Untersuchungen zu den Inhaltsstoffen von *Echinacea atrorubens* sowie zur Wirkung und Bioverfügbarkeit von Alkamiden

Birgit Dietz

Untersuchungen zu den Inhaltsstoffen von

Echinacea atrorubens sowie

zur Wirkung und Bioverfügbarkeit von Alkamiden

Inaugural Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Vorgelegt von

Birgit Dietz

aus Dortmund

Düsseldorf 2002

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. R. Bauer
Korreferent: Prof. Dr. B.C. Lippold
Tag der mündlichen Prüfung: 09.07.2002

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Leitung von

Herrn Prof. Dr. R. Bauer

am Institut für Pharmazeutische Biologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. R. Bauer, für die hilfreiche Betreuung, seine große Diskussionsbereitschaft, für die Schaffung eines harmonischen Arbeitsklimas und für seinen unermüdlichen Einsatz besonders auch über die Entfernung von Graz nach Düsseldorf in der letzten Phase der Arbeit.

Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. P. Proksch und Herrn Prof. Dr. G. Willuhn sehr herzlich, dass sie mir die Arbeit am Institut für Pharmazeutische Biologie ermöglichten.

Herrn Prof. Dr. B.C. Lippold danke ich besonders für die Übernahme des Korreferates.

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG 1

2 DIE GATTUNG *ECHINACEA* 2

2.1. SYSTEMATIK UND VERBREITUNG 2

2.1.1. Systematik *2*

2.1.2. Verbreitung *5*

2.2. BISHER BEKANNTE INHALTSSTOFFE 6

2.2.1. Alkamide *6*

2.2.2. Polyacetylene *10*

2.2.3. Kaffeesäurederivate *11*

2.2.4. Flavonoide *13*

2.2.5. Polysaccharide und Glykoproteine *13*

2.2.6. Alkaloide *14*

2.2.7. Ätherisches Öl *15*

2.2.8. Sonstige Inhaltsstoffklassen *16*

2.3. TRADITIONELLE UND HEUTIGE ANWENDUNG 17

2.3.1. Traditionelle Anwendung *17*

2.3.2. Heutige Anwendung *18*

2.3.3. Klinische Studien mit Zubereitungen aus E. angustifoliae radix *18*

2.3.4. Klinische Studien mit Zubereitungen aus E. pallidae radix *18*

2.3.5. Klinische Studien mit Zubereitungen aus E. purpureae radix *19*

2.3.6. Klinische Studien mit Zubereitungen aus E. purpureae herba *19*

2.3.7. Klinische Studien mit Zubereitungen aus mehreren Echinacea-Arten *20*

2.4. BISHERIGE PHARMAKOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN 21

2.4.1. Pharmakologische Wirkungen von E. angustifoliae radix *21*

2.4.2. Pharmakologische Wirkungen von E. pallidae radix *22*

2.4.3. Pharmakologische Wirkungen von E. purpureae radix *24*

2.4.4. Pharmakologische Wirkungen von E. purpureae herba *26*

2.4.5. Pharmakologische Untersuchungen von nicht näher definierten Echinacea-Präparaten *28*

2.5. VERTRÄGLICHKEIT UND TOXIZITÄT VON ECHINACEA-PRÄPARATEN 30

2.6. BISHERIGE PHARMAKOKINETISCHE UNTERSUCHUNGEN 32

2.7. BISHERIGER STAND DER ANALYTIK 33

3 ALLGEMEINES ZU ECHINACEA ATRORUBENS 40

3.1. BOTANISCHE BESCHREIBUNG UND VERBREITUNG 40
3.1.1. Habitus der Pflanze 40
3.1.2. Makroskopische Beschreibung von Echinaceae atrorubens radix 41
3.2. MIKROSKOPISCHE BESCHREIBUNG 42
3.2.1. Mikroskopische Beschreibung des Krautes 42
3.2.2. Eigene mikroskopische Untersuchungen des Blattes und der Wurzel 42
3.3. BISHER BEKANNTE PHARMAKOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN 44
4 EIGENE PHYTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN 45
4.1. ANALYTIK 45
4.1.1. HPLC-Analyse 45
4.1.2. Dünnschichtchromatographische Analyse 54
4.2. ISOLIERUNG UND STRUKTURAUFKLÄRUNG VON ALKAMIDEN AUS ECHINACEAE ATRORUBENS RADIX 59
4.2.1. Fraktionierung 59
4.2.2. Probleme bei der Isolierung von Alkamiden 62
4.2.3. Undeca-2E,4E/Z-dien-8,10-diinsäure-isobutylamide (Verbindungen A1/2) 62
4.2.4. Undeca-2E-en-8,10-diinsäure-isobutylamid (Verbindung A3) 67
4.2.5. Dodeca-2E,4Z-dien-8,10-diinsäure-isobutylamid (Verbindung A4) 70
4.2.6. Dodeca-2E-en-8,10-diinsäure-isobutylamid (Verbindung A5) 71
4.2.7. Dodeca-2E,4Z,10Z-trien-8-insäure-isobutylamid (Verbindung A6) 72
4.2.8. Trideca-2E,7Z-dien-10,12-diinsäure-isobutylamid (Verbindung A7) 75
4.2.9. Dodeca-2E,4E,8Z,10Z/E-tetraensäure-isobutylamide (Verbindungen A8/9) 79
4.2.10. Dodeca-2E,4E,8Z-triensäure-isobutylamid (Verbindung A10) 82
4.2.11. Dodeca-2E,4E-diensäure-isobutylamid (Verbindung A11) 85
4.2.12. Dodeca-2E,4Z,10Z-trien-8-insäure-2-methylbutylamid (Verbindung A12) 88
4.2.13. Dodeca-2E,4Z-dien-8,10-diinsäure-2-methylbutylamid (Verbindung A13) 92
4.2.14. Dodeca-2E,10E/Z-dien-8-insäure-isobutylamide (Verbindungen A14/15) 96
4.2.15. Pentadeca-2E,9Z-dien-12,14-diinsäure-isobutylamid (Verbindung A16) 99
4.2.16. Dodeca-2E,4E-diensäure-2-methylbutylamid (Verbindung A17) 103
4.2.17. Dodeca-2E,4E,8Z-triensäure-2-methylbutylamid (Verbindung A18) 106
4.2.18. Dodeca-2E,4E,8Z,10Z/E-tetraensäure-2-methylbutylamide (Verbindungen A19/20) 107
4.3. IDENTIFIZIERUNG WEITERER LIPOPHILER VERBINDUNGEN 110
4.3.1. Identifizierung der Triterpene β-Sitosterol, Stigmasterol und Campesterol 110
4.4. ISOLIERUNG UND STRUKTURAUFKLÄRUNG EINER HYDROPHILEN VERBINDUNG AUS ECHINACEAE ATRORUBENS HERBA 111

4.4.1. Narcissin (Verbindung FG1): 3,4´,5,7-Tetrahydroxy-3´-methoxyflavon-3-β-[6-O-α-L-rhamnopyranosyl-D-glucopyranose] *111*

4.5. ISOLIERUNG UND STRUKTURAUFKLÄRUNG EINES FLAVONOIDS AUS DEM PRESSSAFT VON ECHINACEAE PURPUREAE HERBA 114

4.5.1. Robinetin (Verbindung F1): 3´,4´,5´,7-Tetrahydroxyflavonol *114*

4.6. IDENTIFIZIERUNG DER INHALTSSTOFFE AUS DEM ÄTHERISCHEN ÖL VON ECHINACEA ATRORUBENS 118

5 EIGENE PHARMAKOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN 121

5.1. IL-6- UND TNF-ALPHA-TEST 121

6 EIGENE PHARMAKOKINETISCHE UNTERSUCHUNGEN 125

6.1. ENTWICKLUNG EINER METHODE ZUM ALKAMIDNACHWEIS IM HUMANBLUT 125

6.1.1. Voruntersuchungen *125*

6.1.2. Validierung der entwickelten Methode mit Humanblut *130*

6.2. ERSTE BIOVERFÜGBARKEITSSTUDIEN VON ALKAMIDEN 133

6.2.1. Bioverfügbarkeitsuntersuchungen der Dodeca-2E,4E,8Z,10Z/E-tetraensäure-isobutylamide im Humanblut nach oraler Applikation von E. purpurea-Urtinktur *133*

6.2.2. Untersuchungen der Dodeca-2E,4E,8Z,10Z/E-tetraensäure-isobutylamide im Urin nach oraler Applikation von E. purpurea-Urtinktur *135*

6.3. DIFFUSIONSSTUDIEN DER ALKAMIDE AN ADENOCARCINOMZELLEN 136

7 DISKUSSION 138

8 ZUSAMMENFASSUNG 147

9 EXPERIMENTELLER TEIL 150

9.1. HERKUNFT DER DROGEN UND VERGLEICHSSUBSTANZEN 150

9.2. CHROMATOGRAPHISCHE VERFAHREN 150

9.2.1. Dünnschichtchromatographie *150*

9.2.2. Offene Säulenchromatographie *153*

9.2.3. Vakuumflüssigchromatographie *153*

9.2.4. Mitteldruckflüssigchromatographie *154*

9.2.5. Hochleistungsflüssigchromatographie *155*

9.2.6. LC-MS-Messungen *157*

9.2.7. Gaschromatographie *158*

9.3. SPEKTROSKOPISCHE VERFAHREN 159

9.3.1. Optische Drehung *159*

9.3.2. Ultraviolettspektroskopie *159*

9.3.3. Kernresonanzspektroskopie *160*

9.3.4. Massenspektrometrie ... *160*
9.4. EXTRAKTIONSVERFAHREN ... 161
9.5. GEHALTSBESTIMMUNG DER DODECA-2E,4E,8Z,10Z/E-TETRAENSÄURE-ISOBUTYLAMIDE ... 162
9.6. ISOLIERUNGEN ... 163
9.6.1. Isolierungen der Alkamide aus E. atrorubens radix ... *163*
9.6.2. Isolierungen der Kaffeesäurederivate aus E. atrorubens herba ... *168*
9.6.3. Isolierung von Robinetin aus dem Presssaft von E. purpureae herba ... *168*
9.7. PHYSIKALISCHE UND SPEKTROSKOPISCHE DATEN ... 168
9.7.1. Daten der Inhaltsstoffe aus Echinaceae atrorubens radix ... *168*
9.7.2. Daten der Inhaltsstoffe aus Echinaceae atrorubens herba ... *175*
9.7.3. Daten der Inhaltsstoffe aus Echinacea purpurea ... *175*
9.8. PHARMAKOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN ... 176
9.8.1. IL-6- und TNF-α ELISA-Testsystem ... *176*
9.9. PHARMAKOKINETISCHE UNTERSUCHUNGEN ... 176
9.9.1. Methodenentwicklung und -validierung ... *176*
9.9.2. Bioverfügbarkeitsstudien nach der oralen Applikation von E. purpurea-Urtinktur ... *178*
9.9.3. Epitheliale Transportstudien der Alkamide mit colorektalen Adenocarcinomzellen ... *180*
10 LITERATUR ... 183
11 ANHANG ... 200

1 Einleitung und Problemstellung

Zubereitungen aus *Echinacea* Arten haben in der Volksmedizin eine lange Tradition zur Behandlung von Infektionen und septischen Zuständen. Heute werden Präparate aus *Echinacea angustifolia*, *E. pallida* und *E. purpurea* hauptsächlich bei Erkältungskrankheiten zur Stimulierung der körpereigenen Abwehr eingesetzt und gehören damit zu den bedeutendsten pflanzlichen Immunstimulantien (BAUER und WAGNER, 1990; BAUER, 1997).

Intensive phytochemische und pharmakologische Untersuchungen haben sich in den letzten Jahren mit der Analytik, den möglichen Wirksubstanzen, der Pharmakologie und der Wirkung von *Echinacea*-Zubereitungen beschäftigt. So konnten zum Beispiel für Polysaccharide und Glykoproteine aus *E. purpurea* immunstimulierende Wirkungen nachgewiesen werden, die die Wirkung von hydrophilen *Echinacea*-Zubereitungen, wie Presssäften erklären könnten. Eine weitere Inhaltsstoffgruppe, die am stimulierenden Effekt auf das körpereigene Abwehrsystem beteiligt sein könnte, ist die der Alkamide, für welche phagozytosestimulierende und entzündungshemmende Eigenschaften nachgewiesen wurden. Diese Inhaltsstoffklasse könnte für die Wirkung von lipophilen *Echinacea*-Zubereitungen entscheidend sein.

Um einen Überblick über den aktuellen wissenschaftlichen Erkenntnisstand bezüglich *Echinacea* zu bekommen, sollte im ersten Teil dieser Arbeit eine Bestandsaufnahme der neuesten Untersuchungen über diese Gattung gemacht werden.

Da neben den drei medizinisch eingesetzten *Echinacea*-Arten acht weitere, weniger gut untersuchte Arten, existieren, sollte *Echinacea atrorubens Nutt.* im Rahmen dieser Arbeit aus chemotaxonomischen Gründen und zur Überprüfung ihres möglichen Wirkpotentials näher untersucht werden. Eine detailierte anatomische und analytische Untersuchung dieser Art, sollte sie eindeutig beschreiben und von den anderen *Echinacea*-Arten abgrenzen. Dabei sollte der Schwerpunkt auf die Isolierung von Alkamiden gelegt werden, damit diese anschließend auch auf ihre mögliche immunstimulierende Wirkung untersucht werden können.

Die pharmakologischen Untersuchungen der einzelnen Inhaltsstoffe beruhen meistens auf *in vitro* Tests, so dass die Ergebnisse keine Auskunft über die Wirkung der Substanzen im Körper geben. Bioverfügbarkeits- bzw. Resorptionsstudien von *Echinacea*-Zubereitungen oder Inhaltsstoffen fehlen bisher weitgehend. Aus diesem Grund war ein weiteres Ziel dieser Arbeit, eine Methode zu entwickeln, um *Echinacea*-Inhaltsstoffe aus menschlichem Blut und Urin extrahieren und anschließend nachweisen und quantifizieren zu können.

2 Die Gattung *Echinacea*

2.1. Systematik und Verbreitung

2.1.1. Systematik

Die Gattung *Echinacea* MOENCH gehört zur Familie der Asteraceae (Unterfamilie Asteroideae) und wird in den Tribus Heliantheae eingeordnet, der mit 189 Gattungen zum dritt größten Tribus innerhalb der Familie zählt (KARIS und RYDING, 1994). Die Klassifizierung in einen Subtribus ist bis heute nicht eindeutig geklärt und wurde bereits vielfach revidiert. STUESSY stellte 1977 die Gattung *Echinacea* in den Subtribus Helianthinae, wo sie zusammen mit den Gattungen *Rudbeckia*, *Dracopsis* und *Ratibida* eine Untergruppe bildeten. ROBINSON teilte 1981 den Tribus Heliantheae in 35 Subtriben ein und zählte die Gattung *Echinacea* zum Subtribus Ecliptinae, wobei die Gattungen *Rudbeckia*, *Dracopsis* und *Ratibida* in den neu beschriebenen Subtribus Rudbeckiinae gestellt wurden. Problematisch war jedoch die vage Abgrenzung des Subtribus Ecliptinae zu den anderen Subtriben, so dass KARIS (1993) eine Revision der taxonomischen Nomenklatur nach Robinson vorlegte. KARIS teilte den Tribus Heliantheae in 10 Subtriben ein und überführte die Gattung *Echinacea* in den Subtribus Rudbeckiinae. Damit stellte er wieder eine enge verwandtschaftliche Beziehung zu den Gattungen *Rudbeckia*, *Dracopsis* und *Ratibida* her. Charakteristisch für alle vier Gattungen ist der konisch aufgewölbte Blütenstandsboden, der bei *Echinacea* durch die spitzen Spreublätter stachelig ist (echinos = griechisch Igel) (BAUER und WAGNER, 1990).



Abbildung 2.1: E. atrorubens NUTT., Copyright by Steven Foster (1998)

Die Einordnung von *Echinacea* in den Subtribus Rudbeckiinae wurde jedoch von URBATSCH et al. aufgrund ihrer letzten phylogenetischen Untersuchungen kritisiert. Sie führten cpDNA- und IST-Sequenzanalysen mit verschiedenen Arten aus dem Tribus Heliantheae durch (URBATSCH et al., 1995, 2000). Beide Versuche zeigten, dass die Gattung *Echinacea* keine enge, phylogenetische Verwandtschaftsbeziehung zu den anderen Gattungen des Subtribus Rudbeckiinae zeigt, sondern näher zur Gattung *Sanvitalia* und anderen Arten aus dem Subtribus Zinniinae steht. Urbatsch schlägt deshalb einen Transfer der Gattung *Echinacea* in den Subtribus Zinniinae vor.

Diese unterschiedlichen Einordnungen zeigen, dass bei der Gattung *Echinacea* je nach Art der taxonomischen Analyse andere Verwandtschaftsbeziehungen resultieren. Um eine endgültige Einordnung der Gattung in einen Subtribus vornehmen zu können, sollten verschiedene Methoden, wie morphologische, phylogenetische und phytochemische Untersuchungen, in die kladistische Analyse mit einbezogen werden.

Alle Arten der Gattung *Echinacea* stellen ausdauernde, mehrjährige Kräuter dar.
Sie neigen zu Hybridisierungen und bilden daher viele Übergangsformen. Dies führte in der Vergangenheit oft zu kontroversen taxonomischen Einteilungen. CRONQUIST beschrieb vier *Echinacea*-Arten, *E. pallida* var. *angustifolia*, *E. pallida* var. *pallida*, *E. atrorubens* var. *atrorubens*, *E. atrorubens* var. *paradoxa*, *E. laevigata* und *E. purpurea* (1945, 1980). Die zur Zeit am weitesten verbreitete Nomenklatur stammt von MCGREGOR (1968). Er entwickelte einen Bestimmungsschlüssel der Gattung nach morphologisch-anatomischen, ökologischen und cytologischen Merkmalen und teilte die Gattung in 9 Arten und zwei Varietäten auf:
E. angustifolia DC. var. angustifolia
E. angustifolia DC. var. strigosa McGREGOR
E. atrorubens NUTT.
E. laevigata (BOYNTON & BEADLE) BLAKE
E. pallida (NUTT.) NUTT.
E. paradoxa (NORTON) BRITTON var. paradoxa
E. paradoxa (NORTON) BRITTON var. neglecta McGREGOR
E. purpurea (L.) MOENCH
E. simulata McGREGOR
E. sanguinea NUTT.
E. tennesseensis (BEADLE) SMALL

Zuletzt führte BINNS (2001) anhand von morphologischen Gesichtspunkten eine taxonomische Revision der Gattung *Echinacea* durch. Da sich danach *E. purpurea* morphologisch am stärksten von den anderen Arten abhebt, wurde für *E. purpurea* ein Subgenus *Echinacea* geschaffen. Außerdem wurden drei andere Arten, *E. pallida*, *E. atrorubens* und *E. laevigata*, charakterisiert, die in dem Subgenus *Pallida* zusammengefasst wurden. Die anderen nach MCGREGOR beschriebenen Arten wurden als Varietäten von *E. pallida* oder *E. atrorubens* definiert (siehe Tabelle 2.1).

Tabelle 2.1: Taxonomische Einteilung der Gattung Echinacea nach BINNS (2001).

Subgenus	Art	Varietät
Echinacea	*E. purpurea* (L.) Moench *nom. cons. prop.*	
Pallida	*E. pallida* (Nutt.) Nutt.	var. pallida
		var. tennesseensis (Beadle) Binns B.R. Baum & Arnason
		var. angustifolia (DC.) Cronquist
		var. sanguinea (Nutt.) Gandhi and Thomas
		var. simulata (McGregor) Binns B.R. Baum & Arnason
	E. atrorubens Nutt.	var. atrorubens
		var. paradoxa (J.B. Norton) Cronquist
		var. neglecta (McGregor) Binns, B.R. Baum & Arnason
	E. laevigata (C.L.Boynton & Beadle) Blake *nom. cons. prop.*	

Die neue Unterteilung unterstützt viele Gesichtspunkte, die bereits in CRONQUIST´s Taxonomieabhandlungen (1945) berücksichtigt wurden. Da sich die taxonomische Einteilung von BINNS noch nicht durchgesetzt hat, benutze ich im folgenden weiterhin die Artbezeichnungen nach MCGREGOR.

In der Regel sind die Pflanzen der Gattung *Echinacea* diploid und haben n = 11 Chromosomen. Ausnahmen bilden jedoch die Arten *E. pallida* und einige Kolonien von *E. angustifolia* var. *strigosa*, die einen Chromosomensatz von n = 22 aufweisen (MCGREGOR, 1968). In Gegenden, wo *E. pallida* zusammen mit *E. atrorubens* auftritt, konnten triploide Pflanzen als natürliche Hybride gefunden werden. Das Fortpflanzungssystem dieser Gattung ist bisher noch nicht vollständig aufgeklärt. Nach neueren Untersuchungen konnte in allen Arten bis zu einem bestimmten Prozentsatz auch Selbstbestäubung beobachtet werden (MC KEOWN, 1999).

2.1.2. Verbreitung

Das natürliche Areal der Gattung *Echinacea* erstreckt sich von der Golfküstenebene im Süden über die Great Plains bis hin zu Südzentral-Kanada im Norden, umfasst im Osten den Gebirgszug der Appalachen und reicht im Westen bis zu den Rocky Mountains (siehe Abbildung 2.2; MCGREGOR, 1968; BAUER und WAGNER, 1990). Das weite Verbreitungsgebiet vom Süden bis hin zum Norden der USA zeigt die gute Anpassungsfähigkeit der Gattung (MC KEOWN, 1999). Das Gebiet mit der größten Artenvielfalt liegt jedoch zwischen dem Ozark-Gebirge von Missouri im Süden bis zu dem östlich zentralen Grasland von Oklahoma.

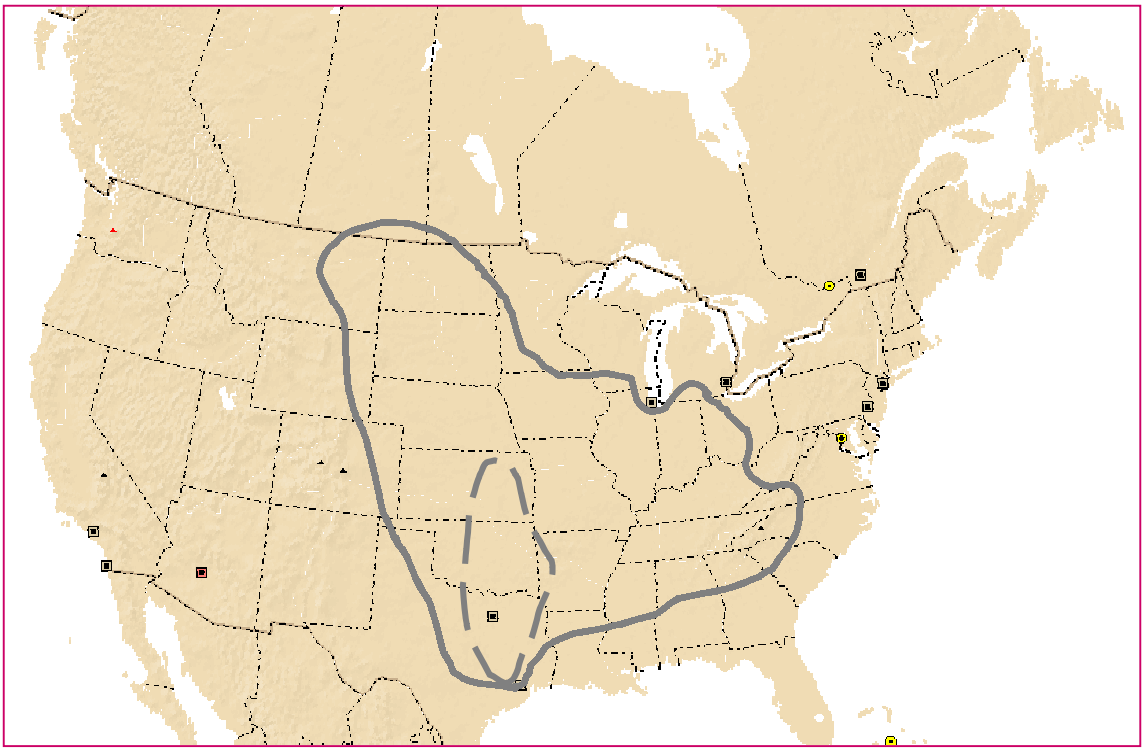


Abbildung 2.2: Verbreitung der Gattung Echinacea (nach MCGREGOR, 1968 und MC KEOWN, 1999):

—— *Gesamtareal der Gattung Echinacea*

– – – *Verbreitungsgebiet der Gattung Echinacea atrorubens*

2.2. Bisher bekannte Inhaltsstoffe

Die Gattung *Echinacea*, insbesondere die drei medizinisch verwendeten *Echinacea*-Arten, *E. angustifolia*, *E. pallida* und *E. purpurea*, wurden phytochemisch bereits intensiv untersucht. Früher traten häufig Verwechslungen zwischen *E. angustifolia* und *E. pallida* auf, die jedoch durch die phytochemischen Arbeiten von BAUER und Mitarbeitern (1988, 1989) behoben werden konnten. Im folgenden soll eine Übersicht der bisher aus *Echinacea*-Pflanzen isolierten Verbindungen gegeben werden.

2.2.1. Alkamide

Alkamide kommen im Pflanzenreich nicht sehr häufig vor. Sie wurden bisher nur in den Familien der Piperaceen, Aristolochiaceen, Rutaceen und Asteraceen nachgewiesen (GREGER, 1984). Aufgrund ihres seltenen Vorkommens könnten sie ein wichtiges chemotaxonomisches Merkmal bei der Aufklärung von Verwandtschaftsbeziehungen unter den einzelnen Arten der Asteraceen und vor allem in dem Tribus Heliantheae darstellen.

Biosynthetisch leitet sich der Säureanteil der Alkamide von der Ölsäure ab. Durch Dehydrierungen, Dehydratationen und Isomerisierungen kommt es zur Einführung von verschiedenen olefinischen und acetylenischen Bindungen. Außerdem führen oxidative Prozesse zur Kettenverkürzung, so dass eine große Vielfalt von Säureresten mit unterschiedlicher Kettenlänge existiert. In *Echinacea*-Arten sind bisher Kettenlängen von 11 bis 16 C-Atomen bekannt. Die Amingruppe der Alkamide entsteht durch Decarboxylierung von Aminosäuren. Insgesamt sind über 15 verschiedene Aminanteile bekannt. In *Echinacea*-Arten wurden bisher Isobutylamin- und 2-Methylaminreste, ableitbar von den Aminosäuren Valin und Isoleucin, gefunden. Außerdem konnte ein 2-Hydroxyisobutylamid aufgeklärt werden (BOHLMANN und HOFFMANN, 1983).

Für Alkamide sind bereits vielfältige pharmakologische Wirkungen beschrieben worden. So hat JACOBSON 1954 ein Alkamid aus *E. angustifolia* isoliert, für das insektizide und beim Menschen Speichelfluss produzierende Wirkungen nachgewiesen wurden. Strukturvoraussetzung für eine gute insektizide Wirkung von Alkamiden ist nach GREGER (1984) ein *E/E* orientiertes Diensystem konjugiert zur Carbonylgruppe und eine Dimethylenbrücke zur nächsten Doppelbindung innerhalb des Säurerestes. Eine Doppelbindung im Zentrum der Kette sollte dabei *Z* orientiert sein. Außerdem besitzen Alkamide einen lokalanaesthesierenden Effekt auf der Zunge, den sogenannten „tingling effect“.

Weiterhin sind phagozytosestimulierende und entzündungshemmende Wirkungen für Alkamide aus *Echinacea*-Arten bekannt (siehe Kapitel 2.4). So wurde für die isomeren Dodeca-2*E*,*4E*,8*Z*,10*Z/E*-tetraensäure-isobutylamide bei einer Konzentration von 50 µg/ml eine 55 prozentige Hemmung der Cyclooxygenase 1 und eine 62 prozentige

Hemmrate der 5-Lipoxygenase festgestellt (MÜLLER-JAKIC, 1994). Pentadeca-2*E*,9*Z*-dien-12,14-diinsäure-isobutylamid und Hexadeca-2*E*,9*Z*-dien-12,14-diinsäure-isobutylamid erwiesen sich als die aktivsten Substanzen im COX-1 Teststystem. Alle weiteren getesteten Alkamide aus *E. angustifolia* zeigten moderate Hemmungen auf die COX-1 und nur schwache Wirkungen auf die 5-Lipoxygenase. Neuere Untersuchungen zeigten, dass Undeca-2*Z*,4*E*-dien-8,10-diinsäure-isobutylamid im Vergleich verschiedener Alkamide die höchste COX-1- und COX-2-Hemmwirkung besaß, wobei die Hemmrate auf COX-1 größer war als auf COX-2 (CLIFFORD et al., 2002; siehe Tabelle 2.2). Für die Dodeca-2*E*,4*E*,8*Z*,10*Z/E*-tetraensäure-isobutylamide konnte jedoch in keinem der beiden Testsysteme eine Wirkung nachgewiesen werden.

Außerdem wurde vor kurzem für Alkamide aus *E. purpurea* eine signifikante Stimulierung von Alveolarmakrophagen *in vivo* nachgewiesen (GOEL et al., 2002).
Für Affinin, ein 2,6,8-Decatrienisobutylamid aus *Heliopsis longipes*, das strukturell den Alkamiden aus verschiedenen *Echinacea*-Arten ähnelt, konnten molluskizide Aktivitäten und Zerkarien abtötende Wirkungen gezeigt werden (JOHNS et al., 1982). Zerkarien, die in bestimmten Wasserschnecken gebildet werden und die in die Haut der Menschen penetrieren, sind die haploiden Formen der Schistosomen. Damit könnten Affinin und ähnlich strukturierte Isobutylamide wirksame Mittel gegen Schistosomiasis darstellen. Darüberhinaus ist Affinin in einer Konzentration von 25 µg/ml wirksam gegen *Escherichia coli* und *Sacharomyces cerevisiae* (MOLINA-TORRES et al., 1999). Dies lässt vermuten, dass Alkamide aus der Gattung *Echinacea* ebenfalls eine bakterizide und fungizide Wirkung aufweisen könnten. Nähere Untersuchungen müssen dafür jedoch noch durchgeführt werden.

Weiterhin wurde für Dodeca-2*E*,4*E*,8*Z*,10*E*-tetraensäure-isobutylamid, welches aus *Spilanthes mauritiana* isoliert wurde und das *E*-Isomer der mengenmäßig dominierenden Alkamide in *E. purpurea* und *E. angustifolia* darstellt, in einer Konzentration von 10^{-5} mg/ml über einen Zeitraum von 24 Stunden eine 100 prozentige moskitozide Wirkung auf *Aedes aegyptii* festgestellt werden (JONDIKO, 1986). In einer neueren Studie wurden verschiedene Alkamide auf ihre moskitozide Wirkung gegen die Larve von *Aedes aegyptii* untersucht (CLIFFORD et al., 2002). Dabei stellten sich die isomeren Dodeca-2E,4E,8Z,10Z/E-tetraensäure-isobutylamide (Konz. 100 µg/ml) mit einer 87,5 prozentigen Todesrate bereits nach einem Zeitraum von 15 Minuten gegenüber den Mückenlarven von *Aedes aegyptii* als besonders wirksam heraus. Bei einer Konzentration von 10 µg/ml kam es noch zu einer 63 prozentigen Hemmung innerhalb einer Stunde. Eine etwas schwächere Wirkung zeigten die weiteren getesteten Alkamide (siehe Tabelle 2.2).

Tabelle 2.2: Moskitozide Wirkung, COX-1- und COX-2-Hemmung verschiedener Alkamide (Konzentration: 100 µg/ml, CLIFFORD et al., 2002).

Verbindung	Moskitozide Wirkung	COX-1	COX-2
Undeca-2*E*,4*Z*-dien-8,10-diinsäure-isobutylamid	71 % in 2 Stunden	36	15
Undeca-2*Z*,4*E*-dien-8,10-diinsäure-isobutylamid	78 % in 9 Stunden	60	46
Dodeca-2*E*,4*Z*-dien-8,10-diinsäure-isobutylamid	50 % in 9 Stunden	36	15
Undeca-2*E*,4*Z*-dien-8,10-diinsäure-2-methylbutylamid	25 % in 24 Stunden	55	39
Dodeca-2*E*,4*Z*-dien-8,10-diinsäure-2-methylbutylamid	10 % in 24 Stunden	48	31
Dodeca-2E,4E,8Z,10Z/E-tetraensäure-isobutylamide	87,5 % in 15 Min.	-	-

Das Alkamidprofil der drei medizinisch eingesetzten *Echinacea*-Arten wurde von BAUER und REMIGER genau untersucht (1988, 1989). Sie fanden in den Wurzeln von *E. angustifolia* vor allem Alkamide mit nur einer Doppelbindung in Konjugation zur Carbonylgruppe (siehe Abbildung 2.3) und in E. purpureae radix hauptsächlich Alkamide mit 2,4-Dien-Struktur (siehe Abbildung 2.4).

Die Wurzeln von *E. tennesseensis* enthalten viele der Monoenalkamide, die bereits für E. angustifoliae radix beschrieben wurden (BAUER et al., 1990). Im Gegensatz zu den Wurzeln aus *E. angustifolia* kommen die Dodeca-2*E*,4*E*,8*Z*,10*Z/E*-tetraensäure-isobutylamide in *E. tennesseensis* jedoch nur in geringen Mengen vor.

Die Wurzeln von *E. paradoxa* enthalten neben den hauptsächlich vorkommenden Ketoalkenen/–alkinen nur Spuren von Alkamiden. In E. simulatae radix hingegen liegen neben den Ketoalkenen/–alkinen mehrere Alkamide vor, die ebenfalls in E. angustifoliae radix gefunden wurden (BAUER und FOSTER, 1989).

Im Presssaft aus dem frischen Kraut von *E. purpurea* konnte neben den aus *E. purpurea* bekannten Alkamiden ein neues Hydroxy-isobutylamid, nämlich Dodeca-2*E*,4*E*,8*Z*,10*E*-tetraensäure-hydroxy-isobutylamid, nachgewiesen werden (SIECK et al., 2000). Dieses stellt möglicherweise ein Oxidationsprodukt der genuin in der Pflanze vorkommenden Isobutylamide dar.

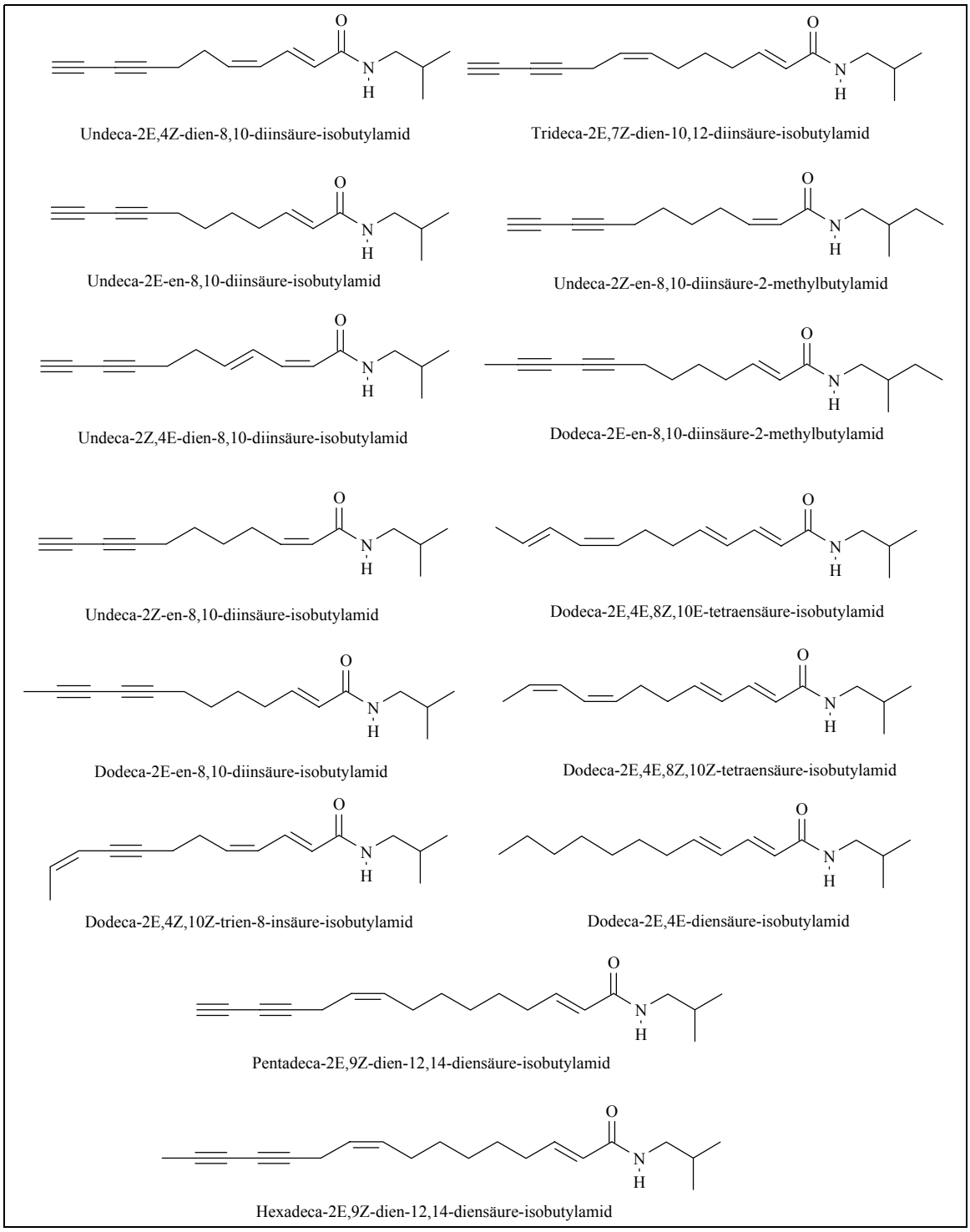


Abbildung 2.3: Alkamide aus den Wurzeln von E. angustifolia.

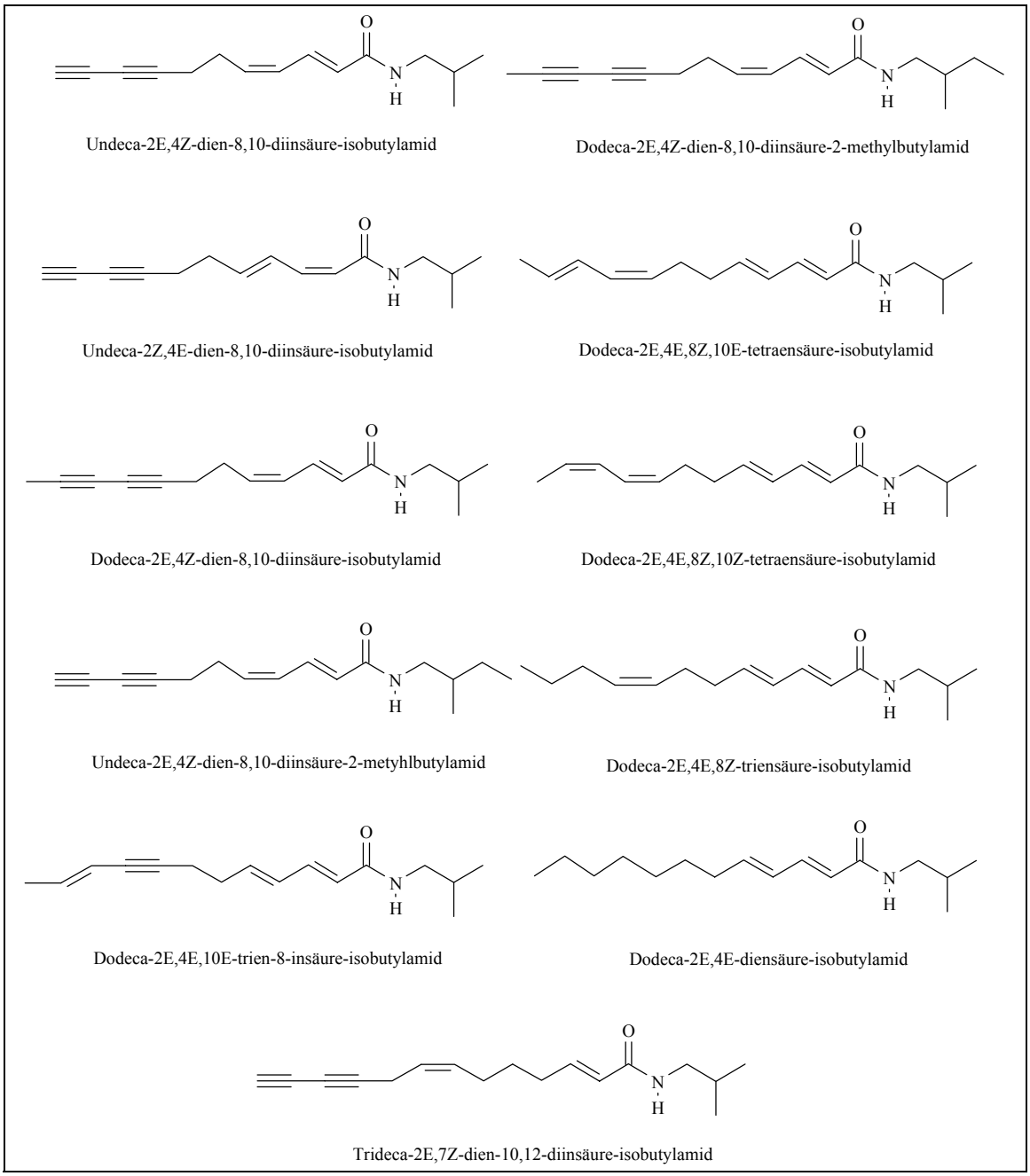


Abbildung 2.4: Alkamide aus den Wurzeln von E. purpurea.

2.2.2. Polyacetylene

Das Vorkommen von Polyacetylenen ist für Pflanzen der Asteraceen typisch. In *E. purpurea* und *E. angustifolia* (oder *E. pallida* ?) wurden mehrere Polyacetylene nachgewiesen, von denen 5 Verbindungen identifiziert werden konnten (SCHULTE et al., 1967). Aus *E. pallida* wurden 12 Ketoalkene und Ketoalkine isoliert und aufgeklärt, die später teilweise auch in *E. simulata* und *E. paradoxa* gefunden wurden (siehe Abbildung 2.5, KHAN, 1987; BAUER und FOSTER, 1989).

Die Verbindungen sind sehr instabil. Eine längere Lagerung der Wurzeln, vor allem im zerkleinerten Zustand, führt zur Oxidation der Polyacetylene durch Luftsauerstoff und zu einer Abnahme des Gehalts der genuinen Acetylene (BAUER et al., 1988). Aus diesem Grund findet man häufig in frischen nicht aber in getrockneten Wurzeln Polyacetylene. In gelagerten *E. pallida* Wurzeln konnten hingegen hydroxylierte Ketoalkine nachgewiesen werden (BAUER et al.; 1987).

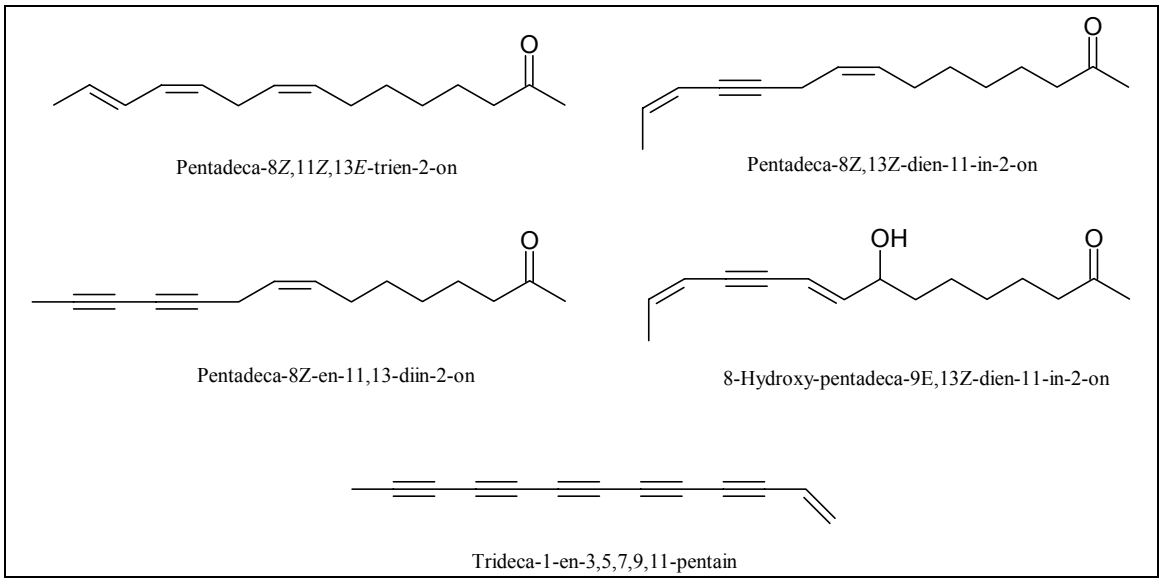


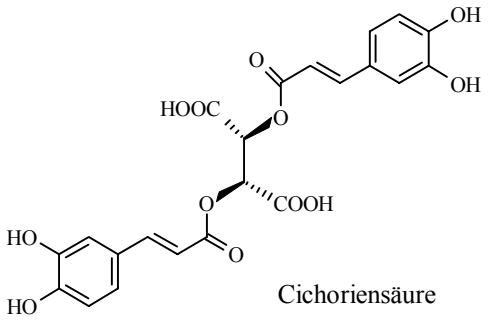
Abbildung 2.5: Auswahl einiger in Echinacea-Arten nachgewiesener Polyacetylene (BAUER und WAGNER, 1990)

2.2.3. Kaffeesäurederivate

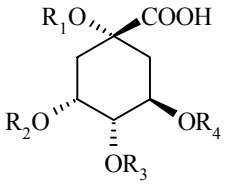
Kaffeesäurederivate sind weit verbreitet in der Gattung *Echinacea* und sind nach pharmakologischen Untersuchungen hauptsächlich für die antioxidative Wirkung der *Echinacea*-Extrakte verantwortlich (siehe Kapitel 2.4). Als erstes Kaffeesäurederivat konnte Echinacosid aus *E. angustifolia* isoliert werden, welches später auch für andere *Echinacea*-Arten, wie zum Beispiel *E. pallida*, beschrieben wurde (BAUER und WAGNER, 1990). Das um eine Glucose ärmere Strukturanalogon, Verbascosid, konnte ebenfalls in *E. angustifolia* und *E. pallida* gefunden werden (REMIGER, 1988). Ein Unterscheidungskriterium zwischen diesen beiden Arten stellt Cynarin dar, welches nicht in *E. pallida*, aber in den Wurzeln von *E. angustifolia* vorkommt (BAUER und WAGNER, 1990). Von CHEMINAT et al. (1988) konnten weitere Kaffeesäureglycoside aus *E. pallida* aufgeklärt werden (siehe Abbildung 2.6).

Ein für *E. purpurea* typisches Kaffeesäurederivat stellt Cichoriensäure dar (siehe Abbildung 2.6). In *E. purpurea*-Präparaten, insbesondere in Frischpflanzenpresssäften,

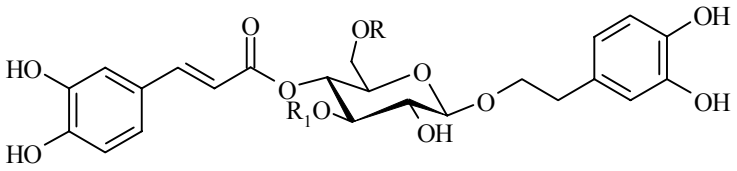
konnte Cichoriensäure jedoch meist nicht mehr nachgewiesen werden. Neuere Untersuchungen haben ergeben, dass neben Esterasen, die zur Hydrolyse der Esterbindungen führen, Phenoloxidasen für die oxidative Zersetzung von Cichoriensäure und anderen Kaffeesäurederivaten verantwortlich sind (NÜSSLEIN et al., 2000). So ist es nicht auszuschliessen, dass die in *E. purpurea* und *E. pallida* gefundene 2-O-Caffeoyl-weinsäure möglicherweise ein Artefakt der Cichoriensäure darstellt (BAUER und WAGNER, 1990). Außerdem konnten weitere Caffeoyl- bzw. Feruloylweinsäurederivate, Chlorogensäure und Isochlorogensäuren (siehe Abbildung 2.6) in *Echinacea*-Arten nachgewiesen werden (BECKER und HSIEH, 1984; REMIGER, 1988; SOICKE et al., 1988; CHEMINAT et al., 1988).



Cichoriensäure



	R1	R2	R3	R4
Chlorogensäure	H	Caffeoyl-	H	H
Isochlorogensäuren	H	Caffeoyl-	Caffeoyl-	H
	H	Caffeoyl-	H	Caffeoyl-
	H	H	Caffeoyl-	Caffeoyl-
Cynarin	Caffeoyl-	H	H	Caffeoyl-



	R	R_1
Echinacosid	Glucose (1,6-)	Rhamnose (1,3-)
6-O-Caffeoyl-echinacosid	6-O-Caffeoyl-glucose (1,6-)	Rhamnose (1,3-)
Verbascosid	H	Rhamnose (1,3-)
Desrhamnosyl-verbascosid	H	H

Abbildung 2.6: Auswahl einiger in Echinacea-Arten nachgewiesener Kaffeesäurederivate.

2.2.4. Flavonoide

Aus dem Kraut von *E. purpurea* und *E. angustifolia* (*E. pallida* ?) wurden von MALONGA-MAKOSI (1983) eine Reihe von Flavonoiden isoliert (siehe Tabelle 2.1). Sie bestimmten einen Flavonoidgehalt in den Blättern von *E. purpurea* von 0,48 % und in den von *E. angustifolia* von 0,38 %. Mittels HPLC konnte im Kraut von *E. purpurea*, *E. pallida* und *E. angustifolia* nur Rutin nachgewiesen werden (BAUER et al., 1988).

Tabelle 2.3: Isolierte Flavonoide aus E. purpurea und E. angustifolia (E. pallida?) nach MALONGA-MAKOSI (1983)

Flavonoide in E. purpurea	**Flavonoide in E. angustifolia (E. pallida?)**
Quercetin	Luteolin
Quercetin-7-glucosid	Kämpferol
Kämpferol-3-monoglucosid	Quercetin
Kämpferol-3-rutinosid	Quercetagetin-7-glucosid
Quercetin-3-glucosid	Luteolin-7-glucosid
Rutin	Kämpferol-3-glucosid
Quercetinrobinobiosid	Quercetin-3-arabinosid
Quercetin-3-xylosylgalaktosid oder Quercetin-3-galaktosylxylosid	Quercetin-3-galaktosid Quercetin-3-xylosid
Zwei Diglykoside des Isorhamnetins	Quercetin-3-glucosid
	Kämpferol-3-rutinosid
	Rutin
	Isorhamnetin-3-rutinosid
	3 Diglykoside des Apigenins, Isorhamnetin bzw. Quercetins

2.2.5. Polysaccharide und Glykoproteine

Aus dem Kraut von *E. purpurea* konnten zwei immunstimulierend wirksame Polysaccharide, nämlich ein 4-O-Methylglucuronoarabinoxylan (MG 35000 Da) und ein saures Arabinorhamnogalactan (MG 450000 Da), isoliert werden (PROKSCH, 1982; PROKSCH und WAGNER, 1987; WAGNER et al., 1985).

Weiterhin wurden drei Glycoproteine mit einem Proteingehalt von 3 % (MG 17000 Da, 21000 Da und 30000 Da) aus den Wurzeln von *E. purpurea* und *E. angustifolia* gewonnen (BEUSCHER, 1987). Die vorherrschenden Zuckerbestandteile waren Arabinose (64-84 %), Galactose (1,9-5,3 %) und Glucosamine (6 %). Der Proteinanteil enthielt vor allem Aspartat, Glycin, Glutamat und Alanin.

Aus verschiedenen Pflanzenteilen von *E. purpurea* wurden außerdem biologisch aktive Lektine nachgewiesen (POGORELAJA et al., 1997).

Zwei neutrale Fucogalactoxyloglucane (MG = 10000-25000 Da) und ein saures Arabinogalactan (MW = 75000 Da) wurden aus Zellkulturen von *E. purpurea*-Blättern gewonnen (WAGNER et al., 1988). Für diese Zellkultur-Polysaccharide wurden ebenfalls immunstimulierende Wirkungen beschrieben (siehe Kapitel 2.4., Seite 27).

In einer Presssaftzubereitung konnte neben Fruktanen vom Inulintyp (MG ca. 6.000 Da), die vermutlich nicht an der immunstimulierenden Wirkung beteiligt sind, ein saures, hoch verzweigtes Arabinogalaktan (MG ca. 70.000 Da) nachgewiesen werden (BLASCHEK et al., 1998). Diesem Polysaccharid wurde aufgrund verschiedener Untersuchungen mit ähnlich strukturierten Arabinogalaktanen eine mögliche Rolle als immunologisch aktives Prinzip in *E. purpurea*-Zubereitungen zugeschrieben.

Später wurde ein Arabinogalactanprotein, mit einem geschätzten Molekulargewicht von 1,2 x 10^6 Da, aus dem Presssaft des Krautes von *E. purpurea* isoliert (CLASSEN et al., 2000). Wie viele andere Arabinogalactanproteine enthält auch dieses einen hohen Polysaccharidanteil (83 %), einige Uronsäuren (4-5 %) und einen geringen Proteinanteil (7 %).

Aus einer 50prozentigen ethanolischen E. angustifoliae radix Tinktur konnte eine hochmolekulare Polysaccharidfraktion mit Komplement aktivierenden Eigenschaften gewonnen werden (BARSETT et al., 2000). Nach Untersuchung der Monosaccharidzusammensetzung wurde bei der Fraktion aus dem *E. angustifolia*-Präparat terminale Rhamnose, Glukose und 1,3,5-verknüpfte Arabinose nachgewiesen. Eine ebenfalls komplementaktivierende Polysaccharidfraktion aus dem Presssaft von E. purpureae herba enthielt hingegen terminale Galactose, Xylose und 1,2-verknüpfte Arabinose.

Mit einer ELISA Methode zur Identifizierung von Glykoproteinen in *Echinacea*-Zubereitungen konnte gezeigt werden, dass die Wurzeln von *E. purpurea* den höchsten und diejenigen von *E. angustifolia* den geringsten Gehalt an Glykoproteinen und Polysacchariden aufweisen. In *E. pallida* Wurzeln sind sie ebenfalls in einer hohen Konzentration enthalten, diese liegt jedoch unter derjenigen von *E. purpurea* (EGERT und BEUSCHER, 1992; BEUSCHER et al., 1995).

2.2.6. Alkaloide

Aus den Wurzeln von *E. angustifolia* wurde 1915 von HEYL und HART Betainhydrochlorid als N-haltige Verbindung isoliert. Später wurde in einem Extrakt von *E. purpurea* Glycin-Betain nachgewiesen (SOICKE, 1988). Auch neuere Untersuchungen bestätigen die Anwesenheit von Betain in *E. purpurea*- und *E. angustifolia*-Produkten. So konnte von GANZERA (2001) eine HPLC-Methode entwickelt werden, die es ermöglicht, Betain in *Echinacea*-Präparaten nach Derivatisierung mit 4-Bromphenacyl-

bromid zu quantifizieren. Alle 10 getesteten *Echinacea*-Produkte, die entweder aus *E. angustifolia*, *E. purpurea* oder einer Mischung beider Arten stammten, enthielten jeweils einen Betaingehalt von 0,04-0,64 %. Außerdem wurde der Betaingehalt im Blut von Sportlern nach der Einnahme der *Echinacea*-Produkte untersucht. Dieses konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.

Desweiteren wurden in *E. angustifolia* und *E. purpurea* die Pyrrolizidin-Alkaloide Tussilagin und Isotussilagin in sehr geringer Konzentration (0,006 %) gefunden (RÖDER et al., 1984; BRITZ-KIRSTGEN, 1985). Eine lebertoxische Wirkung der Alkaloide ist nach der Struktur-Toxizitäts-Beziehung nach MATTOCKS (1986) jedoch auszuschließen, da sie kein 1,2-ungesättigtes Necingerüst aufweisen.

2.2.7. Ätherisches Öl

E. angustifolia weist sowohl im Kraut als auch in der Wurzel einen sehr niedrigen Ätherisch-Öl-Gehalt auf, der in der Regel unter 0,1 % Öl liegt (BAUER und WAGNER, 1990). Während das Kraut von *E. pallida* ebenfalls weniger als 0,1 % Öl enthält, liegt der Gehalt in den Wurzeln bei 0,2-2,0 %. In den Wurzeln von *E. purpurea* wurde maximal 0,2 % Öl gefunden, in den Blüten und in den Blättern konnte jedoch ein Gehalt von 0,6 % nachgewiesen werden.

Das ätherische Öl des Krautes aller drei oben genannten *Echinacea*-Arten enthält Borneol, Bornylacetat, Pentadeca-8-en-2-on, Germacren D, Caryophyllen, Caryophyllenepoxid und Palmitinsäure (BOS et al., 1988). Während im ätherischen Öl des Krautes hauptsächlich Terpenoide vorzufinden sind, dominieren in der Wurzel Fettsäuren und ihre Derivate (HEINZER et al., 1988; siehe Tabelle 2.4.).

Tabelle 2.4: Ätherisch-Öl-Bestandteile der Wurzeln von E. pallida, E. angustifolia und E. purpurea nach HEINZER et al. (1988).

E. pallidae radix	E. angustifoliae radix	E. purpureae radix
Pentadeca-8Z-en-2-on	Dodeca-2,4-dien-1yl-isovalerat	Dodeca-2,4-dien-1yl-isovalerat
Pentadeca-8Z,13Z-dien-11-in-2-on	Palmitinsäure	Palmitinsäure
Pentadeca-8Z,11Z-dien-2-on	Linolensäure	Linolensäure
Tetradeca-8Z-en-11,13-diin-2-on		Germacren D

Das ätherische Öl der Früchte der drei medizinisch verwendeten *Echinacea*-Arten, der Achänen, wurde von SCHULTHESS et al. (1991) untersucht. Sie fanden einen Ölgehalt von 0,15 % in *E. angustifolia* und *E. pallida* und einen von 0,3 % in den Achänen von *E. purpurea*. Das Öl der jeweiligen Art enthielt charakteristische Bestandteile, wie zum Beispiel 1,8-Pentadecadien für *E. pallida*, Epishyobunol für *E. angustifolia* oder

Germacren D für *E. purpurea*, so dass eine Identifizierung der drei Arten auch anhand des ätherischen Öles aus den Achänen möglich sein sollte (siehe Tabelle 2.5).

Tabelle 2.5: Ätherisch-Öl-Bestandteile der Achänen von E. pallida, E. angustifolia und E. purpurea nach SCHULTHESS et al. (1991).

Achänen von *E. pallida*	**Achänen von *E. angustifolia***	**Achänen von *E. purpurea***
α-Pinen	α-Pinen	α-Pinen
β-Pinen	β-Pinen	β-Pinen
Limonen	Myrcen	Myrcen
Carvomenthen	**β-Farnesen***	Limonen
1,8-Pentadecadien	**Epishyobunol**	**Carvomenthen** (relativ hohe Konzentration)
Germacren D-Derivat	Carvomenthen	**Caryophyllen**
Carvomenthen		**Germacren D**

* *Charakteristische Bestandteile für die jeweilige Art sind fett gedruckt.*

2.2.8. Sonstige Inhaltsstoffklassen

Eine Reihe von *n*-Alkanen mit einer Kettenlänge von 10-33 C-Atomen, *n*-Triakontol, β-Sitosterin, Stigmasterin und Sitosterin-3β-O-glucosid konnten im Kraut von *E. angustifolia* (*E. pallida* ?) nachgewiesen werden (VERELIS und BECKER, 1977). In den Wurzeln von *E. angustifolia* (*E. pallida* ?) wurden Behensäureethylester gefunden. Aus den Blüten von *E. angustifolia* und *E. pallida* wurde Cyanidin-3-O-(β-D-glycopyranosid) und Cyanidin-3-O-(6-O-malonyl-β-D-glycopyranosid) nachgewiesen (CHEMINAT et al., 1989). Im destillierten Wurzelöl von *E. angustifolia* und *E. pallida* wurde von VOADEN und JACOBSON (1972) (Z)-1,8-Pentadecadien identifiziert, welches *in vivo* tumorhemmende Eigenschaften aufwies. Das synthetisch hergestellte *E*-Isomer zeigte im gleichen Test geringere Wirkungen.

13-Hydroxy-octadeca-9*Z*,11*E*,15*Z*-triensäure, Methyl-p-hydroxy-cinnamat und ein Labdanderivat konnten aus dem Kraut von *E. purpurea* isoliert werden (BOHLMANN und HOFFMANN, 1983). Aus den frischen oberirdischen Teilen von *E. purpurea* wurde ein Sesquiterpenalkohol, Germacra-4(15),5*E*,10(14)-trien-1β-ol, isoliert und aufgeklärt (REMIGER, 1988).

Im Presssaft aus dem frischen Kraut von *E. purpurea* konnten bisher für *E. purpurea* nicht bekannte Inhaltsstoffe, wie neue Sesquiterpene, Terpenoide und Phenolderivate, nachgewiesen werden (SIECK et al., 2000; siehe Abbildung 2.7).

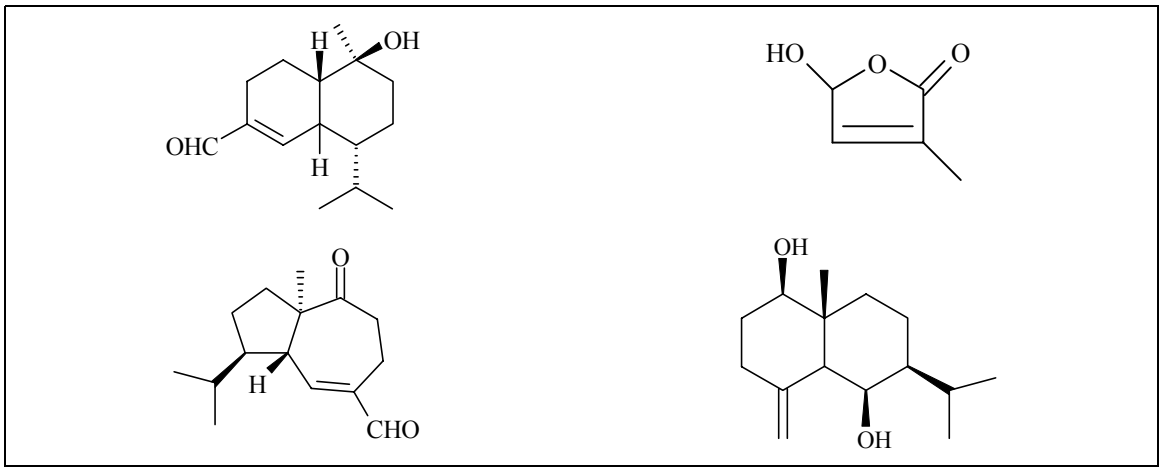


Abbildung 2.7: Auswahl der im Presssaft des frischen Krautes von E. purpurea gefundenen Sesquiterpene und Terpenoide (SIECK et al., 2000).

2.3. Traditionelle und heutige Anwendung

2.3.1. Traditionelle Anwendung

Die Berichte über die arzneiliche Verwendung von *Echinacea* durch verschiedene Indianerstämme Nordamerikas reichen bis ins 18. Jahrhundert zurück (siehe BAUER und Wagner, 1990). Zubereitungen aus unterschiedlichen *Echinacea*-Arten wurden bei Zahnschmerzen, Entzündungen der Mundschleimhaut bzw. des Rachens, bei Insektenstichen, Schlangenbissen, schlecht heilenden Wunden und fieberhaften Erkrankungen angewandt. Besonders das Verbreitungsgebiet von *E. angustifolia* stimmt mit dem Siedlungsgebiet der Indianer überein, aber auch für *E. pallida* und *E. purpurea* wurden verschiedene medizinische Anwendungen überliefert.

1762 berichtete erstmals Gronovius vom medizinischen Einsatz *Echinaceas* durch weiße Siedler (BAUER und Wagner, 1990). Im 19. Jahrhundert dehnte sich die Behandlung mit *Echinacea*-Präparaten unter den weißen Siedlern weiter aus. Besonders beliebt war dabei eine alkoholische Tinktur aus *E. angustifolia* bzw. *E. pallida*, die damals nicht weiter unterschieden wurden. Diesem Präparat („Meyer´s Blood Purifier“) wurden vielversprechende Wirkungen, wie zum Beispiel Linderung der Beschwerden bei Rheumatismus, Neuralgien, Schwindel, Augenschmerzen, Dyspepsie oder bei Vergiftungen, nachgesagt. Es wurde sogar von Erfolgen bei Cholera und Tollwut nach Behandlung mit der *Echinacea*-Tinktur berichtet.

2.3.2. Heutige Anwendung

In Europa wurde *E. angustifolia* seit dem Anfang des 20. Jahrhunderts zunächst in der Homöopathie gegen viele Beschwerden eingesetzt. Später reichte die Einfuhr von Pflanzenmaterial aus Nordamerika nicht mehr aus, so dass die Firma Madaus selber *Echinacea* anbaute. Durch eine Verwechslung wurden jedoch Samen von *E. purpurea* geschickt, so dass heute Arzneimittel dieser Art weit verbreitet sind. Die heute von der Zulassungsbehörde akzeptierte Anwendung ist innerlich zur unterstützenden Behandlung rezidivierender Infekte im Bereich der Atemwege und der ableitenden Harnwege und äußerlich bei schlecht heilenden oberflächlichen Wunden (BAZ, 1989).

Während von *E. purpurea* das Kraut und die Wurzeln arzneilich verwendet werden, werden von *E. angustifolia* und *E. pallida* in der Phytotherapie in der Regel nur Tinkturen aus den Wurzeln hergestellt. Neben dem Kraut von *E. purpurea* wurde nur noch E. pallidae radix von der Kommission E für die Indikation „zur unterstützenden Therapie grippeartiger Infekte“ positiv bewertet (BAZ,1992). *E. angustifolia* findet sich häufig in Kombination mit anderen Pflanzenextrakten auf dem Arzneimittelmarkt.

Die Hauptwirkung von *Echinacea*-Zubereitungen wird als eine unspezifische Stimulierung des Immunsystems beschrieben (BAUER, 1997). Neben dem Einsatz von *Echinacea*-Präparaten bei leichten Infektionen der Atemwege ist deshalb auch der Einsatz dieser Phytopharmaka bei chronischen Erkrankungen, zum Beispiel des Urogenital- oder Respirationstraktes und in der adjuvanten Krebstherapie.

Nach der Beurteilung durch die Kommission E des BGA 1992 wurden weitere klinische Studien durchgeführt, die die Wirkung von verschiedenen Echinacea-Zubereitungen näher untersuchten. Im Folgenden soll deshalb ein kurzer Überblick über die neueren klinischen Studien, die mit reinen *Echinacea*-Präparaten durchgeführt wurden, gegeben werden.

2.3.3. Klinische Studien mit Zubereitungen aus E. angustifoliae radix

In einer Präventions-Studie konnte für einen ethanolischen Extrakt aus E. angustifoliae radix nur eine positive Tendenz, jedoch kein signifikanter Effekt nachgewiesen werden (MELCHART et al., 1998).

2.3.4. Klinische Studien mit Zubereitungen aus E. pallidae radix

In einer doppelblinden placebokontrollierten Studie mit einem Wurzelextrakt aus *E. pallida* wurde ein signifikant positiver therapeutischer Effekt bei bakteriellen und viralen Infektionen des oberen Respirationstraktes festgestellt (BRÄUNIG und KNICK; 1993). Insgesamt nahmen 160 Patienten, die noch nicht länger als drei Tage an einer akuten Infektion der oberen Atemwege litten, an dieser Studie teil. In der Verumgruppe

verringerte sich die Krankheitsdauer gegenüber der Placebogruppe von 13 auf 9-10 Tage. Im Vergleich gingen die klinischen Symptome der Erkältung (Mattigkeit, Gliederschmerzen und Kopfschmerzen) in der Verumgruppe mit viralem Infekt rascher zurück als in der Gruppe mit bakteriellem Infekt.

2.3.5. Klinische Studien mit Zubereitungen aus E. purpureae radix

In einer klinischen Studie mit Patienten, die an einem grippalen Infekt erkrankt waren, konnte ein ethanolischer Extrakt aus E. purpureae radix in einer Konzentration von 900 mg/die die Symptome hochsignifikant verbessern und die Krankheitsdauer leicht verkürzen (BRÄUNIG et al., 1992).

In einer Präventions-Studie konnten für einen ethanolischen Extrakt aus E. purpureae radix nur positive Tendenzen, jedoch kein signifikanter Effekt erzielt werden (MELCHART et al., 1998). Die Studie wurde allerdings mit einer zu geringen Probandenzahl und einem unüblichem Einnahmeschema durchgeführt. In einer anderen Studie wurde ein Extrakt aus E. purpureae herba (95 %) und E. purpureae radix (5 %) bzw. ein reiner E. purpureae radix Extrakt auf seine Wirkungen bei ersten Anzeichen eines grippalen Effektes untersucht (BRINKEBORN et al., 1999). Während mit dem Mischextrakt aus dem Kraut und der Wurzel signifikant bessere Ergebnisse im Vergleich zu Placebo erreicht wurden, zeigte der reine Wurzelextrakt nur positive Tendenzen.

2.3.6. Klinische Studien mit Zubereitungen aus E. purpureae herba

In klinischen Studien mit einem definierten E. purpureae herba Presssaft konnte ebenfalls ein immunmodulierender Effekt gezeigt werden. In zwei neueren Studien wurde der Presssaft an Patienten mit beginnenden Symptomen einer akuten Infektion verabreicht (HOHEISEL et al., 1997, SCHULTEN et al. 2001). Hierbei konnte die vollständige Ausbildung der Erkrankung in vielen Fällen verhindert und die Krankheitsdauer im Falle eines Infektes signifikant verkürzt werden.

Außerdem wurde der Einfluss dieses Presssaftes auf die durch Hochleistungssport hervorgerufene Immunsuppression untersucht (BERG et al., 1998). Dazu nahmen in einer doppelblinden Pilotstudie 42 Triathleten 24 Tage lang bis zu ihrem Wettkampf 8 ml Presssaft, Magnesiumtabletten oder Placebo ein. Durch die Behandlung kam es zu einer leichten Veränderung der T-Lymphozyten und NK-Zellen. Außerdem wurde in der *Echinacea* behandelten Gruppe eine signifikante Erniedrigung der IL-2-Rezeptor-Serumkonzentration direkt nach dem Wettkampf beobachtet. Die IL-6-Urin- und Blutkonzentration war 1 Stunde nach dem Wettkampf in dem mit Presssaft behandelten Patientenkollektiv signifikant höher als in der Placebogruppe. Die Triathleten, die mit Presssaft behandelt wurden, mußten im Gegensatz zu den anderen beiden Behandlungsgruppen an keinem Trainingstag aussetzen.

In einer weiteren Studie beeinflusste der gleiche Presssaft die Anzahl, den Verlauf und den Schweregrad von Erkältungskrankheiten bei Patienten mit erhöhter Infektanfälligkeit günstig, es konnten jedoch in der Studie mit präventiver Gabe keine signifikanten Ergebnisse, sondern nur ein Trend, erzielt werden (SCHÖNEBERGER, 1992; GRIMM W.; MÜLLER und MÜLLER, 1999). In zwei weiteren Studien wurde die Wirksamkeit dieses Presssaftes auf die Prophylaxe von Infekten des Respirationstraktes oder Urogenitaltraktes von Marathonläufern untersucht (PARNHAM, 1996). Hierbei konnte kein Unterschied zwischen der Placebo- und der Verumgruppe festgestellt werden.

Der immunmodulierende Effekt von *Echinacea*-Präparaten wird auch in der adjuvanten Krebstherapie ausgenutzt. Mit Hilfe von *in vitro* und *in vivo* Versuchen konnte HOH (1990) eine Aktivierung immunkompetenter Zellen, insbesondere von Knochenmarksmakrophagen, hinsichtlich der Tumorzytotoxizität durch den definierten Presssaft aus dem frischen Kraut von *E. purpurea* nachweisen.

Weiterhin wurden in einer kontrollierten, offenen Studie die immunologischen Effekte des gleichen Presssaftes an Patientinnen mit kurativ behandeltem Mammakarzinom untersucht (ROSTOCK, 1998). Bei einer Normaldosierung des Presssaftes (8 ml täglich) konnten keine bis nur leichte immunrestaurative Wirkungen auf die IFN-γ Sekretion gezeigt werden. Eine höhere Dosierung (24 ml täglich) bewirkte jedoch statistisch signifikante Effekte auf die Monozyten-/Makrophagenaktivität und auf die T-Lymphozyten- und Natural Killer Zellfunktion.

In einer weiteren Studie wurde ein Kombinationspräparat aus E. purpureae herba (95%) und radix (5%) auf seine Wirkungen bei ersten Anzeichen eines grippalen Infektes untersucht (BRINKEBORN et al., 1999) . Es wurde für dieses Kombinationspräparat eine signifikante Reduktion der Grippesymptome beobachtet.

Mit dem gleichen Präparat wurde eine placebokontrollierte, Cross-over Studie durchgeführt, die die Wirkung von *E. purpurea* auf den klinischen Verlauf von chronischem Genitalherpes untersuchen sollte (VONAU et al., 2001). Jeweils drei Monate lang erhielten die Probanden einmal 800 mg *Echinacea*-Tabletten und Placebo-Tabletten zweimal täglich. Nach den sechs Monaten konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen der Verum- und der Placebogruppe bezüglich der Häufigkeit, Dauer und Schwere von Genitalherpesrückfällen oder von Immunparametern (CD4+ und Neutrophile) festgestellt werden.

2.3.7. Klinische Studien mit Zubereitungen aus mehreren *Echinacea*-Arten

Eine Teezubereitung aus einer Krautmischung von *E. purpurea* und *E. angustifolia* und einem getrockneten Wasserextrakt aus den Wurzeln von *E. purpurea* (6:1, insgesamt: 1,275 mg Extrakt pro Teebeutel) wurde in einer randomisierten, doppelblinden placebokontrollierten Studie untersucht (LINDENMUTH, 2000). Bei den ersten Anzeichen einer Infektion des Respirationstraktes sollten die Probanden (n=95) fünf bis sechs Tassen

Echinacea- bzw. Placebo Tee trinken und die Dosis in den nächsten fünf Tagen jeweils um eine Tasse Tee reduzieren. Am Ende der Studie konnte in der Verumgruppe sowohl eine signifikante Reduzierung der Erkältungssymptome gegenüber Placebo festgestellt werden, als auch eine signifikante Verminderung der Infektionstage.

In einer placebokontrollierten Prophylaxestudie wurde die Wirkung eines Extraktes aus *E. purpurea* und *E. angustifolia* (enthielt: 0,16 % Cichoriensäure, kaum Echinacosid und nur Spuren von Alkamiden) auf eine Rhinovirus-Infektion untersucht (TURNER et al., 2000; DENNEHY, 2001). Die Probanden nahmen 14 Tage vor bis 5 Tage nach der Exposition mit dem Rhinovirus drei mal täglich 300 mg des *Echinacea*-Pulvers ein. In der Verumgruppe konnte nur ein positiver Trend jedoch kein signifikanter Effekt bezüglich der Anzahl der Infektionen mit dem Virus, der Anzahl der auftretenden Erkältungen und der Schwere der Symptome gegenüber der Placebogruppe beobachtet werden.

2.4. Bisherige pharmakologische Untersuchungen

Es liegen eine Reihe von pharmakologischen Untersuchungen zu den drei medizinisch eingesetzten *Echinacea*-Arten, *E. angustifolia*, *E. pallida* oder *E. purpurea*, vor. Aus diesem Grund werden im Folgenden wiederum nur pharmakologische Studien aufgeführt, die nach der Bewertung der *Echinacea*-Arten durch die Kommission E (*BAZ*, 1989, 1992) durchgeführt wurden.

2.4.1. Pharmakologische Wirkungen von E. angustifoliae radix

Ein ethanolischer Wurzelextrakt aus *E. angustifolia* zeigte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* phagozytosestimulierende Eigenschaften (BAUER et al., 1989). Bei weiterer Fraktionierung des Extraktes stellte sich vor allem der Chloroformextrakt, mit der in ihm enthaltenen Alkylamidfraktion, als besonders wirksam heraus. Außerdem konnte aus einem wässrigen *E. angustifolia*-Extrakt eine Polysaccharid-Fraktion gewonnen werden, die ebenfalls *in vitro* und *in vivo* phagozytosestimulierende Aktivität besaß (WAGNER et al., 1985).

Weiterhin zeigte ein Ethanol/Wasser Extrakt (1:1) aus der frischen Wurzel von *E. angustifolia* bei Mäusen *in vivo* phagozytosestimulierende Wirkungen (BUKOVSKÝ et al., 1993 und 1995).

Eine hochmolekulare Fraktion aus E. angustifoliae radix führte in *in vitro* Versuchen zu einer signifikanten Stimulierung der Proliferation von Milzzellen aus Mäusen und erhöhte den IgM-Titer in Überständen von Milzzellkulturen (BEUSCHER et al., 1995).

Die gleiche Fraktion aus den Wurzeln von *E. angustifolia* (MG > 10000 Da) induzierte *in vitro* und *in vivo* höhere Interleukin-1-, Interleukin-6- und Tumornekrosefaktor-α-Titer (BEUSCHER et al., 1995).

Darüber hinaus konnte ein E. angustifoliae radix Extrakt (tägliche Gabe über 6 Wochen) nach einer wiederholten Stimulierung von Ratten mit einem Antigen („Keyhole limpet hemocyanin“) die primäre und sekundäre IgG-Konzentration und den IGM-Titer in den Tieren erhöhen (REHMAN et al., 1999).

Außerdem konnten *in vitro* für den *n*-Hexanextrakt aus den Wurzeln von *E. angustifolia* und für die enthaltenden Alkamide Hemmeffekte auf die Cyclooxygenase 1 bzw. die 5-Lipoxygenase nachgewiesen werden (MÜLLER-JAKICet al., 1994). CLIFFORD et al. (1999) konnten ebenfalls für einen alkoholischen Extrakt aus *E. angustifolia* radix und noch verstärkt für lipophile Teilfraktionen gute Hemmungen der Cyclooxygenase 1 und moderate Hemmungen der Cyclooxygenase 2 zeigen.

Ein Methanolextrakt aus gefriergetrockneter E. angustifoliae radix und alkoholische Extrakte aus den Wurzeln oder Blättern von *E. angustifolia* wiesen in verschiedenen *in vitro* Tests antioxidative Aktivität auf (HU und KITTS, 2000; SLOLEY et al., 2001; CLIFFORD et al., 1999). HU und KITTS erklärten diese Wirkung durch Radikalfängereigenschaften und Chelatbildung von freien Metallionen mit Inhaltsstoffen aus dem *Echinacea*-Extrakt, wie zum Beispiel Kaffeesäurederivate und Flavonoiden.

Für Echinacosid, einem Kaffeesäurederivat aus *E. angustifolia*, konnte in verschiedenen *in vitro* Versuchen ein antioxidativer Effekt festgestellt werden (MAFFEI FACINO et al., 1995; HEILMANN et al., 2000; LI et al., 1993; XIONG et al., 1996; ZHENG et al., 1993).

Die antioxidativen und entzündungshemmenden Eigenschaften von Echinacosid wurden auch in einem anderen Testsystem untersucht (XIONG et al., 2000). Hierbei reduzierte Echinacosid durch Radikalfängereigenschaften die NO-Konzentration in mit Lipopolysaccharid stimulierten Mausmakrophagen und könnte so nach Meinung der Autoren zur entzündungshemmenden Wirkung von *Echinacea*-Präparaten beitragen.

2.4.2. Pharmakologische Wirkungen von E. pallidae radix

Für einen ethanolischen Wurzelextrakt aus *E. pallida* konnten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* phagozytosestimulierende Eigenschaften nachgewiesen werden (BAUER et al., 1989). Bei weiterer Auftrennung des Extraktes zeigte vor allem der Chloroformextrakt eine gute Wirksamkeit.

In *in vitro* Versuchen wurde für eine hochmolekulare Fraktion aus E. pallidae radix eine Stimulierung der Proliferation von Milzzellen aus Mäusen gezeigt, diese blieb jedoch unter der Proliferationssteigerung, die durch *E. angustifolia*- und *E. purpurea*-Extrakte

hervorgerufen wurde (BEUSCHER et al., 1995). Der IgM-Titer in Überständen der Milzzellkulturen konnte durch den *E. pallida*-Extrakt ebenfalls erhöht werden.

Die gleiche Fraktion aus *E. pallida*-Wurzel (MG > 10000 Da) induzierte *in vitro* und *in vivo* höhere Interleukin-1-, Interleukin-6- und Tumornekrosefaktor-α-Titer (BEUSCHER et al., 1995). Dieselbe Fraktion wurde auch auf ihre antivirale Aktivität gegenüber Herpes-simplex-Virus Typ 1 (HSV) getestet. Dabei verringerte *E. pallida* die Anzahl der Viren dosisabhängig. Die Wirkung der hochmolekularen Fraktion wird mit der Anwesenheit von Glykoproteinen und Polysacchariden in Zusammenhang gebracht.

Ein Methanolextrakt aus gefriergetrockneter *E. pallida*-Wurzel wies in verschiedenen *in vitro* Tests sehr gute antioxidative Eigenschaften auf, die die antioxidativen Aktivitäten von *E. angustifolia* und *E. purpurea* überragten (HU und KITTS, 2000).

Eine andere Arbeitsgruppe fand in unterschiedlichen Testsystemen vergleichbar gute antioxidative Effekte für alle drei medizinisch verwendeten *Echinacea*-Arten (SLOLEY et al., 2001). Da *E. pallida* ebenfalls Echinacosid enthält, kann ein Teil der antioxidativen Wirkung auf dieses Kaffeesäurederivat zurückgeführt werden (siehe Kapitel 2.4.1 Pharmakologische Wirkungen von E. angustifoliae radix).

Ein Soxhlet-Ethanol Extrakt aus den Wurzeln von *E. pallida* und reines Echinacosid zeigten nach topischer Applikation auf Wunden bei Ratten nach 48 und vor allem nach 72 Stunden wundheilende und entzündungshemmende Wirkungen (SPERONI et al., 2002). Ein *E. purpurea*-Wurzelextrakt zeigte nach 24 Stunden leichte wundfördernde und antiinflammatorische Wirkungen, diese konnten aber nach 48 und 72 Stunden nicht gesteigert werden. Die Autoren begründen die gute Wirkung des *E. pallida*-Extraktes mit dem hohen Gehalt an Echinacosid, welches Anti-Hyaluronidase Aktivität aufweist.

Ein *n*-Hexanextrakt aus der Wurzel von *E. pallida* hemmte das Wachstum von Pilzkulturen, wie *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *C. steatulytica*, *C. shehata*, *C. kefyr* und *C. tropicalis*, unter UV-Bestrahlung und in geringeren Maßen ohne UV-Bestrahlung (BINNS et al., 2000). Nach Meinung der Autoren ist die Wirkung vor allem auf die enthaltenen Polyacetylene zurückzuführen. Eine besonders starke Hemmung unter UV-Bestrahlung zeigte das Polyacetylen, Trideca-1-en-3,5,7,9,10-pentain. Die Wirkung des Extraktes aus *E. pallida* war jedoch geringer als die Aktivität des *n*-Hexanextraktes aus *E. purpurea*.

