Physiologische Wertbestimmung von Filixsubstanzen und Filixextrakten.

Von
Seiichi Yagi.

(Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Freiburg i. Br.)

Mit 2 Tafeln

(Eingegangen am 13. November 1913.)

Die Chemie der Filixbestandteile und ihrer Spaltungsprodukte gehört durch die Untersuchungen von Boehm¹⁾, Poulsson²⁾ und Kraft³⁾ zu den gut erforschten Kapiteln der Pflanzenchemie. Trotzdem stehen heutzutage noch die Filixdrogen und ihre galenischen Präparate in dem Rufe der unsicheren und unzuverlässigen Medikamente. Das mag zum Teil davon herrühren, daß bekanntlich der Gehalt der Ausgangsmaterialien an sogenanntem Rohfilicin⁴⁾ ein sehr wechselnder ist, zum andern Teile aber davon, daß man den Anteil der einzelnen isolierten Bestandteile an der therapeutischen Wirkung für pharmakologisch noch nicht völlig geklärt halten zu müssen glaubt. Die von Boehm isolierte wirksamste Substanz, Filixsäure, ist nach Poulsson und Straub im experimentell-therapeutischen Versuch, Bandwürmer an Tieren abzutreiben, als ungeeignet gefunden worden, während das amorphe Filmaron Krafts von manchen als der wirksame Körper überhaupt angesehen wird. Da aber von Straub nachgewiesen wurde, daß alle unzersetzten Boehmschen Filixsubstanzen für alle untersuchten niederen Tiere von einer enormen, fast spezifischen Toxizität sind, ist es doch nicht glaubhaft, daß diese Substanzen auch in der Form des Filixextraktes wirkungslos, sondern im Gegenteil wohl nach Maßgabe ihrer Quantität an der Wirkung mit beteiligt sein müssen. Die Pharmakopoe sieht keinerlei chemisches Prüfungsverfahren oder Wertbestimmung der Filixdrogen vor; und man wird dieser Zurückhaltung aus den eingangs erwähnten Gründen zustimmen können. Straub fand nur im Regenwurm ein Objekt von hoher Empfindlichkeit gegen die Filixsubstanzen, und da diese Versuchstiere in größtem Maße und mit größter

¹⁾ R. Boehm, Archiv f. experim. Pathol. u. Pharmacol. **38**. 1897; Annalen d. Chemie u. Pharmazie **301**, 1898, **307**, 1899 und **318**, 1901.

²⁾ E. Poulsson, Archiv f. experim. Pathol. u. Pharmacol. **29**. 1891.

³⁾ E. Kraft, Archiv f. Pharmazie. 1904.

⁴⁾ Kommentar z. D. A. B. 5. Ausg. 1910 von Anselmino und Gilg, S. 505.

Leichtigkeit zu beschaffen sind, ist daran zu denken, sie zur Auswertung, zur Ausprobierung einer physiologischen Wertbestimmung zu benutzen. Auf Veranlassung von Professor Straub habe ich diese Untersuchung durchgeführt und berichte hiermit über ihre ersten Resultate.

Technik: Zur Verwendung gelangten die reinen Substanzen Boehms, Filixsäure, Albaspidin¹⁾, und das Kraftsche Filmaron, das von der Firma C. F. Boehringer in Mannheim in Substanz uns geliefert wurde. Bekanntlich besteht eine Schwierigkeit der Applikation in der Wasserunlöslichkeit und in der Zersetzlichkeit der Filixsubstanzen. Wir haben uns wässrige Lösungen der Magnesiumsalze der Substanzen in der Weise hergestellt, daß wir eine annähernd gewogene Menge der reinen Säure mit Magnesia usta und wenig Wasser zum Brei verrieben und die genaue Titerstellung in dem Filtrat vornahmen. Dazu wurde zunächst eine Trockenbestimmung z. B. der Filixsäuremagnesia bis zur Gewichtskonstanz gemacht und der effektive Magnesiumgehalt durch eine Aschenanalyse ermittelt. In dieser Weise stellten wir uns Stammlösungen von einem Gehalt von 0,107% Filixsäure, 0,202% Filmaron, 0,119% Albaspidin dar.

