

AZ AZIDOMORFINOK SORSA A SZERVEZETBEN

KNOLL JÓZSEF, az MTA levelező tagja, MAGYAR KÁLMÁN, az orvostudományok kandidátusa, MAKLEIT SÁNDOR a kémiai tudományok doktora, ZÓLYOMI GÁBOR és ZSILLA GABRIELLA

Közlésre érkezett: 1975. II. 5.

Az azidomorfin és származékai előnyös farmakológiai spektrumának felfedezése a félszintetikus morfinszármazékok kutatásában új, gyakorlatilag hasznos útnak ígérkezik. Az azidomorfin állatkísérletekben a morfinnál 40-300-szor (Knoll és mtsai 1971; Knoll 1973; Knoll és mtsai 1973/a, 1973/b; Knoll és Zsilla 1974) emberen 40-50-szer (Rétsági és Schwarzmán 1973) erősebb. A morfinnál előnyösebb légzési, keringési és emésztőszervi hatása, valamint hatékonyságához képest feltűnően alacsony tolerancia és dependencia kapacitása teszik különösen figyelemreméltóvá a vegyületet.

Az erősen rögzített konformációjú (Roberts 1961; Ladik és Messmer 1962; Müller és Messmer 1963; Closson és Gray 1963; Jones és mtsai 1971), 3,8 Å hosszú, lineáris azido-csoport (Pauling és Brockway 1937; Cruickshank és mtsai 1972) kémiai természetében alapvetően különbözik azoktól a szubsztituensektől ($-\text{CH}_3$, $-\text{COH}$, $-\text{CO}$) melyeket az ezideig ismert származékokban találunk.

A 6-azido szubsztituációval megjelenő, erős agonista jellegű hatásváltozás, a C6 pozíciónak a morfin-receptor agonista-komplex kialakulásában betöltött nagy szerepére utal és alapot ad a jelenlegi modellek (Beckett és Casy 1962, 1965; Porthogese 1965, 1966) átértékelésére.

Az azidomorfinok kedvező farmakológiai spektruma, egyben példa arra, hogy az azido-csoport általánosságban nagyobb figyelmet érdemel a gyógyszerkutatásban. Az azido-csoport 1970-ig a farmakológiai szempontból releváns irodalomban az azidomorfinon kívül (Bognár és Makleit 1968) alig jelentkezett (Hofmann és mtsai 1967; Allen és Kirby 1970), azóta növekszik iránta a figyelem (Winter és Goldstein 1972; Ramsay és mtsai 1972; Gorman és Ryan 1972; Mair és Stewens 1972; Ning és Sternbach 1973; Hyde-Wyatt 1973; Kamiya és mtsai 1973; Krebs 1973).

Az azido-csoport szerkezeten belüli sorsára vonatkozóan adatot nem találtunk. A biotranszformációs lehetőségek ismeretében nem zárható ki az a lehetőség, hogy az azido-gyökről N_2 szakadjon le, így az azido csoportból erős kémiai reaktivitású nitrén képződhet (Mair és Stewens 1972), amint a 9 azido-akridinnel kapcsolatban ezt feltételezték, konkrét adat ilyen változásra azonban nincs. Saját kísérleteink azt mutatják, hogy az azidomorfinok esetében az

azidogyök legalább is a molekulák zöménél változatlan marad a szerkezetben.

Jelen munkánk célja az azidomorfinok szerkezetbeni sorsának (felszívódás, eloszlás, kiürülés, metabolizmus) leírása. Referens anyagnak a morfint használtuk. Különös figyelmet fordítottunk az azido-csoport szerkezetben belüli sorsának vizsgálatára. Kísérleteinkben főleg a morfin és azidomorfinok radioaktív jelzett változatait használtuk.

Módszerek és anyagok

Vegyületek.

Jelzett vegyületek: N- ^{14}C -metilmorfin (^{14}C -morfin) 0,96 mCi/mmol; 6-deoxi-6-azido-(N- ^{14}C -metil)-dihidroizomorfin (^{14}C -azidomorfin) 9,65 mCi/mmol; 6-deoxi-6-azido-(7,8- ^3H)-dihidroizomorfin (^3H -azidomorfin) 299,5 mCi/mmol; 6-deoxi-6-azido-14-hidroxi-(8- ^3H)-dihidroizomorfin (^3H -14-OH-azidomorfin) 337 mCi/mmol; 6-deoxi-6-azido-(3-O- ^{14}C -metil)-dihidroizokodein bitartarát (^{14}C -azidokodein) 3,28 mCi/mmol; 6-deoxi-6-azido-(7,8- ^3H)-dihidroizokodein bitartarát (^3H -azidokodein) 179,44 mCi/mmol; 6-deoxi-6-azido-(7,8- ^3H)-dihidroizoetilmorfin bitartarát (^3H -azidoetilmorfin) 142,0 mCi/mmol. A radioaktív vegyületeket a Gyógyszerkutató Intézet izotóp laboratóriumában Zólyomi Gábor szintetizálta.

Inaktív vegyületek: A kísérletekben használt valamennyi inaktív vegyületet a Tiszavasvári Alkaloida Gyártól kaptuk.

Oldatok készítése.

A morfint 5%-os sósavban, az azidomorfinat és származékait 5%-os foszforsavban oldottuk, miután a pH-t 1 N NaOH-val 6-ra állítottuk be.

Kísérleti állatok.

Kísérleteinkben CFLP specifikációjú egereket (20 g) és CFY patkányokat (100 g) használtunk (LATI).

Egésztest autoradiográfia. Terhes egereknek (35—40 g) 5 μCi ^{14}C -azidomorfinat (4,045 mg/kg) adtuk be intravénásan, 0,2 ml térfogatban. Egy esetben 20 g-os hím egeret használtunk. A vegyület beadása után különböző idő elteltével (30 sec-től 24 óra) az egereket enyhe éternarkózisban szárzjéggel telített hexánba mártottuk (-75°C). Ezután az állatokat órákon át -15°C -on tartottuk, majd a beágyazást és metszést Ullberg módszerével végeztük (1954). Az egerekből -15°C -on, sagittális irányban, Leitz 1300 típusú microtommal 20 μ -os metszeteket készítettünk oly módon, hogy a metszetek speciális ragasztószalagon rögzüljenek (Minnesota Mining and Manufacturing Co. No 810). A metszeteket -15°C -on szárítottuk, majd néhány napos hidegkezelés

után szobahőmérsékleten tároltuk, később fényérzékeny filmhez (Geavert) szorítva exponáltuk. Megfelelő expozíciós idő után a filmeket előhívtuk.

A kísérletek egy részében hím patkányokat (100 g) használtunk. Az állatok 10 μCi ^{14}C -morfint (29,67 mg/kg), ill. ^{14}C -azidomorfint (3,24 mg/kg) vagy ^{14}C -azidokodeint (14,5 mg/kg) kaptak intravénásan. A kezelés után különböző idő elteltével az állatokat dekapitáltuk és a három különböző vegyülettel kezelt állat fejét egy blokkba ágyasztuk be, majd az előbbi módon metszeteket és autoradiogramot készítettünk. Ez a módszer lehetővé tette, hogy az állatok agyából közel azonos szinteket reprezentáló metszeteket készítsünk és azokat azonos expozíciós és előhívási procedurának vessük alá.

A radioaktivitás mennyiségi meghatározása a szövetekben.

