XIX.

(Aus dem pharmakologischen Institut zu Zürich.)

Über das Verhalten des Morphins im Froschorganismus.

Von

Bronislaw Frenkel aus Warschau.

Arbeiten über das Verhalten des Morphins im Tierorganismus, wie die von Tauber¹⁾, Marquis²⁾, Faust³⁾ und Cloetta⁴⁾, beziehen sich ausschließlich auf den Organismus der Warmblüter. Mit Hinsicht auf den Unterschied der Morphinwirkung bei Warm- und Kaltblüter erschien von Interesse auch das Verhalten des Morphins bei den letztern zu untersuchen. Um so mehr als die Leichtigkeit der Modifizierung äußerer Verhältnisse des Organismus auf den das Morphin einwirkt, hoffen ließ, noch etwas mehr Aufschluß über das Verhalten des Morphins im Tierkörper zu gewinnen.

Die normale Morphinwirkung beim Frosch unterscheidet sich von derjenigen beim Warmblüter namentlich durch das Hervortreten der Erregungssymptome, wobei als charakteristisch hervorgehoben ist das späte Erscheinen der stärksten Symptome (d. Tetanus) und ihre lange Dauer. Nebenbei ist auch die Unmöglichkeit der Angewöhnung der Tiere an das Morphin zu erwähnen.

Die Methode.

Um quantitativ den Morphingehalt im ganzen Froschorganismus oder in einzelnen Organen zu bestimmen, verfuhr ich folgendermaßen.

Die Organe wurden in einer Porzellanreibschale oder in einem Kupfermörser unter Zusatz von Quarzsand und einer geringen Menge von Alkohol zermahlen. Dann wurden sie nach Ansäuren mit Essig-

1) Dieses Archiv Bd. XXVII.

2) Arbeiten des pharmakologischen Institutes zu Dorpat Bd. XIV.

3) Dieses Archiv Bd. XLIV.

4) Dieses Archiv Bd. LI.

säure durch siedenden 96proz. Alkohol 20 bis 30 Minuten extrahiert; sodann filtriert und mit Alkohol ausgewaschen solange bis im Filtrat keine Fröhdesche Morphinreaktion zu erhalten war. Das ganze Filtrat wurde auf dem Wasserbade eingedampft, der Rückstand mit essigsaurem Wasser aufgenommen, und 10—15 Minuten kräftig mit der doppelten Menge vom Petroläther durchgeschüttelt. Die wässrige Lösung wurde dann auf etwa 10 ccm eingeeengt, mit Ammoniak alkalisch gemacht, und mit einer mehrfachen Menge Isobutylalkohol und Chloroform kräftig ausgeschüttelt. (Am leichtesten geht das freie Morphin aus der wässrigen Lösung in eine Mischung von Isobutylalkohol und Chloroform im Verhältnis von 2 : 3 über.) Nach ungefähr drei- bis fünfmaligem Schütteln ist das ganze Morphinquantum in diese Mischung übergegangen. Nach dem Abdunsten des Isobutylalkohols und Chloroforms wurde der Rückstand wieder mit essigsaurem Wasser aufgenommen und filtriert. Da es sich in meinen Versuchen hauptsächlich um den Nachweis und die Ermittlung sehr geringer Morphinmengen handelte, so konnte ich die Methode des Ankrystallisierens nicht anwenden, da sie erst bei Mengen von über 50 mg ordentliche Resultate gibt. Ich bin deshalb in der Weise vorgegangen, daß ich die Menge Morphin bestimmte, die unter Beobachtung gewisser Verhältnisse (Größe der Schälchen, Neigung des Bodens usw.) mit 4 Tropfen Fröhdesches Reagens eine noch deutliche Violettfärbung gibt. Es war dies mit 0,01 mg, während 0,005 mg nur eine sehr schwache Reaktion geben. Auf dieser Basis wurde die quantitative Bestimmung kleiner Morphinmengen durchgeführt in dem die reinen wässrigen Lösungen des isolierten Alkaloids solange mit Wasser weiter verdünnt wurden bis ein bestimmtes Volumen der Lösung eine mit 0,01 mg Morphin identische Reaktion gab. Nach einiger Einübung in diese allerdings immer etwas subjektive Methode bekommt man für kleine Morphinmengen recht gute Resultate, die namentlich den Vorzug haben, daß man nie etwas wiegt, was nicht Morphin ist. Zur Kontrolle habe ich bei etwas größerer Morphinmenge dann auch die völlig wasserklare saure Lösung eingedampft und gewogen. Es ergaben sich ganz regelmäßig einige Milligramm (mindestens 5) mehr bei der Wägung als bei der kolorimetrischen Bestimmung. Wegen der unvermeidlichen Beimischungen habe ich bei kleinen Mengen (unter 8mg) nur die kolorimetrische Bestimmung ausgeführt, denn die Fehlergrenze bei diesen kleinen Mengen beträgt nicht mehr als $\frac{1}{2}$ mg.

