



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Chemische Charakterisierung von südosteuropäischen Individuen aus der Gattung *Achillea*

angestrebter akademischer Grad

Magister der Naturwissenschaften (Mag. rer. nat.)

Verfasserin / Verfasser:	Peter Leidenmuehler
Matrikel-Nummer:	9406481
Studienrichtung (lt. Studienblatt):	Botanik
Betreuerin / Betreuer:	Ao. Univ.-Prof. Dr. Sabine Glasl-Tazreiter

Wien, am 07.11.2008

Ausgeführt am Department für Pharmakognosie der Universität Wien unter dem damaligen Vorstand Prof. Dr. Wolfgang Kubelka

Dank gesagt sei all den Menschen, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützten, insbesondere:

Herrn Univ. Prof. Dr. Wolfgang Kubelka für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes am Department für Pharmakognosie

Herrn Univ. Prof. Dr. J. Jurenitsch für die Fragestellung und die Betreuung des Fortgangs während der Arbeit

Frau Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Sabine Glasl-Tazreiter für die hervorragende Begleitung und Unterstützung während der Arbeit und für ihre große Geduld

Herrn Univ. Prof. Dr. Saukel für seine Hilfe mich nicht in der Botanik zu verlieren

Herrn Dr. Reznicek für Hilfe und aufbauende Tipps beim Umgang mit den technischen Geräten

Frau Dr. Ingrid Werner für regelmäßige gute Ratschläge und Ideen

Bei den Kollegen und Kolleginnen der Abteilung und des Departments für die nette Zusammenarbeit und den mir ermöglichten Erfahrungsgewinn.

Bei Soheila, meiner Liebsten, meinen Eltern, meinen Kolleginnen der Baxter Innovations GesmbH und meinen Freunden und Freundinnen von Dar al Janub, die mich zur Fertigstellung der Arbeit motivierten und mich immer unterstützen.

Inhaltsverzeichnis

<u>1. Einleitung und Zielsetzung</u>	1
<u>2. Zum gegenwärtigen Stand der Forschung</u>	4
<u>2.1. (Bio-)systematik und Taxonomie</u>	4
<u>2.2 Inhaltsstoffe und medizinische Wirksamkeit</u>	7
<u>3. Analysenmethodik</u>	11
<u>3.1 Analysiertes Pflanzenmaterial</u>	11
<u>3.2 Aufbereitung des Pflanzenmaterials</u>	14
<u>3.3 Gaschromatographie</u>	14
<u>3.4 DC-Analyse</u>	17
<u>3.5 IR-Analyse</u>	20
<u>3.6 HPLC-Analyse</u>	29
<u>3.7 Massenspektrometrie</u>	31
<u>4. Ergebnisse</u>	31
<u>4.1 Einteilung nach Sesquiterpenmuster (DC-Fingerprint)</u>	32
4.1.1 Gruppe 1 „Coll. D“	32
<u>4.1.1.1 Spezielle Untersuchungen an der Gruppe „Coll. D“</u>	32
<u>4.1.1.2 Analysenergebnisse der Gruppe „Coll. D“</u>	53
4.1.2 Gruppe 2 „Epblau“	57
4.1.3 Gruppe 3 „AASrot“	61
4.1.4 Gruppe 4 „Elemoldominiert“	65
4.1.5 Gruppe 5 „Proazulenfrei“	67
4.1.6 Gruppe 6 „Eprosa“	70
4.1.7 Gruppe 7 „Collinoid“	74
4.1.8 Gruppe 8 „Proazulenhältig“	83
<u>4.2 Einteilung nach Ätherischem Öl (Summenmerkmale)</u>	87

<u>5. Diskussion der Ergebnisse</u>	93
<u>6. Zusammenfassung</u>	96
<u>7. Literatur</u>	98

Anhang

Anhang 1: Zusammensetzung des Ätherischen Öles der untersuchten Individuen

Anhang 2: Ergebnisse der IR-Spektroskopie der untersuchten Individuen

Anhang 3: Lebenslauf

1. Einleitung und Zielsetzung

Achillea millefolium zählt zu den in Österreich am meisten verwendeten Heilpflanzen. Bereits seit dem Altertum werden die Blätter und Blüten der Pflanze für medizinische Zwecke genutzt (Hofmann et al. 1992).