20-g-os hím egereket 5, ill. 20 μCi jelzett anyaggal kezeltünk i. v. ill. p.o. A kezelés után, az állatokból éternarkózisban, szívpunkcióval vért vettünk. Ezután az állatokat dekapitáltuk és különböző szöveti mintákat vettünk. A pontosan mért vérmintákat, az egyik agyi féltekét, ill. 20–25 mg szöveti mintát folyadék-szcintillációs edényekbe helyeztük, 1 ml Soluene TM 100 (Packard) szövetoldószerrel feloldottuk és a radioaktivitást folyadék-szcintillációs módszerrel határoztuk meg (Intertechnique SL 40). A méréshez edényenként 10 ml toluolt használtunk, mely 0,5%-os PPO-t és 0,01%-os dimetil-POPOP-ot tartalmazott. Az abszolút aktivitást (dpm)/külső standard segítségével korrigáltuk. A komputeres készülék megfelelő programozás után a dpm értékeket automatikusan kinyomtatja. A radioaktivitást 5 állatból számított abszolút aktivitás átlagában \pm S. E. adtuk meg.

A relatív megoszlási hányados meghatározása.

A vizsgálandó anyagokat 20 ml térfogatú üveg dugós csőbe helyeztük, mely 5 ml petrolétert és 5 ml 0,1 M-os foszfát-puffert tartalmazott (pH 7,2). A vizsgálandó anyagok koncentrációja 0,5 mg/ml volt, mely csövenként 5 μCi radioaktivitást tartalmazott. A megfelelő specifikus aktivitás beállításához a radioaktív anyagokat inaktív anyaggal hígítottuk. 20 perces rázás után (22 °C) a szerves- és vizes fázisból mintát vettünk és a radioaktivitást folyadék-szcintillációs módszerrel határoztuk meg. A petroléterben mért abszolút aktivitást a pufferben mérthez hasonlítottuk. Kiszámítottuk, a morfinhoz viszonyított relatív megoszlási hányadost is.

Az azidomorfinok szubcelluláris eloszlása.

100 g-os hím patkányokat 20 μCi ^{14}C -morfinnal (59,0 mg/kg), ill. ^{14}C -azidomorfinnal (6,47 mg/kg) vagy 30 μCi ^3H -azidokodeinnel (6,47 mg/kg) kezeltük intravénásan. A kezelés után 30 perc múlva a patkányokat dekapitáltuk, kivettük az állatok agyát, és üveghomogenizátorral (Potter) 0,25 M-os szacharózban 10%-os agyhomogenizátumot készítettünk.

A homogenizátumból a szubcelluláris frakciókat differenciál centrifugálással preparáltuk. A szubfrakciókból 0,1 ml-es minták aktivitását soluene kezelés után folyadék-szcintillációs módszerrel határoztuk meg. A különböző centrifugálási sebességeknél ülepedő radioaktivitás mértékét a kiindulási homogenizátum aktivitásához hasonlítva, százalékosan adtuk meg.

Kiürülési vizsgálatok

100 g-os hím patkányokat intravénásan kezeltünk a vizsgált morfin-származékokkal. A kezelt állatokat 48 órán keresztül Simax anyagsere ketrecben tartottuk és szeparáltan gyűjtöttük a patkányok székletét és vizeletét. A kiürített radioaktivitást folyadék-szcintillációs módszerrel mértük és kiszámítottuk a vegyületek kumulatív ürülését. Az ürülést a beadott dózis %-ában adtuk meg.

Demetilációs vizsgálatok.

A kísérletekhez 100—150 g-os hím patkányokat használtunk. Kísérletenként legkevesebb 5 állat májából 4 °C-on, 0,1 M-os foszfát-pufferben (pH 7,6), 30%-os homogenizátumot készítettünk (Potter). A homogenizátumot 4 °C-on, 9000 g-vel, 20 percig centrifugáltuk és a felülúszót használtuk a kísérletekhez (továbbiakban mikroszóma-preparátum). Az inkubációs közeg (Beckett és Morton 1966) mintánként 6 ml 0,1 M-os foszfát pufferben (pH 7,6) 100 μ mol nikotinamidot, 0,4 μ mol NAD-t, 0,4 μ mol NADP-t, 20 μ mol glukóz-6-foszfátot 20 μ mol MgCl₂-ot, 70 μ mol szemikarbazidot, 10 μ mol szubsztrátot és 2,0 ml máj szupernatánst (600 mg szövetből preparált) tartalmazott. Az inkubációt 37 °C-on, folyamatos rázás közben, levegő atmoszférában, 1 órán át végeztük. A reakciót 15 ml 30%-os TCA-val állítottuk le. A demetiláció során keletkezett formaldehidet ledesztilláltuk (Axelrod 1955) és mennyiségét kromotrópsavas eljárással mértük (Boyd és Logan 1942).

A formaldehid koncentrációját ismert mennyiségű formaldehidhez hasonlítva belső standard segítségével határoztuk meg. A demetilációs aktivitást μ g HCHO/100 mg fehérje/óra) adtuk meg. A fehérjét Lowry és mtsai módszerével mértük (1951).

Radiokromatográfias mérések. A vizsgálatokat ³H-azidomorfinnal végeztük. Az elválasztás vékonyréteg kromatográfiával történt (Kiesel-gél GF₂₅₄). A futtató-szer ciklohexán:kloroform:dietilamin 5:4:1 arányú keveréke volt. A detektálást Packard-radiochromatogram scanneren végeztük.

Az idomorfin és metabolitjainak infravörös (IR) spektroszkópiás analízise

A kísérletek egy részében a „Demetilációs vizsgálatok” c. részben leírt módon azidomorfin inkubáltunk patkánymáj mikroszóma-preparátummal. A reakciót forralással állítottuk le, majd centrifugálás után, pH 8-nál, 10%-os butanol-kloroformos extrakciót végeztünk. Az organikus fázist elpárologtat-

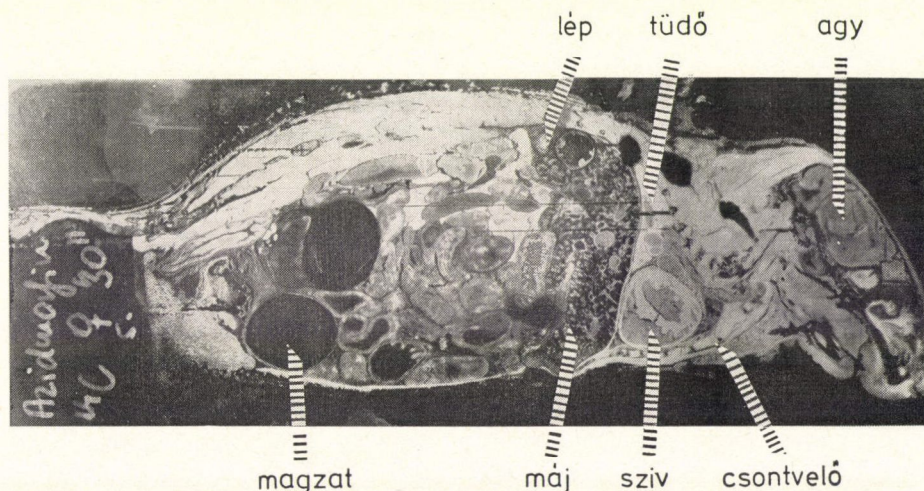
tuk, majd az azidomorfin (Rf = 0,54) és a nor-azidomorfin (Rf = 0,22) rétegekromatográfiás módszerrel választottuk el. Az anyagokat 10%-os butanol-kloroformmal leoldottuk a kromatogramtól, az oldószert elpárologtattuk és Zeiss UR 10 spektrométerrel, dikloretán oldatban vizsgáltuk az anyagok IR-spektrumát.