Die Versuche wurden ausschließlich an *Rana temporaria* ausgeführt; als Präparat diente Morphinum hydrochloricum.

Das Verhalten des Morphins im Organismus.

Vorerst wollte ich feststellen, ob und in welchem Maße das Morphin durch die Nieren und den Verdauungskanal ausgeschieden wird.

Aus einigen Versuchen ergab sich, daß in den Nieren und der Blase kein Morphin nachzuweisen war; ich wandte mich deshalb dem Verdauungskanal zu.

Nachdem das Morphin eine Zeitlang eingewirkt hatte, wurde der Verdauungskanal (von Cardia bis Anus) herauspräpariert und samt den sorgfältig auf einem Teller gesammelten Ausscheidungen in der oben beschriebenen Weise analysiert. Als Beispiel zitiere ich eine Analyse.

Vers. 13. Am 28. 12. um 3 Uhr nachmittags werden einem Frosche 0,03 gr Morphii hydrochlor. eingespritzt; am 29. 12. um 3 Uhr nachmittags wurde der Frosch getötet. Durch die Bestimmung des Morphingehaltes im Verdauungskanal samt den Ausscheidungen werden 0,008 gr kolorimetrisch, 0,012 gewichtsanalytisch nachgewiesen.

Eine Reihe derartiger Analysen des Verdauungskanals wurden noch verschiedenen langen Einwirkungszeiten des Morphins ausgeführt um zu ermitteln, wie lange der Ausscheidungsprozeß dauert, und wann er sein Maximum erreicht. In Tabelle I sind die diesbezüglichen Resultate zusammengestellt:

Tabelle I.

No. des Versuchs	Eingeführte Morphim- menge	Zeit der Einwirkung in Stunden	Menge des gefundenen Morphins
9	0.05	2	0.003
18	0.03	2	0.004
11	0.04	4	0.004
16	0.03	4	0.007
15	"	6	0.006
19	"	8	0.005
20	"	15	0.007
13	"	24	0.008
41	"	24	0.01
17	"	45	0.015
60	"	36	0.018
61	"	144	0.018
21	"	168	0.02

Aus Tabelle I ist zu ersehen, daß der langsame aber stetige Ausscheidungsprozeß eine ganze Woche dauert und daß in dieser

Zeit das größere Teil des eingeführten Morphins ausgeschieden wird. Das ausgeschiedene Quantum beträgt etwa 66 Proz. des eingeführten. Dieses Quantum beträgt ca. das Doppelte des von Cloetta aus dem Verdauungskanal und aus den Ausscheidungen der Warmblüter (Tauben, Hund, Kaninchen) erhaltenen Morphinquantums, und das Fünffache der von Marquis (Katze) erhaltenen Zahlen. Näher kommen meine Zahlen denen von Faust, der in den Faeces von mit Morphin vergifteten Hunden über 60 Proz. des eingespritzten Morphin wieder gefunden hat.

Um festzustellen, welcher Teil des Verdauungskanals das Morphin ausscheidet, der Magen oder der Darm verfuhr ich folgendermaßen.

Der Magen wurde entweder nach beiderseitiger Unterbindung exstirpiert, oder es wurde der unterbundene Magen in situ gelassen, und dann der Magen einerseits, der Darm mit den Ausscheidungen anderseits einer Analyse unterzogen. Die Versuche ergaben folgende Resultate:

Vers. 50. Magen exstirpiert. Vergiftung dauert 24 Stunden. Analyse des Darmes samt Ausscheidungen ergab 0,002 g.