Da über die allgemeine pharmakologische Charakterisierung des Filmarons noch nichts bekannt ist, habe ich zunächst seine Wirkung an großen Regenwürmern studiert. Wie schon Straub beschrieben, gelingt es ganz leicht, den Tieren subkutan zwischen Muskelschlauch und Typhlosolis eine ausreichende Quantität von Lösungen, also ca. 0,1 ccm zu injizieren. Die Erscheinungen der Filmaronvergiftung sind genau dieselben wie die seinerzeit von Straub für den Regenwurm beschriebenen. An der Injektionsstelle wird zunächst der Hautmuskelschlauch nach ca. 2 Stunden tonuslos. Die Tiere liegen unbeweglich in ihren Beobachtungsgefäßen, was schon aus der Tatsache erhellt, daß die Autochromphotographie mit 3 Minuten Exposition ein scharfes Bild liefert. Bei Berührung der Injektionsstelle, die sich übrigens sehr bald nach der Injektion auf einen Bereich von 1—2 cm Länge erweitert, erweist sich diese als direkt kaum reizbar. Es ist also zweifellos, wie das von Straub für die Filixsäure beschrieben wurde, auch bei Filmaron die Muskellähmung die erste Wirkung des Giftes. Reizt man eine nichtvergiftete Stelle, so zuckt das ganze Tier mit Ausnahme der vergifteten Stelle, d. h. es geht der Nervenreiz offenbar noch durch die ganze Bauchganglienketten hindurch, also auch jene Stelle, die von Filmaronlösung umgeben ist, oder mit andern Worten: die Muskelwirkung ist jedenfalls die erste. Dementsprechend kann man auch

¹⁾ Von Herrn Prof. Boehm freundlichst zur Verfügung gestellt.

feststellen, daß elektrische Reizung der Bauchgangliengegend an der Injektionsstelle anfangs noch von Zuckungen des Körperanfanges oder -endes beantwortet wird. Nach längerer Einwirkungsdauer wird aber die Nervensubstanz vergiftet, denn es steigt die Schwelle des elektrischen Reizes an der vergifteten Stelle, und ein am Körperende applizierter Reiz wird in den späteren Stadien nicht mehr zum andern Pole fortgeleitet, d. h. es wird offenbar auch das Zentralnervensystem der Tiere von dem Filmaron vergiftet. Das Filmaron reiht sich also seiner pharmakologischen Stellung gleichwertig den andern Filixsubstanzen an¹⁾. Die Vergiftung bleibt übrigens nicht streng lokalisiert, sondern greift trotz der inneren Segmentierung der Tiere weit nach vorn und hinten über, so daß endlich ein mehrere Zentimeter langes Stück schon äußerlich schwer vergiftet erscheint (Tafel IV, Fig. 3). Mit einer einzigen lokalen Injektion ist es aber nicht möglich, das ganze Tier mit gleichmäßiger Tiefe zu vergiften, denn schließlich behalten die Körperenden doch wenigstens immer noch ihre Form, während die Injektionsstelle rasch, d. h. nach etwa 8—10 Stunden, sich völlig unter Austritt von Blut und irisierender Verfärbung der Cuticula (Tafel IV, Fig. 3) aufzulösen beginnt (Tafel IV, Fig. 4). In diesen Spätstudien bemerkt man auch das ungleichmäßige Fortschreiten der Vergiftung daran, daß nicht primär vergiftete Stellen ebenfalls zerfließen (Tafel IV, Fig. 4).

Die physiologische Wertbestimmung unserer Substanzen setzt vollständige Gleichmäßigkeit der Vergiftung über das ganze Tier oder strenge Lokalisierbarkeit auf die Injektionsstelle voraus. Beides ist nicht zu erreichen, und infolgedessen mußte ich darauf verzichten, quantitative Resultate mit der Injektionsmethode zu bekommen.

