

Chicoree-Säure und deren Derivate aus Echinacea-Arten

Chichoric Acid and Its Derivatives from *Echinacea* Species

H. Becker and W. Ch. Hsieh

Institut für Pharmazeutische Biologie, Universität Heidelberg, Im Neuenheimer Feld 364, D-6900 Heidelberg

Z. Naturforsch. **40c**, 585–587 (1985);
received March 27, 1985

Echinacea Species, Chichoric Acid, Caffeic Acid Derivatives

Echinacea angustifolia and *E. purpurea* contain in all plant parts chichoric acid as well as chichoric acid derivatives: chichoric acid methyl ester and chichoric mono and dimethylether.

Einführung

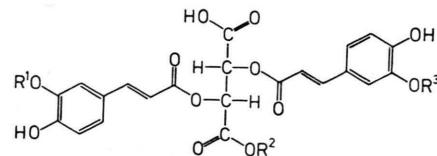
Echinacea angustifolia und *E. purpurea* werden in zahlreichen phytotherapeutischen Zubereitungen, vorwiegend als Mittel zur Steigerung der körpereigenen Abwehr angewandt [1, 2]. Verantwortlich für diesen therapeutischen Effekt sollen nach neueren Untersuchungen Polysaccharide sein [3]. Ob diese Polysaccharide die einzigen Wirkstoffe der Pflanzen sind, werden künftige Untersuchungen zeigen. Für die Charakterisierung der Pflanzen und deren Zubereitungen ist es, unabhängig von der Wirkstofffrage, wichtig, auch deren Zusammensetzung an niedermolekularen Naturstoffen zu kennen. Als charakteristischen Inhaltsstoff für die Wurzel von *E. angustifolia* hatten Stoll *et al.* [4] Echinacosid isoliert. Die genaue Struktur dieser Verbindung konnten wir kürzlich ermitteln [5]. Bei der Isolierung von Echinacosid fielen eine Reihe weiterer polarer Verbindungen an, deren Charakterisierung im folgenden beschrieben wird.

Ergebnisse

Nach der Isolierung von Echinacosid durch DCCC verblieb eine phenolhaltige Fraktion, deren Farbverhalten mit Naturstoffreagenz A (intensive Gelbfärbung) auf Kieselgel DC für ein ortho-Diphenol sprach. Bei der Überprüfung anderer Pflanzenteile (s. u.) zeigte sich, daß eine solche Fraktion in höherer Konzentration in den Blättern von *E. purpurea* vorhanden war, woraus dann die Isolierung erfolgte. Durch Chromatographie in mehreren Trennsystemen

Reprint requests to H. Becker

Verlag der Zeitschrift für Naturforschung, D-7400 Tübingen
0341-0382/85/0700-0585 \$ 01.30/0