A kísérletek második részében a patkányokat azidomorfinnal, ill. 14-OH-azidomorfinnal kezeltük s. c. és 24 órán keresztül gyűjtöttük az állatok vizeletét. A vizelet β -glukuronidázos emésztése után (pH 5), az azidomorfin és a 14-OH-azidomorfinat extraháltuk, kromatografáltuk, eluáltuk a kromatogramról és KBr pasztillában, Perkin-Elmer spektrométerrel vizsgáltuk az anyagok IR spektrumát.

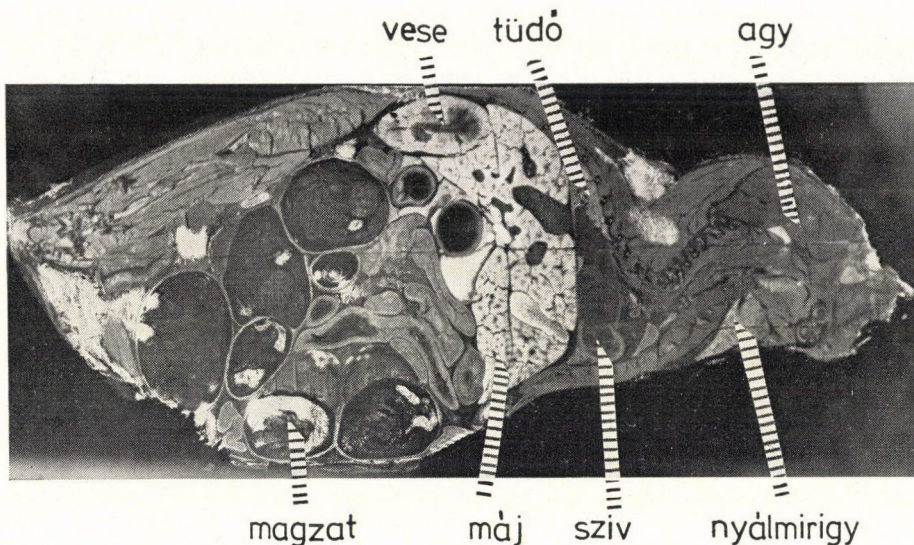
Eredmények és azok megbeszélése

Az azidomorfin eloszlását egérben az egésztest autoradiogramok szemléltetik (1–5. ábra). A vegyület gyorsan bejut a vérből a szövetekbe és már 30 másodperc múlva jelentős koncentrációt ér el a szervekben (1. ábra). Az azidomorfin a központi idegrendszerben is azonnal magas koncentrációt ér el, mely mintegy 20 percig meglehetősen magas marad (3. ábra). A vegyület beadása után 1, ill. 4 óra múlva az agy már szinte háttér aktivitást mutat (4–5. ábra). A szervek közül a máj, a lép, a tüdő, a vese és a barna-zsír szövet magas radioaktivitást tartalmaz.

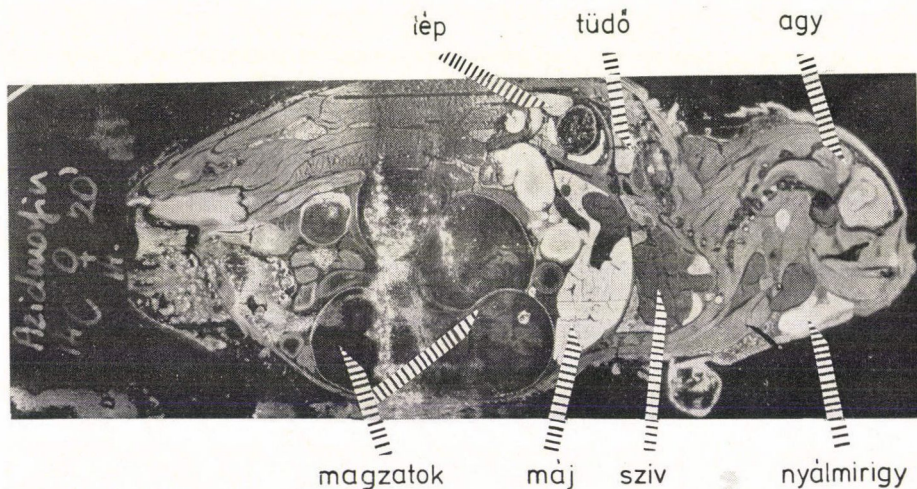
A terhes egerek autoradiogramjai jól szemléltetik a ^{14}C -azidomorfin placenta penetrációját is. Az azidomorfin vagy metabolitja átjut a placenta-barrieren, azonban a vizsgálati periódus minden időpontjában a magzati



1. ábra: Terhes egér egésztest autoradiogramja 0,5 perccel ^{14}C -azidomorfin i. v. beadása után (4,045 mg/kg; 5 μCi /állat; 0,2 ml térfogatban)



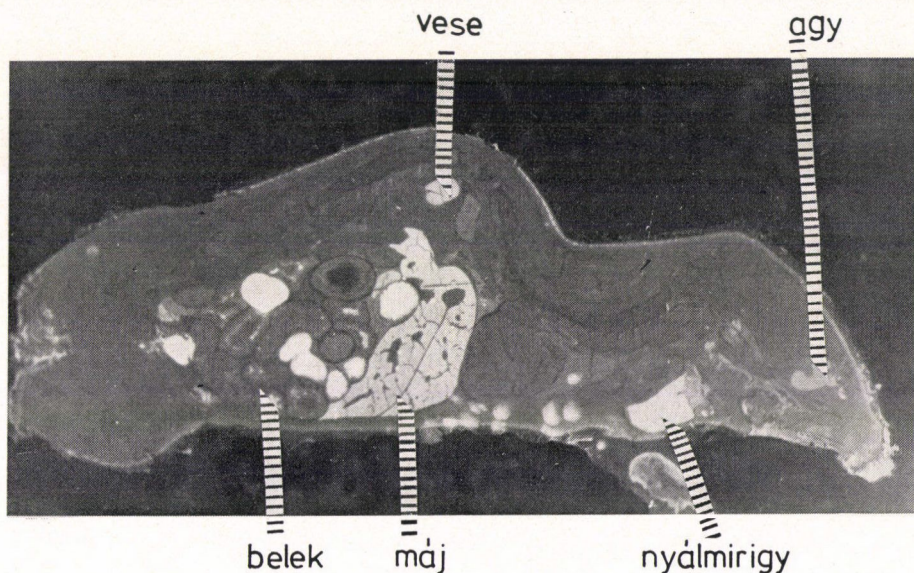
2. ábra: Terhes egér egésztest autoradiogramja 5 perccel ^{14}C -azidomorfin i. v. beadása után. Kísérleti körülmények az 1. ábránál.



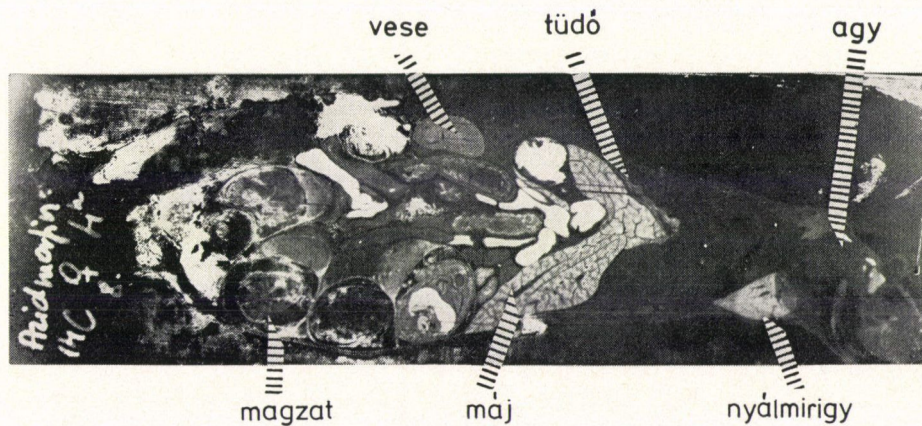
3. ábra: Terhes egér egésztest autoradiogramja 20 perccel ^{14}C -azidomorfin i. v. beadása után. Kísérleti körülmények az 1. ábránál.

szövetek az anyai szöveteknél kisebb koncentrációban tartalmazzák. A beadást követően 30 másodperc múlva a magzati szövetek még háttér aktivitást mutatnak.