Vers. 51. Magen exstirpiert. Vergiftung dauert 5 Stunden. Analyse des Darmes samt Ausscheidungen ergab 0,001 g.

Vers. 57. Magen unterbunden, in situ gelassen. Vergiftung dauert 4 Stunden. Im Magen eine Spur von Morphin (ca. 0,02—0,03 mg); im Darm 0,5 mg.

Vers. 52. Magen unterbunden, in situ gelassen. Vergiftung dauert 24 Stunden. Im Magen 0,0001, im Darm samt den Ausscheidungen 0,003 g.

Vers. 56. Magen nur einseitig, beim Pylorus unterbunden. Vergiftung 24 Stunden. Im Magen keine Spur von Morphin, im Darm und in den Ausscheidungen 0,01 g.

Vers. 58. Magen beiderseits unterbunden, in situ gelassen. Vergiftung dauert 48 Stunden. Im Magen keine Spur von Morphin, im Darm 0,007 g.

Aus diesen Versuchen ergibt sich somit, daß in dem abgebuenden Magen nur Spuren vom Morphin ausgeschieden werden, größere Mengen in dem Darm, daß ferner noch Exstirpation des Magens die Darmausscheidung sich nicht wesentlich verändert (obwohl im Vergleich zu der Ausscheidung unter normalen Bedingungen die mit dem Darm ausgeschiedene Morphinmenge hier eine etwas kleinere ist).

Aus diesen Versuchen darf vielleicht geschlossen werden, daß die Hauptausscheidung normalerweise durch den Darm erfolgt.

Wie schon aus den Analysen des Verdauungskanal (Tab. I) ersichtlich ist, konnte nicht die gesamte eingespritzte Morphinmenge wieder in den Ausscheidungen nachgewiesen werden. Zur weiteren Klärung der Frage nach einer anfälligen Zerstörung des Morphins werden Analysen des Gesamttieres (samt Ausscheidungen) nach Ablauf von 24 Stunden ausgeführt; die Tiere befanden sich unter einer oben offenen Glasglocke im Zimmer.

Vers. 23. Eingeführt 0,03 g M. hydr. Nach 24 Stunden Frosch getötet: Wiedergefunden 0,025 g.

Vers. 41. Eingeführt 0,03 g M. hydr. Nach 24 Stunden Frosch getötet: Wiedergefunden 0,028 g.

Es ergibt sich aus diesen beiden Versuchen, daß der Froschorganismus offenbar nur eine ganz kleine Menge des Giftes innerhalb 24 Stunden zu zersetzen imstande ist. Weiter versuchte ich zu bestimmen, ob die Verminderung der Ausscheidung einen Einfluß auf die Fähigkeit des Frosches Morphin zu zerstören gewinnt.

Vers. 59. Magenexstirpation. Eingespritzt 0,03 g M. hydr. Nach 24 Stunden ausgeführte Analyse des Darmes samt Ausscheidungen zeigt 0,004 g M. hydr., also ungefähr die Hälfte des unter normalen Bedingungen ausgeschiedenen Morphin. Analyse des Gesamtkörpers samt Ausscheidungen ergibt 0,028 g M. hydr.

Die verminderte Ausscheidung steigert also nicht die Fähigkeit des Froschorganismus das Morphin zu zersetzen.

Da jedoch der Ausscheidungsprozeß, wie wir bereits gesehen haben, nur sehr langsam vorsiehet, mußte gefragt werden, wo im Organismus das Gift vor seiner Ausscheidung abgelagert wird. Um dies zu ermitteln wurden mehrere Analysen der Leber ausgeführt.

Tabelle II.

No. des Versuchs	Menge des eingeführten Morphins	Vergiftungs- Zeit in Stunden	Wiedergefundene in der Leber Morphinmenge
28	0.03	2	0.0013
22	"	4	0.002
31	"	4	0.003
24	"	24	0.0013
32	"	48	0.0005
34	"	168	0.0

Auf Grund dieser Analysen kann geschlossen werden, daß ein Teil des Morphins in der Leber abgelagert wird. Das Morphinquantum in der Leber erreicht sein Maximum nach 4 Stunden.