Es handelt sich bei *Achillea millefolium* um eine Sammelart, die über weite Teile der Erde verbreitet ist. Im Folgenden soll, wenn von *Achillea millefolium* die Rede ist, der gesamte Komplex betrachtet werden. Der *Achillea millefolium*-Komplex gehört zur Familie der Kompositen und ist durch eine hohe Diversität ausgezeichnet.

Innerhalb der Gruppe treten sehr oft Polyploidie, Hybridisierung und Introgression auf, was eine Unterscheidung der verschiedenen Arten und die Taxonomie der Gruppe sehr schwierig macht.

Die grundlegende und richtungsweisende Einteilung der verschiedenen Taxa aufgrund karyologischer und morphologischer Analysen (Ehrendorfer 1953), die hauptsächlich auf den verschiedenen Ploidiestufen der Taxa beruht, wurde durch weitergehende Individualanalyse unter Einbeziehung morphometrischer, chemischer, karyologischer, klassisch morphologischer Merkmale, sowie durch Kreuzungsexperimente in Frage gestellt und erweitert. Die Beschreibung der Art *Achillea pratensis* (Saukel & Länger 1992) ist ein Beispiel, wie eingehendere Untersuchungen neue Erkenntnisse auf dem Gebiet der Systematik der *Achillea millefolium*-Gruppe bringen.

Der *Achillea millefolium*-Komplex besteht aus zahlreichen Sippen, die sowohl gut abgrenzbare Taxa darstellen, als auch Hybridschwärme, die vor allem im Überlappungsbereich der definierten Taxa auftreten. Heutzutage wird *Achillea millefolium* als Komplex betrachtet, dem Unterarten unterschiedlicher Polyploidiestufe, von diploid ($2n=18$) bis oktaploid ($2n=72$) angehören. Zu den diploiden Formen gehören z.B. *A. roseoalba*, *A. asplenifolia* oder *A. setacea* (Ehrendorfer 1998).

Die häufige Verwendung von *Achillea millefolium* als Arzneidroge erfordert parallel zur Aufklärung des Wirkstoffspektrums eine genaue Kenntnis der Systematik der Gruppe. Nach Chandler und anderen (Chandler et al. 1982) sind vor allem die Komponenten des Ätherischen Öls und die Sesquiterpene für die medizinischen, spasmolytischen und antiphlogistischen Wirkungen verantwortlich.

Die Anforderungen gemäß Arzneibuch sind widersprüchlich. „Proazulenführend“ wird als entscheidendes Kriterium angegeben, *Achillea millefolium* s. str. erfüllt diese Anforderung aber nicht. Verschiedene andere Sippen aus der Gruppe *Achillea millefolium* sind aber sehr wohl reich an Proazulenen. Volksmedizinisch werden meist sowohl proazulenführende als auch proazulenfreie Pflanzen verwendet.

Ein anderes Faktum, welches die Notwendigkeit der genauen Kenntnis der Gruppe unterstreicht, ist das Auftreten von bestimmten Inhaltsstoffen, Sesquiterpenen mit exozyklischen Methylengruppen im Laktoring (z.B. Guaianolid Peroxide), die potentiell allergene Wirkung aufweisen (Orth et al. 1994) und einer Anwendung als Arzneipflanze entgegenstehen. Diese bei Asteraceen häufig vorkommende Inhaltsstoffgruppe tritt ebenfalls nur in bestimmten Sippen auf, während andere Sippen diesbezüglich unbedenklich sind.

Die auftretenden Probleme und Erweiterungen bei der Systematik der mitteleuropäischen Taxa aus der Gruppe rechtfertigen und erfordern eine Betrachtung auch der südosteuropäischen Vertreter. Vor allem, da der Hauptteil der im Handel erhältlichen Arzneidroge aus südosteuropäischen Anbaugebieten stammt. Bulgarien und Albanien gelten hier als die Hauptanbauländer.

Das Projekt „The *Achillea millefolium* complex in South-Eastern Europe“ setzte sich zum Ziel die multidisziplinäre Analyse der Gruppe auch auf die südosteuropäischen Vertreter anzuwenden, und so mit Hilfe morphometrischer, karyologischer, cytologischer und phytochemischer Methoden, sowie durch Kreuzungsexperimente, die Mannigfaltigkeit der Gruppe in dieser Region erkennen und zu ordnen.