An Mäusen konnte ein protektiver Effekt gegenüber der Toxizität von Cisplatin durch einen Ethanol-Wasser Extrakt aus der Ganzpflanze von *E. pallida* gefunden werden (MUSTEA et al., 1997). Der Extrakt bewirkte eine geringere Abnahme des Körpergewichtes und ein beschleunigtes Erreichen des Ausgangsgewichtes.

2.4.3. Pharmakologische Wirkungen von E. purpureae radix

Ein ethanolischer Wurzelextrakt aus *E. purpurea* zeigte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* phagozytosestimulierende Eigenschaften (BAUER et al., 1989). Bei weiterer Fraktionierung des Extraktes zeigten zum einen die Alkamidfraktionen eine gute Aktivität, zum anderen auch Cichoriensäure, ein Kaffeesäurederivat aus dem hydrophilen Extrakt. Außerdem konnte aus einem wässrigen *E. purpurea*-Extrakt eine Polysaccharid-Fraktion gewonnen werden, die ebenfalls *in vitro* und *in vivo* phagozytosestimulierende Aktivität besaß (WAGNER et al., 1985).

Eine hochmolekulare Fraktion aus E. purpureae radix führte *in vitro* im Vergleich zu E. angustifoliae und E. pallidae radix zu der stärksten Stimulierung der Proliferation von Milzzellen aus Mäusen und erhöhte den IgM-Titer in Überständen von Milzzellkulturen (BEUSCHER et al., 1995). Auch die Zytokinstimulierung (Interleukin-1-, Interleukin-6- und Tumornekrosefaktor-α-Titer, Interferon$_{\alpha/\beta}$) fiel durch die hochmolekulare Fraktion aus den Wurzeln von *E. purpurea* sowohl *in vitro* als auch *in vivo* im Vergleich zu den anderen beiden *Echinacea*-Arten besonders stark aus (BEUSCHER et al., 1995).

Dieselbe Fraktion wurde auf ihre antivirale Aktivität gegenüber Herpes-simplex-Virus Typ 1 (HSV) und Influenza-A2-Virus getestet. Dabei verringerte *E. purpurea* die Anzahl der Viren dosisabhängig. In diesem Testsystem schnitt die *E. purpurea*-Fraktion wiederum besonders gut ab. Die Autoren bringen die gute Wirkung von *E. purpurea* in Zusammenhang mit der besonders hohen Konzentration an Polysacchariden und Glykoproteinen.

Ein Dekokt und ein 30 %iger ethanolischer Extrakt aus E. purpureae radix bewirkten eine Wachstumshemmung von ECHO$_9$ Hill Viruszellen in Zellkulturen aus Affennierenzellen (SKWAREK et al., 1996). In den Zellüberständen konnten typische Interferonwirkungen nachgewiesen werden. Aus diesem Grund vermuten die Autoren, dass E. purpureae radix eine Interferon-vermittelte, antivirale Aktivität besitzen könnte.

Cichoriensäure, das Hauptkaffeesäurederivat aus der Wurzel von *E. purpurea*, hemmte die HIV-Integrase *in vitro* und verhinderte so die HIV-1 Replikation in Zellkulturen in einer Konzentration von 1-4 µg/ml (ROBINSON et al., 1996; MCDOUGALL et al., 1998). Die toxischen Konzentrationen der Kaffeesäurederivate lagen 100-fach oberhalb der antiviralen Dosis. Wurde Cichoriensäure in Kombination mit einem Protease-Inhibitor und Zidovudin eingesetzt, so konnte die inhibitorische Wirkung jedes einzelnen Wirkstoffs verstärkt werden (ROBINSON, 1998).

Weiterhin schützte Cichoriensäure Typ III Kollagen vor radikalinduziertem Abbau (MAFFEI FACINO et al., 1995). Darüberhinaus konnte für Kaffeesäurederivate, besonders für Cichoriensäure, *in vitro* eine Hyaluronidase-Hemmung nachgewiesen werden, wodurch das Eindringen von Infektionserregern in Zelloberflächen und die Ausbreitung einer Infektion eingeschränkt wird (MAFFEI FACINO et al., 1993).

Ein Soxhlet-Ethanol Extrakt aus E. purpureae radix zeigte nach topischer Applikation auf Wunden bei Ratten nach 24 Stunden leicht wundfördernde und enzündungshemmende Wirkungen (SPERONI et al., 2002). Im Gegensatz zu einem *E. pallida*-Wurzelextrakt konnte der Effekt jedoch nicht nach 48 und 72 Stunden gesteigert werden.

Ein Methanolextrakt aus gefriergetrockneter *E. purpurea*-Wurzel und ein Alkoholextrakt aus E. purpureae radix wiesen in verschiedenen *in vitro* Testmodellen antioxidative Aktivität auf (HU und KITTS, 2000; SLOLEY et al., 2001).

CLIFFORD et al. (1999) konnten für einen alkoholischen Extrakt aus E. purpureae radix und noch verstärkt für lipophile Teilfraktionen gute Hemmungen der Cyclooxygenase 1, die vergleichbar mit der Aktivität von Aspirin und Ibuprofen waren, und moderate Hemmungen der Cyclooxygenase 2 nachweisen.

Ein frisches Homogenat aus pulverisierten, getrockneten *E. purpurea*-Wurzeln erhöhte *in vitro* die NK-Aktivität peripherer Blutmonozyten (PBMC) und die Antikörperabhängige Zytotoxizität der PBMC von Gesunden und immunsupprimierten Patienten, wie zum Beispiel von Aids-Patienten, signifikant (SEE et al., 1997).

In einem Tierversuch wurde ebenfalls die Wirkung eines Extraktes aus E. purpureae radix, der Mäusen ein oder zwei Wochen lang mit ihrem Futter zugeführt wurde, auf verschiedene Immunzellen untersucht (SUN et al., 1999). Nach einer Woche konnte bereits eine signifikante Stimulierung der NK-Zellen im Knochenmark festgestellt werden. Nach 2 Wochen wurde zusätzlich eine signifikante Zunahme der Monozyten im Knochenmark und der NK-Zellen und Monozyten in der Milz beobachtet. Alle anderen Immunzellen zeigten weder nach einer noch nach zwei Wochen einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe. Wurde der Extrakt den Mäusen jedoch gemeinsam mit Melatonin, einem weiteren Immunstimulator, verabreicht, kam es zu einer signifikanten Vermehrung der unreifen Granulozyten und zu einer signifikanten Reduzierung der reifen Granulozyten im Knochenmark und in der Milz (CURRIER et al., 2001).

Diese Versuche weisen nach Meinung der Autoren auf die Bedeutsamkeit von Kombinationen auch mit nicht verschreibungspflichtigen Phytopharmaka hin.

Der gleiche Wurzelextrakt aus *E. purpurea* (Firma Phyto Adrien Gagnon, Canada) wurde 14 Tage lang (0,45 mg/Tag) alternden Mäusen über ihr Futter verabreicht (CURRIER und MILLER, 2000). Der Extrakt erhöhte auch bei den alternden Mäusen die Anzahl der NK-Zellen in der Milz und im Knochenmark und führte gleichzeitig zu einer stärkeren Zytotoxizität der NK-Zellen gegenüber Tumorzellen.

Ein *n*-Hexanextrakt aus der Wurzel von *E. purpurea* hemmte *in vitro* das Wachstum von Pilzkulturen, wie *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *C. steatulytica*, *C. shehata*, *C. kefyr* und *C. tropicalis*, unter UV-Bestrahlung und in geringeren Maßen ohne UV-Bestrahlung (BINNS et al., 2000). Die gute Wirkung des *n*-Hexanextraktes

führten die Autoren vor allem auf die enthaltenen Polyacetylene zurück, da aus *E. purpurea* isoliertes Trideca-1-en-3,5,7,9,11-pentain signifikante, antifungale Wirkungen unter UV-Licht zeigte. Die isolierten Isobutylamide, das Undeca-2E,4Z,dien-8,10-diinsäureisobutylamid und die Dodeca-2*E*,4*E*,8*Z*,10*Z/E*-tetraensäureisobutylamide, besaßen hingegen nur schwache phototoxische, antifungale Aktivität.

Ein Ammoniumhydroxidextrakt aus der Wurzel von *E. purpurea* führte in verschiedenen Konzentrationen zu keiner Stimulierung des Glucosemetabolismus und zeigte damit keine insulinartige biologische Aktivität (BROADHURST et al., 2000).

Ein Alkoholextrakt aus E. purpureae radix wurde *in vivo* auf die Stimulierung der Antikörperproduktion untersucht (SOUTH und EXON, 2001). Nachdem 2 Monate alten Ratten ein Antigen injiziert wurde, mischte man anschließend 2 Wochen lang den *E. purpurea*-Extrakt (250 mg/kg) unter ihr Futter. Die Antikörperproduktion der Verumgruppe unterschied sich nicht signifikant von der Placebogruppe.

2.4.4. Pharmakologische Wirkungen von E. purpureae herba

Ein Presssaft aus den oberirdischen blühenden Teilen von *E. purpurea* stimulierte die Phagozytose humaner Granulozyten (STOTZEM et al., 1992; WILDFEUER und MAYERHOFER, 1994). Der gleiche Presssaft erhöhte die schnelle, kurzfristige Freisetzung von Sauerstoffradikalen (Oxidative burst) aus humanen, polymorphkernigen Leukozyten (PMN) gesunder Spender (BAUER et al., 1999).

In neueren Untersuchungen konnte ebenfalls eine phagozytosestimulierende und Komplement aktivierende Wirkung des frischen Presssaftes aus dem Kraut von *E. purpurea* nachgewiesen werden (ODENTHAL et al., 2000). Bei weiterer Auftrennung des Presssaftes stellten sich die niedermolekularen Fraktionen als unwirksam und die hochmolekularen Fraktionen als sehr gut wirksam heraus.

Der Einfluss des Presssaftes auf Virusinfektionen und virale Antigenexpressionen wurde in lymphoiden Zellen, unreifen T-Zellen HSB2, die von einem Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie stammten, untersucht (EICHLER und KRUEGER, 1994). Dabei konnte gezeigt werden, dass der Presssaft die Virusreplikation oder die Virusantigenkonzentration am Ende der Therapie im Vergleich zur Kontrolle nicht erhöht.

Ein frisch gepresster, lyophilisierter bzw. getrockneter Presssaft aus E. purpureae herba induzierte eine signifikant höhere TNF-α-, Interleukin-1-, IL-6- und IL-10-Freisetzung von humanen Makrophagen gegenüber unstimulierten Zellen (BURGER et al., 1997). Da die Zytokininduktion durch den gesamten Presssaft höher war als die Stimulierung durch einzelne Inhaltsstoffe, wie z.B. Polysaccharide, nehmen die Autoren an, dass verschiedene Komponenten des Extraktes für die Zytokinwirkung verantwortlich sind.

Nachdem pulverisiertes Kraut von E. purpureae herba einem künstlichen Verdauungssaft ausgesetzt wurde, löste es ebenfalls eine zeit- und dosisabhängige Stimulierung der

TNF-α-, NO-, Interleukin-1α-, Il-1β-, Il-6- und IL-10-Freisetzung *in vitro* aus (RININGER et al., 2000). Außerdem bewirkte das so aufgearbeitete Kraut eine signifikante Steigerung der Vitalität und Proliferation von menschlichen Blutmonozyten.

Alkamide aus *E. purpurea* stimulierten in einer Dosierung von 12 µg/kg Körpergewicht pro Tag signifikant die Alveolarmakrophagen von gesunden Ratten (GOEL et al., 2002). Im Gegensatz zu Cichoriensäure und Polysacchariden führten die Alkamide zu einem signifikanten Anstieg der Phagozytoseaktivität, des Phagozytoseindices, der TNF-α- und NO-Produktion der Alveolarmakrophagen. Keine der drei Verbindungen konnte die Interleukinausschüttung von Milzzellen erhöhen.

Ein ethanolischer Extrakt aus den Blättern von *E. purpurea* führte zu einer Lebensverlängerung von Mäusen mit einem Thymuslymphom, das durch ein Leukämie-Virus verursacht wurde (HAYASHI et al., 2001). Außerdem führte die orale Applikation des Extraktes zu einer signifikanten Suppression der Lymphomvergrößerung, zu einer Stimulierung der Interferon-γ-Freisetzung und zu einer Hemmmung der Virusvermehrung.

Ein Dekokt, hergestellt nach der 4. Ausgabe der polnischen Pharmakopoe, und ein 30 prozentiger ethanolischer Extrakt aus E. purpureae herba bewirkten eine Hemmung der intrazellulären Vermehrung von $ECHO_9$-Hill-Viruszellen in Zellkulturen aus Affennierenzellen (SKWAREK et al., 1996).

Ein ethanolischer Extrakt aus E. purpureae herba zeigte einen immunstimulierenden Effekt auf Mäuse (n=6) nach intraperitonealer Applikation (BUKOVSKÝ et al., 1993). Durch den *E. purpurea*-Extrakt konnte der Anteil der phagozytierenden Makrophagen gegenüber der Kontrolle gesteigert werden. Außerdem wirkte E. purpureae herba auf *E. coli* K12 ROW bakterizid ($p < 0{,}001$) und erhöhte die metabolische Aktivität der Makrophagen.

Desweiteren konnten für einen Extrakt aus den Blättern von E. purpureae herba antioxidative Eigenschaften festgestellt werden (SLOLEY et al., 2001).

Für das Hauptkaffeesäurederivat aus E. purpureae herba, Cichoriensäure, wurden antioxidative und antivirale Wirkungen nachgewiesen (siehe Kapitel 2.4.3 Pharmakologische Wirkungen von E. purpureae radix).

Eine Injektion einer Polysaccharidfraktion aus Zellkulturen von *E. purpurea*-Blättern verursachte eine mehrstündige Steigerung der Zahl der Gesamtleukozyten und eine Erhöhung von TNF-α bei gesunden Probanden (MELCHART et al., 1993).

Polysaccharide (Xyloglucane und Arabinogalactane) aus den gleichen Zellkulturen von *E. purpurea* zeigten eine Aktivierung der TNF-α Freisetzung und eine Erhöhung der Zytotoxizität von Makrophagen aus gesunden oder immunsupprimierten Tieren (STEINMÜLLER et al., 1993). Weiterhin erhöhten diese Polysaccharide die Leukozytenzahl in immunsupprimierten Mäusen nach intraperitonealer Injektion von

Cyclophosphamid *in vivo*. Außerdem konnte die Applikation von Polysacchariden die Tiere vor einer tödlichen Dosis an *Leishmania monocytogenes* schützen. Im Gegensatz zu den nicht mit Polysacchariden behandelten Tieren überlebten 68 % der behandelten Tiere die LD_{100} Dosis. *Candida albicans*-Kolonien in Nieren von Mäusen, die mit Cyclosporin A behandelt wurden, ließen sich ebenfalls durch die Zellkultur-Polysaccharide um 80 % reduzieren. Dies wird auf die stimulierende Wirkung der Polysaccharide auf Makrophagen zurückgeführt.

2.4.5. Pharmakologische Untersuchungen von nicht näher definierten *Echinacea*-Präparaten

Leider fehlen bei einigen Untersuchungen die genauen Angaben über die verwendete *Echinacea*-Art oder den verwendeten Pflanzenteil. Diese Studien sind im Folgenden zusammengefaßt.

Ein nicht näher definierter *Echinacea*-Extrakt (0,5 mg/ml) konnte nach einer Inkubationszeit von 3-7 Tagen in Makrophagen die IL-12 Ausschüttung im Vergleich zu nicht behandelten Makrophagen stimulieren (KICK und BARRA, 1999). In Mäusen führte die intravenöse Applikation von 0,1 ml des *Echinacea*-Extraktes zu einer verstärkten Proliferation von Lymphozyten und zu einem 2-3 prozentigen Anstieg der Monozytenzahl.

Ein Glycerinextrakt aus einem *Echinacea* Kraut (Nature´s Way Products, 250 mg getrocknetes Kraut:1 ml Extrakt, nähere Charakterisierung fehlt) wurde *in vivo* auf die NK-Zellaktivität, Stimulierung der Antikörperproduktion und T-Zellproduktion untersucht (SOUTH und EXON, 2001). Nachdem weiblichen und männlichen Ratten ein Antigen injiziert wurde, mischte man anschließend 6 Wochen lang den *Echinacea*-Extrakt (250 mg/kg) unter ihr Futter. Weder die NK-Zellaktivität noch die T-Zell- und Antikörperproduktion konnten durch den Glycerinextrakt stimuliert werden. Nach 2 Wochen wurde bei den weiblichen Ratten sogar eine Verringerung der Antikörperproduktion festgestellt.

In einem weiteren Tierversuch wurde der Einfluss eines wässrigen *E. purpurea*-Extraktes auf das Tumorwachstum bei Mäusen untersucht (SIMPSON et al., 2001). Diesen wurde täglich ab einer Woche vor einer Tumorimpfung der Extrakt intraperitoneal injiziert. In der Verumgruppe wurde eine Verlangsamung des Tumorwachstums und ein insgesamt kleinerer Tumor als bei den Kontrolltieren beobachtet. Gleichzeitig stieg in den mit *Echinacea* behandelten Tieren die NK-Zellzahl an. Der Tumor wurde in der Verumgruppe jedoch nicht schneller abgestossen. Dies zeigt nach Meinung der Autoren, dass *E. purpurea* zwar das unspezifische Immunsystem, wie zum Beispiel NK-Zellen, stimulieren kann, jedoch keinen Einfluss auf das spezifische Immunsystem, wie die cytotoxischen T-Zellen, hat.

PARANICH et al. (1993) wiesen antioxidative Eigenschaften durch einen alkoholischen *E. purpurea*-Extrakt in Organen von radioaktiv bestrahlten Ratten *in vivo* nach. Außerdem stellten sie einen positiven Einfluss des *Echinacea*-Extraktes auf den Gehalt von fettlöslichen Vitaminen in den Geweben der radioaktiv bestrahlten Ratten fest. Sie vermuteten, dass die körpereigenen Vitaminreserven mobilisiert und die reduzierte Vitamin E-Form vermehrt angeboten wurden.

Eine *E. purpurea*-Tinktur (vermutlich radix), die 7 Tage vor und nach einer radioaktiven Bestrahlung an Ratten verabreicht wurde, zeigte einen positiven Einfluss auf das antioxidative System der Leber und führte zu einer Normalisierung der entsprechenden Enzymaktivitäten, wie zum Beispiel Superperoxid-Dismutase und Katalase, auf das Kontrollwertniveau (GERUSH und MESHCHISHEN, 1999).

Die Beurteilung vieler Untersuchungen ist dadurch erschwert, dass häufig nicht genau definierte Extrakte verwendet wurden. Es fehlen teilweise Angaben über die Art des Pflanzenteils, die Stammpflanze oder das Extraktionsmittel. Es ist daher nicht verwunderlich, dass in verschiedenen Studien unterschiedliche Ergebnisse erzielt wurden. Für zuverlässige, reproduzierbare Ergebnisse müssen eine eindeutige Charakterisierung der Extrakte und genaue Angaben der Versuchsbedingungen gefordert werden.

Insgesamt zeigen die oben genannten Untersuchungen, dass *Echinacea*-Zubereitungen auf unterschiedliche Weise in das unspezifische Immunsystem eingreifen können.

Die antiviralen Wirkungen verschiedener *Echinacea*-Extrakte geben weiterhin eine Erklärung für den größeren therapeutischen Erfolg von *Echinacea*-Präparaten bei viralen Infekten (siehe Kapitel 2.3.4).

Außerdem machen die einzelnen pharmakologischen Studien deutlich, dass die immunologischen und anderen Effekte der *Echinacea*-Zubereitungen auf mehrere Inhaltsstoffklassen verteilt sind und so der gesamte Extrakt als Wirkprinzip angesehen werden muss.

2.5. *Verträglichkeit und Toxizität von* Echinacea-*Präparaten*

Die Verträglichkeit von *Echinacea*-Präparaten ist in der Regel sehr gut. Die berichteten Nebenwirkungen beziehen sich meist auf die parenterale Applikation von *Echinacea*-Präparaten (NETZWERK AKTUELL, 1991; ARZNEIMITTELKOMMISSION DER DEUTSCHEN ÄRZTESCHAFT, 1996), so dass diese vom Markt genommen wurden. Unerwünschte Wirkungen, die durch die topische oder orale Applikation von *Echinacea*-Produkten entstanden sind, sind in der Zahl sehr gering und nicht eindeutig. Neben verschiedenen einzelnen Symptomen, wie unangenehmer Geschmack oder Nausea handelte es sich in den meisten Fällen um allergische Reaktionen (PARNHAM, 1996; SCHÖNHÖFER, 1999; SOON und CRAWFORD, 2001; MULLINS, 1998 und 2002; BIELORY, 2002). Es ist jedoch meist nicht zweifelsfrei bewiesen, ob die *Echinacea*-Präparate die eigentliche Ursache für die anaphylaktischen Reaktionen darstellten (MYERS und WOHLMUTH, 1998).

Insgesamt kann das allergische Potential aufgrund der Datenlage als sehr gering eingeschätzt werden. Trotzdem sollten atopische Patienten vorsichtig mit der Anwendung von *Echinacea*-Produkten sein und Patienten mit Allergien gegen Korbblüter muss von der Einnahme von *Echinacea*-Präparaten abgeraten werden.

Im Ames-Test wurden für einen *E. angustifolia* Extrakt leichte mutagene Effekte nachgewiesen, die jedoch nicht eindeutig waren und einer Überprüfung bedürfen (SCHIMMER et al., 1994). Ein Extrakt aus E. purpureae herba zeigte keinerlei mutagene Wirkungen.

In Toxizitätsuntersuchungen erwies sich ein definierter Presssaft aus dem Kraut von *E. purpurea* sowohl bezüglich der akuten und subakuten Toxizität als auch hinsichtlich der Mutagenität als untoxisch (MENGS et al., 1991).

In einer prospektiven vergleichenden Studie wurde der Einfluss von E. purpureae radix auf die Spermien-DNA, auf die Befruchtung von Eizellen und die Spermienbeweglichkeit untersucht (ONDRIZEK et al., 1999). Frisch gespendete humane Spermien wurden hierfür mit 0,8 mg/ml (ein tausendstel der empfohlenen oralen Tagesdosis) bzw. mit 8 mg/ml *E. purpurea*-Lösung für 7 Tage inkubiert. Eine Behandlung der Spermien mit *E. purpurea* resultierte in einer signifikanten Denaturierung der Spermien-DNA. Mutationen der DNA wurden nicht festgestellt. Lediglich die hohe Konzentration des Extraktes bewirkte eine signifikante Hemmung der Spermienpenetration und einen reduzierten Kapazitätsindex. Möglicherweise blockiert die hohe Konzentration an *E. purpurea*-Inhaltsstoffen Enzyme, die den Befruchtungsprozeß einleiten (z. B. Hyaluronidase). Die Spermienbeweglichkeit und Geschwindigkeit nahm nach einer 24stündigen Inkubation mit dem konzentrierten *E. purpurea*-Extrakt ebenfalls ab. Da keine Studien über Konzentrationen der *Echinacea*-Inhaltsstoffe nach Einnahme der ensprechenden Präparate im Blut oder in den Spermien existieren, wurden die eingesetzten Konzentrationen zufällig gewählt. Es ist anzunehmen, wie die Autoren betonen, daß die Konzentrationen *in vivo* viel niedriger liegen, und somit die Ergebnisse keine Rückschlüsse auf physiologische Verhältnisse erlauben.

Ein ethanolischer Extrakt aus den Wurzeln von *E. angustifolia* und von *E. purpurea* zeigte *in vitro* eine relativ hohe Hemmung des menschlichen Cytochrom p450 3A4 Enzyms (IC_{50} zwischen 1-5 %; BUDZINSKI et al., 2000). Moderate Hemmungen des Enzyms ergaben ethanolische Extrakte aus dem Kraut von *E. purpurea* und aus einer 1:1 Mischung aus *E. angustifolia* und *E. purpurea*. Reines Echinacosid hemmte das Isoenzym Cytochrom 3A4 ebenfalls moderat, Cichoriensäure hingegen führte nur zu einer sehr schwachen Hemmung. Die Relevanz dieser Untersuchungen *in vivo* muss jedoch erst untersucht werden.

In einer prospektiven Studie wurde bei 206 Frauen, die während ihrer Schwangerschaft *Echinacea* (Art der Ausgangsdroge unbekannt) eingenommen haben, im Vergleich zu einer Kontrollgruppe kein erhöhtes Risiko für Mißbildungen oder andere Geburtskomplikationen bei den Neugeborenen festgestellt (GALLO et al., 2000). Zu dem gleichen Ergebnis kam eine Studie mit 250 schwangeren Frauen, die während ihrer Schwangerschaft neben anderen Phytopharmaka *Echinacea*-Produkte zu sich nahmen (GIBSON et al., 2001).

2.6. Bisherige pharmakokinetische Untersuchungen

Bioverfügbarkeitsuntersuchungen mit Inhaltsstoffen aus *Echinacea* fehlten bisher. Ergebnisse über pharmakokinetische Eigenschaften der **Cichoriensäure** sind bisher nur aus Untersuchungen mit Schachtelhalmkraut bekannt (GRAEFE und VEIT, 1999). Dabei wurde eine starke Metabolisierung der Mono- und Dikaffeoylweinsäurederivate beobachtet. Als Metaboliten der Kaffeesäurederivate konnten unter anderem Feruloylglycin, Dihydroferulasäure, Ferulasäure und Dihydrokaffeesäure detektiert werden.

Weiterhin wurde der Plasmaspiegel von **Kaffeesäure** und der antioxidative Status im Blut nach der Einnahme von 100, 200 oder 300 ml Rotwein untersucht (SIMONETTI et al., 2001). Beide Parameter waren dosisabhängig und korrelierten signifikant miteinander. Die höchste Plasmakonzentration an Kaffeesäure konnte nach 60 Minuten gemessen werden und sank nach 180 Minuten bzw. nach 240 Minuten (300 ml Rotwein) wieder auf den Blindwert ab.

Außerdem wurde die Bioverfügbarkeit von **Quercetinglucosiden** in einer Probandenstudie untersucht (GRAEFE et al., 2001). Nach der Einnahme eines Zwiebelpräparates, Buchweizentee oder von isoliertem Quercetin-4´-O-glucosid bzw. Rutin konnte im Blut der Probanden nur Quercetinglucuronid und kein freies Quercetin nachgewiesen werden. Die maximalen Quercetinglucuronid-Plasmakonzentrationen lagen sowohl nach der Einnahme des Zwiebelpräparates und des Quercetin-4´-O-glucosids (jeweils entsprechend 100 mg Quercetin) bei 2,2 µg/ml und wurden nach 0,7 Stunden erreicht. Der stärker konzentrierte Buchweizentee und Rutin (jeweils entsprechend 200 mg Quercetin) ergaben nur maximale Plasmaspiegel von 0,6 bzw. 0,3 µg/ml und wurden erst nach 4,3 bzw. 7 Stunden erreicht. Dies zeigt, dass vor allem der Zuckeranteil, aber auch die Pflanzenmatrix die Pharmakokinetik von Quercetin beeinflusst. Die Eliminationshalbwertszeit lag bei allen vier Präparaten bei 11 Stunden.

Bioverfügbarkeitstests zu **Polysacchariden** und Glykoproteinen fehlen ganz. Aufgrund der Größe der Moleküle ist eine Resorption über das Darmepithel unwahrscheinlich. Es könnte aber eine Interaktion der Polysaccharide mit den Peyer´schen Plaques, subepitheliale Lymphfollikel im Dünndarm, möglich sein. Das heißt, es könnte direkt an den Plaques zu einer Makrophagen- und Lymphozytenstimulierung kommen. Den Peyer´schen Plaques analoge Strukturen findet man in der Luftröhre, in den Bronchien und an anderen Schleimhäuten. Zusammen bilden sie ein eigenes System, welches mukosaassoziiertes lymphatisches Gewebe, MALT, genannt wird. Generell ist eine Interaktion zwischen den immunologisch aktiven Zellen und den Glykoproteinen oder Polysacchariden denkbar.

Zu **Alkamiden** existierten bisher ebenfalls keine Bioverfügbarkeitsuntersuchungen. Da sie sehr lipophile Verbindungen darstellen, war eine Resorption dieser Substanzen vorstellbar. Außerdem führen die Alkamide auf der Zunge zu einem prickelnden, leicht

anästhesierenden Effekt, dem sogenannten „tingling effect“. Diese Beobachtung könnte ebenfalls für eine gute Penetration der Alkamide durch Biomembranen sprechen. Die Entwicklung einer Methode zum Nachweis von Alkamiden im menschlichen Blut und die Durchführung von ersten Absorptionsuntersuchungen beim Menschen sollte daher ein Thema dieser Arbeit sein.

2.7. Bisheriger Stand der Analytik

Da zu Anfang dieses Jahrhunderts *E. angustifolia* und *E. pallida* als gleichberechtigte Arten auf dem nordamerikanischen Markt waren, wurde die Unterscheidung der beiden Wurzeldrogen häufig vernachlässigt und es kam zu zahlreichen Verwechslungen. Erst durch die Entwicklung von DC- und HPLC-chromatographischen Untersuchungsmethoden ist eine eindeutige Identifizierung der beiden Drogen und daraus hergestellter Extrakte möglich geworden (BAUER und REMIGER, 1989; BAUER et al., 1988). In den nachfolgenden Jahren wurden die drei medizinisch verwendeten *Echinacea*-Arten aufgrund der starken Nachfrage auf dem Arzneimittelmarkt intensiv untersucht. Zum einen bezogen sich die Untersuchungen auf die unterschiedlichen Trocknungs- und Extraktionsarten der Drogen, um einen möglichst hohen Gehalt an aktiven Inhaltsstoffen zu erhalten. Zum anderen wurden neue Analysenverfahren entwickelt, um eine schnelle Identifizierung und Quantifizierung von *Echinacea*-Arten zu gewährleisten.

Die klassische Extraktionsmethode zur Analyse der Kaffeesäurederivate und Alkamide stellt eine Soxhletextraktion mit Methanol bzw. mit *n*-Hexan für Alkamdie dar (BAUER et al., 1988).

Von PERRY und Mitarbeitern (1997) wurden *Echinacea*-Wurzeln unter Zusatz von N-Phenylpentamid als internem Standard und Acetonitril mit einem Ultraturrax für 2 Minuten extrahiert und homogenisiert. Anschließend wurde der Extrakt zentrifugiert und der klare Überstand über eine C-18 Säule gegeben und mit Acetenotril/Wasser 9:1 eluiert, wodurch Fettsäuren abgetrennt werden konnten. Das Eluat stand nach Filtration direkt für die Untersuchung mittels HPLC zur Verfügung.

Drei verschiedene *Echinacea*-Mazerate, die entweder mit Methanol, *n*-Hexan oder einer 1:1 Mischung aus Dichlormethan:Pentan für 24 Stunden bei Raumtemperatur hergestellt wurden, ein Soxhlet-Extrakt mit Methanol und ein CO_2-Extrakt unterschieden sich kaum im Inhaltsstoffspektrum, es konnten lediglich leichte Unterschiede in der Ausbeute festgestellt werden (LIENERT et al.1998).

In Versuchen von STUART und WILLS (2000) stellte sich eine Ethanol/Wassermischung im Verhältnis von 60:40 als bestes Lösungsmittel heraus, um durch 15 minütiges Rühren bei Raumtemperatur sowohl Alkamide als auch Cichoriensäure aus den Wurzeln oder dem Kraut von *E. purpurea* zu extrahieren. Während die Cichoriensäure-

ausbeute durch Erwärmen der Extraktionslösung gesteigert werden konnte, sank der Alkamidgehalt bei erhöhter Temperatur ab.

Eine ebenfalls bei Raumtemperatur durchgeführte Extraktion getrockneter *Echinacea*-Droge mit 70 prozentigem Methanol oder 70 prozentigem Ethanol für drei mal fünf Minuten im Ultraschallbad lieferte gute Ausbeuten (zwischen 80-90%) für Alkamide, Cichoriensäure und Echinacosid (BERGERON et al., 2000). Die neue Methode stellte sich für die Extraktion von Cichoriensäure gegenüber einer Soxhletextraktion mit 100 % Methanol als überlegen heraus. Dies ist wahrscheinlich hauptsächlich auf die erhöhte Extraktionskraft von 70 prozentigem Methanol gegenüber Cichoriensäure zurückzuführen.

PERRY et al. (2001) extrahierten Kaffeesäurederivate aus gepulvertem Pflanzenmaterial mit einer Ethanol/Wassermischung (70:30) durch 15 minütiges Schütteln bei Raumtemperatur. Nach anschließendem Zentrifugieren wurde direkt eine HPLC-Analyse vorgenommen. Mit dieser Methode konnten sie einen ähnlichen Cichoriensäure-Gehalt (*E. purpurea* Kraut: 0,52-2,02 % w/w; Wurzel: 1,68-2,27 % w/w) erhalten wie durch die Soxhletextraktion (Kraut: 0,2-3,1%; Wurzel: 0,6-2,0%). Jedoch soll die Extraktion auf kaltem Wege zu einer geringeren Isomerisierung der Cichoriensäure zur *meso*-Form führen.

Wenn feuchte Droge für die Extraktbereitung verwendet wurde, kam es zu einer Braunfärbung des Extraktes und zu einer Senkung des Cichoriensäuregehaltes bis zu 50 %. Dies ist wahrscheinlich auf eine enzymatische Zersetzung der Cichoriensäure durch Polyphenoloxidasen (PPO) zurückzuführen (siehe Kapitel 2.2.3). Da durch Trocknen der Droge die PPO denaturiert wurden, zeigen diese Untersuchungen die Wichtigkeit der richtigen Trocknungs- und Lagerungsbedingungen der *Echinacea*-Drogen.

LI und WARDLE (2001) kamen zu ähnlichen Ergebnissen. Sie stellten fest, dass eine Zunahme der Trocknungstemperatur (bis 45° C) und damit eine abnehmende Restfeuchtigkeit von *E. purpurea* oder *E. pallida* Wurzeln den Gehalt an Cichoriensäure erhöhte. Auf der anderen Seite vergrößerte sich der Echinacosid und Chlorogensäuregehalt durch eine Zunahme der Wurzelfeuchtigkeit (bis 15 % Feuchtigkeitsgehalt).

Auch WILLS und STUART (2000) stellten eine relativ stabile Cichoriensäurekonzentration bei kurz aufgekochten und gut getrockneten *E. purpurea* Wurzeln, die bei geringer Luftfeuchtigkeit gelagert wurden, fest. Wurde die Droge jedoch direkt ohne vorheriges blanchieren und trocken gelagert, kam es zu einer Abnahme des Cichoriensäuregehaltes. Die Zersetzung wurde durch Lagerung bei hoher Luftfeuchtigkeit (> 80 %) drastisch beschleunigt.

In Lagerungsversuchen über 7 Monate mit getrockneter, pulverisierter *E. purpurea*-Wurzel nahm die Konzentration der Hauptalkamide, der Dodeca-2*E*,4*E*,8*Z*,10*Z*/*E*-tetraensäure-isobutylamide, ebenfalls bei einer Temperatur von 25° C und 40° C

signifikant ab (LIVESEY et al., 1999). Der Cichoriensäuregehalt blieb jedoch sowohl bei –20, 25 und 40° C im Drogenpulver stabil. Anders sah es bei der Lagerung eines wässrig-alkoholischen Extraktes aus *E. purpurea* Wurzeln aus. Hierbei blieb die Alkamidkonzentration bei allen drei Lagerungstemperaturen über 7 Monate nahezu unverändert. Cichoriensäure hingegen zeigte einen signifikanten Abfall der Konzentration bei 25 und 40° C im Extrakt. Dies deutet wiederum auf eine enzymatische Zersetzung der Cichoriensäure hin, da mit zunehmender Feuchtigkeit der Droge oder in wässriger Lösung die enzymatische Aktivität der PPO ansteigt.

Die Alkamidkonzentration von getrockneter, pulverisierter *Echinacea*-Wurzeldroge nahm bei einer Lagerungstemperatur von 20-30° C unter Lichteinfluss stark ab (WILLS und STUART, 2000). Fand die Lagerung bei 5° C und im Dunkeln statt, war der Alkamidgehalt lange Zeit stabil. Dies zeigt, dass für den Abbau der Alkamide vor allem oxidative Prozesse, die durch hohe Temperaturen und Lichteinfluss beschleunigt werden, verantwortlich sind.

Außerdem wurde der Einfluss unterschiedlicher Trocknungsverfahren auf die Alkamid- und Cichoriensäurekonzentration untersucht. Um einen möglichst hohen Alkamidgehalt in *E. purpurea*-Wurzeln zu erzielen, stellte sich die Gefriertrocknung als überlegen gegenüber einer Vakuummikrowellentrocknung und einer Lufttrocknung bei 70° C heraus (KIM et al., 2000). Die Blätter von *E. purpurea* zeigten die größte Alkamidkonzentration nach einer Lufttrocknung bei 50° C. Durch Vakuummikrowellentrocknung bei niedriger Feuchtigkeit und Gefriertrocknung konnte der höchste Cichoriensäure- und Kaffeesäuregehalt von *E. purpurea* Blüten erreicht werden (KIM et al., 2000). Eine Lufttrocknung bei 70° C lieferte die geringste Konzentration an Kaffeesäurederivaten.

In verschiedenen Lagerungsversuchen von *E. purpurea*-Blüten- bzw. Wurzelpulver, *E. purpurea*-Krautextrakt und *E. angustifolia*-Wurzelpulver kam es ebenfalls zu einem signifikanten Abfall der Kaffeesäure- und Alkamidkonzentration durch den Einfluss von hohen Temperaturen (100 bzw. 40° C) und durch Sonnenlicht (HALLORAN et al., 2000). Eine Lagerung der Drogen bei Raumtemperatur führte nur bei dem Wurzelpulver von *E. angustifolia* zu einer starken Abnahme der Alkamidkonzentration. Bei den anderen Drogen kam es nur zu einem sehr geringen Gehaltsverlust.

Weiterhin wurde der Gehalt an Alkamiden und Cichoriensäure zu unterschiedlichen Wachstumsperioden untersucht (STUART und WILLS, 2000). Während die Alkamidkonzentration in den Wurzeln, dem Spross und den Blättern während eines Jahres abgenommen hatte, stieg sie in den Blüten an. In vollständig aufgeblühten Pflanzen enthielten die Wurzeln 70 %, die Blüten 20 %, der Spross 10 % und die Blätter nur 1 % der gesamten Alkamidmenge. Der Cichoriensäuregehalt veränderte sich nicht während einer Wachstumsperiode. Blüten und Blätter enthielten beide 35 %, Wurzeln 20 und der Spross 10 % des Gesamtanteils an Cichoriensäure.

WILLS und STUART (1999) konnten weiterhin eine Abhängigkeit der Alkamidkonzentration von der Lage des Anbauortes feststellen. Denn *E. purpurea*-Pflanzen nördlich des Breitengrades 32°S enthielten einen signifikant höheren Alkamidgehalt als Pflanzen südlich dieses Breitengrades.

Untersuchungen von TOBLER und SCHNEIDER (2001) zeigten, dass der Cichoriensäure- und Alkamidgehalt durch viele weitere Variabilitäten, wie zum Beispiel den Genotyp, den Erntezeitpunkt und die Aufarbeitung der *E. purpurea* Pflanzen, beeinflusst wurde. Durch Optimierung verschiedener Faktoren im Herstellungsverfahren konnte eine geringere Schwankungsbreite und eine höhere Cichoriensäure- und Alkamidkonzentration erreicht werden. Neben den bisher genannten Faktoren (siehe oben) konnte die Zersetzung der Cichoriensäure durch eine geringere und unter Argongas stattfindende Zerkleinerung der Droge minimiert werden. Eine kürzere Extraktionszeit der Frischpflanze führte zusätzlich zu einem höheren Cichoriensäuregehalt. Außerdem konnte eine Standardisierung von *Echinacea*-Präparaten durch Mischen verschiedener Chargen eines Jahrganges erreicht werden (TOBLER und SCHNEIDER, 2001).

Wie bereits erwähnt, wurde das erste HPLC-Verfahren zur Unterscheidung der *Echinacea*-Arten von BAUER und Mitarbeitern (1988 und 1989) entwickelt. Lipophile Verbindungen werden mit einem Acetonitril/Wasser Gradienten von 40/60 bis 80/20 in 30 Minuten mit einem Fluss von 1,0 ml/min aufgetrennt (siehe Kapitel 9.2.5., Trennsystem **Ech1**). Detektiert werden die Substanzen bei 254 oder 210 nm mittels eines Photodiodenarraydetektors. Die HPLC-Trennung der phenolischen Substanzen erfolgt mit einem Acetonitril/Wasser-Gradienten von 10/90 bis 30/70 unter Zusatz von jeweils 0,1 % Phosporsäure über 20 min (siehe Kapitel 9.2.5., Trennsystem **Ech2**). Die Flussrate beträgt ebenfalls 1,0 ml/min und die UV-Detektion findet bei 330 nm statt. In den Jahren danach wurden diese beiden Methoden von verschiedenen Arbeitskreisen variiert (siehe Tabelle 2.6). Quantitative Bestimmungen der Alkamide oder der phenolischen Substanzen werden in der Regel mit externem Standard (Dodeca-2*E*,4*E*,8*Z*,10*Z*/*E*-tetraensäure-isobutylamiden, Cichoriensäure bzw. Echinacosid) bestimmt. In neueren Untersuchungen wurden auch interne Standards wie trans-2,4-Dodecadienal oder N-Phenylpentamid für die Alkamidquantifizierung und Chlorogensäure für die Cichoriensäurebestimmung eingeführt (STUART und WILLS, 2000; PERRY et al., 1997).

Tabelle 2.6: HPLC-Methoden für die Identifizierung von Echinacea-Arten.

HPLC-Gradient	Zeit [min]	Fluss [ml/min]	Literatur
Alkamid-Trennung: -mit $CH_3CN:H_2O$			
50:50 –100:0	25	1	PERRY et al., 1997
50:50	35	0,85	ROGERS et al., 1998
40:60-70:30	20	1	WILLS und STUART, 1999
40:60 40:60-53:47	10 35	 1	STUART und WILLS, 2000
40:60-80:20	15	1	BERGERON et al., 2000
Cichoriensäure-Trennung - mit $CH_3CN:H_2O$ und 0,1 % Phosphorsäure			
10:90-22:78 22:78-40:60 40:60	13 14 14,5	1,5	PERRY et al., 2001
- mit $CH_3OH:H_20$ und 1% 0,1M Phosphorsäure			
7:93-40:60	19	1	LI und WARDLE, 1999
10:90-50:50	20	1	STUART und WILLS, 2000
- mit CH_3OH + 1% 0,1M Phosphorsäure:50mm $NaHPO_4$ + Phosphorsäure (pH 2,80)			
5:95-25:75 25:75 25:75-5:95	7 9 10	1,5	BERGERON et al., 2000

Weiterhin wird eine kombinierte Aufreinigung von phenolischen Verbindungen aus *Echinacea*-Arten durch Festphasenextraktion mit anschließender HPLC-Analyse beschrieben (KAZIMIERZ et al., 1996). Das besondere dieser Methode ist neben einer Vorreinigung von *Echinacea*-Extrakten auf Octadecan-Mikrosäulen, die anschließende Extraktion von Phenolsäuren auf Anionen-Austauschersäulen (quaternäre Ammoniumionen). Bei 2 pH-Einheiten unterhalb des pKa-Wertes (4-5) findet eine gezielte Extraktion der Phenolsäuren statt, die anschließend direkt HPLC-chromatographisch untersucht werden können.

Eine hochdruckflüssigkeitschromatographische Trennung von Alkamiden aus *E. purpurea* mit Massenspektrometrischen- und UV-Detektor wurde von HE et al. (1998) beschrieben. Mittels UV-Detektor konnten sie den Gehalt der Dodeca-2*E*,4*E*,8*Z*,10*Z/E*-tetraensäure-isobutylamide in den Wurzeln und Achänen von *E. purpurea* und *E. angustifolia* mit einer Nachweisgrenze von 15 ng bei einer Detektionswellenlänge von 254 nm quantifizieren (siehe Tabelle 2.7).

Tabelle 2.7: Gehalt der Dodeca-2E,4E,8Z,10Z/E-tetraensäure-isobutylamide (Tetraen) ermittelt mit verschiedenen Extraktionsmethoden.

Droge	Tetraengehalt	Quelle
-Chloroformextrakt aus:		HE et al.; 1998
Achänen von *E. angustifolia*	1,06 mg/g	
Achänen von *E. purpurea*	0,75 mg/g	
Achänen von *E. pallida*	0,08 mg/g	
Wurzeln von *E. purpurea*	0,37 mg/g	
-Soxhletchloroformextrakt aus:		BAUER und REMIGER; 1989
Wurzeln von *E. angustifolia*	0,009-0,151 %	
Wurzeln von *E. purpurea*	0,004-0,039 %	
Kraut von *E. angustifolia*	0,001-0,03 %	
Kraut von *E. purpurea*	0,001-0,03 %	
-Acetonitrilextrakt aus:		PERRY et al., 1997
Wurzel von *E. purpurea*	1,7 mg/g	
Rhizom von *E. purpurea*	5,7 mg/g	
Vegetativer Spross von *E. purpurea*	14,1 mg/g	
Blätter von *E. purpurea*	0,2 mg/g	
Fruchtbarer Spross *E. purpurea*	1,3 mg/g	
Blüten von *E. purpurea*	2,7 mg/g	
-60% Ethanolextrakt aus:		
Wurzeln von *E. purpurea*	6,2 mg/g	WILLS und STUART; 1999
Kraut von *E. purpurea*	1,0 mg/g	
-Methanolextrakt aus:		
Wurzeln von australischer *E. angustifolia*	0,039 %	ROGERS et al., 1998
Wurzeln von amerikanischer *E. angustifolia*	0,066-0,075 %	
Kraut von *E. purpurea*	0,013-0,102 %	

Neben der HPLC-Analyse von *Echinacea*-Extrakten sind in den letzten Jahren weitere Untersuchungsmethoden entwickelt worden.

Mittels automatisch gesteuerter Gradienten-Dünnschichtchromatographie (AMD-TLC = Automated multiple development thin-layer chromatography) konnte eine bessere Auftrennung eines *E. angustifolia*-Extraktes erzielt werden als nach der üblichen

isokratischen Dünnschichtchromatographie-Methode laut Homöopathischem Arzneibuches (GOCAN et al., 1996). Unter Zusatz von 25 % Ammoniak wurde schrittweise zuerst mit 100 % Methanol, dann mit ansteigendem Ethylacetat- und Toluolanteil eluiert.

Zur schnellen Unterscheidung der Wurzeldrogen von *E. angustifolia*, *E. pallida* und *E. purpurea* wurde eine gaschromatographische Analyse, gekoppelt mit einem Massenspektrometer (GC-MS), entwickelt (LIENERT et al., 1998). Mit einem Temperaturgradienten von 55° C - 230° C und einer Temperatursteigerung von 4,5° C/min konnten die Inhaltsstoffe der drei *Echinacea*-Arten gut getrennt und anhand der Chromatogramme zweifelsfrei unterschieden werden. Als interne Standards wurde den Proben 1-Eicosen und Nonadecansäure zugesetzt.

Eine Quantifizierung der Kaffeesäurederivate von *E. purpurea*-Extrakten konnte durch direkte UV-Spektroskopie bei einer Wellenlänge von 330 nm durchgeführt werden (KURKIN et al., 1998). Ein Extrakt aus dem Kraut von *E. purpurea*, der unter Wärmeeinwirkung für 45 Minuten mit 30 prozentigem Ethanol hergestellt wurde, enthielt nach dieser Methode einen Gesamtphenylpropansäuregehalt von 3,7-4,6 %.
BAUM und Mitarbeiter (2001) konnten zeigen, dass mit einer DNA-Analyse (AFLP = „Amplified restricted Fragment Längen Polymorphismus“) einzelne *Echinacea*-Pflanzen voneinander unterschieden und darüber hinaus Vorhersagen über den Cichoriensäure- und Dodeca-2E,4E,8Z,10Z/E-tetraensäure-isobutylamid-Gehalt der Extrakte gemacht werden konnten.

Mittels Kapillarelektrophorese konnten die drei medizinisch eingesetzten *Echinacea*-Arten, *E. angustifolia*, *E. pallida* und *E. purpurea* anhand des Methanolextraktes unterschieden werden (PIETTA et al. 1998). Die Trennung fand auf einer Kieselgel-Kapillare mit 25mM Tetraborat (pH 8,6) als Fließmittelpuffer statt. Detektiert wurden die Kaffeesäurederivate durch einen Diodenarray Detektor bei 320 nm.

Die Antigen-Antikpörperreaktion in einem competitiven ELISA Test zur Identifizierung von Glykoproteinen in *E. purpurea* erwies sich als spezifisch bei *E. purpurea* Glykoproteine, da Glykoproteine aus anderen Extrakten oder andere Antigene keine Reaktion zeigten (EGERT und BEUSCHER, 1992). Die ELISA-Methode kann somit zur Identifizierung und Quantifizierung von *Echinacea*-Extrakten verwendet werden.

Um eine schnelle Identifizierungsmöglichkeit von *E. purpurea* Wurzelpulver zu erreichen, wurde eine Methode mit nahen Infrarotstrahlen (NIR) entwickelt (LAASONEN et al., 2001). Mit diesem Analyseverfahren können Verunreinigungen (ab 10%) oder Verwechslungen mit *E. angustifolia*, *E. pallida* oder *Parthenium integrifolium* Wurzeln erkannt werden, wenn die Proben nach dem gleichen Verfahren wie die *E. purpurea* Kalibrierproben pulverisiert werden.

3 Allgemeines zu Echinacea atrorubens

3.1. Botanische Beschreibung und Verbreitung

3.1.1. Habitus der Pflanze

NUTTAL lieferte 1834 erstmals eine kurze Beschreibung von *Echinacea atrorubens*, zählte diese jedoch noch zur Gattung *Rudbeckia*. 1841 überführte er dann diese Art zur Gattung *Echinacea*. In den Jahren danach kam es zu vielen kontroversen Einteilungen, unter anderem in die Gattung *Brauneria*, bis 1968 MCGREGOR eine ausführliche Beschreibung und Klassifizierung von *Echinacea atrorubens* lieferte (siehe Abbildung 2.1, Seite 2).

Die Pflanze ist 30-100 cm hoch, der Stengel ist kaum bis nicht verzweigt, hellgrün und oben borstig bis striegelhaarig behaart, unten jedoch fast kahl. Die Blätter sind im Gegensatz zu *E. laevigata* und *E. purpurea* lanzettlich bis lineal-lanzettlich und zur Basis hin verschmälert. Die unteren Blätter sind gestielt; nach oben hin verkürzt sich der Blattstiel bis hin zu sitzenden Blättern. Außerdem werden die Blätter nach oben hin kleiner. In der Regel sind sie striegelhaarig oder steif rauhaarig. Die Zungenblüten sind dunkelrot bis hellrot, selten auch weiß. Die Blütenfarbe sollte nach MC KEOWN (1999) nicht als charakteristisches Merkmal zur Identifizierung von einzelnen Arten herangezogen werden, da sie starken Schwankungen unterworfen ist. Sie ist zum einen vom Alter der Pflanze, zum anderen von der geographischen Lage abhängig.

Die Zungenblüten sind bei *E. atrorubens* bis 3 cm lang und meist kaum länger als der Durchmesser des Blütenköpfchens. Sie sind stark zurückgebogen, teilweise bis der Stengel direkt unterhalb des Köpfchens berührt wird. Die Zungenblüten unterscheiden *E. atrorubens* eindeutig von *E. paradoxa*, mit der sie früher häufig verwechselt wurde, da nach MCGREGOR (1968) sowohl bei der Varietät *E. paradoxa* var. *paradoxa* als auch bei *E. paradoxa* var. *neglecta* die Zungenblüten deutlich länger als der Durchmesser des Blütenköpfchens sind. Ein weiteres Charakteristikum für *E. atrorubens* sind die steifen Spitzen der Spreublätter. Die Chromosomenzahl beträgt n = 11.

BINNS (2001) unterscheidet in ihrer neuen taxonomischen Einteilung der Gattung *Echinacea* die Varietät *E. atrorubens* var. *atrorubens* von den beiden anderen Varietäten *E. atrorubens* var. *paradoxa* und *E. atrorubens* var. *neglecta*, die nach McGregor beide zu der Art *E. paradoxa* gehörten, durch folgende Charakteristika.

E. atrorubens var. *atrorubens* besitzt:

- Einen kürzeren und meist verzweigten Stengel.
- Die Haare an den Blattstielen fehlen entweder ganz oder treten sehr viel seltener auf.
- Die Involucralblätter sind in der Regel kürzer

- Die Kronblätter der Zungenblüten sind zu mehr als einem ¾ der gesamten Corollalänge miteinander verschmolzen.

Da sich die neue Taxanomie für die Gattung *Echinacea* noch nicht durchgesetzt hat, wird in dieser Arbeit weiterhin die Nomenklatur nach MCGREGOR benutzt.

Verbreitet ist *E. atrorubens* in einem engen Streifen von Houston, Texas, bis hin zu Ardmore, Oklahoma, und Topeka, Kansas, und wächst dort meist auf schwerem, feuchtem Prärieboden (MCGREGOR, 1968; siehe Abbildung 2.2, Seite 5). Auch das Verbreitungsgebiet zeigt, dass *E. atrorubens* zu den Arten der Gattung *Echinacea* gehört, die auch trockenere Standorte besiedeln können. Die kräftige, tief in das Erdreich reichende Pfahlwurzel und die lineal-lanzettlichen, derberen Blätter ermöglichen ein Überdauern auch unter wasserarmen Bedingungen.

Hybride kommen nach BINNS (2001) mit *E. angustifolia* (*E. pallida var. angustifolia,* BINNS) im Südosten Kansas und auch mit *E. paradoxa var. neglecta* (*E. atrorubens var. neglecta*, BINNS) in der Nähe von Ardmore, OK, vor.

3.1.2. Makroskopische Beschreibung von Echinaceae atrorubens radix

Es handelt sich um eine etwa 2-20 mm dicke und 10-20 cm lange, wenig und unregelmäßig verzweigte, zylindrische Pfahlwurzel. Die äußere Oberfläche ist graubraun und längsgefurcht. Im Querschnitt fällt der von gelblichen und grauschwarzen, radialen Streifen durchzogene Holzkörper auf. Die dunkle Streifung entsteht durch Phytomelaneinlagerungen. Nur an wenigen Wurzelstücken ist noch makroskopisch eine dünne, helle Rinde erkennbar. Die sehr harten Wurzelstücke ergeben einen kurzfaserigen Bruch.

Der Geruch ist wenig charakteristisch und nur schwach aromatisch.
Der Geschmack ist am Anfang leicht süßlich, dann schwach adstringierend. Später ist ein kühlender, prickelnder, lokalanästhetischer Effekt auf der Zunge zu spüren, der durch die Alkamide verursacht wird.



Abbildung 3.1: Wurzeln von E. atrorubens.

3.2. Mikroskopische Beschreibung

3.2.1. Mikroskopische Beschreibung des Krautes

KELLER (1962) und MCGREGOR (1968) untersuchten alle Arten der Gattung *Echinacea* in Bezug auf ihre mikroskopischen Merkmale und stellten damit einen anatomischen Bestimmungsschlüssel auf. Danach sind folgende Merkmale für *Echinacea atrorubens* charakteristisch und stellen Unterscheidungskriterien im Vergleich zu den anderen *Echinacea*-Arten dar:

- Harzkanäle in Mark und Rinde
- Stengel mit weniger als 42 Protoxylemanlagen; Harzkanäle nur gegenüber der Interfascicularregion angeordnet
- Blattstiel mit 3 Luftkanälen um das zentrale Leitbündel, längs des Stiels verlaufend

Weiterhin gibt KELLER (1962) detailliertere mikroskopische Beschreibungen von *E. atrorubens* an. Die Epidermiszellen (Länge: ca. 78 µm, Breite: 55 µm), die zusammengedrückt wirken, haben eine papillöse adaxiale Oberfläche. Die Tangentialwände sind stark verdickt.

Die Zungenblüten (233 µm dick) enthalten wenige, zerstreut angeordnete Sekretionsbehälter, die einen Durchmesser von 55 µm haben. Im Querschnitt der Zungenblüten sind 12 Gefäße erkennbar, die von sehr wenigen abaxialen Sekretionsbehältern begleitet werden.

Im Querschnitt des Stengels sind circa 20 oder mehr relativ große Markkanäle sichtbar, die durchschnittlich 46µm breit sind.

BINNS (2001) hebt ebenfalls die papillöse Blattoberfläche von *E. atrorubens* hervor. Die Blätter sind behaart, wobei sowohl vielzellige als auch einzellige Haare vorkommen können. Charakteristisch sind weiterhin die Randhaare, die in der Regel mehr abstehen und sich deutlich von den Blattspreitenhaaren im Habitus unterscheiden.

3.2.2. Eigene mikroskopische Untersuchungen des Blattes und der Wurzel

Blatt

In eigenen mikroskopischen Untersuchungen des Blattquerschnittes fielen ebenfalls die bereits von KELLER und BINNS beschriebenen dickwandigen, papillösen Epidermiszellen auf (siehe Abbildung 3.2). Unterhalb der oberen Epidermis, im Bereich der Mittelrippe, folgen ein paar Reihen parenchymatischer Zellen, in die ein großer, charakteristischer Luftkanal eingebettet ist. Nach etwa zwei bis drei weiteren Reihen parenchymatischer Zellen schließt sich das Leitbündel an, das oben und unten von einer Sklerenchymscheide begrenzt ist. Die Tracheen sind regelmäßig, strahlenförmig angeordnet. Neben dem großen Leitbündel der Mittelrippe sind auf jeder Seite, getrennt

von lockerem, interzellularhaltigem Parenchym, ein oder zwei kleinere Leitbündel angeordnet. Unterhalb des Hauptleitbündels schliesst sich wiederum parenchymatisches Gewebe an, das gefolgt wird von 2-3 Zellreihen Kantenkollenchym. Eine mit einer dicken streifigen Cuticula versehene Epidermisschicht schließt das Blatt nach unten hin ab.

Im Flächenschnitt der unteren Blattepidermis sieht man die wellig verzahnten Epidermiszellen. Außerdem ist der anisocytische Spaltöffnungsapparat auffällig.

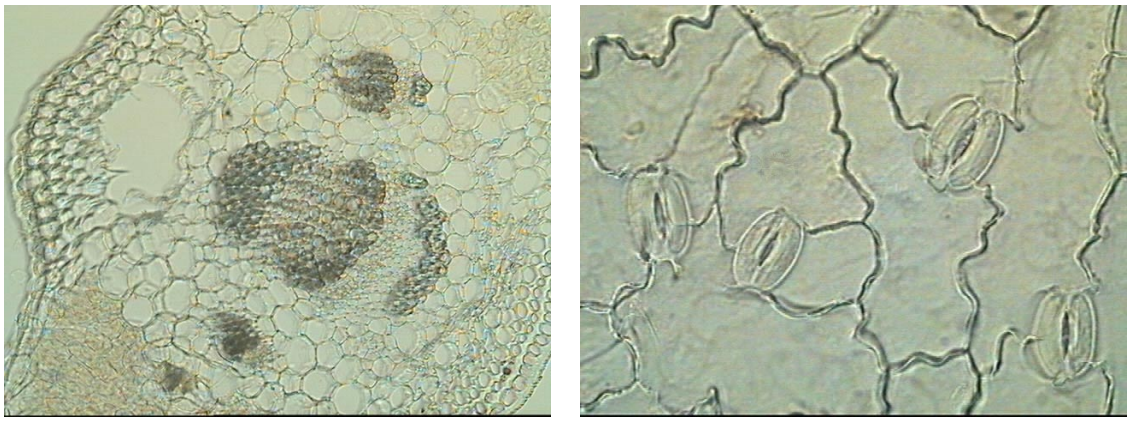


Abbildung 3.2: Mikroskopisches Bild des Blattquerschnittes (links, Vergrößerung: 100 fach) und des Flächenschnittes der unteren Blattepidermis von E. atrorubens (rechts, Vergrößerung: 200 fach).

Wurzel

Im mikroskopischen Bild der Wurzeldroge unterscheiden sich die dünnen, noch Reste des primären Rindengewebes enthaltenden Wurzelstücke von den vollständig sekundär verdickten, kräftigeren Wurzeln.

Der Querschnitt der dünnen, noch teilweise primären Wurzel weist im Zentrum deutlich erkennbare Xylemplatten mit dazwischenliegenden, regelmäßig angeordneten Parenchymstreifen auf (siehe Abbildung 3.3 links). Außerhalb des nur schwach ausgebildeten ringförmigen Kambiums ist eine schmale Schicht mit kleinzelligen sekundären und primären Phloemzellen sichtbar. Darüber liegend befinden sich die weitlumigeren Zellen der primären Rinde, von denen einige fensterartig verdickt sind. Nach außen hin wird die Wurzel von dunklen, verkorkten Zellen des Periderms abgegrenzt.

Zahlreiche Faserbündel und Sklereiden treten sowohl im Zentralzylinder als auch im Rindenparenchym auf. Diese sind meist in Phytomelanauflagerungen, einer schwarzen Interzellularsubstanz, eingebettet.

Schizogene Exkretgänge und einzelne Ölzellen sind sowohl in den Rindenteilen als auch im Holz vorhanden, aber noch nicht so zahlreich wie in der älteren, vollständig sekundär verdickten Wurzel. Einige Arbeiten beschäftigten sich mit den Öl- bzw. Harzkanälen der *Echinacea*-Arten (BOODLE und FRITSCH, 1908; METCALFE und CHALK, 1958; CASTER und MYERS, 1987). CASTER und MYERS vermuteten, dass die

Ölkanäle die Speicherorgane für Alkamide seien und die Zellen, die die Kanäle umranden, die Biosyntheseorte der Alkamide darstellen.

Im Querschnitt der vollständig sekundär verdickten Wurzel zeigt sich unterhalb des Periderms direkt die sekundäre Rinde, die in den äußeren Schichten durch schizogene Exkreträume zerklüftet ist (siehe Abbildung 3.3 rechts). Die Markstrahlen reichen vom primären Xylem im Zentrum bis zum Periderm nach außen. Gut zu erkennen ist weiterhin zwischen sekundärer Rinde und Holzteil der mehrreihige Kambiumring. Zahlreiche Ölbehälter und Sklerenchymfasern mit Phytomelaneinlagerungen sind ungeordnet über den gesamten Querschnitt der Wurzel verteilt, welches sie von *E. angustifolia* und *E. pallida* abgrenzt, da bei diesen Arten entweder die Öl- oder Sklerenchymzellen auf bestimmte Gewebeschichten begrenzt sind. Insgesamt besitzt der Wurzelquerschnitt jedoch morphologische Ähnlichkeit zu *E. angustifolia* und *E. pallida* und zeigt größere Unterschiede zu *E. purpurea*. Wie bei den beiden erstgenannten Arten ist der Querschnitt von E. atrorubens radix durch mehrere schmale Xylemstrahlen und zahlreiche Sklerenchymfasern mit Phytomelanauflagerungen, die außerhalb und innerhalb des Leitbündels liegen, gekennzeichnet.

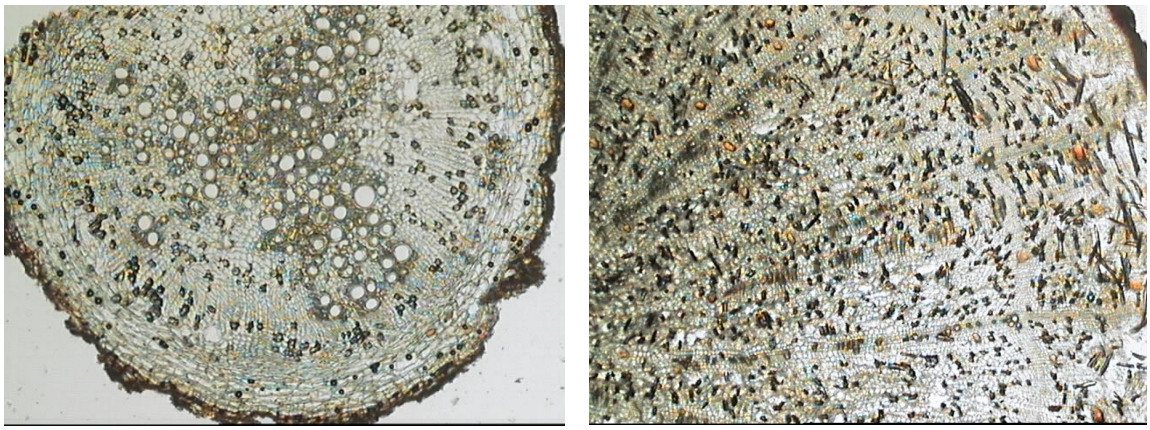


Abbildung 3.3: Mikroskopisches Bild der schwach (links) und stark (rechts) sekundär verdickten Wurzel. Vergrößerung: 100 fach

3.3. Bisher bekannte pharmakologische Untersuchungen

Extrakte aus *Echinacea atrorubens* wurden bisher nur auf ihre Wirkung gegen *Mycobacterium tuberculosis* und *M. avium* untersucht (CANTRELL et al., 1998). Ein *n*-Hexanextrakt aus den Blüten und ein Dichlormethanextrakt aus den Stengeln zeigte bei einer Konzentration von 100 µg/ml gute Hemmwirkungen gegen *M. tuberculosis*. Alle *n*-Hexan- und Dichlormethanextrakte aus den Blüten, Wurzeln oder Stengeln besaßen nur schwache bis gar keine wachstumshemmenden Eigenschaften gegen *M. avium*. Es existieren bisher keine Berichte über den therapeutischen Einsatz von *E. atrorubens*.

4 Eigene phytochemische Untersuchungen

4.1. Analytik

Während die drei medizinisch angewandten *Echinacea*-Arten sehr gut analytisch bearbeitet sind, existierten zu *E. atrorubens* bisher keine phytochemischen Untersuchungen. Ein Ziel der Arbeit war es daher, die Wurzeln und das Kraut von *E. atrorubens* aus chemotaxonomischen Gründen und um eine Verwechslung mit anderen *Echinacea*-Arten auszuschließen, chemisch-analytisch zu untersuchen.

4.1.1. HPLC-Analyse

Lipophile Extrakte

Für die Untersuchung der lipophilen Bestandteile wurde aus dem Kraut und aus der Wurzel jeweils ein *n*-Hexan-Soxhletextrakt hergestellt. Anschließend wurden diese mit einem Fliessmittelgradienten von 40-80 % Acetonitril in 30 Minuten bei einer Detektionswellenlänge von 254 nm auf einer RP-18-Säule HPL-chromatographisch untersucht (BAUER und REMIGER, 1989; siehe Trennmethode **Ech1** Kapitel 9.2.5). Die Zuordnung der Peaks erfolgte mit Hilfe der im Rahmen dieser Arbeit aus Echinacea atrorubens radix isolierten Inhaltsstoffe als Referenzsubstanzen. Das daraus resultierende Fingerprint-Chromatogramm des Wurzelextraktes ähnelt denjenigen von E. purpureae und E. angustifoliae radix, da auch das von *E. atrorubens* ein vielfältiges Alkamidspektrum aufweist, welches vor allem aus Isobutylamiden und nur wenigen 2-Methylbutylamiden besteht. Außerdem wurden als Hauptkomponenten die Dodeca-2E,4E,8Z,10Z/E-tetraensäure-isobutylamide nachgewiesen (siehe Abbildung 4.1). Wie aus den UV-Spektren deutlich wird, weist E. atrorubens radix hauptsächlich 2,4-Dienamide auf, wie sie in *E. purpurea* vorkommen, und weniger 2-Monoenamide, die man vermehrt in den Wurzeln von *E. angustifolia* antrifft (siehe Abbildung 4.2). Im Gegensatz zu den anderen *Echinacea*-Arten enthält *E. atrorubens* als zweites Hauptalkamid Dodeca-2E,4Z,10Z-trien-8-insäure-isobutylamid **6**, wodurch diese Droge von den anderen Arten unterschieden werden kann. Polyacetylene konnten nur in Spuren in einer frischen Wurzelcharge nachgewiesen werden. Damit grenzt sich die untersuchte Art eindeutig von E. pallidae radix ab.

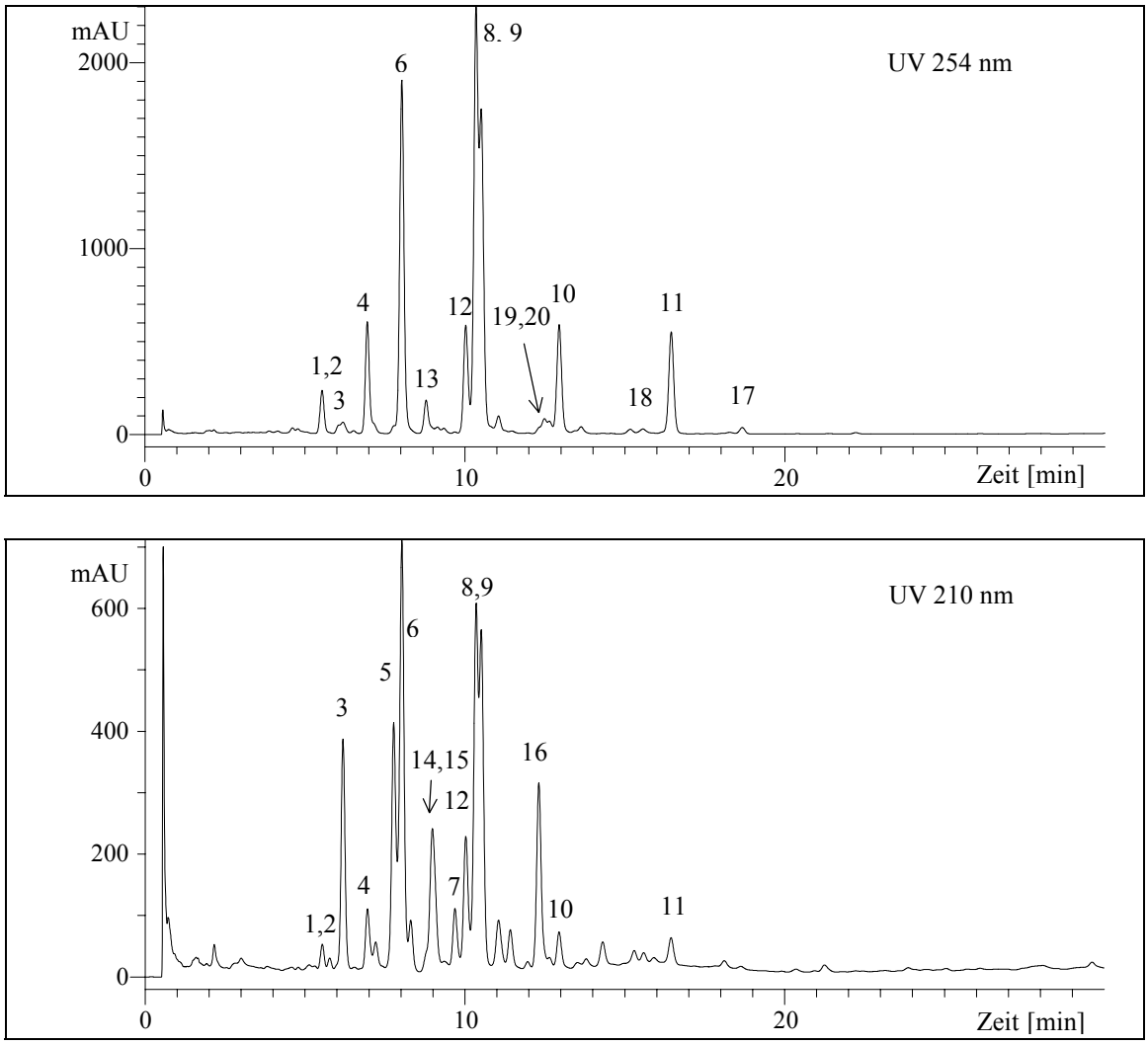


Abbildung 4.1: HPLC-Trennungen des n-Hexan-Soxhletextraktes von E. atrorubens radix (Herkunft Arkansas, 5 mg/ml, Injektionsvolumen 10 µl, Methode: ***Ech1****, Detektion bei 254 nm (oben) und bei 210 nm (unten), Peakzuordnung siehe Tabelle 4.1 , weitere Drogenmuster siehe Anhang.)*

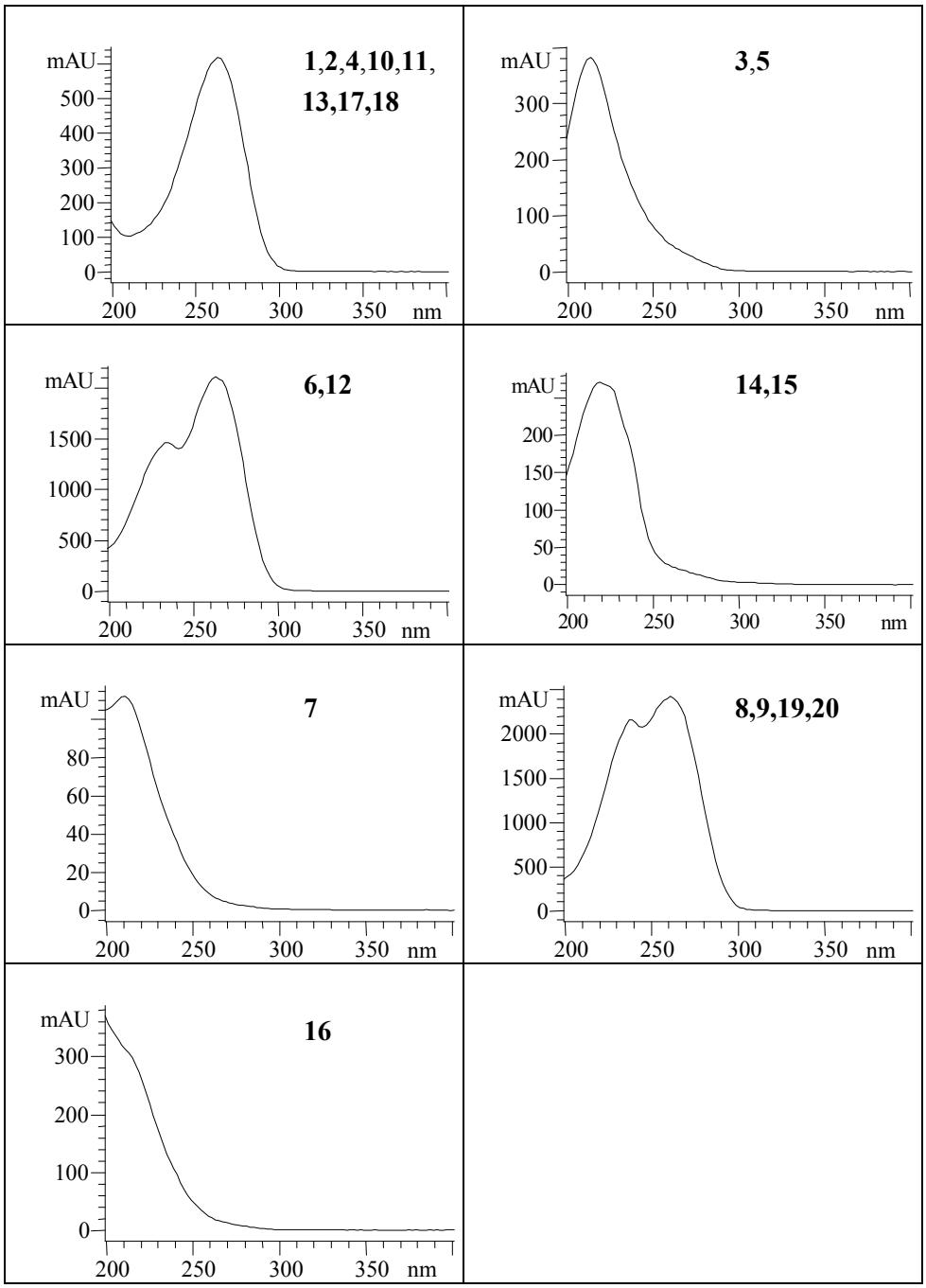


Abbildung 4.2: UV-Spektren der identifizierten Alkamide aus E. atrorubens (Numerierung der Peaks von Abbildung 4.1 und Tabelle 4.1).

*Tabelle 4.1: Retentionszeiten der Alkamide (Trennsystem: Methode: **Ech1**, Detektion bei 254 nm bzw. 210 nm.*

Alkamid	Bezeichnung	Retentionszeit [min]
1/2	Undeca-2*E*,4*Z*/*E*-dien-8,10-diinsäure- isobutylamid	5,54
3	Undeca-2*E*-en-8,10-diinsäure-isobutylamid	6,19
4	Dodeca-2*E*,4*Z*-dien-8,10-diinsäure-isobutylamid	6,95
5	Dodeca-2*E*-en-8,10-diinsäure-isobutylamid	7,77
6	Dodeca-2*E*,4*Z*,10*Z*-trien-8-insäure-isobutylamid	8,03
7	Trideca-2*E*,7*Z*-dien-10,12-diinsäure-isobutylamid	9,69
8/9	Dodeca-2*E*,4*E*,8*Z*,10*Z*/*E*-tetraensäure-isobutylamide	10,35 und 10,50
10	Dodeca-2*E*,4*E*,8*Z*-triensäure-isobutylamid	12,94
11	Dodeca-2*E*,4*E*-diensäure-isobutylamid	16,44
12	Dodeca-2*E*,4*Z*,10*Z*-trien-8-insäure-2-methylbutylamid	10,02
13	Dodeca-2*E*,4*Z*-dien-8,10-diinsäure-2-methylbutylamid	8,79
14/15	Dodeca-2*E*,10*E*/*Z*-dien-8-insäure-isobutylamide	8,99
16	Pentadeca-2*E*,9*Z*-dien-12,14-diinsäure-isobutylamid	12,31
17	Dodeca-2*E*,4*E*-diensäure-2-methylbutylamid	18,66
18	Dodeca-2*E*,4*E*,8*Z*-triensäure-2-methylbutylamid	15,56
19/20	Dodeca-2*E*,4*E*,8*Z*,10*Z*/*E*-tetraensäure-2-methylbutylamide	12,64

Der Vergleich der HPLC-Trennungen des Kraut- und Wurzelextraktes zeigte, dass in der Wurzel die Alkamidkonzentration höher und das Alkamidspektrum wesentlich vielfältiger ist. Auffällig ist hierbei, dass sich das Inhaltsstoffspektrum des Krautextraktes von *E. atrorubens* kaum von denjenigen der drei medizinisch eingesetzten *Echinacea*-Arten, *E. purpurea*, *E. angustifolia* und *E. pallida*, unterscheidet. Wie bei diesen konnten als Hauptpeak die Dodeca-2*E*,4*E*,8*Z*,10*Z/E*-tetraensäure-isobutylamide detektiert werden. Außerdem wurden in geringen Mengen Undeca-2*E*,4E/*Z*-dien-8,10-diinsäure-isobutylamide **1,2**, Dodeca-2E,4Z,10Z-trien-8-insäure-isobutylamid **6**, Dodeca-2E,4E,8Z,10Z/E-tetraensäure-isobutylamide **8**,**9**, Dodeca-2*E*,4*E*,10*Z*-triensäure-isobutylamid **10** und Dodeca-2*E*,4*E*-diensäure-isobutylamid **11** identifiziert (siehe Abbildung 4.3).

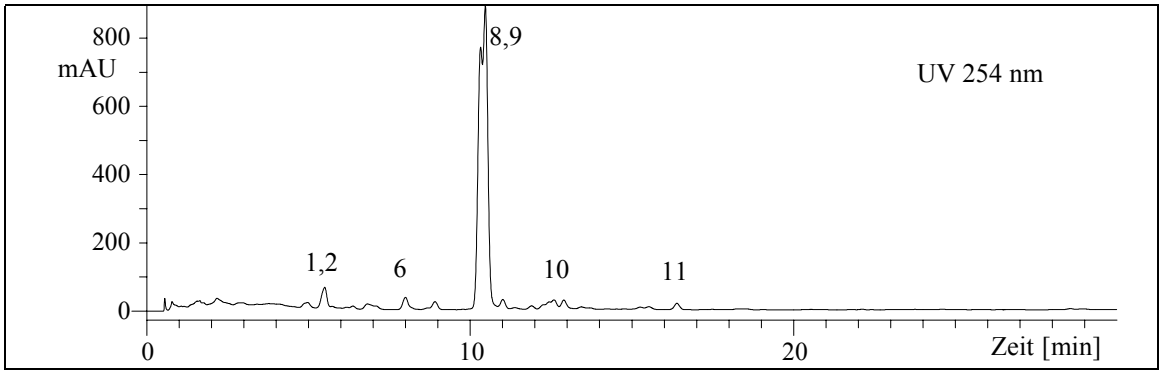
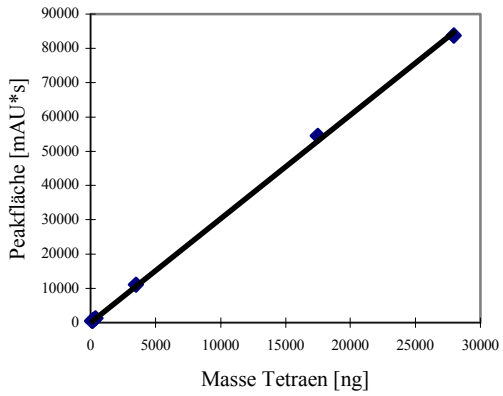


Abbildung 4.3: HPLC-Trennung des n-Hexanextraktes von E. atrorubens herba, Herkunft Kansas, 5 mg/ml, Injektionsvolumen 15 µl, Methode: ***Ech1****, Peakzuordnung siehe Exp. Teil, Kapitel 9.7.1, UV-Spektren siehe Abbildung 4.2*

Zur eindeutigen Charakterisierung der Droge wurden *n*-Hexanextrakte von einzelnen *Echinacea atrorubens* Drogenchargen mit der oben beschriebenen HPLC-Methode vergleichend untersucht. Die untersuchten Wurzelchargen lieferten sehr ähnliche Fingerprint-Chromatogramme. Sie unterschieden sich lediglich in quantitativer Hinsicht. Die von uns identifizierten Peaks konnten in allen Chargen wiedergefunden werden, womit eine eindeutige Charakterisierung und Identifizierung von *E. atrorubens* gewährleistet ist (Spektren siehe Anhang).