Wie noch andere Versuche zeigen (Analyse von Knochen samt den Muskeln) wird in der Zeit von 4 bis 8 Stunden nach der Vergiftung das größte Giftquantum in den einzelnen Organen abgelagert. Ähnliches sehen wir nach Marquis¹⁾ bei den Katzen. Eine halbe Stunde nach der Vergiftung fand er in der Katzenleber 38 Proz. des eingeführten Morphins in unveränderter Form. Allmählich schwand das Morphin (in dieser Form) aus der Leber; dagegen wurde es nach Marquis dort in veränderter Form (Verbindungen) gefunden, was beweisen könnte, daß in eben diesem Organ das Morphin als solches zersetzt werde. Diesbezügliche Untersuchungen habe ich nicht unternommen; da aber im Froschorganismus überhaupt nur eine geringe Menge des Morphins zersetzt wird, so kann gefolgert werden, daß auch die Veränderung des Morphins in der Froschleber normalerweise eine kleine ist.

Ich habe ferner eine Milzanalyse (Versuch 55) ausgeführt, bei welcher zwei Stunden nach der Vergiftung keine Spur von Morphin zu finden war. Dies stimmt mit den Ergebnissen von Marquis der in der Katzenmilz nur Spuren von gepaarten Morphinen gefunden hat.

Es wurde weiter die Muskelsubstanz untersucht; hierfür wurden einige Zeit nach der Vergiftung jeweils 2 g Muskelsubstanz des Oberschenkels exstirpiert und analysiert. Die zwei Versuche (62 und 63), bei denen nach 5 Stunden und 24 Stunden nach der Vergiftung die Analyse der Muskeln ausgeführt wurde, ergaben im ersten Falle 0,001 g M. hydr. im zweiten 0,00075 g M. hydr. Die verwendete Gewebemenge entsprach je 5 Proz. des Körpergewichtes. Nach diesen Versuchen scheint also neben der Leber auch das Muskelgewebe ein Depôt für das eingeführte Gift darzustellen.

Es wäre auch noch von Interesse gewesen, festzustellen, wie schnell das Morphin von der Injektionsstelle verschwindet, möglicherweise geschieht das ja sehr langsam.

Leider gibt es beim Frosch keinen abgeschlossenen Lymphsack; die für die Injektion gebräuchlichen kommunizieren alle mehr oder weniger offen mit anderen Lymphräumen, sodaß eine quantitative Untersuchung über die lokale Resorption als aussichtslos betrachtet werden mußte.

Als Ersatz hierfür machte ich Blutanalysen zu verschiedener Zeit nach der Morphininjektion. Es wurden Mengen von 0,6—0,2 g Blut untersucht. In 4 derartigen Experimenten (Versuche 65, 66,

1) Loco citato.

67, 68) ergab sich, daß 1 Stunde nach der Injektion von 0,03 m. h. nur 0,1 mg Morphin wiedergefunden wurde, was einer zirkulierenden Menge von ca. 0,4 mg entsprach. Zwei Stunden nach der Injektion war kein Morphin mehr im Blut nachzuweisen. Diese Befunde beruhigen uns auch darüber, daß das in den Muskeln gefundene Morphin nicht etwa auf deren Blutgehalt beruhte.

Es sollte noch das Verhalten des Morphins in den wichtigsten, weil seiner Wirkung am meisten unterliegenden Organen, im Gehirn und im Rückenmark untersucht werden. Anfangs wurden diese Organen samt ihrer Knochen- und Muskelhaut analysiert. Das Morphin wurde bei diesen Versuchen wiederum nach 4 Stunden in größter Menge erhalten (vergleiche Tabelle II). Als aber dann das zentrale Nervensystem allein, nach Auspräparierung desselben aus dem Cerebrospinalkanal, der Analyse unterzogen wurde, ergaben sämtliche Analysen (Versuche 35, 39, 36, 37) ein negatives Resultat. Dies stimmt mit den Ergebnissen der Untersuchungen an Warmblütern von Marquis und Cloetta überein. Wir dürfen also für den Frosch, wie für die Warmblüter annehmen, daß das Morphin vom Gehirn und Rückenmark, falls es zur Wirkung gelangt, zerstört wird. Dagegen enthalten die jene Organe einhüllenden Substanzen (Knochen und Muskeln) nicht unbedeutende Mengen von Morphin, was hinweist, daß das Morphin dort einer Zerstörung nicht unterliegt.