Az autoradiogramok az azidomorfin gyors ürülését mutatják. A vegyület beadása után 60 perc múlva a vegyület már kizárólag a kiürülési helyeken koncentrálódik (4. ábra).



4. ábra: Hím egér egésztest autoradiogramja 60 perccel a ^{14}C -azidomorfin i. v. beadása után. Kísérleti körülmények az 1. ábránál.



5. ábra: Terhes egér egésztest autoradiogramja 240 perccel ^{14}C -azidomorfin i. v. beadása után. Kísérleti körülmények az 1. ábránál.

Patkányagyak autoradiogramjai azt mutatják, hogy növekvő sorrendben a ^{14}C -morfin, ^{14}C -azidomorfin és ^{14}C -azidokodein penetrál jobban az agy-vér-gáton (6.–7. ábra). A 4 órás autoradiogramon látható, hogy a vegyületek zöme kiürült a központi idegrendszerből, azonban jelentős mennyiség maradt a talamikus és hipotalamikus területeken (8. ábra).

A kvantitatív szöveti meghatározások az egésztest autoradiogramokkal egybehangzóan azt mutatják, hogy a ^3H -azidomorfin i.v. beadás után, a máj

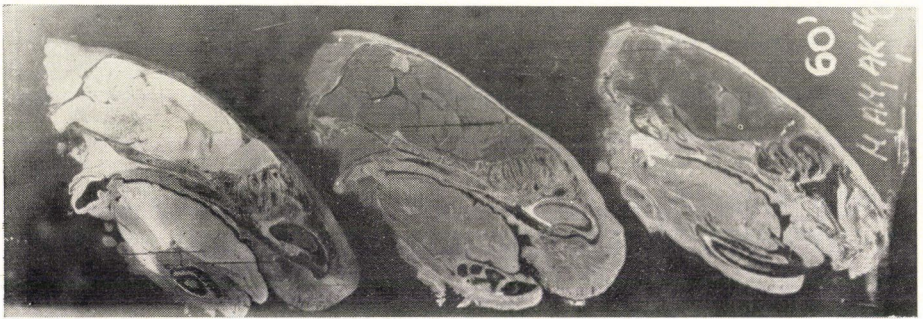


azidokodein

azidomorfin

morfin

6. ábra: Patkányagyak autoradiogramja 20 perccel ^{14}C -morfin (29,67 mg/kg), ^{14}C -azidomorfin (3,24 mg/kg), ill. ^{14}C -azidokodein (14,5 mg/kg) i. v. beadása után ($10 \mu\text{Ci}/100 \text{ g}$ patkány, 0,2 ml térfogatban)

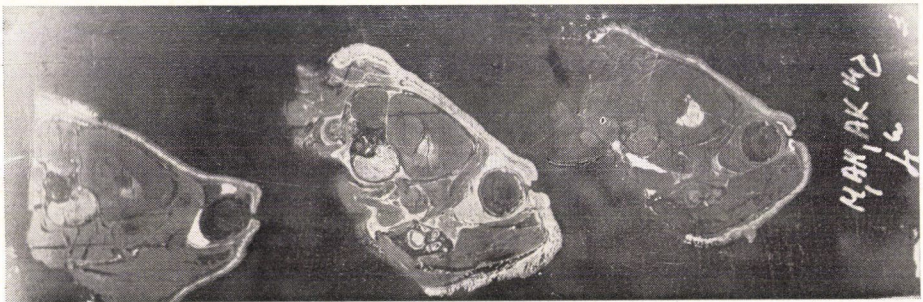


azidokodein

azidomorfin

morfin

7. ábra: Patkányagyak 60 perces autoradiogramja. Kísérleti feltételek a 6. ábránál.



azidokodein

azidomorfin

morfin

8. ábra: Patkányagyak 240 perces autoradiogramja. Kísérleti feltételek a 6. ábránál.

I. táblázat

A ³H-azidomorfin szöveti koncentrációja egér szerveiben a vegyület i. v. beadása után

Idő	dpm/1,0 mg nedves szövet ± S. E.				
	vér	agy	máj	barna-zsírövet	vese
0,5 perc	349±12	535±62	708± 69	2717±448	4659±356
1 perc	755±68	776±40	1145±274	1124±117	4071±363
5 perc	435±44	713±37	1371±138	989± 52	3572±162
10 perc	451±47	735±70	1136± 72	981±117	3237± 89
30 perc	211±12	301±18	366± 14	270± 11	1044± 98
60 perc	188±10	151±29	159± 10	164± 18	563± 73
2 óra	128± 9	33± 3	116± 4	89± 5	173± 3
4 óra	119±15	15± 2	76± 6	78± 3	169± 9
24 óra	139±15	18± 3	109± 9	80± 7	170± 10
48 óra	133±12	13± 1	54± 5	88± 11	87± 7

Dózis: 260 µg/kg; 5 µCi/20 g egér

Az értékek 5 állat adatainak átlagát jelentik ± S. E.

II. táblázat

A ³H-14-OH-azidomorfin szöveti koncentrációja egér szerveiben a vegyület i. v. beadása után

Idő	dpm/1,0 mg nedves szövet ± S. E.				
	vér	agy	máj	barna-zsírövet	vese
0,5 perc	8709±620	707±46	1723±234	1462±76	11 880±1158
1,0 perc	4416±290	945±31	2299±146	1744±134	5 339±800
5,0 perc	3336±545	1169±138	5277±1338	2152±201	5 308±809
10,0 perc	4855±143	946±111	5042±744	1152±67	6 046±1132
30,0 perc	313±22	326±25	1416±28	289±13	1 645±37
60,0 perc	228±13	86±3	892±39	141±5	920±65
2 óra	72±4	18±0,91	412±43	85±8	325±21
4 óra	55±2	12±0,83	335±18	85±4	217±10
24 óra	69±4	8±0,61	154±7	50±7	108±8
48 óra	57±2	6±0,84	103±5	47±4	63±4

Dózis: 1,0 mg/kg; 5 µCi/20 g egér (A radioaktív anyagot inaktív anyaggal 4×-re hígítottuk)

Az értékek 5 állat adatainak átlagát mutatják ± S. E.

kivételével minden szervben már az első másodpercekben elérte legmagasabb koncentrációját, melyet a szintek gyors csökkenése kísért (I. táblázat). Tanulmányoztuk a ³H-14-OH-azidomorfin eloszlását az egereken, a vegyület i. v. beadása után. Az eredményeket a II. táblázat mutatja. A ³H-14-OH-azidomorfin az azidomorfinhoz hasonlóan igen jól penetrál a szövetekbe, koncentrációi valamelyest magasabbak is az azidomorfinénál, azonban a vegyület eliminációja is intenzívebb. Az agyi szintekből számított felezési idő az azidomorfin esetében 25,3, a 14-OH-azidomorfinnál 14,6 percnak adódott.

Kísérleteinkben tanulmányoztuk a morfin és az azidomorfin *orális fel szívódását* egereken. Mértük különböző idővel a vegyületek beadása után a vér és az agyszövet radioaktivitását. Az eredményeket a vérben a III., az agyszövetekben a IV. táblázat mutatja.