	R ¹	R ²	R ³
1:	H	H	H
2:	H	CH ₃	H
3:	H	H	CH ₃
4:	CH ₃	H	CH ₃

men und Mehrfachentwicklung zeigte es sich, daß die Fraktion aus dem Gemisch zweier Substanzen bestand. Diese wurden durch préparative DC isoliert und über Sephadex LH 20 gereinigt. Substanz **1** zeigte im UV-Spektrum ein Maximum von 325 nm, das nach Zugabe von 3 Tropfen AlCl₃ eine bathochrome Verschiebung von 55 nm erfuhr. Damit war die durch das Farbverhalten auf DC vermutete *o*-Diphenolgruppe bestätigt. Im ¹H-NMR Spektrum liegen drei aromatische Protonen zwischen 6,92 ppm und 7,2 ppm, weiterhin ist ein AB-System von olefinischen Protonen bei 6,5 und 7,7 ppm (*trans*-Form, 16 Hz) zu erkennen. Diese Daten sprechen für ein Kaffeesäurederivat. Zu interpretieren war noch ein Singulett bei 5,5 ppm. Die Integration dieses Protons zu den aromatischen Protonen ergab ein Verhältnis von 1:3. Da Kaffeesäure häufig verestert vorliegt, wurde als Molekülteil Hydroxymalonsäure und Weinsäure in Betracht gezogen. Im letzten Fall mußten beide Hydroxylgruppen mit Kaffeesäuren verestert sein. Die DC-Trennung nach Hydrolyse ergab Weinsäure und Kaffeesäure. Im FAB-Massenspektrum war als Molpeak 474 (M – H = 473) zu erkennen. Das EI-Massenspektrum der permethylierten Substanzen hatte einen Molpeak von *m/z* 558 (474 + 6 × 14). Das ¹H-NMR-Spektrum der permethylierten Verbindung zeigte je ein Singulett für die Protonen der Estermethylegruppen (3,86 ppm) und der Methoxylgruppen (3,97 ppm) im Verhältnis 1:2. Damit war die Struktur von **1** als Dicaffeoylweinsäure bestätigt. Die Substanz war erstmals von Scarpati und Oriente [6] als Chicoree-Säure aus *Cichorium intybus* (Asteraceae) isoliert und beschrieben worden. Die nach dieser Literatur aus *Cichorium intybus* isolierte Substanz war DC mit der von uns isolierten Substanz identisch.



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

Die zweite Substanz aus der oben beschriebenen Fraktion zeigte ein ähnliches Farbverhalten auf der DC und hatte das gleiche Maximum im UV mit einer bathochromen Verschiebung von 38 nm bei Zugabe von AlCl_3 . Im H-NMR-Spektrum von **2** erkennt man wie bei **1** Signale für die aromatischen Protonen bei 6,9 bis 7,27 ppm mit dem gleichen Aufspaltungsmuster. Auch die olefinischen Protonen treten an gleicher Stelle auf (6,5 ppm und 7,7 ppm) sind jedoch verbreitert. Anstelle des Singulett für die Methinprotonen treten zwei Dubletts bei 5,65 ppm und 5,85 ppm auf. Zusätzlich erscheint ein Signal bei 3,85 ppm, an der Stelle, an der bei der permethylierten Chicoree-Säure die Protonen der Estermethylgruppen auftraten. Die Integration ergibt 3 Protonen. Damit ergibt sich für **2** die Strukturen eines Chicoree-Säure Methylesters.

In einer weiteren Fraktion der Isolierung von Echinacosid fiel ein Substanzpaar (**3** und **4**) an, das ebenfalls durch präparative DC getrennt und durch Sephadex LH 20 gereinigt werden konnte. Das UV-Spektrum von **3** zeigte ein Maximum von 322 nm mit einer bathochromen Verschiebung von 20 nm nach Zugaben von AlCl_3 .

Im $^1\text{H-NMR}$ erscheinen sechs aromatische Protonen zwischen 6,8 ppm und 7,3 ppm, weiterhin erkennt man die Dubletts von vier olefinischen Protonen bei 6,4 ppm, 6,6 ppm, 7,6 ppm und 7,8 ppm (jeweils 16 Hz) und ein Singulett für zwei Protonen bei 5,7 ppm (wie bei **1**). Ein Singulett für drei Protonen bei 3,9 ppm deutet auf ein phenolisches Methoxyl hin. Die alkalische Hydrolyse von **3** und anschließende DC erbrachte Weinsäure, Kaffeesäure und Ferulasäure. Demnach handelt es sich bei **3** um 2-Caffeoyl-3-Feroyl-Weinsäure.

Das UV-Spektrum von **4** weist ein Maximum von 318 nm auf; mit AlCl_3 ergibt sich nur eine bathochrone Verschiebung von 10 nm. Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zeigt einen trisubstituierten Aromaten und Signale für olefinische Protonen bei 6,5 und 7,7 ppm ($J = 16$ Hz). Bei 5,7 ppm erscheint ein Singulett für Methinprotonen. Wie bei **3** erkennt man bei 3,9 ppm die Signale für die Protonen phenolischer Methoxylgruppen. Nach der alkalischen Hydrolyse ist neben Weinsäure nur Ferulasäure nachzuweisen. Demnach handelt es sich bei **4** um 2,3-Diferoylweinsäure.