Gehaltsbestimmung der Dodeca-2*E*,4*E*,8*Z*,10*Z/E*-tetraensäure-isobutylamide

Der Gehalt der isomeren Dodeca-2*E*,4*E*,8*Z*,10*Z/E*-tetraensäure-isobutylamide (Tetraen) in Extrakten verschiedener *E. atrorubens* Chargen wurde mittels HPLC (Trennmethode: **Ech1**) und externer Standardkalibrierung bestimmt. Zur Erstellung der Kalibriergeraden wurden insgesamt 6 Konzentrationen mit 2 Verdünnungslösungen der isolierten Isomere jeweils dreimal in die HPLC injiziert. Hierbei wurde ein möglichst großer Konzentrationsbereich ausgewählt, um sicherzustellen, dass die Kalibriergerade Werte von 50-150% der zu erwartenden Konzentration der Isobutylamide im Extrakt abdeckt. Eine lineare Beziehung der Tetraenkonzentration zu der integrierten Peakfläche konnte über einen Bereich von 27,968 µg bis 105 ng Dodeca-2E,4E,8Z,10Z/E-tetraensäure-isobutylamide mit einem Korrelationskoeffizient von 0,9997 und einer relativen Standardabweichung unter 3% (max. 2,88%) nachgewiesen werden (siehe Abbildung 4.4). Damit konnten die allgemeinen Anforderungen an lineare Kalibriergeraden erfüllt werden (GREEN, 1996; (CDER), 1994). Nachweisbar waren die Dodecatetraensäureisobutylamide bis zu einer Konzentration von 17 ng, bei der das hervorgerufene Signal mehr als dreimal größer war als das Grundrauschen des Detektors und noch gut mittels UV-Spektrum identifiziert werden konnte. Der Eichfaktor wurde als Steigung der Regressionsgeraden erhalten und betrug 3,0299.



Tetraen-masse [µg]	Fläche [mAU*s]	rel. Standard-abweichung %
27,968	83750,78	0,79
17,480	54434,71	1,13
3,496	11109,58	1,29
0,350	1250,92	0,90
0,175	624,07	0,91
0,105	395,25	2,88

*Abbildung 4.4: Kalibriergerade für die Gehaltsbestimmung der Dodeca-2E,4E,8Z,10Z/E-tetraensäure-isobutylamide und die dafür zugrundeliegenden Massen- und Flächenwerte mit Standardabweichungen (HPLC-Trennsystem: **Ech1**, Detektionswellenlänge: 254 nm).*

Damit der Dodeca-2*E*,4*E*,8*Z*,10*Z/E*-tetraensäure-isobutylamid-Gehalt mit den anderen *Echinacea*-Arten verglichen werden konnte, wurde die gleiche Extraktions- und Aufarbeitungsmethode gewählt wie sie von REMIGER (1988) für die Dodeca-2E,4E,8Z,10Z/E-tetraensäure-isobutylamid-Gehaltsbestimmung in den drei medizinisch angewandten *Echinacea*-Arten durchgeführt wurde (siehe Exp. Teil, Kapitel 9.5, Seite 162). Dafür wurden vier verschiedene Drogenchargen von E. atrorubens radix mit Chloroform in einer Soxhletapparatur extrahiert. Von der frischen Droge wurde zusätzlich ein Hexansoxhletextrakt und ein *n*-Hexanmazerat durch 4 stündiges Rühren auf dem Magnetrührer hergestellt, um den Einfluss des Extraktionsmittels und der Extraktionsart ermitteln zu können.

Für die Gehaltsbestimmung im Kraut stand leider nur eine Drogencharge zur Verfügung.

Tabelle 4.2: Dodeca-2E,4E,8Z,10Z/E-tetraensäure-isobutylamid-Gehalt bezogen auf das Trockengewicht der verschiedenen E. atrorubens-Chargen mit Standardabweichungen (Mittelwert aus 3 Bestimmungen)

Chargen	Herkunft	Gesammelt	Tetraengehalt	rel. Standard-abw. %
E. atrorubens radix				
1 (Chloroform-Soxhletextrakt)	Kansas	1997	0,06 %	1,79
2 (Chloroform-Soxhletextrakt)	Central Kansas	1998	0,09 %	1,77
3 (Chloroform-Soxhletextrakt)	Arkansas	1998	0,16 %	1,19
4 (Chloroform-Soxhletextrakt)	Botanischer Garten*	2002	1,46 %	0,59
4a (*n*-Hexan-Soxhletextrakt)	Botanischer Garten	2002	0,99 %	1,86
4b (*n*-Hexan-Mazerat)	Botanischer Garten	2002	1,08 %	1,10
E. atrorubens herba	Kansas	1997	0,01 %	0,49

*E. atrorubens Samen aus Kansas wurden im Gewächshaus des Botanischen Gartens in Düsseldorf ausgesät. Die frischen Wurzeln dieser Pflanze wurden auf ihren Tetraengehalt untersucht.

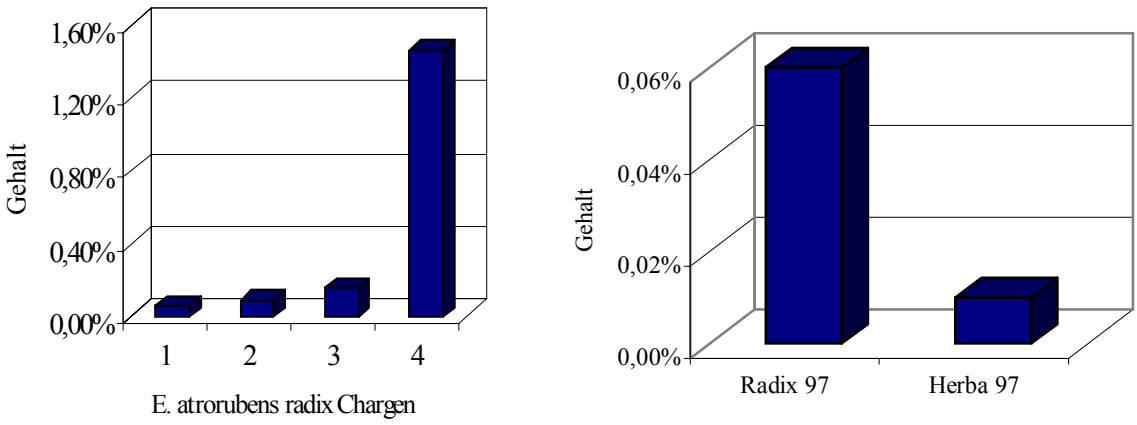


Abbildung 4.5: Dodeca-2E,4E,8Z,10Z/E-tetraensäure-isobutylamid-Gehalt bezogen auf das Trockengewicht der verschiedenen E. atrorubens Chargen (Charakterisierung der Chargen siehe Tabelle 4.2)

Tabelle 4.3: Mittlerer Dodeca-2E,4E,8Z,10Z/E-tetraensäure-isobutylamidgehalt in getrockneter Droge verschiedener Echinacea-Arten.

Tetraengehalt in	*E. atrorubens*	*E. angustifolia*	*E. pallida*	*E. purpurea*
Radix	0,104 %	0,073 %	-	0,012 %
Herba	0,013 %	0,003 %	0,005 %	0,015 %

Wie im Fingerprintchromatogramm bereits ersichtlich war, ist die Dodeca-2*E*,4*E*,8*Z*,10*Z/E*-tetraensäure-isobutylamidkonzentration in der Wurzel wesentlich höher als im Kraut (siehe Abbildung 4.5). Auch im Vergleich zu den medizinisch eingesetzten *Echinacea*-Arten enthält E. atrorubens radix den höchsten durchschnittlichen Gehalt an Dodecatetraensäureisobutylamiden (siehe Tabelle 4.3). Die Konzentration der Alkamide im Kraut von *E. atrorubens* entspricht etwa derjenigen von *E. purpurea* und liegt oberhalb des Gehaltes der anderen beiden *Echinacea*-Arten.

Aus Tabelle 4.2 ist weiterhin ersichtlich, dass mit zunehmender Lagerungszeit der getrockneten, unzerkleinerten Wurzel der Tetraen-Gehalt abnimmt, während die frische Wurzeldroge eine sehr viel höhere Konzentration an Isobutylamiden aufweist. Dies entspricht den Ergebnissen der Lagerungsversuchen mit *Echinacea*-Droge durch verschiedene andere Arbeitsgruppen (siehe Kapitel 2.7).

Außerdem macht die Konzentrationsbestimmung der Isobutylamide der verschiedenen Extrakte deutlich, dass durch eine Chloroformextraktion eine höhere Ausbeute an Tetraen erzielt werden kann als durch eine *n*-Hexanextraktion. Gegen eine Anwendung von Chloroform spricht jedoch, dass zum einen gleichzeitig auch mehr hydrophile Bestandteile extrahiert werden und vor allem dass aus Umweltschutz- und Gesundheitsgründen auf Chloroform verzichtet werden sollte. Eine *n*-Hexanextraktion frischer Wurzeldroge durch Mazeration ergab eine ähnliche Dodeca-2*E*,4*E*,8*Z*,10*Z/E*-tetraensäure-isobutylamidkonzentration wie die *n*-Hexan-Soxhlet-Extraktion (siehe Tabelle 4.2).

Hydrophile Extrakte

Die hydrophilen Bestandteile von *E. atrorubens* wurden nach der Extraktion mit *n*-Hexan in einer Soxhlet-Apparatur mit Methanol extrahiert. Der Extrakt konnte auf einer RP-18 Säule bei einem Fliessmittelgradienten von 10/90 bis 30/70 Acetonitril/Wasser unter Zusatz von jeweils 0,1 % Phosphorsäure mit einer Flussrate von 1,0 ml/min aufgetrennt werden (Trennmethode: **Ech2**). Detektiert wurden die eluierten Verbindungen mittels PDA-Detektor bei einer Wellenlänge von 330 nm. Die resultierenden HPLC-Trennungen der Kraut- und Wurzelextrakte unterscheiden sich deutlich von denjenigen aus *E. angustifolia*, *E. pallida* und *E. purpurea* (siehe Abbildung 4.6). Weder Cichoriensäure noch 2-Kaffeoylweinsäure, Kaffeesäure, Echinacosid, Cynarin oder Verbascosid konnten in *E. atrorubens* nachgewiesen werden. Während in den

Wurzeln mittels HPLC keine hydrophilen Inhaltsstoffe in größeren Mengen identifiziert werden konnten, wurden im Kraut anhand der UV-Spektren und Vergleiche mit Referenzsubstanzen oder Eigenisolaten Chlorogensäure, Rutin und das zum ersten mal in der Gattung *Echinacea* gefundene Narcissin (siehe Kapitel 4.5) nachgewiesen.

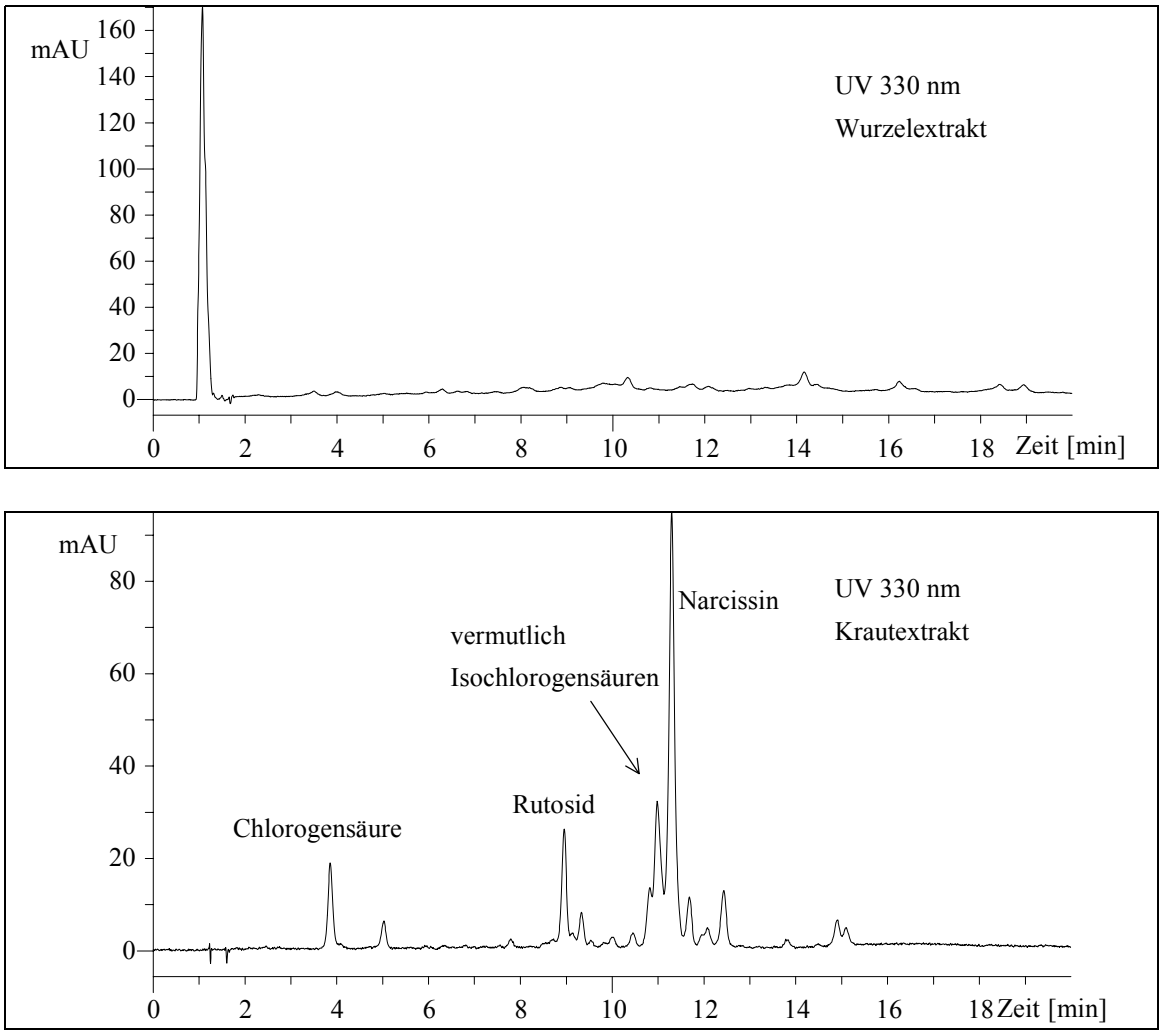


Abbildung 4.6: HPLC-Trennungen der Methanol-Soxhletextrakte aus der Wurzel (oben) und aus dem Kraut (unten) von E. atrorubens (*Herkunft Kansas; Inj.vo.l: 5 µl, Methode:* ***Ech2****, UV-Spektren siehe Abbildung 4.7)*

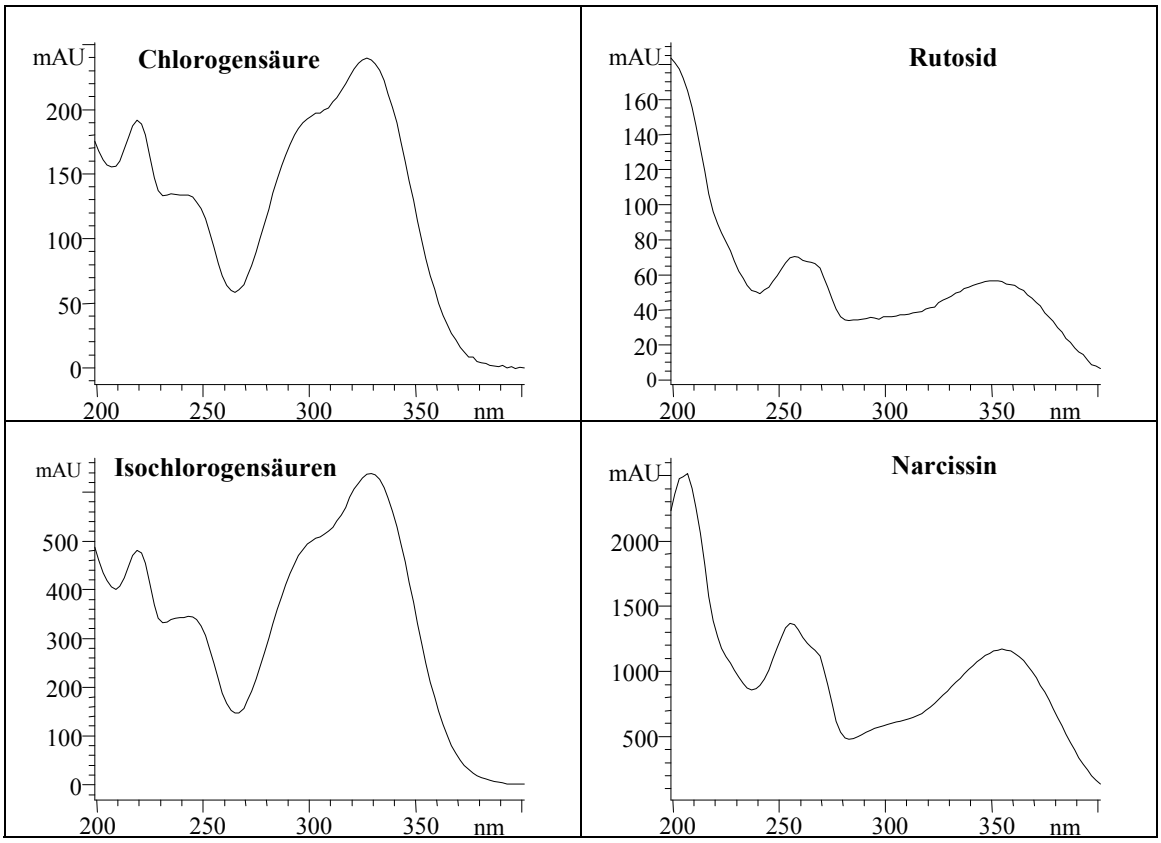


Abbildung 4.7: UV-Spektren der identifizierten hydrophilen Bestandteile im Methanol-Soxhletextrakt

4.1.2. Dünnschichtchromatographische Analyse

Lipophile Extrakte

Für die dünnschichtchromatographische Auftrennung der *n*-Hexanextrakte wurde ein Fließmittelsystem aus *n*-Hexan/Ethylacetat (2:1; Trennsystem: **DC-T1**), welches speziell für die Untersuchung von Alkamiden aus *Echinacea*-Arten entwickelt wurde, verwendet (BAUER und REMIGER, 1989). Die Detektion erfolgte zuerst durch Fluoreszenzlöschung unter UV 254 nm und anschließend mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz. Die Zuordnung der Hauptzonen geschah durch Cochromatographie mit den von uns isolierten Verbindungen.

Wie schon bei der HPLC-chromatographischen Analyse erwähnt, ist auch bei der Direktauswertung der entwickelten Kieselgelplatte unter dem UV-Licht bei 254 nm bereits gut zu erkennen, dass in E. atrorubens radix stark fluoreszenzlöschende 2,4-Dienamide überwiegen. Besonders fielen als Hauptzonen des Wurzel- und Krautextraktes die Dodeca-2*E*,4*E*,8*Z*,10*Z*/*E*-tetraensäureisobutylamide **8/9** bei einem Rf-Wert von 0,41 auf. Während im Krautextrakt nur durch die Alkamide **8/9** eine stark fluoreszenzlöschende Zone unter dem UV-Licht hervorgerufen wurde, waren im Wurzelextrakt auch die Zonen des Dodeca-2*E*,4*Z*-dien-8,10-diinsäure-isobutylamids **4**, Dodeca-

2*E*,4*Z*,10*Z*-trien-8-insäure-isobutylamids **6**, Dodeca-2*E*,4*Z*,10*Z*-trien-8-insäure-2-methylbutylamid **12**, Dodeca-2E,4E,8Z-triensäureisobutylamids **10** und des Dodeca-2E,4E-diensäureisobutylamids **11** gut sichtbar. Da sich die Alkamide strukturell nur sehr wenig unterscheiden, kommt es im Dünnschichtchromatogramm des alkamidreichen Wurzelextraktes teilweise zu Überlappungen von sehr ähnlichen Substanzen.

Nach Detektion mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz (siehe Abbildung 4.9, Seite 57) werden bei Tageslicht im Chromatogramm des Wurzel- und Krautextraktes unterhalb der Fliessmittelfront verschiedene langkettige Kohlenwasserstoffe als violette Zonen und oberhalb des Dodeca-2E,4E-diensäureisobutylamids **10** β-Sitosterin als violett-blaue Zone sichtbar. Außerdem reagieren die nicht fluoreszenzlöschenden 2-Monoenamide mit dem Sprühreagenz nun zu rötlich bis gelben Banden, wobei die Monoenamide Undeca-2*E*-en-8,10-diinsäure-isobutylamid **3** und Dodeca-2*E*-en-8,10-diinsäure-isobutylamid **5** bei einem Rf-Wert von 0,21 und 0,25 besonders ins Auge fallen. Die 2,4-Dienamide auf der anderen Seite werden in der Regel violett bis braun angefärbt (siehe Tabelle 4.4).

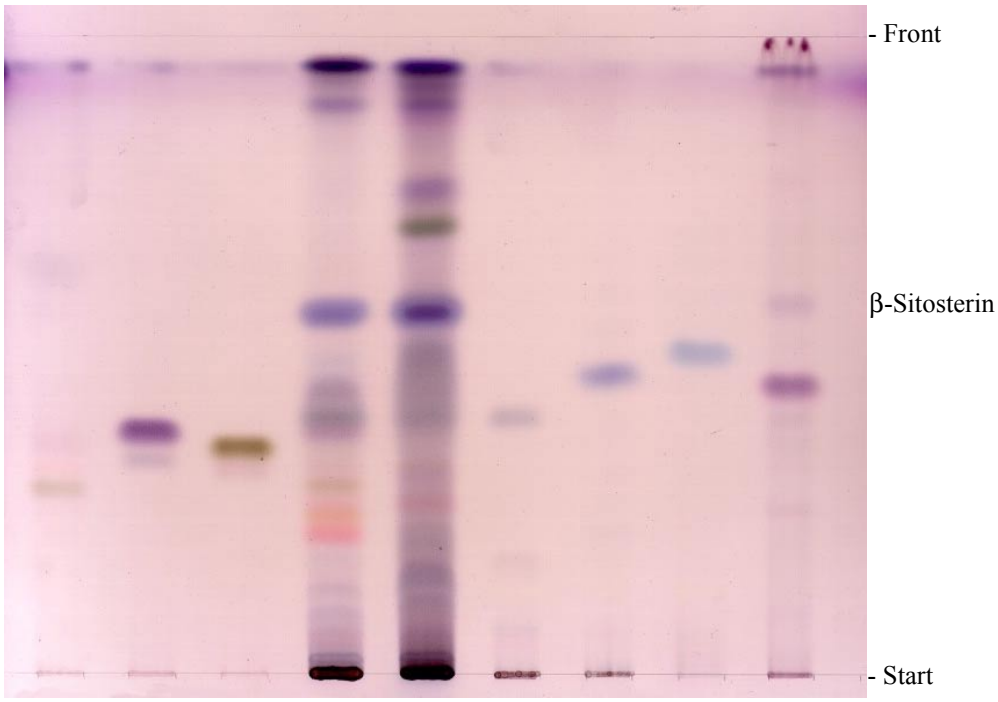


*Abbildung 4.8: Dünnschichtchromatogramm der n-Hexan-Soxhlet-Extrakte aus der Wurzel und dem Kraut (Ernte: 1997 in Kansas; Charge 1) von E. atrorubens neben isolierten Vergleichssubstanzen (Zuordnung der Zonen siehe Tabelle 4.1, Seite 48) nach Detektion mit Anisaldehyd/Schwefelsäure-Reagenz/Vis; Trennsystem **DC-T1**.*

*Tabelle 4.4: Rf-Werte und Detektionsverhalten der in E. atrorubens nachgewiesenen Alkamide (Trennsystem **DC-T1**)*

Verbindung	Rf-Wert	UV 254 nm	Färbung mit Anisaldehyd/H_2SO_4
1/2	0,22; 0,26	+	violett
3	0,21	-	orange/gelb
4	0,29	+	violett/braun
5	0,25	-	orange/gelb
6	0,38	+	violett
7	0,23	-	gelb
8/9	0,41	+	violett
10	0,47	+	violett
11	0,5	+	blau/violett
12	0,45	+	violett
13	0,35	+	braun
14/15	0,33	-	rosa/gelb
16	0,31	-	gelb
17	0,55	+	violett
18	0,52	+	violett
19/20	0,48	+	violett/grau

Zur eindeutigen Identifizierung von *E. atrorubens* wurden die *n*-Hexansoxhletextrakte von vier Wurzelchargen unterschiedlicher Herkunft dünnschichtchromatographisch verglichen (siehe Tabelle 4.2, Seite 51 und Abbildung 4.9). Zusätzlich wurden 70 prozentige Methanolextrakte nach der Ultraschall-Methode von BERGERON (2000; siehe Seite 34) aus der Charge 1 (1997) und aus der frischen Wurzel (Charge 4) hergestellt. Wie aus Abbildung 4.9 ersichtlich ist, führt die Extraktion mit 70 prozentigem Methanol zu einem ähnlichen Alkamidspektrum wie die *n*-Hexansoxhletextraktion.

Im Dünnschichtchromatogramm fällt auch auf, dass die Alkamidkonzentration in der Wurzel mit zunehmender Lagerungszeit abnimmt. So wurden bei gleicher Auftragskonzentration im Dünnschichtchromatogramm der ältesten E. atrorubens radix Droge von 1997 (Charge 1) sehr viel weniger Alkamide sichtbar als im Chromatogramm der Wurzel von 1998 (Charge 2 und 3) oder der frischen Wurzeldroge (Charge 4). Abbildung 4.8 zeigt ein aufkonzentrierteres DC-Chromatogramm der Charge 1, welches den anderen Wurzelchargen entspricht, so dass alle vier E. atrorubens radix-Chargen ein homogenes Dünnschichtchromatogramm liefern und sich lediglich in quantitativer Hinsicht unterscheiden.

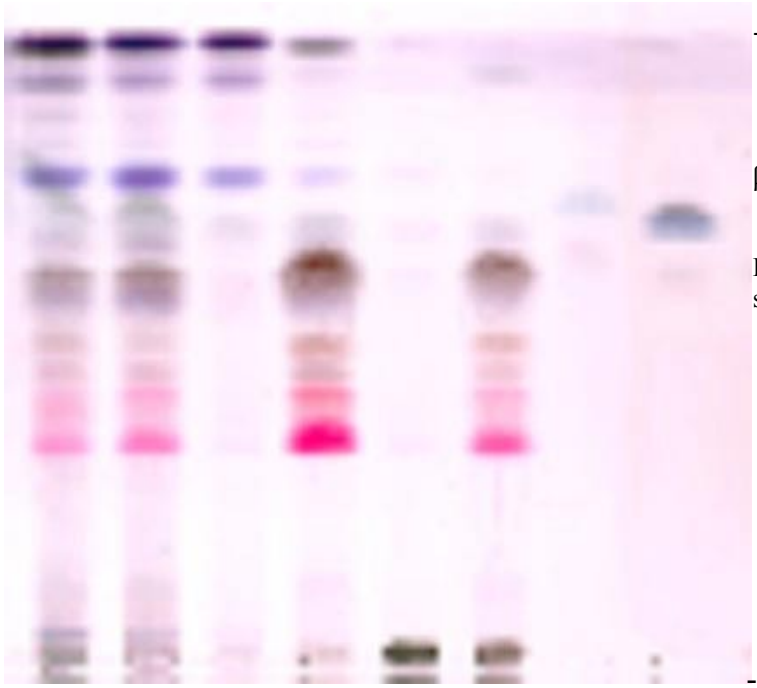


Abbildung 4.9: DC-Vergleich der n-Hexan-Soxhletextrakte vier verschiedener E. atrorubens radix Drogenchargen: Detektion: Detektion mit Anisaldehyd/Schwefelsäure-Reagenz/Vis; Trennsystem ***DC-T1****.*

1 = Charge 3: Ernte 1998 aus Arkansas
2 = Charge 2: Ernte 1998 aus Centralkansas
3 = Charge 1: Ernte 1997 aus Kansas
4 = Charge 4: Frische Wurzeldroge aus dem Botanischen Garten, Düsseldorf
5 = 70 prozentiger Methanolextrakt der Charge 1 (Ernte 1997 aus Kansas)
6 = 70 prozentiger Methanolextrakt der Charge 4 (Frische Droge)
7 = Dodeca-2*E*,4*E*-diensäure-isobutylamid **A11**
8 = Dodeca-2*E*,4*E*,8*Z*-triensäure-isobutylamid **A10**

Hydrophile Extrakte

Die Methanol-Soxhletextrakte von *E. atrorubens* wurden mit einem Fliessmittelgemisch aus Ethylacetat-Wasser-Ameisensäure-Essigsäure (100:27:11:11) dünnschichtchromatographisch aufgetrennt. Die einzelnen Zonen wurden zum einen durch ihre Fluoreszenz im UV-Licht bei 366 nm und zum anderen im UV- und Tageslicht nach Detektion mit Naturstoffreagenz-PEG charakterisiert (REMIGER, 1988).

Sowohl im Kraut als auch in der Wurzel von *E. atrorubens* konnten weder Cichoriensäure, noch Echinacosid, Cynarin oder Verbascosid mittels DC nachgewiesen werden. Im Dünnschichtchromatogramm des Krautextraktes wurden im UV-Licht bei 366 nm Rutosid als schwach rote Zone bei Rf 0,42 und Chlorogensäure als blau fluoreszierende Bande (Rf 0,55) sichtbar. Weiterhin erschien bei einem Rf-Wert von

0,45 Narcissin, das erstmals aus der Gattung *Echinacea* isoliert und identifiziert werden konnte (siehe Kapitel 4.4.1, Seite 111), als dunkelrote Zone.
Nach Besprühen mit Naturstoffreagenz-PEG färbte sich Rutosid orange, Narcissin gelb/orange und Chlorogensäure blau an.

Tabelle 4.5: Rf-Werte und Detektionsverhalten der in E. atrorubens herba nachgewiesenen hydrophilen Verbindungen (Trennsystem: DC-T3).

Verbindung	Rf-Wert	UV 366 nm	Naturstoff-Reagenz/PEG
Rutosid	0,42	schwach rot	orange
Narcissin	0,45	dunkelrot	gelb/orange
Chlorogensäure	0,55	blau	blau

Im Dünnschichtchromatogramm des Wurzelextraktes konnten unter den obengenannten Bedingungen keine Substanzen nachgewiesen werden.

Die vorangegangenen Untersuchungen stellen die ersten Dünnschicht- und HPL chromatographischen Analysen von *E. atrorubens* dar.

4.2. Isolierung und Strukturaufklärung von Alkamiden aus Echinaceae atrorubens radix

4.2.1. Fraktionierung

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, die lipophilen Bestandteile von E. atrorubens radix näher zu untersuchen. Da bereits bekannt war, dass Alkamide phagozytosestimulierende und entzündungshemmende Eigenschaften aufweisen (siehe Kapitel 2.2.1 und 2.4.1) und so wahrscheinlich an der Wirkung von *Echinacea*-Zubereitungen beteiligt sind, sollten weitere Alkamide aus der Wurzel von *E. atrorubens* isoliert und aufgeklärt werden, um sie verschiedenen pharmakologischen Untersuchungen unterziehen zu können. Die HPL-chromatographische Analyse des *n*-Hexanextraktes aus E. atrorubens radix lieferte ein vielfältiges Inhaltsstoffspektrum chromatographisch eng benachbarter Peaks von Alkamiden (siehe Kapitel 4.1.1). Aus diesem Grund waren für die Auftrennung der Alkamide verschiedene chromatographische Systeme mit unterschiedlichen stationären und mobilen Phasen notwendig. *n*-Hexan wurde gegenüber Dichlormethan oder Chloroform als Extraktionsmittel bevorzugt, da zum einen auf chlorierte Lösungsmittel weitestgehend verzichtet werden sollte und zum anderen mit diesen gleichzeitig hydrophile Substanzen extrahiert würden, die die Isolierung der Alkamide erschwert hätten.

Für die Grobfraktionierung des *n*-Hexanextraktes wurde als erstes eine Vakuumflüssigchromatographie an Kieselgel mit *n*-Hexan-Ethylacetat-Mischungen als Elutionsmittel durchgeführt (siehe 9.6.1). Die Fraktionen IX-XI des Extraktes **E1** und die Fraktionen II-IV aus dem Extrakt **E2** enthielten die gesuchten Alkamide. Da die Fraktionen II bzw. X noch ein sehr komplexes Alkamidspektrum aufwiesen, wurden diese jeweils erneut mittels Vakuumflüssigchromatographie an Kieselgel angereichert. Anschließend wurden die Alkamidfraktionen jeweils durch Mitteldruckflüssigchromatographie (MPLC) an RP-18 Material mit Acetonitril-Wassergradienten aufgetrennt. Mit Hilfe dieses Verfahrens konnten einige Alkamide bereits in reiner Form erhalten werden. Für die Aufreinigung anderer, strukturell sehr ähnlicher Verbindungen war semipräparative HPLC auf einer RP-18 Säule notwendig. Die Trennmethoden wurden jeweils speziell für die einzelnen Alkamide optimiert.

Eine ausführliche Beschreibung des Trennungsverfahrens findet sich in Kapitel 9.6.1. Eine Übersicht über alle Trennungsschritte gibt das Isolierungsschema in Abbildung 4.10 und Abbildung 4.11 wieder.

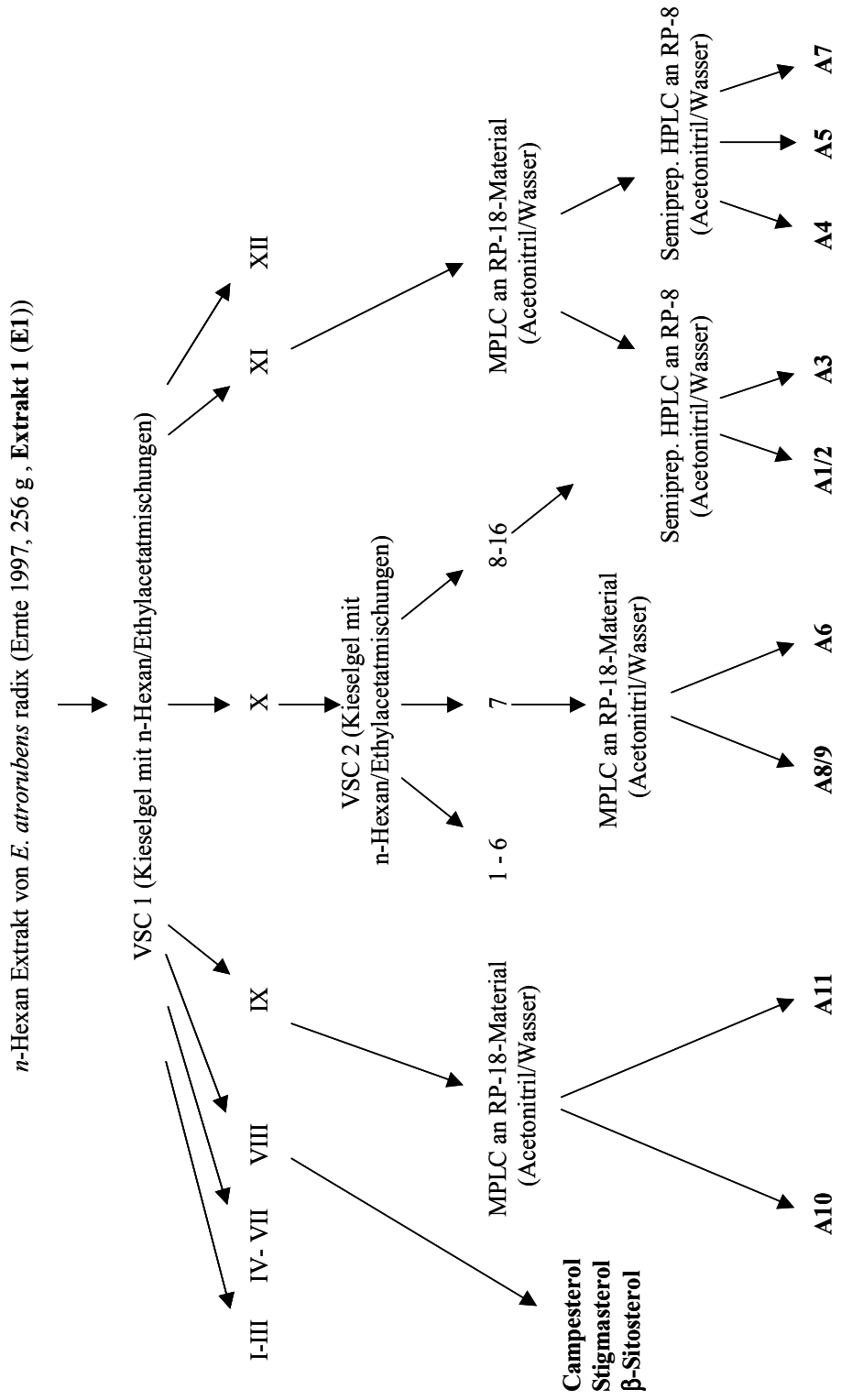


*Abbildung 4.10:Isolierungsschema der Alkamide aus dem Extrakt 1 (**E1**) von E. atrorubens radix (Ernte 1997, 256 g).*

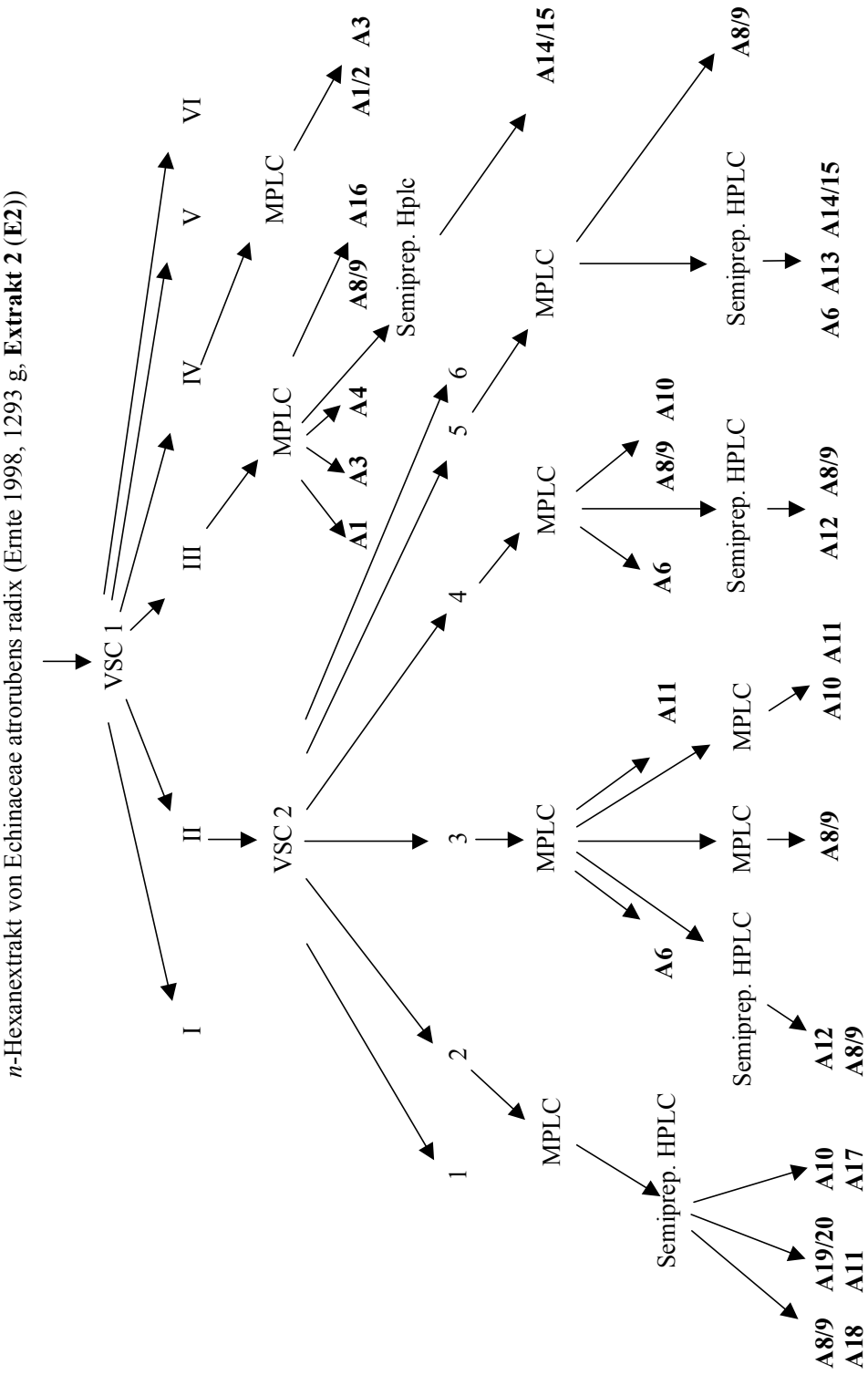


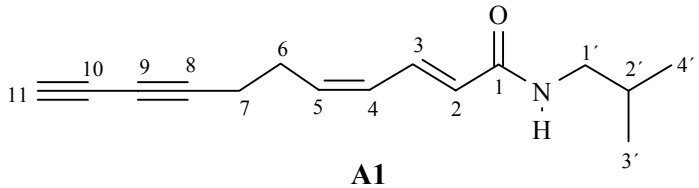
*Abbildung 4.11:Isolierungsschema der Alkamide aus dem Extrakt 2 (**E2**) von E. atrorubens radix (Ernte 1998, 1293 g).*

4.2.2. Probleme bei der Isolierung von Alkamiden

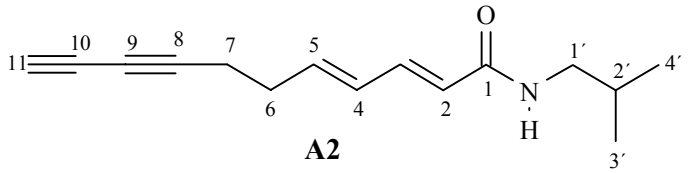
Aufgrund der ungesättigten Strukturen im Säureteil der Alkamide sind diese vor allem im isolierten Zustand relativ instabil. Dies erfordert bei der Isolierung besondere Arbeitsbedingungen. Während die Substanzen in Lösung relativ stabil sind, neigen sie als Festsubstanzen dazu, dunkle, unlösliche Polymerisationsprodukte ungeklärter Zusammensetzung zu bilden. Diese sogenannte „echte Polymerisation“ läuft über parallel ausgerichtete, angenäherte Ketten ab, zwischen denen nach Anregung ihres π-Elektronensystems durch Licht und Wärme Wechselwirkungen und damit die Ausbildungen neuer Bindungen möglich werden (BOHLMANN, 1953). Außerdem ist der ungesättigte Fettsäureanteil der Alkamide anfällig für Autoxidationen (Allyloxidation), so dass aus den genuien Inhaltsstoffen innerhalb kurzer Zeit hydroxylierte Artefakte entstehen können. BOHLMANN und Mitarbeiter (1973) beschrieben dies für ähnliche Verbindungen. Zur Vermeidung dieser Vorgänge wurden die Wurzeln im unzerkleinerten Zustand und die isolierten Verbindungen unter *n*-Hexan unter Licht- und Wärmeausschluss gelagert.

Trotz einer Lagerung unter *n*-Hexan bei –20 °C wurde jedoch zum Beispiel bei Verbindung **A1,** dem Undeca-2*E*,4*Z*-dien-8,10-diinsäure-isobutylamid, eine Konfigurationsänderung der Doppelbindung zu dem stabileren 2*E*,4*E*-Isomer **A2** festgestellt. Da Alkamide biosynthetisch aus *cis*-konfigurierten Fettsäuren entstehen, ist anzunehmen, dass **A1** von der Pflanze gebildet wird und dass das *trans*-Isomer **A2** später durch Isomerisierung entsteht.

4.2.3. Undeca-2*E*,4*E*/*Z*-dien-8,10-diinsäure-isobutylamide (Verbindungen A1/2)



A1



A2

Die Substanz **A1** (7 mg) konnte zuerst mittels semipräparativer HPLC aus der Fraktion XI.2 des Extraktes **E1** als weiße Kristalle gewonnen werden. Während der Aufarbeitung

und Lagerung von **A1** erschien im DC- und GC-MS-Chromatogramm ein weiterer Peak, der durch die Substanz **A2** verursacht wurde. Außerdem gelang die Isolierung von **A1** (29,7 mg) mittels MPLC aus der Fraktion III und IV der VSC-Trennung des Extraktes **E2**. Da sehr schnell nach der Isolierung eine Untersuchung erfolgte, konnte dieses Mal nur **A1** nachgewiesen werden.

Das während der HPLC-Trennung aufgenommene UV-Spektrum der Substanz **A1** wies ein Absorptionsmaximum bei 260 nm auf, welches auf ein 2,4-Dienamid-Chromophor hindeutete. Die Substanz **A2** wies das gleiche HPLC- und UV-Verhalten auf wie die Verbindung **A1**.

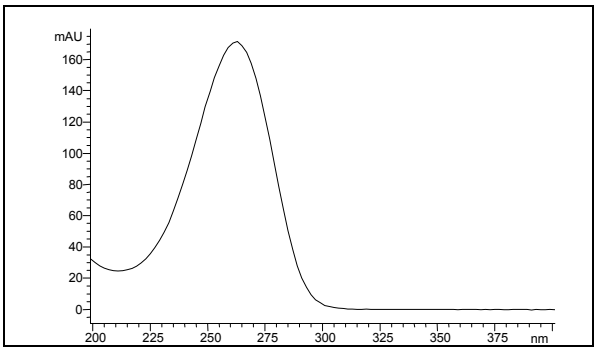


*Abbildung 4.12:UV-Spektrum der Verbindung **A1/A2***

Das EI-Massenspektrum von **A1** bzw. **A2** lieferte jeweils einen Molekülpeak bei *m/z* 229, entsprechend einer Formel von $C_{15}H_{19}NO$. Die Abspaltungen von 15, 43, 57 und 72 Masseneinheiten (m/z bei: 214, 186, 172, 157) sind charakteristisch für eine Isobutylamidgruppierung (REMIGER, 1988, (siehe Abbildung 4.13).

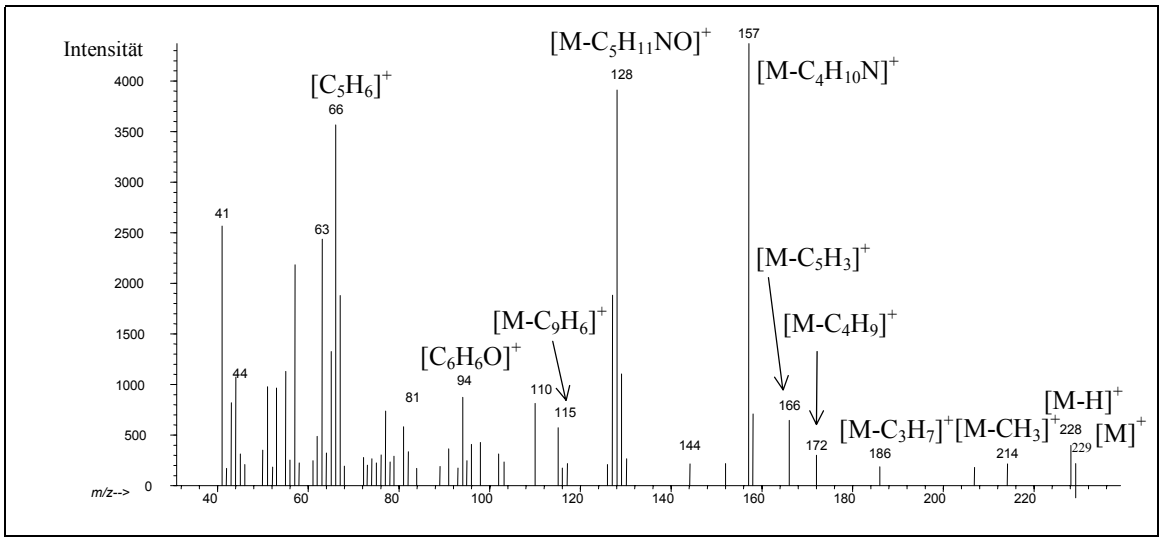


*Abbildung 4.13:GC-EI-Massenspektrum von **A2**.*

Der Basispeak von **A1** bei *m/z* 128 $[M\text{-}C_5H_{11}NO]^+$ zeigte einen Bindungsbruch zwischen C-1 und C-2 im Säureteil an. Die Differenz von einer Masseneinheit lässt sich durch den Verlust eines weiteren Wasserstoffatoms erklären. Das Massenspektrum von **A2** unterschied sich nur durch den Basispeak bei *m/z* 157 $[M\text{-}C_4H_{10}N]^+$ (siehe Abbildung 4.13).

Das ^{1}H-NMR-Spektrum bestätigte die Isobutylamidstruktur von **A1**/**A2** mit den Signalen bei 3,15 (*dd*, H_2-1´), 1,79 (*m*, H-2´) und 0,91 ppm (*d*, H_3-3´, H_3-4´) (siehe Abbildung 4.14). Da die beiden Kopplungskonstanten von H_2-1´ zu H-2´ und N-H gleich groß waren, erschien das Signal der beiden Methylenprotonen H_2-1´ bei 3,15 ppm zwar wie ein Triplett, stellte jedoch ein Dublett vom Dublett dar. Das Methinproton H-2´ lieferte durch die Nachbarschaft zu den beiden magnetisch äquivalenten Methylgruppen H_3-3´ und H_3-4´, die gemeinsam als Dublett bei 0,91 ppm auftraten, und zu dem Methylenproton H_2-1´ ein stark aufgespaltenes Signal bei 1,79 ppm (theoretisch *tqq*). Das Proton am Stickstoff erschien als stark verbreitertes Signal bei 5,45 ppm.

Für die Identifizierung der Säuregruppierung von **A1** und **A2** war ein ^{1}H,^{1}H-Korrelationsspektrum (COSY) notwendig. Zuerst wurden die Resonanzsignale des ^{1}H,^{1}H-COSY- und ^{1}H-NMR-Spektrums, das nur **A1** und noch kein **A2** enthielt, den Protonen der Substanz **A1** zugeordnet (siehe Abbildung 4.14). Bei 5,85 ppm erschien das Dublett von H-2 und koppelte mit einer Konstante von 15,1 Hz mit H-3 (7,47 ppm, *ddd*), welches die *E*-Konfiguration der Doppelbindung an C2/C3 bewies. Wie es für α,β-ungesättigte Carbonylgruppen charakteristisch ist, liegt das Signal von H-3 durch den elektronenziehenden Einfluss der Carbonylgruppe sehr weit im Tieffeld bei 7,47 ppm. Im 500 MHz-^{1}H-NMR-Spektrum konnte die Aufspaltung von H-3 zu einem dreifachen Dublett beobachtet werden. Neben der Kopplung zu H-2 und H-4 (6,15 ppm, 11,9 Hz, *ddt*) wurde weiterhin eine Allylkopplung mit 1,5 Hz festgestellt. Die Kopplungskonstante von 11,9 Hz zwischen H-4 und H-5 (5,80 ppm, *dt*) zeigte an, dass diese miteinander *cis*-verknüpft waren. Die Signale von H_2-6 und H_2-7 erschienen im höheren Feld bei 2,53 und 2,36 ppm. H_2-6 wies zwei vicinale Kopplungen zu H-5 und H_2-7 mit jeweils 6,9 Hz auf und zusätzlich eine long-Range-Kopplung zu H-4 mit 1,5 Hz. H_2-7 spaltete sich als Triplett-Dublett auf (J = 6,9; 1,1), wobei die kleine Kopplungskonstante von 1,1 Hz eine Fernkopplung anzeigte. Da H_2-7 nur zu H_2-6 und einem weiter entfernten Proton koppelte und aufgrund der Masse von 229 Da noch 49 Masseneinheiten für den Rest des Moleküls zur Verfügung standen, liess dies zwei konjugierte acetylenische Bindungen zwischen C-8/C-9 und C-10/C-11 vermuten. Das Triplett bei 1,96 ppm mit einer Kopplungskonstante von 1,1 Hz untermauerte diese Vermutung, da dieses Signal durch das endständige, acetylenische Proton H-11 hervorgerufen worden sein musste und die Kopplungskonstante von 1,1 Hz die Fernkopplung über die zwei Dreifachbindungen zu H_2-7 belegte.

Aufgrund der oben genannten spektroskopischen Daten konnte **A1** als Undeca-2*E*,4*Z*-dien-8,10-diinsäure-isobutylamid identifiziert werden.

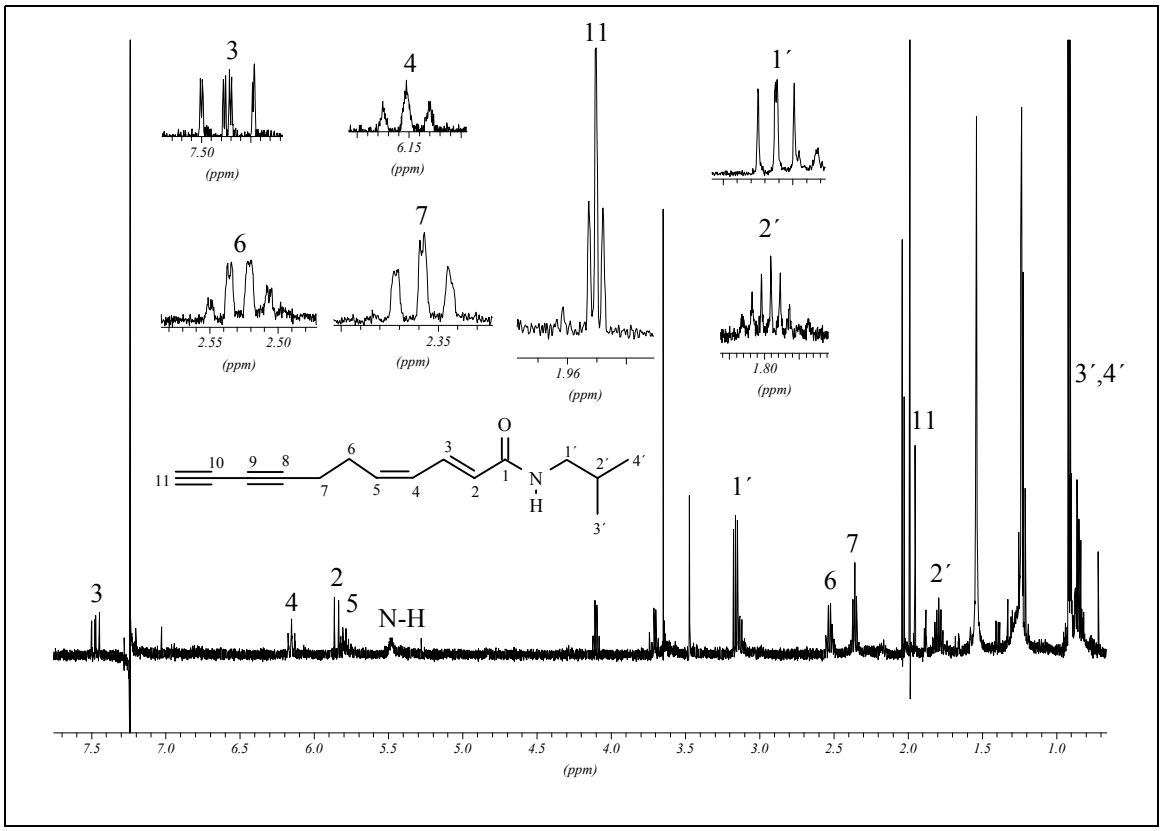


*Abbildung 4.14: ^{1}H-NMR-Spektrum von **A1** (500 MHz $CDCl_3$).*

Die UV-, MS- und NMR-Daten stimmten mit den Ergebnissen von REMIGER (1988) überein, der **A1** zum ersten Mal aus den Wurzeln von *E. purpurea* und *E. angustifolia* isolierte.

Außerdem standen die ^{13}C-NMR-Daten von **A1** im Einklang mit den Werten, die PERRY und Mitarbeiter (1997), die **A1** vor allem im vegetativen Sproß (Übergang Rhizom/Blattrosette) von *E. purpurea* nachwiesen.
In *E. atrorubens* konnte diese Verbindung hier zum ersten Mal beschrieben werden.

Im ^{1}H,^{1}H-Cosy- und ^{1}H-NMR-Spektrum der isolierten Substanzen aus dem Extrakt **E1** (siehe Abbildung 4.15) traten neben den oben beschriebenen Signalen für **A1** weitere, jedoch schwächere Resonanzsignale im olefinischen Bereich auf. Das Signal bei 7,17 ppm (dd) konnte aufgrund der Kopplungen zu dem Dublett bei 5,78 ppm und zu dem Signal bei 6,19 ppm (dd) dem Proton 3 zugeordnet werden. Weiterhin ist die relativ stark tieffeldverschobene Lage des Signals, wie bereits oben beschrieben, typisch für das Proton-3 der α,β-ungesättigten Carbonylgruppe. Die Kopplungskonstante von 15,1 Hz zu dem Dublett von H-2 bei 5,78 ppm belegte die *trans*-Verknüpfung zwischen C-3 und C-2. Das Signal bei 6,19 ppm (dd) mit der Kopplungskonstante von 11,3 Hz zu

H-3, das teilweise durch das Resonanzsignal von H-4 der Verbindung **A1** überlagert wurde, mußte folglich durch H-4 von **A2** entstanden sein. Im ^{1}H,^{1}H-COSY-Spektrum war die Kopplung von H-4 zu H-5 (6,03 ppm, dt) mit einer für *trans*-konfigurierte Doppelbindungen typischen Konstanten von 15,1 Hz gut sichtbar. H-5 koppelte zusätzlich mit der Metyhlengruppe 6, welches gemeinsam mit H_2-7 als Multiplett bei 2,36 ppm erschien.

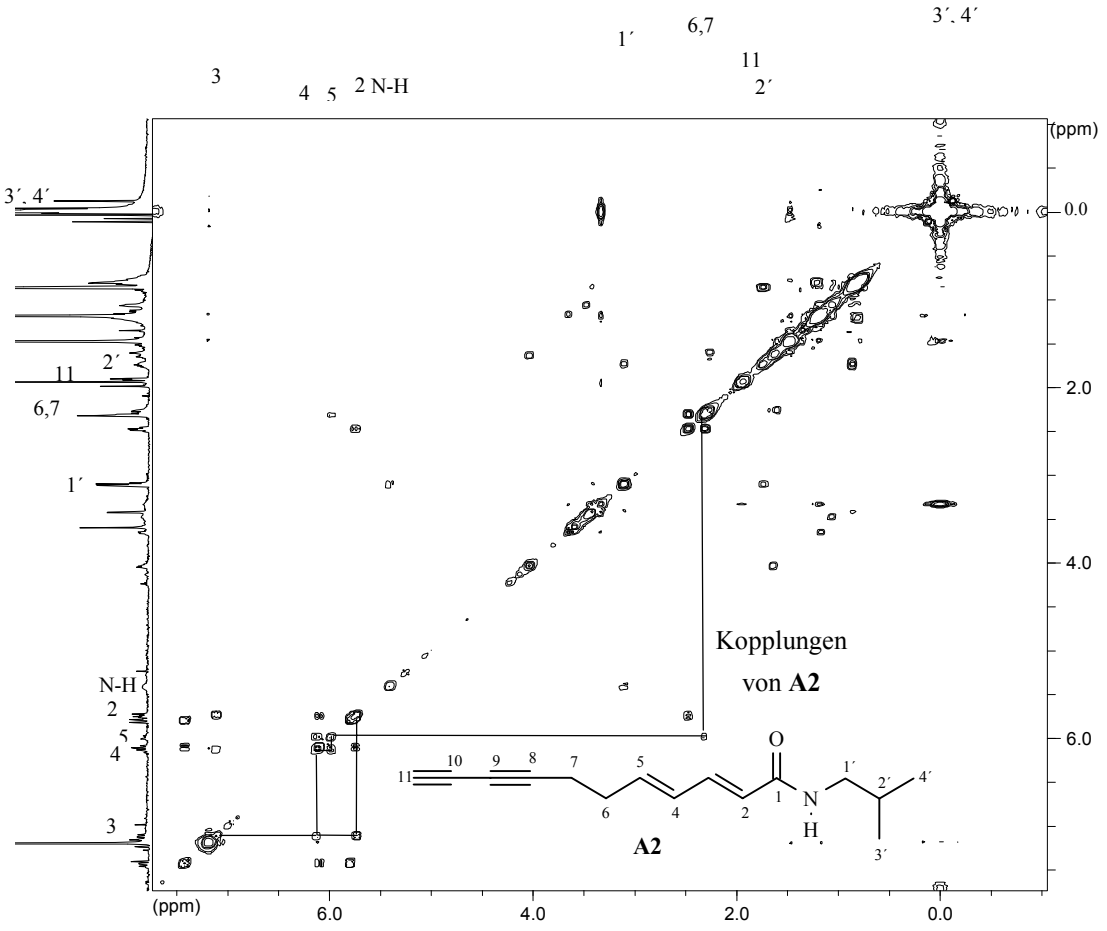


*Abbildung 4.15:^{1}H,^{1}H-COSY-Spektrum von **A1** und **A2** (500 MHz, in $CDCl_3$,), Beschriftungen beziehen sich auf **A2.***

Da **A2** laut MS-Spektrum ebenfalls die Masse 229 besaß und H_2-7 keine weiteren vicinalen Kopplungen aufwies, mußte der Rest des Moleküls der Verbindung **A1** gleichen. **A2** konnte also als Undeca-2*E*,4*E*-dien-8,10-diinsäure-isobutylamid, dem *trans, trans*-Isomer von **A1,** identifiziert werden. Die genauen ^{1}H-NMR-Daten der Verbindungen **A1** und **A2** sind in Tabelle 4.6 wiedergegeben.

Da Alkamide aus *cis*-konfigurierten Fettsäuren gebildet werden, ist es denkbar, dass **A1** genuin in der Pflanze vorliegt und erst später im extrahierten oder isolierten Zustand zu

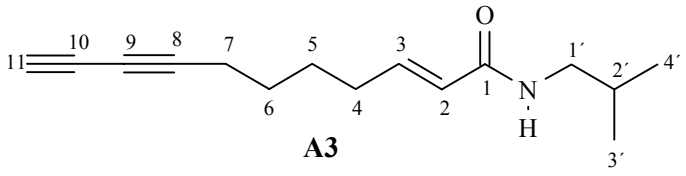
dem energetisch stabileren **A2** isomerisiert. Dafür spricht weiterhin die Tatsache, dass mittels GC-MS nur sehr wenig **A2** im frisch hergestellten *n*-Hexanextrakt von E. atrorubens radix nachgewiesen werden konnte und dass nach einer Lagerungszeit von 2 Monaten der Anteil von **A2** im Isomerengemisch zunahm.

Die Verbindung **A2** wurde hier zum ersten Mal beschrieben.

*Tabelle 4.6: ^{1}H-NMR-Daten von **A1** und **A2** (500 MHz, in $CDCl_3$).*

H	A1			A2		
2	5,85	d	15,1	5,78	d	15,1
3	7,47	ddd	15,1; 11,9; 1,5	7,17	dd	15,1; 11,3
4	6,15	ddt	11,9; 11,9; 1,5	6,19	dd	11,3; 11,3
5	5,80	dt	11,9; 6,9	6,03	dt	15,1; 6,9
6	2,53	ddt; 2H	6,9; 6,9; 1,5	2,36	m; 2H	
7	2,36	td; 2H	6,9; 1,1	2,36	m; 2H	
8						
9						
10						
11	1,96	t	1,1	1,96	t	1,1
N-H	5,45	brs	-	5,45	brs	-
1´	3,15	dd; 2H	6,9; 6,9	3,15	dd; 2H	6,9; 6,9
2´	1,79	m		1,79	m	
3´, 4´	0,91	dd; 6H	6,9; 2,5	0,91	dd; 6H	6,9; 2,5

4.2.4. Undeca-2*E*-en-8,10-diinsäure-isobutylamid (Verbindung A3)



A3

Die Verbindung **A3** (34 mg) wurde wie die vorhergehend beschriebenen Amide **A1**/**A2** mittels semipräparativer HPLC aus der Fraktion XI.2 des Extraktes **E1** als farblose Kristalle gewonnen. Außerdem gelang die Isolierung von **A3** (18,8 mg) mittels MPLC aus der Fraktion III und IV der VSC-Trennung des Extraktes **E2**.

Das UV-Spektrum dieser Verbindung zeigte ein UV-Maximum bei 210 nm, welches auf ein 2-Monoenamid hindeutete.

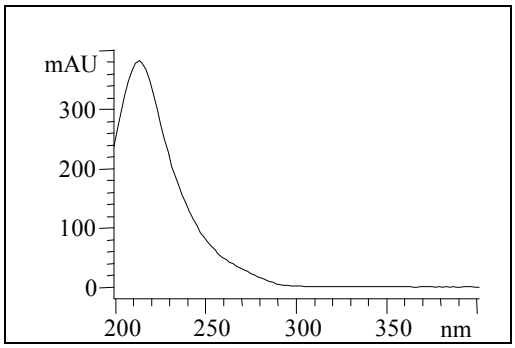


*Abbildung 4.16:UV-Spektrum von **A3***

Das Massenspektrum von **A3** wies einen Molekülpeak von *m/z* 231 auf und zeigte wiederum die typischen Isobutylamidfragmente. Mit Hilfe der MS-Daten konnte auf eine Molekülformel von $C_{15}H_{21}NO$ geschlossen werden. Der im Vergleich zu **A1** um zwei Masseneinheiten größere Molekülpeak von **A3** legte die Vermutung nahe, dass es sich bei **A3** um das in 4,5 Stellung hydrierte Derivat von **A1** handeln könnte.

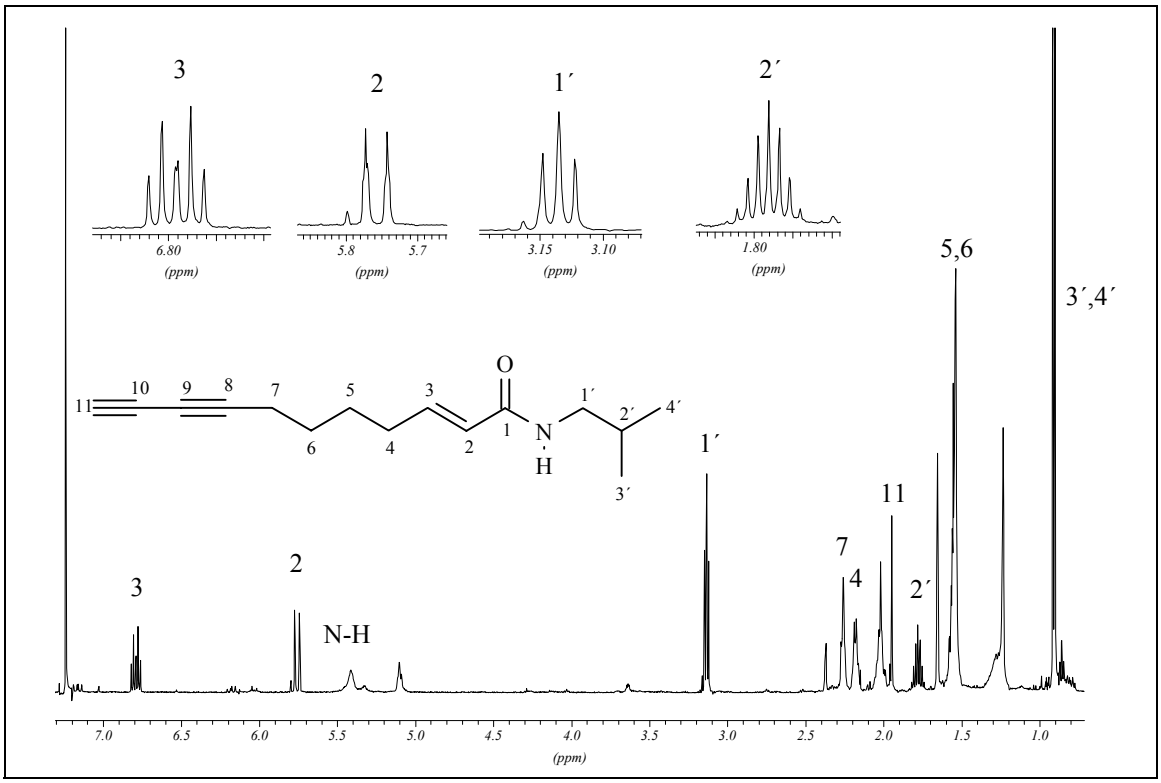


*Abbildung 4.17::^{1}H-NMR-Spektrum von **A3** (500 MHz $CDCl_3$)*

Im ^{1}H-NMR-Spektrum waren ebenfalls die typischen Isobutylamidsignale bei 3,13; 1,78 und 0,91 ppm erkennbar (siehe Abbildung 4.17). Im olefinischen Bereich traten die beiden Signale der Wasserstoffatome 2 und 3 bei 5,76 und 6,79 ppm auf. Diese beiden Protonen koppelten mit einer Konstante von 15,1 Hz miteinander, was die *trans*-

Konfiguration der 2,3-Doppelbindung belegte. Außerdem wies das Signal von H-2 eine Triplett-Unterstruktur auf, die durch eine Allylkopplung zu H_2-4 bei 2,18 ppm entstand. H-3 spaltete sich deutlich zu einem Dublett eines Tripletts auf und zeigte so auch die Kopplung mit 6,9 Hz zu H_2-4 an.

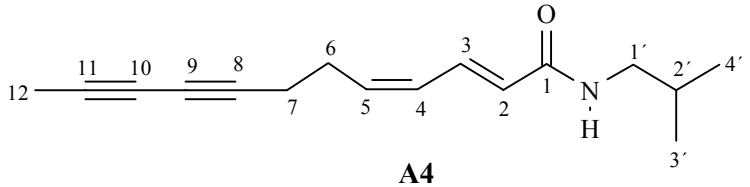
Im $^1H,^1H$-Cosy-Spektrum war weiterhin das Kreuzsignal von H_2-4 zu dem Signal von H_2-5 und H_2-6 bei 1,56 ppm (m, 4H) erkennbar. Das Signal von H_2-7 erschien bei 2,26 ppm, was durch die Kopplung zu dem Multiplett bei 1,56 ppm belegt werden konnte. Aus dem Aufspaltungsmuster des Signals von H_2-7, einem Triplett (7 Hz) mit Dublett-Unterstruktur (1,1 Hz), läßt sich, wie bei den vorangegangenen Amiden, die Nachbarschaft zu einer oder zwei konjugierter Acetylengruppen ableiten. Das acetylenische Proton 11 bei 1,95 ppm, dessen Aufspaltung zu einem Singulett mit Triplettunterstruktur (J = 1,1 Hz) und dessen Kreuzsignal im $^1H,^1H$-COSY-Spektrum zu H-7 eine Fernkopplung durch die beiden Dreifachbindungen anzeigte, bewies dies.

Die oben aufgeführten spektroskopischen Daten belegen, dass es sich bei **A3** um das Undeca-2*E*-en-8,10-diinsäure-isobutylamid handelt. Die Verbindung wurde bereits aus den Wurzeln von *E. angustifolia* (REMIGER, 1988) und aus *Acmella ciliata* (H.B.K.) CASS. (MARTIN und BECKER, 1985) isoliert. Die hier ermittelten spektroskopischen Daten stehen im Einklang mit den MS- und ^1H-NMR-Literaturdaten (siehe Tabelle 4.7). Für *E. atrorubens* ist diese Verbindung hier zum ersten Mal beschrieben worden.

*Tabelle 4.7: ^1H-NMR-Daten von **A3** und **A4** (500 MHz, in $CDCl_3$) im Vergleich zu Literaturdaten von REMIGER (1988).*

H	A3	Literatur A3	A4	Literatur A4
2	5,76 dt 15,1; 1,3	5,79 dt 15; 1	5,84 d 14,5	5,86 d 15
3	6,79 dt 15,1; 6,9	6,83 dt 15; 7	7,47 dd 14,5; 11,3	7,50 dd 15; 11
4	2,18 m; 2H	2,30 m -	6,13 dd 11,3; 10,7	6,15 dd 11; 11
5	1,56 m; 2H -	1,60 m -	5,81 dt 10,7; 6,9	5,85 dt 11; 8
6	1,56 m; 2H -	1,60 m -	2,50 dt; 2H 6,9	2,52 dt 7; 7
7	2,26 dt; 2H 6,9; 1,1	2,30 m -	2,34 td; 2H 6,9; 1,1	2,63 t 7
8	-	-	-	-
9	-	-	-	-
10	-	-	-	-
11	1,95 t 1,1	1,98 t 1	-	-
12	-		1,87 t; 3H 1,1	1,90 s -
N-H	5,41 brs	5,45 brs	5,47 br s	5,56 br s
1´	3,13 dd; 2H 6,9; 6,9	3,18 dd 7; 7	3,16 dd 6,5	3,18 dd 7, 7
2´	1,78 m -	1,80 m	1,79 m -	1,81 m -
3´,4´	0,91 d; 6H 6,9	0,93 d 7	0,91 d 6,3	0,93 d 7

4.2.5. Dodeca-2*E*,4*Z*-dien-8,10-diinsäure-isobutylamid (Verbindung A4)



A4

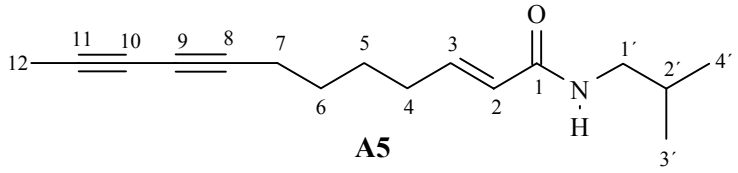
Die Substanz **A4** wurde durch semipräparative HPLC aus der Fraktion XI.3 des Extraktes **E1** als weiße Kristalle isoliert (4 mg). Außerdem fiel sie bei der MPLC-Trennung der Fraktion III des E. atrorubens radix Extraktes **E2** an (14 mg).

A4 wies wie die Verbindungen **A1**/**A2** ein UV-Absorptionsmaximum bei 260 nm auf, was wiederum für eine 2,4-Dienamid-Struktur sprach.

Mit Hilfe des Massenspektrums konnte der Verbindung eine Masse von 243 mit der Summenformel $C_{16}H_{21}NO$ zugeordnet werden. Die typischen Isobutylamidfragmente bestätigten die strukturelle Ähnlichkeit zu den beiden Isobutylamiden **A1**/**A2**. Auch die Massendifferenz von 14 Einheiten ließ vermuten, dass es sich bei **A4** um ein Methylderivat von **A1**/**A2** handeln könnte.

Das ^{1}H-NMR-Spektrum von **A4** zeigte im olefinischen Bereich die gleichen Aufspaltungen und chemischen Verschiebungen wie **A1**, so dass auch dies auf eine 2*E*,4*Z*-dien-Struktur schliessen ließ (siehe Tabelle 4.7). Die durch die Isobutylamidstruktur und durch H_2-6 und H_2-7 verursachten Signale im aliphatischen Bereich waren ebenfalls identisch zu denjenigen von **A1**. Eine Ausnahme stellte das Triplett mit einer Kopplungskonstante von 1,1 Hz bei 1,87 ppm dar, das für 3 Protonen integrierte. Dies ließ auf eine endständige Methylgruppe schließen, die aufgrund der Fernkopplung zu H_2-7 in Nachbarschaft zu zwei konjugierten Acetylengruppen liegen mußte. Damit war belegt, dass **A4** das um eine Methylgruppe reichere Homologe von **A1** darstellte. Die ^{1}H-NMR-Daten von **A4** sind in Tabelle 4.7, Seite 69 aufgeführt. Diese Substanz, Dodeca-2*E*,4*Z*-dien-8,10-diinsäure-isobutylamid **A4**, wurde zum ersten Mal für die Wurzeln von *E. purpurea* beschrieben (REMIGER, 1988). In E. atrorubens radix wurde diese Verbindung hier zum ersten Mal gefunden.

4.2.6. Dodeca-2*E*-en-8,10-diinsäure-isobutylamid (Verbindung A5)



A5

Verbindung **A5** wurde in einer Ausbeute von 8 mg als farblose Kristalle aus Fraktion XI.3 des Extraktes **E1** isoliert.

A5 wies das gleiche UV-Maximum (λ_{max} = 210 nm) wie die Verbindung **A3** auf, was ebenfalls auf eine Monoenamid-Struktur hindeutete.

Die Isobutylamidfragmente und ein um 14 Masseneinheiten höherer Molekülpeak als **A3** (*m/z* 245) im Massenspektrum wiesen darauf hin, dass es sich bei **A5** um das Methylderivat von **A3** handeln könnte.

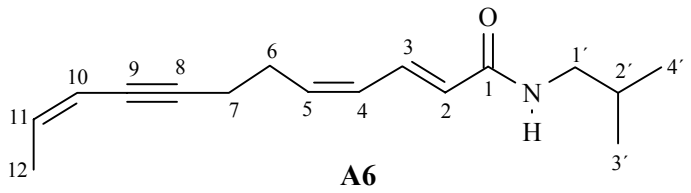
Das ^{1}H-NMR-Spektrum bestätigte dies. Denn beide Spektren waren bis auf das Signal bei 1,89 ppm im Spektrum der Verbindung **A5**, welches durch die endständige Methylgruppe H_3-12 in Nachbarschaft zu einer oder zwei Acetylengruppen verursacht worden sein musste und für 3 Protonen integrierte, identisch. **A5** stellte folglich das Dodeca-2*E*-en-8,10-diinsäure-isobutylamid dar. Die genauen ^{1}H-NMR-Daten sind in Tabelle 4.8 wiedergegeben.

*Tabelle 4.8: ^{1}H-NMR-Daten von **A5** und **A6** (500 MHz, in $CDCl_3$) im Vergleich zu Literaturdaten von REMIGER (1988).*

H	A5			Lit. A5			A6			Lit. A6		
2	5,75	dt	15,1; 1,3	5,79	dt	15; 1	5,83	d	15,1	5,87	d	15
3	6,79	dt	15,1; 6,9	6,83	dt	15; 7	7,52	dd	15,1; 11,3	7,55	dd	15; 11
4	2,17	m; 2H		2,25	m	-	6,14	dd	11,3; 11,3	6,17	dd	11; 11
5	1,54	m; 2H	-	1,62	m	-	5,87	dt	11,3; 6,9	5,88	dt	11; 7
6	1,54	m; 2H	-	1,62	m	-	2,53	dt; 2H	6,9; 6,9	2,57	dt	7; 7
7	2,24	dt; 2H	6,9; 1,1	2,25	m	-	2,43	t ; 2H	6,9	2,47	dt	7; 1
8	-			--			-			-		
9	-			-			-			-		
10	-			-			5,42	dq	10,7; 1,9	5,45	dq	11; 1
11	-			-			5,89	dq	10,7; 6,9	5,90	m	
12	1,89	t; 3H	1,1	1.90	t	1	1,81	dd; 3H	6,9; 1,9	1,84	dd	7; 1
N-H	5,40	brs		5,45	brs	-	5,47	br s	-	5,57	brs	
1´	3,13	dd; 2H	6,9	3,18	dd	7; 7	3,14	dd; 2H	6,9	3,18	dd	7; 7
2´	1,78	m	-	1,80	m	-	1,78	m	-	1,80	m	
3´,4´	0,91	d; 6H	6,9	0,93	d	7	0,91	d; 6H	6,9	0,93	d	7

Diese Verbindung wurde ebenfalls von REMIGER (1988) für *E. angustifolia* beschrieben. In *E. atrorubens* wurde diese Substanz hier zum ersten Mal gefunden.

4.2.7. Dodeca-2*E*,4*Z*,10*Z*-trien-8-insäure-isobutylamid (Verbindung A6)



A6

Die Verbindung **A6** fiel zum einen bei der MPLC-Trennung der Fraktion X.7 des *E. atrorubens*-Extraktes **E1** an, zum anderen wurde **A6** jeweils aus den Fraktionen II.3, II.4 und II.5 mittels MPLC oder semipräparativer HPLC aus dem Extrakt **E2** als farbloses Öl rein gewonnen.

Die Substanz stellt das mengenmäßig am zweitstärksten vertretene Alkamid dar.
Das UV-Spektrum zeigte neben dem UV-Maximum bei 260 nm eine Schulter bei 231 nm und deutete damit auf das Vorhandensein eines zweiten chromophoren Zentrums neben der 2,4-Dienamidstruktur hin (siehe Abbildung 4.18).

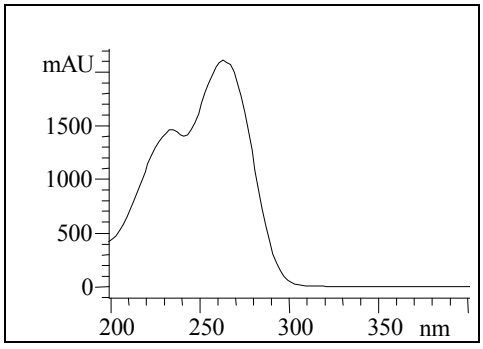


*Abbildung 4.18:UV-Spektrum von **A6***

Das Molekulargewicht von 245 Da, die Summenformel von $C_{16}H_{23}NO$ und eine Isobutylamidstruktur wurde für **A6** aus dem EI-Massenspektrum abgeleitet.

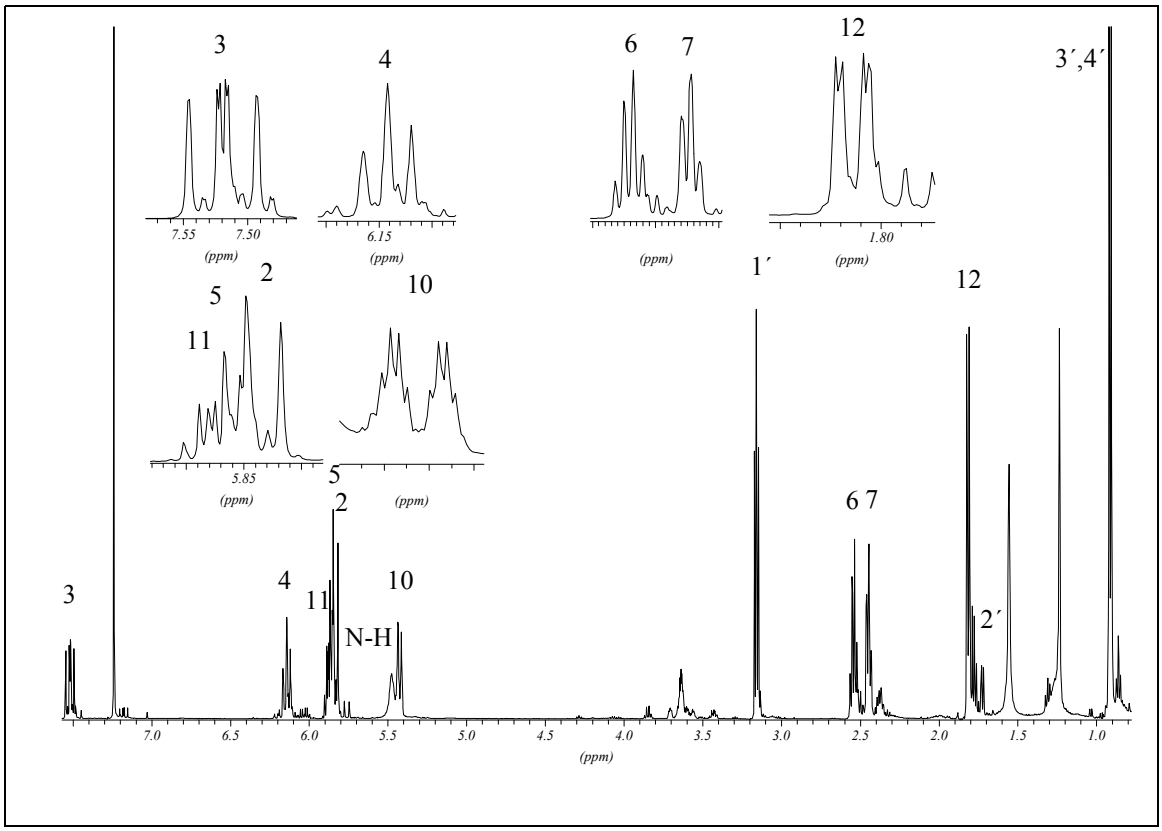


Abbildung 4.19: ^{1}H-NMR-Spektrum von A6 (500 MHz, in $CDCl_3$).