III. táblázat

A morfin és azidomorfinok vérkoncentrációja egérkísérletekben a vegyületek p. o. beadása után

Idő, perc	ng/1,0 mg vér ± S. E.				
	¹⁴ C-morfin 286,7 mg/kg	¹⁴ C-azidomorfin 32,36 mg/kg	³ H-14-OH-azido- morfin 32,36 mg/kg	³ H-azidokodein 32,36 mg/kg	³ H-azidoetilmorfin 32,36 mg/kg
15	68,72 ± 16,83	6,17 ± 0,79	9,89 ± 1,66	14,56 ± 2,58	26,91 ± 1,24
30	79,81 ± 17,65	9,07 ± 2,17	63,25 ± 17,92	66,08 ± 2,47	31,84 ± 7,65
60	140,91 ± 26,2	29,66 ± 4,67	39,65 ± 0,99	51,14 ± 4,24	29,53 ± 8,85
120	85,83 ± 20,45	11,32 ± 3,32	8,82 ± 0,96	25,31 ± 8,19	6,20 ± 1,11
240	66,98 ± 15,51	14,23 ± 1,21	23,76 ± 4,55	27,24 ± 6,93	6,99 ± 1,51
1440	33,16 ± 5,21	3,77 ± 1,11	9,34 ± 2,32	18,79 ± 4,0	7,02 ± 1,92

A vegyületeket gyomorszájával adtuk be 0,5 ml térfogatban. A radioaktív koncentráció 20 μ Ci/20 g egér volt.

A ³H-jelzett vegyületeket inaktív anyaggal hígítottuk az azidomorfin farmakológiai dózisára.

Az értékek 5 állat adatainak átlagát jelentik ± S. E.

IV. táblázat

A morfin és azidomorfinok agyi koncentrációja egérkísérletekben a vegyületek p. o. beadása után

Idő, perc	ng/1,0 mg nedves szövet ± S. E.				
	¹⁴ C-morfin 296,2 mg/kg	¹⁴ C-azidomorfin 32,36 mg/kg	³ H-14-OH-azido- morfin 32,36 mg/kg	³ H-azidokodein 32,36 mg/kg	³ H-azidoetilmorfin 32,36 mg/kg
15	2,81 ± 0,27	0,93 ± 0,13	1,93 ± 0,21	4,97 ± 0,87	4,21 ± 0,37
30	7,36 ± 1,20	2,85 ± 0,45	1,71 ± 0,51	5,0 ± 1,16	14,36 ± 0,64
30	4,41 ± 0,27	2,64 ± 0,13	2,47 ± 1,18	3,98 ± 0,45	2,52 ± 0,48
120	6,28 ± 1,20	3,11 ± 0,45	2,04 ± 0,22	4,89 ± 0,28	2,37 ± 0,24
240	4,81 ± 0,13	1,60 ± 0,16	1,17 ± 0,22	3,99 ± 1,19	1,45 ± 0,19
1440	2,41 ± 0,04	0,51 ± 0,10	1,20 ± 0,24	1,45 ± 0,27	1,26 ± 0,22

A vegyületeket gyomorszájával adtuk be 0,5 ml térfogatban. A radioaktív koncentráció 20 μ Ci/20 g egér volt.

A ³H jelzett vegyületeket inaktív anyaggal hígítottuk az azidomorfin farmakológiai dózisára.

Az értékek 5 állat adatainak átlagát jelentik ± S. E.

V. táblázat

A morfin és az azidomorfinok relatív megoszlási hányadosai

Vegyületek	Megoszlási hányados konc. petroléterben konc. pufferben	Relatív oldékonyság petroléterben
¹⁴ C-morfin	0,0018	1
¹⁴ C-azidomorfin	0,0021	1,16
³ H-14-OH-azidomorfin	0,0051	2,83
³ H-azidokodein	0,3696	205,33
³ H-azido-etilmorfin	1,1139	618,83

Hőmérséklet: 32 °C; foszfát puffer: 0,1 M, pH 7,2.

VI. táblázat

A morfin, azidomorfin és azidokodein szubcelluláris megoszlása patkánygyanban 30 perc múlva a vegyületek i. v. beadása után

Üledék (g × idő)	A kiindulási homogenizatum radioaktivitásának %-os ülepedése ± S.E.		
	¹⁴ C-morfin	¹⁴ C-azidomorfin	³ H-azidokodein
500 × 10 perc sejtmag, mielin, sejttöredék	13,43 ± 3,9	12,59 ± 0,7	19,33 ± 6,3
12,000 × 15 perc mitochondrium, mielin, idegvégződés	14,53 ± 4,3	23,25 ± 0,6	19,81 ± 2,7
100 000 × 60 perc mikroszomális frakció	6,28 ± 1,6	9,78 ± 0,8	15,00 ± 0,6
230 000 × 5 óra molekulásúly > 70 000	4,46 ± 1,9	5,60 ± 1,8	7,31 ± 1,4
230 000 × 5 óra supernatáns, molekulásúly g > 70 000	61,79 ± 6,8	47,33 ± 1,4	32,12 ± 3,5
Visszanyerés	100,49	98,55	93,57

Dózis: ¹⁴C-morfin, 59,0 mg/kg; ¹⁴C-azidomorfin, 6,47 mg/kg; ³H-azidokodein, 6,47 mg/kg
 A radioaktív dózis: 20 μCi/100 g patkány. A ³H-azidokodeint inaktív anyaggal hígítottuk.
 Az agyat 0,25 M-os szacharózban homogenizáltuk.
 A kísérletek száma 4.

VII. táblázat

A morfin és azidomorfinok kumulatív ürülése

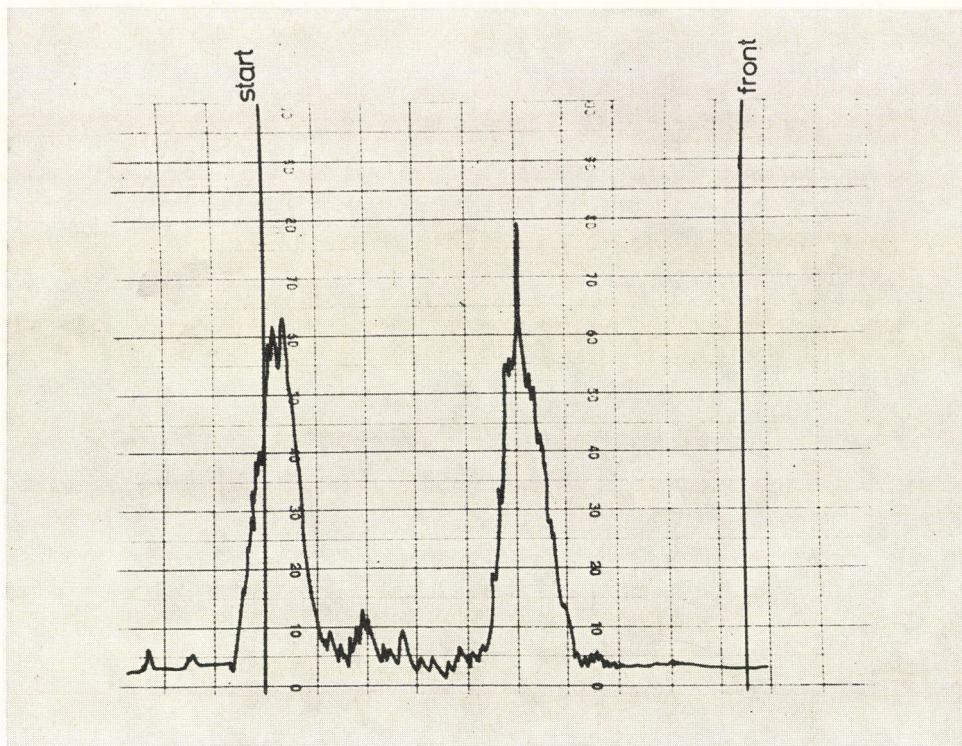
Idő óra	¹⁴ C-morfin 53,34 mg/kg	¹⁴ C-azidomorfin 6,47 mg/kg	³ H-14-OH- azidomorfin 1,37 mg/kg	³ H-azidokodein 1,37 mg/kg	³ H-azidoetil- morfin 1,37 mg/kg
Vizelet					
0-2	7,38	5,16	39,87	5,87	27,05
0-4	26,48	31,09	45,59	54,50	31,49
0-24	64,57	59,79	80,62	72,17	63,83
0-48	87,76	88,75	93,32	89,71	88,29
Széklet					
0-48	1,42	2,53	5,02	3,46	4,52
Az ürített össz- mennyiség:	89,18	91,28	98,34	94,17	92,81

Az értékek az ürített mennyiséget mutatják a beadott dózis %-ában. A ¹⁴C-jelzett vegyületekből 20, a ³H-jelzettekből 40 μCi izotópotadtunk patkányonként (100 g).

