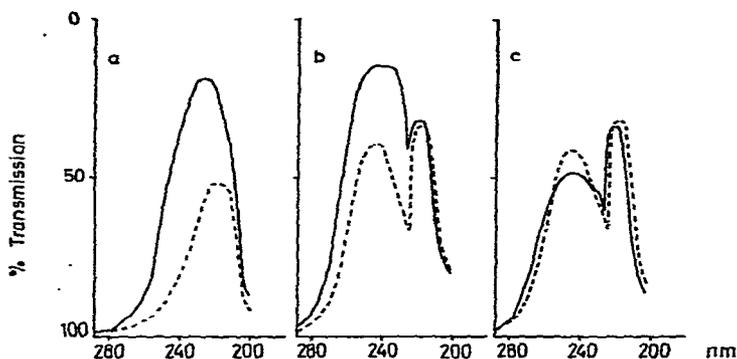


Fig. 4. UV-Absorptionsspektren des Hexobarbitals und der 3-Ketoverbindung. Konzentrationen jeweils $5 \times 10^{-5} M$. ---, Hexobarbital; —, 3-Ketohexobarbital; (a) in Äthanol, (b) in 0.8 M Phosphatpuffer (pH 11), (c) in 0.5 N NaOH.

in dem hier untersuchten Konzentrationsbereich einer äquivalenten Zunahme an 3-Ketohexobarbital. Gegenüber der UV-Absorptionsmethode entfällt die Interferenz des nicht restlos entfernten Metaboliten, der zwar nur mit 2% in den Petroläther-Isoamylalkohol (100:1.5) eingeht, aber durch die verdoppelte UV-Absorption unverhältnismässig stark die Gesamtextinktion beeinflusst (s. Fig. 4).

LITERATUR

- 1 D. D. Breimer und J. M. Van Rossum, *J. Chromatogr.*, 88 (1974) 235.
- 2 G. H. Draffan, R. A. Clare und F. M. Williams, *J. Chromatogr.*, 75 (1973) 45.
- 3 B. B. Brodie, J. J. Burns, L. C. Mark, P. A. Lief, E. Bernstein und E. M. Papper, *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, 109 (1953) 26.
- 4 H. Remmer, *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.*, 233 (1958) 173.
- 5 H. Tsukamoto, H. Yoshimura und S. Toki, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, 4 (1956) 364.