Das ^{1}H-NMR-Spektrum gab weitere Strukturhinweise (siehe Abbildung 4.19). Im olefinischen Bereich integrierten die Signale neben dem breiten Singulett für das Stickstoffproton insgesamt für sechs Protonen, wobei sich H-2, H-5 und H-11 überlappten. Mit Hilfe des ^{1}H,^{1}H-Cosy-Spektrums wurde die Zuordnung zu den einzelnen Signalen jedoch eindeutig (siehe Abbildung 4.20). Entsprechend den vorhergehend beschriebenen 2,4-Dienamiden ließ sich auch aus den Signalen der Protonen 2 und 3 von **A6** eine *trans*-Verknüpfung (J = 15,1 Hz) und aus H-4 und H-5 eine *cis*-Verknüpfung ableiten (J = 11,3 Hz). Wie bei **A1** ist auch hier eine Kopplung von H-5 zu dem Signal bei 2,53 ppm (H_2-6, dt) erkennbar. Die Triplettstruktur von H_2-7 (2,43 ppm) ließ wiederum auf eine benachbarte Acetylengruppe schließen. Im ^{1}H,^{1}H-COSY-Spektrum wurde darüber hinaus eine Fernkopplung von H_2-7 zu dem Dublett eines Quartetts bei 5,42 ppm sichtbar. Dieses Signal konnte H-10 zugeordnet werden, da die Kopplungskonstante von 10,7 Hz die *cis*-Verknüpfung zu H-11 (5,89 ppm, dq) und die Konstante von 1,9 Hz die Allylkopplung zu der terminalen Methylgruppe H_3-12 (1,81 ppm, dd) anzeigte. Im aliphatischen Bereich waren außerdem die Signale der Isobutylamidstruktur erkennbar.

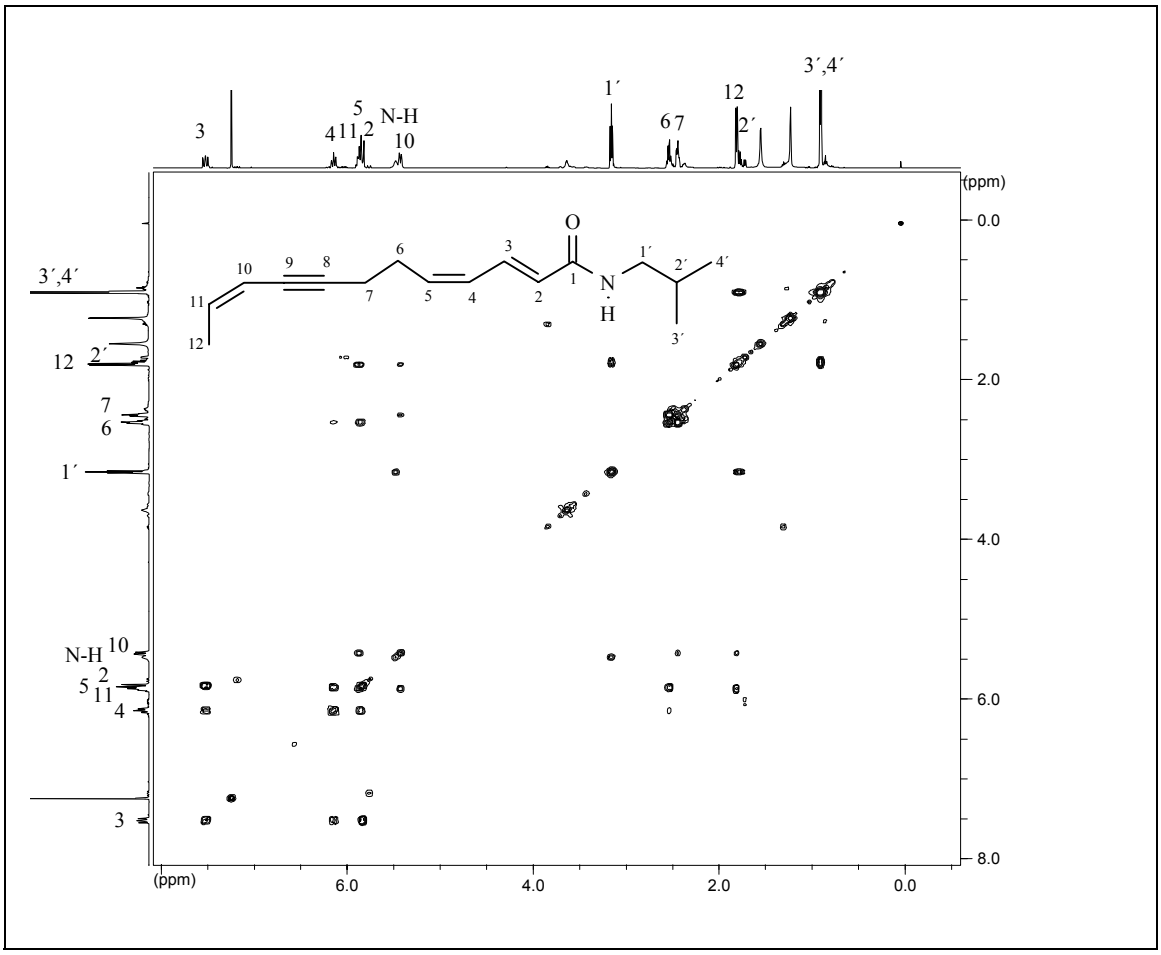
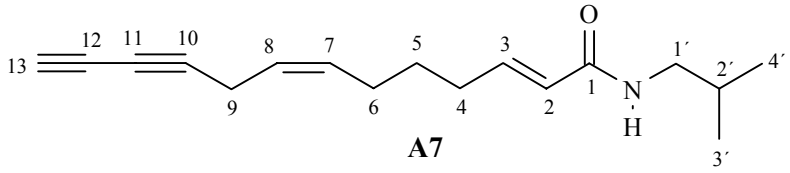


*Abbildung 4.20:^{1}H,^{1}H-Cosy-Spektrum von **A6** (500 MHz, in $CDCl_3$)*

Aus den oben aufgeführten spektroskopischen Daten ließ sich die Verbindung **A6** eindeutig als Dodeca-2*E*,4*Z*,10*Z*-trien-8-insäure-isobutylamid identifizieren. Diese Substanz wurde zum ersten Mal von REMIGER (1988) aus *E. angustifolia* isoliert. Die ermittelten UV-, MS-, und NMR-Daten stimmten mit diesen Literaturwerten überein.

In *E. atrorubens* wurde diese Substanz hier erstmalig gefunden.

4.2.8. Trideca-2*E*,7*Z*-dien-10,12-diinsäure-isobutylamid (Verbindung A7)



A7

Verbindung **A7** wurde aus Fraktion XI.3 des Extraktes **E1** mittels semipräparativer HPLC mit einer Ausbeute von 8 mg als farbloses Öl isoliert.

Das UV-Spektrum (siehe Abbildung 4.21) glich den Spektren der Monoenamide, jedoch war das Maximum geringfügig hypsochrom verschoben (λ_{max} = 210 nm). Dies ließ eine Abweichung der Struktur zu den bisherigen Monoenamiden vermuten.

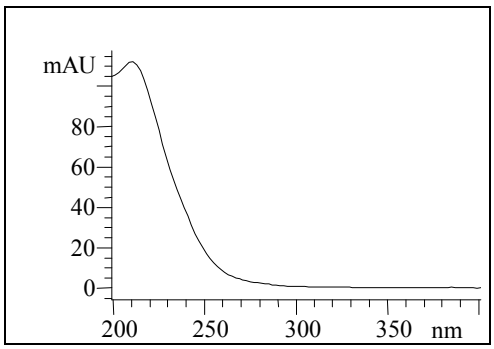


*Abbildung 4.21: UV-Spektrum von **A7***

Das EI-Massenspektrum lieferte einen Molekülpeak bei *m/z* 257 ($C_{17}H_{23}NO$) und die typischen Isobutylamidfragmente.

Im tiefen Feld des ^{1}H-NMR-Spektrums traten drei Signalgruppen auf, die durch vier olefinische Protonen und durch das Stickstoffproton verursacht wurden (siehe Abbildung 4.22). Das Dublett von H-2 (5,76 ppm) koppelte mit dem Dublett eines Tripletts von H-3 (6,79 ppm) mit einer Konstante von 15,1 Hz und zeigte so die *trans*-Stellung der Doppelbindung an. Durch die Aufspaltung von H-3 zum Dublett vom Triplett (J = 15,1; 6,9) war eine weitere Doppelbindung zwischen H_2-4 und H_2-5 ausgeschlossen. Mit Hilfe des ^{1}H,^{1}H-COSY-Spektrums konnten die weiteren Signale den restlichen Protonen zugeordnet werden (siehe Abbildung 4.23).

H_2-4 trat ebenfalls als Dublett vom Triplett bei einer chemischen Verschiebung von 2,17 ppm auf (J = 6,9 Hz). Dieses Signal besaß darüber hinaus eine Dublett-Unterstruktur mit einer Kopplungskonstante von 1,4 Hz und zeigte damit die Allylkopplung zu H-2 an. Eine vicinale Kopplung von H_2-4 führte zu dem Signal bei 1,53 ppm, welches folglich durch H_2-5 verursacht wurde. Das Signal von H_2-5 wies

weiterhin einen Crosspeak zu dem Dublett eines Tripletts von H_2-6 bei 2,04 ppm auf. Die Tieffeldverschiebung der Methylengruppe sprach bereits für eine Verknüpfung mit einer olefinischen Teilstruktur.

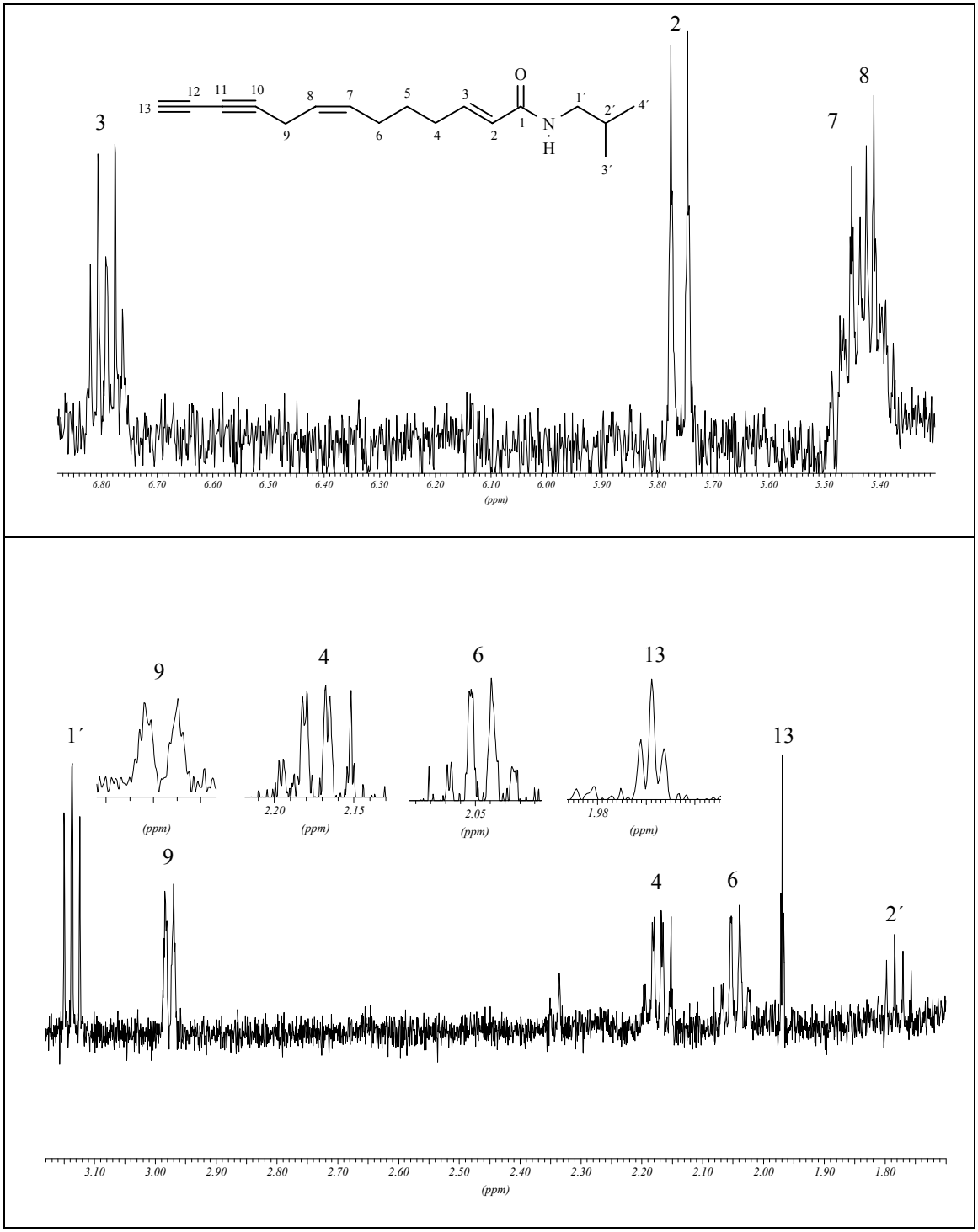


*Abbildung 4.22: ^{1}H-NMR-Spektrum von **A7** (500 MHz, $CDCl_3$)*

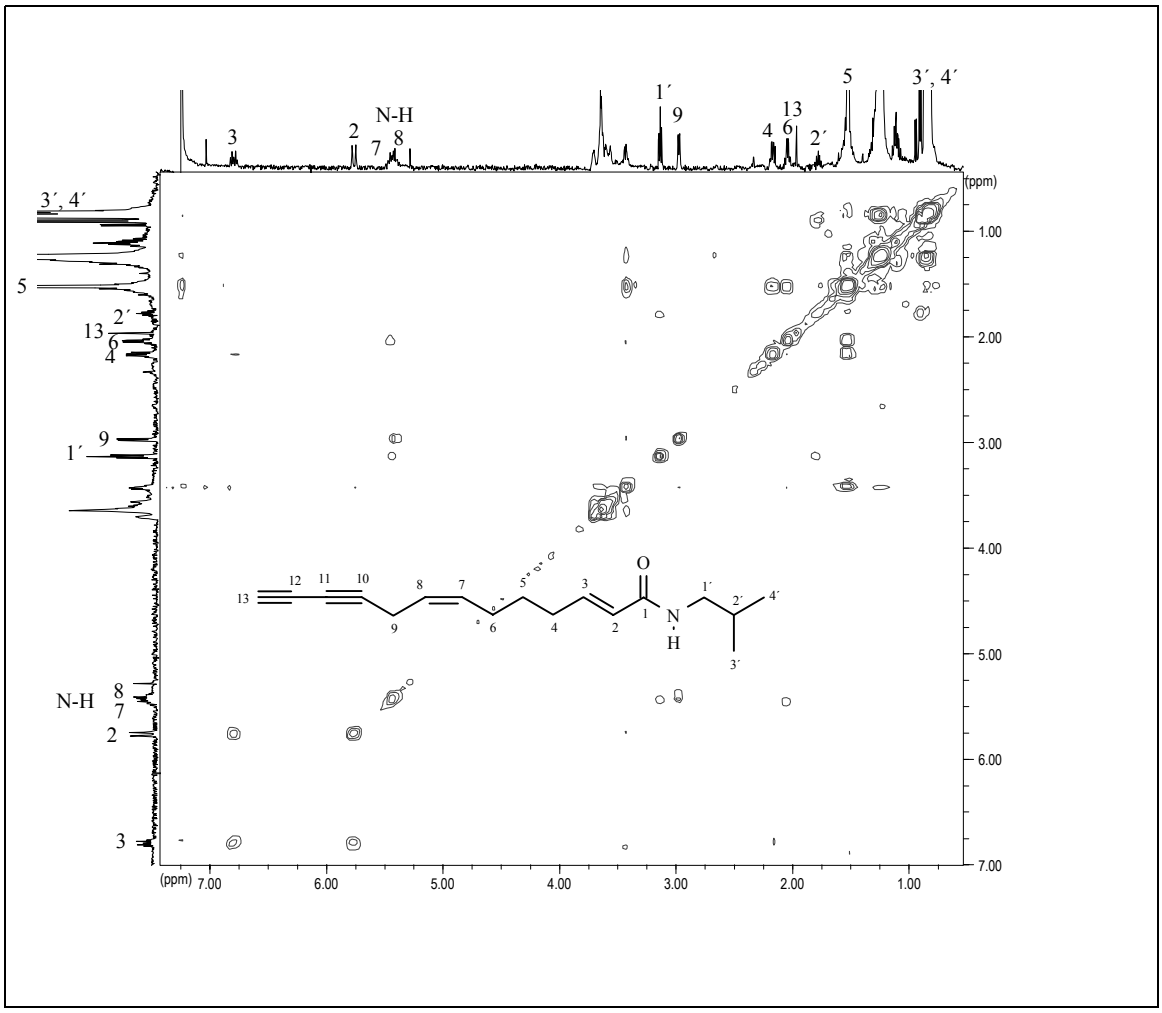


*Abbildung 4.23: $^{1}H,^{1}H$-Cosy-Spektrum von **A7** (500 MHz; $CDCl_3$)*

So war im $^{1}H,^{1}H$-COSY-Spektrum auch eine Kopplung zu dem olefinischen Proton von H-7 bei 5,44 ppm zu erkennen (siehe Abbildung 4.23). Dies wies auf eine *cis*-Verknüpfung zu H-8 bei 5,41 ppm hin (J = 11,3 Hz). H-8 koppelte weiterhin mit dem Dublett von H_2-9 bei 2,98 ppm (J = 6,9 Hz), welches außerdem Fernkopplungen einging. Die Aufspaltung und der starke Tieffeldshift deuteten die Nachbarschaft zu einer oder zwei konjugierter Acetylengruppen an. Das Triplett des endständigen acetylenischen Protons bei 1,97 ppm zeigte mit der Kopplungskonstante von 1,3 Hz die Fernkopplung zu H_2-9 an und konnte so die Anwesenheit der Acetylengruppen belegen. Aufgrund der Massenzahl von 257 konnte auf zwei konjugierte Acetylengruppen geschlossen werden. Tabelle 4.9 gibt die genauen ^{1}H-NMR-Daten wieder.

Mit Hilfe der oben aufgeführten spektroskopischen Daten konnte die Struktur von **A7** eindeutig als Trideca-2*E*,7*Z*-dien-10,12-diinsäure-isobutylamid aufgeklärt werden.

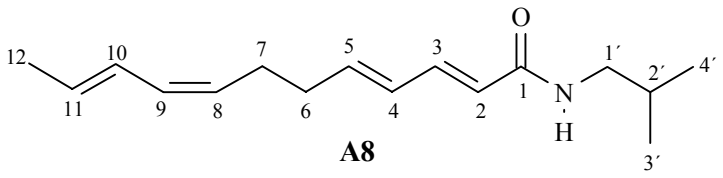
Diese Verbindung wurde bereits von BOHLMANN und HOFFMANN aus *Echinacea purpurea* isoliert (1983). Die ermittelten spektroskopischen Werte stimmten mit den Literaturdaten überein.

Für *E. atrorubens* wurde die Substanz hier zum ersten Mal belegt.

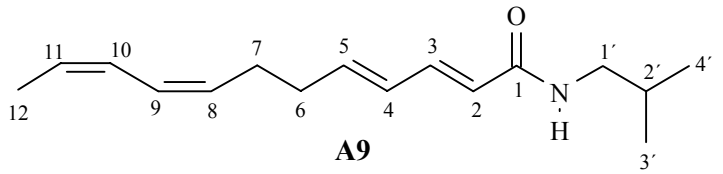
Tabelle 4.9: ^{1}H-NMR-Daten von A7 (500 MHz, in $CDCl_3$) im Vergleich zu Literaturdaten von REMIGER (1988).

H	A7			Literatur A7		
2	5,76	d	15,1	5,79	d	15
3	6,79	dt	15,1; 6,9	6,81	dt	15; 7
4	2,17	dt	6,9; 6,9	2,19	dt	7; 7
5	1,53	m	-	1,55	m	-
6	2,04	dt	6,9; 6,9	2,06	dt	7; 7
7	5,44	dt	11,3; 6,9	5,49	dt	11; 7
8	5,41	dt	11,3; 6,9	5,43	dt	11;7
9	2,98	m		3,00	d	6
10	-	m		-		
11	-	m		-		
12	-			-		
13	1,97	t	1,3	1,99	s	
N-H	5,43	br s	-	5,50	brs	-
1´	3,14	dd	6,5	3,16	dd	7; 7
2´	1,78	m	6,5	1,81	m	-
3´,4´	0,91	d	6,3	0,92	d	7

4.2.9. Dodeca-2*E*,4*E*,8*Z*,10*Z*/*E*-tetraensäure-isobutylamide (Verbindungen A8/9)



A8



A9

Die Verbindungen **A8/A9** stellen die Hauptalkamide in den Wurzeln von *E. atrorubens* dar. Im HPLC-Chromatogramm lieferten sie zwei nicht vollständig getrennte Peaks im Verhältnis 1:1, die auch nicht durch eine Verlängerung des HPLC-Fließmittelgradienten oder durch isokratische Trennung in reiner Form erhalten werden konnten. Die Substanzen **A8/9** wurden mittels MPLC in einer Ausbeute von 170 mg aus der Fraktion X.7 des Extraktes **E1** isoliert.

In der ersten Vakuumsäulentrennung des Extraktes **E2** fielen die Alkamide **A8/9** in den Fraktionen II und III an, sowie auch aus nahezu allen Fraktionen der darauffolgenden Vakuumsäulen-, MPLC- oder semipräparativen HPLC-Trennungen (ca. 350 mg). Die Substanzen kristallisierten in *n-Hexan* bereits bei 4 °C als weiße Nadeln aus.

Das während des HPLC-Laufs aufgenommene UV-Spektrum zeigte ein UV-Maximum bei 260 nm und eine Schulter bei 231 nm, die eine stärkere Absorption aufwies als Verbindung **A6** (siehe Abbildung 4.24).

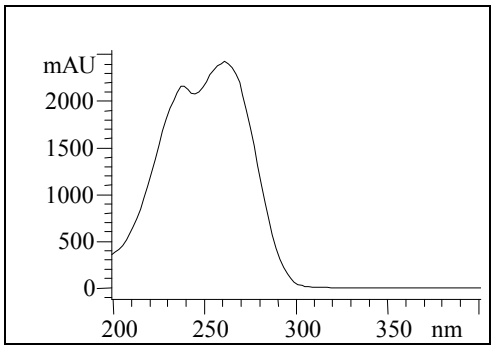


*Abbildung 4.24: UV-Spektrum von **A8/9***

Das GC-EI-Massenspektrum lieferte ebenfalls zwei nur ansatzweise getrennte Signale mit derselben Masse (247 Da) und dem gleichen Fragmentierungsmuster, die auf eine Summenformel von $C_{16}H_{25}NO$ schließen ließen. Auffällig waren hierbei neben den

typischen Isobutylamidfragmenten, zum einen der Basispeak bei 81 Da und zum anderen ein Fragment bei *m/z* 167. Das UV- und Massenspektrum stimmte exakt mit demjenigen der Dodeca-2E,4E,8Z,10Z/E-tetraensäure-isobutylamide überein, die in den Wurzeln von *E. purpurea* und *E. angustifolia* und im Kraut der drei medizinisch eingesetzten *Echinacea*-Arten die Hauptinhaltsstoffe darstellen (siehe Kapitel 2.2.1). Die Fragmente im Massenspektrum bei *m/z* 167 und 81 entstehen danach aus der begünstigten doppelten Allylspaltung zwischen C-6 und C-7 (REMIGER, 1988).

Im ^{1}H-NMR-Spektrum erschienen alle Signale mit den für die Dodeca-2E,4E,8Z,10Z/E-tetraensäure-isobutylamide zu erwartenden chemischen Verschiebungen und Intensitäten (REMIGER, 1988, siehe Abbildung 4.25).

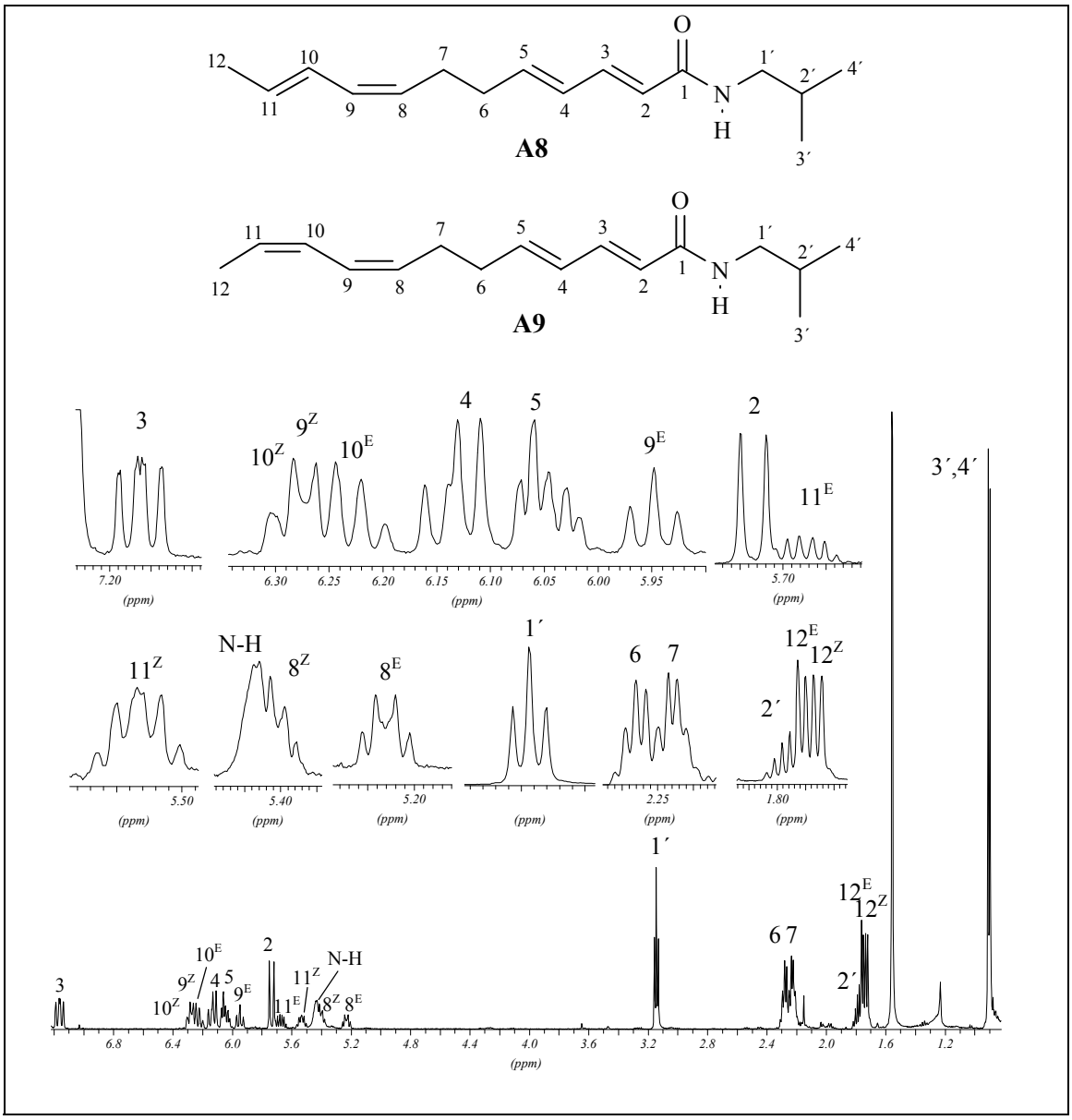


*Abbildung 4.25: ^{1}H-NMR-Spektrum von **A8/A9** (500 MHz, in $CDCl_3$).*

So waren im olefinischen Bereich 10 komplexe Signalgruppen zu erkennen, die aufgrund ihrer Integrale teilweise von beiden Isomeren und teilweise nur von einer der beiden Verbindungen stammen konnten.

Mit Hilfe des $^{1}H,^{1}H$-COSY-Spektrums konnten die Signale den einzelnen Protonen zugeordnet werden (siehe Abbildung 4.26). Dabei wurde deutlich, dass sich die Protonen 1-7 beider Verbindungen identisch verhielten wohingegen sich die Protonen 8-12 unterschieden. Neben der 2,4-Dienamidstruktur, die jeweils *trans* konfiguriert war, musste sich also ein weiteres konjugiertes Doppelbindungssystem mit abweichender Konfiguration im hinteren Teil des Moleküls befinden. So wurde mit Hilfe des $^{1}H,^{1}H$-COSY- und ^{1}H-NMR-Spektrums in beiden Verbindungen eine *trans*-Doppelbindung zwischen H-8 und H-9 und eine weitere Doppelbindung zwischen H-10 und H-11, die einmal *cis*- (J = 10,1 Hz) und einmal *trans*- (J = 15,1 Hz) konfiguriert war, festgestellt. Tabelle 4.10 gibt die detaillierten ^{1}H-NMR-Daten der Verbindungen **A8/9** wieder.

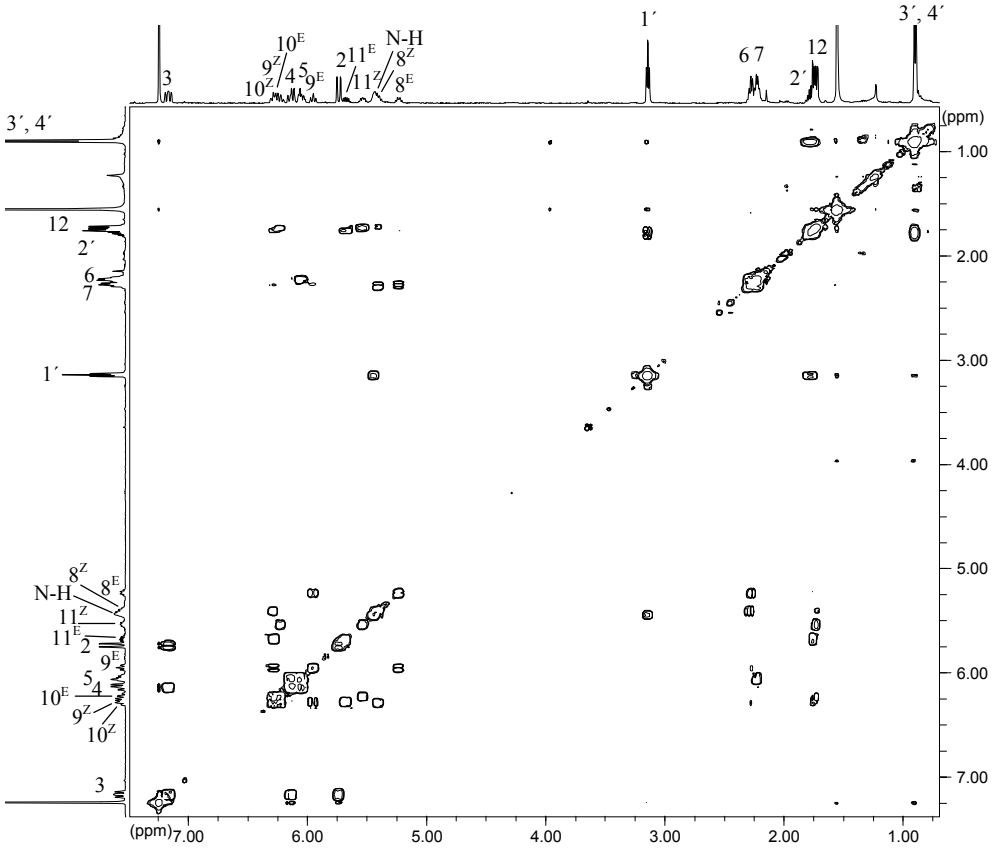


*Abbildung 4.26: $^{1}H,^{1}H$-COSY-Spektrum von **A8/A9** (500 MHz, in $CDCl_3$).*

Aufgrund der spektroskopischen Daten konnten **A8/A9** damit zweifelsfrei als die isomeren Dodeca-2*E*,4*E*,8*Z*,10*Z*/*E*-tetraensäure-isobutylamide identifiziert werden. Die Verbindungen sind erstmals von BOHLMANN und GRENZ (1966) in *Echinacea*-Arten

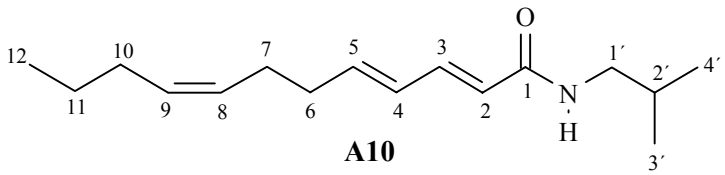
nachgewiesen worden. Die Stereochemie wurde jedoch erst von REMIGER (1988) aufgeklärt, der die Substanzen aus den Wurzeln von *E. angustifolia* und *E. purpurea* isolierte.

In *E. atrorubens* wurden die Dodeca-2*E*,4*E*,8*Z*,10*Z/E*-tetraensäure-isobutylamide zum ersten Mal nachgewiesen.

Tabelle 4.10: *^{1}H-NMR-Daten von **A8/9** (500 MHz, in $CDCl_3$) im Vergleich zu Literaturdaten von REMIGER (1988) .*

H	A8 (10E-Isomer)			Literatur A8			A9 (10Z-Isomer)			Literatur A9		
2	5,73	d	15,1	5,76	d	15	5,73	d	15,1	5,76	d	15
3	7,16	dd	15,1; 11,3	7,18	dd	15; 10	7,16	dd	15,1; 11,3	7,18	dd	15; 10
4	6,13	dd	15,1; 11,3	6,17	dd	15; 11	6,13	dd	15,1; 11,3	6,17	dd	15; 11
5	6,05	dt	-	6,10	dt	15;7	6,05	dt	-	6,10	dt	15;7
6	2,27	m; 2H	-	2,28	m		2,27	m; 2H	-	2,28	m	
7	2,23	m; 2H	-	2,28	m		2,23	m; 2H	-	2,28	m	
8	5,23	dt	11,3; 6,9	5,25	dt	11; 7	5,39	dt	10,7; 6,9	5,43	dt	11; 7
9	5,95	dd	11,3; 11,3	5,97	dd	11; 11	6,27	dd	11,3; 10,7	6,30	dd	11; 11
10	6,24	dd	15,1; 11,3	6,32	dd	15; 11	6,30	dd	11,3; 11,3	6,26	dd	11; 7
11	5,67	dq	15,1; 6,9	5,69	m	-	5,53	dq	11,3; 6,9	5,55	m	-
12	1,76	d; 3H	6,9	1,76	dd	7; 1	1,73	d; 3H	6,9	1,75	dd	7; 1
N-H	5,44	brs		5,50	brs	-	5,44	brs		5,50	brs	-
1´	3,14	dd	6,9; 6,9	3,16	dd	7; 7	3,14	dd	6,9; 6,9	3,16	dd	7; 7
2´	1,78	m		1,76	m	-	1,78	m		1,76	m	-
3´,4´	0,89	d	6,9	0,92	d	7	0,89	d	6,9	0,92	d	7

4.2.10. Dodeca-2*E*,4*E*,8*Z*-triensäure-isobutylamid (Verbindung A10)



A10

Die Substanz **A10** wurde zum einen aus der Fraktion IX des Extraktes **E1** gewonnen, zum anderen wurde sie aus der Fraktion II.2.2 mittels semipräparativer HPLC und aus der Teilfraktion II.3.6 des Extraktes **E2** mittels MPLC als farbloses Öl isoliert.

Das UV-Maximum von **A10** lag wie bei Alkamid **A1/2** und **A4** bei 260 nm und zeigte damit eine 2,4-Dienamidstruktur an.

Das EI-Massenspektrum sprach für eine Molekülmasse von 249 Da und enthielt wiederum die typischen Fragmente der Isobutylamidbruchstücke. Daraus ließ sich eine Summenformel von $C_{16}H_{27}NO$ ableiten, was ein Dihydroderivat von **A8/9** vermuten ließ.

Im ^{1}H-NMR-Spektrum von **A10** waren die Signale für H-2, 3, 4 und 5 identisch mit denen der Alkamide **A8/9** (siehe Abbildung 4.27).

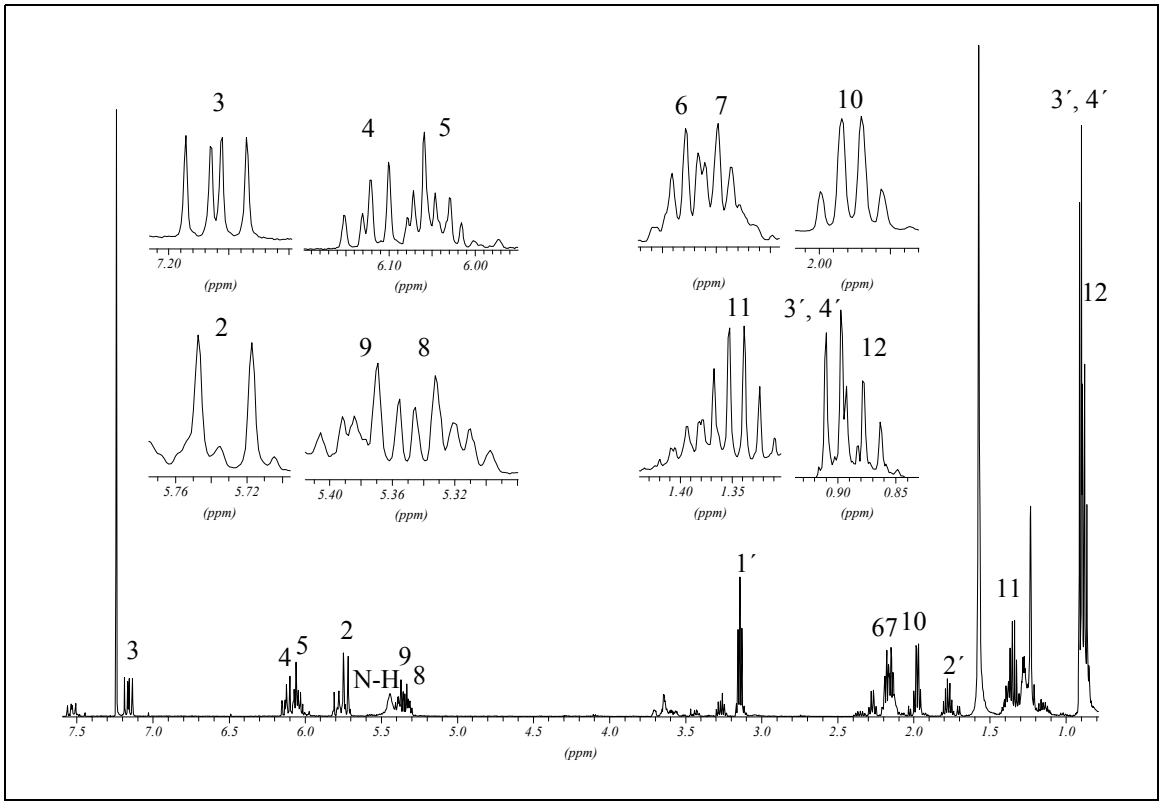


*Abbildung 4.27: ^{1}H-NMR-Spektrum von **A10** (500 MHz, in $CDCl_3$).*

Die 2,4-Dienstruktur lag somit auch bei **A10** *trans*,*trans*-konfiguriert vor. Außerdem war im olefinischen Bereich ein komplexeres Signal, das für 2 Protonen integrierte, zu erkennen, was für eine weitere isolierte Doppelbindung in dem Molekül sprach. Mit Hilfe des ^{1}H,^{1}H-COSY-Spektrums konnte die Lage der Doppelbindung eindeutig festgelegt werden (siehe Abbildung 4.28).

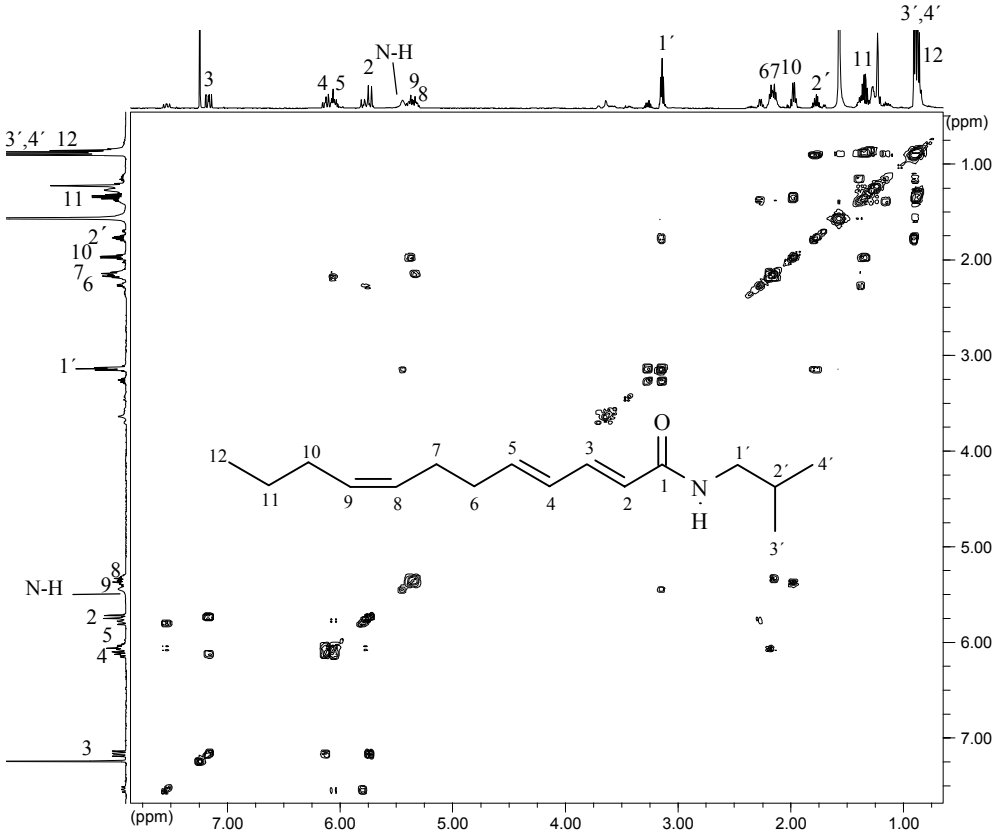


Abbildung 4.28: ^{1}*H,*^{1}*H-COSY-Spektrum von Verbindung* ***A10*** *(500 MHz, in* $CDCl_3$*).*

Wie bei Verbindung **A8/9** führte ein Crosspeak von H_2-5 zu dem Signal von H_2-6 bei 2,15 ppm. Zwischen H_2-7 und H-8 bei 5,34 ppm war ebenfalls ein Kreuzsignal sichtbar. Folglich lag die isolierte Doppelbindung zwischen H-8 und H-9. Aus dem Signal der beiden Protonen ließ sich eine Kopplungskonstante von 11,3 Hz errechnen, die auf eine *cis*-Verknüpfung schließen ließ. Das Signal von H-9 zeigte im ^{1}H,^{1}H-COSY-Spektrum eine Kopplung zu dem Methylenproton H_2-10 bei 1,98 ppm (dt). Im höheren Feld erschien das benachbarte H_2-11 (1,35 ppm, m) und die endständige Methylgruppe H-12 (0,87, t). Außerdem waren die charakteristischen Isobutylamidsignale sichtbar. Die genauen ^{1}H-NMR-Daten sind in Tabelle 4.11 wiedergegeben.

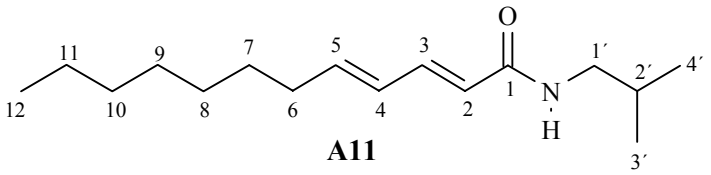
Nach Auswertung dieser spektralen Daten wurde **A10** zweifelsfrei als Dodeca-2*E*,4*E*,8*Z*-triensäure-isobutylamid identifiziert. Die Verbindung **A10** wurde bereits von REMIGER (1988) aus *E. purpurea* isoliert.

Für *E. atrorubens* wurde sie zum ersten Mal beschrieben.

Tabelle 4.11: *^{1}H-NMR-Daten von **A10** und **A11** (500 MHz, in $CDCl_3$) im Vergleich zu Literaturdaten von REMIGER (1988).*

H	A10			Literatur A10			A11			Literatur A11		
2	5,73	d	15,1	5,76	d	15	5,73	d	15,1	5,75	d	15
3	7,16	dd	15,1; 10,4	7,19	dd	15; 10	7,17	dd	15,1; 11,3	7,19	dd	15; 11
4	6,13	dd	15,1; 10,4	6,15	dd	15; 11	6,12	dd	15,1; 11,3	6,13	dd	15; 11
5	6,05	dt	15,1; 6,3	6,10	dt	15; 7	6,06	dt	15,1; 6,3	6,06	dt	15; 7
6	2,15	m; 2H		2,18	m		2,12	dt; 2H	6,3; 6,3	2,14	dt	7; 7
7	2,17	m; 2H		2,18	m		1,39	m; 2H		1,26	m	
8	5,34	dt	11,3; 6,9	5,35	m		1,26	m; 2H		1,26	m	
9	5,38	dt	11,3, 6,9	5,35	m		1,26	m; 2H		1,26	m	
10	1,98	dt; 2H	6,9; 6,9	2,00	dt	7; 7	1,26	m; 2H		1,26	m	
11	1,35	m; 2H		1,37	m		1,26	m; 2H		1,26	m	
12	0,87	t; 3H	6,9	0,90	t	7	0,88	t; 3H	6,9	0,88	t	7
N-H	5,44	brs	-	5,50	brs		5,35	br s		5,55	brs	
1´	3,14	dd; 2H	6,3; 6,3	3,17	dd	7; 7	3,15	dd; 2H	6,3; 6,3	3,16	dd	7; 7
2´	1,78	m	6,3; 63	1,78	m		1,77	m		1,80	m	
3´, 4´	0,90	d; 6H	6,3	0,92	d	7	0,90	d; 6H	6,3	0,93	d	7

4.2.11. Dodeca-2*E*,4*E*-diensäure-isobutylamid (Verbindung A11)



A11

A11 konnte neben **A10** aus der Fraktion IX des Extraktes **E1** und aus den Fraktionen II.2.2 und II.3.6 des Extraktes **E2** mittels semipräparativer HPLC und MPLC als weiße Nadeln gewonnen werden.

Im HPLC-Chromatogramm erschien **A11** nach den anderen bisher genannten Alkamiden bei einer Retentionszeit von 16,4 min. Dies deutete bereits auf eine lipophilere Struktur hin.

Das UV-Spektrum mit einem λ_{max} von 260 nm glich den anderen 2,4-Dienamiden.
Im EI-Massenspektrum erschien der Molekülpeak bei *m/z* 251 und es traten die typischen Isobutylamidfragmente auf ($C_{16}H_{29}NO$). Die Masse von 251 Da ließ vermuten, dass **A11** ein Dihydroderivat der Verbindung **A10** darstellen könnte und so zwei Doppelbindungen weniger aufwies als die Alkamide **A8/9**.

Im ^{1}H-NMR-Spektrum waren im olefinischen Bereich neben dem breiten Singulett des Stickstoffprotons drei weitere Signalgruppen erkennbar, deren chemische Verschiebungen, Multiplizitäten und Kopplungskonstanten identisch waren mit den Signalen der Protonen 2-4 der Alkamide **A8/9** und **A10** (siehe Abbildung 4.29). Demzufolge stellte auch Substanz **A11** ein 2*E*,4*E*-Dienamid dar. Die weiteren Protonen kamen im höheren Feld zur Resonanz. So konnte mit Hilfe des ^{1}H-NMR-Spektrums und ^{1}H,^{1}H-COSY-Spektrums das Dublett vom Triplett von H_2-6 bei 2,12 ppm (dt, 2H), das Signal von H_2-7 bei 1,39 ppm, das Multiplett von H_2-8-H_2-11 bei 1,26 ppm (8H) und das Triplett der terminalen Methylgruppe H_3-12 bei 0,88 ppm festgelegt werden (siehe Tabelle 4.11).

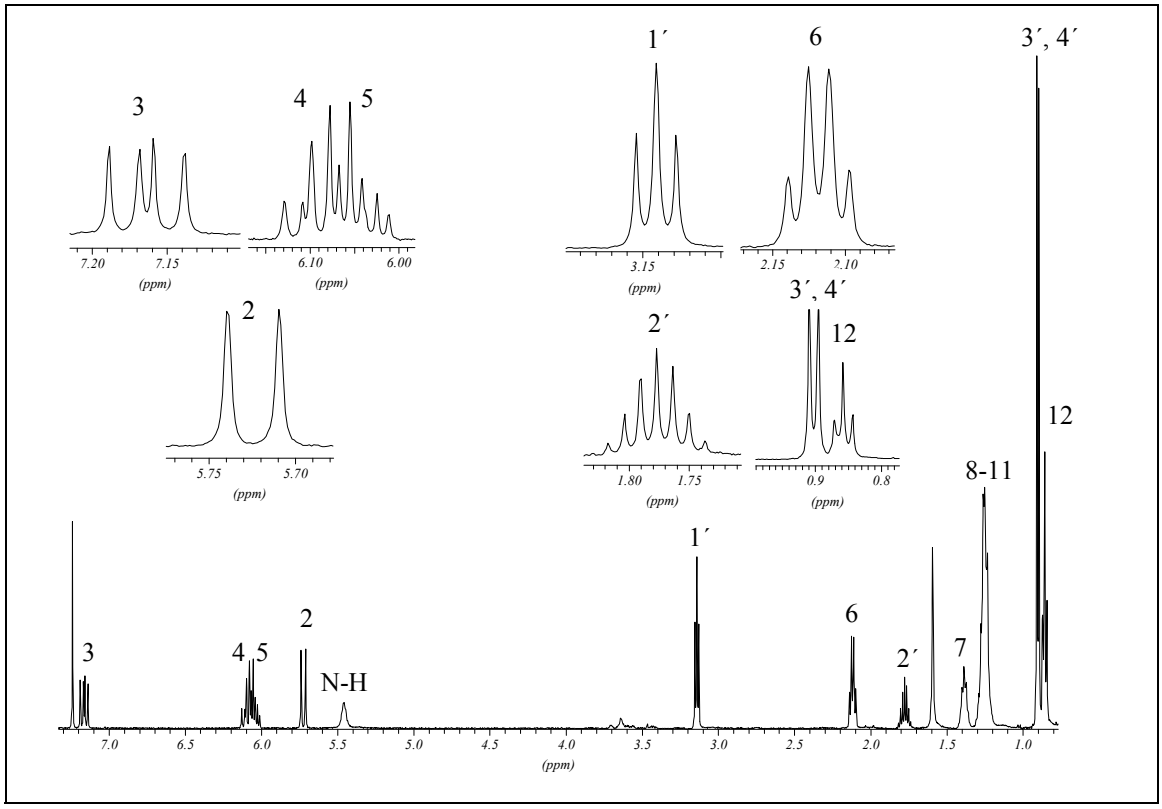


*Abbildung 4.29: ^{1}H-NMR-Spektrum von **A11** (500 MHz, in $CDCl_3$).*

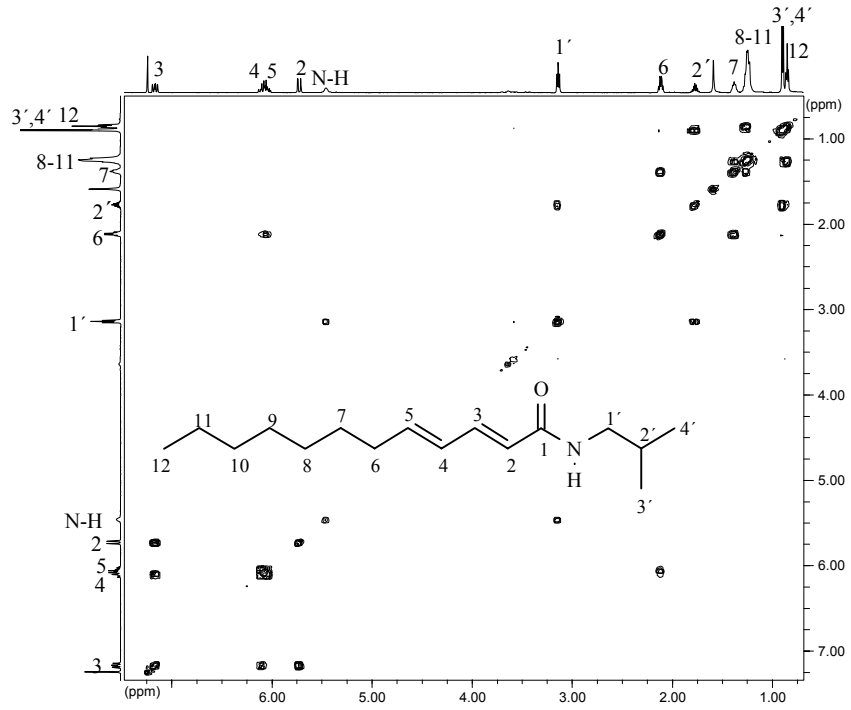
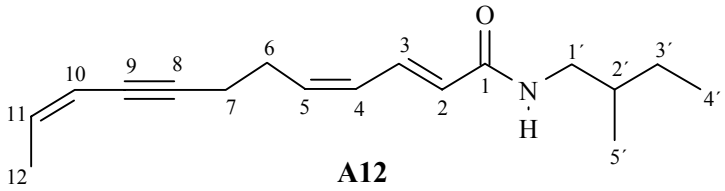


*Abbildung 4.30:^{1}H,^{1}H-COSY-Spektrum von Verbindung **A11** (500 MHz, in $CDCl_3$).*

Die Struktur von **A11** konnte damit eindeutig als Dodeca-2*E*,4*E*-diensäure-isobutylamid identifiziert werden. Diese Verbindung wurde zum ersten Mal aus Pfefferarten isoliert (DHAR, 1973) und konnte später auch in *Echinacea*-Arten nachgewiesen werden (VERELIS, 1978; REMIGER, 1988). In den Literatur-NMR-Daten (REMIGER, 1988), die an einem 360 MHz Spektrometer aufgenommen wurden, kamen jedoch die Protonen H_2-7 bis H_2-11 gemeinsam bei 1,26 ppm zur Resonanz. Da die obengenannten Werte an einem 500 MHz-Spektrometer gemessen worden sind, wurde das Signal von H_2-7-H_2-11 in ein Signal für H_2-7 bei 1,39 ppm und in ein Multiplett für die Protonen 8-11 bei 1,26 ppm aufgespalten. Die weiteren ermittelten spektroskopischen Ergebnisse stimmten mit den Literaturdaten überein (siehe Tabelle 4.11).

Für *E. atrorubens* wurde diese Substanz noch nicht beschrieben.

4.2.12. Dodeca-2*E*,4*Z*,10*Z*-trien-8-insäure-2-methylbutylamid (Verbindung A12)



A12

Da die Substanz **A12** nahezu identische Retentionszeiten im HPLC-Chromatogramm zeigte wie die Isobutylamide **A8/9**, war eine semipräparative HPLC-Trennung notwendig, um die Verbindung **A12** aus Fraktion II.3.4 und II.4.2 des Extraktes **E2** isolieren zu können. So wurden insgesamt 53 mg **A12** als farbloses Öl gewonnen.

Das UV-Spektrum, das identisch war mit der Verbindung **A6**, wies ein Maximum bei 260 nm und eine Schulter bei 235 nm auf, so dass auf ein Dienamid mit einem weiteren chromophoren Zentrum geschlossen werden konnte.

Im EI-Massenspektrum wurde ein Molekülpeak von 259 Da sichtbar (siehe Abbildung 4.31). Die ungerade Massenzahl wies auf einen Aminteil im Molekül hin, die charakteristischen Isobutylamidbruchstücke fehlten jedoch. Stattdessen waren Fragmente bei *m/z* 258 $[M-H]^+$, 244 $[M-Me]^+$, 230 $[M-C_2H_5]^+$, 202 $[M-C_4H_9]^+$, 188 $[M-C_5H_{11}]^+$, 173 $[M-C_5H_{12}N]^+$ und ein besonders intensives bei 145 $[M-C_6H_{12}NO]^+$ zu erkennen. Die Massendifferenzen von [M-29], [M-57], [M-71], [M-86] und [M–114] sind typisch für das Vorliegen einer 2-Methylbutylamid-Gruppierung (REMIGER, 1988). Die weiteren Fragmente zeigten sehr große Ähnlichkeit zu dem Fragmentierungsmuster der Verbindung **A6**.

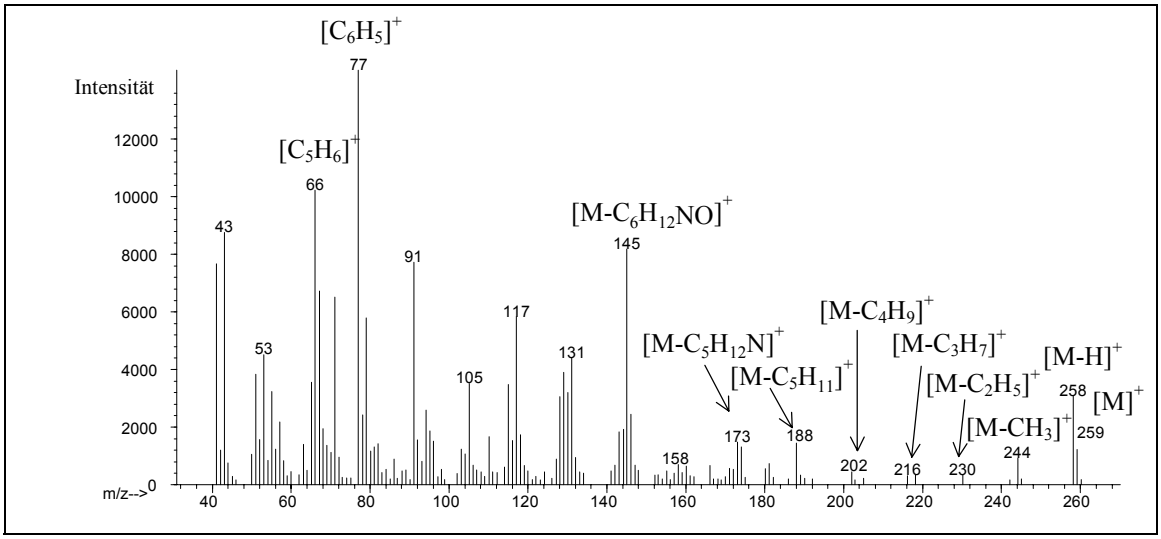


*Abbildung 4.31:GC-EI-Massenspektrum von **A12** (GC2).*

Das ^{1}H-NMR-Spektrum bestätigte die Annahme, dass es sich um ein 2-Methylbutylamid handelte (siehe Abbildung 4.32), denn das Resonanzsignal der beiden Methylenprotonen H_2-1′ wurde in zwei symmetrische Multipletts bei 3,27 und 3,15 ppm aufgespalten, was bei 2-Methylbutylamiden durch die Nachbarschaft des asymmetrischen C-Atoms C-2′ verursacht wird. Im ^{1}H,^{1}H-COSY-Spektrum war die Korrelation zwischen dem Multiplett von H-2′ bei 1,55 ppm und den beiden Signalen der H_2-1′-Methylengruppen eindeutig erkennbar (siehe Abbildung 4.33). Durch die Nachbarschaft zum chiralen C-2′-Atom konnte weiterhin eine Aufspaltung des Signals von H_2-3′ in zwei Multipletts bei 1,39 und 1,15 ppm erklärt werden. Die endständigen Methylgruppen, H_3-4′ und H_3-5′, kamen gemeinsam bei 0,89 ppm einmal als Triplett und einmal als Dublett zur Resonanz.

Die Signale der Säuregruppierung waren identisch mit denjenigen der Verbindung **A6**. So waren im olefinischen Bereich sechs Signalgruppen, die für insgesamt 6 Protonen integrierten, erkennbar. Nach Zuordnung der Signale mit Hilfe des ^{1}H,^{1}H-COSY-Spektrums konnte wie bei **A6** für die 2,4-Dienamid-Struktur eine 2/3-*trans*-, 4/5-*cis*-Konfiguration und für die isolierte Doppelbindung zwischen C-10 und C-11 eine *cis*-Konfiguration nachgewiesen werden. C-8 und C-9 mußten durch eine Dreifachbindung verknüpft sein, da sich H_2-7 nur zu einem Triplett und H-10 zu einem Dublett mit Quartett-Unterstruktur aufspaltete.

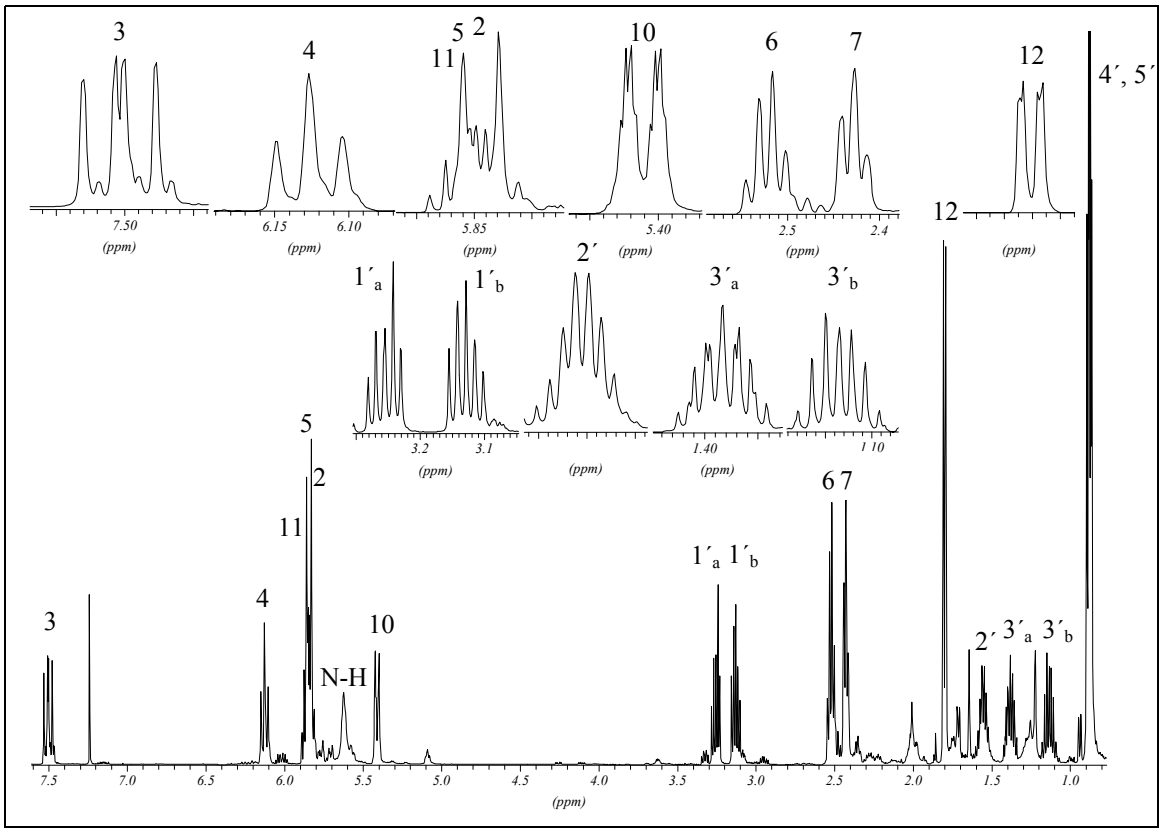


*Abbildung 4.32: ^{1}H-NMR-Spektrum von **A12** (500 MHz, in $CDCl_3$).*

Außerdem war im $^{1}H,^{1}H$-COSY-Spektrum wie bei **A6** eine Korrelation zwischen H_2-7 und H-10 sichtbar.

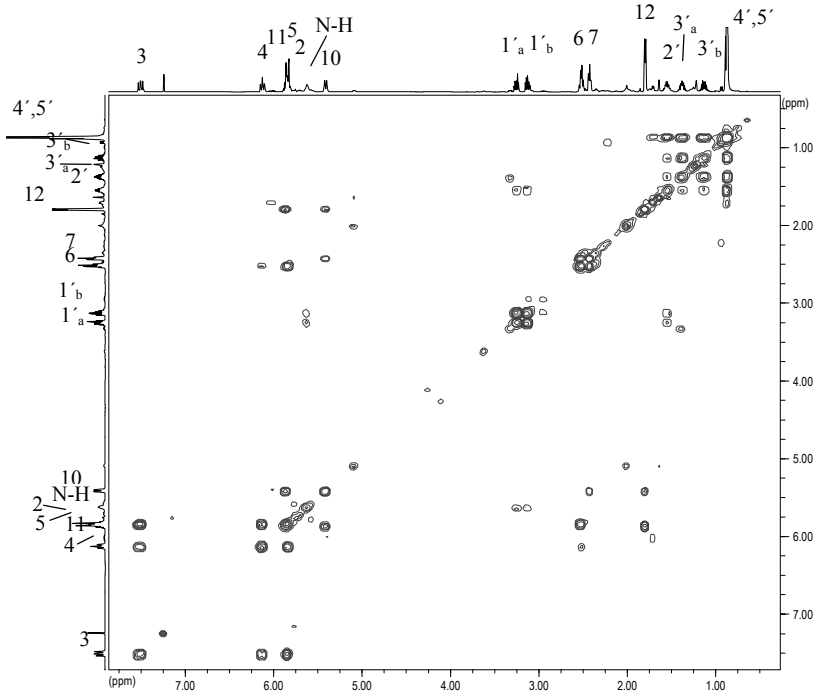


*Abbildung 4.33: $^{1}H,^{1}H$-COSY-Spektrum von **A12** (500 MHz, in $CDCl_3$).*

Die ^{13}C-NMR-Daten bestätigten die bisherigen Ergebnisse (siehe Abbildung 4.34).

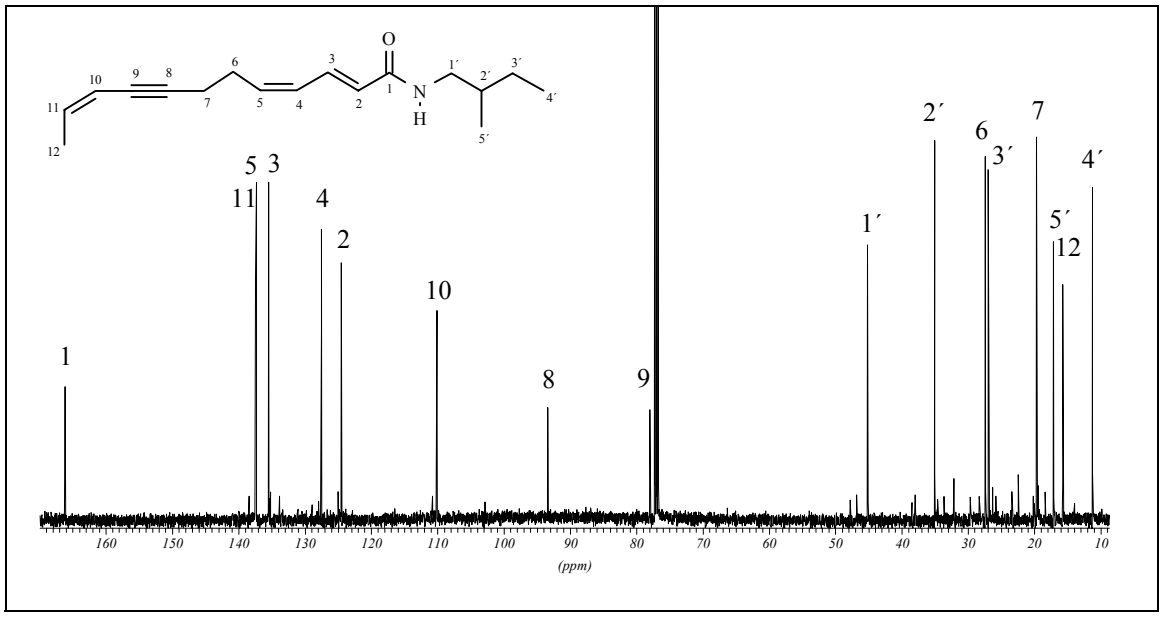


*Abbildung 4.34: ^{13}C-NMR-Spektrum von **A12** (125 MHz, $CDCl_3$).*

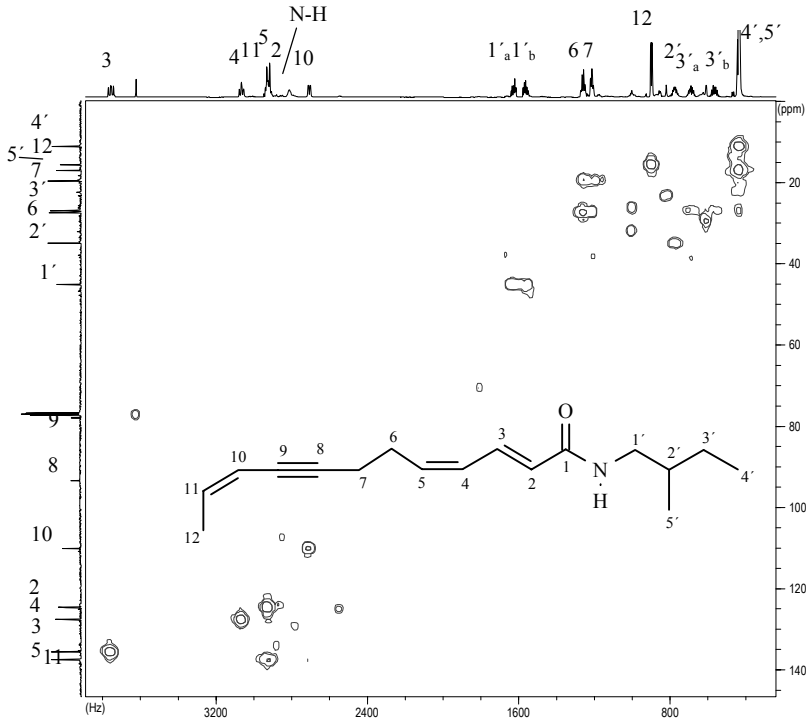


*Abbildung 4.35:HMQC-Spektrum von **A12** (500 MHz bzw. 125 Mhz, in $CDCl_3$).*

Wie es für Ketoamide üblich ist, kam C-1 bei 166,2 ppm zur Resonanz. Mit Hilfe des HMQC-Spektrums konnten die sp^2-C-Atome den vier Signalen zwischen 110 und 140 ppm zugeordnet werden (siehe Abbildung 4.35 und Tabelle 4.12). Das *sp*-hybridisierte C-Atom-9 kam durch den abschirmenden Einfluss der olefinischen Bindung weiter im Hochfeld bei 78,0 ppm zur Resonanz als C-8. Dieses Kohlenstoffatom wurde durch die Doppelbindung und durch das sp^3-C-Atom-7 entschirmt, so dass das Signal von C-8 weiter im Tieffeld bei 93,4 ppm erschien (STOTHERS, 1972).

Im aliphatischen Bereich waren neben den beiden Signalen der Methylen-C-Atome, C-6 (27,5 ppm) und C-7 (19,7 ppm), das Signal der terminalen Methylgruppe der Säurekette C-12 (15,7 ppm) und die Signale der C-Atome der 2-Methylbutylamid-Gruppierung sichtbar. Wie es für an Stickstoffgebundene C-Atome charakteristich ist, erschien das Signal von C-1´ relativ weit tieffeldverschoben bei 45,2 ppm, das von C-2´ bei 35,0 ppm und von C-3´ bei 27,0 ppm. Die Signale der endständigen Methylgruppen waren wie erwartet sehr weit im Hochfeld bei 11,2 ppm (C-4´) und bei 17,1 ppm (C-5´) zu erkennen.

Die spezifische Drehung von **A12** wurde mit $[\alpha]_D^{20} = -11\,°$ (c = 0,1; Ethanol p.a.) bestimmt. Eine definitive Aussage über die absolute Konfiguration der asymmetrischen Zentren an C-2´ kann jedoch nicht gemacht werden.

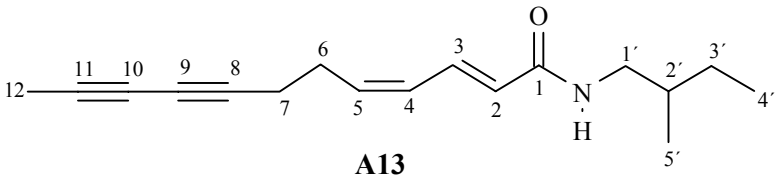
Nach Auswertung der spektralen Daten konnte zweifelsfrei festgestellt werden, dass es sich bei **A12** um das Dodeca-2*E*,4*Z*,10*Z*-trien-8-insäure-2-methylbutylamid handelt.

Die Verbindung ist bisher noch nicht nachgewiesen worden und stellt damit einen neuen Naturstoff dar.

*Tabelle 4.12: ^{1}H- und ^{13}C-NMR-Daten von **A12** (500/125 MHz, in $CDCl_3$).*

H/C	^{1}H-NMR			^{13}C-NMR
1	-			166,2
2	5,83	d	15,1	124,6
3	7,52	dd	15,1; 11,0	135,5
4	6,14	dd	11,0; 11,0	127,5
5	5,85	dt	11,0; 6,9	137,4
6	2,53	dt; 2H	6,9; 6,9	27,5
7	2,44	t; 2H	6,9	19,7
8	-			78,0
9	-			93,4
10	5,42	dd	10,7; 1,9	110,1
11	5,87	dq	10,7; 6,9	137,5
12	1,81	dd; 3H	6,9; 1,9	15,7
N-H	5,63	brs		
1´a	3,27	m	6,3; 6,3	45,2
1´b	3,15	m	6,3; 6,3	
2´	1,55	m		35,0
3´a	1,39	m		27,0
3´b	1,15	m		
4´	0,89	t ; 3H	6,3	11,2
5´	0,89	d; 3H	6,3	17,1

4.2.13. Dodeca-2*E*,4*Z*-dien-8,10-diinsäure-2-methylbutylamid (Verbindung A13)



A13

Die Substanz **A13** wurde mittels semipräparativer HPLC aus Fraktion II.5.2. mit einer Ausbeute von 4 mg als weiße Kristalle isoliert.

Das UV-Spektrum war das eines Dienamids mit einem UV-Absorptionsmaximum bei 260 nm.

Das GC-EI-Massenspektrum zeigte einen Molekülpeak bei *m/z* 257 und die für 2-Methylbutylamide charakteristischen Bruchstücke. Weiterhin erschien ein Fragment bei *m/z* 128, was durch die Abspaltung der 2-Methylbutylamid-Gruppierung ([M-$C_6H_{12}NO]^+$) und einer terminalen Methylgruppe entstanden sein konnte.

Im ^{1}H-NMR-Spektrum waren im aliphatischen Bereich die charakteristischen Signale der 2-Methylbutylamid-Teilstruktur erkennbar (siehe Abbildung 4.36).

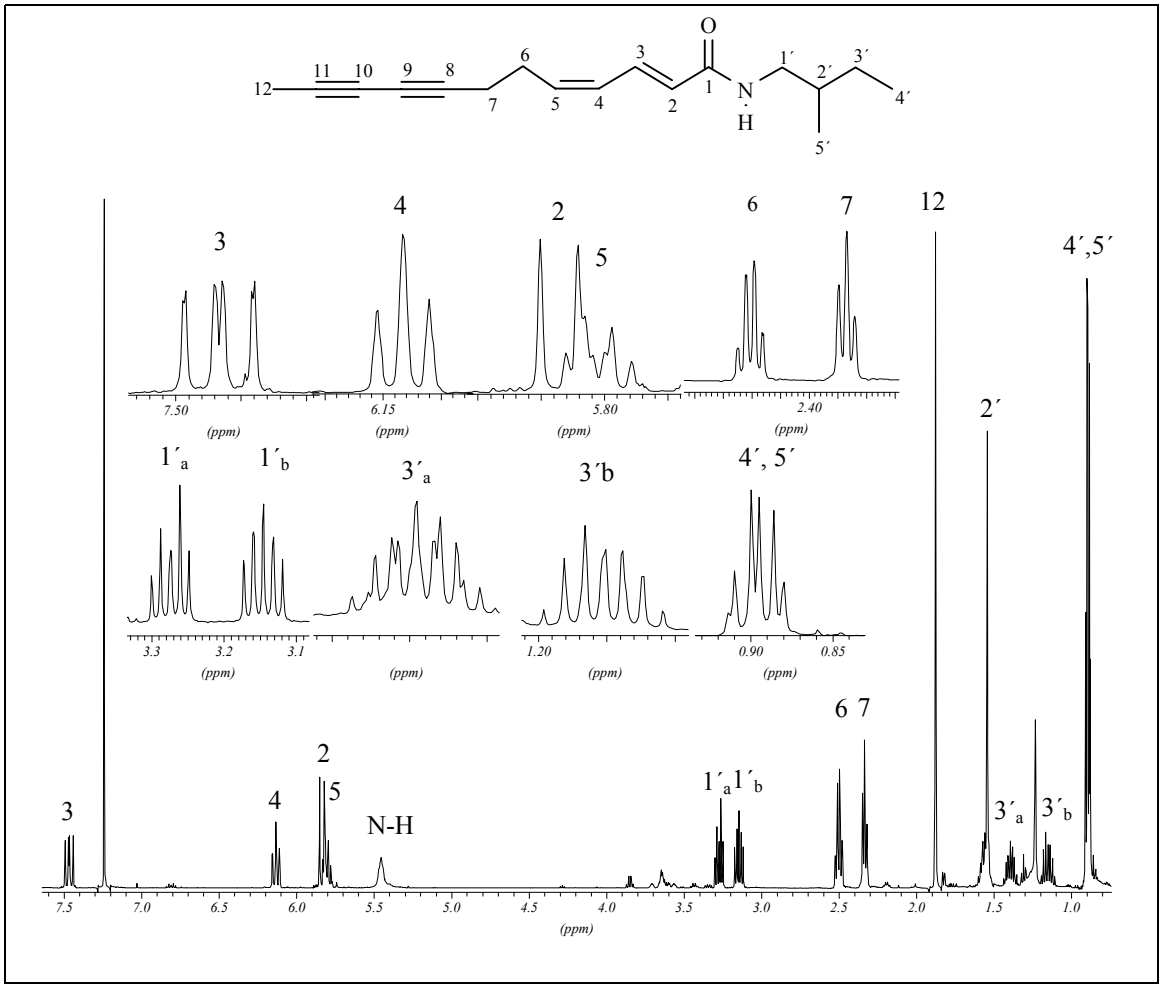


*Abbildung 4.36: ^{1}H-NMR-Spektrum von **A13** (500 MHz, in $CDCl_3$).*

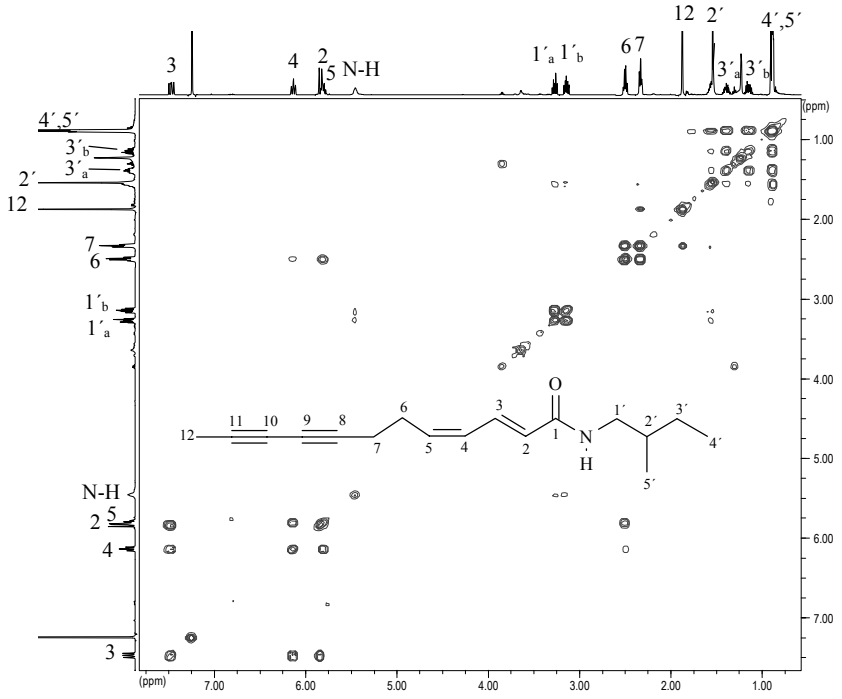


*Abbildung 4.37: $^{1}H,^{1}H$-COSY-Spektrum von **A13** (500 MHz, in $CDCl_3$).*

Im olefinischen Bereich waren vier Signale sichtbar, die durch die H-Atome 2-4 verursacht wurden. Die jeweiligen Kopplungskonstanten ließen auf eine 2*E*,4*Z*-Konfiguration schließen. Die übrigen H-Atome konnten mit Hilfe des $^{1}H,^{1}H$-COSY-Spektrums den zugehörigen Signalen zugeordnet werden (siehe Abbildung 4.37). Durch die Aufspaltung der Methylengruppe H_2-7 und weiterhin durch das für 3 H-Atome integrierende Singulett bei 1,9 ppm (H_3-12) konnte auf eine Dreifachbindung zwischen C8/C9 und C10/C11 geschlossen werden. Folglich handelte es sich hierbei um die gleiche Säuregruppierung wie bei **A4**.

Das ^{13}C-NMR-Spektrum bestätigte diese Annahmen. Im aliphatischen Bereich erschienen die Signale der 2-Methylbutylamid-Kohlenstoffe neben dem C-12 der Säuregruppierung. Im acetylenischen Bereich waren entsprechend die vier *sp*-hybridisierten C-Atome zwischen 60 und 80 ppm zu erkennen. Die vier Signale der olefinischen C-Atome waren im Bereich von 120 –140 ppm sichtbar. Das Carbonyl-Kohlenstoff war im zu erwartenden Bereich bei 166,5 ppm zu sehen (siehe Tabelle 4.13).