Neben den genannten Weinsäurederivaten [1–4] wurden noch Kaffeesäure und Kaffeesäuremethylester isoliert und spektroskopisch identifiziert. Das genuine Vorkommen von Kaffeesäuremethylester

wurde dadurch abgesichert, daß anstelle von Methanol Ethanol zur Extraktion genommen wurde.

Um einen ersten Überblick über die Verteilung von Chicoree-Säure in *E. angustifolia* und *E. purpurea* zu bekommen, wurden Extrakte von Pflanzenteilen mittels HPLC untersucht. Dabei wurde gefunden, daß Chicoree-Säure in beiden Arten und in allen Teilen der Pflanze vorhanden ist. In *E. purpurea* liegt der Gehalt um das 2- bis 3fache höher als in *E. angustifolia* (Tab. I).

Ob Chicoree-Säure an der Wirkung von Echinacea-Zubereitungen beteiligt ist, müssen entsprechende pharmakologische Untersuchungen zeigen. Als Leitsubstanz scheint sie, wegen der einfachen HPLC-Bestimmbarkeit, geeignet.

Tab. I. Gehalt verschiedener Pflanzenteile (% Trockengewicht) an Chicoree-Säure.

	<i>E. ang.</i>	<i>E. pur.</i>
Wurzel	0,34	0,76
Stengel	0,14	0,45
Blätter	0,32	1,28
Blüten	0,49	1,29

Material und Methode

Pflanzenmaterial: Das Pflanzenmaterial stammte aus Anbauversuchen der Bayerischen Landesanstalt für Bodenkultur und Pflanzenbau.

Extraktion: 500 g Blätter wurden mit 2 l 50% Methanol 24 Stunden lang auf einer Schüttelmaschine extrahiert. Der Extrakt wurde im Vakuum bis auf etwa 500 ml eingeengt und über eine Cellulose Trockensäule (20 cm \times 3,5 cm i.D.) filtriert. Aus dem Filtrat wurden Kaffeesäure und Kaffeesäuremethylester isoliert. Die Säule wurde mit 2 l heißem 50prozentigem Methanol eluiert. Das Eluat wurde im Vakuum bis zu einem hygroskopischen Rückstand eingeengt (ca. 20 g).

Isolierung: Der Rückstand wurde im Ultraschallbad in 20 ml Unterphase von Ethylacetat – Ameisensäure – Wasser/10 – 1 – 9 (System I) aufgenommen und in einer kleinen 22stufigen manuellen Verteilungsapparatur mit dem angegebenen Trennsystem vorgetrennt. Zur Isolierung von **1** und **2** wurden die Elemente 11–15 zusammengefaßt, eingeengt und durch präparative DC isoliert:

Stat. Phase: Kieselgel 60 F 0,25 m Schichtdicke
20 cm × 6,6 cm.

Mobile Phase: Oberphase von Ethylacetat-n-Propanol-Wasser 4 – 3 – 5 (System II). Zweite DC Trennung mit der Oberphase des Systems I.

Reinigung: SC über Sephadex LH 20 (30 cm/2 cm i.D.) Elution mit Methanol.

Zur Isolierung von **3** und **4** wurden die Elemente 16–20 der Verteilungschromatographie zusammengefaßt und durch präparative DC an Kieselgel F HPTLC-Platten in der Oberphase von System II eluiert.

Die Reinigung erfolgte wie vor über Sephadex LH 20.