A ³H-jelzett vegyületeket inaktív anyaggal hígítottuk a ³H-azidoetilmorfin dózisára.

Annak ellenére, hogy a vegyületek specifikus aktivitása jelentősen eltért egymástól, a farmakológiai és a radioaktív dózis a morfin kivételével valamennyi alkalmazott vegyületnél azonos volt. A morfin esetében csak a radioaktív dózis egyezett a többiével. Ennek elérése céljából a triciált azidovegyületeket inaktív vegyülettel hígítottuk az azidomorfin dózisára.

A III. táblázat azt mutatja, hogy a morfin és azidomorfin kb. egyforma sebességgel szívódik fel a gyomor-béltraktusból, hiszen a beadás utáni 15. perc-

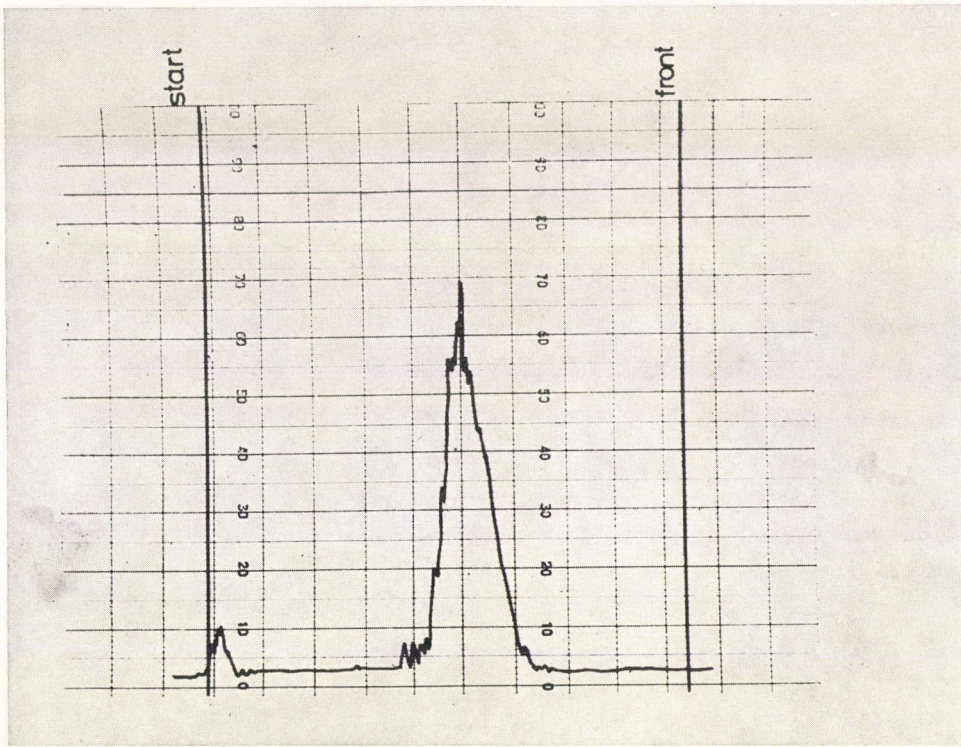


9. ábra: Azidomorfinnal kezelt (2 mg/kg s. c.) patkányvizelet radiokromatogramja. A vizeletet 24 órán át gyűjtöttük. Vékonyréteg kromatogram (Kiesel-gel G₂₅₄ 0,3 mm). Oldószer: ciklohexan: kloroform: dietilamin = 5 : 4 : 1. Azidomorfin: $R_f = 0,54$. Azidomorfin-glukuronid: $R_f = 0,02$. Lineáris regisztrálás: 1×10^4 cpm.

ben a morfin-azidomorfin dózisában meglevő különbség arányában alakult a vérkoncentráció is. A vizsgált többi azidomorfin-származék felszívódásának intenzitása azonban meghaladja a morfinét. A 15. percben mért vérszintekből számítva az 5 vegyület felszívódási intenzitásának morfinhoz viszonyított aránya a következő: morfin: azidomorfin: 14-OH-azidomorfin: azidokodein: azidoetilmorfin = 1:0,8:1,4:2,1:3,3.

A IV. táblázat az 5 vegyület orális felszívódása esetében mutatja ugyanazon állatokban az agyi koncentrációkat. Az összes azidovegyület agyi penetrációja jobb mint a morfiné. A 15. perces értékekből a következő arányosság tényezők számíthatók az 5 vegyületből: morfin:-azidomorfin: 14-OH-azidomorfin: azidokodein: azidoetilmorfin = 1:3,3:6,8:17,6:14,9.

A morfinalkaloidok felszívódása és agyi penetrációja valamint *lipoidoldékonyságuk* között összefüggés található. Petroléterben mért relatív megoszlási hányadosaikat az V. táblázat tartalmazza.



10. ábra: Azidomorfinnal kezelt, glukuronidázzal emésztett patkányvizelet radiokromatogramja. A patkányokat 2 mg/kg azidomorfinnal kezeltük s. c. A béta-glukuronidázos emésztés pH-5-nél történt (24 óra, 20000 Fismann egység). A kromatográfiai eljárás körülményei a 9. ábránál.

A morfin, azidomorfin és azidokodein *szubcelluláris eloszlását* a fő szöveti frakciókban a VI. táblázat mutatja. Az azidomorfin és az azidokodein koncentrációja a fő szubcelluláris frakciókban magasabb a morfinénál, míg a felülúszó frakció a morfinból tartalmaz többet (61,79%). Ennél a centrifugálási sebességnél, az alkalmazott időtartam alatt a haemoglobin (molekulasúly 67 000) szintén leülepedett. Az azidomorfin és az azidokodein intenzívebb kötődése a mikroszomális frakcióhoz — melyet máj mikroszomális frakcióban is tapasztaltunk — indirekt módon azt jelenti, hogy az azido-vegyületek metabolikus átalakulásának jobb az esélye.

A morfin, az azidomorfin és származékai a *vizeleten keresztül ürülnek* a patkányok szervezetéből. A beadott dózis 30–50%-a az első 4 órában kiürül és kb. 90% található a 48 órás gyűjtött vizeletben. 48 óra alatt a vegyületeknek csupán 2–5%-a ürült a széklettel (VII. táblázat).