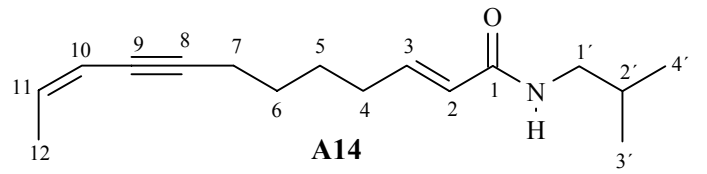
*Tabelle 4.13: ^{1}H- und ^{13}C-NMR-Daten von **A13** (500/125 MHz, in $CDCl_3$).*

H/C	^{1}H-NMR [ppm]			^{13}C-NMR [ppm]	Literatur ^{1}H-NMR		
1	-			166,2			
2	5,83	d	15,1	124,7	5,90	d	15
3	7,47	dd	15,1; 11,0	135,3	7,48	dd	15; 11
4	6,13	dd	11,0; 11,0	127,9	6,15	dd	11; 11
5	5,81	dt	11,0; 6,9	137,0	5,82	dt	11; 8
6	2,50	dt; 2H	6,9; 6,9	27,0	2,52	dt	7; 7
7	2,33	t; 2H	6,9	19,4	2,35	t	7
8	-			73,5	-		
9	-			66,2	-		
10	-			64,4	-		
11	-			75,5	-		
12	1,9	s; 3H		4,2	1,90	t	1
N-H	5,45	brs			5,71	br s	
1´a	3,27	m	6,3; 6,3	45,2	3,23	m	
1´b	3,15	m	6,3; 6,9				
2´	1,57	m		35,1	1,58	m	
3´a	1,39	m		26,86	1,41	m	
3´b	1,15	m			1,17	m	
4´	0,90	t ; 3H	6,3	11,3	0,92	t	7
5´	0,90	d; 3H	6,3	17,3	0,92	d	7

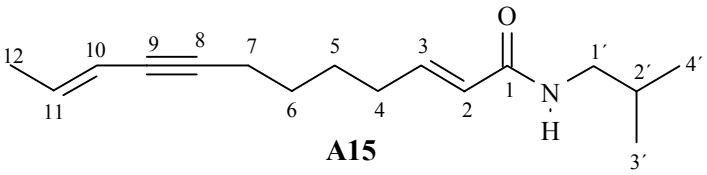
Nach Auswertung der oben aufgeführten Daten konnte zweifelsfrei festgestellt werden, dass es sich bei Verbindung **A13** um Dodeca-2*E*,4*Z*-dien-8,10-diinsäure-2-methylbutyl-amid handelte. Die Verbindung wurde von REMIGER (1988) bereits in *E. purpurea* nachgewiesen.

Für *E. atrorubens* stellt diese Substanz einen neuen Inhaltsstoff dar.
^{13}C-NMR Daten waren bisher für diese Verbindung nicht beschrieben.

4.2.14. Dodeca-2*E*,10*E*/*Z*-dien-8-insäure-isobutylamide (Verbindungen A14/15)



A14



A15

Die Verbindungen **A14/15** fielen in zwei verschiedenen Fraktionen des Extraktes **E2** als weiße Kristalle an. Zum einen konnte mittels semipräparativer HPLC aus Fraktion II.5.2 vor allem **A14** neben einem geringen Anteil von **A15** isoliert werden (3 mg), zum anderen wurden bei der semipräparativen HPLC-Trennung der Fraktion III.1 die nicht mehr weiter aufzutrennenden Substanzen **A14** und **A15** zusammen isoliert (13 mg).

Das UV-Spektrum beider Verbindungen wies ein Maximum bei 210 nm auf und zeigte so eine 2-Monoenamidstruktur an.

Im Massenspektrum erschien der Molekülpeak bei *m/z* 247. Damit stellten beide Substanzen Strukturisomere von **A8/9** mit der Summenformel $C_{16}H_{25}NO$ dar. Das Fragmentierungsmuster zeigte die charakteristischen Isobutylamidfragmente bei *m/z* 232, 204, 192, 175 und 147 (Basispeak).

Die Isobutylamid-Teilstruktur beider Isomere wurde durch das Protonen-NMR-Spektrum abgesichert. Wie Abbildung 4.38 zeigt, erschienen im aliphatischen Bereich die charakteristischen Signale der Isobutylamid-Gruppierung. Die Integration der weiteren Signale machte deutlich, dass einige Signale beider Verbindungen getrennt waren, während andere offensichtlich vollständig überlappten.

Die Analyse des $^1H,^1H$-COSY-Spektrums ergab, dass beide Verbindungen vergleichbare Spinsysteme aufwiesen (siehe Abbildung 4.39). Bei der mengenmäßig dominierenden Komponente **A14** zeigte die terminale Methylgruppe H_3-12 (1,83 ppm, dd) eine Kopplung zu H-11 (5,87 ppm, dq), das seinerseits mit H-10 koppelte (5,44 ppm, dq). Aufgrund der Größe der Kopplungskonstante zwischen H-10 und H-11 (11,3 Hz) musste diese Doppelbindung in *Z*-Konfiguration vorliegen. H-10 zeigte weiterhin eine Fernkopplung durch die Dreifachbindung zu H_2-7, wie durch Vergleich mit dem $^1H,^1H$-COSY-Spektren der Alkamide **A6** und **A12** belegt werden konnte.

Bei der Nebenkomponente **A15** ergaben sich analog Kopplungen zwischen H_3-12 (1,73 ppm, dd), H-11 (6,03 ppm, dq) und H-10 (5,45 ppm, m), nur dass hier die

Kopplungskonstante zwischen H-10 und H-11 15,7 Hz betrug. Somit unterschied sich **A15** von der Hauptkomponente **A14** nur durch die *E*-Konfiguration der terminalen Doppelbindung.

Die verbleibende Substruktur von H-2-H_2-7 zeigte für beide Isomere eine sehr gute Übereinstimmung mit den entsprechenden Signalen von Verbindung **A3** (siehe Kapitel 4.2.4). Eine genaue Analyse des ^{1}H,^{1}H-COSY-Spektrums ermöglichte es zum Teil, bei geringen Unterschieden in der chemischen Verschiebung, die entsprechenden Signale aufgrund ihrer Integrale und des identischen Kopplungsmusters den Verbindungen **A14** bzw. **A15** zuzuordnen (siehe Tabelle 4.14 und Abbildung 4.38).

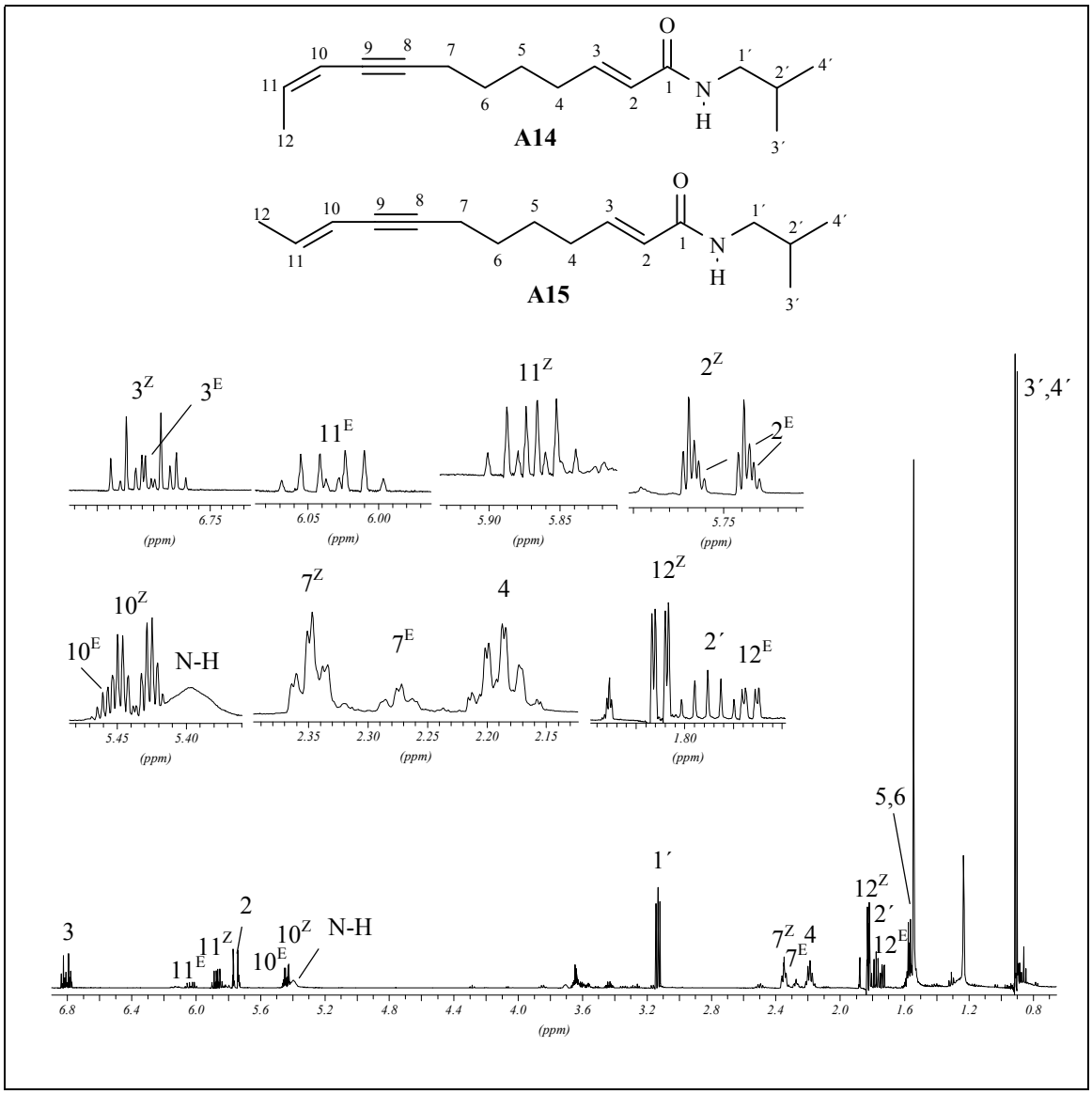


*Abbildung 4.38:^{1}H-NMR-Spektrum von **A14/15** (500 MHz, in $CDCl_3$); Z = Z-Isomer **A14**; E = E-Isomer **A15***

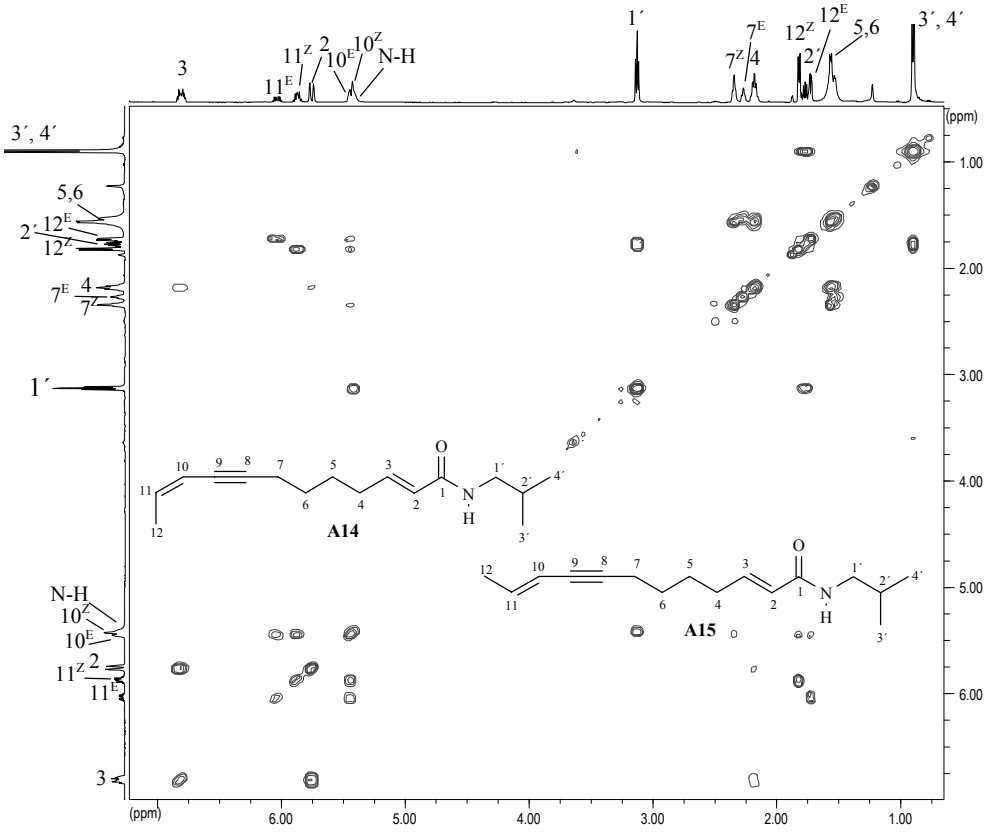


Abbildung 4.39: ^{1}*H,*^{1}*H-COSY-Spektrum von* ***A14/15*** *(500 MHz, in* $CDCl_3$*); Z = Z-Isomer* ***A14****; E = E-Isomer* ***A15***

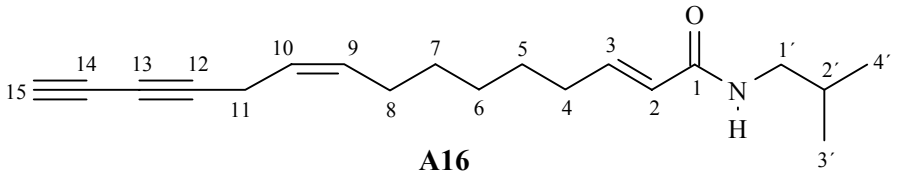
Mit Hilfe der oben aufgeführten spektroskopischen Daten wurden die beiden isomeren Verbindungen **A14** und **A15** eindeutig als Dodeca-2*E*,10*Z*,*E*-dien-8-insäure-isobutyl-amide identifiziert, wobei **A14** das mengenmäßig dominierende Isomer darstellte (3,5:1-1,5:1). Dies könnte daraufhin deuten, dass mit der Zeit, wie bei Verbindung **A1/2**, die *cis*- in die stabilere *trans*-Form **A15** isomerisiert.

Sowohl **A14** als auch **A15** wurden bisher nicht beschrieben und stellen somit neue Naturstoffe dar.

*Tabelle 4.14: ^{1}H-NMR-Daten von **A14** und **A15** (500 MHz, in $CDCl_3$).*

H	A14 (10*Z*-Isomer)			A15 (10*E*-Isomer)		
1	-			-		
2	5,76	dt	15,1; 1,3	5,76	dt	15,1; 1,3
3	6,81	dt	15,1; 6,9	6,81	dt	15,1; 6,9
4	2,18	dt; 2H	6,9; 1,3	2,18	dt; 2H	6,9; 1,3
5	1,55	m; 2H	-	1,55	m; 2H	-
6	1,55	m; 2H	-	1,55	m; 2H	-
7	2,35	td; 2H	6,9; 1,3	2,28	td; 2H	6,9; 1,3
8	-			-		
9	-			-		
10	5,44	dq	11,3; 1,3	5,45	m	15,7; 1,3
11	5,87	dq	11,3; 6,9	6,03	dq	15,7; 6,9
12	1,83	dd; 3H	6,9; 1,3	1,73	dd; 3H	6,9; 1,3
N-H	5,41	brs		5,41	brs	
1´	3,14	dd; 2H	6,9; 6,9	3,14	dd; 2H	6,9; 6,9
2´	1,78	m		1,78	m	
3´, 4´	0,90	d; 6H		0,90	d; 6H	

4.2.15. Pentadeca-2*E*,9*Z*-dien-12,14-diinsäure-isobutylamid (Verbindung A16)



A16

Mittels MPLC konnte **A16** aus Fraktion III des Extraktes **E2** mit einer Ausbeute von 28 mg als farbloses Öl isoliert werden.

Das UV-Spektrum unterschied sich von den bisherigen identifizierten Alkamiden, da das Maximum bei 199 nm lag und bei 211 nm eine Schulter auftrat (siehe Abbildung 4.40).

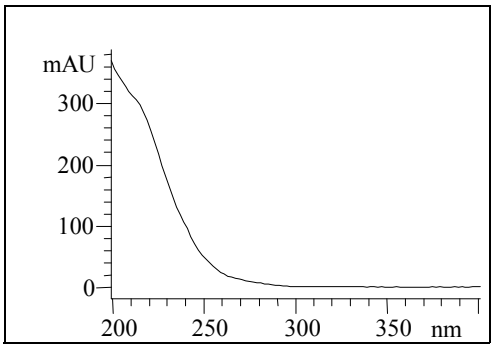


*Abbildung 4.40:UV-Maximum von **A16***

Da das Spektrum Ähnlichkeiten zu **A7** zeigte, war anzunehmen, dass **A16** ebenfalls ein 2-Monoenamid darstellen würde, welches höchstens im hinteren Teil der Säuregruppierung eine isolierte Doppelbindung aufweisen konnte.

Im GC-EI-Massenspektrum wurde der Molekülpeak bei *m/z* 285 beobachtet. Außerdem traten die charakteristischen Isobutylamidfragmente bei *m/z* 270, 242, 213 und 185 auf, wodurch auf eine Summenformel von $C_{19}H_{27}NO$ geschlossen werden konnte.

Das ^{1}H-NMR-Spektrum bestätigte das Vorliegen eines Isobutylamids (siehe Abbildung 4.41). Die Signale von H-2-H_2-4 entsprachen denen des Alkamids **A7**, so dass auch bei **A16** eine *trans*-konfigurierte Doppelbindung zwischen H-2 (5,74 ppm) und H-3 (6,80 ppm) vorliegen mußte. Das restliche Signalmuster zeigte ebenfalls große Ähnlichkeit mit demjenigen von **A7**, zusätzlich konnte im aliphatischen Bereich jedoch noch ein für vier Protonen integrierendes Multiplett beobachtet werden. Dies und die Massenzahl von 285 deuteten daraufhin, dass **A16** über zwei zusätzliche Methylengruppen verfügen mußte.

Durch das ^{1}H,^{1}H-COSY-Spektrum gelang eine genaue Zuordnung der Signale (siehe Abbildung 4.42). Danach kamen im aliphatischen Bereich H_2-4 bei 2,15 ppm (dtd), H_2-5 bei 1,43 ppm (tt), H_2-6/7 bei 1,33 ppm (m) und H_2-8 bei 2,01 ppm (dt) zur Resonanz. Anhand des Kreuzsignals von H_2-8 zu H-9 im olefinischen Bereich bei 5,37 ppm (dtt), konnte die isolierte Doppelbindung zwischen H-9 und H-10 lokalisiert werden. Die Kopplungskonstante von 10,6 Hz belegte die *cis*-Konfiguration. Von H-10 (5,48 ppm, dtt) führte ein weiterer Crosspeak in den aliphatischen Bereich zum Signal von H_2-11 (2,98 ppm, dd). Dieses zeigte im hochaufgelösten Spektrum eine Fernkopplung durch die Dreifachbindungen zu dem endständigen acetylenischen H-15 (1,96 ppm, t, J = 1,2).

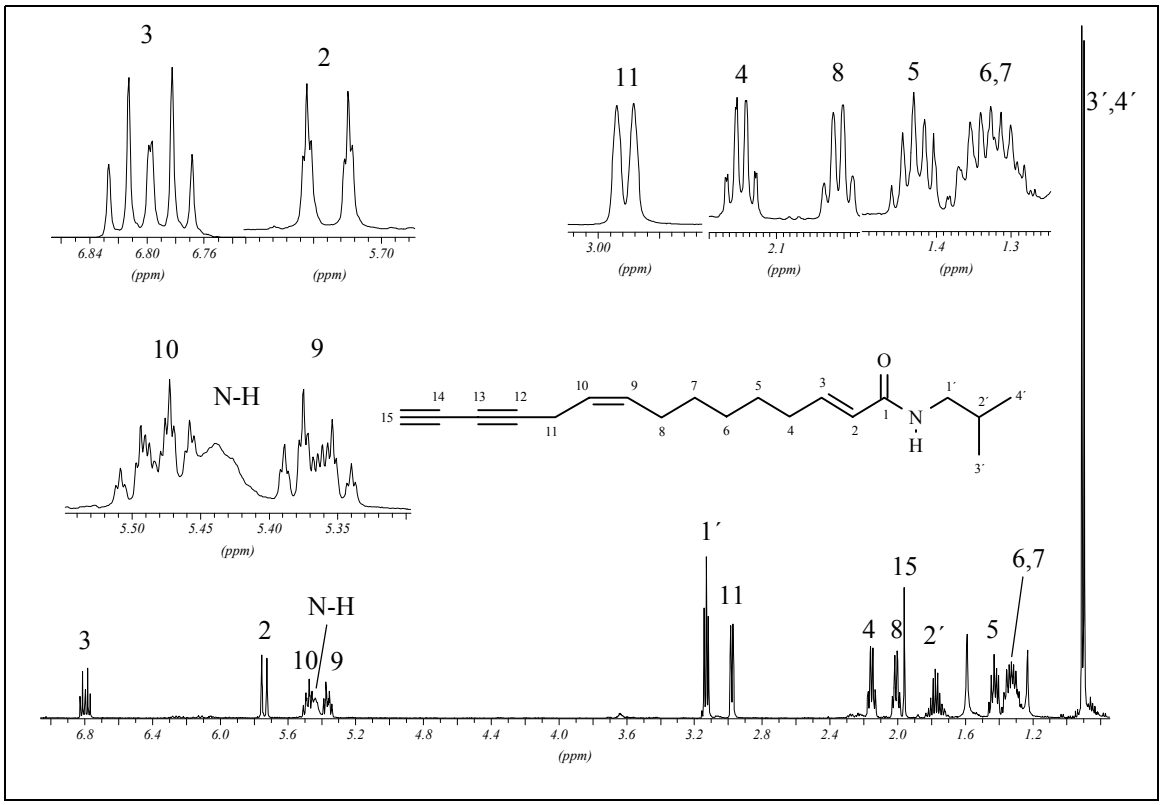


*Abbildung 4.41:^{1}H-NMR-Spektrum von **A16** (500 MHz, in $CDCl_3$).*

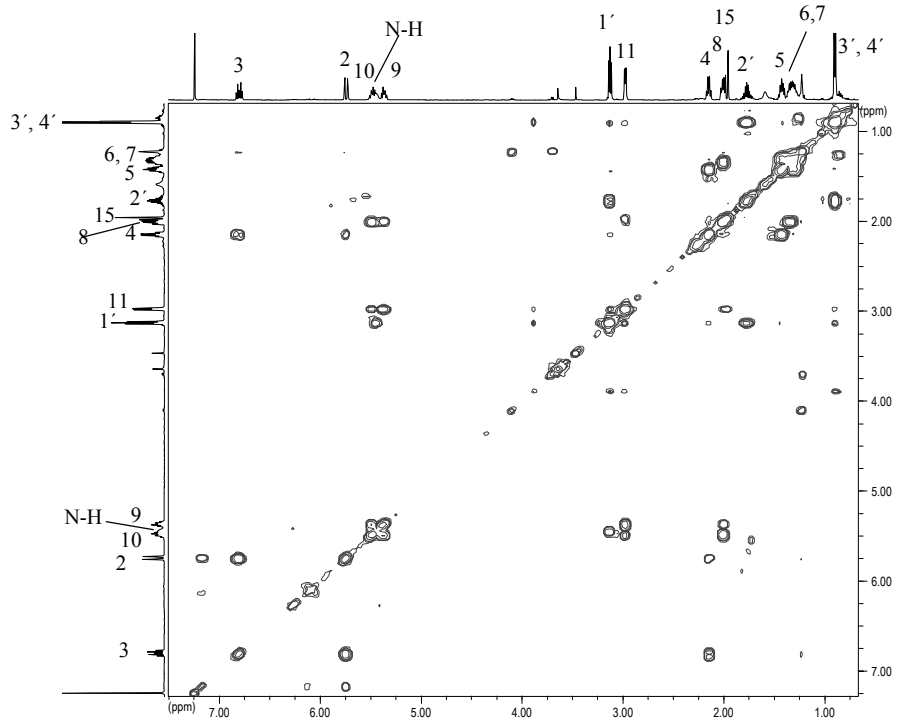


*Abbildung 4.42:^{1}H,^{1}H-COSY-Spektrum von **A16** (500 MHz, in $CDCl_3$).*

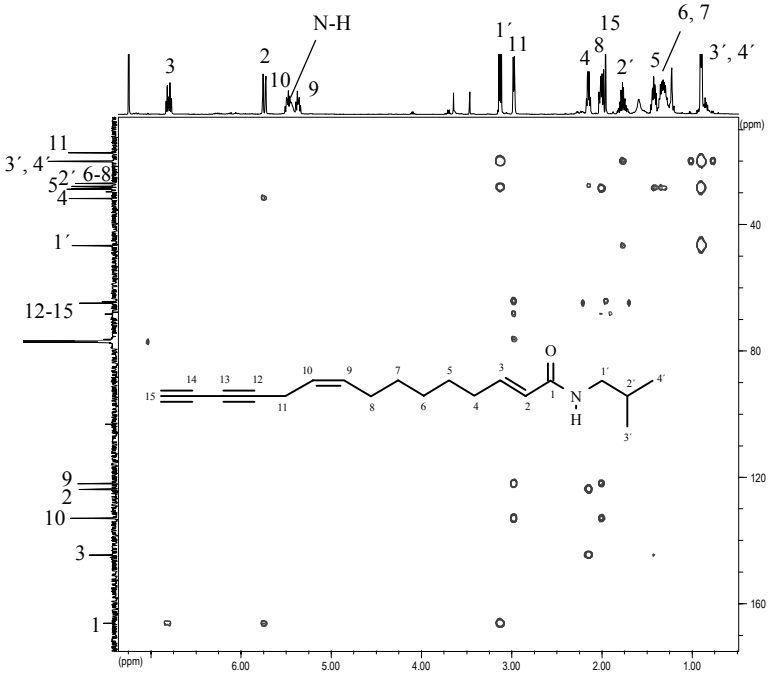


*Abbildung 4.43:HMBC-Spektrum von **A16** (500 bzw. 125 MHz, in $CDCl_3$).*

Die Dreifachbindung wurde weiterhin durch ein HMBC-Spektrum bestätigt. Sowohl das Signal von H_2-11 (2,98 ppm) als auch das von H-15 (1,96 ppm) zeigten Kreuzsignale zu acetylenischen Kohlenstoffatomen, die im Bereich von 64-78 ppm zur Resonanz kamen (siehe Abbildung 4.43). Die genauen ^{1}H-NMR- und ^{13}C-NMR-Daten gibt Tabelle 4.15 wieder.

Mit den oben aufgeführten spektroskopischen Daten konnte zweifelsfrei belegt werden, dass die Verbindung **A16** das Pentadeca-2*E*,9*Z*-dien-12,14-diinsäure-isobutylamid darstellt. Diese Substanz wurde bereits früher von BOHLMANN und HOFFMANN (1983) und von REMIGER (1988) aus *E. angustifolia* und *E. purpurea* isoliert. Die ^{1}H-NMR-Daten stimmen mit den Literaturwerten von REMIGER (1988) überein (siehe Tabelle 4.15). ^{13}C-NMR-Daten wurden bisher für diese Verbindung noch nicht beschrieben.

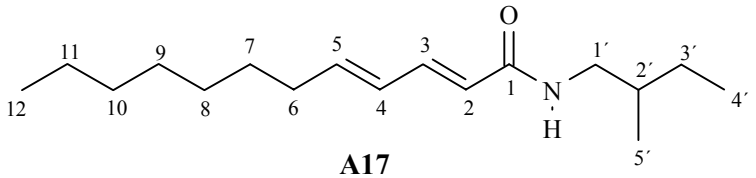
Für *E. atrorubens* wurde diese Verbindung zum ersten Mal belegt.

*Tabelle 4.15: ^{1}H-NMR- und ^{13}C-NMR-Daten von **A16** (500 bzw. 125 MHz, in $CDCl_3$) im Vergleich zu Literaturdaten von REMIGER (1988).*

H/C	^{1}H-NMR [ppm]			^{13}C-NMR [ppm]	^{1}H-NMR-Literaturdaten		
1	-			166,4	-		
2	5,74	dt	15,2; 1,5	124,1	5,78	d	15
3	6,80	dt	15,2; 6,9	144,9	6,83	dt	15; 7
4	2,15	tdd; 2H	6,9; 6,9; 1,5	32,3	2,18	dt	7; 7
5	1,43	tt; 2H	6,9	29,3	1,47	m	
6	1,33	m; 2H	-	29,1	1,36	m	
7	1,33	m; 2H	-	29,0	1,36	m	
8	2,01	dt; 2H	6,9; 6,9	27,4	2,05	dt	7; 7
9	5,37	ttd	10,6; 6,9; 1,2	122,3	5,40	dt	11; 7
10	5,48	ttd	10,6; 7,1; 1,2	133,3	5,50	dt	11; 7
11	2,98	d; 2H	7,1	17,8	3,02	d	7
12	-			76,7*	-		
13	-			64,8*	-		
14	-			65,3*	-		
15	1,96	t	1,2	68,8*	2,01	s	
N-H	5,44	brs		-	5,50	brs	
1´	3,13	dd	6,3; 6,3	47,2	3,18	dd	7; 7
2´	1,78	m	-	28,5	1,82	m	
3´	0,91	d; 3H	6,3	20,5	0,93	d	7
4´	0,91	d; 3H	6,3	20,5	0,93	d	7

* Innerhalb der gekennzeichneten Reihen austauschbar.

4.2.16. Dodeca-2*E*,4*E*-diensäure-2-methylbutylamid (Verbindung A17)



A17

Die Substanz **A17** wurde aus Fraktion II.2.2 des Extraktes **E2** mittels semipräparativer HPLC als weiße Kristalle gewonnen. Die Ausbeute betrug 6 mg.

Das UV-Spektrum mit einem Absorptionsmaximum von 260 nm deutete eine 2,4-Dienamidstruktur an.

Das GC-EI-Massenspektrum erbrachte ein Molekulargewicht von 265 Da und zeigte die schon bei Substanz **A12** beschriebenen Fragmente eines 2-Methylbutylamids, was auf eine Summenformel von $C_{17}H_{31}NO$ schließen ließ. Die deutlich hervortretenden Fragmente bei *m/z* 179, 96 und 81 glichen denen der Substanz **A11**.

Das ^{1}H-NMR-Spektrum bestätigte das Vorliegen eines 2-Methylbutylamids (siehe Abbildung 4.44). Die restlichen Signale konnten dem Säurerest zugeordnet werden und waren identisch mit denen der Verbindung **A11**, einem Dodeca-2*E*,4*E*-diensäure-Derivat. Im Gegensatz zum Protonenresonanzspektrum von **A11** wurde in dem von **A17** jedoch das Signal von H_2-7 (1,39 ppm, m) durch das Multiplett von H-3´a (1,39 ppm) überlagert.

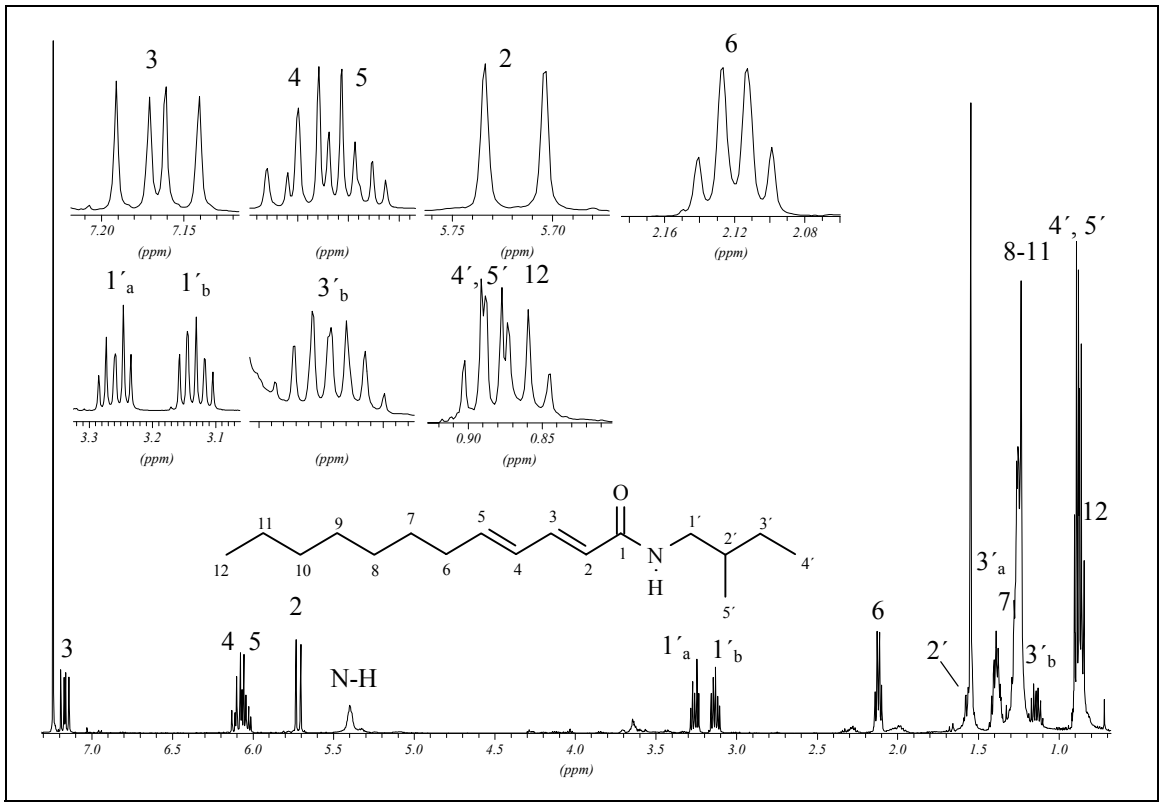


*Abbildung 4.44: ^{1}H-NMR-Spektrum von **A17** (500 MHz, in $CDCl_3$).*

Die Analyse des ^{1}H,^{1}H-COSY-Spektrums bestätigte die bisherigen Ergebnisse (siehe Abbildung 4.45). Tabelle 4.16 gibt die genauen ^{1}H-NMR-Daten wieder.

Verbindung **A17** wurde anhand der genannten spektralen Daten eindeutig die Struktur des Dodeca-2*E*,4*E*-diensäure-2-methylbutylamids zugeordnet. Die spezifische Drehung von **A17** betrug $[\alpha]_D^{20} = -4\ °$ (c = 0,1; Ethanol p.a.). Ohne kristallographische Analyse kann jedoch keine definitive Aussage über die absolute Konfiguration des asymmetrischen Zentrums an C-2´ gemacht werden.

Das Dodeca-2*E*,4*E*-diensäure-2-methylbutylamid stellt einen neuen Naturstoff dar.

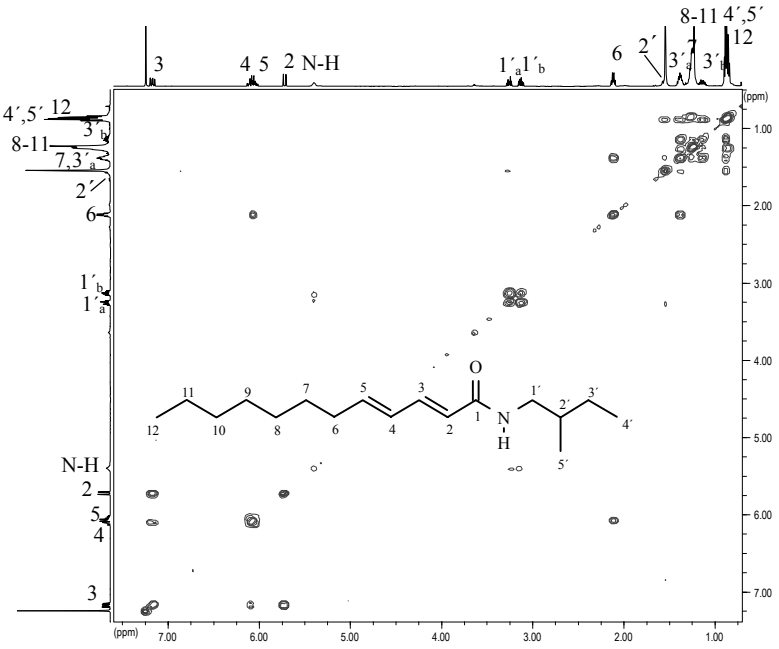
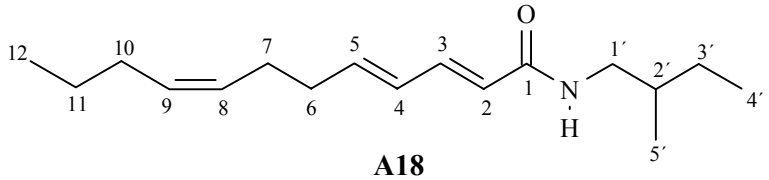


*Abbildung 4.45: $^{1}H,^{1}H$-COSY-Spektrum von **A17***

*Tabelle 4.16: ^{1}H-NMR-Daten von **A17** und **A18** (500 bzw. 125 MHz, in $CDCl_3$).*

H	^{1}H-NMR A17 [ppm]			^{1}H-NMR A18 [ppm]		
2	5,72	d	15,1	5,73	d	15,1
3	7,17	dd	15,1; 10,1	7,16	dd	15,1; 10,7
4	6,13	dd	15,1; 10,1	6,13	dd	15,1; 10,7
5	6,06	dt	15,1; 6,9	6,05	dt	15,1; 6,3
6	2,12	dt; 2H	6,9; 6,9	2,17	m; 2H	
7	1,39	m; 2H		2,15	m; 2H	
8	1,26	m; 2H		5,34	dt	10,7; 6,9
9	1,26	m; 2H		5,38	dt	10,7; 6,9
10	1,26	m; 2H		1,98	dt; 2H	6,9; 6,9
11	1,26	m; 2H		1,37	m; 2H	
12	0,86	t	6,9	0,88	t; 3H	6,9
N-H	5,55	brs		5,39	brs	
1´$_a$	3,26	m		3,26	m	
1´$_b$	3,13	m		3,13	m	
2´	1,55	m		1,58	m	
3´$_a$	1,39	m		1,37	m	
3´$_b$	1,14	m		1,15	m	
4´	0,88	t; 3H	6,9	0,88	t; 3H	6,9
5´	0,88	d; 3H	6,9	0,88	d; 3H	6,9

4.2.17. Dodeca-2*E*,4*E*,8*Z*-triensäure-2-methylbutylamid (Verbindung A18)



A18

Die Substanz **A18** wurde wie **A17** ebenfalls aus Fraktion II.2.2 des Extraktes **E2** mit einer Ausbeute von 4 mg mittels semipräparativer HPLC als farbloses Öl gewonnen.

Das UV-Spektrum wies wie die bisherigen 2,4-Dienamide ein λ_{max} von 260 nm auf.

Das GC-EI-Massenspektrum zeigte einen Molekülpeak von *m/z* 263 und die charakteristischen 2-Methylbutylamidfragmente ($C_{17}H_{29}NO$).

Das ^{1}H-NMR-Spektrum bestätigte das Vorliegen eines 2-Methylbutylamids (siehe Abbildung 4.46). Weiterhin war das gleiche Signalmuster wie bei Substanz **A10** zu erkennen (siehe 4.2.10, Seite 82). In diesem Fall wurde nur das Signal von H_2-11 bei 1,37 ppm überlagert durch das Multiplett von H_2-3 (1,37 ppm).

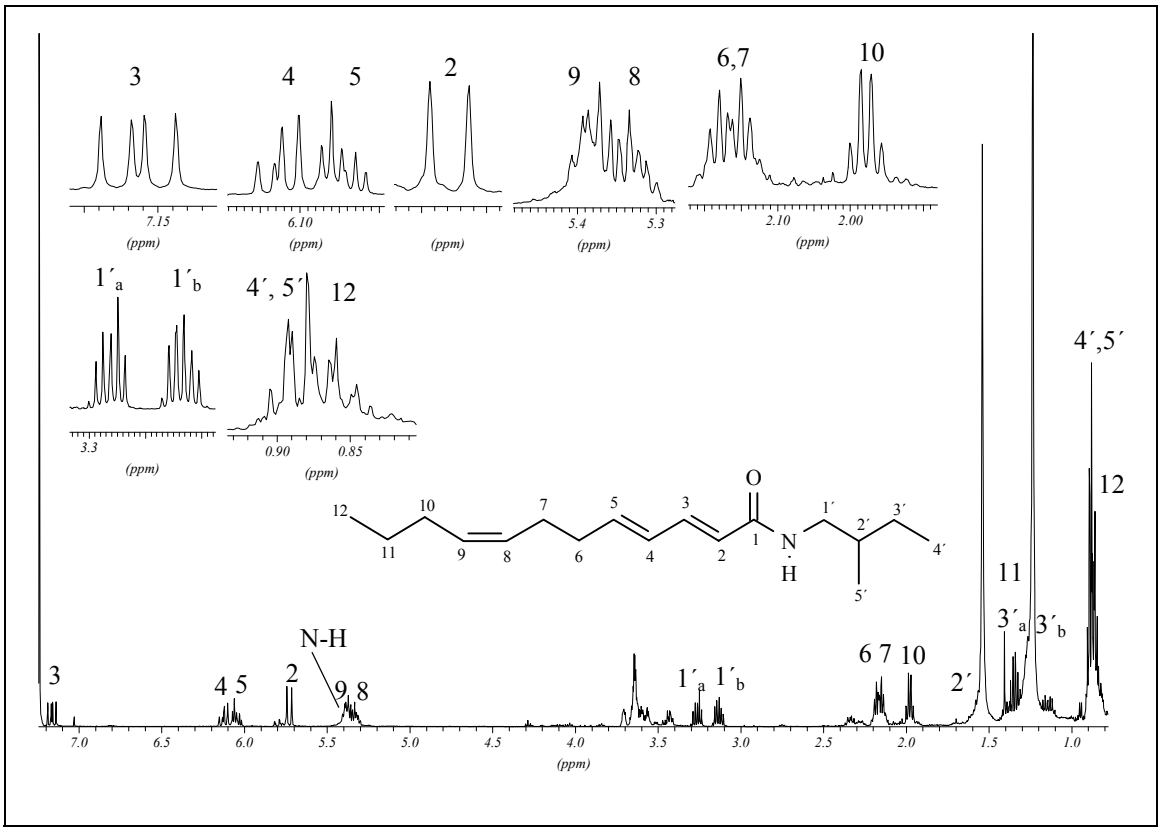
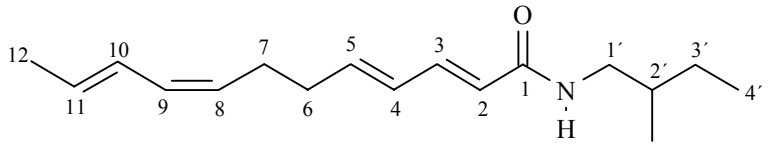


*Abbildung 4.46: ^{1}H-NMR-Spektrum von **A18** (500 MHz, in $CDCl_3$).*

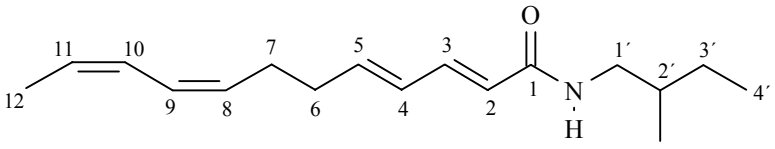
Demzufolge handelte es sich bei **A18** um das Dodeca-2*E*,4*E*,8*Z*-triensäure-2-methylbutylamid. Diese Struktur konnte durch ein $^{1}H,^{1}H$-COSY-Spektrum bestätigt werden. Die genauen ^{1}H-NMR-Daten sind in Tabelle 4.16, Seite 105 wiedergegeben.
Die spezifische Drehung von **A18** glich derjenigen von **A12** und betrug $[\alpha]_D^{20} = -13$ ° (c = 0,1; Ethanol p.a.).

Die Substanz wurde bisher nicht beschrieben und stellt daher einen neuen Naturstoff da.

4.2.18. Dodeca-2*E*,4*E*,8*Z*,10*Z*/*E*-tetraensäure-2-methylbutylamide (Verbindungen A19/20)



A19



A20

Die Substanzen **A19/20** wurden wie die beiden vorrangegangenen Amide **A17** und **A18** ebenfalls aus Fraktion II.2.2 des Extraktes **E2** mit einer Ausbeute von 4 mg mittels semipräparativer HPLC als weiße Kristalle gewonnen. HPL-chromatographisch waren die beiden Substanzen, die einen gemeinsamen Peak bei einer Retentionszeit von 12,6 Minuten ergaben, nicht zu trennen.

Das UV-Spektrum beider Verbindungen wies wie die Alkamide **A8/9** ein Maximum bei 260 nm und eine Schulter bei 231 nm auf. Dies deutete neben einer 2,4-Dienamidstruktur auf eine zusätzliche konjugierte ungesättigte Teilstruktur hin.

Das GC-Chromatogramm zeigte zwei eng benachbarte Peaks, die das gleiche Massenspektrum aufwiesen. Danach war in den Massenspektren beider Substanzen ein Molekülpeak von *m/z* 261 und ein Basispeak von *m/z* 81, der ebenfalls bei den Substanzen **A8/9** auftrat, zu erkennen. Schwache Fragmente im Amidteil wiesen auf eine 2-Methylbutylamidstruktur hin. Die Substanzen **A19/20** stellten somit Isomere dar, denen beiden die Summenformel $C_{17}H_{27}NO$ zugeordnet werden konnte.

Durch die Analyse des ^{1}H-NMR-Spektrums konnte die 2-Methylbutylamidstruktur mit den charakteristischen Signalen im aliphatischen Bereich eindeutig belegt werden (siehe Abbildung 4.47).

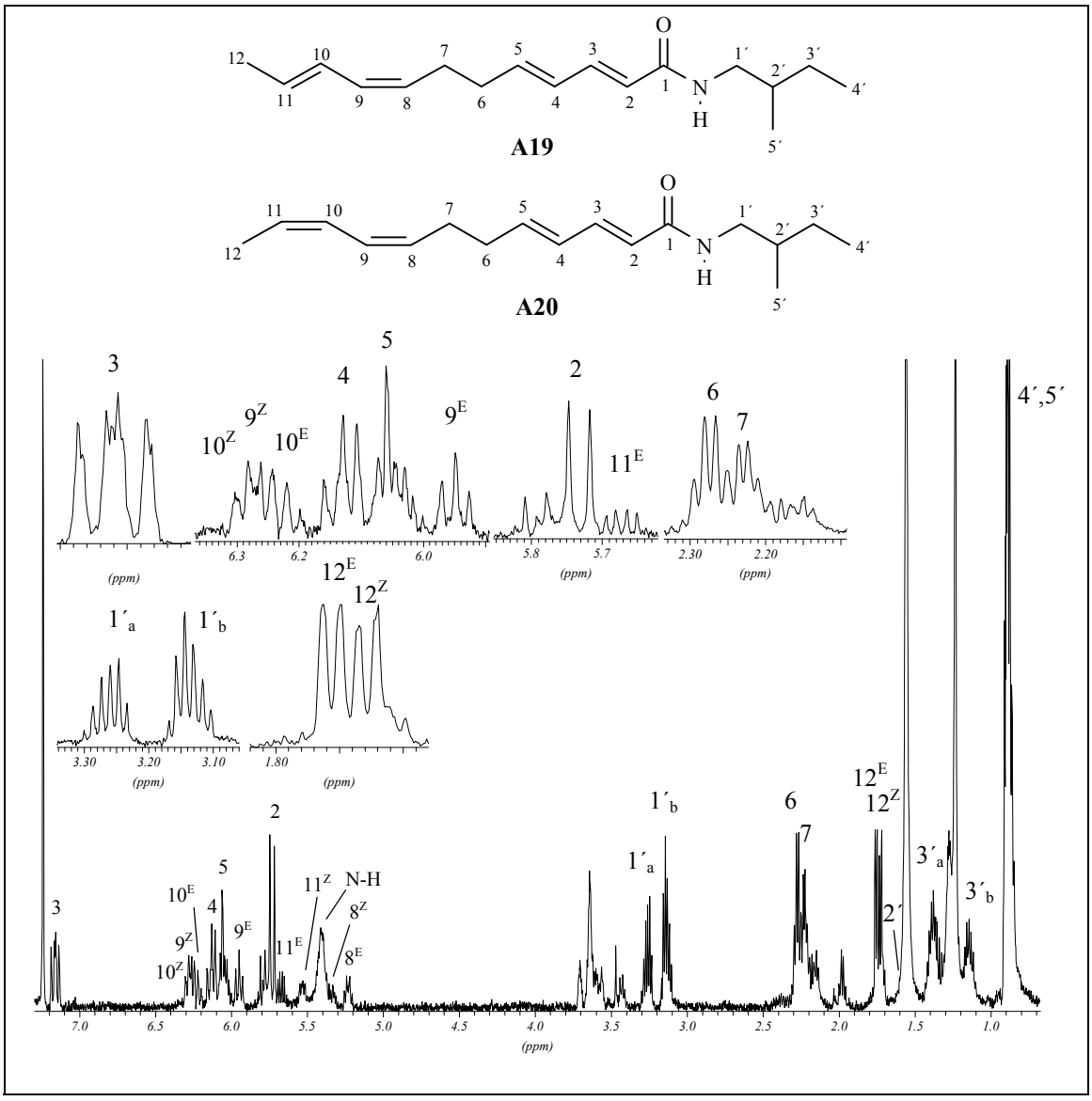


*Abbildung 4.47:^{1}H-NMR-Spektrum von **A19/20** (500 MHz, in $CDCl_3$).*

Im olefinischen Bereich wurde ein sehr komplexes Signalmuster sichtbar. Die Integration der Signale machte deutlich, dass einige Signale beiden Verbindungen zugeordnet werden mußten, während andere offensichtlich nur durch ein Isomer verursacht wurden. Dabei wiesen die beiden Isomere ein Massenverhältnis von 1:1 auf.
Im Vergleich zum Protonenresonanzspektrum der Verbindungen **A8/9** fiel auf, dass die Signale der Säuregruppierung denen des Spektrums von **A19/20** entsprachen.

Das ^{1}H,^{1}H-COSY-Spektrum bestätigte das Vorliegen der beiden isomeren Dodeca-2*E*,4*E*,8*Z*,10*Z*/*E*-tetraensäuren, die sich somit nur durch die Konfiguration der Doppelbindung zwischen H-10 und H-11 unterschieden. Im Gegensatz zu **A8/9** sind diese jedoch mit einer 2´-Methylbutylamidstruktur verknüpft, die durch das

assymetrische Zentrum an C-2´ eine spezifische Drehung der Isomere von $[\alpha]_D^{20} = -4$ ° (c = 0,1; Ethanol p.a.) verursacht.

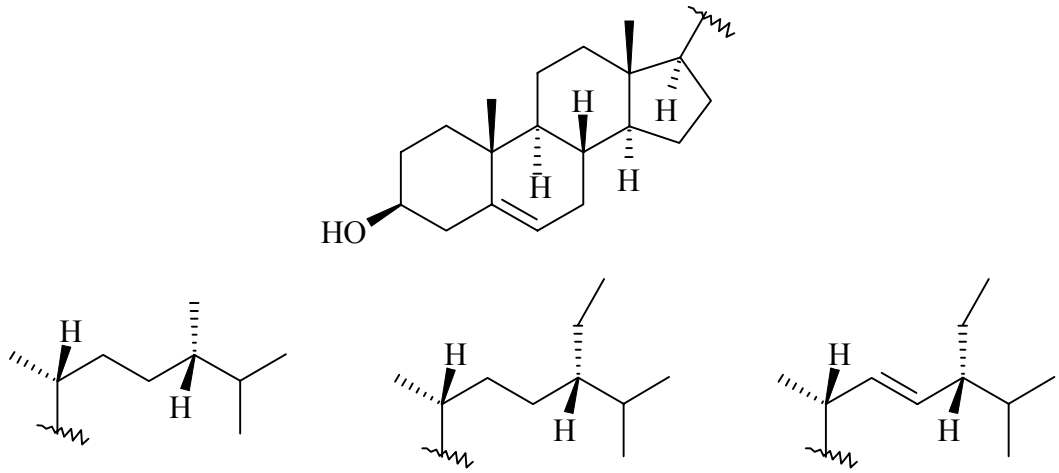
Die beiden isomeren Verbindungen **A19/20** konnten mit den oben aufgeführten spektroskopischen Untersuchungen als die bisher in der Literatur noch nicht beschriebenen Dodeca-2*E*,4*E*,8*Z*,10*Z*/*E*-tetraensäure-2-methylbutylamide identifiziert werden.

*Tabelle 4.17: ^{1}H-NMR-Daten von **A19/20** (500 MHz, in $CDCl_3$).*

H	**A19 (10*E*-Isomer)**			**A20 (10*Z*-Isomer)**		
2	5,73	d	15,1	5,73	d	15,1
3	7,16	dd	15,1; 11,3	7,16	dd	15,1; 11,3
4	6,13	dd	15,1; 11,3	6,13	dd	15,1; 11,3
5	6,05	dt	-	6,05	dt	-
6	2,27	m; 2H	-	2,27	m; 2H	-
7	2,23	m; 2H	-	2,23	m; 2H	-
8	5,23	dt	11,0; 6,9	5,33	dt	11,0; 6,9
9	5,95	dd	11,0; 10,4	6,28	dd	11,0; 10,4
10	6,23	dd	15,1; 10,4	6,30	dd	11,3; 10,4
11	5,67	dq	15,1; 6,9	5,53	dq	11,3; 6,9
12	1,76	d; 3H	6,9	1,73	d; 3H	6,9
N-H	5,40	brs		5,40	brs	
1´$_a$	3,25	m		3,25	m	
1´$_b$	3,15	m		3,15	m	
2´	1,58	m		1,58	m	
3´$_a$	1,39	m		1,39	m	
3´$_b$	1,15	m		1,15	m	
4´	0,89	t ; 3H	6,9	0,89	t; 3H	6,9
5´	0,89	d; 3H	6,9	0,89	d; 3H	6,9

4.3. Identifizierung weiterer lipophiler Verbindungen

4.3.1. Identifizierung der Triterpene β-Sitosterol, Stigmasterol und Campesterol



Campesterol β-Sitosterol Stigmasterol

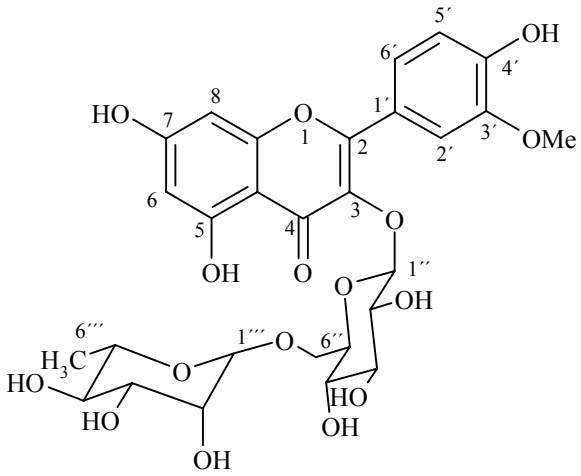
Nach der ersten Vakuumsäulenchromatographie des Extraktes **E1** wurden in Fraktion VIII weiße Kristalle erhalten, die aufgrund fehlender UV-Absorption weder durch HPLC-UV noch mittels Fluoreszenz oder Fluoreszenzlöschung auf der DC-Platte detektierbar waren. Nach einer GC-MS-Analyse mit Spektrenvergleich verschiedener Triterpene wurden β-Sitosterol, Stigmasterol und Campesterol identifiziert (GC-Methode: GC-4). Durch vergleichende Dünnschichtchromatographie mit authentischen Verbindungen konnte dies bestätigt werden (DC-T1, Detektion mit Anisaldehyd/H_2SO_4-Reagenz).

Sterole sind im Pflanzenreich weit verbreitet. Als Inhaltsstoffe für *E. atrorubens* wurden sie bisher noch nicht beschrieben, β-Sitosterol und Stigmasterol konnten aber bereits im Kraut und in den Wurzeln von *E. angustifolia* und *E. purpurea* nachgewiesen werden (VERELIS und BECKER, 1977; REMIGER, 1988).

4.4. Isolierung und Strukturaufklärung einer hydrophilen Verbindung aus Echinaceae atrorubens herba

Um aus phytochemischen und chemotaxonomischen Gründen die Hauptsubstanzbande des Methanolextraktes aus E. atrorubens herba im Dünnschicht-Chromatogramm und den Hauptpeak im HPLC-Chromatogramm identifizieren zu können, isolierten wir diese Verbindung aus dem Methanolextrakt.

4.4.1. Narcissin (Verbindung FG1): 3,4´,5,7-Tetrahydroxy-3´-methoxy-flavon-3-β-[6-O-α-L-rhamnopyranosyl-D-glucopyranose]



Die Verbindung **FG1** konnte in einer Ausbeute von 1 mg aus dem Methanolextrakt von E. atrorubens herba mittels präparativer DC (Fliessmittelsystem DC-T3, siehe Kapitel 4.1.2) DC-rein isoliert werden.

Auf der DC-Platte erschien **FG 1** im UV-Licht bei 366 nm als dunkelrote Zone. Nach Besprühen mit Naturstoffreagenz/PEG zeigte sich eine orange/gelbe Fluoreszenz bei 366 nm und ein oranger Fleck im Tageslicht. Das UV-Spektrum, welches während der HPLC-Analyse aufgenommen wurde (Trennsystem Ech 2, siehe Kapitel 9.2.5), lieferte das Absorptionsmaximum der Bande II bei 254 nm, zwei Schultern bei 268 nm und 300 nm und das Maximum der Bande I bei 354 nm.

Im positiven Modus des LC-MS-Spektrums (aufgenommen durch Elektronische Ionisation) befand sich ein „Cluster-Ion“ vom Typ $[M+Na]^+$ bei m/z 647, was auf eine Molekularmasse für **FG-1** von 624 schließen ließ. Bei Glykosiden werden in dieser Form der Massenspektrometrie lediglich die Zucker abgespalten, für eine weitere

Fragmentierung der Aglyka reicht die Kollisionsenergie der beschleunigten Pseudomolekülionen nicht aus. So spaltete **FG-1** zuerst das Fragment der Masse 146 $[M+H-146]^+$ ab, welches typisch für eine Desoxyhexose wie Rhamnose ist, und anschließend ein Bruchstück mit der Masse 162 $[M+H-146-162]^+$, das für eine Hexose wie Glucose oder Galactose spricht.

Durch die Hydrolyse der Verbindung **FG-1** auf einer DC-Folie konnten die beiden Zuckerkomponenten als Rhamnose und Glucose identifiziert werden (DC-System: DC-T4; Detektion mit Thymol-H_2SO_4-Reagenz, siehe Seite 152). Da beide Fragmente im Massenspektrum immer nacheinander auftraten, ließ sich eine Verknüpfung der beiden Zucker zu einem Rhamnoglucosyl vermuten. Das Aglykon erschien im Massenspektrum mit einer Masse von 317 als $[Aglykon+H]^+$ Ion. Flavonoide werden unter diesen Reaktionsbedingungen in der Regel am O-1 protoniert (STEVENS et al., 1995). Es musste sich also um ein methyliertes Quercetinderivat mit einem Molekulargewicht von 316 Da handeln. Durch Abspaltung eines Methylradikals entstand aus dem protonierten Aglykon das Fragment mit der Masse 302. Wie oben bereits erwähnt, reichte die zugeführte Energie nicht aus, die üblichen Zerfallswege anzustoßen, so dass nur unspezifische Radikale abgespalten wurden und keine Retro-Diels-Alder-Fragmente im Massenspektrum erkennbar waren.

Im ^{1}H-NMR-Spektrum (siehe Abbildung 4.48 und Tabelle 4.18) befanden sich die beiden A-Ring Protonen von **FG-1** typischerweise relativ weit im Hochfeld bei 6,14 ppm für H-6, welches *meta* mit H-8 (6,32 ppm) koppelte. Wie es für 3´-OH methylierte B-Ringe charakteristisch ist, verschob sich H-6´ ins Hochfeld (7,63 ppm) und H-2´ durch den Einfluss der 3´-OCH_3-Gruppe ins Tieffeld (7,94 ppm) (MABRY et al., 1970). Während H-2´ nur *meta* mit H-6´ koppelte, zeigte H-6´ eine weitere *ortho*-Kopplung zu H-5´ (6,90 ppm). Das ^{1}H-NMR-Spektrum belegte somit, dass es sich bei dem hier vorliegenden Aglykon um Isorhamnetin handeln musste. Da die Substanzmenge nicht ausreichte die Zuckerverknüpfungen durch das ^{1}H-NMR-Spektrum oder durch andere NMR-Versuche zu identifizieren, wurde zusätzlich nach den obengenannten Versuchen ein direkter Vergleich mit der authentischen Substanz Narcissin (Isorhamnetin-3-rutinosid) vorgenommen. DC-, HPLC-, NMR- und LC-MS-Untersuchungen mit der Referenzsubstanz identifizierten **FG1** eindeutig als Isorhamnetin-3-rutinosid (Narcissin). Narcissin wurde zum ersten Mal von KUBOTA und HASE (1956) aus den gelben Blütenblättern von *Narcissus tazetta* L. var. chinensis isoliert. KOTAKE und ARAKAWA (1956) fanden es in den Pollen von *Lilium auratum*, HÖHRHAMMER et al. (1960, 1966) in *Herniara glabra* und in den Blüten von *Cereus grandiflorus* Mill.. Außerdem konnte es aus *Brassica napus* var. oleifera (KRÄMER, 1966), aus *Limnanthes douglsii* (PARKER und BOHM, 1975), aus den männlichen Blüten von *Cucurbita pepo* (ITOKAWA et al., 1981) und aus den Blütenblättern von *Lilium cordatum* (NAKANO et al., 1989) gewonnen werden. HÖHRHAMMER et al. (1966) stellten Narcissin zusätzlich synthetisch her.

Für das Genus *Echinacea* ist das Vorkommen von Narcissin neu.

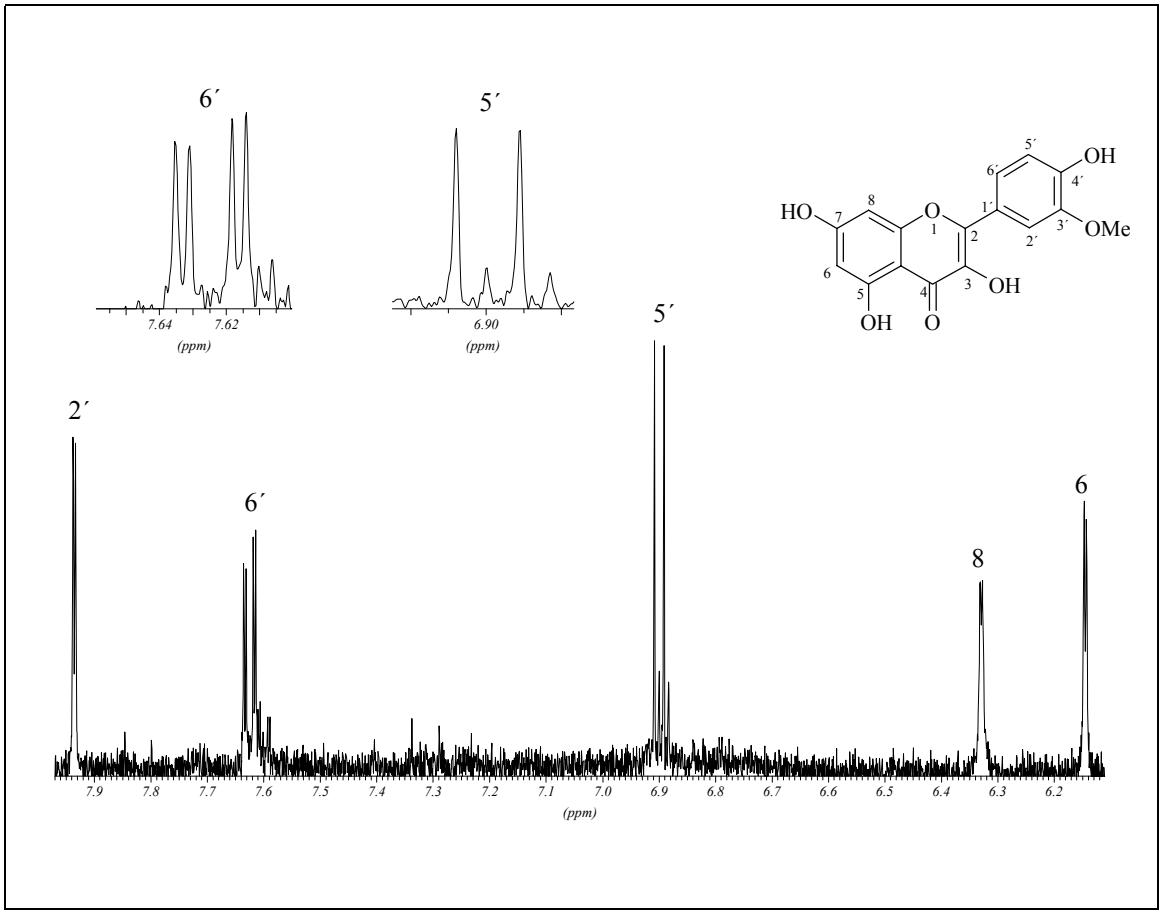


*Abbildung 4.48:Auszug aus dem ^{1}H-NMR-Spektrum des Aglykons (Isorhamnetin) von Verbindung **FG1** (500 MHz, in CD_3OD)*

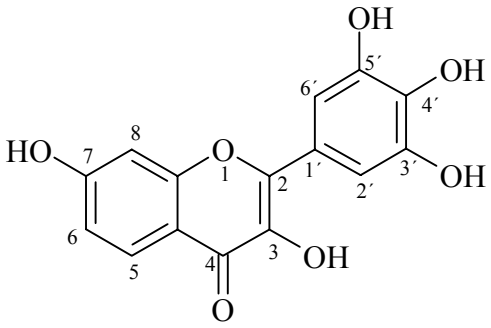
*Tabelle 4.18: ^{1}H-NMR-Daten des Aglykons von Verbindung **FG1** (500 MHz, in CD_3OD)*

H	δ [ppm]	Multiplizität	J [Hz]
2´	7,94	d	2,2
6´	7,63	dd	8,5; 2,2
5´	6,90	d	8,5
8	6,33	d	2,0
6	6,15	d	2,0
3´-OCH_3	3,94	s	-

4.5. Isolierung und Strukturaufklärung eines Flavonoids aus dem Presssaft von Echinaceae purpureae herba

Im Rahmen von vergleichenden Vorversuchen wurde der medizinisch eingesetzte Presssaft aus dem frischen Kraut von *E. purpurea* untersucht und dabei ein für diese Zubereitung noch nicht bekanntes Flavonoid detektiert. Dieses wurde daraufhin isoliert und dessen Struktur anschließend aufgeklärt.

4.5.1. Robinetin (Verbindung F1): 3´,4´,5´,7-Tetrahydroxyflavonol



Die Verbindung **F1** wurde als gelbes Pulver aus einem *E. purpurea*-Presssaft (Fa. Schönenberger) durch Ausschütteln mit Ethylacetat und anschließender säulenchromatographischer Trennung an Sephadex isoliert. Die Ausbeute betrug 9 mg.

Auf der DC-Platte erschien **F1** im UV-Licht bei 366 nm als gelb fluoreszierende Bande. Nach Detektion mit Naturstoffreagenz A zeigte die Substanz im Tageslicht eine orange Färbung und im UV-Licht eine stark fluoreszierende orange Bande. Dies deutete auf ein Flavanol mit mindestens zwei *ortho*-ständigen OH-Gruppen in Ring B hin (BRASSEUR und ANGENOT, 1986).

Die UV-Analyse unter Zugabe verschiedener Verschiebungsreagenzien ließ folgende Strukturhinweise zu (MABRY et al., 1970):

MeOH: Das UV-Maximum der Bande I bei 368 nm sprach für ein freies Flavonol. Die Lage des Maximums von Bande II bei 252 nm war charakteristisch für eine Di- oder Trihydroxygruppierung in Ring B (CHIRIKDJIAN und BLEIER, 1971). Da die Bande II neben dem Absorptionsmaximum nur eine sehr leichte Schulter bei 266 nm aufwies, war dies eher ein Hinweis auf eine Dreier-Substitution in Ring B.

NaOMe: Da die Zugabe von NaOMe zu einer Abfall der Absorptionspeaks führte, mußte die Substanz mindestens eine alkali-sensitive Gruppierung besitzen. Dies traf auf eine 3,4´-Dihydroxystruktur und eine 3´,4´,5´-Trihydroxystruktur zu.

Außerdem trat eine zusätzliche Absorption bei 325 (330) nm auf, welches für eine freie OH-Gruppe an C-7 sprach.

$AlCl_3$/HCl: Die *ortho*-Di- oder Trihydroxygruppe im B-Ring ließ sich ebenfalls aus dem $AlCl_3$-Spektrum ableiten. Nach Zusatz von $AlCl_3$ wurde die Bande I im Vergleich zu dem in Methanol aufgenommenen Spektrum um 77 nm bathochrom und nach anschließender Zugabe von HCl um 59 nm hypsochrom verschoben. Dies ließ sich dadurch erklären, dass der Al-Komplex mit der *o*-Dihydroxygruppe säurelabil war, der Chelatkomplex mit der OH-Gruppe an C-3 sowie mit der 4-Oxo-Gruppe jedoch einen säurestabilen bathochromen Shift bewirkte.

NaOAc: Nach Zugabe von NaOAc nahm mit der Zeit die Absorption von **F1** ab, was wiederum die Anwesenheit einer 3,4´-Di- oder 3,3´,4´-Trihydroxygruppe bestätigte.

NaOAc/H_3BO_3: Auch der Zusatz von Borsäure belegte eine 3´,4´-Di oder 3´,4´,5´-Trihydroxygruppierung in Ring B, da es zu einer bathochromen Verschiebung der Bande I um 17 nm kam.

Weitere wichtige Hinweise für die Strukturaufklärung von Flavonoidaglyka lieferte die Massenspektrometrie. Da aufgrund der hohen Polarität der Substanz **F1** keine GC-MS-Analyse durchgeführt werden konnte, wurde zum einen ein Massenspektrum mit chemischer Ionisation (NH_3), zum anderen ein Massenspektrum mit Elektronenstoß-Ionisation aufgenommen.

Mit beiden Methoden wurde für **F1** ein Molekülpeak von 302 Da erhalten. Dies entsprach der Masse von Quercetin, jedoch stimmte die Substanz laut DC-Vergleich nicht mit diesem Flavonoid überein. Die UV-Analysen hatten bereits ergeben, dass jeweils eine freie OH-Gruppe an C-3 und C-7 und eine ortho-3´,4´-Dihydroxygruppe in Ring B vorliegen mußte. Die Lage einer weiteren Hydroxylgruppe war zu diesem Zeitpunkt noch nicht zweifelsfrei belegt.

Das MS-Spekrum lieferte weitere Strukturinformationen, da die für Flavonole sehr typischen Schlüsselbruchstücke $[A_1+H]^+$ und $[B_2]^+$, die durch zwei verschiedene Mechanismen gebildet werden, auftraten (HARBORNE et al., 1975). Weg 1 verläuft nach dem Mechanismus einer Retro-Diels-Alder-Reaktion und liefert Fragment $[A_1+H]^+$. Weg 2 bildet neben Fragment $[B_2]^+$, Dehydrobenzol (*m/z* 78) und ein Ketenradikal (*m/z* 41). In dem vorliegenden Massenspektrum (siehe Abbildung 4.49) tratt $[A_1+H]^+$ bei *m/z* 137 auf, welches die Mono-Hydroxylierung in Ring A belegte. Das Fragment $[B_2]^+$ erschien mit einer Masse von 153 Da und bestätigte eine Tri-Hydroxylierung in Ring B (siehe Abbildung 4.49). Das $[B_2]^+$-Ion spaltete zusätzlich CO ab, wodurch das Fragment mit der Masse 125 entstand. Das Signal bei der Massenzahl 41, stand für das Ketenradikal.

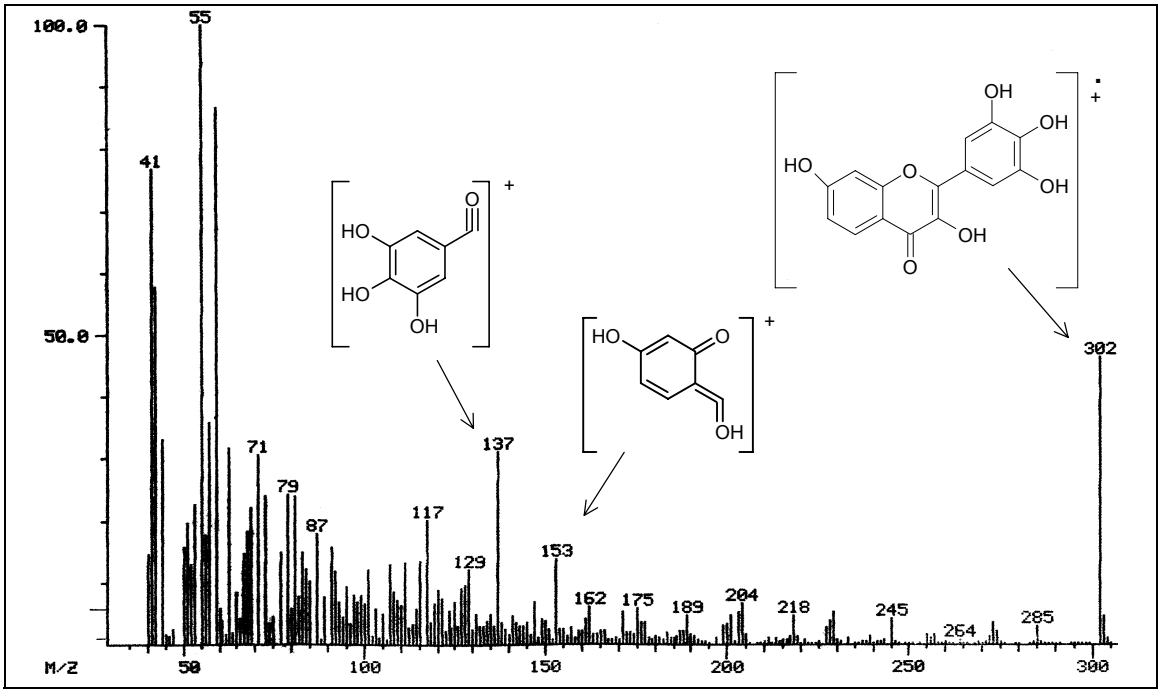


*Abbildung 4.49:EI-Massenspektrum von Robinetin (**F1**)*

Eindeutig ließ sich die Struktur schließlich durch das ^{1}H-NMR-Spektrum aufklären (aufgenommen in CD_3OD, siehe Tabelle 4.19 und Abbildung 4.50). Da die *meta*-koppelnden Signale von H-6 ($\delta = 6{,}90$ ppm) und H-8 ($\delta = 6{,}89$ ppm) sehr nahe aneinanderlagen, war das Verhältnis mit $\Delta\nu/J = 2{,}3$ sehr niedrig (mit einer zugrundeliegenden Kopplungskonstante von 2,2 Hz). Ist $\Delta\nu/J$ kleiner als 10, so entstehen Aufspaltungen höherer Ordnung mit komplizierterer und veränderter Linienverteilung als dies bei Spektren erster Ordnung der Fall wäre. Dies war auch an der erhöhten Multiplizität der Protonen H-5 ($\delta = 7{,}97$ ppm), welches durch die Ketogruppe an C-4 relativ weit ins Tieffeld verschoben wurde (MABRY et al., 1970), H-6 und H-8 sichtbar. Um die Kopplungskonstanten der Signale höherer Ordnung bestimmen und die erhöhte Linienverteilung nachvollziehen zu können, wurde das Spektrum von **F1** am Computer simuliert*. Zugrundegelegt wurden die chemischen Verschiebungen, die *ortho*- und *meta*-Kopplungskonstanten der Signale aus dem aufgenommenen ^{1}H-NMR-Spektrum von **F1,** und der theoretische Wert einer *para*-Kopplungskonstante von 0,3 Hz zwischen H-5 und H-8. Wie in Abbildung 4.50 zu erkennen ist, konnten exakt die gleichen Aufspaltungen wie im tatsächlich aufgenommenen Spektrum simuliert werden.

Die Kopplungskonstante von 9,0 Hz zwischen H-5 und H-6 zeigte, dass H-5 *ortho* mit H-6 koppelte. Das ^{1}H-NMR-Spektrum bestätigte damit das Ergebnis aus dem Massen-

* Herrn Dr. Thomas Schmidt danke ich herzlich für die Simulationsversuche am Computer.

spektrum, dass Ring A nur an C-7 hydroxyliert sein konnte. Die Trihydroxylierung an Ring B ließ sich durch das gemeinsame Singulett von H-2´und H-6´ bei δ = 7,37 ppm belegen.

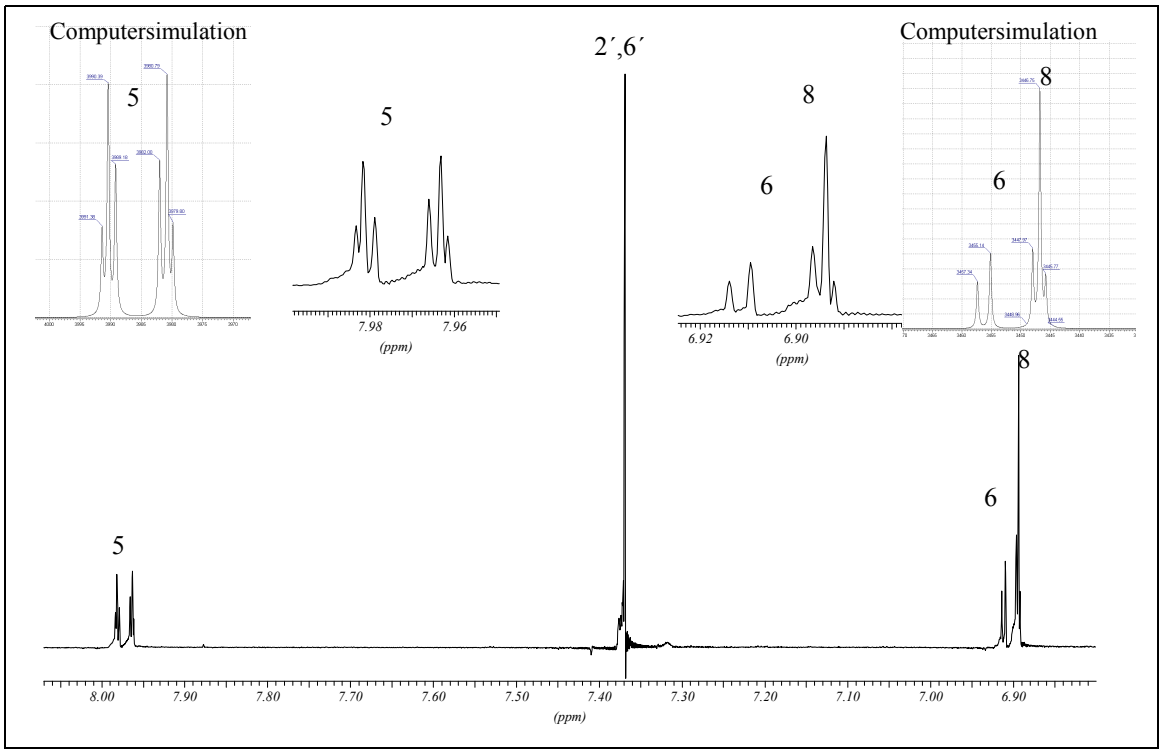


*Abbildung 4.50: Ausschnitt des ^{1}H-NMR-Spektrums von Verbindung **F1**(500 MHz, in CD_3OD) mit den Signalen der Protonen H-5, H-6 und H-8 nach Simulierung am Computer.*

Das ^{1}H,^{1}H-COSY-Spektrum und der Vergleich mit Literaturwerten belegten die postulierte Struktur (MABRY et al., 1970). Es handelte sich somit bei dieser Substanz eindeutig um das Flavonol Robinetin.

Tabelle 4.19: ^{1}H-NMR-Daten von Verbindung F1 (500 MHz, in CD_3OD) im Vergleich zu Angaben für Robinetin: MABRY et al., 1970 (in CCl_4)

H-Atom	δ (ppm)	J (Hz)	Mult.	Robinetin δ (ppm)
5	7,97	9,0; 0,3*	m*	8,0 (d)
6	6,90	9,0; 2,2	dd*	6,8 (dd)
8	6,89	2,2; 0,3*	s*	6,8 (d)
2´/6´	7,37	-	s	7,3 (s)

* Spinsystem höherer Ordnung, Kopplungskonstanten durch Spektrensimulation ermittelt.

Robinetin wurde erstmals aus dem Holz von *Robinia pseudacacia* isoliert und identifiziert (SCHMID und PIETSCH, 1931; SCHMID UND TADROS, 1932). ROUX UND

PAULUS (1962) konnten später neben Dihydrorobinetin und anderen Flavonoiden Robinetin in dem Kernholz von *Robinia pseudacacia*, welches sehr widerstandsfähig gegen Insekten ist, lokalisieren. Außerdem konnte die Verbindung in *Gleditsia monosperma*, im Kernholz von *Millettia stuhlmannii*, in der Rinde von *Acacia mearnsii* und weiteren Pflanzen gefunden werden (HAWTHORNE und MORGAN, 1962; DREWES und ROUX, 1963). CHARLESWORTH und ROBINSON gelang 1933 die Synthese dieses Flavonoids. Das Vorkommen von Robinetin in *Echinacea*-Arten wurde bisher noch nicht belegt.

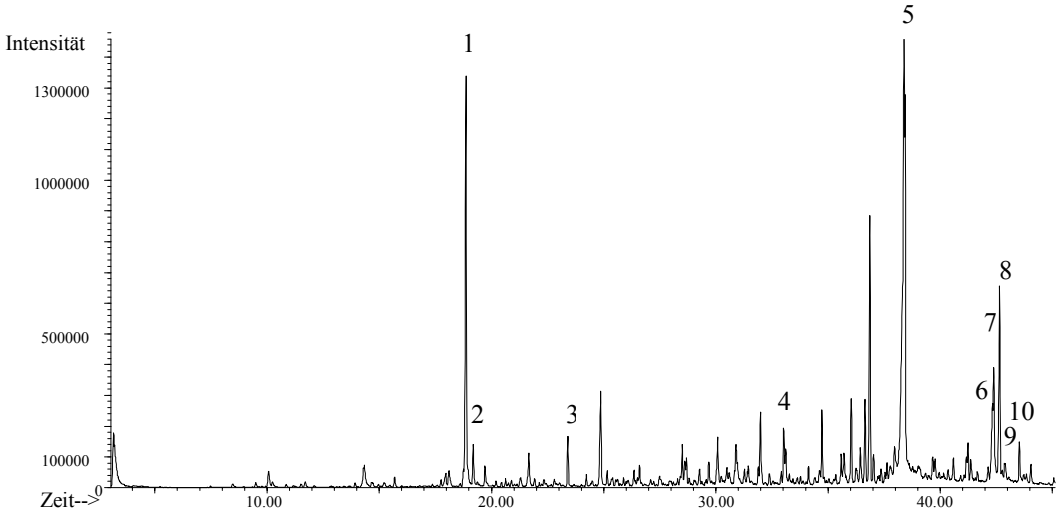
Neben einer insektiziden Wirkung gegenüber *Heliothis zea* konnte für Robinetin eine moderate Hemmung eines Mutagens in *Salmonella typhimurium* und eine gute Hemmung der HIV-1 Integrase nachgewiesen werden (HARBORNE, 1994; EDENHARDER et al., 1997; FESEN et al., 1994). Die Autoren führten die gute Wirkung von Robinetin im Vergleich zu einigen anderen Flavonoiden auf die ortho-ständigen Hydroxylgruppen in Ring B zurück.

4.6. Identifizierung der Inhaltsstoffe aus dem ätherischen Öl von Echinacea atrorubens

Aus chemotaxonomischen Gründen wurde das ätherische Öl von *E. atrorubens* untersucht. Dieses wurde aus der getrockneten Wurzel und dem getrockneten Kraut von *E. atrorubens* mittels Wasserdampfdestillation gewonnen (siehe Kapitel 9.4, Seite 161).