Es blieb also nichts anderes übrig als zu untersuchen, ob etwa durch Eintauchen der ganzen Tiere in die Lösungen selbst eine Messung sich ermöglichen ließe, und tatsächlich führte diese sehr einfache Methode zum Ziel. Es wurden in jedes Gefäß eine Serie von 5 Stück gleich großer, frisch gefangener Regenwürmer von etwa 5 cm Länge gegeben und die entsprechend verdünnten Lösungen der zu prüfenden Substanz zugesetzt. Es ergab sich zunächst schon eine absolute Toxizitätsgrenze, die für Filixsäure bei einem Gehalt von 0,00097%, für Albaspidin bei 0,0004% und bei Filmaron bei 0,0003% liegen, bei einer Zimmertemperatur von 18° und einer Flüssigkeitstemperatur von 17°. Diese Werte wurden im Juli gewonnen. Eine spätere Kontrolle im November, also zur Zeit, wo die Tiere sich anschicken, in die tieferen Regionen zur Winterruhe zu kriechen, ergab

¹⁾ Auch an anderen niederen Tieren ist Filmaron von der gleichen Artgiftigkeit der Filixsäure; so sterben Wasserschnecken, wie Planorbis, in sehr verdünnten Filmaronlösungen mit großer Geschwindigkeit.

Tabelle I.

mg in 100 c c	Zeit bis zum Tode		
	Filixsäure	Albaspidin	Filmaron
2	1h 30m		
	1 30		
	1 30		
	1 30		
	2		
1	2 30	1h 30m	30m
	2 30	1 30	30
	3	2 30	30
	3	3	30
	3	3	30
0,9	3	2 30	1h
	3	3	1
	3 30	3	1 30
	4 30	3	1 30
	5	3	1 30
0,8	5	3	1 30
	—	3 30	1 30
	—	3 30	1 30
	—	3 30	2
	—	4	2
0,7	—	3 30	2
	—	4	2 30
	—	4	2 30
	—	4	2 30
	—	4	2 30

mg in 100 c c	Zeit bis zum Tode		
	Filixsäure	Albaspidin	Filmaron
0,6	—	4	3
	—	4	3
	—	4 30	3
	—	4 30	3
	—	5	3
0,5	—	4 30	3 30
	—	4 30	3 30
	—	5 50	3 30
	—	6	4
	—		4
0,4	—	6	4
	—	—	4
	—	—	4
	—	—	4 30
	—	—	4 30
0,3	—	—	4 30
	—	—	4 30
	—	—	5
	—	—	5
	—	—	5 30
0,2	—	—	—
	—	—	—
	—	—	—
	—	—	—
	—	—	—
Zimmertemperatur			17—16° C

In jedem der 33 Gefahr, je 5 gleich große Würmer. — bedeutet: das Tier überlebt.

Filixsäure 0,0009%
 Albaspidin 0,0005%
 Filmaron. 0,0003%

also eine gute Übereinstimmung mit den früheren Werten. Unterhalb dieser Konzentrationen zeigten sich nur geringe Lähmungserscheinungen, die nach Herausbringen in frisches Wasser glatt zurückgingen. Ober-

¹⁾ Für diese Untersuchung verwandte ich ausschließlich die kleine, braunrot gefärbte Art *Allolobophora foetida*, die lebhafter und filixempfindlicher ist als die kleinen Exemplare von *Lumbricus*. *Allolobophora* hat zudem den Vorzug, daß man sie leicht und fast in „Reinkultur“ gewinnt, wenn man in der Nähe von Düngerhaufen gräbt.

halb der Konzentrationsgrenze starben die Tiere, auch wenn sie wieder in frisches Wasser zurückgesetzt wurden. Die Genauigkeit der Messung ist also eine gute. Es besteht im allgemeinen bei tödlichen Lösungen eine Proportionalität zwischen Konzentration des Giftes und der Zeit, in der die Tiere starben, wie aus der Tabelle zu ersehen ist. Jedenfalls ergibt sich, daß große Unterschiede der Toxizität der 3 untersuchten Substanzen nicht bestehen, daß aber jedenfalls das Filmaron auch in Hinsicht seines relativ größeren Moleküls die wirksamste Substanz ist.