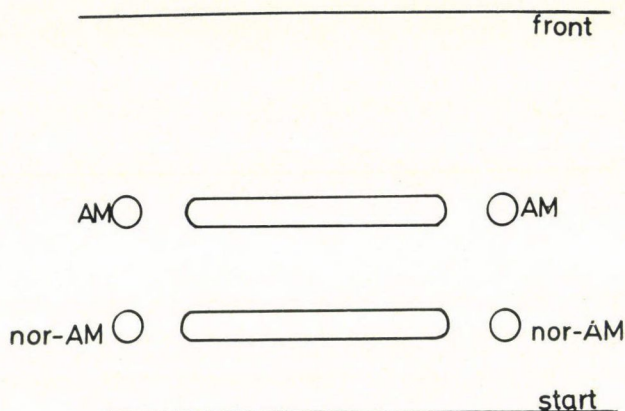
A *metabolitok radiokromatográfiai analízise* azt mutatja, hogy a 2 mg/kg azidomorfinnal s. c. előkezelt patkányok vizeletében változatlan azidomor-

VIII. táblázat

Az azidomorfin N-demetilációja patkánymáj mikroszóma-preparátum hatására

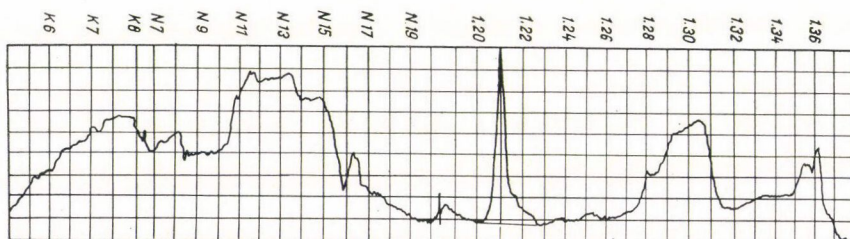
Az azidomorfin konc. M.	HCHO μ g/100mg fehérje/óra
$2,17 \times 10^{-4}$	$14,7 \pm 3,0$
$5,42 \times 10^{-4}$	$18,0 \pm 4,5$
$1,08 \times 10^{-3}$	$25,2 \pm 5,1$

A kísérletek száma 4.

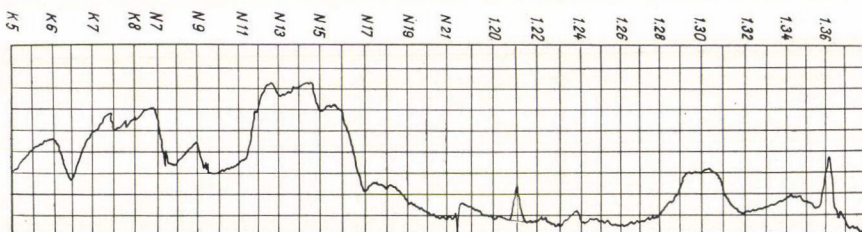


11. ábra: A N-demetilációs közeg extraktumának kromatogramja. Az inkubáció patkánymáj mikroszómaival, azidomorfin szubsztát mellett, 37 °C-on, 1 óráig történt. Kísérleti körülmények a 9. ábránál.

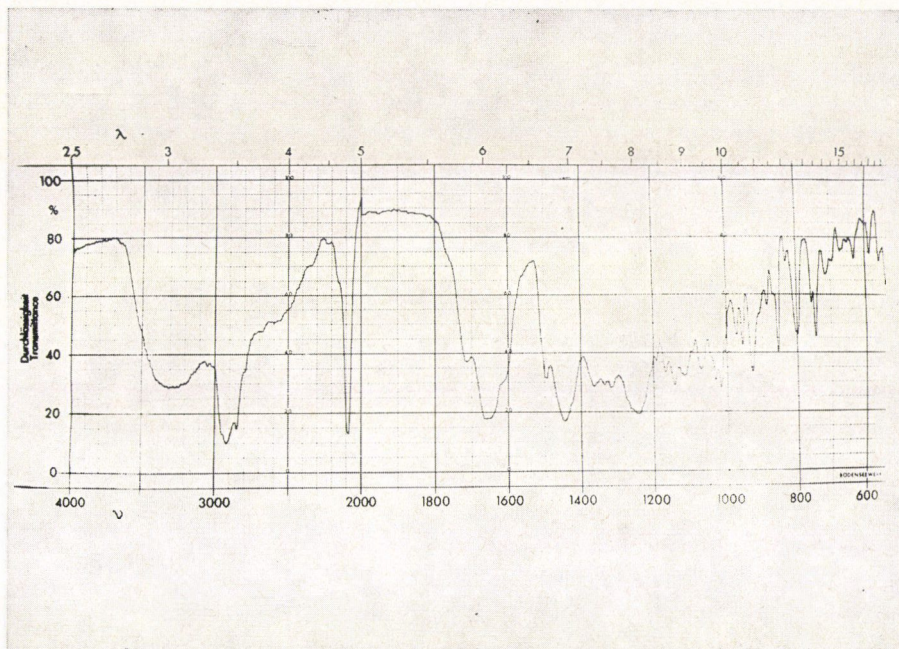
Norazidomorfin: $R_f = 0,22$; azidomorfin: $R_f = 0,54$.



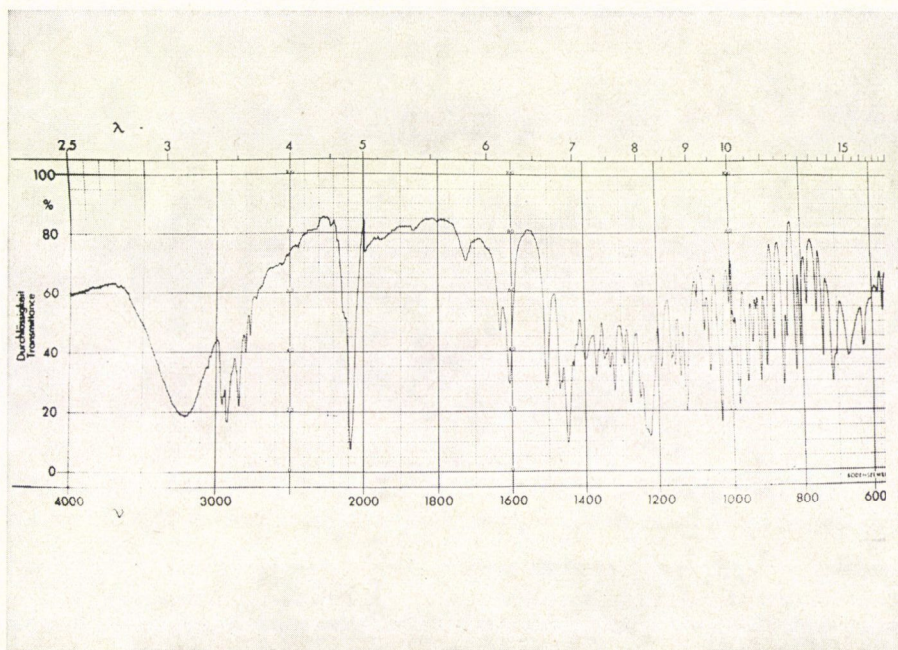
12. ábra: Az N-demetilációs közegből extrahált azidomorfin IR spektruma.



13. ábra: Az N-demetilációs közegből extrahált norazidomorfin IR spektruma.



14. ábra: Azidomorfinnal kezelt (2 mg/kg s. c.) patkányvizelet extraktumából nyert azidomorfin IR spektruma.



15. ábra: 14-OH-azidomorfinnal kezelt (60 mg/kg s. c.) patkány vizelet extraktumának IR spektruma.

fin és annak glukuronid konjugátuma ürül (9. ábra). A 10. ábrán látható, hogy a 0,02 Rf-ű vegyület kizárólag azidomorfin-glukuronid, mivel β -glukuronidázos emésztés után ez a folt megszűnik a kromatogramon.