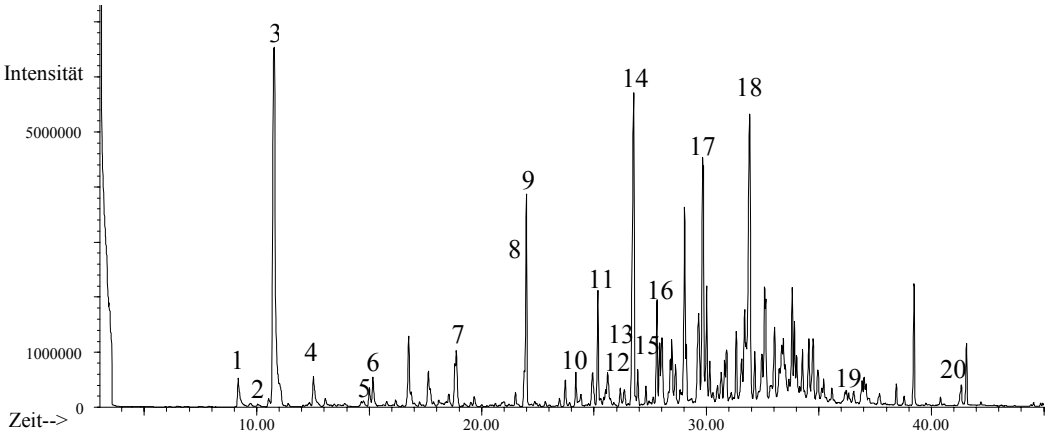
Wie bei *E. angustifolia* und *E. purpurea* wiesen auch die Wurzeln von *E. atrorubens* einen sehr niedrigen Ätherisch-Ölgehalt auf, der bei 0,03 % lag. Da bereits drei Jahre gelagerte Wurzeln verwendet wurden (Ernte 1997), ist zu vermuten, dass der Gehalt in frischen Wurzeln noch etwas höher liegt.

Das Kraut zeigte einen Gehalt von 0,13 % und enthielt damit etwas mehr ätherisches Öl als E. angustifoliae herba und etwas weniger als das Kraut von *E. pallida* (siehe Kapitel 2.2.7, Seite 15).



1	= Thymol	6	= Linolsäure
2	= Carvacrol	7	= Dodeca-2*E*,4*E*,8*Z*-triensäure-isobutylamid
3	= β-Caryophyllen	8	= Dodeca-2*E*,4*E*-diensäure-isobutylamid
4	= Myristinsäure	9	= Dodeca-2*E*,4*Z*,10*Z*-trien-8-insäure-isobutylamid
5	= Palmitinsäure	10	= Dodeca-2*E*,4*E*,8*Z*,10*E/Z*-triensäure-isobutylamid **A8/9**

Abbildung 4.51:Gaschromatogramm des ätherischen Öls aus E. atrorubens radix (GC-Methode: GC3).



1	= α-Pinen	11	= Copaen
2	= Camphen	12	= Germacren D
3	= β-Pinen	13	= Gurjunen
4	= Limonen	14	= β-Caryophyllen
5	= 1-Undecen	15	= Patchoulen
6	= Linalool	16	= α-Caryophyllen
7	= Myrtenal	17	= δ-Amorphen
8	= 1-Tridecen	18	= Caryophyllenoxid
9	= Bornylacetat	19	= Myristinsäure
10	= α-Cubeben	20	= Palmitinsäure

Abbildung 4.52:Gaschromatogramm des ätherischen Öls aus E. atrorubens herba (GC-Methode: GC3).

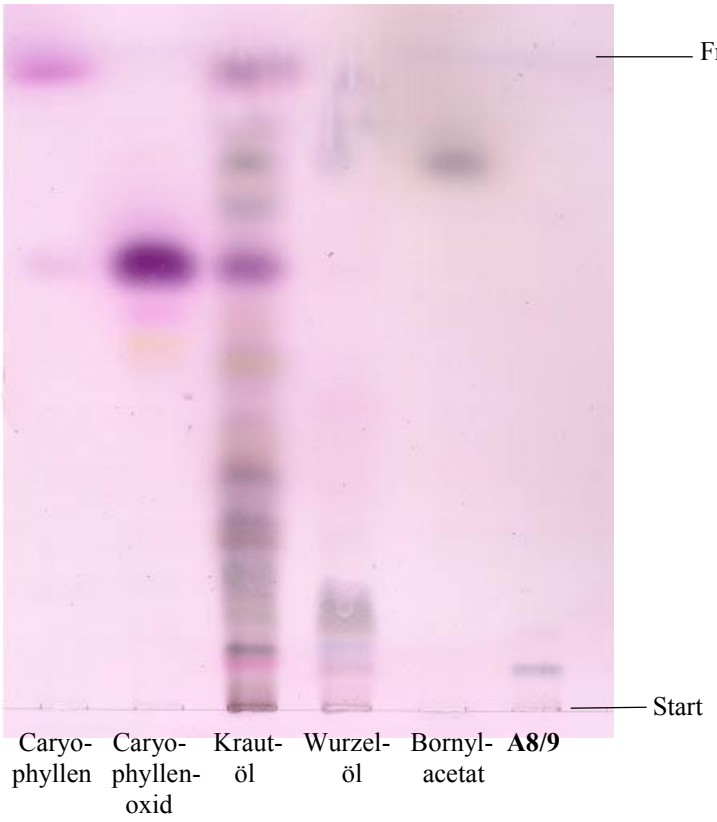


Abbildung 4.53:Dünnschichtchromatogramm des ätherischen Öls aus E. atrorubens *mit Vergleichssubstanzen (Trennsystem: DC-T2; Detektion: Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz/VIS).*

Die einzelnen Bestandteile des ätherischen Öls wurden zum einen durch GC-EI-Massenspektrometrie und zum anderen durch vergleichende Dünnschichtchromatographie identifiziert (siehe Abbildung 4.53). Die Isobutylamide aus dem ätherischen Öl der Wurzel konnten weiterhin durch HPLC-Analyse nachgewiesen werden (siehe Kapitel 4.1.1, Seite 45). Abbildung 4.51 und Abbildung 4.52 zeigen die durch Vergleich mit einer Spektrenbibliothek identifizierten Ätherisch-Öl-Komponenten.

Wie im Kraut der anderen drei medizinisch verwendeten *Echinacea*-Arten wurden Bornylacetat, Germacren D, Caryophyllen, Caryophyllenepoxid und Palmitinsäure auch in E. atrorubens herba nachgewiesen. Weiterhin konnten α-Pinen, β-Pinen und Limonen bereits in den Achänen dieser drei Arten identifiziert werden (siehe Kapitel 2.2.7, Seite 15). Die übrigen vorwiegend terpenoiden Ölbestandteile des Krautes von *E. atrorubens* konnten bisher noch nicht in der Gattung *Echinacea* nachgewiesen werden.

Im Wurzelöl von *E. atrorubens* wurden wie bei den anderen bekannten *Echinacea*-Arten hauptsächlich Fettsäurederivate identifiziert. Diese Verteilung, von terpenoiden Verbindungen im Kraut und Fettsäurederivaten in der Wurzel, erklärt die biologische Funktion der Inhaltsstoffe zum einen als insektenanlockende und antimikrobielle Verbindungen des Krautes und zum anderen als insektizide Substanzen in der Wurzel.
Die vorangegangenen Untersuchungen stellen die ersten Analysen des ätherischen Öls von *E. atrorubens* dar.

5 Eigene pharmakologische Untersuchungen

In vielen *in vivo*- und *in vitro*-Untersuchungen wurde bereits eine immunmodulierende Wirkung von *Echinacea*-Zubereitungen belegt (siehe Kapitel 2.3.6, 2.4.3 und 2.4.4). Um die Wirkungsweise verschiedener Alkamide auf das Immunsystem näher zu analysieren und um potentielle Struktur-Wirkungs-Beziehungen aufstellen zu können, wurden die aus E. atrorubens radix isolierten Alkamide im Rahmen dieser Arbeit auf ihre Wirkung hinsichtlich IL-6- und TNF-α- Freisetzung aus Makrophagen untersucht.

TNF-α gehört zu den Zytotoxinen und wird hauptsächlich nach Stimulation von Makrophagen, T- und NK-Zellen gebildet (BARON, 1996). Er ist beteiligt an der Abwehr von Infektionen, Verstärkung von Entzündungsreaktionen und der Beschleunigung der Wundheilung. Außerdem ist er für eine normale humorale und zelluläre Immunantwort notwendig.

IL-6 wird vor allem von Monozyten und Makrophagen produziert (BARON, 1996). Es induziert die Bildung von Akute-Phase-Proteinen und beeinflusst vor allem die B-Zell-Aktivierung. Insgesamt stellt es ein multifunktionelles Zytokin dar, dass auf eine Vielzahl von Zellen, zu denen auch Endothel-, Myelom- und T-Zellen gehören, wirkt.

5.1. IL-6- und TNF-alpha-Test

Im nachfolgend beschriebenen Testsystem wurden Peritonealmakrophagen von Mäusen jeweils zusammen mit den einzelnen Alkamiden in verschiedenen Verdünnungen inkubiert und der Überstand der Makrophagensuspension auf IL-6- und TNF-α-Freisetzung mittels ELISA getestet. Eingesetzt wurden Alkamidkonzentrationen von 4,3 µg/ml, 2,15 µg/ml, 1,075 µg/ml und 0,537 µg/ml.

Die IL-6-Ausschüttung konnte durch die Alkamide in diesem Testsystem insgesamt nur sehr schwach stimuliert werden. Bei einer Konzentration von 4,3 µg/ml wurde eine gewisse IL-6-Freisetzung durch die Alkamide **A5**, **A6**, **A8/9** und **A10** erzielt. Eine Konzentration von 2,15 µg/ml führte in keinem Fall zu einer Induktion von IL-6. Eine Konzentration von 1,07 µg/ml von **A8/9**, **A10**, **A16** und **A19/20** und von 0,54 µg/ml von **A8/9** führten noch zu einer geringfügigen Stimulierung. Wie die Abbildung 5.1 zeigt, konnte eine Konzentrationsabhängigkeit der IL-6-Induktion durch die Alkamide jedoch nicht festgestellt werden.

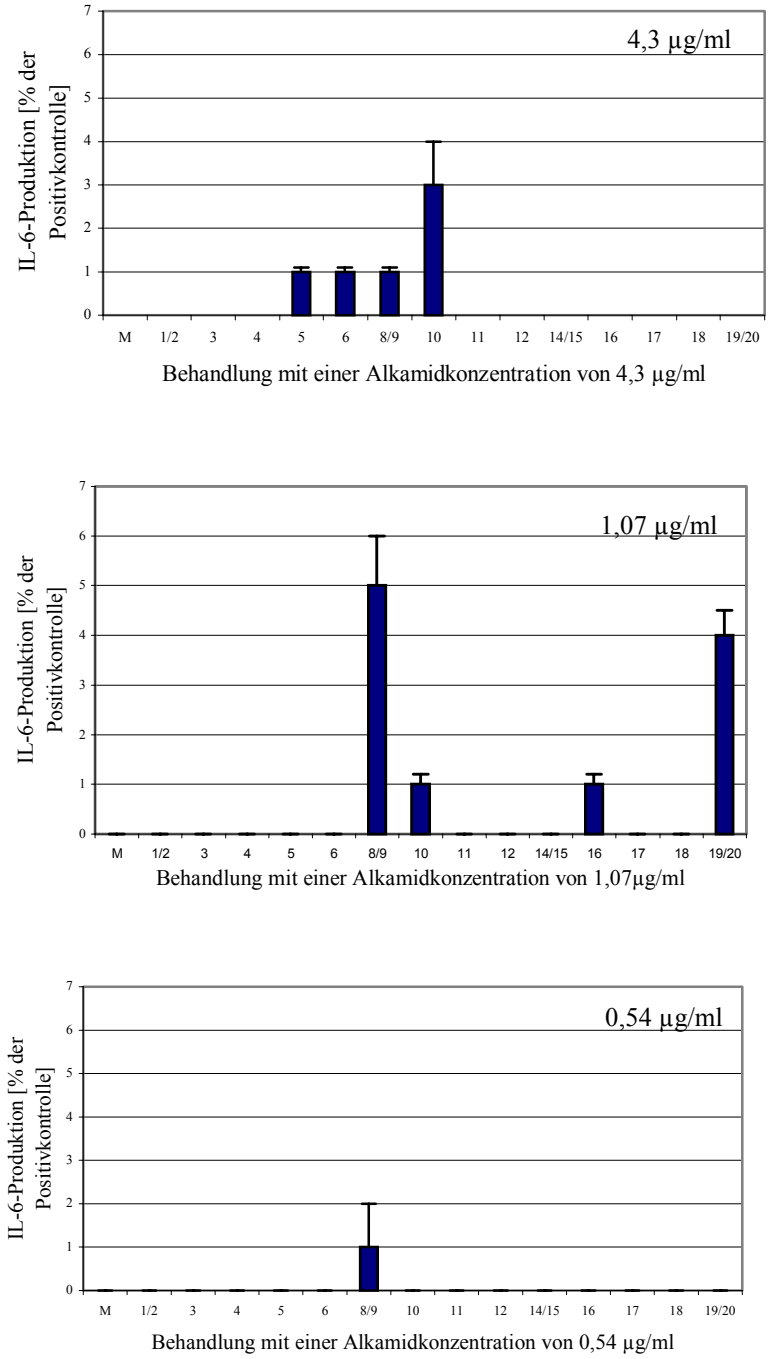


*Abbildung 5.1: Stimulierung von Peritonealmakrophagen durch Alkamide in drei verschiedenen Konzentrationen (**1**: 4,3 µg/ml; **2**: 1,07 µg/ml; **3**: 0,54 µg/ml) bezogen auf eine Positiv-Kontrolle (Polysaccharidfraktion); M = Medium; n = 3; Numerierung siehe Tabelle 5.1.*

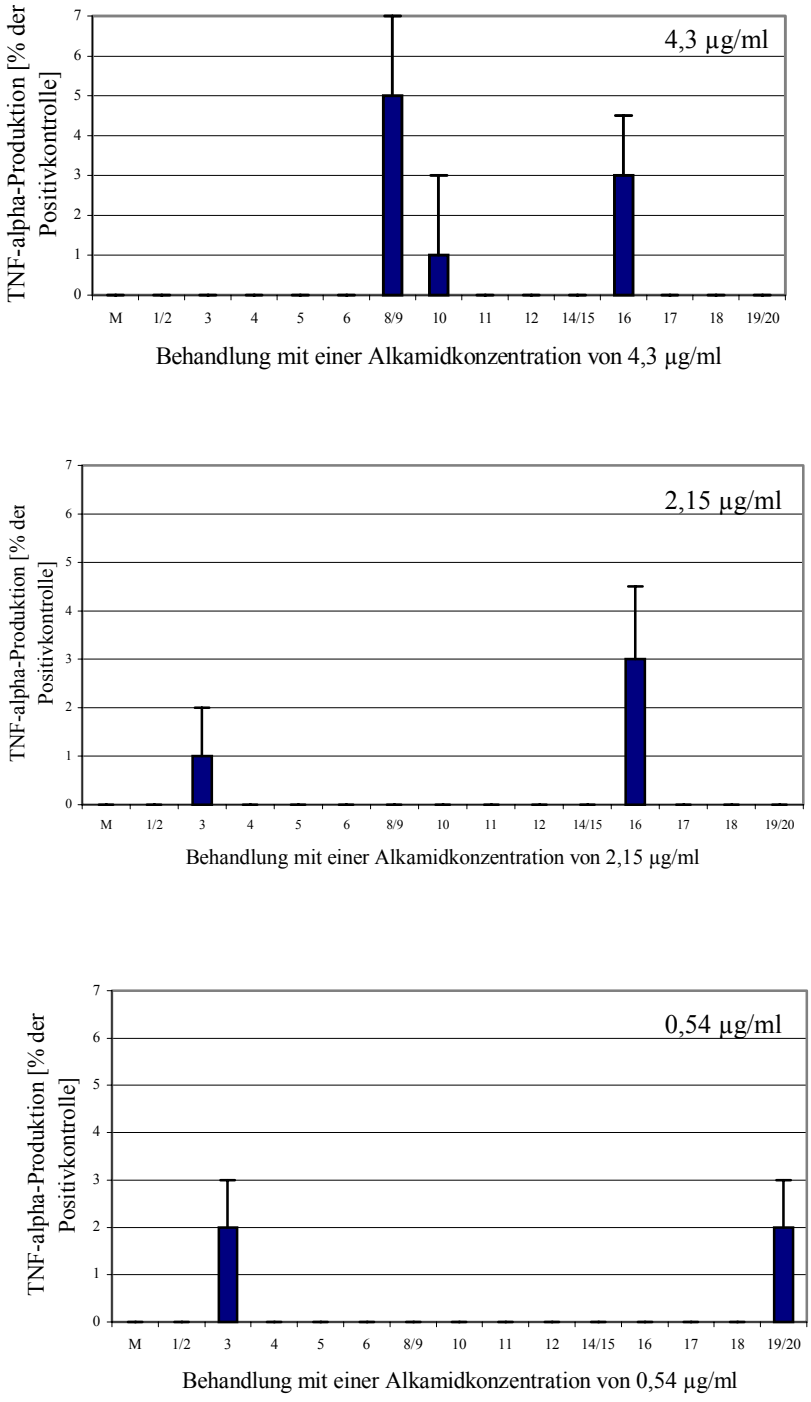


Abbildung 5.2 Stimulierung von Peritonealmakrophagen durch drei verschiedene Alkamidkonzentrationen (1: 4,3 µg/ml, 2: 2,15 µg/ml, 3: 0,54 µg/ml) bezogen auf eine Positiv-Kontrolle (Polysaccharidfraktion); M = Medium; n = 3; Numerierung siehe Tabelle 5.1.

Tabelle 5.1: Bezeichnungen der aus E. atrorubens radix isolierten und im IL-6- und TNF-α-Test eingesetzten Alkamide 1-20 (außer 13).

Alkamid	Bezeichnung
1/2	Undeca-2*E*,4*Z*/*E*-dien-8,10-diinsäure-isobutylamid
3	Undeca-2*E*-en-8,10-diinsäure-isobutylamid
4	Dodeca-2*E*,4*Z*-dien-8,10-diinsäure-isobutylamid
5	Dodeca-2*E*-en-8,10-diinsäure-isobutylamid
6	Dodeca-2*E*,4*Z*,10*Z*-trien-8-insäure-isobutylamid
7	Trideca-2*E*,7*Z*-dien-10,12-diinsäure-isobutylamid
8/9	Dodeca-2*E*,4*E*,8*Z*,10*Z*/*E*-tetraensäure-isobutylamide
10	Dodeca-2*E*,4*E*,8*Z*-triensäure-isobutylamid
11	Dodeca-2*E*,4*E*-diensäure-isobutylamid
12	Dodeca-2*E*,4*Z*,10*Z*-trien-8-insäure-2-methylbutylamid
14/15	Dodeca-2*E*,10*Z*/*E*-dien-8-insäure-isobutylamide
16	Pentadeca-2*E*,9*Z*-dien-12,14-diinsäure-isobutylamid
17	Dodeca-2*E*,4*E*-diensäure-2-methylbutylamid
18	Dodeca-2*E*,4*E*,8*Z*-triensäure-2-methylbutylamid
19/20	Dodeca-2*E*,4*E*,8*Z*,10*Z*/*E*-tetraensäure-2-methylbutylamide

Die TNF-α-Produktion wurde in diesem Testsystem durch die Alkamide ebenfalls nur in geringem Maße induziert. Bei einer Konzentration von 4,3 µg/ml führten hierbei wiederum das Dodeca-2*E*,4*E*,8*Z*-triensäure-isobutylamid **A10**, die Dodeca-2*E*,4*E*,8*Z*,10*Z*/*E*-tetraensäure-isobutylamide **A8/9** und das Pentadeca-2*E*,9*Z*-dien-12,14-diinsäure-isobutylamid **A16** zu einer leichten TNF-α-Stimulierung. Nach einer Verdünnung der Lösungen konnte durch die Alkamide **A8/9** und **A10** keine TNF-α-Induktion mehr erzielt werden. Schwach stimulierende Effekte zeigten weiterhin die Alkamide **A3** und **A16** bei einer Konzentration von 2,15 µg/ml und **A3** und **A19/20** bei einem Gehalt von 0,54 µg/ml (siehe Abbildung 5.2).

Die vorangegangenen Untersuchungen stellen erste *in vitro*-Ergebnisse bezüglich der Induktion von Zytokinen durch verschiedene Alkamide dar. Weitere Untersuchungen, insbesondere Testung anderer Zytokine und Verwendung anderer Makrophagen, wie zum Beispiel Alveolarmakrophagen, sind noch notwendig, um genauere Aussagen über den Mechanismus der immunmodulierenden Wirkung, wie sie kürzlich in *vivo* für Alkamide gezeigt werden konnte (GOEL et al., 2002), zu erhalten.

6 Eigene pharmakokinetische Untersuchungen

Die meisten bisherigen pharmakologischen Untersuchungen der Alkamide wurden mit *in vitro* Tests vorgenommen, so dass diese Ergebnisse keine Auskunft über die Wirkungen *in vivo* geben. Bioverfügbarkeits- bzw. Resorptionsstudien von *Echinacea*-Zubereitungen existieren bisher nicht (siehe Kapitel 2.6). Aus diesem Grund war es ein weiteres Ziel dieser Arbeit, Hinweise auf die Resorption von *Echinacea*-Inhaltsstoffen zu erhalten und eine Methode zu entwickeln, um Alkamide aus menschlichem Blut und Urin extrahieren und anschließend nachweisen und quantifizieren zu können. Damit sollten dann erste Resorptionsstudien durchgeführt werden.

Da die Dodeca-2E,4E,8Z,10Z/E-tetraensäure-isobutylamide die Hauptalkamide in *Echinacea*-Extrakten und Zubereitungen darstellen, wurden diese stellvertretend für alle anderen Alkamide als Leitsubstanz verwendet.

6.1. Entwicklung einer Methode zum Alkamidnachweis im Humanblut

6.1.1. Voruntersuchungen

Extraktionsverfahren der Dodeca-2E,4E,8Z,10Z/E-tetraensäure-isobutylamide
Um eine möglichst niedrige Nachweisgrenze für die Alkamide zu erhalten, musste als erstes ein effektives Extraktions- und Anreicherungsverfahren der Isobutylamide aus Blut gefunden werden. Für Voruntersuchungen wurde eine Urtinktur aus *E. purpurea* (HAB) und deren Verdünnungen (1:10; 1:100 und 1:1000) verwendet, da in dieser Tinktur die Dodeca-2E,4E,8Z,10Z/E-tetraensäure-isobutylamide (**8/9**) in ausreichender Menge enthalten sind und diese daher auch für Resorptionsstudien verwendet werden sollte. Die lipophilen Isobutylamide lassen sich sehr gut mit Chloroform aus der Urtinktur anreichern, so dass zwei verschiedene Flüssig-Flüssig-Verteilungsmethoden mit Chloroform getestet wurden. Zum einen wurden die Isobutylamide aus 20 ml Urtinktur bzw. den Verdünnungen mit Chloroform ausgeschüttelt, zum anderen wurde eine Flüssig-Flüssig-Extraktion unter Verwendung von Kieselgurmaterial (Extrelut®-20-Säulen, Firma Merck) mit Chloroform durchgeführt. Bei dem Extrelut®-Verfahren befindet sich das wäßrige Medium, wie die Urtinktur bzw. das Plasma, als stationäre Phase auf dem Kieselgurmaterial. Durch hydrophobe Lösungsmittel als mobile Phase lassen sich dann die lipophilen Substanzen, in diesem Fall die Alkamide, ohne die Gefahr der Emulsionsbildung extrahieren (BREITER, 1978).

Die vereinigten Chloroformphasen aus den beiden Extraktionsverfahren wurden jeweils zur Trockne eingeengt und der Rückstand für die HPLC-Analyse in Ethanol aufgenommen. Die Wiederfindungsrate der Isobutylamide wurde bestimmt, in dem die

ethanolischen Lösungen HPLC-chromatographisch untersucht wurden und die Peakfläche der extrahierten Isobutylamide mit derjenigen aus der eingesetzten Urtinktur oder Verdünnung ins Verhältnis gesetzt wurde. Als Trennverfahren wurde die für die HPLC-chromatographische Analyse von Alkamiden aus *Echinacea*-Arten entwickelte Methode verwendet (REMIGER, 1988). Da in diesem Fall nur die Dodeca-2E,4E,8Z,10Z/E-tetraensäure-isobutylamide mit einer möglichst niedrigen Nachweisgrenze bestimmt werden sollten, wurde als Detektionswellenlänge 260 nm, das UV-Maximum von **8/9** ausgewählt (HPLC-Methode: **Tet**).

Tabelle 6.1: Wiederfindungsraten der Dodeca-2E,4E,8Z,10Z/E-tetraensäure-isobutylamide aus der Urtinktur von E. purpurea (HAB), Mittelwerte aus drei Bestimmungen.

	Wiederfindung [%]	**rel. Standardabweichung [%]**
Ausschüttelverfahren	91,7	4,3
Extrelutverfahren	93,4	4,5

Wie aus Tabelle 6.1 ersichtlich ist, unterscheiden sich die Wiederfindungsraten und relativen Standardabweichungen der beiden Methoden nicht signifikant voneinander. Das Extrelutverfahren weist jedoch einige Vorteile gegenüber der Ausschüttelmethode auf. So treten weder Emulsionen, noch Koagulation der organischen Lösungsmittel mit Blutbestandteilen auf, die Reproduzierbarkeit ist höher und es wird eine automatische Phasentrennung durch einen am Eluatauslauf eingebauten hydrophobisierten Filter erreicht (BREITER, 1978; LEVEN, 1988). Deshalb wurde diese Methode zur Gewinnung der Alkamide bevorzugt. Eingesetzt wurde hierbei eine Glassäule, die jeweils mit neuem Extrelutmaterial befüllt wurde.

Die auf dieselbe Weise durchgeführten Blindwertanalysen zeigten im HPLC-Chromatogramm keinerlei den Nachweis der Isobutylamide störenden Signale.

Da aus Umweltschutz- und toxikologischen Gründen auf die Verwendung von Chloroform verzichtet werden sollte, wurde die Extraktionsausbeute an Dodeca-2E,4E,8Z,10Z/E-tetraensäure-isobutylamide nach Elution mit Chloroform und Dichlormethan verglichen. Dabei trat kein signifikanter Unterschied auf ($p < 0,05$), so dass im folgenden die Isobutylamide von der Extrelut®-Säule mit Dichlormethan eluiert wurden.

Eine Extraktion mit dreimal 40 ml Dichlormethan führte dabei zu einer nahezu vollständigen Wiederfindung von **8/9**. Bei einer weiteren Aufgabe von Dichlormethan auf die Säule konnten im Eluat keine Dodeca-2*E*,4*E*,8*Z*,10*Z/E*-tetraensäure-isobutylamide mehr nachgewiesen werden.

Vorversuche mit Humanplasma

In ersten Untersuchungen mit Humanplasma überprüften wir zunächst die Spezifität der oben genannten Extraktionsmethode. Spezifität bedeutet, dass der Nachweis der

Dodeca-2E,4E,8Z,10Z/E-tetraensäure-isobutylamide nicht durch andere miteluierende, endogene Verbindungen aus dem Plasma gestört wird. Alkamidfreie Plasmaproben wurden hierfür zum einen 1:4 und zum anderen im Verhältnis 1:1 mit dest. Wasser verdünnt. 20 ml dieser Lösung wurden anschließend wie oben beschrieben auf die Extrelutsäule gegeben und mit Dichormethan eluiert. Um eine stärkere Aufkonzentrierung der Isobutylamide zu erreichen, wurde die zur Trockne eingeengte Dichlormethanphase in nur 200 µl eines Acetonitril-Wassergemisches (1:1) aufgenommen. Insgesamt wurde dadurch eine Aufkonzentrierung um den Faktor 50 erreicht. 100 µl dieser Lösung wurden direkt HPLC-chromatographisch untersucht. Die erhaltenen Chromatogramme zeigten keine den Nachweis von **8/9** störenden Signale.

Weiterhin wurden den Plasmaproben definierte Mengen von selbst isolierten Dodeca-2E,4E,8Z,10Z/E-tetraensäure-isobutylamiden zugesetzt, um die Wiederfindungsraten der Alkamide aus dem Humanplasma bestimmen zu können. Zum einen wurden, wie es die Vorschrift für das Extrelut®-Verfahren vorsieht, 5,0 ml gespiktes Plasma mit Wasser auf 25,0 ml (**Plasmalösung A**), zum anderen, 10,0 ml Plasma mit Wasser auf 20,0 ml verdünnt (**Plasmalösung B**). Jeweils 20 ml wurden anschließend auf die Extrelut®-Säule gegeben und nach einer Einwirkungszeit von 30 Minuten wie oben beschrieben mit dreimal 40 ml Dichlormethan extrahiert, zur Trockne eingeengt, der Rückstand in 200 µl Acetonitril/Wasser (1:1) aufgenommen und einer HPLC-Analyse unterzogen. Dieses Verfahren wurde dreimal wiederholt. Als Standard diente die theoretisch zu erhaltende Menge an Isobutylamiden einer Dodeca-2E,4E,8Z,10Z/E-tetraensäure-isobutylamid-Stammlösung, so dass mit den Peakflächen der alkamidhaltigen Plasmalösung und der reinen Alkamid-Stammlösung die Wiederfindungsraten bestimmt werden konnten (siehe Tabelle 6.2).

Tabelle 6.2: Wiederfindungsraten der Dodeca-2E,4E,8Z,10Z/E-tetraensäure-isobutylamide aus einer Plasmalösung (Mittelwerte aus 3 Bestimmungen)

	Wiederfindung [%]	**rel. Standardabweichung [%]**
Plasmalösung A	94,6	14,0
Plasmalösung B	94,4	6,5

Da sowohl das Aufarbeitungsverfahren **A** (1:4 Verdünnung) als auch das Verfahren **B** (1:1 Verdünnung) zu einer hohen Wiederfindungsrate von etwa 94 % führten, wählten wir die Methode **B**, um eine weitere Aufkonzentrierung der Tetraensäureisobutylamide zu erzielen.

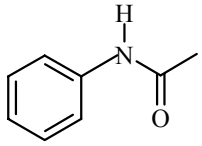
Interner/Externer Standard

Für komplexere Probenaufarbeitungen und für niedrigere Probenkonzentrationen, wie es in der Regel bei pharmakokinetischen Studien der Fall ist, wird vom (CDER) (Center for Drug Evaluation and Research, 1994) zur quantitativen Bestimmung des Analyten eine Interne Standard-Methode empfohlen. Der Vorteil des internen Standards ist, dass Fehler bei der Probenaufbereitung, wie zum Beispiel geringe Abweichungen im Dosiervolumen, ausgeschaltet werden. Da bei der Extraktion der Dodeca-2E,4E,8Z,10Z/E-tetraensäure-isobutylamide mehr Aufarbeitungsschritte notwendig sind als bei der quantitativen Bestimmung der Alkamide in *Echinacea*-Extrakten, wurde in diesem Fall der Methode des internen Standards der Vorzug gegeben.

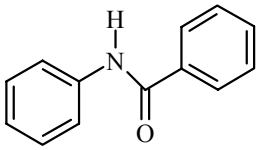
Dazu musste als erstes ein geeigneter interner Standard gefunden werden, der unter den Arbeitsbedingungen stabil, in reiner Form erhältlich ist, ähnliche chromatographische und spektroskopische Eigenschaften aufweist und keine Überlappungen mit endogenen Substanzen aus dem Plasma im HPLC-Chromatogramm zeigt.

Es wurden folgende Substanzen als potentielle interne Standards ausgewählt:

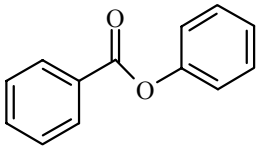
- Acetanilid



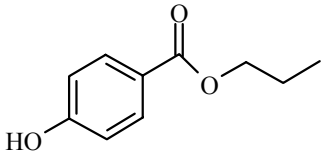
- Benzanilid



- Phenylbenzoat



- Propyl-4-hydroxybenzoat



Diese wurden auf ihr chromatographisches und spektroskopisches Verhalten untersucht. Dabei wies nur Benzanilid die oben genannten Voraussetzungen für die Verwendung als interner Standard auf: Die Detektion von Benzanilid bei einer Retentionszeit von 4,4 Minuten wurde nicht durch coeluierende Substanzen gestört. Außerdem lag das UV-Maximum wie das der Dodeca-2E,4E,8Z,10Z/E-tetraensäure-isobutylamide bei 260 nm und zeigte eine ähnliche Extinktion. Bei den anderen getesteten Substanzen wurde entweder die Elution durch coeluierende, körpereigene Substanzen gestört oder sie zeigten eine nicht mit den Dodeca-2E,4E,8Z,10Z/E-tetraensäure-isobutylamiden vergleichbare UV-Extinktion.

Als nächstes sollte die Wiederfindungsrate des Benzanilids nach Aufarbeitung durch das oben genannte Extrelutverfahren bestimmt werden. Da sich in verschiedenen Wiederfindungs- und Kalibrierversuchen Schweineplasma und Human-Plasma als gleichwertig herausstellten und uns Humanplasmakonserven oder Humanblut nur begrenzt zur Verfügung standen, führten wir die Vorversuche mit Schweineplasma durch. Eine Benzanilidmenge von 2,028 µg (200 µl einer BA-Verdünnung (10,14 µg/ml), die der ebenfalls mit **8/9** versetzten Plasmaverdünnung vor der Extraktion zugesetzt wurde, erwies sich als optimal. Die Plasmalösung wurde wie oben beschrieben aufgearbeitet und HPLC-chromatographisch untersucht. Anschießend wurde die Wiederfindungsrate aus der Peakfläche der aufbereiteten Benzanilidplasmalösung und der Fläche unter dem Signal der gleichen Menge einer reinen Benzanilid-Stammlösung errechnet. Die mittlere Wiederfindungsrate von 98,6 % aus 5 Bestimmungen (rel. Standardabw. 2,2 %) zeigt, dass Benzanilid mit dieser Methode sehr effizient und reproduzierbar wiedergewonnen werden kann. Da, wie die vorangegangenen Versuche verdeutlichen, Benzanilid ähnliche chromatographische und spektroskopische Eigenschaften aufweist wie die Dodeca-2E,4E,8Z,10Z/E-tetraensäure-isobutylamide, ist diese Verbindung als interner Standard für die Quantifizierung der Alkamide gut geeignet.

Stabilitätsprüfungen der dodeca-2E,4E,8Z,10Z/E-tetraensäure-isobutylamid- und benzanilidenthaltenden Plasmalösungen

Um zu überprüfen, ob sich die Proben während der Probenvorbereitung, kurzfristigen Lagerung oder HPLC-Analyse zersetzten, wurde die Stabilität der mit Alkamid und Benzanilid versetzten Plasmaproben über einen Zeitraum von 24 Stunden zum einen bei Raumtemperatur, zum anderen im Kühlschrank bei 4 °C kontrolliert. Diese Versuche wurden wiederum mit Schweineplasma durchgeführt. Nach der HPLC-Analyse wurden die resultierenden Peakflächen der gelagerten Proben der Isobutylamide **8/9** und des Benzanilids mit den entsprechenden Peakflächen der Proben, die direkt nach der Aufarbeitung vermessen wurden, verglichen (siehe Tabelle 6.3). Hierbei zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den sofort vermessenen oder den nach 24 Stunden vermessenen Proben ($p < 0,05$).

Damit war die Stabilität der Plasmaproben während der kurzfristigen Lagerung und Probenaufarbeitung gesichert.

Tabelle 6.3: Peakflächen der Dodeca-2E,4E,8Z,10Z/E-tetraensäure-isobutylamide und von Benzanilid (BA) im Schweineplasma nach direkter HPLC-Analyse und nach Lagerung von 24 Stunden bei 4 °C bzw. bei Raumtemperatur (n=3).

	Direkte Untersuchung des Plasmas	**Nach 24 Std. Lagerung bei 4 °C**	**Nach 24 Std. Lagerung bei RT**
Peakfläche 8/9 mAU*s	5980,65 (2,42 %)	6013,61 (4,76 %)	5108,42 (4,55 %)
Peakfläche BA mAU*s	2792,97 (5,96 %)	2300,23 (9,71 %)	2476,52 (13,41 %)

Stabilitätsprüfung der Standardlösungen

Um die Stabilität der Standardlösungen, die dem Plasma für die Aufnahme der Kalibriergeraden und Wiederfindungswerte zugesetzt wurden, über einen längeren Zeitraum zu überprüfen, wurden die Benzanilid- (10,14 µg/ml) und Dodeca-2E,4E,8Z,10Z/E-tetraensäure-isobutylamid-Verdünnung (31,2 µg/ml) mittels HPLC nach einer Lagerzeit von 2 Monaten im Kühlschrank überprüft. Hierbei wurde kein signifikanter Unterschied der Dodeca-2E,4E,8Z,10Z/E-tetraensäure-isobutylamid- und Benzanilidkonzentration festgestellt ($p < 0,05$; siehe Tabelle 6.4, n=3).

*Tabelle 6.4: Signalflächen von Benzanilid und Dodeca-2E,4E,8Z,10Z/E-tetraensäure-isobutylamiden (**8/9**) in den Standardlösungen direkt nach der Herstellung und nach 2 monatiger Lagerung bei 4 °C (n=3).*

	Peakfläche (mAU*s) sofort	**Peakfläche (mAU*s) nach 2 Monaten**
Benzanilid	418,59 (14,9%)	409,74 (3,1 %)
8/9	697,47 (6,6 %)	619,59 (10,5 %)

Systemeignung

Um die Leistung und Zuverlässigkeit der HPLC-Anlage zu überprüfen, wurden 100 µl einer Dodeca-2E,4E,8Z,10Z/E-tetraensäure-isobutylamid (1,88 µg/ml) und Benzanilid enthaltenden (3,81 µg/ml) Lösung jeweils zehnmal injiziert. Dabei ergab sich eine relative Standardabweichung von 0,84 % für **8/9** und von 0,82 % für Benzanilid. Dies erfüllte die empfohlenen Normen des „Center for Drug Evaluation and Research“ (rel. Standardabw. ≤ 1 % für n ≥ 5; (CDER), 1994).

6.1.2. Validierung der entwickelten Methode mit Humanblut

Spezifität

Um sicher zu gehen, dass keine Signale endogener Substanzen den Dodeca-2E,4E,8Z,10Z/E-tetraensäure-isobutylamid- oder Benzanilidnachweis stören, wurde als

erstes wiederum das alkamid- und benzanilidfreie Blut untersucht. Das erhaltene Chromatogramm des Blindwertes zeigte weder bei der Retentionszeit des Benzanilids noch bei der von **8/9** störende Signale körpereigener Substanzen.

Da die Blindwertbestimmungen mit Blut bzw. Plasmaproben von insgesamt vier verschiedenen Spendern durchgeführt wurden und alle Proben keine mit den Isobutylamiden coeluierenden Substanzen aufwiesen, war sichergestellt, dass mit dieser HPLC-Methode speziell nur die Dodeca-2E,4E,8Z,10Z/E-tetraensäure-isobutylamide bei einer Retentionszeit zwischen 10 und 12 min eluiert und detektiert wurden.

Kalibriergerade

Um den Dodeca-2E,4E,8Z,10Z/E-tetraensäure-isobutylamidgehalt im Blut quantifizieren zu können, wurde eine Kalibriergerade mit vier verschiedenen Konzentrationen an **8/9** erstellt. Dabei wurde ein sehr niedriger Konzentrationsbereich abgedeckt, da nach der Einnahme von *Echinacea*-Präparaten eine sehr geringe Alkamid-Konzentration im Blut zu erwarten war. Nachdem das frische, mit definierten Konzentrationen an Dodeca-2E,4E,8Z,10Z/E-tetraensäure-isobutylamiden versetzte Humanblut zentrifugiert worden war, wurden 10,0 ml Plasma mit Wasser zu 20 ml verdünnt und mit Benzanilid (2,028 µg ⇒ 101,4 ng/ml Plasma) versetzt. Wie oben beschrieben wurde diese Lösung quantitativ auf eine Extrelut®-20-Säule aufgegeben und nach 30 Minuten mit Dichlormethan eluiert. Der zur Trockne eingeengte Dichlormethanrückstand des Eluates wurde anschließend in 200 µl Acetonitril-Wasser (1:1) aufgenommen und HPL-chromatographisch untersucht.

- Nachweis und Quantifizierungslimit

Eine Konzentration von 10 ng/ml erwies sich als Quantifizierungslimit. Bei dieser Konzentration konnten die Alkamide aufgrund ihres UV-Spektrums und Retentionszeiten im HPL-Chromatogramm noch eindeutig nachgewiesen werden. Mit einer Standardabweichung von 16 % und einer Wiederfindungsrate von 95 % (siehe Tabelle 6.5) wurden auch die von der US-FDA empfohlenen Normen erfüllt (1998).
Die Nachweisgrenze, die über das Signal-Rauschverhältnis von 3:1 bestimmt wurde, lag bei 6 ng/ml.

- Linearität

Für die Erstellung der Kalibriergeraden wurden die Konzentrationen 20, 30 und 150 ng **8/9** pro ml Blut eingesetzt. Nach der HPLC-Analyse wurden die Massenverhältnisse der Dodeca-2E,4E,8Z,10Z/E-tetraensäure-isobutylamide und des Benzanilids mit den entsprechenden Peakflächenverhältnissen korreliert. Hierbei konnte ein lineares Verhältnis über den gesamten, geprüften Bereich, von 10-150 ng/ml Blut festgestellt werden (siehe Abbildung 6.1). Der Korrelationskoeffizient von 0,99989, das Bestimmtheitsmass von 0,99978 und die einzelnen Standardabweichungen (siehe Tabelle 6.5) erfüllen die Kriterien einer linearen Kalibriergeraden (US-FDA, 1998).

Tabelle 6.5: Peakflächen- und Massenverhältnisse der Dodeca-2E,4E,8Z,10Z/E-tetraensäure-isobutylamid und Benzanilid enthaltenden Blutproben und Standardabweichungen der Peakflächenintegrale (n=3).

Konzentration [ng /ml]	Präzision	Präz.-Kriterien*	FV 8/9/BA	MV 8/9/BA.
10	16.4 %	< 20 % LOQ	0,0933	0,0762
20	10.5 %	< 15 %	0,1212	0,0984
30	6.8 %	< 15 %	0,1734	0,1475
150	13.5 %	< 15 %	0,8535	0,7377
Benzanilid 101,4	13.2 %	< 15 %		

* Präzisions-Kriterien nach der US-FDA (1998).

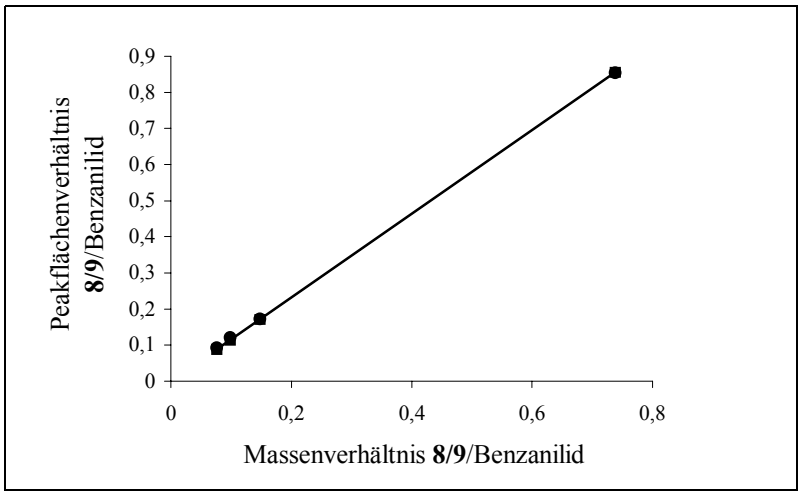


Abbildung 6.1: Kalibriergerade der mit Dodeca-2E,4E,8Z,10Z/E-tetraensäure-isobutylamiden versetzten Blutproben (10, 20, 30, 150 ng/ml Blut, n=3).

Wiederfindung

Sowohl Benzanilid mit 94 % als auch alle vier Dodeca-2E,4E,8Z,10Z/E-tetraensäure-isobutylamid-Konzentrationen zeigten gute Wiederfindungsraten mit Werten zwischen 95 und 115 % (siehe Abbildung 6.2).

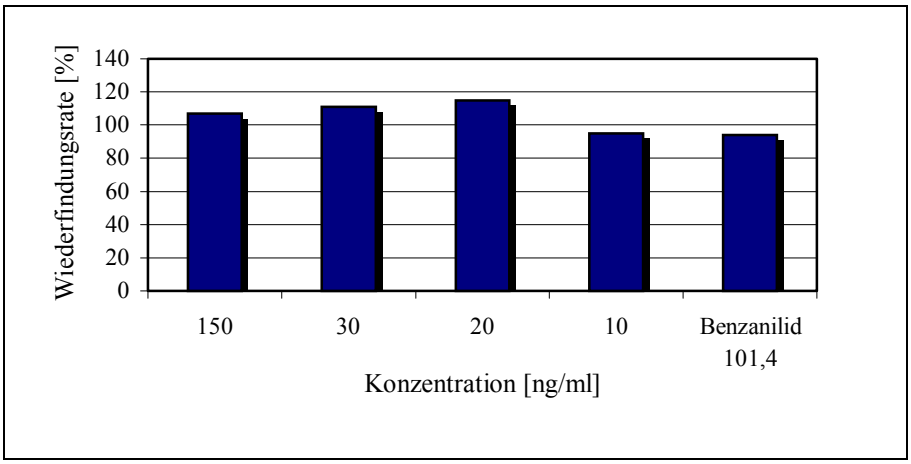


Abbildung 6.2: Wiederfindungsraten der Dodeca-2E,4E,8Z,10Z/E-tetraensäure-isobutylamide und von Benzanilid in humanem Blut

Mit der entwickelten Methode war es somit möglich, bis zu 10 ng Dodeca-2E,4E,8Z,10Z/E-tetraensäure-isobutylamide pro ml Humanblut quantitativ nachzuweisen.

6.2. Erste Bioverfügbarkeitsstudien von Alkamiden

6.2.1. Bioverfügbarkeitsuntersuchungen der Dodeca-2E,4E,8Z,10Z/E-tetraensäure-isobutylamide im Humanblut nach oraler Applikation von *E. purpurea*-Urtinktur

Um Hinweise über die Resorption der Dodeca-2E,4E,8Z,10Z/E-tetraensäure-isobutylamide zu erhalten, wurde der Gehalt der Alkamide im menschlichen Blut nach oraler Applikation von *E. purpurea* Urtinktur (HAB1) untersucht. Für diese Studie wurde eine alkoholische Lösung ausgewählt, da diese aufgrund ihrer größeren Lipophilie einen höheren Isobutylamidgehalt aufweist als wässrige Extrakte. Im Vergleich zu anderen handelsüblichen Urtinkturen wies die in der Studie benutzte Tinktur „Immudynal“, mit 47,5 µg/ml an Dodeca-2E,4E,8Z,10Z/E-tetraensäure-isobutylamiden, den höchsten Alkamidgehalt auf.

In einem ersten Selbstversuch wurde jeweils vor und 1, 2 und 3 Stunden nach der ersten und zweiten Einnahme von jeweils 40 ml Urtinktur, entsprechend 1,9 mg Dodeca-2E,4E,8Z,10Z/E-tetraensäure-isobutylamiden, Blut entnommen und anschließend nach der oben beschriebenen Methode untersucht. Dabei wurde in den Blutproben, die jeweils eine Stunde nach Applikation entnommen wurden, Isobutylamide nachgewiesen. Diese waren jedoch unterhalb des Quantifizierungslimits. 2 und 3 Stunden nach der Einnahme war die Alkamidkonzentration bereits unter die Nachweisgrenze gesunken.

Um eine höhere Konzentration im Blut zu erreichen, wurde ein zweiter Versuch mit aufkonzentrierter Urtinktur durchgeführt. Es wurde eine Stunde nach der Einnahme von 65 ml einer Lösung, die 4,3 mg Dodeca-2E,4E,8Z,10Z/E-tetraensäure-isobutylamide enthielten, Blut entnommen. Nun konnten die Alkamide deutlich im HPLC-Chromatogramm nachgewiesen (siehe Abbildung 6.3) und zu 44 ng pro ml Blut mit einer rel. Standardabweichung von 15,0 % (n = 3) quantifiziert werden.

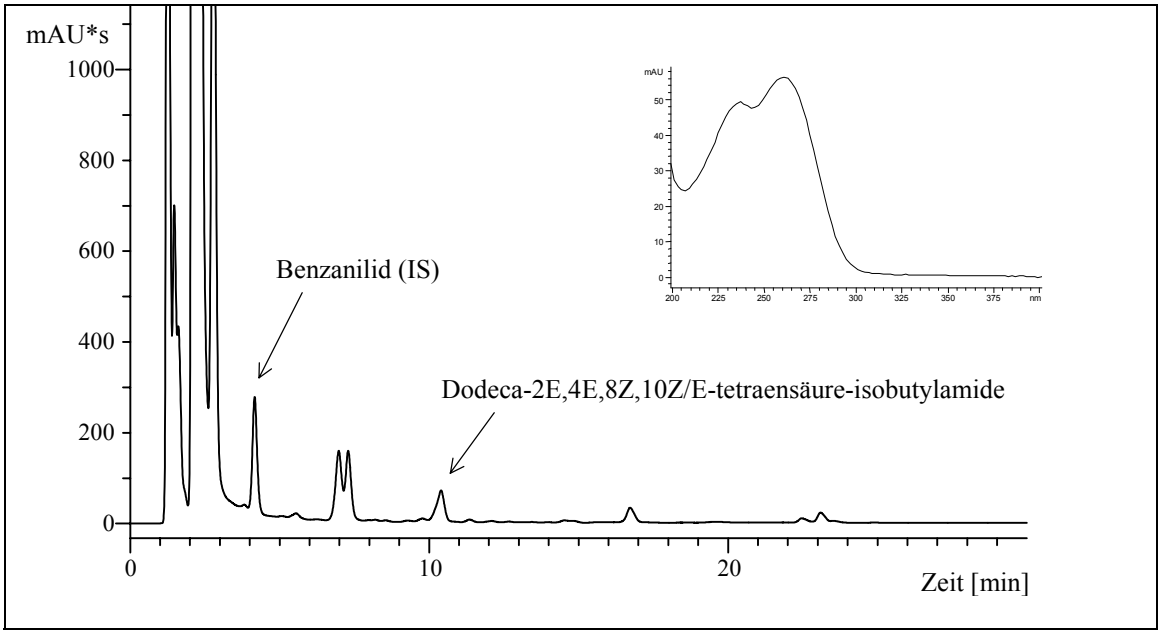


*Abbildung 6.3: HPLC-Chromatogramm einer Plasmaprobe nach der oralen Applikation von E. purpurea Urtinktur, die 4,3 mg Dodeca-2E,4E,8Z,10Z/E-tetraensäure-isobutylamide (**8/9**) enthielt, mit dem UV-Spektrum von **8/9**.*

Diese Pilotstudien wurden durchgeführt, um erste grundsätzliche Hinweise über die Resorption von Alkamiden zu erhalten. Detailierte pharmakokinetische Studien mit einem größeren Probandenkollektiv müssen zeigen, in welchem genauem Ausmaß und mit welcher Geschwindigkeit Alkamide resorbiert und metabolisiert werden. Hierbei wäre eine Blutentnahme wenige Minuten nach der Einnahme eines alkamidreichen *Echinacea*-Präparates sinnvoll, da aufgrund ihrer Lipophilie eine schnelle Resorption der Alkamide über die Mundschleimhaut und über den Magen-Darmtrakt wahrscheinlich ist. Außerdem läßt der erste Einnahmeversuch und die Alkamidstruktur eine schnelle Metabolisierung der Substanzen vermuten, so dass möglicherweise die maximale Blutkonzentration bereits innerhalb der ersten Stunde erreicht sein könnte.

Die oben aufgeführten Versuche zeigen eindeutig, dass Alkamide nach oraler Applikation resorbiert werden und so an den *in vivo* Wirkungen von *Echinacea*-Präparaten beteiligt sein könnten.

Insgesamt stellen diese Studien die ersten Ergebnisse zur Resorption von *Echinacea*-Inhaltsstoffen dar.

6.2.2. Untersuchungen der Dodeca-2*E*,4*E*,8*Z*,10*Z/E*-tetraensäure-isobutylamide im Urin nach oraler Applikation von *E. purpurea*-Urtinktur

Untersuchung nach der Extrelut®-Methode

Um Kenntnisse über das Eliminationsverhalten der Alkamide zu erhalten, untersuchten wir den menschlichen Urin nach der oralen Applikation von 50 ml *E. purpurea*-Urtinktur, entsprechend einer Menge von 2,4 mg Dodeca-2*E*,4*E*,8*Z*,10*Z/E*-tetraensäure-isobutylamiden. Hierbei standen zunächst rein qualitative Aspekte im Vordergrund, so dass, wie es die Extrelut®-Vorschrift vorsieht, jeweils 20,0 ml des unverdünnten Urins direkt auf die Extrelut®-20-Säule gegeben und nach der oben genannten Methode (siehe Kapitel 6.1.2) auf Isobutylamide überprüft wurden. Im Urin, der vor der Einnahme der Urtinktur gesammelt wurde, und im Urin, der innerhalb der 24 Stunden nach der oralen Applikation der Tinktur entnommen wurde, konnten jedoch keine Alkamide nachgewiesen werden.

Auch nach einer weiteren Aufkonzentrierung des Urins, wobei 80 ml Urin auf die vierfache Menge des Extrelutmaterials gegeben wurden, konnten keine Alkamide im HPLC-Chromatogramm detektiert werden.

Festphasenextraktion mit C-18-Material

Da mit einer Festphasenextraktion eine starke Aufkonzentrierung und ebenfalls eine selektive Extraktion des Analyten aus einem komplexen Gemisch, wie Plasma oder Urin, erreicht werden kann, sollte diese Methode für die Urinproben als Alternative zum Extrelut®-Verfahren untersucht werden. Dabei wurde RP-18 Material ausgewählt, an dem die Dodeca-2E,4E,8Z,10Z/E-tetraensäure-isobutylamide zunächst adsorbiert und anschließend mit Acetonitril eluiert wurden.

Um das Verfahren zu prüfen, wurde die Wiederfindungsrate einer wässrigen Dodeca-2E,4E,8Z,10Z/E-tetraensäure-isobutylamid-Lösung (50 ng/ml) nach Elution von den RP-18-Kartuschen bestimmt. Hierzu wurden 20,0 ml dieser Lösung auf die mit Methanol und Wasser vorkonditionierte RP-18-Kartusche aufgetragen. Nach Waschen mit destilliertem Wasser wurde mit dreimal 2,0 ml Acetonitril unter Vakuum eluiert. Die vereinigten Acetonitrileluate wurden schonend zur Trockne eingeengt und HPLC-chromatographisch untersucht (Methode: **Tet**). Durch Peakflächenvergleich mit der gleichen Menge einer unbehandelten Dodeca-2E,4E,8Z,10Z/E-tetraensäure-isobutylamid-Stammlösung wurde eine Wiederfindungsrate von 90 % bestimmt. In der Waschlösung und in dem Acetonitril nach einer weiteren Elution konnten keine Isobutylamide mehr nachgewiesen werden.

Ziel dieser Untersuchung war es, eventuell vorhandende, geringe Mengen an Isobutylamiden im Urin qualitativ nachweisen zu können, bevor eine Weiter-entwicklung der Methode für quantitative Fragestellungen durchgeführt werden sollte.

Ein Vorteil dieser Festphasenextraktion ist, dass das Fassungsvermögen der C-18-Kartuschen lediglich durch die Masse an Analyten, nicht jedoch durch das Probenvolumen begrenzt ist. So konnten große Mengen Urin (50-180 ml) auf die Säule aufgetragen werden und nach leicht modifizierten Arbeitsvorschriften für die Festphasenextraktion untersucht werden. Eingesetzt wurden hierbei zum einen Urinproben, die vor der Einnahme von aufkonzentrierter *E. purpurea*-Urtinktur, entsprechend 4,9 mg Dodeca-2E,4E,8Z,10Z/E-tetraensäure-isobutylamide, entommen wurden und zum anderen Proben, die nach oraler Applikation, gesammelt wurden. Der Urin wurde in Anteilen auf die Säule aufgetragen und mit Vakuum über die Säule befördert. Inmitten und am Ende der Probenaufgabe wurde immer wieder mit Wasser gewaschen. Nach Elution mit Acetonitril wurde das Eluat zur Trockne eingeengt, mit 200 µl Acetonitril/Wasser (1:1) aufgenommen und HPLC-chromatographisch untersucht (Trennsystem: **Tet**).

Die Blindprobe zeigte keine Signale bei der Retentionszeit von **8/9** (10-11 min) im HPLC-Chromatogramm. Auch mit Hilfe dieser Methode konnten trotz des großen Probenvolumens keine Alkamide im Urin nach der Einnahme von fast 5 mg Isobutylamiden nachgewiesen werden.

Die gute Wiederfindungsrate von **8/9** aus der wässrigen Alkamid-Lösung mittels der Festphasenextraktionsmethode auf RP-18-Material weist darauf hin, dass dies eine Alternative zum Extrelutverfahren darstellen könnte. Um diese Methode jedoch quantitativ nutzen zu können, müsste eine weitere Optimierung und Validierung des Verfahrens stattfinden.

Die durchgeführten Untersuchungen lassen jedoch bereits Rückschlüsse auf den qualitativen Nachweis der Isobutylamide zu. Außerdem lassen die Ergebnisse vermuten, dass die Alkamide entweder aufgrund der lipophilen Struktur sehr schnell ins Fettgewebe und in Membranen eingelagert, oder nicht renal bzw. stark metabolisiert ausgeschieden werden.

6.3. Diffusionsstudien der Alkamide an Adenocarcinomzellen

Um genauere Informationen über die intestinale Resorption und Metabolisierung von Alkamiden zu erhalten, wurde die Resorptionskinetik der Dodeca-2E,4E,8Z,10Z/E-tetraensäure-isobutylamide an menschlichen Adenocarcinom-Colonzelllinien (Caco-2 Monolayer) über einen Zeitraum von 6 Stunden untersucht (JAGER et al., 2002).

Als erstes wurden die Isobutylamide auf ihre cytotoxische Wirkung gegenüber den Caco-2-Zellen untersucht. Über einen Konzentrationsbereich von 1 - 50 µg/ml wurde

innerhalb von 24 Stunden kein cytotoxischer Effekt der Dodeca-2E,4E,8Z,10Z/E-tetraensäure-isobutylamide beobachtet.

Für die Resorptionsversuche erwies sich in der Donatorphase eine Alkamidkonzentration von 25 µg/ml als geeignet. Bereits nach 30 Minuten wurden 15 % der Dodeca-2E,4E,8Z,10Z/E-tetraensäure-isobutylamide in der Akzeptorphase nachgewiesen. Um Sinkbedingungen zu schaffen, wurde die Akzeptorphase in regelmäßigen Zeitabständen ausgetauscht (siehe Exp. Teil Kapitel 9.9.3, Seite 180). Nach 4 Stunden konnte eine ca. 80 prozentige Diffusion der Alkamide durch die Caco-2-Zellen festgestellt werden. Eine signifikante Metabolisierung von **8/9** wurde nicht beobachtet.

Um zu überprüfen, ob es sich bei dem Alkamidtransport, um einen passiven oder aktiven Mechanismus handelte, wurden die gleichen Versuche statt bei 37 °C bei 4 °C wiederholt. Hierbei zeigte sich nur eine geringfügig schwächere Permeation der Dodeca-2E,4E,8Z,10Z/E-tetraensäure-isobutylamide. Dieses spricht für eine passive Diffusion der Alkamide, da bei Molekülen, die durch einen aktiven Mechanismus transportiert werden, ein stärkerer Penetrationsabfall bei niedrigen Temperaturen beobachtet werden würde. Auch eine Entzündung der Caco-2-Zellen, hervorgerufen durch eine Inkubation der Zellen zusammen mit Lipopolysaccharid aus *Escherichia coli* (LPS) oder Phorbol-12-Myristat-13-acetat (PMA) jeweils 2 Stunden vor der Alkamidzugabe, führte zu kaum einer Reduktion des transepithelialen Transportes der Alkamide (siehe Abbildung 6.4).

Diese Ergebnisse sprechen für eine gute intestinale Resorption der Alkamide, so dass diese tatsächlich an der *in vivo* Wirkung der *Echinacea*-Präparate beteiligt sein könnten.

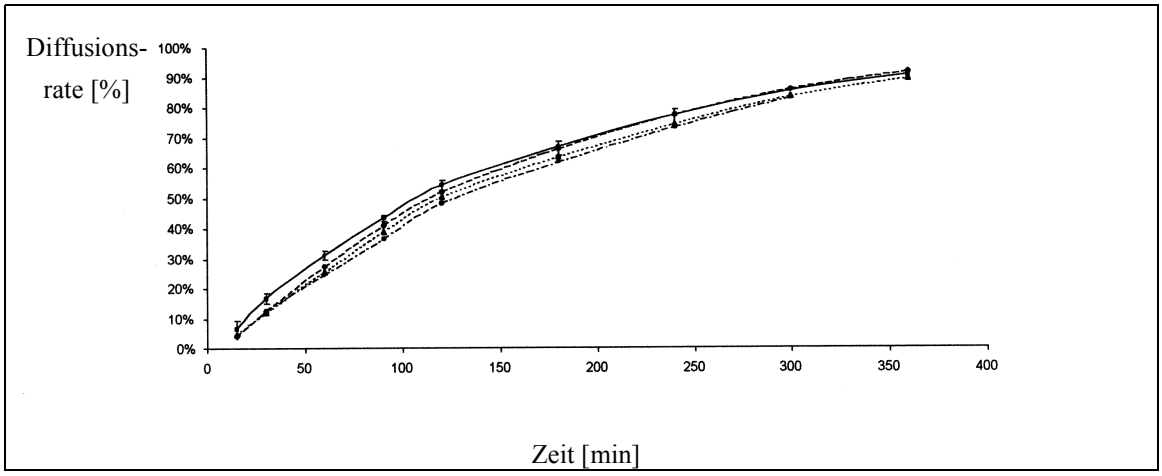


Abbildung 6.4: Diffusionsrate der Dodeca-2E,4E,8Z,10Z/E-tetraensäure-isobutylamide durch Caco-2-Zellen über 6 Stunden. Symbole: ❁: Inkubation bei 37 °C; ●: Inkubation bei 4 °C; ⇦: Inkubation bei 37 °C unter Zusatz von PMA; ↖: Inkubation bei 37 °C unter Zusatz von LPS.

7 Diskussion

Wie in dieser Arbeit ausgeführt wurde, wird *Echinacea* bereits seit Jahrhunderten von den Indianerstämmen Nordamerikas bei Zahnschmerzen, Entzündungen des Rachens, schlecht heilenden Wunden und fieberhaften Erkrankungen angewandt. In den letzten Jahren wurde intensiv in klinischen und pharmakologischen Untersuchungen die Wirkungsweise von *Echinacea*-Arten erforscht. So konnte für viele der tradionellen Anwendungsgebiete eine rationale Basis gefunden werden. Die vielfach belegte lokalanästhetische Wirkung der alkamidreichen *E. angustifolia*-Wurzeln erklärt zum Beispiel die Anwendung bei Zahnschmerzen und Entzündungen des Rachens. Die wundheilungsfördernde Wirkung von *Echinacea*-Extrakten wurde auf die Anti-Hyaluronidase-Aktivität des enthaltenden Echinacosids zurückgeführt. In vielen pharmakologischen Untersuchungen ist weiterhin die stimulierende Wirkung auf das unspezifische Immunsystem beschrieben worden, die eine Anwendung der *Echinacea*-Zubereitungen bei der unterstützenden Therapie von grippeartigen und rezidivierenden Infekten sinnvoll macht. Mittlerweile gehören *Echinacea*-Präparate zu den populärsten pflanzlichen Immunstimulantien in Europa und den USA.

Insgesamt wurden nach MCGREGOR (1968) 9 *Echinacea*-Arten beschrieben, von denen die drei medizinisch eingesetzten Arten, *E. angustifolia*, *E. pallida* und *E. purpurea*, phytochemisch sehr gut untersucht sind. In der vorliegenden Arbeit wurde eine weitere bisher noch nicht untersuchte Art, *Echinacea atrorubens*, phytochemisch analysiert, zum einen aus chemotaxonomischen Gründen und zum anderen um zu klären, ob diese Art mit den medizinisch verwendeten vergleichbar ist.

Zunächst wurde die *E. atrorubens*-Droge mikroskopisch untersucht, um Unterschiede bzw. Gemeinsamkeiten zu den medizinisch eingesetzten *Echinacea*-Arten herauszustellen. Dabei konnte festgestellt werden, dass der Wurzelquerschnitt anatomische Ähnlichkeiten zu *E. angustifolia* und *E. pallida*, jedoch größere Unterschiede zu *E. purpurea* zeigte.

Bei der phytochemischen Analyse wurde ein besonderes Augenmerk auf die Untersuchung der Alkamide gelegt, die wegen ihrer phagozytosestimulierenden und entzündungshemmenden Eigenschaften als potentielle Wirkstoffe in Frage kommen.

Die lipophilen Inhaltsstoffe von E. atrorubens radix stellten ein komplexes Alkamidgemisch dar (siehe 4.1.1, Seite 45). Neben wenigen 2-Methylbutylamiden konnten, wie in E. purpureae und E. angustifoliae radix, hauptsächlich Isobutylamide nachgewiesen werden. Diese besaßen vorwiegend 2,4-Dienamidstrukturen und ähnelten damit vor allem den Alkamiden aus E. purpureae radix. 2-Monoenamide, wie sie in den Wurzeln von *E. angustifolia* vorkommen, traten ebenfalls auf, jedoch nur in geringeren Konzentrationen (siehe Kapitel 4.1.1, Seite 45). Die Hauptalkamide des Krautes und der Wurzel aus *E. angustifolia* und *E. purpurea*, die isomeren Dodeca-2*E*,4*E*,8*Z*,10*Z*/*E*-

tetraensäure-isobutylamide **A8/9**, stellten ebenfalls die Hauptsubstanzen im Alkamidspektrum von E. atrorubens radix und herba dar. Im Vergleich zu den beiden erstgenannten Arten wiesen die Wurzeln von *E. atrorubens* mit 0,104 % die höchste Konzentration und das Kraut einen mit E. purpureae herba vergleichbaren Gehalt von 0,013 % an **A8/9** auf (siehe Tabelle 4.3, Seite 52). Weiterhin wies das HPLC-Fingerprintchromatogramm des *n*-Hexanextraktes von *E. atrorubens* radix auf eine sehr hohe Konzentration an Alkamid **A6** hin.

Insgesamt wurden 20 Alkamide aus *E. atrorubens* isoliert, von denen bereits **A1**, **A7**, **A8/9**, **A11** und **A16** für *E. angustifolia* und *E. purpurea* beschrieben wurden. **A3**, **A5** und **A6** konnten bisher nur in *E. angustifolia* und **A10** und **A13** nur in *E. purpurea* nachgewiesen werden. **A2**, **A12**, **A14/15**, **A17**, **A18** und **A19/20** stellen neue Naturstoffe dar. Eine Übersicht der isolierten Alkamide aus *E. atrorubens* gibt Abbildung 8.1, Seite 148.

Insgesamt ähnelt das Alkamidspektrum von *E. atrorubens* Wurzeln vor allem dem von E. purpureae radix, es zeigt jedoch auch Gemeinsamkeiten mit E. angustifoliae radix.
Das des Krautes gleicht dem Spektrum der drei medizinisch eingesetzten *Echinacea*-Arten.

Während die lipophilen Inhaltsstoffspektren der Krautdrogen von *E. pallida* und *E. atrorubens* große Übereinstimmungen zeigten, unterschieden sich die der entsprechenden Wurzeldrogen eindeutig, da Polyacetylene in *E. atrorubens* nur in Spuren in frisch geernteten Wurzeln nachgewiesen werden konnten.

Die hydrophilen Inhaltsstoffmuster der drei medizinisch eingesetzten *Echinacea*-Arten unterscheiden sich von dem von *E. atrorubens* deutlich, da sowohl Cichoriensäure als auch Echinacosid und Cynarin im Kraut und in der Wurzel von *E. atrorubens* fehlen. Während in der Wurzel von *E. atrorubens* mittels UV-Detektor bei 360 nm keine Kaffeesäurederivate in größeren Mengen detektierbar waren, enthielt das Kraut Chlorogensäure, Rutin, Isochlorogensäure und das erstmals in der Gattung *Echinacea* beschriebene Flavonoidglycosid Narcissin.

In einer vergleichenden HPLC- und DC-Analyse lieferten alle vier getesteten *E. atrorubens*-Chargen ein homogenes Bild, so dass damit eine eindeutige Charakterisierung der *E. atrorubens*-Droge gewährleistet werden kann.

Die durchgeführten phytochemischen Untersuchungen machen somit deutlich, dass *E. atrorubens* zumindest hinsichtlich des lipophilen Inhaltsstoffspektrums näher den Gattungen *E. purpurea* und *E. angustifolia* zuzuordnen ist als zu *E. pallida*.

Auf der anderen Seite wurde von BINNS (2001), die eine taxonomische Revision der Gattung *Echinacea* aufgrund von morphologischen Merkmalen durchgeführt hat (siehe Kapitel 2.1.1, Seite 2), *E. atrorubens var. atrorubens* unter dem Subgenus Pallida gemeinsam mit den Arten *E. pallida var. pallida* und *E. pallida var. angustifolia* zusammengefasst und *E. purpurea* durch einen eigenen Subgenus deutlich von den

anderen *Echinacea*-Arten abgegrenzt. Diese Einteilung lässt sich zwar aufgrund des zu den anderen Arten deutlich variierenden Habitus und der abweichenden anatomischen Beschaffenheit der Wurzel von *E. purpurea* und der sich aus morphologischer und anatomischer Sicht näher stehenden Arten *E. angustifolia* und *E. pallida* nachvollziehen, ist aus phytochemischer Sicht jedoch nicht verständlich.

Dies macht deutlich, dass für eine taxonomische Analyse verschiedene Aspekte, wie morphologische, phylogenetische und phytochemische Untersuchungen, gemeinsam berücksichtigt werden sollten.

Nachdem die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen phytochemischen Ergebnisse über *E. atrorubens* bereits publiziert worden waren (DIETZ und BAUER, 2001), wurden von BINNS (2001) auch phytochemische Untersuchungen der einzelnen Arten vorgestellt. Dabei wurde unter anderem das hydrophile und lipophile Inhaltsstoffspektrum der neu beschriebenen Art, *E. atrorubens var. atrorubens*, mittels HPLC untersucht. Das resultierende HPLC-Chromatogramm des hydrophilen Extraktes aus E. atrorubens var. atrorubens herba stimmte weitgehend, bis auf ein fehlendes Rutosidsignal, mit dem in dieser Arbeit vorgestellten Chromatogramm aus E. atrorubens herba überein (siehe 4.1.1; Seite 45). Wie in unserem Extrakt waren auch in dem von BINNS aufgenommenen Fingerprintchromatogramm keine Peaks von Cichoriensäure, Echinacosid oder Cynarin erkennbar. Nach Angaben von BINNS sollen Cichoriensäure und Echinacosid jedoch in Spuren enthalten sein.

Das HPLC-Chromatogramm der lipophilen Kraut- und Wurzelextrakte zeigte ebenfalls als Hauptalkamide die Dodeca-2E,4E,8Z,10Z/E-tetraensäure-isobutylamide und weitere geringer konzentrierte Alkamide. Während das Inhaltsstoffmuster des Krautextraktes auch sonst weitgehend demjenigen des im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten entsprach, unterschied sich das Alkamidmuster des Wurzelextraktes deutlich von dem in Kapitel 4.1.1 aufgeführten. So lässt sich vermuten, dass es sich bei der von BINNS beschriebenen Art *E. atrorubens var. atrorubens* möglicherweise nicht um die entsprechende Art nach MCGREGOR (1968) *E. atrorubens* handelt, die von uns untersucht wurde. Möglicherweise stellen sie auch aufgrund der großen Variabilität und Kreuzungstendenzen zwei Varietäten innerhalb der Art dar. Detaillierte morphologische und anatomische Vergleiche der beiden Pflanzenmaterialien wären notwendig, um nähere Aussagen hierüber machen zu können.

Aufgrund der Ähnlichkeit des Alkamidspektrums von *E. atrorubens* zu den beiden medizinisch eingesetzten *Echinacea*-Arten, *E. angustifolia* und *E. purpurea,* sind ähnliche pharmakologische Eigenschaften zu erwarten. Da sich das hydrophile Inhaltsstoffspektrum von dem der anderen beiden Arten unterscheidet und bisher auch noch keine Analyse der Polysaccharidfraktion durchgeführt wurde, muß trotzdem angenommen werden, dass Unterschiede in der Wirksamkeit bestehen.

Welche Verbindungen für die Wirkung der unterschiedlichen *Echinacea*-Zubereitungen verantwortlich sind, ist bis heute nicht eindeutig geklärt. Zum einen stellten sich für die

hydrophilen Inhaltsstoffe, wie Cichoriensäure und Echinacosid, antioxidative, wundheilende, entzündungshemmende und für Cichoriensäure darüberhinaus phagozytosestimulierende Eigenschaften heraus (SLOLEY et al., 2001; SPERONI et al., 2002; MAFFEI FACINO et al., 1993; REMIGER; 1988) zum anderen wurden für die in *Echinacea*-Arten enthaltenen Polysaccharide und Glykoproteine phagozytose- und zytokinstimulierende Wirkungen *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen (BEUSCHER et al., 1995; STEINMÜLLER et al., 1993; MELCHART et al., 1993).

Weiterhin werden die in den lipophilen Fraktionen enthaltenen Alkamide als potentielle Wirkstoffe angesehen. So konnten für die Dodeca-2E,4E,8Z,10Z/E-tetraensäureisobutylamide sowohl COX-1 als auch 5-LOX-Hemmungen gezeigt werden (MÜLLER-JAKIC et al., 1994). In neueren Untersuchungen wurden in einem Testsystem an isoliertem Enzym aus Schafsamenblasen für verschiedene Alkamide aus *E. purpurea* relativ gute COX-1-Hemmungen (36-60 %) und schwächere Hemmraten für COX-2 (15-46 %, Konzentration jeweils 100 µg/ml) erzielt (CLIFFORD et al., 2002). Während hierbei die Alkamide Dodeca-2E,4E,8Z,10Z/E-tetraensäure-isobutylamide **A8/9** keine Wirkung zeigten, wurde in einem anderen ELISA-Testsystem am isolierten Reinenzym eine moderate Hemmrate von COX-1 (24 %) und COX-2 (35 %) für die Dodeca-2E,4E,8Z,10Z/E-tetraensäure-isobutylamide (50 µM) beobachtet (REININGER, 2001). Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass die Alkamide aus *Echinacea*-Arten aufgrund der moderaten COX-Inhibition, leichte entzündungshemmende Eigenschaften aufweisen.

Weiterhin erhöhten alkamidreiche lipophile Fraktionen aus E. purpureae und E. angustifoliae radix die Phagozytoserate *in vitro* und *in vivo* (BAUER et al., 1988). Die ebenfalls untersuchten hydrophilen Fraktionen der *Echinacea*-Extrakte zeigten eine wesentlich geringere Wirkung.

In neueren Tierversuchen an Ratten führte eine Alkamidfraktion aus Dodeca-2E,4E,8Z,10Z/E-tetraensäure-isobutylamide aus *E. purpurea* zu einer signifikanten Steigerung der phagozytotischen Aktivität von Alveolarmakrophagen (GOEL et al., 2002). Darüberhinaus produzierten die Alveolarmakrophagen, die aus den mit Alkamiden behandelten Ratten gewonnen wurden, nach einer Stimulierung mit LPS signifikant mehr TNF-α und NO. Cichoriensäure und Polysaccharide aus dem Kraut von *E. purpurea* zeigten in diesen Versuchen keine Wirkungen. Alle drei Verbindungen, Cichoriensäure, Polysaccharide und Alkamide, riefen keinen zytokin- oder phagozytosestimulierenden Effekt in Milzzellen hervor. So zeigten diese Versuche, dass Alkamide eine größere Wirkung auf Zellen der Lunge als auf die der Milz zu haben scheinen, was eine Erklärung liefern könnte für die gute Wirkung von alkamidhaltigen *Echinacea*-Zubereitungen bei Infekten des Respirationstraktes.

Um die immunstimulierende Wirkung der Alkamide näher zu untersuchen, wurden die aus E. atrorubens radix isolierten Alkamide (siehe Abbildung 8.1) auf ihre IL-6- und TNF-α-induzierende Wirkung auf Peritonealmakrophagen untersucht. Die Freisetzung

beider Zytokine wurde durch eine Alkamidkonzentration von 4,3 µg/ml nur schwach stimuliert. Die Alkamide **A8/9** und **A10** zeigten jedoch sowohl eine leichte IL-6- als auch eine TNF-α-induzierende Wirkung. Schwache IL-6-stimulierende Effekte zeigten weiterhin die Alkamide **A5**, **A6**, **A16** und **A19/20**. Geringe TNF-α-freisetzende Wirkungen wiesen die Alkamide **A3**, **A16** und **A19/20** auf, welche jedoch aufgrund der relativ großen Standardabweichungen und fehlenden Konzentrationsabhängigkeit als sehr gering einzustufen sind.

Weitere Untersuchungen, die eine potentielle stimulierende Wirkung der Alkamide auf das unspezifische Immunsystem zum Ziel haben können, wie Induktion weiterer Zytokine oder Steigerung der Proliferation und Aktivität von immunkompetenten Zellen, wie Natürliche Killerzellen, Monozyten und verschiedener Makrophagen, sind notwendig, um die Wirkungsweise der Alkamide endgültig klären zu können. Die oben genannten Versuche belegen jedoch bereits, dass sie vor allem an der immunstimulierenden Wirkung von *Echinacea*-Zubereitungen durch eine Phagozytosestimulierung insbesondere der Alveolarmakrophagen in nicht unerheblichem Maße beteiligt sein müssen.

Auffällig ist weiterhin die Ähnlichkeit der Alkamide aus *Echinacea*-Arten mit Anandamid (N-Arachidonyl-ethanolamin), einem endogenen Liganden der „Cannabinoidrezeptoren".

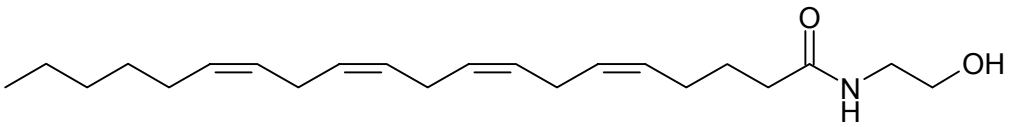


Abbildung 7.1: Anandamid (N-Arachidonyl-ethanolamin)

Die Stimulierung der CB_1-Rezeptoren im ZNS und in den peripheren sensorischen Neuronen durch den inhibitorischen Neurotransmitter Anandamid, führt wie der Marihuana Wirkstoff, Tetrahydrocannabinol, unter anderem zu einer analgetischen Wirkung (MARKS, 2000). Außerdem werden periphere CB_2-Rezeptoren vermehrt in B- und NK-Zellen exprimiert (PIOMELLI et al., 2000). Eine Aktivierung dieser Rezeptoren durch Cannabinoide oder Anandamid könnte ebenfalls zu einer entzündungshemmenden und immunmodulierenden Wirkung führen. Aufgrund des Einsatzgebietes von *Echinacea*-Zubereitungen und der strukturellen Ähnlichkeit der Alkamide mit Anandamid, wäre eine Wechselwirkung der Alkamide mit CB_1- und CB_2-Rezeptoren denkbar. In Strukturwirkungsbeziehungen konnten für N-Arachidonyl-isobutylamid sehr gute CB_1- und CB_2-Rezeptoraffinitäten und eine erhöhte Stabilität gegenüber Amidasen festgestellt werden (LIN et al., 1998). Diese Untersuchungen unterstützen eine mögliche „cannabinoide" Wirkung der Isobutylamide. Auf der anderen Seite kann eine Verkürzung der Arachidonyl-Kette zu einer Abnahme der Rezeptoraffinität führen.

Aus diesem Grund können erst detailierte Studien mit den *Echinacea*-Alkamiden zeigen, welche Verbindungen gute Rezeptoraffinitäten aufweisen.

Um eventuell toxische Effekte auf Zellen zu untersuchen, wurden verschiedene Alkamide, **A10**, **A11**, **A12**, **A8/9** und ein Undeca-2Z-en-8,10-diinsäure-isobutylamid aus *E. angustifolia*, auf ihre Zytotoxizität getestet. Dabei zeigten sie über einen Konzentrationsbereich von 5-50 ppm (n = 4) keine zytotoxischen Effekte auf KB Krebszellen. Der IC_{50}-Wert lag unter 25 ppm bzw. sogar unter 50 ppm (entsprechend 100-200µM), so dass eine toxische Wirkung der Alkamide auf Zellen ausgeschlossen werden kann.

Die meisten der pharmakologischen Untersuchungen sind in *in vitro*-Testsystemen durchgeführt worden, welche nichts über die Aktivitäten der Extrakte oder Substanzen *in vivo* aussagen, solange nicht die Bioverfügbarkeit geklärt ist. Bioverfügbarkeitsuntersuchungen waren jedoch mit *Echinacea*-Zubereitungen noch nicht durchgeführt worden.

In pharmakokinetischen Studien mit Schachtelhalmkraut konnte eine starke Metabolisierung von Mono- und Dikaffeoylweinsäurederivaten, wie Cichoriensäure, beobachtet werden (GRAEFE und VEIT, 1999).

In einer weiteren Studie wurde die Plasmakonzentration von Kaffeesäure nach der Einnahme von Rotwein untersucht. Hierbei konnte eine Stunde nach der Einnahme der höchste Kaffeesäuregehalt im Blut festgestellt werden (SIMONETTI et al., 2001).

Resorptionsstudien zu Polysacchariden oder Glykoproteinen fehlen bisher ganz. Eine Resorption dieser Makromoleküle über das Darmepithel ist sehr unwahrscheinlich, jedoch ist eine Stimulierung von immunologisch aktiven Zellen in den Peyer´schen Plaques oder anderem mukosaassoziiertem, lymphatischem Gewebe (MALT) denkbar.

Zu den Alkamiden existierten bisher ebenfalls keine Bioverfügbarkeits- oder Resorptionsstudien, so dass im Rahmen dieser Arbeit hierzu erste Versuche durchgeführt wurden.

Um die intestinale Resorption und Metabolisierung von Alkamiden studieren zu können, wurden Resorptionsstudien mit den Dodeca-2E,4E,8Z,10Z/E-tetraensäureisobutylamiden an menschlichen Adenocarcinomzellen über einen Zeitraum von 6 Stunden durchgeführt. Nach 30 Minuten waren bereits 15 % der Alkamide **A8/9** resorbiert und nach 4 Stunden konnte eine 80 prozentige Diffusion ohne eine signifikante Metabolisierung der Alkamide beobachtet werden. Durch eine Erniedrigung der Standardtemperatur von 37 ° auf 4 °C wurde nur eine wenig schwächere Diffusionrate erzielt. Die gute Penetration der Alkamide auch bei niedrigen Temperaturen deutet auf einen passiven Transport durch Biomembranen hin, da bei einem aktiven Transport ein stärkerer Penetrationsabfall beobachtet worden wäre. Mit diesen Versuchen konnte eine gute und vor allem schnelle intestinale Resorption der Alkamide belegt werden.