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit ist es, im Rahmen dieses Projektes Vertreter von bulgarischen Schafgarben mit verschiedenen chemischen Methoden zu charakterisieren. Im Mittelpunkt des Interesses steht die Analyse der terpenoiden Inhaltsstoffe, Monoterpene des Ätherischen Öles sowie höhermolekulare Terpenoide (Sesquiterpe) mit den Methoden der Gaschromatographie, HPLC, Dünnschichtchromatographie und Infrarotspektroskopie.

Die Infrarotanalyse zur Charakterisierung von Pflanzen aus dem *Achillea millefolium*-Komplex durch Aufnahme von Spektren eines aufgereinigten Extraktes ist eine relativ neue Herangehensweise (Werner 2001). Die Anwendung dieser Verfahrensweise auf weitere Individuen und der Versuch der Korrelation mit den anderen chemischen Methoden wird ein wesentlicher Aspekt dieser Arbeit sein.

Die erwähnten terpenoiden Inhaltsstoffe haben sich in zahlreichen früheren Arbeiten als taugliche Parameter zur Charakterisierung von Vertretern aus der *Achillea millefolium*-Gruppe herausgestellt (Eglseer et al. 1988, Kastner et al. 1992, Rauchensteiner et al. 2002).

Es stellt sich die Frage, inwieweit die in dieser Arbeit untersuchten Vertreter in bestimmte Gruppen ein- bzw. zugeordnet werden können, ob Zusammenhänge zwischen den verschiedenen untersuchten chemischen Parametern zu erkennen sind, und wie das eventuelle Auftreten von Hybriden interpretiert werden kann. Ein Versuch der Korrelation mit weiteren parallel untersuchten Parametern v.a. der Morphologie (Rauchensteiner 2002, Rauchensteiner et al. 2002), soll weitere Aufschlüsse über Einteilung und Vielfältigkeit der Sippen und die Hybridbildung zwischen denselben geben.

Die Untersuchung der chemischen Merkmale erfolgt an Blüten von Einzelpflanzen, die durch Rauchensteiner und Nejati in Bulgarien gesammelt wurden, nicht an der Sammeldroge. Diese auch in zahlreichen vorherigen Untersuchungen praktizierte Herangehensweise erklärt sich aus der Zielsetzung der Analyse. Charakterisierung und Erkennen von Vielfältigkeit, das Verständnis der Systematik kann nur auf der Untersuchung von einzelnen Individuen beruhen, da diese die grundlegende Einheit bilden. Die oftmals praktizierte Untersuchung von Ätherischem Öl aus Sammeldroge würde Mischergebnisse bringen. Gerade beim erwarteten Auftreten von Hybridschwärmen und bei der hohen Mannigfaltigkeit der Gruppe ist diese Individualanalyse notwendig.

2. Zum gegenwärtigen Stand der Forschung

2.1. (Bio-)systematik und Taxonomie

Das Verbreitungsgebiet von *Achillea millefolium* (s.l.) erstreckt sich weitgehend über die gesamte nördliche Hemisphäre, wo zahlreiche Arten und Unterarten in unterschiedlichen Polyploidiestufen zu finden sind (Saukel & Länger 1992).

Die Taxonomie der Gattung *Achillea* ist sehr komplex und Gegenstand zahlreicher Arbeiten. Die Gattung wird dem Tribus Anthemidae in der Familie der Kompositen zugeordnet. Nach Hegi (Hegi 1979) ist die Gattung *Achillea* in 5 Sektionen untergliedert. Nach anderen Autoren (Huber-Morath 1974) ist auch eine sechste Sektion zu unterscheiden. Die hier zu behandelnden Pflanzen sind der Sektion Millefolium zuzuordnen. Es sind auch vor allem die Vertreter dieser Sektion, die als Heilpflanzen gesammelt und verwendet werden. Innerhalb der Sektion Millefolium verdient die *Achillea millefolium*-Gruppe eine besondere Beachtung. Nach den grundlegenden Arbeiten von Ehrendorfer (Ehrendorfer 1953) zeichnet sich diese Gruppe durch eine besonders hohe Diversität und verschiedene Polyploidiestufen aus (2x,4x,6x,8x). Ehrendorfer teilt die Gruppe hauptsächlich aufgrund der Polyploidiestufen in 5 Kleinarten ein (*A. setacea*: 2x, *A. asplenifolia*: 2x, *A. collina*: 4x, *A. millefolium*: 6x, *A. pannonica*: 8x).