A VIII. táblázat az *azidomorfin N-demetilációjának* intenzitását mutatja májmikroszóma preparátum hatására. A májmikroszómális frakció extraktumában vékonyréteg kromatográfiával változatlan azidomorfint ($R_f = 0,54$) és norazidomorfint ($R_f = 0,22$) találtunk (11. ábra).

A mikroszómával emésztett és a kezelt patkányok vizeletéből kivont azido-vegyületek *IR analízisei* azt mutatták, hogy az azidomorfinnál és a 14-OH-azidomorfinnál az azido-csoportra jellemző karakterisztikus jel 2120 cm^{-1} -nél megmaradt a spektrumban. A 12. ábra az azidomorfin, a 13. ábra a norazidomorfin IR spektrumait mutatja mikroszómával inkubált azidomorfin extraktumából. A 14. és 15. ábrán kezelt állatok vizeletéből extrahált és kromatográfiásan tisztított azidomorfin és 14-OH-azidomorfin IR spektruma látható. Az IR analízisek nem zárják ki az azido-csoport kismérvű átalakulását, azonban nem tudtuk kimutatni a 6-amino-dihidromorfint a vizeletben. A farmakológiai vizsgálatok is ellene szólnak az ilyen irányú nagymérvű átalakulásnak, mivel a 6-amino-dihidromorfin hatástalanabb fájdalomcsillapító az azidomorfinnál mind i. v., mind intraventrikuláris alkalmazás esetén.

Az IR analízisek tehát azt bizonyítják, hogy az azido-szubsztitúció a C6 helyen olyan struktúrához vezet, mely megvédi az azido-csoportot, legalábbis a molekulák zömében, az átalakulástól. A metabolizmus vizsgálatok azt mutatják, hogy az azidomorfinok esetében a fő metabolitikus út mint a morfinnál (Way és Adler 1960, 1962; Way 1968) a glukuronid-konjugáció és az N-demetiláció. Az előbbi a fontosabb út a morfin típusú vegyületek inaktiválásában és egyben jobban elősegíti a vegyületek intenzív ürülését is.

Összefoglalás

Kísérleteinkben az azidomorfin és származékainak szervezeten belüli sorsát vizsgáltuk a morfinnal összehasonlítva. A vizsgálatokhoz a vegyületek radioaktív-jelzett módosulatait használtuk.

Az egésztest autoradiográfiás vizsgálatok azt mutatták, hogy az $N\text{-}^{14}\text{C}$ -metil-azidomorfin intravénás beadása után gyorsan bejut a szövetekbe. A vegyület vagy metabolitja, átjut ugyan a placenta barrieren, a magzati szövetek azonban az anya szöveteinél kisebb koncentrációban tartalmazzák az azidomorfint. A patkányagyak autoradiográfiás analízise azt bizonyítja, hogy a morfin és azidomorfin szorosan kötődik a talamikus és hipotalamikus területekhez.

A kvantitatív vizsgálatok az egésztest autoradiogramokkal egybehangzó adatokat szolgáltatottak. Az azidomorfinok magas koncentrációt érnek el a központi idegrendszerben és gyorsan kiürülnek onnan. A morfin és azidomorfin

egyformán szívódik fel a gyomor-béltraktusból, míg a 14-OH-azidomorfin, azidokodein, azidoetilmorfin felszívódása gyorsabb. Az azido-vegyületek agyi penetrációja is jobb mint a morfiné. Az azidomorfin és azidokodein nagyobb koncentrációban kötődik a mikroszomális frakcióhoz, mint a morfin. Valamennyi vizsgált vegyület a vesén keresztül ürül és a beadott dózis 90%-át találtuk meg a 48 órán át gyűjtött vizeletben. Ugyanezen időtartam alatt csak 2–5% ürült a széklettel.

Az azidovegyületek fő metabolitikus útja a glukuronid konjugáció és az N-demetiláció. Az infravörös spektroszkópiás vizsgálatok azt mutatták, hogy az azido-csoport változatlan marad a szervezetben.

IRODALOM

- Allen, R. M. és Kirby, C. W.: Chem. Comm. 1346 (1970).
 Axelrod, J.: J. Pharmac. exp. Ther. **114**, 430 (1955).
 Beckett, A. M. és Casy, A. F.: Progr. Med. Chem. **2**, 43 (1962).
 Beckett, A. M. és Casy, A. F.: Ibid. **4**, 171 (1965).
 Beckett, A. H. és Morton, D. M.: Biochem. Pharmac. **15**, 937 (1966).
 Bognár, R. és Makleit, S.: Acta Chim. Hung. **58**, 203 (1968).
 Boyd, M. J. és Logan, M. A.: J. biol. Chem. **146**, 279 (1942).
 Closson, W. D. és Gray, H. B.: J. Am. Chem. Soc. **85**, 290 (1963).
 Cruickshank, D. W. J., Filippini, G. és Mills, O. S.: J. C. S. Chem. Comm. 1 (1972).
 Gorman, M. és Ryan, C. W.: Cephalosporins and penicillins. Academic Press, N. Y. 1972.
 Hofmann, L. M., Wagner, H. A. és Jacobs, R. S.: CA **66**, 84302 (1967).
 Hyde-Wyatt, R.: C. A. **79**, 49678 (1973).
 Jones, D. N., Wyse, K. J. és Kime, D. E.: J. Chem. Soc. (c) 763 (1971).
 Kamiya, T., Saito, Y., Hashimoto, S. és Seki, H.: CA **78**, 136624 (1973).
 Knoll, J.: Pharmac. Res. Commun. **5**, 175 (1973).
 Knoll, J. és Zsilla, Gabriella: Biochem. Pharmacol. **23**, 745 (1974).
 Knoll, J., Fürst, Zsuzsanna és Kelemen, K.: Orvostudomány **22**, 226 (1971).
 Knoll, J., Fürst, Zsuzsanna és Kelemen, K.: J. pharm. pharmac. **25**, 929 (1973/a).
 Knoll, J., Fürst, Zsuzsanna és Vizi, E. S.: Pharmacology, **10**, 354 (1973/b).
 Krebs, R.: CA **78**, 71663 (1973).
 Ladik, J. és Messmer, A.: Acta Chim. Hung. **34**, 7 (1962).
 Lowry, H., Rosenbough, N. J., Farr, A. A. és Randall, R. J.: J. biol. Chem. **193**, 265 (1951).
 Mair, A. C. és Stewens, M. F. E.: J. Chem. Soc. Perkin I. 1611 (1972).
 Müller, A. és Messmer, A.: ibid. **38**, 35 (1963).
 Ning, R. Y. és Sternbach, L. M.: J. Med. Chem. **16**, 879 (1973).
 Pauling, L. és Brockway, L. O.: J. Am. chem. Soc. **59**, 13 (1937).
 Porthogese, P. S.: J. Med. Chem. **8**, 609 (1965).
 Porthogese, P. S.: J. Pharm. Sci. **55**, 865 (1966).
 Ramsay, G. H., Bodin, N. O. és Hansson, E.: Arzneim.-Forsch. **22**, 1962 (1972).
 Rétsági, G. és Schwarzmann, Éva: Orvostudomány, **24**, 359 (1973).
 Roberts, J. D.: Chem. Ber. **94**, 274 (1961).
 Ullberg, s.: Acta Radiol. (Stockholm) Suppl. **118**, 1 (1954).
 Way, E. L.: Proc. Ass. Res. nerv. ment. Dis. **46**, 13 (1968).
 Way, E. L. és Adler, T. K.: Pharmacol. Rev. **12**, 383 (1960).
 Way, E. L. és Adler, T. K.: The Biochemical Disposition of Morphine and its Surrogates. World Health Organisation, Geneve (1962).
 Winter, B. A. és Goldstein, A.: Mol. Pharmacol. **6**, 601 (1972).