Außerdem weisen sie auf eine Bioverfügbarkeit der Alkamide nach oraler Applikation von *Echinacea*-Präparaten hin.

Um eine Bioverfügbarkeit der Alkamide endgültig beweisen zu können, wurde ein Pilotversuch durchgeführt. Hierfür wurde eine analytische HPLC-Methode zur Bestimmung der Alkamide im Humanblut entwickelt. Als Leitsubstanzen wurden die Dodeca-2E,4E,8Z,10Z/E-tetraensäure-isobutylamide **A8/9** stellvertretend für die anderen Alkamide untersucht.

Mit dem entwickelten Verfahren war es möglich, die Alkamide **A8/9** mit einer Wiederfindungsrate von 95-115 % und einer mittleren Präzision von 12 % in einem Bereich von 10 ng/ml bis zu 150 ng/ml im Blut quantitativ nachweisen zu können.

In ersten Bioverfügbarkeitsstudien konnte eine Stunde nach der Einnahme von 65 ml aufkonzentrierter Urtinktur, die 4,3 mg Dodeca-2E,4E,8Z,10Z/E-tetraensäureisobutylamide enthielt, 44 ng/ml der Alkamide **A8/9** im Blut nachgewiesen werden. Diese Pilotstudie beweist eindeutig, dass Alkamide nach oraler Applikation resorbiert werden und so an der *in vivo*-Wirkung von *Echinacea*-Präparaten beteiligt sein können.

In zukünftigen Studien sollte eine Blutentnahme wenige Minuten nach der Einnahme eines *Echinacea*-Präparates erfolgen, da aufgrund der Lipophilie eine schnelle Resorption der Alkamide über die Mundschleimhaut wahrscheinlich ist und die Resorptionsversuche an menschlichen Adenocarcinom-Colon-Zelllinien ebenfalls eine zügige Resorption der Alkamide gezeigt haben.

Um Hinweise auf das Eliminationsverhalten der Alkamide zu erhalten, wurde nach der oralen Applikation von *E. purpurea*-Urtinktur, die einmal einer Menge von 2,4 mg und einmal von 4,9 mg **A8/9** entsprach, der Probandenurin auf Alkamide untersucht. Obwohl mittels Festphasenextraktion eine Anreicherung des Urins um den Faktor 900 möglich war, konnten keine Alkamide darin detektiert werden. Dies schließt entweder eine Elimination der Substanzen über den renalen Ausscheidungsweg aus oder deutet daraufhin, dass die Alkamide bereits vollständig metabolisiert worden sind. Aufgrund der lipophilen Struktur der Alkamide ist weiterhin eine Einlagerung ins Fettgewebe und in Membranen denkbar.

Wie sich nach Veröffentlichung dieser Ergebnisse herausstellte, wurden ähnliche Untersuchungen von OSOWSKI (1998) durchgeführt. Hierbei wurde eine pharmakokinetische Studie mit vier Probanden, denen eine *E. purpurea*-Urtinktur in unterschiedlichen Dosisstufen appliziert wurde, durchgeführt. Erste Alkamidkonzentrationen wurden bereits nach 10 Minuten im Blut nachgewiesen, nach 20-30 Minuten wurde die maximale Serumkonzentration erreicht. Die Halbwertszeit der Alkamide betrug etwa 1 Stunde. Insgesamt wurden nur 10 % der applizierten Alkamide im Plasma wiedergefunden.

Außerdem wurde von OSOWSKI (1998) die Cichoriensäurekonzentration im Blut der Probanden nach der Einnahme eines Presssaftes aus dem Kraut von *E. purpurea*

bestimmt. Nach Extraktion der Cichoriensäure aus dem Plasma konnte diese mittels HPLC-UV-Analyse detektiert werden. Insgesamt wurde eine sehr niedrige Konzentration an Cichoriensäure im Blut (1,3 %) und ebenfalls eine sehr viel langsamere Resorption und Elimination dieser Verbindung als die der Alkamide festgestellt. Dies ist möglicherweise dadurch erklärbar, dass zum einen aufgrund der relativ hohen Polarität eine geringere Resorption zu erwarten war und zum anderen eine starke Metabolisierung zum Beispiel durch Esterasen anzunehmen war.

Weiterhin wurde von OSOWSKI Cichoriensäure auch im Urin nachgewiesen (0,08-0,32 %). Dies ist erstaunlich, da GRAEFE und Mitarbeiter (1999) eine starke Metabolisierung von Mono- und Dikaffeesäurederivaten nach der Einnahme eines Extraktes aus Schachtelhalmkraut festgestellt hatten. Neben Dihydrokaffeesäurederivaten wurde darüber hinaus ein hoher Gehalt an Glucuron- und Sulfatkonjugaten der Kaffeesäurederivate detektiert. Diese wurden in der Studie von OSOWSKI jedoch nicht näher untersucht. Weitere Studien mit einer größeren Probandenzahl müßten durchgeführt werden, um genauere Erkenntnisse über das Resorptions-, Metabolisierungs- und Eliminationsverhalten der Cichoriensäure zu erhalten.

Da Cichoriensäure durch Esterasen und Phenoloxidasen in *Echinacea*-Zubereitungen, vor allem in frischen Presssäften, sehr schnell abgebaut wird, ist deren Gehalt in den Zubereitungen in der Regel nur sehr gering (NÜSSLEIN et al., 2000). Die niedrige Konzentration in den *Echinacea*-Präparaten und die niedrige Resorptionsrate sprechen dafür, dass Cichoriensäure nach oraler Applikation nur in sehr geringen Konzentrationen bioverfügbar ist und so nur in geringem Umfang zu der *in vivo*-Wirkung von *Echinacea*-Zubereitungen beizutragen scheint. Andererseits gibt es Präparate, die bis zu 0,5 % Cichoriensäure enthalten, so dass hierbei auch relevante Plasmakonzentrationen erreicht werden würden (BAUER, 1997).

Für Polysaccharide wurden zwar gute phagozytose- und zytokinstimulierende Wirkungen nachgewiesen, jedoch ist die Resorption dieser Verbindungen noch zweifelhaft. Weitere *in vivo*-Versuche müssen noch zeigen, ob diese Substanzklasse bioverfügbar ist bzw. über lymphatisches Gewebe direkt zu einer immunmodulierenden Wirkung der *Echinacea*-Präparate beiträgt.

In verschiedenen pharmakologischen Untersuchungen konnten moderate entzündungshemmende, TNF-α- und NO-induzierende und vor allem gute phagozytosestimulierende Wirkungen für Alkamide *in vitro* und *in vivo* belegt werden. Da außerdem die Bioverfügbarkeit der Alkamide bewiesen ist, scheinen diese tatsächlich an der *in vivo*-Wirkung der *Echinacea*-Präparate beteiligt zu sein.

Mit den Ergebnissen dieser Arbeit konnte zwar eine *in vivo*-Wirkung für Alkamide plausibel gemacht werden, jedoch müssen weitere Untersuchungen den genauen Wirkmechanismus dieser Inhaltsstoffklasse klären.

Als alleinige Inhaltsstoffklasse können sie sicherlich nicht die gesamten immunmodulierenden Effekte der *Echinacea*-Zubereitungen erklären, so dass bei der Gesamtextraktwirkung wahrscheinlich auch Kaffeesäurederivate und Polysaccharide beteiligt sind. Es sollte weiterhin der gesamte Extrakt als Wirkstoff angesehen werden.

8 Zusammenfassung

Zubereitungen aus *Echinacea*-Arten zählen zu den umsatzstärksten pflanzlichen Arzneimitteln. Hauptsächlich werden als Stammpflanzen *E. purpurea*, *E. angustifolia* und *E. pallida* verwendet. Die als Verfälschung oder Substitutionsdroge in Frage kommende Art *E. atrorubens* war bisher phytochemisch und pharmakologisch nicht untersucht.

1. Aus chemotaxonomischen Gründen und zur Überprüfung ihres möglichen Wirkpotentials wurde daher die Inhaltsstoffführung dieser Art analysiert.
   Bei den lipophilen Inhaltsstoffen wurden Gemeinsamkeiten mit den lipophilen Fraktionen von *E. purpurea* und *E. angustifolia* festgestellt. Wie im Kraut und den Wurzeln von *E. purpurea* und *E. angustifolia* wurden auch in *E. atrorubens* Alkamide, hauptsächlich Isobutylamide neben wenigen in geringer Konzentration enthaltenen 2-Methylbutylamiden detektiert. Auch in *E. atrorubens* stellen die Dodeca-2E,4E,8Z,10Z/E-tetraensäure-isobutylamide die Hauptalkamide dar, wobei in den Wurzeln die höchste Konzentration dieser Verbindungen bestimmt wurde. Zusätzlich sind in den Wurzeln von *E. atrorubens* vorwiegend 2,4-Dienamide, wie sie in *E. purpurea* vorherrschen, enthalten. In geringen Mengen konnten 2-Monoenamide, die hauptsächlich in E. angustifoliae radix vorkommen, nachgewiesen werden.

   Das Kraut von *E. atrorubens* enthält ein Alkamidspektrum an 2,4-Dienamiden wie es auch in den anderen drei Arten vorkommt.

   Das hydrophile Inhaltsstoffspektrum von *E. atrorubens* unterscheidet sich grundlegend von dem der anderen drei medizinisch verwendeten *Echinacea*-Arten. So konnten weder Cichoriensäure noch Echinacosid oder Cynarin im Kraut oder der Wurzel von *E. atrorubens* nachgewiesen werden. Während in der Wurzel mittels HPLC-UV nur Spuren von phenolischen Verbindungen detektierbar waren, konnten im Kraut Chlorogensäure, Rutosid und das erstmals in der Gattung *Echinacea* nachgewiesene Narcissin identifiziert werden.

   Der HPLC- und dünnschichtchromatographische Vergleich von vier verschiedenen *E. atrorubens*-Chargen lieferte ein einheitliches Bild, so dass phytochemisch eine eindeutige Charakterisierung und Identifizierung von *E. atrorubens* gewährleistet werden kann und chromatographisch eine Unterscheidung der Arten möglich ist.

2. Aus dem *n*-Hexanextrakt der Wurzeln von *E. atrorubens* wurden 20 Alkamide isoliert und deren Struktur mittels UV, MS und ein- und zweidimensionaler NMR-Techniken aufgeklärt. Abbildung 8.1 gibt eine Übersicht der in E. atrorubens radix

identifizierten Substanzen. Die Alkamide **A2**, **A12**, **A14/15**, **A17**, **A18** und **A19/20** stellen neue Naturstoffe dar.

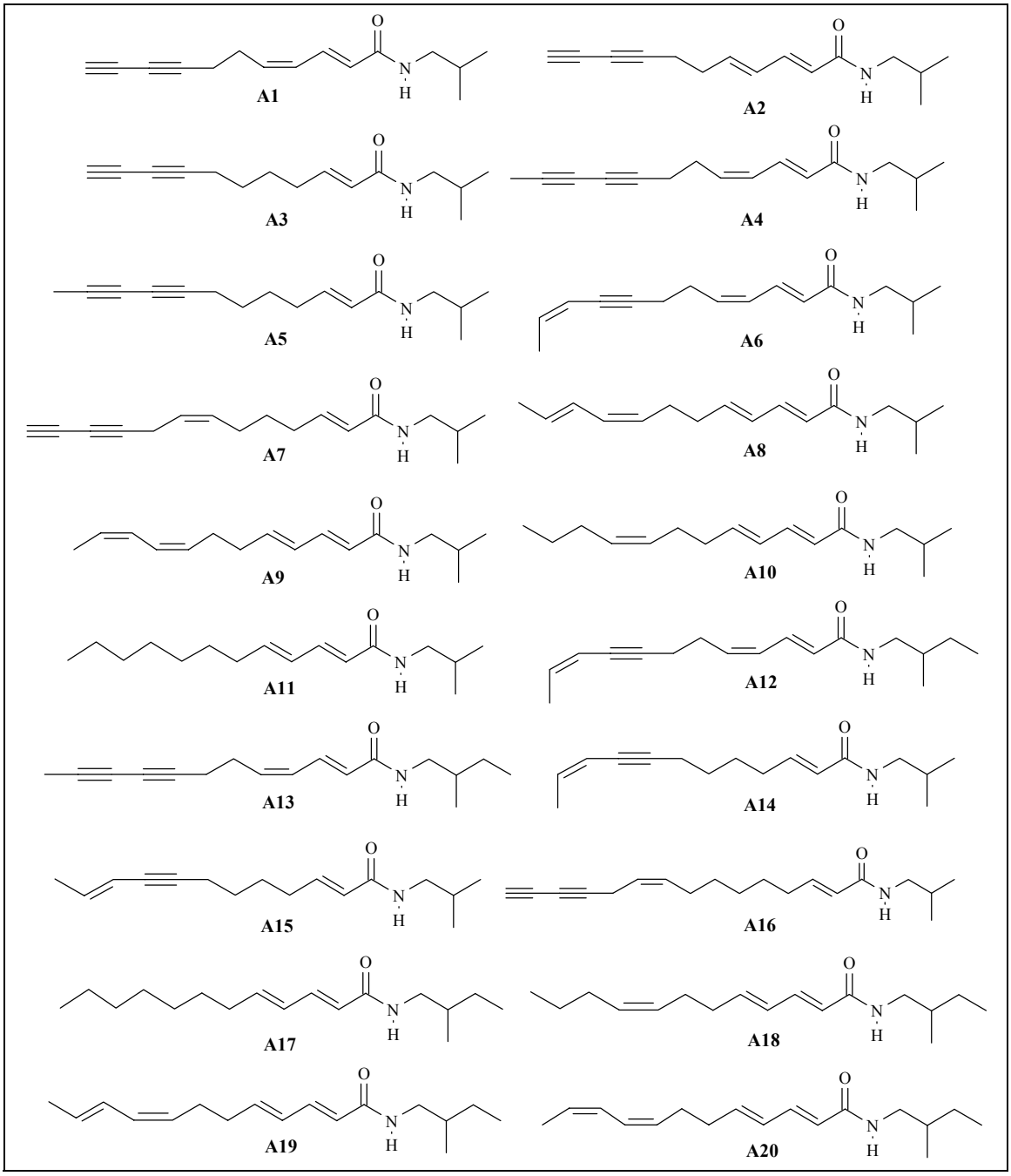


Abbildung 8.1: Strukturformeln der aus E. atrorubens radix isolierten Alkamide.

3. Um die Wirkungsweise der immunmodulatorischen Aktivität der Alkamide näher zu untersuchen, wurden die isolierten Verbindungen auf ihren Einfluss auf die TNF-α- und IL-6-Induktion getestet. Eine leichte Stimulierung der Zytokinaus-

schüttung bewirkten insbesondere die Dodeca-2E,4E,8Z,10Z/E-tetraensäure-isobutylamide **A8/9** und das Dodeca-2E,4E,8Z-triensäure-isobutylamid **A10** in einer Konzentration von 4,3 µg/ml. Alle übrigen Alkamide führten nur zu einer sehr geringen IL-6- und TNF-α-Freisetzung.

4. Aus dem Presssaft des frischen Krautes von *E. purpurea* konnte ein bisher für die Gattung *Echinacea* nicht bekanntes Flavonoid Robinetin isoliert und dessen Struktur mittels UV, MS und NMR-Techniken aufgeklärt werden.

5. Um die Bioverfügbarkeit und damit die mögliche *in vivo*-Wirkung der Alkamide belegen zu können, sollten erste Resorptions- und Bioverfügbarkeitsuntersuchungen durchgeführt werden. Hierfür wurde zuerst eine analytische HPLC-Methode etabliert, die es ermöglicht, noch 10 ng Dodeca-2E,4E,8Z,10Z/E-tetraensäure-isobutylamide pro ml Blut quantitativ zu bestimmen.
   In den ersten Bioverfügbarkeitsstudien konnten eine Stunde nach oraler Applikation von *E. purpurea*-Urtinktur, die 4,3 mg Dodeca-2*E*,4*E*,8*Z*,10*Z/E*-tetraensäure-isobutylamide **A8/9** enthielt, 44 ng/ml der Alkamide **A8/9** im Blut detektiert werden. Somit sind die Alkamide nach oraler Applikation eindeutig bioverfügbar.
   Außerdem wurde die Elimination im Urin untersucht. Es konnten allerdings keine Alkamide im Urin nachgewiesen werden.
   Weiterhin wurden Penetrationsstudien an menschlichen Adenocarcinomzellen durchgeführt. Dabei wurde eine 80 prozentige Diffusionsrate der Alkamide innerhalb von 4 Stunden festgestellt, wobei keine signifikante Metabolisierung der Substanzen beobachtet wurde.
   Beide Versuche weisen auf eine Bioverfügbarkeit der Alkamide nach oraler Applikation hin, so dass deren Beteiligung an *in vivo*-Wirkungen von *Echinacea*-Zubereitungen sehr wahrscheinlich ist.

9 Experimenteller Teil

9.1. Herkunft der Drogen und Vergleichssubstanzen

Das Drogenmaterial für die Isolierung aus *E. atrorubens* wurde uns von D.G. Richter (Richter´s herbs & roots), Wyandotte, geliefert. 300 g wurden im Juni 1997 und weitere 1400 g wurden Ende Juli 1998 jeweils in Central Kansas gesammelt. Die Droge wurde direkt am Sonnenlicht getrocknet und die Identität vor Ort überprüft. Ein weiteres Drogenmuster von E. atrorubens radix wurde 1998 in Arkansas von Clay Downing gesammelt. Für analytische Vergleichsuntersuchungen wurde außerdem *E. atrorubens* radix Droge verwendet, die im Frühjahr 2000 vom Botanischen Garten in Düsseldorf im Gewächshaus angepflanzt wurde, und im August 2001 geerntet werden konnte. Die *E. atrorubens* Samen wurden uns freundlicherweise von Dr. Steven Moring, Kansas, USA, zur Verfügung gestellt. Rückstellmuster befinden sich am Institut für Pharmazeutische Biologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Der Presssaft, der zur Isolierung von Robinetin verwendet wurde, stammte von der Firma Schönenberger.

Vergleichssubstanzen:
Cichoriensäure und 2-Caffeoylweinsäure wurden am Institut für Pharmazeutische Biologie der Universiät Düsseldorf aus *E. purpurea* isoliert.
Rutin stammte von der Firma Merck, Darmstadt, Germany.
Die Vergleichssubstanz Isorhamnetin-3-O-rutinosid (Narcissin) wurde uns freundlicherweise von Prof. Wagner Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität München zur Verfügung gestellt.
Referenzsubstanzen von β-Sitosterol, Stigmasterol und Campesterol und der Ätherisch-Öl-Komponenten Thymol, β-Caryophyllen, Caryophyllenoxid und Bornylacetat waren am Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität Düsseldorf vorhanden.

9.2. Chromatographische Verfahren

9.2.1. Dünnschichtchromatographie

Stationäre Phase: DC-Alufolien (20 x 20 cm) Kieselgel 60 F_{254}, Schichtdicke 0,2 mm; Fa. Merck (Art.-Nr. 5554 bzw. 1.05554).

Mobile Phase:
DC-T1: Hexan/Ethylacetat (2 :1) (Trennung der Alkamide)
DC-T2 : Hexan/Ethylacetat (9 :1) (Trennung des ätherischen Öls)
DC-T3 : Ethylacetat/Wasser/Ameisensäure/Essigsäure (100:27:11:11) (Trennung der Kaffeesäurederivate und Flavonoide)

DC-T4: Ethylacetat/Methanol/Wasser/Essigsäure (60:15:10:15) (Trennung der Zucker)

Lösungsmittel: Alle Lösungsmittel für die DC wurden in technischer Qualität bezogen und nach einmaliger Destillation eingesetzt.

Durchführung: Die Entwicklung erfolgte in einer DC-Kammer ohne Sättigung.

Detektion: - Direktauswertung: - Fluoreszenzminderung bei UV 254 nm
- Eigenfluoreszenz bei UV 365 nm
- nach Besprühen mit folgenden Detektionsreagenzien:

- Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz:

0,5 ml Anisaldehyd wurden mit 10 ml Eisessig, 85 ml Methanol und 5 ml konzentrierter Schwefelsäure unter Eiskühlung in der angegebenen Reihenfolge gemischt. Nach kräftigem Besprühen der DC-Platte wurde diese etwa 5-10 min bei 100°C erhitzt. Die Auswertung erfolgte bei Tageslicht.
Für den Nachweis lipophiler Verbindungen, wie zum Beispiel Alkamide.

- Naturstoffreagenz A nach Neu:

Lösung A: 1%ige Lösung von Diphenylboryloxyethylamin in Methanol.
Lösung B: 5%ige Lösung von Polyethylenglycol 400 in Ethanol
Die entwickelte DC-Platte wurde zuerst mit Lösung A und nach dem Trocknen des Reagenzes zur Fixierung mit Lösung B besprüht. Die Auswertung erfolgte nach 30 Minuten im Tageslicht und im UV-Licht bei 365 nm.
Für die Detektion von hydrophilen Substanzen, wie zum Beispiel Kaffeesäurederivate und Flavonoide.

- Thymol-Schwefelsäure-Reagenz:

0,5 g Thymol wurden in 95 ml Ethanol gelöst. Anschließend wurden 5 ml Schwefelsäure (95-97 %) vorsichtig unter Eiskühlung hinzugegeben.
Das Reagenz muss vor Gebrauch frisch hergestellt werden. Die DC-Platte wurde nach dem Besprühen ca. 5 Minuten lang bis zur Ausbildung maximaler Farbintensität bei 120° C erhitzt.
Für den Nachweis von Zuckern.

Präparative Dünnschichtchromatographie:

Um Klebstoff- und Weichmacherreste auf den DC-Alufolien zu entfernen, wurden diese mit Methanol vorentwickelt und anschließend getrocknet. Danach wurden 500 µl des *E. atrorubens* Methanol-Extraktes strichförmig über die gesamte Breite der Startzone aufgetragen. Nach der Entwicklung der DC-Chromatogramme wurden die Substanzbanden unter UV-Licht (254 und 366 nm) markiert. Ein schmaler Streifen der entwickelten DC-Folie wurde zusätzlich mit Naturstoffreagenz besprüht. Nach Anlegen des Streifen an die Ursprungsfolie wurden die entsprechenden Substanzbanden markiert und mit einem Spatel ausgekratzt. Anschließend wurden die Verbindungen mit Methanol auf einem Magnetrührer erschöpfend extrahiert. Um Kieselgelreste zu entfernen, wurden die gewonnenen Lösungen durch Blauband-Papierfilter der Fa. Schleicher & Schuell filtriert.

Rf-Werte: Die Rf-Werte der Alkamide aus *E. atrorubens* sind in Tabelle 4.4, Seite 56 aufgeführt, diejenigen der hydrophilen Verbindungen sind in Tabelle 4.5, Seite 58 wiedergegeben.

Hydrolyse der Flavonoidglykoside:

Das isolierte Flavonoidglykosid Narcissin **FG1** wurde nach der Methode von KARTNIG und WEGSCHAIDER (1971) und MERFORT und WENDISCH (1987) auf Kieselgel 60 F_{254}-Fertigplatten hydrolysiert:

Die zu untersuchenden Glykoside wurden bandförmig auf die Startlinie der Kieselgelfolie aufgetragen und diese 30 Minuten lang in einer DC-Kammer bei 100 °C den Dämpfen konzentrierter HCl im Trockenschrank ausgesetzt. Nach Entnahme der Platte wurde diese mindestens 1 Stunde lang an der Luft und anschließend 30 Minuten lang bei 60 °C im Trockenschrank getrocknet. Die Entwicklung des Chromatogrammes erfolgte in dem DC-System DC-T4 (siehe Seite 151). Detektiert wurde mit Thymol-H_2SO_4-Reagenz (siehe Seite 151). Tabelle 9.1 gibt die Rf-Werte der Zucker und deren Färbungen wieder.

Tabelle 9.1: Rf-Werte der Referenzzucker in dem DC-System DC-T4 und deren Färbung nach Detektion mit Thymol-H_2SO_4-Reagenz.

Zucker	Färbung	Rf-Werte
Galaktose	lila-braun	0,32
Glucose	blau	0,35
Mannose	rosa	0,36
Rhamnose	orange	0,55

9.2.2. Offene Säulenchromatographie

Für die Isolierung von Robinetin aus dem Presssaft von E. purpureae herba wurde eine offene Säulenchromatographie an Sephadex verwendet.*

Säulen: Es wurde eine Glassäule mit Glasfritte und feinregulierbarem Auslasshahn verwendet (Säulenlänge: 1,5 m; Säulendurchmesser: 30 mm)

Stationäre Phase: Sephadex LH-20 (Pharmacia)

Füllung der Säulen: Das Sorbens (Sephadex® LH-20) wurde mit dem verwendeten Fließmittel angeschlämmt und über Nacht zur Quellung stehengelassen. Am nächsten Tag wurde diese Suspension erneut gut durchmischt und kontinuierlich und luftblasenfrei bei geöffnetem Hahn in die Säule eingegossen. Anschließend wurde so lange Eluens nachgefüllt bis die Packungshöhe konstant blieb.

Probenaufgabe: Die in wenig Fließmittel gelöste Probe wurde vorsichtig, ohne Aufwirbeln von Säulenmaterial bei geöffnetem Auslasshahn auf die Oberfläche des Säulenbetts pipettiert. Nach dem Einsickern wurde mit Eluens nachgespült und danach die stationäre Phase mit dem Eluenten überschichtet, so dass mit der Elution begonnen werden konnte.

9.2.3. Vakuumflüssigchromatographie

Bei der Vakuumflüssigchromatographie, einer Sonderform der offenen Säulenchromatographie, wird durch Anlegen von Vakuum eine schnelle und gut reproduzierbare Grobtrennung von Rohextrakten und Fraktionen erreicht (PELLETIER et al., 1986).

* Frau S. Borstel danke ich für die Isolierung des Robinetins.

Durchführung: Verwendet wurde jeweils eine Glassäule (30 cm Länge und 5 cm Durchmesser) mit Glasfritte (Porosität 3), einem darunter liegenden Stutzen zum Anschluss einer Vakuumpumpe und einem Schliffstutzen zum Anbringen eines Auffangkolbens.
Als erstes wurde etwas Glaswolle und eine etwa 1 cm dicke Schicht Seesand (Fa. Roth) auf die Glasfritte gelegt. Als stationäre Phase wurden etwa 180 g Kieselgel 60 (40-63 µm, Merck), trocken in die Säule gefüllt. Die Probe wurde anschließend als Verreibung mit Kieselgel aufgegeben. Zum Schluß wurde das Säulenbett mit Glaswolle abgedeckt, um ein Aufwirbeln des Kieselgelbettes während der Fließmittelaufgabe zu vermeiden. Als Elutionsmittel dienten konstante Mengen von Hexan/Ethylacetat-Mischungen (250 ml), bei denen der Ethylacetatanteil in 5%- bzw. 2,5 %-Schritten erhöht wurde. Das Fließmittel wurde nach Anlegen von Vakuum durch die Säule gesaugt bis das Kieselgelbett weitgehend trocken war.

9.2.4. Mitteldruckflüssigchromatographie

Gerät: Zwei HPLC-Pumpen 64 mit Gradientensteuerung über Programmer 50, Mischkammer, UV-Detektor K-2000/A4060 und Zweikanalschreiber (Fa. Knauer), automatischer Fraktionssammler (Pharmacia).

Säulen: Die Säulen wurden entweder vom Glasbläser der Universität Düsseldorf aus dickwandigem Borosilikatglas hergestellt und mit eigens angefertigten Stempeln aus Messing mit Teflonköpfen ausgestattet oder direkt von der Firma Latek mit den entsprechenden Stempeln geliefert.
MPLC-Säule 1: Länge 50 cm, $\varnothing_{innen}$ 0,8 cm, Füllhöhe 40 cm.
MPLC-Säule 2: Länge 55 cm, $\varnothing_{innen}$ 1,1 cm, Füllhöhe 47 cm.
MPLC-Säule 3: Länge 109 cm, $\varnothing_{innen}$ 2,4 cm, Füllhöhe 90 cm.

Mobile Phasen: Acetonitril für die HPLC (J.T. Baker oder Fa. Merck) /deionisiertes Wasser

Stationäre Phase: Für MPLC-Säule 1: 8 g LiChroprep RP-18, 15-25 µm (Fa. Merck).
Für MPLC-Säule 2: 23 g LiChroprep RP-18, 25-40 µm (Fa. Merck).
Für MPLC-Säule 3: 260 g Europrep 60-30 RP-18, 60 Å, 20-45 µm (Fa. Knauer).

Probenaufgabe: Die Proben wurden in etwa 500 µl Ethanol (max. 1 ml) gelöst, wenn sie über die 1 ml Probeschleife aufgegeben wurden, und in

etwa 2-3 ml für die Aufgabe über die 10 ml Probeschleife. Die Schleifen waren jeweils mit dem Injektor (Altex) gekoppelt.

Flussrate: Je nach Trennung wurden Flussraten von 3 - 5 ml/min gewählt.

Detektion: Als Detektionswellenlänge wurde je nach zu trennenden Alkamiden 210 nm oder 254 nm ausgewählt. Manche Trennungen wurden direkt mittels Fraktionssammler ohne Detektor durchgeführt.

Fraktionierung: Die Fraktionierung erfolgte entweder manuell-peakorientiert mittels des angeschlossenen Detektors und Schreibers oder zeitgesteuert mit Hilfe eines automatischen Fraktionssammlers (Büchi 660 Fraction Collector, Fa. Büchi).

Aufarbeitung: Um einer Zersetzung labiler Inhaltsstoffe vorzubeugen, wurden wasserhaltige Fraktionen nach DC-Kontrolle sofort vereinigt, mindestens sechs mal mit *n*-Hexan ausgeschüttelt, über wasserfreies Na_2SO_4 filtriert und sofort bei –20 °C über *n*-Hexan gelagert.

9.2.5. Hochleistungsflüssigchromatographie

Gerät: - Liquid Chromatograph HP 1050 mit quaternärer Pumpe, Autosampler 1050, beheizbarem Säulenraum sowie Vakuum-Entgaser und HP-Chemstation (Hewlett-Packard).
Dieses Gerät wurde für alle Untersuchungen außer für die Konzentrationsbestimmungen von **A8/9** im Akzeptormodell der Resorptionsstudien mit Caco-2-Zellen verwendet.
- Liquid Chromatograph Hewlett-Packard HP 1090 Serie II System gekoppelt mit einem Diodenarraydetektor.
Dieses Gerät wurde für die Konzentrationsbestimmungen von **A8/9** im Akzeptormodell der Resorptionsstudien mit Caco-2-Zellen verwendet.

Detektoren: Hewlett-Packard Diodenarraydetektor DAD 1050.
Die Aufzeichnung der Chromatogramme erfolgte routinemäßig für die lipophilen Fraktionen bei 254 nm und für die hydrophilen Fraktionen bei 330 nm.
Die Dodeca-2*E*,4*E*,8*Z*,10*Z/E*-tetraensäure-isobutylamide wurden im Rahmen der Bioverfügbarkeits- und Resorptionsmodelluntersuchungen bei 260 nm detektiert.

Säulen: HPLC-Säule 1: - Standardsäule für analytische Untersuchungen LiChroCART® 125-4 mit LiChrospher® 100 RP-18, 5 µm und Vorsäule LiChroCART® 4-4 mit demselben Füllmaterial (beides von Fa. Merck).

HPLC-Säule 2: - Säule für semipräparative Trennungen
Hibar® RT 250-10 mit LiChrosorb® RP-8, 7 µm (Fa. Merck).

HPLC-Säule 3: - Säule für die Konzentrationsbestimmungen von **A8/9** im Akzeptormodell der Resorptionsstudien mit Caco-2-Zellen.
RP-18 Hypersil ODS 125 x 4 mm, 5 µm (Knauer) mit Vorsäule (KS 11/4 Nucleosil 100-5 (C-18, Macherey-Nagel).

Säulentemperatur: 40° C

Flussrate: Analytische Untersuchungen: 1 ml/min
Semipräparative Trennungen: 1-3 ml/min

Mobile Phase:
A = Aqua ad injectabilia (Fa. Delta Pharma)
B = Acetonitril für die HPLC (Fa. J.T. Baker oder Fa. Merck)
C = Aqua ad injectabilia mit 0,1 % (V/V) *ortho*-Phosphorsäure puriss. p.a. (Fa. Fluka)
D = Acetonitril für die HPLC mit 0,1 % (V/V) *ortho*-Phosphorsäure puriss. p.a. (Fa. Fluka)

Trennmethoden:

Ech1: - Für lipophile Inhaltsstoffe aus *Echinacea*-Arten
Eluenten: **A** und **B**
Gradient: 40-80 % **B** linear in 30 min, nach jedem Lauf 10 min Äquilibrierungszeit mit Startkonzentration 40% **B**
Detektion: 210 und 254 nm
Temperatur: 40 °C

Ech2: - Für hydrophile Inhaltsstoffe aus *Echinacea*-Arten
Eluenten: **C** und **D**
Gradient: 10-30 % **D** linear in 20 min, nach jedem Lauf 10 min Äquilibrierungszeit mit Startkonzentration 10% **D**
Detektion: 330 nm
Temperatur: 40 °C

Tet: - Für den Nachweis von Dodeca-2*E*,4*E*,8*Z*,10*Z*/*E*-tetraensäureisobutylamide aus Blut oder Urin
Eluenten: **A** und **B**

Gradient: 40-80 % **B** linear in 30 min, nach jedem Lauf 10 min Äquilibrierungszeit mit Startkonzentration 40% **B**
Detektion: 260 nm
Temperatur: 40 °C

Tetr: - Für den Nachweis von Dodeca-2*E*,4*E*,8*Z*,10*Z/E*-tetraensäure-isobutylamide in der Akzeptorphase des Resorptionsmodells mit Caco-2-Zellen.
Eluenten: **A**: Acetonitril
B: 0,5 % Phosphorsäure
Gradient: 60-72 % **A** in 0-6 min, 72-60 % **A** in 6-7 min; 7-12 min isokratisch bei 60 % **A**.
Temperatur: 25 °C
Detektion: 260 nm
Injektionsvolumen: 200 µl
Retentionszeit der Dodeca-2*E*,4*E*,8*Z*,10*Z/E*-tetraensäure-isobutylamide : 4,2 min

Flussrate: Die Flussrate betrug in allen HPLC-Methoden 1,0 ml/min.

Probenvorbereitung: Für Routine-Analysen (Trennsystem: Ech1) wurden die vom *n*-Hexan befreiten lipophilen Proben mit einer Konzentration von 1-10 mg/ml in Ethanol p.a. gelöst. Die zur Trockne eingeengten hydrophilen Extrakte oder Substanzen (Trennsystem: Ech2) wurden problemabhängig auf eine bestimmte Konzentration mit Methanol eingestellt. Die vom Dichlormethan befreiten Proben für den Nachweis der Dodeca-2E,4E,8Z,10Z/E-tetraensäure-isobutylamide aus Blut oder Urin wurden in einer 1:1 Mischung von Acetonitril/Wasser aufgenommen. Das Injektionsvolumen variierte je nach Problemstellung und ist bei den einzelnen Chromatogrammen jeweils vermerkt.

Semipräp. HPLC: 50-100 µl der Fraktion in möglichst konzentrierter Lösung wurden mehrmals injiziert und peakorientiert mit Hilfe des DAD-UV-Detektors manuell fraktioniert.

Retentionszeiten: In Tabelle 4.1, Seite 48 sind die HPLC-Retentionszeiten der aus *Echinacea atrorubens* isolierten Verbindungen dargestellt.

9.2.6. LC-MS-Messungen

Gerät: Liquid Chromatograph: Agilent 1100 Series
Massenspektrometer: Finnigan LCQ Deca

Electro Spray Ionisation (ESI): Spray Voltage: 5,0 kV
Capillary Voltage: -15,4 V
Capillary Temperature: 350 °C
Flussrate: 3,0 µl/min

Atmospheric Pressure Chemical Ionisation (APCI): Spray Voltage: 4,2 kV
Vaporizer Temp: 450,5 °C
Capillary Voltage: 19,2 V
Capillary Temperature: 227,0 °C

Trennmethode: Gradienten: **A**: Acetonitril
B: Wasser + 0,1 % Ameisensäure

Zeit [min]	A [%]	B [%]
0	10	90
5	10	90
35	100	0
45	100	0
46	10	90
60	10	90

Flussrate: 0,2 ml/min für ESI-Messungen
0,4 ml/min für APCI-Messungen

9.2.7. Gaschromatographie

Geräte: - GC-EI-MS-gekoppelte Untersuchungen

1. Gaschromatograph HP 5890 Series II *PLUS* mit Split-einlasssystem, massenselektivem Detektor HP 5972 Series (Ionisierungsenergie 70 eV) und HP Chemstation (alles von Hewlett-Packard); Trägergas Helium 5,0; Säulenvordruck 1,16 x 10^5 Pa; Trägergasstrom (total): 70 ml/min; Injektortemperatur: 280°C.

2. Gaschromatograph Typ 1700 (Varian) mit Spliteinlasssystem; massenselektiver Detektor Finnigan 1020 (Ionisierungsenergie 70 eV) von der Firma Finnigan MAT, Bremen; Trägergas Helium 5,0

Säulen: 1. Quarzkapillarsäule OPTIMA 1 DF (25 m x 0,25 mm, Filmdicke 0,25 µm, Macherey & Nagel) für Gerät 1 und 2
2. HP-5MS (crosslinked 5 %PH Me Siloxan) special performance Kapillarsäule ($\varnothing_{innen}$ = 0,25 mm x 30 m x 0,5 µm) nur für Gerät 1

Temperaturgradienten:

GC1: - Standardmethode
Starttemperatur: 120 °C für 3 min, Heizrate: 10 °C/min bis 280 °C, 15 min isotherm bei 280 °C.

GC2: - Für Alkamide
Starttemperatur: 170 °C für 3 min, Heizrate: 3 °C/min bis 240 °C, 2 min isotherm bei 240 °C.

GC3: - Für ätherisches Öl
Starttemperatur: 70 °C für 3 min, Heizrate: 4 °C/min bis 295 °C.

GC4: - Für Sterine und Flavonoide
Starttemperatur: 250 °C für 2 min, Heizrate: 10 °C/min bis 280 °C, bis 35 min isotherm bei 280 °C.

9.3. Spektroskopische Verfahren

9.3.1. Optische Drehung

Für die Messung der spezifischen Drehung wurde eine Quarzküvette der Schichtdicke 1 dm verwendet. Gemessen wurde an einem Polarimeter 241 MC (Perkin-Elmer) bei 20 °C und 589 nm in Ethanol p.a..

9.3.2. Ultraviolettspektroskopie

Die UV-Spektren aller Verbindungen wurden mit Hilfe des Photodiodenarray-Detektors HP 1050 (Hewlett Packard, siehe Kapitel 9.2.5) online während der HPLC-Analysen in einem Acetonitril/Wassergemisch bei Raumtemperatur aufgenommen. Das UV-Spektrum von Robinetin **F1** wurde zusätzlich an einem Spektralphotometer Typ DB-G (Fa. Beckman) in Methanol bzw. zusätzlich mit Shiftreagenzien vermessen.

9.3.3. Kernresonanzspektroskopie

Gerät: Kernresonanzspektrometer DRX 500 (Fa. Bruker);
Messfrequenzen: 500 MHz (^{1}H-NMR), 125 MHz (^{13}C-NMR);
Probenkopf: TBI-Probenkopf (triple broadband inverse gradient head) für ^{1}H-NMR- und Cosy-Messungen, QNP-Probenkopf (quadro nuclear probe) für ^{13}C-NMR-Messungen.

Lösungsmittel: Standardlösungsmittel: d-Chloroform (99,8%D, Aldrich)
Für Kaffeesäurederivate oder Flavonoide: DMSO-d_6 (Merck)

Probenvorbereitung: Da es sich bei den Alkamiden aus *Echinacea atrorubens* oder aus anderen *Echinacea*-Arten um leicht zersetzbare Verbindungen handelt, wurden sie erst direkt vor der NMR-Messung aus dem Eisfach entnommen. Die Substanzen wurden am Rotationsverdampfer schonend vom *n*-Hexan befreit und für etwa 30 min unter Stickstoff oder im Exsiccator im Vakuum getrocknet. Weniger zersetzbare Verbindungen wurden über Nacht im Exsikkator getrocknet. Die Proben wurden anschließend im entsprechenden Lösungsmittel gelöst und über Glaswolle in die gut getrockneten NMR-Probenröhrchen überführt.

Kalibrierung: Die Kalibrierung erfolgte auf das jeweilige Lösungsmittelsignal, welches in der Regel d-Chloroform war.

Einheiten: Die auf TMS bezogenen chemischen Verschiebungen [δ-Werte] sind in ppm angegeben und die Einheit der Kopplungskonstante [J] ist Hz.

Auswertung: Die NMR-Spektren wurden mit spezieller Software der Firma Bruker bearbeitet.

Simulation von ^{1}H-NMR-Spektren:
Die Simulation von ^{1}H-NMR-Spektren am Computer wurde mit folgendem Programm durchgeführt:
ACD/HNMR DB, Advanced Chemistry Development Inc., V.2.5.1.

9.3.4. Massenspektrometrie

Gaschromatographie-Elektronenstoßionisations-MS (GC-EI-MS):
Soweit nicht anders angegeben, wurden EI-Massenspektren unter Kopplung eines Massenspektrometers mit einem Gaschromatographen (näheres siehe Kapitel 9.3.4) aufgenommen.

Direkteinlaß mit Elektronenstoßionisation (DEI-MS):
Das Massenspektrum von Verbindungen, die nicht GC-gängig waren, wurde nach Direkteinlaß mit einem Massenspektrometer INCOS 50 (Finnigan MAT) aufgenommen.

Direkteinlaß mit chemischer Ionisation (DCI-MS):
DCI-Spektren wurden ebenfalls an einem Massenspektrometer INCOS 50 (Finnigan MAT) vermessen.

Auswertung: Die Substanzen aus dem ätherischen Öl von *Echinacea atrorubens* wurden durch Spektrenvergleich mit Massenspektren aus der Datenbank (Software G1034C, Version C.03.00) identifiziert.

9.4. Extraktionsverfahren

Soxhlet-Extraktion für vergleichende Analytik:
5 g Droge wurden in einer Drogenmühle (Typ A 10, Jank & Kunkel, IKA-Werk) fein pulverisiert und direkt in eine Extraktionshülse eingewogen. Anschließend wurde die Droge zunächst mit 80 ml *n*-Hexan für zwei Stunden im Soxhletverfahren extrahiert. Nach Trocknen der Soxhlethülse mit dem Drogenmaterial unter dem Abzug wurde eine weitere Extraktion der Droge mit 80 ml Methanol für wiederum zwei Stunden durchgeführt.

70% Methanol Ultraschallextraktion nach BERGERON et al., 2000:
Die pulverisierte Droge (5 g) wurde für drei mal fünf Minuten mit jeweils 100 ml 70 prozentigem Methanol im Ultraschallbad extrahiert.

Soxhlet-Extraktion für die Isolierung der Inhaltsstoffe aus Echinaceae atrorubens radix:
Die Extraktion und Isolierung der Droge erfolgte in zwei Ansätzen. Als erstes wurden 256 g fein pulverisierte Wurzeldroge von *E. atrorubens* (Extrakt **E1**, Ernte 1997, Herkunft siehe Kapitel 9.1) für 27 Stunden erschöpfend mit *n*-Hexan in einer Soxhletapparatur extrahiert. Nach Einengen des gewonnenen Extraktes verblieben 3,3 g eines viskosen, braunen Rohextraktes (Ausbeute: 1,3 %).
Die zweite Soxhletextraktion wurde in mehreren Ansätzen mit insgesamt 1293 g fein pulverisierter Wurzeldroge (Extrakt **E2**, Ernte 1998, Herkunft siehe 9.1) wiederholt mit *n*-Hexan für jeweils circa 41 Stunden durchgeführt. Die Extrakte wurden vereinigt und am Rotationsverdampfer schonend vom *n*-Hexan befreit. Es blieben 9 g eines zähflüssigen braunen Extraktes übrig (Ausbeute: 0,7%).

Wasserdampfdestillation:
43 g frisch pulverisierte *Echinacea atrorubens* Wurzeldroge und 49 g frisch pulverisierte Krautdroge wurden jeweils mit 450 ml Wasser in einer Karlsruherapparatur für 2 Stunden destilliert. Das ätherische Öl wurde in Pentan als Hilfsphase aufgefangen. Nach Beendigung der Destillation wurde das Öl-Pentangemisch in einem tarierten Kolben aufgefangen und auf einer Heizplatte bei 70 °C erhitzt. Anschließend wurde die Ausbeute des ätherischen Öls gravimetrisch

bestimmt (Wurzel: 0,03 %; Kraut: 0,13%). Für weitere Untersuchungen wurde das Öl wieder mit Pentan aufgenommen und kühl gelagert.

9.5. Gehaltsbestimmung der Dodeca-2E,4E,8Z,10Z/E-tetraensäure-isobutylamide

Der Gehalt an Dodeca-2*E*,4*E*,8*Z*,10*Z/E*-tetraensäure-isobutylamiden in den Wurzeln und dem Kraut von *E. atrorubens* wurde mittels HPLC und externer Standardkalibrierung bestimmt.

Kalibriergerade
Als Eichlösung diente eine Stammlösung von 3,8 mg selbstisolierten Dodeca-2E,4E,8Z,10Z/E-tetraensäure-isobutylamiden (Reinheit: 92 %) in 1,0 ml Ethanol p.a.. Daraus wurde zusätzlich eine Verdünnungslösung mit einer Konzentration von 380 µg/ml hergestellt. Um einen möglichst weiten Konzentrationsbereich an Isobutylamiden abzudecken, wurden insgesamt 16 verschiedene Injektionsvolumina in die HPLC eingespritzt. Im oberen Bereich schlug das Detektorsignal jedoch zu stark aus und im unteren Bereich wurde die Standardabweichung der einzelnen Injektionen zu groß, so dass Linearität der Kalibriergeraden nach Flächenintegration im Bereich von 27,968 µg bis 105 ng durch 6 verschiedene Tetraenmassenwerte mit jeweils 3 Injektionen bewiesen werden konnte. Die Standardabweichung lag bei allen Werten unter 3 % (siehe Abbildung 4.4, Seite 50). Die Kalibriergerade ergab einen Eichfaktor von 3,0299 und einen Korrelationskoeffizienten von 0,9997.

Extrakte
Circa 5 g Droge (genau eingewogen) vier verschiedener, pulverisierter Wurzelchargen (siehe Tabelle 4.2) und einer Krautdroge wurden jeweils mit 50 ml Chloroform in einer Soxhletapparatur für 2 Stunden extrahiert. Zusätzlich wurden einmal 5 g pulverisierte, frische Wurzeldroge mit 50 ml *n*-Hexan in einer Soxhletapparatur für 2 Stunden und weitere 5g zweimal für 2 Stunden mit jeweils 100 ml *n*-Hexan auf dem Magnetrührer bei Raumtemperatur extrahiert. Die Extrakte wurden zur Trockne eingeengt und mit Ethanol p.a. auf 10,0 ml aufgefüllt. Diese Lösungen wurde jeweils dreimal in die HPLC injiziert (Trennsystem: **Ech1**, Spektren siehe Anhang). Mit Hilfe des oben genannten Eichfaktors konnte der Gehalt in Prozent an Dodeca-2E,4E,8Z,10Z/E-tetraensäure-isobutylamide bezogen auf die getrocknete Droge berechnet werden.

Trockenrückstand
Der Trockenrückstand wurde, wie es das DAB 2000 für verschiedene Wurzeldrogen vorsieht, durch 2 stündiges Erhitzen der Droge bei 100 °C bestimmt. Drei Bestimmungen frischer Wurzelstücke ergaben einen mittleren Trocknungsverlust von 53,13 %.

Die bereits getrocknete Wurzeldroge zeigte einen durchschnittlichen Trocknungsverlust von 4,8 % (n = 3).

9.6. Isolierungen

9.6.1. Isolierungen der Alkamide aus *E. atrorubens* radix

*Fraktionierung des n-Hexan Extraktes von Echinaceae atrorubens radix (Ernte 1997, **E1**)*

Eine Grobfraktionierung des *n*-Hexan Extraktes von *E. atrorubens* radix (1,8 g) wurde durch VSC (siehe 9.2.3) über 150 g Kieselgel erreicht. Als Elutionsmittel dienten jeweils 200 ml entweder reines *n*-Hexan oder *n*-Hexan/Ethylacetatmischungen, bei denen der Ethylacetatanteil in 5 % Schritten bis 50 % erhöht wurde (siehe Tabelle 9.2). Zum Schluß wurde noch einmal mit reinem Ethylacetat bzw. mit reinem Methanol eluiert. Die daraus resultierenden Fraktionen wurden dünnschichtchromatographisch untersucht (DC-T1, siehe 9.2.1) und zu zwölf Grobfraktionen vereinigt. Alkamide wurden aus den Fraktionen IX-XI isoliert.

Tabelle 9.2: Grobfraktionierung des n-*Hexan Extraktes von* E. atrorubens *radix (Ernte 1997)*

Fraktion	*n*-Hexan [%]	Ethylacetat [%]	Methanol [%]	Gewicht [mg]
I	**100**	**0**		
II	**95**	**5**		
III	**90**	**10**		**347**
IV	**85**	**15**		**172**
V	**80**	**20**		**40**
VI	**75**	**25**		**53**
VII	**70**	**30**		**52**
VIII	**65**	**35**		**148**
IX	**60**	**40**		**58**
X	**55**	**45**		**563**
	50	**50**		
XI	**0**	**100**		**186**
XII	**-**	**-**	**100**	**178**

Die Triterpene **Campesterol**, **β-Sitosterol** und **Stigmasterol** wurden aus Fraktion VIII identifiziert.

Um eine bessere Vortrennung der Alkamide zu erreichen, wurde Fraktion X mit einer weiteren Vakuumsäule über 75 g Kieselgel mit 100 ml *n*-Hexan bzw. mit *n*-Hexan/Ethylacetatmischungen in 16 Fraktionen aufgetrennt. Eine anschließende Fraktionierung der Unterfraktion X.7 (310 mg) mittels MPLC an RP-18-Material (MPLC-Säule 2; Fließmittel: Acetonitril/Wasser; Methode: 10-100% ACN in 2h;

Flussrate: 5 ml/min) lieferte den Reinstoff **A6** (25 mg) und das Isomerenpaar **A8/9** (170 mg), welches durch Umkristallisierung noch weiter aufgereinigt werden konnte.
Fraktion IX wurde ebenfalls auf eine MPLC-Säule mit RP-18-Material gegeben (MPLC- Säule 1; Fließmittel: Acetonitril/Wasser; Methode: 40-80% ACN in 1h, 80-99% in 15 min; Flussrate: 3 ml/min; Detektion: 254 nm) und führte zu der Isolierung von **A10** (4 mg) und **A11** (6 mg).
Fraktion XI wurde durch MPLC an RP-Material in drei Fraktionen getrennt (MPLC-Säule 2; Fließmittel: Acetonitril/Wasser; Methode: 10-50% ACN in 120min, 50-99% ACN in 30min; Flussrate: 5 ml/min; Detektion: 254 nm), die noch Substanzgemische darstellten und daher mittels semipräparativer HPLC (siehe 9.2.5) weiter aufgereinigt werden mussten. Für Fraktion XI.2 (47 mg) wählten wir eine isokratische Methode mit 42% Acetonitril und 58% Wasser über 40 Minuten und einer Detektionswellenlänge von 235 nm. Dadurch konnten wir Alkamid 1 (7 mg), welches sich mit der Zeit teilweise zu dem Isomer **A2** umwandelte, und **A3** (34 mg) isolieren.
Unterfraktion XI.3 (30 mg) wurde ebenfalls isokratisch getrennt, jedoch mit einem Acetonitrilanteil von 47% über 42 Minuten (Detektion: 235 nm; Flussrate: 3,0 ml/min), wodurch die Alkamide **A4** (4 mg), **A5** (8 mg) und **A7** (8 mg) in reiner Form isoliert werden konnten. Abbildung 4.10, Seite 60, gibt eine Übersicht über die Isolierung der Alkamide aus dem *n*-Hexan Extrakt **E1** der *Echinacea atrorubens* Wurzeldroge.

*Fraktionierung des n-Hexan Extraktes von Echinaceae atrorubens radix (Ernte 1998, **E2**)*

Der *n*-Hexan Extrakt von Echinaceae atrorubens radix (8,3 g) wurde mittels einer Vakuum-Flüssig-Chromatographie über 180 g Kieselgel vorfraktioniert (siehe 9.2.3.). Die Inhaltsstoffe wurden zuerst mit 250 ml *n*-Hexan, anschließend mit *n*-Hexan/Ethylacetatmischungen und abschließend mit reinem Ethylacetat und reinem Methanol (siehe Tabelle 9.3) eluiert. Die erhaltenen Fraktionen wurden durch Dünnschichtchromatographie im Laufmittel DC-T1 untersucht und inhaltsgleiche Fraktionen vereinigt. Um die Ausbeute der Fraktionen zu bestimmen, wurde das Lösungsmittel schonend am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand circa 30 Minuten unter Stickstoff getrocknet. Direkt nach der Ausbeutebestimmung wurden die Fraktionen bei –20 °C unter *n*-Hexan gelagert.

Tabelle 9.3: Grobfraktionierung des n-*Hexanextrakts von Echinaceae atrorubens radix mit VLC1.*

Fraktion	*n*-Hexan [%]	Ethylacetat [%]	Methanol [%]	Gewicht [g]
I	100 95 90 85 80 75	0 5 10 15 20 25		0,9
II	72,5 70 67,5	22,5 30 32,5		4,4
III	65	35		0,6
IV	62,5 60 57,5 55	37,5 40 42,5 45		0,9
V	52,5 50 45	47,5 50 55		0,3
VI	40 0 -	60 100 -	 100	1,1

Die Alkamide wurden aus den Fraktionen II, III und IV isoliert.

Auftrennung der Fraktion II

Fraktion II (4,4 g) wurde einer weiteren VSC an Kieselgel (180 g, siehe 9.2.3) unterzogen. Die Fraktionen wurden wiederum mit *n*-Hexan/Ethylacetatmischungen als Eluens gewonnen, bei denen schrittweise der Ethylacetatanteil in 5, dann 2,5 und in 1 % Schritten erhöht wurde. Nach DC-Kontrolle wurden inhaltsgleiche Fraktionen wiederum vereinigt (siehe Tabelle 9.4).

Tabelle 9.4: Trennung der Fraktion II mittels VSC.

Fraktion	*n*-Hexan [%]	Ethylacetat [%]	Methanol [%]	Gewicht [mg]
1	100	0	-	6,1
	95	5		
	90	10		
	85	15		
	82,5	17,5		
2	80	20		458,5
	79	21		
	78	22		
3	77	23		1789,6
	76	24		
4	75	25		793,7
5	74	26		996,2
	73	27		
	72	28		
6	71	29		103,7
	70	30		
7	69	31		101,6
	68	32		
	67	33		
	66	34		
	65	35		
	60	40		
	0	100		
	-	-	100	

Alkamide konnten aus den Fraktionen 2-6 isoliert werden (siehe Abbildung 4.11, Seite 61).

Die Fraktion II.2 (458 mg) wurde mittels MPLC an RP-18-Material weiter fraktioniert (MPLC-Säule 3, siehe 9.2.4., Fließmittel: Acetonitril/Wasser, Gradient: 20-100 % ACN in 7h, zeitgesteuerte Fraktionierung mittels Fraktionssammler). Die Teilfraktion mit dem größten Alkamidanteil II.2.2 wurde durch semipräparative HPLC weiter aufgetrennt (siehe 9.2.5, Fließmittel: Acetonitril/Wasser, Methode: 57% ACN isokratisch über 20 min, in 40 min bis 45 min 75% ACN, in 50 min 99% ACN, Fluß: 3,0 ml/min, Detektion 254 nm). Durch manuelle peakorientierte Fraktionierung konnten sechs Alkamide gewonnen werden, **A8/9**, **A19/20**, **A10**, **A18**, **A11**, **A17**.

Die Teilfraktion II.3 wurde ebenfalls einer MPLC an RP-18-Material unterzogen (MPLC-Säule 3; Fließmittel: Acetonitril/Wasser, Gradient: 40-70 % ACN in 1,5 h,

70 % ACN isokratisch über 5 Std., 100% ACN in 30 Minuten, zeitgesteuerte Fraktionierung mittels Fraktionssammler). Insgesamt wurden sechs unterschiedliche Fraktionen gebildet, zwei davon enthielten die Reinstoffe **A6** und **A11**. Drei Fraktionen wurden weiter aufgetrennt.

Die Trennung der Unterfraktion II.3.4 durch semipräparative HPLC (Fließmittel: Acetonitril/Wasser, Methode: 50% ACN isokratisch über 57 min, von 50-99 % ACN in 10 min, stoptime: 70 min, Flussrate: Zu Beginn 3,0 ml/min nach 25 min 1,0 ml/min bis 57 min, dann wieder Anstieg bis 3,0 ml/min) lieferte die Alkamide **A12** und **A8/9** in reiner Form bzw als Isomerengemisch.

Teilfraktion II.3.5 enthielt die isomeren Dodeca-2E,4E,8Z,10Z/E-tetraensäure-isobutylamide in stark angereicherter Form. Durch eine MPLC an RP-18-Material (MPLC-Säule 2, Fließmittel: Acetonitril/Wasser, Methode: 40% ACN isokratisch über 3h, Flussrate: 3,0 ml/min) konnte eine Aufreinigung von **A8/9** erzielt werden, so dass am Schluss 181,7 mg Dodeca-2E,4E,8Z,10Z/E-tetraensäure-isobutylamide erhalten wurden.

Die Fraktion II.3.6 (253 mg) wurde ebenfalls mittels MPLC in die Reinstoffe **A10** und **A11** aufgetrennt (RP-18-Material, MPLC-Säule 2, Fließmittel: Acetonitril/Wasser, Methode: 45 % ACN isokratisch über 4h, Flussrate: 3,0 ml/min).

Aus Fraktion II.4 konnte in 2 Ansätzen durch MPLC an RP-18 Material (MPLC-Säule 3, Fließmittel Acetonitril/Wasser, Methode: 40% ACN in 3h 60% ACN, von 60% ACN bis 71% ACN in weiteren 3h, isokratisch für 3h bei 71% ACN, bis 99% ACN in einer Stunde, flow: 3,0 ml/min) **A6** und **A10** rein und **A8/9** als Isomerengemisch isoliert und eine Fraktion II.4.2, die **A12** in stark angereicherter Form enthielt, erhalten werden. Diese Fraktion wurde durch eine semipreparative HPLC-Trennung aufgereinigt und lieferte die Reinstoffe bzw. Isomerengemische **A12** und **A8/9**.

Eine weitere MPLC wurde mit Fraktion II.5 durchgeführt (MPLC-Säule 3; Fließmittel: Acetonitril/Wasser; Gradient: 30-40 % ACN in 1h, 40-50 % ACN in 2h, 50 % ACN isokratisch über 2h, von 50-60 % ACN in 1h, 60-99 % ACN in 2h; Fluss: 3 ml/min; Zeitgesteuerte Fraktionierung). Auf diese Weise wurden drei Fraktionen, von denen eine reine Dodeca-2E,4E,8Z,10Z/E-tetraensäure-isobutylamide **A8/9** (98 mg) und zwei Fraktionen Substanzgemische darstellten, erhalten. Zur Isolierung von **A6** und weiteren Alkamiden wurde Unterfraktion II.5.2 einer semipräparativen HPLC unterzogen Die Trennung erfolgte isokratisch bei 51% ACN und 49% Wasser über 35 min (Fluss: 3,0 ml/min; Detektion: 254 nm, manuell-peakorientierte Fraktionierung). Hieraus resultierten die Reinstoffe **A6** und **A13** und die Isomere **A14/15**.

Fraktion III wurde durch MPLC in 4 Reinstoffe, **A1, A3, A4, A16** in ein Isomerengemisch **A8/9** und in ein Substanzgemisch (III.1) getrennt (MPLC-Säule 2; Fließmittel: Acetonitril/Wasser; Gradient: 5-60% ACN in 4h, 60-80% in 3h, 80-99% ACN in 1h; Fluß: 0,8 ml/min; zeitgesteuerte Fraktionierung). Eine weitere semipreparative HPLC

war nötig, um die Isomere **A14/15** aus dem Substanzgemisch III.1 zu isolieren (Fließmittel: Acetonitril/Wasser; Methode: 48% ACN isokratisch über 47min; Fluss: 3,0 ml/min; Detektion: 230 nm; manuell peakorientierte Fraktionierung).

Fraktion IV wurde durch MPLC-Chromatographie in die nicht weiter zu trennenden Alkamide **A1/2** und in den Reinstoff **A3** aufgetrennt (MPLC-Säule 2; Fließmittel: Acetonitril/Wasser; Methode: 10-46% ACN in 4h, Fluss: 3 ml/min, zeitgesteuerte Fraktionierung).

9.6.2. Isolierungen der Kaffeesäurederivate aus *E. atrorubens* herba

Das Flavonoidglykosid **FG-1** wurde direkt aus dem Methanolextrakt von E. atrorubens herba mittels präparativer DC (siehe Kapitel 9.2.1, Seite 152) gewonnen. Insgesamt wurden 40,4 mg Methanolextrakt auf vier DC-Folien aufgetragen, so dass **FG-1** mit einer Ausbeute von 2 mg isoliert werden konnte.

9.6.3. Isolierung von Robinetin aus dem Presssaft von E. purpureae herba

750 ml *E. purpurea*-Presssaft (Fa. Schönenberger; Charge: VD 47) wurden 8 mal mit 500 ml Ethylacetat ausgeschüttelt und die Ethylacetatphase zur Trockne eingeengt. Der Rückstand (2 g) wurde mittels Säulenchromatographie an Sephadex® LH 20 (siehe Kapitel 9.2.2, Seite 153; 250 g Sephadex® LH 20; Höhe der stationären Phase: 1,25 m; mobile Phase: Methanol p.a.: Wasser 4:1; Fraktionsgrösse: 7-10 ml/25 min) aufgetrennt. Die Fraktionen 731-819 enthielten insgesamt 9 mg DC-reines Robinetin **F1**.

9.7. Physikalische und Spektroskopische Daten

9.7.1. Daten der Inhaltsstoffe aus Echinaceae atrorubens radix

A1: Undeca-2*E*,4*Z*-dien-8,10-diinsäure-isobutylamid

Summenformel:	$C_{15}H_{19}NO$
Aussehen:	Weiße Kristalle (als Isomeren-Gemisch mit **A2**)
UV_{max}:	λ_{max}: 260 nm
GC-EI-MS:	*m/z* (rel. Int.): 229 (3) $[M]^+$, 228 (13) $[M-H]^+$, 214 (4) $[M-Me]^+$, 186 (3) $[M-C_3H_7]^+$, 172 (8) $[M-C_4H_9]^+$, 157 (21) $[M-C_4H_{10}N]^+$, 144 (4), 128 (100) $[M-C_5H_{11}NO]^+$, 115 (8), 94 (10), 77 (12), 66 (56), 57 (24) $[C_4H_9]^+$, 41 (36).
^{1}H-NMR:	siehe Tabelle 4.6, Seite 67
DC:	siehe Tabelle 4.4, Seite 56
HPLC:	Rt: 5,54 min (Methode: Ech1)

A2: Undeca-2*E*,4*E*-dien-8,10-diinsäure-isobutylamid

Summenformel: $C_{15}H_{19}NO$
Aussehen: Weiße Kristalle (als Isomeren-Gemisch mit **A1**)
UV_{max}: λ_{max}: 260 nm
GC-EI-MS: *m/z* (rel. Int.): 229 (6) $[M]^+$, 228 (9) $[M-H]^+$, 214 (5) $[M-Me]^+$, 186 (3) $[M-C_3H_7]^+$, 166 (12) $[C_{10}H_{16}NO]^+$, 157 (100) $[M-C_4H_{10}N]^+$, 128 (87) $[M-C_5H_{11}NO]^+$, 110 (16), 94 (14), 77 (14), 66 (79), 57 (42) $[C_4H_9]^+$, 41 (54).
^{1}H-NMR: siehe Tabelle 4.6, Seite 67
DC: R*f*-Wert und Detektionsverhalten, siehe Tabelle 4.4, Seite 56
HPLC: Rt: 5,54 min (Methode: Ech1)

A3: Undeca-2*E*-en-8,10-diinsäure-isobutylamid

Summenformel: $C_{15}H_{21}NO$
Aussehen: Farblose Kristalle
UV_{max}: λ_{max}: 210 nm
GC-EI-MS: *m/z* (rel. Int.): 231 (2) $[M]^+$, 230 (3) $[M-H]^+$, 216 (2) $[M-Me]^+$, 202 (9), 188 (7) $[M-C_3H_7]^+$, 174 (5) $[M-C_4H_9]^+$,160 (9), 159 (5) $[M-C_4H_{10}N]^+$, 146 (10), 131 (24) $[M-C_5H_{10}NO]^+$, 116 (43), 103 (40), 91 (100) $[C_7H_7]^+$, 79 (19), 63 (45), 55 (45), 41 (59).
^{1}H-NMR: siehe Tabelle 4.7, Seite 69
DC: siehe Tabelle 4.4, Seite 56
HPLC: Rt: 6,19 min (Methode: Ech1)

A4: Dodeca-2*E*,4*Z*-dien-8,10-diinsäure-isobutylamid

Summenformel: $C_{16}H_{21}NO$
Aussehen: Weiße Kristalle
UV_{max}: λ_{max}: 260 nm
GC-EI-MS: *m/z* (rel. Int.): 243(5) $[M]^+$, 242 (27) $[M-H]^+$, 228 (4) $[M-Me]^+$, 215 (4), 200 (4) $[M-C_3H_7]^+$, 186 (17) $[M-C_4H_9]^+$,171 (10) $[M-C_4H_{10}N]^+$, 143 (19) $[M-C_5H_{10}NO]^+$, 128 (100) $[M-C_6H_{13}NO]^+$, 115 (31) $[M-C_{10}H_8]^+$, 94 (14), 77 (77), 66 (63) $[C_7H_7]^+$, 57 (49), 51 (69), 41 (57).
^{1}H-NMR: siehe Tabelle 4.7, Seite 69
DC: siehe Tabelle 4.4, Seite 56
HPLC: Rt: 6,95 min (Methode: Ech1)

A5: Dodeca-2*E*-en-8,10-diinsäure-isobutylamid

Summenformel: $C_{16}H_{23}NO$
Aussehen: Farblose Kristalle
UV_{max}: λ_{max}: 210 nm
GC-EI-MS: *m/z* (rel. Int.): 245 (2) $[M]^+$, 244 (6) $[M-H]^+$, 230 (3) $[M-CH_3]^+$, 217 (13), 202 (9) $[M-C_3H_7]^+$, 188 (6) $[M-C_4H_9]^+$, 173 (10) $[M-C_4H_{10}N]^+$, 160 (14), 145 (36) $[M-C_5H_{10}NO]^+$, 130 (34), 117 (59), 105 (42) $[C_8H_9]^+$, 91 (56) $[C_7H_7]^+$, 77 (68) $[C_6H_5]^+$, 57 (50) $[C_4H_9]^+$, 51 (65), 41 (100).
^{1}H-NMR: siehe Tabelle 4.8, Seite 71
DC: siehe Tabelle 4.4, Seite 56
HPLC: Rt: 7,77 min (Methode: Ech1)

A6: Dodeca-2*E*,4*Z*,10*Z*-trien-8-insäure-isobutylamid

Summenformel: $C_{16}H_{23}NO$
Aussehen: Farbloses Öl
UV_{max}: λ_{max}: 231 nm (sh), 260 nm
GC-EI-MS: *m/z* (rel. Int.): 245 (16) $[M]^+$, 244 (43) $[M-H]^+$, 230 (11) $[M-CH_3]^+$, 202 (5) $[M-C_3H_7]^+$, 188 (9) $[M-C_4H_9]^+$, 173 (9) $[M-C_4H_{10}N]^+$, 167 (7), 145 (60) $[M-C_5H_{10}NO]^+$, 131 (16),128 (36), 117 (38), 105 (14) $[C_8H_9]^+$, 91 (58) $[C_7H_7]^+$, 77 (72) $[C_6H_5]^+$, 66 (88), 56 (100).
^{1}H-NMR: siehe Tabelle 4.8, Seite 71
DC: siehe Tabelle 4.4, Seite 56
HPLC: Rt: 8,03 min (Methode: Ech1)

A7: Trideca-2*E*,7*Z*-dien-10,12-diinsäure-isobutylamid

Summenformel: $C_{17}H_{23}NO$
Aussehen: Farbloses Öl
UV_{max}: λ_{max}: 210 nm
GC-EI-MS: *m/z* (rel. Int.): 257 (1) $[M]^+$, 256 (2) $[M-H]^+$, 242 (2) $[M-CH_3]^+$, 228 (14), 214 (6) $[M-C_3H_7]^+$, 200 (4) $[M-C_4H_9]^+$,185 (7) $[M-C_4H_{10}N]^+$, 172 (7), 157 (21) $[M-C_5H_{10}NO]^+$, 142 (35) $[M-C_6H_{13}NO]^+$, 129 (81), 115 (90) $[M-C_{11}H_{10}]^+$, 103 (26), 91 (66), 81 (61) $[C_6H_9]^+$, 77 (65), 57 (55) $[C_4H_9]^+$, 55 (85), 41 (100).
^{1}H-NMR: siehe Tabelle 4.9, Seite 78
DC: siehe Tabelle 4.4, Seite 56
HPLC: Rt: 9,69 min (Methode: Ech1)

A8/9: Dodeca-2*E*,4*E*,8*Z*,10*Z*/*E*-tetraensäure-isobutylamide

Summenformel: $C_{16}H_{25}NO$
Aussehen: Weiße Nadeln
UV_{max}: λ_{max}: 231 nm (sh), 260 nm
GC-EI-MS: *m/z* (rel. Int.): 247 (2) $[M]^+$, 246 (1) $[M-H]^+$, 232 (2) $[M-CH_3]^+$, 218 (2), 204 (2) $[M-C_3H_7]^+$, 175 (1) $[M-C_4H_{10}N]^+$, 167 (20) $[C_{10}H_{17}NO]^+$, 152 (5), 147 (2) $[M-C_5H_{10}NO]^+$, 128 (6) $[C_7H_{14}NO]^+$, 115 (11) $[M-C_{10}H_{12}]^+$, 94 (7), 81 (100) $[C_6H_9]^+$, 66 (25), 57 (27) $[C_4H_9]^+$, 41 (32).
^{1}H-NMR: siehe Tabelle 4.10, Seite 82
DC: siehe Tabelle 4.4, Seite 56
HPLC: Rt: 10,35 min und 10,50 min (Methode: Ech1)

A10: Dodeca-2*E*,4*E*,8*Z*-triensäure-isobutylamid

Summenformel: $C_{16}H_{27}NO$
Aussehen: Farbloses Öl
UV_{max}: λ_{max}: 260 nm
GC-EI-MS: *m/z* (rel. Int.): 249 (4) $[M]^+$, 234 (1) $[M-CH_3]^+$, 220 (1), 206 (1) $[M-C_3H_7]^+$, 192 (1) $[M-C_4H_9]^+$,177 (18) $[M-C_4H_{10}N]^+$, 166 (15), 152 (10), 149 (1) $[M-C_5H_{10}NO]^+$, 115 (3), 110 (10), 94 (16), 81 (16) $[C_6H_9]^+$, 66 (45), 57 (50) $[C_4H_9]^+$, 55 (73), 41 (100).
^{1}H-NMR: siehe Tabelle 4.11, Seite 85
DC: siehe Tabelle 4.4, Seite 56
HPLC: Rt: 12,94 min (Methode: Ech1)

A11: Dodeca-2*E*,4*E*-diensäure-isobutylamid

Summenformel: $C_{16}H_{29}NO$
Aussehen: Weiße Nadeln
UV_{max}: λ_{max}: 260 nm
GC-EI-MS: *m/z* (rel. Int.): 251 (14) $[M]^+$, 236 (7) $[M-CH_3]^+$, 222 (1), 208 (3) $[M-C_3H_7]^+$, 194 (2) $[M-C_4H_9]^+$,179 (78) $[M-C_4H_{10}N]^+$, 152 (43) $[M-C_7H_{15}]^+$, 138 (5), 113 (21) $[C_6H_{11}NO]^+$, 110 (20), 96 (93) $[C_5H_6NO]^+$, 81 (100) $[C_5H_5O]^+$, 67 (37), 66 (38), 57 (25) $[C_4H_9]^+$, 55 (46), 41 (65).
^{1}H-NMR: siehe Tabelle 4.11, Seite 85
DC: siehe Tabelle 4.4, Seite 56
HPLC: Rt: 16,44 min (Methode: Ech1)

A12: Dodeca-2*E*,4*Z*,10*Z*-trien-8-insäure-2-methylbutylamid

Summenformel: $C_{17}H_{25}NO$
Aussehen: Farbloses Öl
UV_{max}: λ_{max}: 235 nm (sh), 260 nm
GC-EI-MS: *m/z* (rel. Int.): 259 (8) $[M]^+$, 258 (21) $[M-H]^+$, 244 (6) $[M-CH_3]^+$, 230 (2) $[M-C_2H_5]^+$, 202 (2) $[M-C_4H_9]^+$, 188 (10) $[M-C_5H_{11}]^+$, 173 (10) $[M-C_5H_{12}N]^+$, 145 (57) $[M-C_6H_{12}NO]^+$, 131 (30), 117 (40), 105 (24), 91 (54), 77 (100), 66 (71), 53 (31), 43 (61).
^{1}H-NMR: siehe Tabelle 4.12, Seite 92
^{13}C-NMR: siehe Tabelle 4.12, Seite 92
DC: siehe Tabelle 4.4, Seite 56
HPLC: Rt: 10,02 min (Methode: Ech1)
Spezifische Drehung: $[\alpha]_D^{20}$ = -11 ° (c = 0,1; Ethanol p.a.)

A13: Dodeca-2*E*,4*Z*-dien-8,10-diinsäure-2-methylbutylamid

Summenformel: $C_{17}H_{23}NO$
Aussehen: weiße Kristalle
UV_{max}: λ_{max}: 260 nm
GC-EI-MS: *m/z* (rel. Int.): 257 (20) $[M]^+$, 256 (40) $[M-H]^+$, 242 (6) $[M-CH_3]^+$, 228 (6) $[M-C_2H_5]^+$, 200 (10) $[M-C_4H_9]^+$, 186 (23) $[M-C_5H_{11}]^+$, 171 (20) $[M-C_5H_{12}N]$+, 158 (6), 143 (30) $[M-C_6H_{12}NO]^+$, 128 (47), 115 (21), 110 (13), 91 (8), 77 (32), 71 (33), 66 (22), 51 (27), 43 (76) 41 (100).
^{1}H-NMR: siehe Tabelle 4.13, Seite 95
^{13}C-NMR: siehe Tabelle 4.13, Seite 95
DC: siehe Tabelle 4.4, Seite 56
HPLC: Rt: 8,79 min (Methode: Ech1)
Spezifische Drehung: $[\alpha]_D^{20}$ = -5 ° (c = 0,1; Ethanol p.a.)

A14/15: Dodeca-2*E*,10*E*/*Z*-dien-8-insäure-isobutylamide

Summenformel: $C_{16}H_{25}NO$
Aussehen: weiße Kristalle
UV_{max}: λ_{max}: 220 nm
GC-EI-MS: *m/z* (rel. Int.): 247 (22) $[M]^+$, 246 (29) $[M-H]^+$, 232 (20) $[M-CH_3]^+$, 218 (32), 204 (23) $[M-C_3H_7]^+$, 190 (11) $[M-C_4H_9]^+$, 175 (36) $[M-C_4H_{10}N]^+$, 147 (100) $[M-C_5H_{10}NO]^+$, 133 (43), 119 (59), 105 (90) $[C_8H_9]^+$, 91 (90) $[C_7H_7]^+$, 79 (74), 77 (62) $[C_6H_5]^+$, 67 (62), 57 (88) $[C_4H_9]^+$, 41 (100).

^{1}H-NMR: siehe Tabelle 4.14, Seite 99
DC: siehe Tabelle 4.4, Seite 56
HPLC: Rt: 8,99 min (Methode: Ech1)

A16: Pentadeca-2*E*,9*Z*-dien-12,14-diinsäure-isobutylamid

Summenformel: $C_{19}H_{27}NO$
Aussehen: Farbloses Öl
UV_{max}: λ_{max}: 199 nm, 211 (sh) nm
GC-EI-MS: *m/z* (rel. Int.): 285 (2) $[M]^+$, 284 (4) $[M-H]^+$, 270 (3) $[M-CH_3]^+$, 242 (14) $[M-C_3H_7]^+$, 228 (11) $[M-C_4H_9]^+$,213 (3) $[M-C_4H_{10}N]^+$, 202 (14), 185 (10) $[M-C_5H_{10}NO]^+$, 154 (16), 143 (23), 129 (40), 115 (37), 103 (27) $[C_8H_7]^+$, 91 (55), 81 (43) $[C_6H_9]^+$, 77 (53), 57 (40) $[C_4H_9]^+$, 55 (100), 41 (72).
^{1}H-NMR: siehe Tabelle 4.15, Seite 103
^{13}C-NMR: siehe Tabelle 4.15, Seite 103
DC: siehe Tabelle 4.4, Seite 56
HPLC: Rt: 12,31 min (Methode: Ech1)

A17: Dodeca-2*E*,4*E*-diensäure-2-methylbutylamid

Summenformel: $C_{17}H_{31}NO$
Aussehen: weiße Kristalle
UV_{max}: λ_{max}: 260 nm
GC-EI-MS: *m/z* (rel. Int.): 265 (10) $[M]^+$, 250 (2) $[M-CH_3]^+$, 236 (5) $[M-C_2H_5]^+$, 208 (3) $[M-C_4H_9]^+$, 194 (3), 179 (71) $[M-C_5H_{12}N]^+$, 166 (25) $[M-C_7H_{15}]^+$, 152 (5), 127 (7), 110 (33), 96 (81) $[C_5H_6NO]^+$, 81 (92) $[C_5H_5O]^+$, 66 (41), 55 (58), 41 (100).
^{1}H-NMR: siehe Tabelle 4.16, Seite 105
DC: siehe Tabelle 4.4, Seite 56
HPLC: Rt: 18,66 min (Methode: Ech1)
Spezifische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = -4$ ° (c = 0,1; Ethanol p.a.)

A18: Dodeca-2*E*,4*E*,8*Z*-triensäure-2-methylbutylamid

Summenformel: $C_{17}H_{29}NO$
Aussehen: Farbloses Öl
UV_{max}: λ_{max}: 260 nm

GC-EI-MS: *m/z* (rel. Int.): 263 (3) $[M]^+$, 248 (1) $[M\text{-}CH_3]^+$, 234 (2) $[M\text{-}C_2H_5]^+$, 206 (1) $[M\text{-}C_4H_9]^+$, 177 (21) $[M\text{-}C_5H_{12}N]^+$, 166 (6), 150 (2), 149 (2) $[M\text{-}C_6H_{12}NO]^+$, 110 (15), 94 (17), 81 (17) $[C_6H_9]^+$, 66 (47), 55 (76) 41 (100).
^{1}H-NMR: siehe Tabelle 4.16, Seite 105
DC: siehe Tabelle 4.4, Seite 56
HPLC: Rt: 15,56 min (Methode: Ech1)
Spezifische Drehung: $[\alpha]_D^{20}$ = -13 ° (c = 0,1; Ethanol p.a.)

A19/20: Dodeca-2*E*,4*E*,8*Z*,10*Z*/*E*-tetraensäure-2-methylbutylamide

Summenformel: $C_{17}H_{27}NO$
Aussehen: weiße Kristalle
UV_{max}: λ_{max}: 231 nm (sh), 260 nm
GC-EI-MS: *m/z* (rel. Int.): 261 (1) $[M]^+$, 246 (1) $[M\text{-}CH_3]^+$, 232 (1) $[M\text{-}C_2H_5]^+$, 204 (1) $[M\text{-}C_4H_9]^+$, 181 (20) $[C_{11}H_{19}NO]^+$, 166 (4), 142 (6), 129 (6) $[M\text{-}C_{10}H_{12}]^+$, 110 (3), 94 (9), 81 (100) $[C_6H_9]^+$, 66 (34), 57 (5) $[C_4H_9]^+$, 53 (24), 41 (51).
^{1}H-NMR: siehe Tabelle 4.17, Seite 109
DC: siehe Tabelle 4.4, Seite 56
HPLC: Rt: 12,64 min (Methode: Ech1)
Spezifische Drehung: $[\alpha]_D^{20}$ = -4 ° (c = 0,1; Ethanol p.a.)

Stigmasterol

Summenformel: $C_{29}H_{48}O$
GC-EI-MS: *m/z* (rel. Int.): 412 $[M]^+$ (5), 351 (2), 314 (1), 301 (2), 300 (5), 281 (4), 273 (2), 271 (9), 255 (11), 231 (2), 229 (3), 213 (7), 207 (4), 159 (18), 145 (21), 133 (26), 105 (29), 83 (56), 55 (100), 41 (44)
DC: R*f*: 0,78 (DC-T1)
GC: Rt: 11,9 min (Methode: GC4)

β-Sitosterol

Summenformel: $C_{29}H_{50}O$
GC-EI-MS: m/z (rel. Int.): 414 $[M]^+$ (5), 399 $[M - CH_3]^+$ (2), 396 $[M - H_2O]^+$ (3), 381 $[M - CH_3 - H_2O]^+$ (3), 329 (6), 303 (7), 273 (5), 255 (7), 231 (6), 213 (13), 207 (18), 159 (17), 145 (26), 133 (21), 107 (34), 91 (36), 81 (40), 55 (60), 43 (100)

DC: R*f*: 0,78 (DC-T1)
GC: Rt: 13,1 min (Methode: GC4)

Campesterol
Summenformel: $C_{28}H_{48}O$
GC-EI-MS: *m/z* (rel. Int.): 400 $[M]^+$ (6), 382 $[M - H_2O]^+$ (3), 367 $[M - CH_3 - H_2O]^+$ (3), 315 (7), 289 (8), 273 (4), 255 (7), 231 (5), 213 (12), 207 (28), 199 (5), 159 (15), 145 (24), 119 (20), 105 (34), 91 (34), 81 (37), 55 (56), 43 (100)
DC: R*f*: 0,78 (DC-T1)
GC: Rt: 11,2 min (Methode: GC4)

9.7.2. Daten der Inhaltsstoffe aus Echinaceae atrorubens herba

FG-1: Narcissin = 3,4´,5,7-Tetrahydroxy-3´-methoxyflavon-3-β-[6-O-α-L-rhamnopyranosyl-D-glucopyranose]

Summenformel: $C_{28}H_{32}O_{16}$ MG: 624
Aussehen: Gelbes Pulver
UV_{max}: λ_{max}: 254 nm, 268 nm (sh), 300 nm (sh), 354 nm
GC-EI-MS: m/z (rel. Int.): 647 $[M+Na]^+$ (44), 625 $[M+H]^+$ (2), 479 [MH-Rhamnose]$^+$ (9), 317 [MH-Rhamnose-Glucose]$^+$ (100), 302 [AglykonH-CH_3]$^+$ (11), 274 (2).
^{1}H-NMR: siehe Tabelle 4.18, Seite 113
DC: Rf: 0,45
HPLC: Rt: 11,17 min

9.7.3. Daten der Inhaltsstoffe aus *Echinacea purpurea*

F1: Robinetin = 3´,4´,5´,7-Tetrahydroxyflavonol
Summenformel: $C_{15}H_{10}O_7$
Aussehen: gelbes Pulver
UVλ_{max} (nm): **MeOH**: 251, 265sh, 317, 368
NaOMe: 240sh, 275sh, $325_{(n.l.)}$, deg. (> 450)
$AlCl_3$: 275, 283, 318, 445
$AlCl_3$/HCL: 269, 278sh, 318, 427
NaOAc: 255 sh, 310 sh, deg. 345
NaOAc/H_3BO_3: 252, 315, 385

DCI-MS (NH_3): Positive Ionen: m/z (rel. Int.): 320 $[M+NH_4]^+$ (35); 303 $[M+H]^+$ (100); 180 (3)

Direkteinlass: m/z (rel. Int.): 302 $[M]^+$ (42); 285 $[M-OH]^+$ (5); 273 $[M-COH]^+$ (5); 153 $[M-C_7O_4H_5]^+$(12); 137 $[M-C_7O_3H_5]^+$ (30); 129; 117

DC: System T3: Rf: 0,96 UV (366 nm): gelbe Fluoreszenz; nach Besprühen mit Naturstoff-Reagenz A im Tageslicht: Starke orange Fluoreszenz

HPLC: System Ech2: Rt: 9,42 min.