Bekanntlich sind die Filixsubstanzen in reinem Zustand sehr zersetzlich. Durch Abspaltung einer Buttersäuregruppe und gleichzeitiger Verfärbung verlieren sie, wie von Boehm gefunden, schließlich völlig an Wirksamkeit. Ich habe den Verlauf dieser Zersetzung verfolgt und konnte sie messend in der Weise bestätigen, daß die Lösungen der Magnesiumsalze, die 14 Tage im Eiskasten aufbewahrt wurden, sehr beträchtlich an Titer verloren: z. B. sank der Wert der Filixsäure auf ca. $\frac{1}{16}$, der des Albaspidins auf ca. $\frac{1}{8}$ und der des Filmarons auf ebenfalls $\frac{1}{8}$ im Laufe der 14tägigen Zersetzung unter den günstigen Konservierungsbedingungen der niederen Temperatur. Ich will auf die quantitativen Differenzen keinen besonderen Wert legen und meine Feststellungen nur zu der Konstatierung verwerten, daß auch das Filmaron als Magnesiumsalz sehr merklich seinen Titer verliert.

Wertbestimmung des Filixextraktes.

Nachdem auf diese Weise genaue Werte für die Wirksamkeit der reinen Substanzen Filixsäure und Filmaron gefunden wurden, konnte um so eher auf dieser Grundlage an die physiologische Wertbestimmung des ätherischen Extraktes gegangen werden, als von Straub seinerzeit für die anderen von Boehm isolierten Filixbestandteile eine geringere Wirksamkeit als für Filixsäure festgestellt war. Die technische Schwierigkeit lag nunmehr nur darin, alle wirksamen Substanzen der zu untersuchenden Extraktprobe in wässrige Lösung überzuführen, deren Toxizität dann mit den Regenwürmern zu prüfen waren. Im ätherischen Extrakt sind die wirksamen Substanzen bekanntlich in Fett gelöst und mit Wachs usw. verunreinigt; dadurch war der zu betretende Weg vorgezeichnet. Ich verfuhr in der Weise, daß die Extraktprobe zunächst im Schwefelsäure-Exsikkator getrocknet wurde, wobei sie durchschnittlich 1—2% ihres Gewichtes als Wasser oder Äther verlor. Darauf wurde die gewogene Menge in einem bestimmten Quantum Äther gelöst und die ätherische Lösung mit einer gesättigten Lösung von Magnesium-Hydroxyd geschüttelt. Die Magnesiumhydroxydlösung wurde einfach gewonnen durch Verreibung von *Magnesia usta* mit Brunnenwasser und Filtration. Man muß die Verhältnisse so

wählen, daß für die zu erwartende Menge von Filixsubstanzen einerseits eine hinreichende Menge Magnesium vorhanden ist und daß andererseits die Wassermenge groß genug ist, um den Äther vollständig zu lösen. Einige Vorversuche im Reagensglas lassen rasch die richtige Kombination finden. Auf diese Weise gelingt es leicht, alle wirksamen Substanzen des Extraktes mit großer Geschwindigkeit in die wässrige Lösung ihrer Magnesiumsalze überzuführen. Natürlich löst sich dabei das Fett, Öl und Wachs des Extraktes nicht mit, es schwimmt nach einiger Zeit als sehr dünne Schicht auf der wässrigen Lösung. Zur Kontrolle habe ich diese Schicht abgehebert, mit *Magnesia usta* verrieben, die Verreibung mit Wasser extrahiert und auf Wirksamkeit mit Regenwürmern geprüft; sie erwies sich als unwirksam, es ist also tatsächlich alles Wirksame aus dem Extrakt in die wässrige Lösung übergeführt. Kontrollversuche ergaben, daß die Magnesiumhydroxylösung an sich, sowie das Ätherwasser und schließlich auch die Summe beider keine schädliche Wirkung auf die Regenwürmer ausübt. Der Gehalt der Extrakte an wirksamen Substanzen ist groß genug, um eine wässrige Lösung der Magnesiumsalze von einer Konzentration zu liefern, die noch in mehrfacher Verdünnung tödliche Wirkung äußert. Von den so erhaltenen wässrigen Lösungen der Magnesiumsalze der Filixsubstanzen wurden verschiedene Verdünnungsgrade hergestellt und ermittelt, in welchem eben gerade die Regenwürmer starben. Dieser Wert ist dann äquivalent zu setzen der tödlichen Grenzkonzentration einer beliebigen bekannten Substanz aus dem Extrakt. Mit Rücksicht darauf, daß die Filixsäure der bestdefinierte chemische Körper mit gleichzeitig hoher Toxizität ist, habe ich auf diese die Werte eingestellt. Es ergab sich z. B. für ein Extrakt der Firma B. in M. folgendes:

Extrakt B.