Damit wurden die Untersuchungen über das Verhalten des Morphins im Froschorganismus unter normalen Bedingungen abgeschlossen.

Das Verhalten des Morphins im Organismus unter veränderten äußeren Bedingungen.

Nun schritt ich zur Untersuchung des Frosches unter künstlich veränderten äußeren Bedingungen; die Ergebnisse meiner vorher beschriebenen Versuche dienten jetzt als Vergleichsmaterial.

Vorerst wurde die Temperatur künstlich variiert.

Vers. 45. Nach Einspritzung von 0,03 g M. hydr. wurde der Frosch auf den Hof getragen. Die Temperatur wechselte im Laufe der 24 Stunden von $+4^{\circ}$ während des Tages bis -2° während der Nacht. 24 Stunden nach der Vergiftung ergab die Analyse des Froschorganismus mitsamt den Ausscheidungen 0,026 g M. hydr. Analyse des Verdauungskanal allein 0,0006 g.

Die Ausscheidung geht also, wie überhaupt alle Lebensfunktionen des Frosches in solch niedrigen Temperaturen viel langsamer vor sich.

Vers. 30. Der Frosch wurde auf den Brutschrank gestellt. Nach Ablauf einiger Stunden, als die Temperatur des Frosches um ungefähr 6° gestiegen war, wurden 0,03 g M. hydr. eingespritzt. Die Gesamtanalyse nach 24 Stunden ergab 0,01 g.

Vers. 44. Wiederholung des obigen Versuches. Unter denselben Bedingungen: Analyse ergab 0,02 g M. hydr.

Vers. 48. Wiederholung des obigen Versuches. Unter denselben Bedingungen: Analyse ergab 0,017 g M. hydr.

Die Analyse des Darmes samt den Ausscheidungen bei Erhöhung der Temperatur des Frosches um 5°—7° ergab:

Vers. 26. Einspritzung von 0,03 g M. hydr. Nach 24 Stunden im Darm + Ausscheidungen 0,006 g wieder gefunden.

Vers. 44. Einspritzung von 0,03 g M. hydr. Analyse des Verdauungskanales und der Ausscheidungen nach 24 Stunden wieder gefunden — 0,01 g.

Vers. 48. Wie vorher. Analyse ergab 0,012 g M. hydr.

Aus obigen Analysen ist zu ersehen, daß der Ausscheidungsprozeß des Morphins bei erhöhter Temperatur im Vergleich mit der Ausscheidung unter normalen Bedingungen im Durchschnitt keine nennenswerte Veränderung erleidet, dagegen erhöht sich das im Körper zersetzte Morphinquantum im Durchschnitt um 30—40 Proz.

Um zu ermitteln, ob die Oxydationsprozesse für die Morphinzersetzung im Tierorganismus von Bedeutung sind, hat seinerzeit Cloetta in mehreren Versuchen die Menge des freien Sauerstoffes im Organismus zu vermindern gesucht, um den Einfluß dieser Sauerstoffverminderung auf die Morphinzersetzung festzustellen. Zu demselben Zwecke machte ich den umgekehrten Versuch. Das Quantum des freien Sauerstoffes im Organismus suchte ich zu erhöhen, indem ich den Frosch nach der Morphineinspritzung in eine Atmosphäre von reinem Sauerstoff versetzte.

Zu diesem Zweck wurde der Frosch unter eine aufgeschliffene Glasglocke gesetzt und langsam Sauerstoff vom Boden aus zugeleitet. Durch eine feine Glaskanüle entwich das entsprechende Luftquantum wieder aus der Glocke, wobei aber die Anordnung so getroffen war, daß unter der Glocke ein etwas erhöhter Druck (ca. 30 mm H.) herrschte.

Durch Anwendung einer Sauerstoffbombe mit Reduktionsventil konnte diese Anordnung beliebig lange konstant erhalten werden. Derartige Versuche würden wahrscheinlich bei Warmblütern weniger Erfolg versprechen als beim Frosch mit seiner Hautatmung und seiner geringen O-aufnahme aus der Luft.

Vers. 27. Es werden dem Frosch 0,03 g M. hydr. eingespritzt und derselbe für 24 Stunden bei Zimmertemperatur unter die Glocke gebracht, worauf die Analyse des Gesamtkörpers samt Ausscheidungen folgte. Gefunden 0,0025 g M hydr.