9.8. Pharmakologische Untersuchungen*

9.8.1. IL-6- und TNF-α ELISA-Testsystem

Die verwendeten Makrophagen wurden aus dem Peritonealraum von 6-8 Wochen alten, männlichen BALB/c Mäusen gewonnen. Anschließend wurden die isolierten Makrophagen mit den entsprechenden Verdünnungen der Alkamidlösungen bzw. mit den Kontrollen für 48 Stunden bei 37 °C inkubiert. Der Überstand wurde mittels eines ELISA-Testsystems auf die IL-6 und TNF-α-Konzentration untersucht. Die Ergebnisse wurden als Prozentzahl der Positivkontrolle (*Echinacea*-Polysaccharidfraktion), deren Hemmung gleich 100 % gesetzt wurde, angegeben.

Die in dem Testsystem eingesetzten Alkamide wurden aus *E. atrorubens* radix isoliert (siehe Kapitel 9.6.1, Seite 163). Bevor sie in den pharmakologischen Untersuchungen eingesetzt werden konnten, wurden sie unter einem Stickstoffstrom vom Lösungsmittel (*n*-Hexan) befreit und in 95 %igem Ethanol mit einer Konzentration von 0,43 mg/ml gelöst. Anschließend wurden 1:100, 1:200, 1:400 und 1:800 Verdünnungen der Alkamidlösungen hergestellt. Mit diesen Verdünnungen wurden die oben genannten Analysen jeweils dreimal durchgeführt.

9.9. Pharmakokinetische Untersuchungen

9.9.1. Methodenentwicklung und -validierung

Die als Referenzsubstanz eingesetzten Dodeca-2*E*,4*E*,8*Z*,10*Z/E*-tetraensäure-isobutylamide wurden aus den Wurzeln von *E. atrorubens* isoliert (siehe Kapitel 9.6.1). Die Reinheit, die Dünnschicht- und HPLC-chromatographisch überprüft wurde, betrug 94 %.

* Die IL-6- und TNF-α-Tests wurden von Prof. Tim Lee, Dahlhousie Universität durchgeführt.

Das für die Vorversuche verwendete Schweineplasma wurde aus dem ersten Blutstrahl von frisch geschlachteten Schweinen aus dem Düsseldorfer Schlachthof bezogen. Das Blut wurde mit einer frisch hergestellten Dextran- (NaCl 1,9 g, Dextran T-500 12,0 g, H_2O ad 200,0 g) und einer Citratlösung (NaCl 1,9 g, Tri-Na-citrat 8,0 g, Heparin 20 µl, H_2O ad 200,0 g) versetzt und 1 Stunde zum Sedimentieren stehengelassen. Der Überstand wurde 10 Minuten bei 550 g/4 °C zentrifugiert. Das Plasma wurde anschließend direkt oder höchstens zwei Tage bei 4 °C gelagert und dann in den Versuchen eingesetzt.
Für die ersten Plasmauntersuchungen wurde eine Plasmakonserve aus der Blutbank der Universitätsklinik Düsseldorf verwendet. Direkt nach Auftauen des Plasmas wurden jeweils 50 ml mit 4,5 mg Dodeca-2E,4E,8Z,10Z/E-tetraensäure-isobutylamiden **A8/9** versetzt. Diese wurden sofort wie in Kapitel 6.1.1, Seite 125 beschrieben, untersucht.
Das für die Methodenvalidierung verwendete Blut, wurde in der Arztpraxis von Dr. Wienert entnommen und direkt mit Natriumcitrat versetzt.
Unmittelbar nach der Entnahme wurden dem Blut definierte Mengen an **A8/9** aus der Isobutylamid-Verdünnung (siehe Tabelle 9.5) zugesetzt (150, 30, 20, 10 ng pro ml Blut) und zentrifugiert (30 Minuten, Geschwindigkeit: 1600 rpm, Bremse: 6, Beckman Coulter, Model J6, Seriennummer: 648, Zentrifugenglasdurchmesser: 3 cm). Anschließend wurden 10,0 ml Plasma auf 20 ml mit dest. Wasser verdünnt und mit 200 µl Benzanilid-Verdünnung (siehe Tabelle 9.5) versetzt. Die Lösung wurde quantitativ auf eine Extrelut®-20-Säule aufgetragen und nach 30 Minuten mit dreimal 40 ml Dichlormethan eluiert. Der am Rotationsverdampfer bei 32 °C schonend zur Trockne eingeengte Dichlormethanrückstand wurde in 200 µl Acetonitril/Wasser (1:1) aufgenommen und mittels HPLC untersucht (Trennsystem: **Tet**, siehe Seite 156). Injiziert wurden jeweils 100 µl der aufbereiteten Proben.
Die Wiederfindungsraten wurden bestimmt, indem die DAD-Signalfläche der **A8/9** und Benzanilid enthaltenen Blutproben mit den Peakflächen der nicht aufgearbeiteten Isobutylamid- und Benzanilidstandardlösungen verglichen wurden. Die Kalibriergerade wurde aus den Massen- und Signalflächenverhältnissen der vier verschiedenen Blutkonzentrationen an **A8/9** erstellt. Alle Werte stellen Mittelwerte aus mindestens drei Messungen dar.

Tabelle 9.5: Verwendete Lösungen und Material für die pharmakokinetischen Studien.

- Extrelut®-20-Material	weitporiges Kieselgur, Firma Merck, Darmstadt
- Glassäule für das Extrelut®-Material	Durchmesser: oben: 27 mm, mit am Auslauf eingebauter Glasfritte (Porengröße 2)
- Urtinktur für die Vorversuche:	selbsthergestellt aus dem frischen Kraut von *E. purpurea* nach HAB
- Chloroform	durch einmalige Destillation aus techn. Chloroform gewonnen
- Dichlormethan	durch einmalige Destillation aus techn.

	Dichlormethan gewonnen
- Benzanilid	Merck-Schuchardt
- Urtinktur für die Resorptionsstudien	nach dem HAB1 aus 2200 g frischem *E. purpurea* Kraut selbst hergestellt
-Dodeca-2E,4E,8Z,10Z/E-tetraensäure-isobutylamid-Stammlösung	15,6 mg **8/9** in 100,0 ml Ethanol p.a. lösen
-Dodeca-2E,4E,8Z,10Z/E-tetraensäure-isobutylamid-Verdünnung	20,0 ml **8/9-**Stammlösung auf 100,0 ml mit Ethanol p.a. verdünnen
-Benzanilidstammlösungen	10,1 mg BA in 100,0 ml Ethnol p.a. lösen
-Benzanilidverdünnung	10,0 ml BA-Stammlösung auf 100,0 ml mit Ethanol p.a. verdünnen

9.9.2. Bioverfügbarkeitsstudien nach der oralen Applikation von *E. purpurea*-Urtinktur

Nachweis der Alkamide im Humanblut

- Erster Einnahmeversuch für den Nachweis der Alkamide im Humanblut

E. purpurea Urtinktur (Immudynal®) wurde für die Bioverfügbarkeitsstudien verwendet. Die Tinktur stellt einen ethanolischen Extrakt dar, der nach dem Deutschen Homeopathischen Arzneibuch HAB1 aus dem frischen blühenden Kraut von *E. purpurea* hergestellt wurde.

In dem ersten Einnahmeversuch wurde einem gesunden Probanden zweimal 40 ml *E. purpurea* Urtinktur, entsprechend 1,9 mg Dodeca-2*E*,4*E*,8*Z*,10*Z/E*-tetraensäure-isobutylamide, oral appliziert (Einnahme- und Blutabnahmeschema siehe Tabelle 9.6). Es wurden jeweils 50 ml Blut entnommen, mit Natriumcitratlösung versetzt, direkt zentrifugiert und 10,0 ml Plasma jeweils wie oben beschrieben auf den Dodeca-2E,4E,8Z,10Z/E-tetraensäure-isobutylamid-Gehalt analysiert.

Tabelle 9.6: Einnahmeschema der E. purpurea Urtinktur in dem ersten Einnahmeversuch

7:25 Uhr	Abnahme der Blindprobe
7:30 Uhr	Orale Applikation von 40 ml *E. purpurea* Urtinktur
8:00 Uhr	Frühstück
8:30 Uhr	Erste Blutabnahme
9:30 Uhr	Zweite Blutabnahme
10:30 Uhr	Dritte Blutabnahme
12:00 Uhr	Mittagessen
13:30 Uhr	Zweite Einnahme von 40 ml *E. purpurea*

	Urtinktur
14:30 Uhr	Erste Blutabnahme
15:30 Uhr	Zweite Blutabnahme
16:30 Uhr	Dritte Blutabnahme

- Zweiter Einnahmeversuch für den Nachweis der Alkamide im Humanblut
Für den zweiten Einnahmeversuch wurden 90 ml Urtinktur (Immudynal) bei Raumtemperatur auf 65 ml eingeengt, um die Verträglichkeit zu verbessern. Mittels HPLC konnte bestätigt werden, dass die Alkamidzusammensetzung dadurch nicht verändert wurde.
Einem gesunden Probanden wurde die aufkonzentrierte Urtinktur, entsprechend 4,3 mg **A8/9**, vor dem Frühstück oral verabreicht. 100 ml Blut wurden eine Stunde nach der Einnahme entnommen, mit 2 ml Natriumcitrat versetzt und sofort zentrifugiert. 10,0 ml Plasma wurden jeweils nach der oben beschriebenen Methode (siehe Kapitel 9.9.1) untersucht, so dass die Analysen dreimal durchgeführt werden konnten.

Nachweis der Alkamide im menschlichen Urin
- Erster Einnahmeversuch für den Nachweis der Alkamide im menschlichen Urin Extrelut®-Verfahren
Einer gesunden Probandin wurde am Abend aufkonzentrierte *E. purpurea* Urtinktur (siehe oben), entsprechend einer Menge von 2,4 mg Dodeca-2*E*,4*E*,8*Z*,10*Z/E*-tetraensäure-isobutylamide, peroral verabreicht. Vor der Einnahme, am Morgen und alle weiteren zwei Stunden wurden Urinproben gesammelt. Der unverdünnte Urin wurde direkt wie oben angeführt (siehe Kapitel 9.9.1) nach dem Extrelut®-Verfahren untersucht.

Untersuchung des Urins mittels Festphasenextraktion über C-18-Material
Für die Festphasenextraktion wurde folgende Kartusche benutzt:
Merck LiChrolut Rp-18endcapped (200 mg), Part# 19847, Lot# 989050

Sowohl die Referenz- als auch die Urinproben wurden nach folgendem Verfahren bearbeitet:

- Konditionieren der Säule erst mit 3 ml Methanol, dann mit 3 ml Wasser (Die Säule darf nicht austrocknen).
- Aufgabe der Probe ohne Vakuum.
- Die Probe mit Vakuum durch die Säule saugen.
- Mit gleicher Menge Wasser die Säule durchspülen, um polare Stoffe abzutrennen.

- Dreimal jeweils 2 ml Acetonitril auf die Säule auftragen und unter Vakuumanschluss das Acetonitril durch die Säule saugen.
- Vereinigte Eluate am Rotationsverdampfer bei 32 °C schonend zur Trockne einengen.
- Rückstand in 200 µl Acetonitril/Wasser aufnehmen und mittels HPLC untersuchen (Methode: **Tet**).

Durch dieses Verfahren wurde für eine wässrige Dodeca-2*E*,4*E*,8*Z*,10*Z/E*-tetraensäureisobutylamid-Verdünnung (50 ng/ml) eine Wiederfindungsrate an **A8/9** von 90 % ermittelt. Die Wiederfindungsrate wurden bestimmt, indem die DAD-Signalfläche der behandelten Probe mit der Peakfläche der gleichen Menge an **A8/9** aus einer Referenzlösung verglichen wurde.

- Zweiter Einnahmeversuch für den Nachweis der Alkamide im menschlichen Urin
Einer gesunde Probandin wurde wiederum am Abend aufkonzentrierte *E. purpurea* Urtinktur, entsprechend 4,9 mg **A8/9**, oral appliziert. Am morgen und alle zwei Stunden bis 24 Stunden nach der Einnahme wurden Urinproben entnommen. Diese wurden sofort und unverdünnt nach der oben beschriebenen Methode auf den C-18-Säulen untersucht.

9.9.3. Epitheliale Transportstudien der Alkamide mit colorektalen Adenocarcinomzellen*

Tabelle 9.7 gibt die Substanzen, Lösungen und Materialien, die in den epithelialen Transportstudien benutzt werden, wider.

Tabelle 9.7: Substanzen, Lösungen und Materialien, die in den epithelialen Transportstudien benutzt wurden.

Substanzen	Herkunft
Dodeca-2E,4E,8Z,10Z/E-tetraensäure-isobutylamide	Eigenisolate aus E. atrorubens radix (siehe 9.6.1)
Lipopolysaccharide von Escherichia coli (Serotype 055:B5) (LPS)	Fluka
Phorbol-12-Myristat-13-acetat (PMA)	ICN Biochemicals Inc.
^{14}C-Mannitol	NEN^{TM}
Caco-2-Zellen	"American Type Culture Collection"

* durchgeführt von Dr. Heilmann, Department für angewandte Biowissenschaften, Institut für Pharmazie, ETH Zürich

Substanzen	Herkunft
	(ATCC)
Glucose (4,5 g/L) „Dulbeccos Modified Eagle Medium mit glutaMAX	GibcoBRL
Foetales Kalbserum (FCS)	GibcoBRL
Nicht essentielle Aminosäuren	GibcoBRL
Penicillin	GibcoBRL
Streptomycin	GibcoBRL
Amphotericin B	GibcoBRL
Methylthiazolyltetrazol chlorid (MTT)	Fluka

LPS und PMA wurden auf eine Konzentration von 5 bis 2 µg/ml eingestellt.

Zellkulturen: Caco-2 Zellen wurden in hochangereicherter Glucose (4,5 g/L), mit 10 % foetalem Kälberserum, 1 % nicht essentiellen Aminosäuren, 100 Einheiten/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 0,5 µg/ml Amphotericin B bei 37 °C und 5 % CO_2 kultiviert.

Transport Experimente: (modifiziert nach ARTURSSON et al. (1996)): Die Zellen wurden in Transwell-COL Costar Einsätze gelegt (Polycarbonatmembranen, 24 mm Durchmesser, 0,4 µm Porengröße, 500000 Zellen/Einsatz). Das Medium wurde jeden zweiten Tag gewechselt.

Wenn der transepitheliale, elektrische Widerstand (TEER) im Steady-state größer als 300 $\Omega\,cm^2$ war (nach 19-24 Tagen) konnten die Zellen für die Versuche benutzt werden. TEER-Messungen wurden in einem Millicell®-ERS-Gerät (Endohm 24, Millipore) durchgeführt. 12 Stunden bevor die Experimente begannen, wurde die FCS-Konzentration auf 1 % herabgesetzt. Die Versuche wurden eingeleitet, indem die Zellen zweimal mit FCS freiem Medium gewaschen wurden. Die Transport-Untersuchungen fanden mit FCS freiem Medium statt, da das Serum durch Bildung von Präzipitaten zu Störungen bei der HPLC-Analyse führen kann.

Dodeca-2*E*,4*E*,8*Z*,10*Z/E*-tetraensäure-isobutylamide wurden mit Medium auf eine Konzentration von 25 µg/ml eingestellt. 1,5 ml wurden in die Donatorphase gegeben. Nach 15, 30, 60, 90, 120, 180, 300 und 360 Minuten wurde das Medium in der Akzeptorphase durch neues Medium ausgetauscht, um Sink-Bedingungen herzustellen.

Alle Ergebnisse stellen Mittelwerte ± Standardabweichung aus Zweifach-Bestimmungen dar und jedes Experiment wurde zweimal durchgeführt. Die maximale Standardabweichung lag bei 5 %. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Students Zweistich-Proben T-Test mit einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$.

Die Vollständigkeit der Monolayers wurde geprüft durch den Transport des radioaktiv markierten ^{14}C-Mannitols von der Donator- in die Akzeptorphase. Diese Versuche wurden in einem flüssigen Szintillationszähler (Beckmann LS 6500 Counter) durchgeführt.

HPLC: Die Konzentration der Dodeca-2*E*,4*E*,8*Z*,10*Z/E*-tetraensäure-isobutylamide wurde mittels HPLC bestimmt (Trennsystem: Tetr, siehe Kapitel 9.2.5, Seite 155).

Zytotoxizität: Die Zytotoxizität der Dodeca-2*E*,4*E*,8*Z*,10*Z/E*-tetraensäure-isobutylamide wurde auf 96 Wellplatten (Falcon) mit Caco-2-Zellen, der gleichen Charge wie sie für die Transportstudien benutzt wurden, bestimmt. Der Test wurde jeweils mit 4000 Zellen über einen Zeitraum von 72 Stunden durchgeführt. Um den Test quantifizieren zu können, wurden 15 µl einer wässrigen MTT-Lösung (5 mg/ml in PBS) hinzugefügt. Nach 4 Stunden wurde das Medium abgenommen und das produzierte Formazan in 150 µl einer 10 prozentigen wässrigen Natriumdodecasulfat-Lösung gelöst. Nach 24 Stunden wurde die Absorption bei 540 nm mittels eines Mikroplatten-Reader (MRX, Dynex Technologies) vermessen. Jeder Test wurde doppelt und alle Experimente wurden zweimal durchgeführt. Die maximale Standardabweichung lag bei 15 % (absolut). Die Positivkontrollen wurden mit Podophyllotoxin durchgeführt (IC_{50} 0,02 ± 0,005 µg/ml).

10 Literatur

ARZNEIMITTELKOMMISSION DER DEUTSCHEN ÄRZTESCHAFT: Wie verträglich sind *Echinacea*-haltige Präparate? *Deutsches Ärzteblatt* **93**, B2135 (1996).

AUFBEREITUNGSMONOGRAPHIEN für Arzneimittel der phytotherapeutischen Therapierichtung: Echinaceae purpureae herba (Purpursonnenhutkraut) *BAz* Nr. 43 vom 02.03.1989.

AUFBEREITUNGSMONOGRAPHIEN für Arzneimittel der phytotherapeutischen Therapierichtung: Echinaceae pallidae radix *BAz* (Blasse Sonnenhutwurzel) Nr. 162 vom 29.08.1992.

ARTURSSON P.; KARLSSON J.; OCKLIND G.; SCHIPPER N.: Studying transport processes in absorptive epithelia. In: Shaw A.J.: Epithelial cell culture. Oxford: IRL Press, 111-133 (1996).

BARSETT H.; LANGSETER A.M.; KRISTIANSEN G.; COHEN E.H.; MICHAELSEN T.E.: Polysaccharides from the root of *Echinacea angustifolia*, structure and biological activity. Poster auf dem Kongress der Gesellschaft für Arzneipflanzenforschung, Zürich (2000).

BAUER R.; KHAN I.A.; WRAY V.; WAGNER H.: Two Acetylenic Compounds from *Echinacea pallida* Roots. *Phytochemistry* **26**, 1198-1200 (1987).

BAUER R.; JURCIC K.; PUHLMANN J.; WAGNER H.: Immunologische In-vivo- und In-vitro-Untersuchungen mit *Echinacea*-Extrakten. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* **38**, 276-281 (1988).

BAUER R.; KHAN I.A.; WAGNER H.: TLC and HPLC Analysis of *Echinacea pallida* and *Echinacea angustifolia* Roots. *Planta Med.* **54**, 426-430 (1988).

BAUER R.; REMIGER P.; WAGNER H.: *Echinacea* – Vergleichende DC- und HPLC-Analyse der Herba-Drogen von *Echinacea purpurea*, *Echinacea pallida* und *Echinacea angustifolia*. *Dtsch. Apoth. Ztg*. **128**,174-180 (1988).

BAUER R.; FOSTER S.: HPLC Analysis of *Echinacea simulata* and *E. paradoxa* Roots. *Planta Med.* **55**, 637 (1989).

BAUER R.; REMIGER P.; JURCIC K.; WAGNER H.: Beeinflussung der Phagozytose-Aktivität durch *Echinacea*-Extrakte. *Zeitschrift für Phytotherapie* 10, 43-48 (1989).

BAUER R.; REMIGER P.: TLC and HPLC Analysis of alkamides in *Echincea* Drugs. *Planta Med.* **55**, 367-371 (1989).

BAUER R.; REMIGER P.; ALSTAT E.: Alkamides and Caffeic Acid Derivatives from the Roots of *Echinacea tennesseensis*. *Planta Med.* **56**, 533-534 (1990).

BAUER R.; WAGNER H.: *Echinacea* - Ein Handbuch für Ärzte, Apotheker und andere Naturwissenschaftler. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 1990.

BAUER R.: *Echinacea* - Pharmazeutische Qualität und therapeutischer Wert. *Zeitschrift für Phytotherapie* **18**, 207-214 (1997).

BAUER R.: Standardisierung von *Echinacea purpurea*-Presssaft auf Cichoriensäure und Alkamide. *Z. Phytother.* **18**, 270-276 (1997).

BAUER R.; HOHEISEL O.; STUHLFAUTH I.; WOLF H.: Preßsaft aus dem Kraut von *Echinacea purpurea*: ein allopathisches Phytoimmunstimulans. *Wiener medizinische Wochenschrift* **149**, 185-189 (1999).

BAUER R.: Chemistry, analysis and immunological investigations of *Echinacea* phytopharmaceuticals. In: Wagner H. Ed., Immunomodulatory Agents from Plants. Basel: Birkhäuser Verlag, 41-88 (1999).

BAUM B.R.; MECHANDA S.; LIVESEY J.F.; BINNS S.E.; ARNASON J.T.: Predicting quantitative phytochemical markers in single *Echinacea* plants or clones from their DNA fingerprints. *Phytochemistry* **56**, 543-549 (2001).

BARON D.: Immunologie – Antikörper, Cytokine, Impfungen. *Pharmazeutische Zeitung*, PZ-Schriftenreihe **6**, Frankfurt am Main, Govi-Verlag (1996).

BECKER H.; HSIEH W.CH.: Chicoree-Säure und deren Derivate aus *Echinacea*-Arten. *Z. Naturforsch.* **40c**, 585-587 (1984).

BERG A.; NORTHOFF H.; STUHLFAUTH I.; KEUL J.; KÖNIG D.; WEINSTOCK C.; GRATHWOHL D.; PARNHAM M.J.: Influence of Echinacin (EC31) treatment on the exercise-induced immune response in athletes. *Journal of Clinical Research* **l1**, 367-380 (1998).

BERGERON CH.; LIVESEY J.F.; AWANG D.V.C.; ARNASON J.T.; RANA J.; BAUM B.R.; LETCHAMO W.: A quantitative HPLC Method for the quality assurance of *Echinacea* Products on the North American Market. *Phytochemical Analysis* **11**, 207-215 (2000).

BEUSCHER N.; KOPANSKI L.; ERNWEIN C.: Modulation der Immunantwort durch polymere Substanzen aus *Baptisia tinctoria* und *Echinacea angustifolia*. *Adv Biosci* **68**, 329-336 (1987).

BEUSCHER N.; BODINET C.; WILLIGMANN I.; EGERT D.: Immunmodulierende Eigenschaften von Wurzelextrakten verschiedener *Echinacea*-Arten. *Zeitschrift für Phytotherapie* **16**, 157-166 (1995).

BIELORY L.: Adverse reactions to complementary and alternative medicine: ragweed´s cousin, the coneflower (*echinacea*), is "a problem more than a sneeze". *Annals of Allergy, Asthma & Immunology* **88**, 7-9 (2002).

BINNS S.E.; PURGINA B.; BERGERON C.; SMITH M.L.; BALL L.; BAUM B.R.; ARNASON J.T.: Light-mediated antifungal activity of *Echinacea* extracts. *Planta Med.* **66**, 241-244 (2000).

BINNS S.E: The Taxonomy, Phytochemistry And Biological Activity of the genus *Echinacea* (Asteraceae). Dissertation. University of Ottawa, Canada (2001).

BLASCHEK W.; DÖLL M.; FRANZ G.: *Echinacea*-Polysaccharide. *Zeitschrift für Phytotherapie* **19**, 255-262 (1998).

BOHLMANN F.: Die Polyine. *Angew. Chem.* **65** (15), 385-389 (1953).

BOHLMANN F.; BURKHARDT T.; ZDERO C.: Naturally Occuring Acetylenes. *Academic Press*, London und New York (1973).

BOHLMANN F.; GRENZ M.: Über die Inhaltsstoffe aus *Echinacea*-Arten. *Chem. Ber.* **99**, 3197-3200 (1966).

BOHLMANN F.; HOFFMANN H.: Further Amides from *Echinacea purpurea*. *Phytochemistry* **22**, 1173-1175 (1983).

BOODLE L.; FRITSCH F.: Solereder´s Systematic Anatomy of the Dicotyledones. Oxford: Clarendon Press (1908).

BOS R.; HEINZER F.; BAUER R.: Volatile Constituents of the Leaves of *Echinacea purpure*a, *E. pallida* and *E. angustifolia*. Poster auf dem 19. International Symposium on Essential Oils and Other Natural Substrates, in Zürich (7.-10.9.1988).

BRÄUNIG B.; DORN M.; KNICK E.: Echinaceae purpureae radix: Zur Stärkung der körpereigenen Abwehr bei grippalen Infekten. *Zeitschrift für Phytotherapie* **13**, 7-13 (1992).

BRÄUNIG B.; KNICK E.: Therapeutische Erfahrungen mit Echinaceae pallidae bei grippalen Infekten. *Naturheilpraxis* **1**, 72-75 (1993).

BRASSEUR T.; ANGENOT L.: Le mélange diphenylborate d´aminoéthanol-PEG 400. Un interessant réactif de révélation des flavonoides. *J. Chromatography* **351**, 351-355 (1986).

BREITER J.: Säulenexraktionsanalyse. *Arzneim.-Forschung/Drug Res*. **28 (II)**, 1941-1944 (1978).

BRINKEBORN R.M.; SHAH D.V.; DEGERING F.H.: Echinaforce and other *Echinacea* fresh plant preparations in the treatment of the common cold. *Phytomedicine* **6**, 1-5 (1999).

BRITZ-KIRSTGEN R.: Phytochemische Untersuchungen an *Senecio cacallaster* L., *Echinacea angustifolia* DC und *Pulmonaria officinalis* L. Dissertation, Universität Bonn (1985).

BROADHURST C.L.; POLANSKY M.M.; ANDERSON R.A.: Insulin-like Biological Activity of Culinary and Medicinal Plant Aqueous Extracts in Vitro. *J.Agric.Food Chem.* **48**, 849-852 (2000).

BUDZINSKI J.W.; FOSTER B.C.; VANDENHOEK S.; ARNASON J.T.: An *in vitro* evaluation of human cytochrome P450 3A4 inhibition by selected commercial herbal extracts and tinctures. *Phytomedicine* **7**, 273-282 (2000).

BUKOVSKÝ M.; VAVERKOVÁ S.; KOSTALOVÁ D.; MAGNUSOVA R.: Immunomodulatory activity of ethanol-water extracts from the root *Echinacea gloriosa* L., *Echinacea angustifolia* DC. and *Rudbeckia speciosa* Wenderoth tested on the immune system of inbred mice in C57BL6. *Ceskoslovenska Farmacie* **42**, 184-187 (1993).

BUKOVSKÝ M.; VAVERKOVÁ S.; KOSTALOVÁ D.: Immunomodulating activity of *Echinacea gloriosa* L., *Echinacea angustifolia* DC. and *Rudbeckia speciosa* Wenderoth ethanol-water extracts. *Polish Journal of Pharmacology* **47**, 175-177 (1995).

BURGER R.A.; TORRES A.R.; WARREN R.P.; CALDWELL V.D.; HUGHES B.G.: *Echinacea*-induced cytokine production by human macrophages. *International Journal of Immunopharmacology* **19** (7), 371-379 (1997).

CANTRELL C.L.; FISCHER N.H.; URBATSCH L.; MC GUIRE M.S.; FRANZBLAU S.G.: Antimycobacterial crude plant extracts from South, Central, and North America. *Phytomedicine* **5**, 137-145 (1998).

CASTER J.C.; MYERS G.A.: A Study of Oleoresin Canals in *Echinacea purpurea* (L.) MOENCH. *Proc. South Dakota Acad. Sci.* **66**, 71-75 (1987).

CENTER FOR DRUG EVALUATION AND RESEARCH (CDER). Validation of Chromatographic Methods. *Reviewer Guidance* (1994).

CHARLESWORTH E.H.; ROBINSON R.: Anthoxanthins. Part XIII. Synthesis of a Colouring Matter of Robinia pseudacacia. *J. C. S.*, **269** (1933).

CHEMINAT A.; ZAWATZKY R.; BECKER H., BROUILLARD R.: Caffeoyl Conjugates from *Echinacea* Species: Structures and Biological Activity. *Phytochemistry* **27**, 2787-2794 (1988).

CHEMINAT A.; BROUILLARD R.; GUERNE P.; BERGMANN P.; RETHER B.: Cyanidin 3-Malonylglucoside in Two *Echinacea* Species. *Phytochemistry* **28**, 3246-3247 (1989).

CHIRIKDJIAN J.J.; BLEIER W.: Zusammenhänge wzischen UV-Spektrum und Substitutionsmuster von Flavonen, Flavonolen und deren 3-Methyläthern. *Scientia Pharmaceutica* **39** (2), 65-79 (1971).

CLASSEN B.; WITTHOHN K.; BLASCHEK W.: Characterization of an arabinogalactan-protein isolated from pressed juice of Echinacea purpurea by precipitation with the β-glucosyl Yariv reagent. *Carbohydrate Research* **327**, 497-504 (2000).

CLIFFORD L.J.; NAIR M.G.; RANA J.; KOEDAM J.; ZEMAITIS D.: Antiinflammatory and antioxidant activities of *Echinacea purpurea* and *Echinacea angustifolia* root extracts. Poster auf dem GA-Kongress, Amsterdam (1999).

CLIFFORD L.J.; NAIR M.G.; RANA J.; DEWITT D.L.: Bioactivity of alkamides isolated from *Echinacea purpurea* (L.) Moench.. *Phytomedicine* **9**, 249-253 (2002).

CRONQUIST A.: Notes on the Compositae of the Northeastern United States, II. Heliantheae and Helenieae. *Rhodora* **47**, 396-403 (1945).

CRONQUIST A.: Vascular flora of the southeastern United States. Vol.1. Asteraceae. The University of North Carolina Press, Chapel Hill (1980).

CURRIER N.L.; MILLER S.C.: Natural killer cells from aging mice treated with extracts from *Echinacea purpurea* are quantitatively and functionally rejuvenated. *Experimental Gerontology* **35**, 627-639 (2000).

CURRIER N.L.; SICOTTE M.; MILLER S.C.: Deleterious effects of *Echinacea purpurea* and melatonin on myeloid cells in mouse spleen and bone marrow. *Journal of Leukocyte Biology* **70**: 274-276 (2001).

DIETZ B.; BAUER R.: The constituents of *E. atrorubens* roots and aerial parts. *Pharmaceutical Biology* **39** (1), 11-15 (2001).

DHAR K.L.; RAINA M.L.: Further Chemical Studies of *Piper peepuloides*. *Planta Med*. **23**, 295-297 (1973).

DENNEHY C.; TURNER R.B.; GANGEMI J.D.: Need for additional, specific information in studies with *Echinacea*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* **45** (1), 369-370 (2001).

DREWES S.E.; ROUX D.G.: Condensed Tannins. *Biochem J.* **87**, 167-172 (1963).

EDENHARDER R.; RAUSCHER R.; PLATT K.L.: The inhibition by flavonoids of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline metabolic activation to a mutagen: a structure-activity relationship study. *Mutation Research* **379**, 21-32 (1997).

EGERT D.; BEUSCHER N.: Studies on antigen specifity of immunoreactive arabino-galactan proteins extracted from *Baptisia tinctoria* and *Echinacea purpurea*. *Planta Med.* **58**, 163-165 (1992).

EICHLER F., KRUEGER G.R.F.: Effects of Non-Specific Immunostimulants (Echinacin, Isoprinosine and Thymus Factors) on the Infection and Antigen Expression in Herpesvirus-6 Exposed Human Lymphoid Cells. *In vivo* **8**, 565-576 (1994).

FESEN M.R.; POMMIER Y.; LETEURTRE F.; HIROGUCHI S.; YUNG J.; KOHN K.W.: Inhibition of HIV-1 integrase by flavones, caffeic acid phenylethyl ester (CAPE) and related compounds. *Biochemical pharmacology* **48** (3), 595-608 (1994).

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). Bioanalytical Methods Validation for Human Studies. Draft guidance for industry, 1998.

GALLO M., SARKAR M. AU W.; PIETRZAK K.; COMAS B.; SMITH M.; JAEGER T.V.; EINARSON A.; KOREN G.: Pregnancy Outcome Following Gestational Exposure to *Echinacea*. *Arch Intern Med.* **160**, 3141-3143 (2000).

GANZERA M.; PUJOL P.; WALZER L.; KHAN I.A.: An improved method for the determination of betaine in *Echinacea* products. *Pharmazie* **56**, 552-553 (2001).

GERUSH I.V.; MESHCHISHEN I.F.: State of liver antioxidant system at exposure to low-dose ionizing radiation and ist correction with *Echinacea purpurea* tincture. *Ukrainian Radiological Journal* **2**, 168-170 (1999).

GIBSON P.S.; POWRIE R.; STAR J.: Herbal and Alternative Medicine Use During Pregnancy: A Cross-Sectional Survey. *Obstetrics & Gynecology* **97**, 45S (2001).

GOCAN S.; CIMPAN G.; MURESAN L.: Automated multiple development thin layer chromatography of some plant extracts. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **14**, 1221-1227 (1996).

GOEL V.; CHANG C.; SLAMA J.V. ; BARTON R. ; BAUER R. ; GAHLER R.; BASU T.K.: Alkylamides of *Echinacea purpurea* stimulate alveolar macrophage function in normal rats. *International Immunopharmacology* **2**, 381-387 (2002).

GRAEFE E.U.; VEIT M.: Urinary metabolites of flavonoids and hydroxycinnamic acids in humans after application of a crude extract from *Equisetum arvense*. *Phytomedicine* **6**, 239-246 (1999).

GRAEFE E.U.; WITTIG J.; MUELLER S.; RIETHLING A.-K.; UEHLEKE B.; DREWELOW B.; PFORTE H.; JACOBASCH G.; DERENDORF H.; VEIT M.: Pharmakokinetics and Bioavailability of Quercetin Glycosides in Humans. *J. Clin. Pharmacol.* **41**, 492-499 (2001).

GREEN J.M.: A Practical Guide to Analytical Method Validation. *Analytical Chemistry News & Features* **May 1**, 305 A-309 A (1996).

GRIMM W.; MÜLLER H.-H.: A randomized controlled trial of the effect of fluid extract of *Echinacea purpurea* on the incidence and severity of colds and respiratory infections. *American Journal of Medicine* **106**, 138-143 (1999).

GREGER H.: Alkamides: Structural Relationships, Distribution and Biological Activity. *Planta Medica* **50**, 366-375 (1984).

HALLORAN K.; LEHMANN R.; PENMANN K.: Stability Profiling of *Echinacea* products in terms of caffeic acid derivatives and alkamides. Poster auf dem Kongress der Gesellschaft für Arzneipflanzenforschung in Zürich (2000).

HARBORNE J.B.; MARBRY T.J.; MABRY H. (Eds.): The Flavonoids. London: Chapman and Hall, (1975).

HARBORNE J.B (Ed.): The Flavonoids: Advances in Research since 1986. London: Chapmann and Hall, (1994).

HAWTHORNE B.J.; MORGAN J.W.W.: The Colouring Matter from *Millettia stuhlmannii*. *Chem. Ind.*, 1504-1505 (1962).

HAYASHI I.; OHOTSUKI M.; SUZUKI I.; WATANABE T.: Effects of oral administration of *Echinacea purpurea* (American herb) on incidence of spontaneous Leukemia caused by recombinant Leukemia viruses in AKR/J mice. *Jpn. J. Clin. Immun.* **24** (1), 10-20 (2001).

HE X.; LIN L.; BERNART M.W.; LIAN L.: Analysis of alkamides in roots and achenes of *Echinacea purpurea* by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **815**, 205-211 (1998).

HEILMANN J.; CALIS I.; KIRMIZIBEKMEZ H.; SCHÜHLY W.; HARPUT S.; STICHER O.: Radical Scavenger Activity of Phenylethanoid Glycosides in FMLP Stimulated Human Polymorphonuclear Leukocytes: Structure-Activity Relationships. *Planta Medica* **66**, 746-748 (2000).

JAGER H.; MEINEL L.; DIETZ B., LAPKE C.; BAUER R.; MERKLE H.P.; HEILMANN J.: Transport of Alkamides from Echinacea Species through Caco-2 Monolayers. *Planta Medica* **68**, 469-471 (2002).

HEINZER F.; CHAVANNE M.; MEUSY J.P.; MAITRE H.P.; GIGER E.; BAUMANN T.W.: Ein Beitrag zur Klassifizierung der therapeutisch verwendeten Arten der Gattung *Echinacea*. *Pharm. Acta. Helv.* **63**, 132-136 (1988).

HEYL F.W.; HART M.C.: Some constituents of the root of *Brauneria angustifolia*. *J. Am. Chem. Soc.* **37**, 1769-1778 (1915).

HOH K.: Untersuchungen über immunmodulierende Wirkungen von *Echinacea purpurea* Pressaft und dafür verantwortliche Inhaltsstoffe. Dissertation, Universität Freiburg (1990).

HOHEISEL O.; SANDBERG M.; BERTRAM S.; BULITTA M.; SCHÄFER M.: Echinagard treatment shortens the course of the common cold: a double-blind, placebo-controlled clinical trial. *European Journal of Clinical Research* **9**, 261-268 (1997).

HÖHRHAMMER L.; WAGNER H.; PROBST W.:Über das diuretische Prinzip von *Herniaria glabr*a L.. *Naturwissenschaften* **47**, 63-64 (1960).

HÖHRHAMMER L.; WAGNER H.; ARNDT H.-G.; FARKAS L.: Isolierung und Synthese zweier Flavonol-glykoside von *Cereus grandiflorus* Mill.. *Chem. Ber.* **99**, 1384-1387 (1966).

HU C.; KITTS D.D.: Studies on the Antioxidant Activity of *Echinacea* Root Extract. *J.Agric.Food Chem.* **48** (5), 1466-1472 (2000).

ITOKAWA J.; OSHIDA Y.; IKUTA A.; INATOMI H.; IKEGAMI S.: Flavonol glycosides from the flowers of *Cucurbita pepo*. *Phytochemistry* **20**, 2421-2422 (1981).

JACOBSON M.: Occurrence of a Pungent Insecticidal Principle in American Coneflower Roots. *Science* **120**, 1028-1029 (1954).

JOHNS T.; GRAHAM K.; TOWERS G.H.N.: Molluscicidal activity of affinin and other isobutylamides from the Asteraceae. *Phytochemistry* **21**, 2737-2738 (1982).

JONDIKO I.J.O.: A mosquito larvicide in *Spilanthes mauritiana*. *Phytochemistry* **25**, 2289-2290 (1986).

KARIS P.O.: Heliantheae sensu lato (Asteraceae), clades and classification. *Plant systematics and evolution* **188**, 139-195 (1993).

KARIS P.O.; RYDING O.: Tribe Heliantheae. In: Bremer K. Ed., Asteraceae, Cladistics & Classification. Portland, Oregon: Timber Press (1994).

KARTNIG T.; WEGSCHAIDER O.: Eine Möglichkeit zur Identifizierung von Zuckern aus kleinsten Mengen von Glykosiden oder aus Zuckergemischen. *J. Chromatogr.* **61**, 375-377 (1971).

KAZIMIERZ G.; GRAZYNA Z.; MALGORZATA K.: Solid-phase extraction and reversed-phase high-performance liquid chromatography of free phenolic acids in some *Echinacea* species. *J. Chromatog. A* **730**, 25-29 (1996).

KELLER H.W.: An Anatomical Study on the Genus *Echinacea*. Master Thesis, University of Kansas (1962).

KHAN I.A.: Neue Sesquiterpenester aus *Parthenium integrifolium* L. und Polyacetylene aus *Echinacea pallida* NUTT. Dissertation, Universität München (1987).

KICK M.; BARRA R.: *Echinacea*: Effects on the Production of IL-12 by cultured P388D1 Macrophage Cells and *in vitro* Effects on the Level of Monocytes in Mice. *Molecular biology of the Cell* **10**, 448a (1999).

KIM H-O.; DURANCE T.D.; SCAMAN C.H.; KITTS D.D.: Retention of Alkamides in Dried *Echinacea purpurea*. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 4187-4192 (2000).

KIM H.-O.; DURANCE T.D.; SCAMAN C.H.; KITTS D.D.: Retention of caffeic acid derivatives in dried *Echinacea purpurea*. *J. Agric. Food Chem.* **48**; 4182-4186 (2000).

KOTAKE M.; ARAKAWA H.: Narcissin (Isorhamnetin-3-rutinosid) aus den Pollen von *Lilium auratum* LINDLE. *Naturwissenschaften* **43**, 327 (1956).

KRÄMER H.: Konstitutionsaufklärung neuer Flavonolglykoside aus der Familie der Cruciferen, Synthese von Polyhydroxy-flavonol-3,7 und 7 und 5,7-glukosiden. Dissertation, Universität München (1966).

KUBOTA T.; HASE T.: *J. chem. Soc.* Japan, pure Chem. Sect. [*Nihon kagaku zasshi*] **77**, 1059 (1956).

KURKIN V.A.; AVDEEVA O.I.; AVDEEVA E.V; MIZINA P.G.: Quantitative estimation of total hydroxycinnamic acids in aerial part of *Echinacea purpurea* (L.) Moench. Rastitel`nye-Resursy. **34** (2), 81-85 (1998).

LAASONEN M.; HARMIA-PULKKINEN T.; SIMARD C.; MICHIELS E.; WENNBERG T.; RÄSÄNEN M.; VUORELA H.: Near infrared reflectance spectroscopy for the fast identification of *Echinacea purpurea* roots. Poster (P159) auf dem internationalen Symposium der phytochemischen Gesellschaft von Europa: „Lead Compounds from Higher Plants", Lausanne (2001).

LEVEN W.: Qualitative und quantitative Chromatographische (DC, GC, HPLC) und photometrische Analyse der Sesquiterpenlactone in „Arnicablüten DAB 9" und Untersuchungen zur Sesquiterpenlacton-Führung in Blüten von *Arnica acaulis*. Dissertation, Düsseldorf (1988).

LI J.; WANG P.F.; ZHENG R.L.; LIU Z.M.; JIA Z.J.: Protection of phenylpropanoid glycosides from *Pedicularis* against oxidative hemolysis in vitro. *Planta Medica* **59**, 315-317 (1993).

LI T.S.C.; WARDLE D.A.: Effects of Root Drying Temperature and Moisture Content on the Levels of Active Ingredients in *Echinacea* Roots. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants* **8** (1), 15-22 (2001).

LIENERT D.; ANKLAM E.; PANNE U.: Gas Chromatography-Mass Spectral Analysis of roots of *Echinacea* Species and Classification by multivariate data analysis. *Phytochem. Anal.* **9**, 88-98 (1998).

LIN S.; KHANOLKAR A.D.; FAN P., GOUTOPOULOS A.; QIN C.; PAPAHADJIS D.; MAKRIYANNIS A.: Novel Analogues of Arachidonylethanolamide (Anandamide): Affinities for the CB1 and CB2 Cannabinoid Receptors and Metabolic Stability. *J. Med. Chem.* **41**, 5353-5361 (1998).

LINDENMUTH G.F.; LINDENMUTH E.B.: The Efficacy of *Echinacea* Compound Herbal Tea Preparation on the Severity and Duration of Upper Respiratory and Flu Symptoms: A Randomized, Double-Blind Placebo-Controlled Study. *Journal of Alternative and comlementary Medicine* **6** (4), 327-334 (2000).

LIVESEY J.F.; BERGERON CH.; RANA J.; AWANG D.V.C.; LETCHAMO W.; ARNASON J.T.: Development of a method for identity assurance and quality control in *Echinacea* species. Poster at the 39th Annual Meeting of the American Society of Pharmacognosy in July, Orlando, Florida (1998).

LIVESEY J.; AWANG D.V.C.; ARNASON J.T.; LETCHAMO W.; BARRETT M.; PENNYROYAL G.: Effect of temperature on stability of marker constituents in *Echinacea purpurea* root formulations. *Phytomedicine* **6** (5), 347-349 (1999).

MABRY T.J.; MARKHAM K.R.; THOMAS M.B.: The Systematic Identification of Flavonoids; Springer-Verlag, New York, Heidelberg, Berlin (1970).

MAFFEI FACINO R.; CARINI M.; ALDINI G.; SAIBENE L.; PIETTA R.; MAURI P.: Echinacoside and Caffeoyl Conjugates Protect Collagen from Free Radical-Induced Degradation. A Potential Use of *Echinacea* Extracts in the Prevention of Skin Photodamage. *Planta Med.* **61**, 510-514 (1995).

MAFFEI FACINO R.; CARINI M.; ALDINI G.; MARINELLO C.; ARLANDINI E.; FRANZOI L.; Colombo M.; Pietta P.; Mauri P.: Direct characterization of caffeoyl esters with anti-hyaluronidase activity in crude extracts from *Echinacea angustifolia* roots by fast atom bombardment tandem mass spectrometry. *Il Farmaco* **48** (10), 1447-1461 (1993).

MALONGA-MAKOSI J.P.: Untersuchung der Flavonoide von *Echinacea angustifolia* D.C. und *Echinacea purpurea* MOENCH. Dissertation, Heidelberg (1983).

MARKS F.: Der Stoffwechsel der Arachidonsäure. *Biologie in unserer Zeit* **30**, 342-353 (2000).

MARTIN R.; BECKER H.: Amides and other constituents from *Acmella ciliata*. *Phytochemistry* **24**, 2295 (1985).

MATTOCKS A.R.: Chemistry and Toxicology of Pyrrolizidine Alkaloids. *Academic Press*, London (1986).

MERFORT I.; WENDISCH D.: Flavonoidglykoside aus *Arnica montana* und *Arnica chamissonis*. *Planta Med.* **53**, 434-437 (1987).

MCDOUGALL B.; KING P.J.; WEN WU B.; HOSTOMSKY Z.; REINECKE M.G.; ROBINSON W.E.JR.: Dicaffeoylquinic and Dicaffeoyltartaric acids are selective inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 integrase. *Antimicrobial, Agents and Chemotherapy* **42** (1), 140 – 146 (1998).

MCGREGOR R.L.: The taxonomy of the genus *Echinacea* (Compositae). *University of Kansas Science Bulletin* **48**, 113-142 (1968).

MC KEOWN K.A.: A Review of the Taxonomy of the genus *Echinacea*. In: Janick J. Ed., Perspectives on new crops and new uses. ASHS Press, Alexandria, VA (1999).

MELCHART D.; WALTHER E.; LINDE K.; BRANDMAIER R.; LERSCH C.: *Echinacea* root extracts for the prevention of upper respiratory tract infections. *Archives of Familiy Medicine* **7**, 541-545 (1998).

MELCHART D.; WORKU F.; LINDE K.; FLESCHE C.; EIFE R.; WAGNER H.: Erste Phase-I-Untersuchung von Echinacea-Polysaccharid (EPO VIIa/EPS bei i.v. Applikation). *Erfahrungsheilkunde* **6**, 318-323 (1993).

MENGS U.; CLARE C.B.; POILEY J.A.: Toxicity of *Echinacea purpurea*. Acute, subacute and genotoxicity studies. *Arzneimittel-Forschung/Drug Research* **41** (II), 1076-1081 (1991).

METCALFE C.R.; CHALK L.: Anatomy of Dicotyledons. Oxford: Clarendon Press (1958).

MOLINA-TORRES J.; GARCIA-CHAVEZ A.; RAMIREZ-CHAVEZ E.: Antimicrobial properties of alkamides present in flavouring plants traditionally used in Mesoamerica: affinin and capsaicin. *J. Ethnopharmacol.* **64**, 241-248 (1999).

MÜLLER-JAKIC B.; BREU W.; PRÖBSTLE A.; REDL K.; GREGER H.; Bauer R.: *In vitro* inhibition of cyclooxygenase and 5-lipoxygenase by alkamides from *Echinacea* and *Achillea* Species. *Planta Med.* **60**, 37-40 (1994).

MULLINS R.J.: *Echinacea*-associated anaphylaxis. *Medical Journal of Australia* **168**, 170-171 (1998).

MULLINS R.J.: Adverse reactions associated with *Echinacea*: The Australien Experience. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology* **88**, 42-51 (2002).

MUSTEA I.; POSTESCU I.D.; TAMAS M.; RASNITA T.D.: Experimental Evaluation of Protective Activity of *Echinacea pallida* against Cisplatin Toxicity. *Phytotherapy Research* **11**, 263-265 (1997).

MYERS S.P.; WOHLMUTH H.: *Echinacea*-associated anaphylaxis [letter]. *Medical Journal of Australia* **168**, 583 (1998).

NAKANO K.; NISHIZAWA K.; TAKEMOTO I.; MURAKAMI K.; TAKAISHI Y.; TOMIMATSU T.: Flavonol and Phenylpropanoid glycosides from *Lilium cordatum*. *Phytochemistry* **28**, 301-303 (1989).

NETZWERK AKTUELL. Immunallergische Reaktionen nach *Echinacea*-Extrakten (Echinacin, Esberitox N U.A.). *Arznei-Telegramm* **4**, 39 (1991).

NÜSSLEIN B.; KURZMANN M.; BAUER R.; KREIS W.: Enzymatic Degradation of Cichoric Acid in *Echinacea purpurea* Preparations. *J. Nat. Prod.* **63**, 1615-1618 (2000).

NUTTAL T.: A Description of Some of the Rarer or Little Known Plants Indigenous to the United States, from the Dried Specimens in the Herbarium of the Academy of Natural Sciences in Philadelphia. *J. Acad. Nat. Sci. of Phil.* **7**, 77 (1834).

NUTTAL T.: Description of New Species and Genera of Plants in the Natural Order Compositae. *Trans. Am. Phil. Soc. n. ser.* **7**, 354 (1841).

ODENTHAL K.P.; SCHWARZ T.; WITTHOHN K.; LOOS M.: Bioassay-guided identification of immunomodulating constituents in Echinacin®. Poster auf dem Kongress der Gesellschaft für Arzneipflanzenforschung, Zürich (2000).

ONDRIZEK R.R.; CHAN P.J.; PATTON W.C.; KING A.: An alternative medicine study of herbal effects on the penetration of zona-free hamster oocytes and the integrity of sperm deoxyribonucleic acid. *Fertility and Sterility* **71**, 517-522 (1999).

ONDRIZEK R.R.; CHAN P.J.; PATTON W.C.; KING A.: Inhibition of human sperm motility by specific herbs used in alternative medicine. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* **16,** 87-91 (1999).

OSOWSKI S.: *Echinacea* – ein Immunstimulans? Zur Pharmakokinetik der *Echinacea purpurea*–Inhaltsstoffe Dodeca-2E,4E,8Z,10Z/E-tetraensäure-isobutylamide und Cichoriensäure sowie ihr immunmodulierender Einfluß. Dissertation, Universität Freiburg i.Br. (1998).

PARANICH A.V.; POCHERNYAEVA V.F.; DUBINSKAYA G.M.; MISHCHENKO V.P.; MIRONOVA N.G.; GUGALO V.P.; NAZARETS V.V.: The influence of presumable radioprotectors on vitamin E redox system in irradiated rat tissues. *Radiation Biology, Radiation Ecology* **33** (2), 653 – 657 (1993).

PARNHAM M.J.: Benefit-risk assessment of the squeezed sap of the purple coneflower (*Echinacea purpurea*) for long-term oral immunostimulation. *Phytomedicine* **3** (1), 95-102 (1996).

PARKER W.H.; BOHM B.A.: Flavonol glycosides of Limnanthes douglasii. *Phytochemistry* **14**, 553-555 (1975).

PELLETIER S.W.; CHOKSHI H.P.; DESAI H.K.: Separation of diterpenoid alkaloid mixtures using vacuum liquid chromatography. *J. Nat. Prod.* **49** (5), 892-900 (1986).

PERRY N.B.; VAN KLINK J.W.; BURGESS E.J.; PARMENTER G.A.: Alkamide levels in *Echinacea purpurea*: A rapid analytical method revealing differences among roots, rhizomes, stems, leaves and flowers. *Planta med.* **63**, 58-62 (1997).

PERRY N.B. ; BURGESS E.J.; GLENNIE V.LEA.: *Echinacea* Standardization: Analytical Methods for Phenolic Compounds and Typical Levels in Medicinal Species. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 1702-1706 (2001).

PIETTA P.; MAURI P.; BAUER R.: MEKC Analysis of Different *Echinacea* Species. *Planta Med.* **64**, 649-652 (1998).

PIOMELLI D.; GIUFFRIDA A.; CALIGNANO A., DE FONSECA F.R.: The endocannabinoid system as a target for therapeutic drugs. *TiPS* **21**, 218-224 (2000).

POGORELAJA N.F.; MENSHOVA V.O.; BRAJON A.V.; VOEVODINA O.V.; POGORELAJ Z.A.; BRODOVSKAJA N.V.: Lectins - biologically active substances of *Echinacea purpurea*. *Farm Zh* (Kiev) **4**, 80-83 (1997).

PROKSCH A.: Über ein immunstimulierendes Wirkprinzip aus *Echinacea purpurea* (L.) MOENCH, Dissertation, Universität München (1982).

PROKSCH A.; WAGNER H.: Structural Analysis of a 4-O-Methylglucuronoarabinoxylan with Immuno-Stimulating Activity from *Echinacea purpurea*. *Phytochemistry* **26**, 1989-1993 (1987).

REHMAN J.; DILLOW J.M.; CARTER ST.M.; CHOU J.; LE B.; MAISEL A.S.: Increased production of antigen-specific immunoglobulins G and M following *in vivo* treatment with the medicinal plants *Echiancea angustifolia* and *Hydrastis canadensis*. *Immunology Letters* **68**, 391-395 (1999).

REININGER E.: Vergleichende phytochemische und pharmakologische Untersuchungen zur Hemmung der Prostaglandin-H-Synthase Isoenzyme mit Arzneidrogen der chinesischen Medizin, insbesondere Platycodi radix und Chaenomelis fructus. Dissertation, Universität Düsseldorf (2001).

REMIGER P.: Zur Chemie und Immunologie neuer Alkylamide und anderer Inhaltsstoffe aus *Echinacea purpurea*, *Echinacea angustifolia* und *Echinacea pallida*. Dissertation, Universität München (1988).

RININGER J.A.; KICKNER S.; CHIGURUPATI P.; MCLEAN A.; FRANCK Z.: Immuno-pharmacological activity of *Echinacea* preparations following simulated digestion on murine macrophages and human peripheral blood mononuclear cells. *J. Leukocyte Biol.* **68**, 503-510 (2000).

ROBINSON H.: A Revision of the tribal and subtribal limits of the Heliantheae (Asteraceae), Smithsonian Contrib, *Botany* **51**, 1-102 (1981).

ROBINSON W.E.JR.; REINECKE M.G.; ABDEL-MALEK S.; JIA QI; CHOW S.A.: Inhibitors of HIV-1 replication that inhibit HIV integrase. *Proeedings of the National Academy of Science USA* **93**, 6326-6331 (1996).

ROBINSON W.E.JR.: L-Chicoric acid, an inhibitor of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) integrase, improves on the *in vitro* anti-HIV-1 effect of Zidovudine plus a protease inhibitor (AG1350). *Antiviral Research* **39**, 101-111 (1998).

RÖDER E.; WIEDENFELD H.; HILLE T.; BRITZ-KIRSTGEN R.: Pyrrolizidine in *Echinacea angustifolia* DC und *Echinacea purpurea* MOENCH – Isolierung und Analytik. *Dtsch Apoth Ztg* **124**, 2316-2318 (1984).

ROGERS K.L.; GRICE I.D.; MITCHELL C.J.; GRIFFITHS L.R.: High performance liquid chromatography determined alkamide levels in Australian-grown *Echinacea* spp.. *Australian Journal of Experimental Agriculture* **38**, 403-408 (1998).

ROSTOCK M.: Untersuchungen über immunologische Effekte eines oral applizierten *Echinacea-purpurea*-Preßsaftes bei Patientinnen mit kurativ behandeltem Mamma-Karzinom. Inaugural-Dissertation der Medizinischen Fakultät der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i.Br., 1998.

ROUX D.G.; PAULUS E.: Condensed Tannins. *Biochem. J.* **82**, 324-330 (1962).

SCHIMMER O.; KRÜGER A.; PAULINI H.; HAEFELE F.: An evaluation of 55 commercial plant extracts in the Ames mutagenicity test. *Pharmazie* **49**, 448-451 (1994).

SCHMID L.; PIETSCH K.: Über den Farbstoff des Akazienholzes. *Mh. Chem.* **57**, 305-322 (1931).

SCHMID L.; TADROS F.: Die Konstitution des Farbstoffs von *Robinia pseudacacia*. *Ber. dtsch. chem. Ges.* **65**, 1689-1691 (1932).

SCHÖNEBERGER D.: Immunstimulierende Wirkung von Echinacin Madaus Liquidum auf Verlauf und Schweregrad von Erkältungskrankheiten. *Zeitschrift für Immunologie in der Praxis* **2** (8), 18-22 (1992).

SCHÖNHÖFER P.S.; WERNER B.; KUKLINSKI M.; ZÜRNER P.; BERG P.A.; BECKER-BRÜSER W.: Ungewöhnliche Immunerkrankungen durch Pflanzenextrakte (*Echinacea*, Mistel): Akute Sarkoidose. *Arzneimitteltherapie* **17** (9), 282-284 (1999).

SCHULTHESS B.H.; GIGER E.; BAUMANN T.W.: *Echinacea*: Anatomy, Phytochemical Pattern, and Germination of the Achene. *Planta Med.* **57**, 384-388 (1991).

SCHULTE K.E.; RÜCKER G.; PERLICK J.: Das Vorkommen von Polyacetylen-Verbindungen in *Echinacea purpurea* MOENCH und *Echinacea angustifolia* DC. *Arzneim.-Forsch.* **17**, 825-829 (1967).

SCHULTEN B.; BULITTA M.; BALLERING-BRÜHL B.; KÖSTER U.; SCHÄFER M.: Efficacy of *Echinacea purpurea* in patients with a common cold. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* **51** (II), 563-568 (2001).

SEE D.M.; BROUMAND N.; SAHL L.; TILLES J.G.: *In vitro* effects of *Echinacea* and ginseng on natural killer and antibody-dependent cell cytotoxicity in healthy subjects and chronic fatigue syndrome or acquired immunodeficiency syndrome patients. *Immunopharmacology* **35**, 229-235 (1997).

SIECK R.; SIEMS K.; ODENTHAL K.P.; WITTHOHN K.: New Substances detected in the pressed juice [1.7-2.5:1] from *Echinacea purpurea* Herbs. Poster auf dem Kongress der Gesellschaft für Arzneipflanzenforschung, Zürich (2000).

SIMONETTI P.; GARDANA C.; PIETTA P.: Plasma Levels of Caffeic Acid and Antioxidant Status after Red Wine Intake. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 5964-5968 (2001).

SIMPSON K.; COLEMAN M.; ELLIOT S.; FADEL S.; JORDAN B.J.; HUDSON S.J. : *Echinacea* treatment enhances natural killer cell activity and restricts P815 tumor cell growth in BALB/c mice. *FASEB Journal* **15** (4), pp. A692 (2001).

SKWAREK T.; TYNECKA Z.; GLOWNIAK K.; LUTOSTANSKA E.: *Echinacea* L. inducer of interferons. *Herba Polonica* **XLII** (2), 110-117 (1996).

SLOLEY B.D.; URICHUK L.J.; TYWIN C.; COUTTS R.T.; PANG P.K.T.; SHAN J.J.: Comparison of chemical components and antioxidant capacity of different *Echinacea* species. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **53**, 849-857 (2001).

SOICKE H.; AL-HASSAN G.; GÖRLER K.: Weitere Kaffeesäure-Derivate aus *Echinacea purpurea*. *Planta Med.* **54**, 175-176 (1988).

SOICKE H.; GÖRLER K.; KRÜGER D.: Glycine-Betaine in *Echinacea* species and their preparations. *Fitoterapia* **59**, 73-73 (1988).

SOON S.L.; CRAWFORD R.I.: Recurrent erythema nodosum associated with *Echinacea* herbal therapy. *J. Am. Acad. Dermatol.* **44**, 298-299 (2001).

SOUTH E.H.; EXON J.H.: Multiple Immune functions in rats fed *Echinacea* extracts. *Immunopharmacology and Immunotoxicology* **23** (3), 411-421 (2001).

SPERONI E.; GOVONI P.; GUIZZARDI S.; RENZULLI C.; GUERRA M.C.: Anti-inflammatory and cicatrizing activity of *Echinacea pallida* Nutt. root extract. *Journal of Ethnopharmacology* **79**, 265-272 (2002).

STEINMÜLLER C.; ROESLER J.; GRÖTTRUP E.; FRANKE G.; WAGNER H.; LOHMANN-MATTHES M.L.: Polysaccharides isolated from plant cell cultures of *Echinacea purpurea* enhance the resistance of immunosuppressed mice against systemic infections with *Candida albicans* and *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Immunopharmacology* **15** (5), 605-614 (1993).

STEVENS J.F.; ELEMA E.T.; WOLLENWEBER E.: Exudate Flavonoids of *Eupatorium cannabinum*. *Biochemical Systematics and Ecology* **24** (4), 451-452 (1995).

STOLL A.; RENZ J.; BRACK A.: Isolierung und Konstitution des Echinacosids, eines Glykosids aus den Wurzeln von *Echinacea angustifolia* D.C.. *Helv. Chim. Acta* **33**, 1877-1893 (1950).

STOTHERS J.B.: Carbon-13 NMR Spectroscopy. Academic Press London, 87-89 (1972).

STOTZEM C.D.; HUNGERLAND U.; MENGS U.: Influence of *Echinacea purpurea* on the phagocytosis of human granulocytes. *Medical Science Research* **20**, 719-720 (1992).

STUART D.L.; WILLS R.B.H.: Factors affecting the extraction of alkylamides and cichoric acid during ethanolic processing of *Echinacea purpurea* (L.) Moench. *Australian Journal of Experimental Agriculture* **40**, 873-877 (2000).

STUART D.L.; WILLS R.B.H.: Alkylamide and Cichoric Acid Levels in *Echinacea purpurea* Tissues During Plant Growth. *Journal of Herbs, Spices & Medicinial Plants* **7** (1), 91-101 (2000).

STUESSY T.F.: Heliantheae – Systematic Review, in: Harborne V.H., Harborne J.B., Turner B.L. (Hrsg.): The Biology and Chemistry of the Compositae **II**, 622-671, Academic Press, London (1977).

SUN L.Z.Y.; CURRIER N.L.; MILLER S.C.: The American Coneflower: A Prophylactic Role Involving Nonspecific Immunity. *Journal of Alternative and Comlementary Medicine* **5** (5), 437-446 (1999).

TOBLER M.; SCHNEIDER E.: Naturgerechte Standardisierung von Phytopharmaka. *Z. Phytother.* **22**, 10-21 (2001).

TURNER R.B.; RIKER D.K.; GANGEMI J.D.: Ineffectiveness of *Echinacea* for prevention of experimental Rhinovirus Colds. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **44** (6), 1708-1709 (2000).

URBATSCH L.E.; JANSEN R.K.: Phylogenetic affinities among and within the coneflower genera (Asteraceae, Heliantheae), a chloroplast DNA analysis. *Systematic Botany* **20**, 28-39 (1995).

URBATSCH L.E.; BALDWIN B.G.; DONOGHUE M.J.: Phylogeny of the coneflowers and relatives (Heliantheae: Asteraceae) based on nuclear rDNA internal transcribed spacer (ITS)sequences and chloroplast DNA restriction site data. *Systematic Botany* **25** (3): 539-565 (2000).

VERELIS C.D.; BECKER H.: Die *n*-Alkane von *Echinacea angustifolia*. *Planta Med.* **31**, 288-289 (1977).

VERELIS C.D.: Untersuchung der lipophilen Inhaltsstoffe von Radix Echinaceae angustifoliae D.C.. Dissertation Heidelberg (1978).

VOADEN D.J.; JACOBSON M.: Tumor Inhibitors. 3. Identification and Synthesis of an Oncolytic Hydrocarbon from American Coneflower Roots. *J. Med. Chem.* **15** (6), 619-623 (1972).

VONAU B.; CHARD S.; MANDALIA S.; WILKINSON D.; BARTON S.E.: Does the extract of the plant *Echinacea purpurea* influence the clinical course of recurrent genital herpes? *International Journal of STD & AIDS* **12**, 154-158 (2001).

WAGNER H.; PROKSCH A.; RIESS-MAURER I.; VOLLMAR A.; ODENTHAL S.; STUPPNER H.; JURCIC K.; LE TURDU M.; FANG J.N.: Immunstimulierend wirkende Polysaccharide (Heteroglucane) aus höheren Pflanzen. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* **35** (II), 1069-1075 (1985).

WAGNER H.; STUPPNER H.; SCHÄFER W.; ZENK M.: Immunologically active polysaccharides of *Echinacea purpurea* cell cultures. *Phytochemistry* **27** (1), 119-126 (1988).

WILDFEUER A.; MAYERHOFER D.: Untersuchung des Einflusses von Phytopräparaten auf zelluläre Funktionen der körpereigenen Abwehr. *Arzneimittel-Forschung/Drug-Research* **44** (I), 361-366 (1994).

WILLS R.B.H.; STUART D.L.: Effect of handling and storage on alkylamides and cichoric acid in *Echinacea purpurea*. *J. Sci. Food. Agric.* **80**, 1402-1406 (2000).

WILLS R.B.H.; STUART D.L.: Alkylamide and cichoric acid levels in *Echinacea purpurea* grown in Australia. *Food Chemistry* **67**: 385-388 (1999).

XIONG Q.; KADOTA S.; TANI T.; NAMBA T.: Antioxidative Effects of Phenylethanoids from Cistanche deserticola. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **19** (12), 1580-1585 (1996).

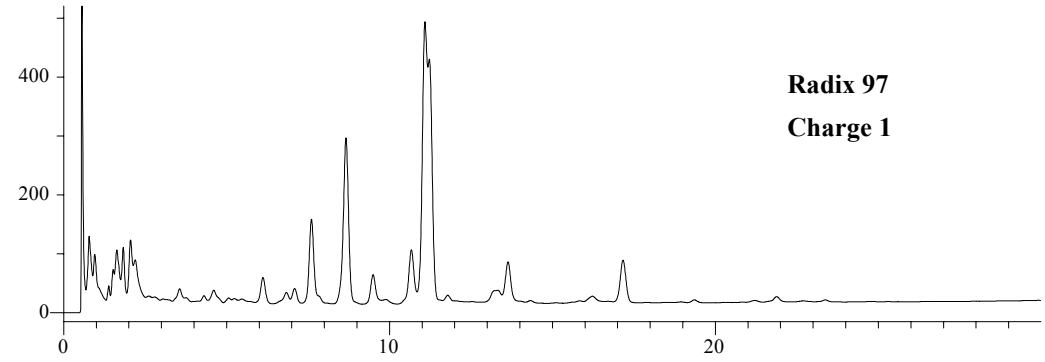
XIONG Q.; TEZUKA Y.; KANEKO T.; LI H.; TRAN LE Q.; HASE K.; NAMBA T.; KADOTA S.: Inhibition of nitric oxide by phenylethanoids in activated macrophages. *European Journal of Pharmacology* **400** (1), 137-144 (2000).

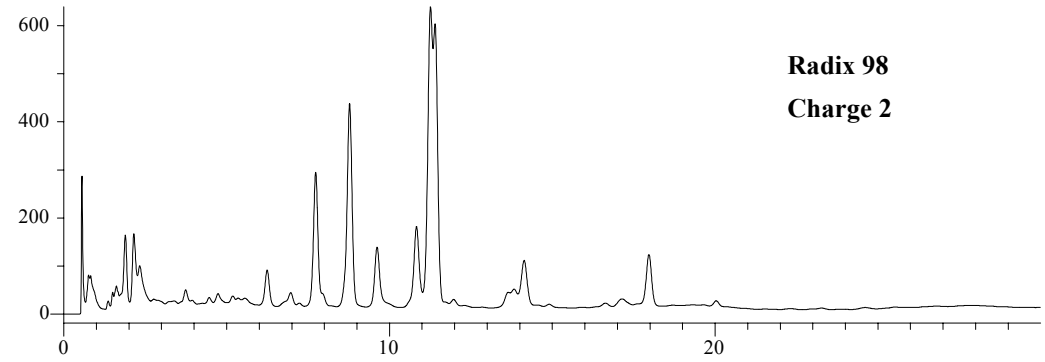
ZHENG R.L.; WANG P.F.; LI J.; LIU Z.M.; JIA Z.J.: Inhibition of the autoxidation of linoleic acid by phenylpropanoid glycosides from *Pedicularis* in micelles. *Chemistry and Physics of Lipids* **65**, 151-154 (1993).

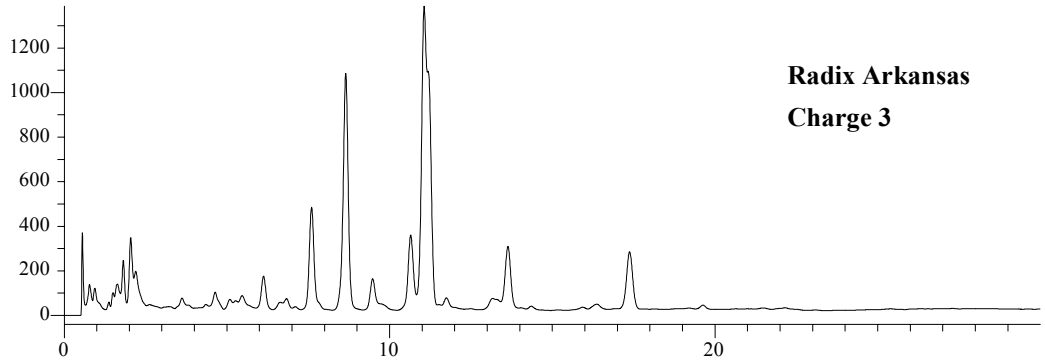
11 Anhang

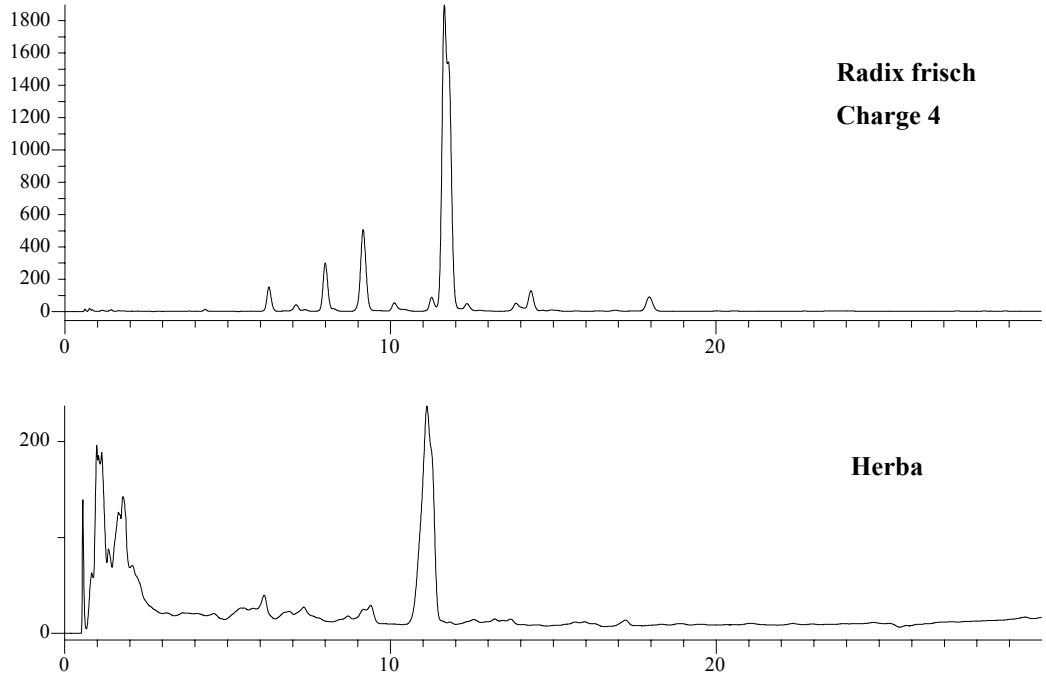
1. HPLC-Chromatogramme der Chloroformextrakte aller untersuchten *E. atrorubens* Chargen

(Probenvorbereitung: 5 g Droge wurden mit Chloroform in einer Soxhletapparatur für 2 h extrahiert und anschließend schonend zur Trockne eingeengt. Der Rückstand wurde in 10,0 ml Ethanol aufgenommen (Methode **Ech1**, Detektion: 254 nm, Injektionsvol. 10 µl).



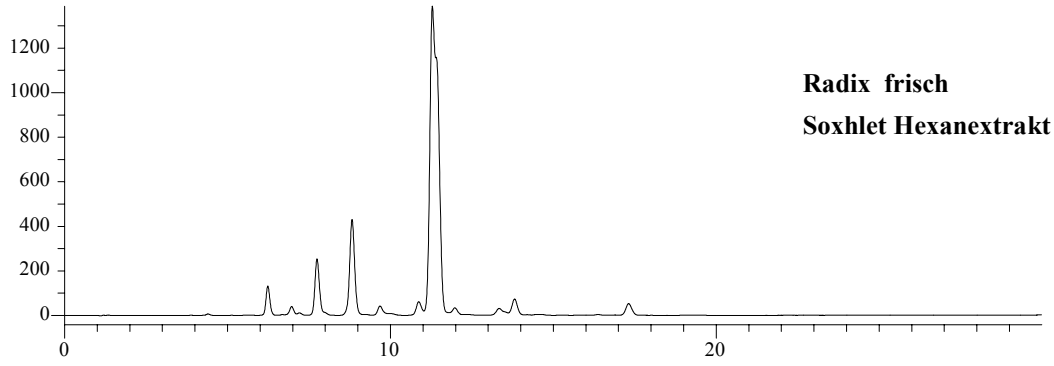






2. HPLC-Chromatogramm des n-Hexanextraktes aus der frischen *E. atrorubens* radix Droge (Charge 4)

(Probenvorbereitung: 5 g Droge wurden mit *n*-Hexan in einer Soxhletapparatur für 2 h extrahiert und anschließend schonend zur Trockne eingeengt. Der Rückstand wurde in 10,0 ml Ethanol aufgenommen (Methode **Ech1**, Detektion: 254 nm, Injektionsvol. 10 µl).



Abkürzungsverzeichnis

COSY	Correlated Spectroscopy (NMR-Methode)
COX-1/ -2	Cyclooxygenase-1/ -2
DAB	Deutsches Arzneibuch
DC	Dünnschichtchromatographie
DCI-MS	Massenspektrometrie mit chemischer Ionisation und Proben-Direkteinlaß
EtOH	Ethanol
GC	Gaschromatographie
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Coherence (NMR-Methode)
HMQC	Hetereonuclear Multiple Quantum Coherence (NMR-Methode)
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
MPLC	Mitteldruckflüssigchromatographie
MS	Massenspektrometrie
Mult.	Multiplizität (s = Singulett, d = Dublett, t = triplett, q = quartett, m = Multiplett, b = verhältnismäßig breites Signal, z.B. *b*s = breites Singulett)
NMR	Kernresonanz (Nuclear Magnetic Resonance)
R*f*	Retentions-Faktor (DC)
RP	Reversed Phase (Umkehrphase)
Rt	Retentionszeit (HPLC, GC)
Tetraen	Dodeca-2*E*,4*E*,8*Z*,10*Z/E*-tetraensäure-isobutylamide
UV	Ultraviolettes Licht
VIS	Sichtbares Licht
VLC	Vakuumflüssigchromatographie

Danksagung

Allen, die zum Gelingen dieser Arbeit mit beigetragen haben, möchte ich an dieser Stelle herzlich danken.
Insbesondere möchte ich mich bedanken bei:

Prof. Tim Lee, Dahlhousie Universität, für die Durchführung der IL-6- und TNF-α-Tests.

Herrn Dr. Jörg Heilmann für seine große Hilfe bei den Bioverfügbarkeitsuntersuchungen und für die Durchführung der Diffusionsstudien und der Zytotoxizitätstests.

Herrn Dr. W. Peters, Herrn Dr. Sven Augner und Herrn Dr. Carsten Uhlemann, Institut für Anorganische und Strukturchemie I der Universität Düsseldorf, für die Aufnahme zahlreicher NMR-Spektren und für die Ermöglichung vieler Sondermessungen.

Herrn D.G. Richter für die Beschaffung des Pflanzenmaterials.

Herrn Dr. Wienert für die Ermöglichung der Resorptionsstudien und Frau Hilger für die sorgfältige und schmerzfreie Entnahme des Blutes.

Ganz besonders möchte ich allen meinen Kolleginnen und Kollegen in Düsseldorf für die große Hilfsbereitschaft und gute und freundschaftliche Zusammenarbeit danken, insbesondere möchte ich hierbei erwähnen:

Frau Dr. Kerstin Paulus und Frau Dr. Anne Schwarte für die tatkräftige Hilfe und die vielfältigen, ungezählten Unterstützungen und Aufmunterungen, für die sehr schöne gemeinsame Zeit am und außerhalb des Instituts und für Ihre Freundschaft.

Frau Franka Teuscher möchte ich für das kritische und ausdauernde Korrekturlesen der vorliegenden Arbeit, für die wertvollen und aufmunternden Tipps, die wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben, für die Anfertigung der Titelblattzeichnung und für Ihre Freundschaft danken.

Herrn Dr. Thomas Schmidt für die sehr große Hilfe bei der Interpretation von NMR-Spektren und für die Durchführung der Simulationsversuche von NMR-Spektren am Computer.

Frau Dr. RuAngelie Edrada und Herrn Dr. Rainer Ebel danke ich für die prompte und kompetente Hilfe bei der Interpretation von NMR-Spektren und für die tatkräftige Hilfe bei dem Promotionsvortrag.

Frau Dr. Marion Resch danke ich für zahlreiche, gute Ratschläge, aufbauende Worte und für die gute Zusammenarbeit.

Herrn Klaus Lohmann für die gute Hilfe bei zahlreichen Computerproblemen und für die nette gemeinsame Zeit am Institut.

Herrn Dr. Jochen Stöhr danke ich für die Hilfe bei Computer-, HPLC- und MPLC-Problemen und für alle weiteren wertvollen Tipps während der Anfangszeit der Promotion.

Herrn Klaus Lohmann, Frau Dr. Kerstin Paulus, Frau Dr. Eveline Reininger, Herrn Carsten Thoms und Frau Franka Teuscher danke ich herzlich für die nette gemeinsame Praktikumsbetreuung.

Frau S. Borstel danke ich für die Isolierung des Robinetins, für die Wartung der HPLC-Anlage und für viele gute Ratschläge.

Bei meinen studentischen Hilfskräften Kashan Ahmed und Carina Weiskob möchte ich mich besonders bedanken für die große Unterstützung und für viele gute Anregungen, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben, sowie für die sehr schöne gemeinsame Zeit im Labor. Ebenfalls möchte ich Julia Baronsky, Juan Pedro Catalán Medina, Stefan Gottschalk, Stefan Grunitz, Jessica Luppus, Anne Metuge, Tina Misic, Parissa Keshavarzi, René Säuberlich, Vera Sonderkamp und Friederike Schroeder für die tatkräftige Hilfe und die sehr nette Gesellschaft im Labor danken.

Herrn Robin Schwabe für die kompetente Hilfe bei Computerproblemen, für die Bereitstellung von Computern und Computerzubehör und für die Teilnahme an den Bioverfügbarkeitsstudien.

Frau Kirsten Jöhren und Herrn Peter Sippel für die große Hilfe bei zahlreichen Computerproblemen.

Herrn Dr. U. Matthiesen, Spurenelementlabor der med. Einrichtungen der Universität Düsseldorf, für die Aufnahme vieler Massenspektren, die theoretische Einführung in die Massenspektroskopie sowie für die Beantwortung vieler massenspektroskopischer Probleme.

Herrn Dr. Steven Foster für die Zusendung des *E. atrorubens* Bildes.

Herrn Dr. Stephen Moring für die Zusendung der *E. atrorubens* Samen.

Den Mitarbeitern des Botanischen Gartens der Universität Düsseldorf für das Anpflanzen und die sorgfältige Pflege der *E. atrorubens* Pflanzen.

Den Mitarbeitern der Glasbläserwerkstatt der Universität Düsseldorf für das Anfertigen von Säulen und anderen wichtigen Glasgeräten.

Der Firma Madaus für die großzügige finanzielle Unterstützung.

Last but not least danke ich besonders meinen Eltern für die Ermöglichung des Studiums sowie für die liebevolle Unterstützung und ihr Interesse während meiner gesamten Promotionszeit.

Lebenslauf

Von:	Birgit Maria Dietz
Geboren am:	13. Oktober 1971 in Dortmund
Eltern:	Wilhelm und Katharina Dietz, geb. Meyer
Schulausbildung:	1978 – 1982: Comenius-Grundschule in Dortmund
	1982 – 1991: Käthe-Kollwitz-Gymnasium in Dortmund
	Juni 1991: Abitur
Studium:	Heinrich-Heine Universität Düsseldorf
	10/1991 - 04/1992: Chemie
	04/1992 - 09/1996: Pharmazie
	2. Staatsexamen: September 1996
Pharmazie-Praktikum:	10/1996 - 03/1997: Fa. Thiemann, Waltrop
	04/1997 – 09/1997: Hellweg-Apotheke, Dortmund
Approbation:	Dezember 1997
Wissenschaftl. Tätigkeit:	1.1.1998 Beginn der vorliegenden Arbeit unter Leitung von Prof. Dr. Rudolf Bauer am Institut für pharmazeutische Biologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.