Abgewogen ca. 1,0 g.

Im Exsikkator bis zur Gewichtskonstanz behandelt = 0,988 g.

Die ganze Menge gelöst in 25,0 ccm Äther, d. h. Extraktkonzentration im Äther = 3,95%.

Genau 1,0 ccm der ätherischen Lösung mit 0,0395 g Extraktgehalt wird in 50,0 ccm gesättigte Magnesialösung eingetragen, d. h. Extraktkonzentration der wässrigen Lösung = 0,079%.

Von dieser Stammlösung werden vier Verdünnungsgrade hergestellt entsprechend

1. 0,0035 %
2. 0,0026 %
3. 0,00176 %
4. 0,00088 %

in jedes Gefäß kommen 5 gleichgroße Würmer. Die Tiere in 1 und 2 sterben alle, die in 4 überleben alle, in 3 überlebt ein Tier, also liegt die Wirksamkeitsgrenze bei 0,00176% Extraktlösung.

Dieser Wert ist äquivalent einer 0,0009proz. Lösung von Filixsäure. Den Filixsäurewert als 1 gesetzt ergibt für den B-Extrakt = 0,5 Filixsäurewirksamkeit,

er ist ebenso äquivalent 0,0005% Albaspidin, und 0,0003% Filmaron, das gibt für denselben Extrakt 0,21 Albaspidinwirksamkeit, bzw. 0,17 Filmaronwirksamkeit.

Aus früher erörterten Gründen ist angezeigt, auf den Filixsäurewert einzustellen.

Auf diese Weise habe ich eine Reihe von Extrakten des Handels untersucht, darunter auch einen, der ca. 15 Jahre alt war. Ihre Wirksamkeit war ungefähr von gleicher Größenordnung, wie die des B-Extrakts, nur etwas geringer, nämlich 0,37—0,33 Filixsäurewirksamkeit. Ich möchte diese letzteren Resultate aber noch nicht zu der Behauptung verwerten, daß die Extrakte alle ziemlich gleichen Wirkungswert haben. Dazu sind meine Messungen in diesem Punkte weder genügend zahlreich noch genügend systematisch. Da angegeben wird, daß die Ausbeuten an Rohfilizin aus den verschiedenen Farrhizomen sehr schwanken, ist es nicht unwahrscheinlich, wenn auch keineswegs nötig, daß auch die Extrakte die gleichen Schwankungen mitmachen. Es erscheint wünschenswert, daß die medizinisch wichtige Frage nach der Wirkungszuverlässigkeit der Filixextrakte von pharmazeutischer Seite bearbeitet wird. Die Methode dazu ist in meiner Mitteilung gegeben.

Erklärung der Tafeln III und IV.

Großer Regenwurm (*Lumbricus agricola*) im Laufe einer Vergiftung durch subcutane Injektion von 0,1 cem einer 0,2proz. Filmaronlösung. Autochromaufnahmen.

- Fig. 1. Ca. 60 Min. nach der Injektion. Injektionsstelle und ihre nächste Umgebung gelähmt. Die unvergifteten Teile haben sich während der 2 Min. dauernden Aufnahme bewegt. Etwas verkleinert.
- „ 2. 4 Stunden später. Das ganze Tier unbeweglich. Die Injektionsstelle tonuslos. Natürliche Größe.
- „ 3. 10 Stunden später. Die Injektionsstelle stärkst vergiftet. Caudalwärts von ihr ein neues, durch Resorptions entstandenes Wirkungsmaximum. Natürliche Größe.
- „ 4. Nach 24 Stunden. Das Tier zerfließt. Bintaustritt. Natürliche Größe.