*Methylierung von **1**:* **1** wurde in wenig MeOH gelöst und anschließend tropfenweise etherische Diazomethanlösung bis zur beständigen Gelbfärbung zugegeben. Der Methylierungsgrad wurde DC überprüft. Nach 2 Std. wurde Lösungsmittel und überschüssiges Reagenz im Vakuum entfernt. Permethyliertes **1** wurde durch präparative DC im Laufmittel Toluol-Ethylacetat [9–3] von unvollständig methylierten Nebenprodukten getrennt.

Säurehydrolyse: Etwa 1 mg Substanz wurde in 1,7 ml 0,1 N Trifluoressigsäure gelöst und in eine 2 ml Ampulle überführt und mit N₂ begast. Die Ampulle wurde zugeschmolzen und danach 3 Std. im siedenden Wasserbad erhitzt. Danach wurde die Lösung in einem 10 ml Rundkolben zur Trockne eingedampft und der Rückstand in 0,5 ml 50% MeOH aufgenommen.

Alkalische Hydrolyse: In der gleichen Art wie vor wurde etwa 1 mg Substanz mit 1,7 ml 4% NaOH hydrolysiert. Nach der Hydrolyse wurde mit 1 nHCl

neutralisiert, eingeengt und in 0,5 ml 50% MeOH aufgenommen.

Chromatographie der Hydrolyseprodukte: Kieselgel F HPTLC Oberphase von System II.

Quantitative Bestimmung: Etwa 1 g pulverisierte Droge genau gewogen wurden in einem 250 ml Rundkolben mit 100 ml H₂O unter Rückfluß zum Sieden erhitzt. Der Extrakt wurde nach dem Abkühlen durch Watte in einem 250 ml Rundkolben filtriert, Rückstand und Watte mit wenig Wasser nachgewaschen. Der Extrakt wurde auf 15 ml eingeengt, mit 2 nHCl auf pH 2 angesäuert und fünfmal mit je 30 ml EtOAc ausgeschüttelt. Die vereinigte EtOAc-Phase wurde zur Trockne eingedampft und der Rückstand mit MeOH in einen 10 ml Meßkolben ge spült und bis zur Marke aufgefüllt.

HPLC: Waters 6000 A mit SF 770 Detektor

Lichrosorb RP-18 (Merck) 5 µ (250 × 4 mm)

Mob. Phase: MeOH – H₂O – AcOH 25 – 75 – 3

(von Becker und Martin (unveröff.) für Echinacosid entwickelt)

Durchfluß: 1,2 ml/min

Interner Standard: Ferulasäure.

Danksagung

Wir danken Herrn Rubik, Institut für Biochemie (Direktor: Prof. Dr. Hecker) DKFZ, für die Aufnahme der Massenspektren und Herrn Dr. Kramer und Frau Jost, Pharm.-Chem. Institut (Direktor Prof. Dr. Neidlein), Universität Heidelberg, für die Aufnahme der HNMR Spektren. Frau Dr. Wylde, Frau Dr. Laffite und Herrn Prof. Andary, Montpellier danken wir für wertvolle Hinweise. Der Firma Arzneimittel-Müller Rorer danken wir für finanzielle Unterstützung.

- [1] H. Becker, Dtsch., Apoth. Ztg. **122**, 2320 (1982).
- [2] G. Harnischfeger und H. Stolze, Notabene medici **11**, 484 (1980).
- [3] H. Wagner, A. Proksch, J. Riess-Maurer, A. Vollmar, S. Odenthal, K. Jurcic, M. Le Turdu und Y. H. Heur, Arzneim.-Forsch. **34**, 659 (1984).

- [4] A. Stoll, J. Renz und A. Brack, Helv. Chim. Acta **33**, 473 (1950).
- [5] H. Becker, W. Ch. Hsieh, R. Wylde, C. Laffite und C. Andary, Z. Naturforsch. **37c**, 351 (1982).
- [6] M. L. Scarpati und G. Oriente, Tetrahedron **4**, 43 (1958).