Vers. 40. Dieselben Bedingungen. Gefunden 0,015 g M. hydr.

Vers. 69. Dieselben Bedingungen. Gefunden 0,015 g M. hydr.

Betrachten wir die letzteren zwei Befunde als maßgebend, angenommen, daß der Versuch 27 fehlerhaft war, so können wir dennoch eine Zunahme der Morphinzersetzung konstatieren im Vergleich zu den unter denselben Bedingungen (S. □) ohne O-Zufuhr ausgeführten Versuchen.

Die Analyse des Darmes, nach 25ständiger Morphineinwirkung unter Sauerstoffdruck (Versuche 25, 40), ergab 0,0025 g M. hydr. — d. i. eine beträchtliche Abnahme der ausgeschiedenen Menge im Vergleich mit der Ausscheidung unter normalen Bedingungen.

Das Zusammenwirken der beiden künstlichen Bedingungen (Temperaturerhöhung und Sauerstoffdruck) ergab folgendes:

Vers. 46. Der Frosch auf den Brutschrank gestellt, nach einigen Stunden Temperatur erhöht um 5°. Eingespritzt 0,03 g M. hydr. Der Frosch bleibt weitere 24 Stunden auf dem Brutschrank unter Sauerstoffdruck. Analyse des Verdauungskanal samt Ausscheidungen ergibt 0,0025 g. Analyse des Gesamtkörpers samt Ausscheidungen — 0,012 g. M. hydr.

Aus allen oben angeführten Versuchen folgt, daß bessere Oxydationsbedingungen die Fähigkeit des Froschorganismus das eingeführte Morphin zu zersetzen, bedeutend verstärken. Auch die erhöhte Temperatur, indem sie ja alle chemischen Prozesse, die im Organismus vor sich gehen, beschleunigt, könnte in diesem Falle durch Beschleunigung des Oxydationsprozesses ihren Einfluß ausüben. Jedenfalls sprechen aber die Versuche bei gewöhnlicher Temperatur und vermehrter O-Zufuhr für die große Bedeutung der Oxydation im ganzen Zersetzungsprozeß des Morphins im Organismus.

Zu demselben Schlusse gelangt schon seinerzeit C l o e t t a, indem er, wie es schon oben betont wurde, in entgegengesetzter Richtung (Verminderung der Oxydation) Versuche anstellte. Damit soll noch nicht ausgeschlossen werden, daß ein gewisser Teil des in den Organismus eingeführten Morphin auch durch Spaltung zersetzt werden könnte. Damit möchte ich auch keine Schlüsse ziehen auf die Verhältnisse der Morphinzerstörung bei der Erscheinung der Morphinsucht, denn das ist ein Symptomenkomplex ganz für sich.

Aus meinen Versuchen ergibt sich folgendes:

Der Frosch hält das Morphin sehr lange im Körper zurück, es dauert 8 Tage bis nach der Injektion alles eliminirt ist, die Ausscheidung geschieht nur durch den Verdauungskanal. Als Ausscheidungsorgan scheint hauptsächlich der Darm in Betracht zu kommen.

Der Frosch besitzt nur ein sehr geringes Zerstörungsvermögen für Morphin, indem nach 24 stündiger Vergiftung nur ca. 10 Proz. des Morphin zerstört werden und sogar nach 8 Tagen 66 Proz. in den Ausscheidungen wiedergefunden werden.

In der Leber und den Muskeln läßt sich Morphin noch längere Zeit (48 Stunden) nach der Vergiftung nachweisen, nicht — im Gehirn und Rückenmark.

Die Zerstörung des Morphins im Organismus wird durch Erhöhung der Temperatur und des Sauerstoffdruckes wesentlich begünstigt, es handelt sich also wohl um einen oxydativen Abbau.

Ob die geringe Fähigkeit zur Morphinzerstörung als die Ursache der auch von mir festgestellten Unmöglichkeit Frösche an Morphin zu gewöhnen im Sinne der von Faust¹⁾ vertretenen Anschauung über Morphinsucht gelten kann, müssen weitere Versuche abklären.

1) Dieses Archiv Bd. XLIV.