Diese grundlegende Einteilung wurde durch neuere Forschungsergebnisse verfeinert und erweitert. Viele Kleinarten kommen in unterschiedlichen Polyploidiestufen vor, eine Abgrenzung ist insbesondere auf dem tetraploiden Niveau schwierig. Nach Saukel und Länger (Saukel & Länger 1992) ist es deshalb wesentlich, bei taxonomischen Betrachtungen bedeutend mehr Wert auf die Ausbildung der Blattfiedern und Zungenblüten zu legen. Zusätzlich zu den morphologischen und auf Polyploidiestufen basierenden Kriterien werden auch phytochemische Merkmale für Taxonomie und Charakterisierung herangezogen. Es sind vor allem die Mono- und Sesquiterpene, die hier als Kriterium dienen. Eglseer und andere haben herausgefunden, dass die relativen Mengenverhältnisse von α - und β -Pinen, Caryophyllen, Sabinen, 1,8-Cineol, Campher und Chamazulen, allesamt Substanzen im Ätherischen Öl, als Parameter herangezogen werden können (Eglseer et al. 1988).

Nach Kastner, Rauchensteiner und anderen eignen sich zur Charakterisierung aufgrund der hohen Reproduzierbarkeit und einer kurzen Analysezeit folgende 13 Komponenten besonders gut:

α -Pinen, Camphen, Sabinen, β -Pinen, p-Cymol, 1,8-Cineol, γ -Terpinen, Campher, Borneol, α -Terpineol, Bornylacetat, β -Caryophyllen, Elemol.

Ebenso können folgende sich aus den Einzelmerkmalen summierende Merkmale herangezogen werden:

Summe 1: α -Pinen+Cineol

Summe 2: Sabinen+ β -Pinen+ β -Caryophyllen

Summe 3: Camphen+Campher+Borneol.

Rauchensteiner und andere fügten diesen 3 Summen noch zwei weitere charakteristische Summen hinzu, die Summen aus Camphen+Campher und Cineol+Borneol (Kastner et al. 1992, Rauchensteiner et al. 2002).

Nach dem derzeitigen Stand der Wissenschaft werden der Gruppe *Achillea millefolium* folgende Kleinarten zugeordnet:

Diploide Kleinarten sind *A. setacea* 2x, *A. ceretanica* 2x, *A. asiatica* 2x, *A. rosea* 2x und *A. asplenifolia* 2x. Diese Einteilung wurde morphologisch (Saukel & Länger 1992) und phytochemisch (Kastner et al. 1992, Kubelka et al. 1999) bestätigt. Nach Saukel und Länger treten *A. setacea* und *A. asplenifolia* aber auch als tetraploide Individuen auf. Als tetraploide Kleinarten gelten *A. collina* 4x, *A. pratensis* 4x, *A. ceretanica* 4x und *A. asiatica* 4x. *Achillea millefolium* s.str. gilt als hexaploider Vertreter der Gruppe, ebenso wie *A. distans*. *A. pannonica* gilt als oktoploider Vertreter der Gruppe, kommt aber auch in hexaploider Stufe vor (Saukel & Länger 1992).

Die Einteilung und Unterscheidung wird durch das weit verbreitete Auftreten von Hybridisierungen erschwert. Die Hybridisierung erfolgt nicht nur innerhalb der Gruppe *Achillea millefolium* sondern auch mit anderen Sektionen der Gattung *Achillea* (Nedelcheva et al. 1998, Nejati 2002).

Neben den morphologischen, karyologischen und phytochemischen Merkmalen wurde auch AFLP-Analysen zur Verfeinerung der Systematik der Gattung *Achillea* und des Aggregats *Achillea millefolium* agg. verwendet (Guo et al. 2004, Guo et al. 2008).

Demnach hat sich *Achillea* durch Hybridisierung und Polyploidisierung ausgebreitet. Das Aggregat selbst ist nach diesen Untersuchungen monophyletisch, und die diploide Ursprungsart nahe verwandt mit der in der Nordost-Türkei und Georgie vorkommenden diploiden *Achillea latiloba*. Die diploiden Kleinarten haben sich daraus vikariierend entwickelt und sind relativ klar abgrenzbar. Hybridisierungen und weitere Differenzierungen ließen aus den basalen diploiden Kleinarten abgeleitete polyploide Kleinarten des Aggregats entstehen. Nach AFLP Analyse erscheinen die polyploiden Arten somit polyphyletischen Ursprungs. Nacheinanderfolgende Zyklen von Differenzierung, Hybridisierung und (Auto- und Allo-) Polyploidisierung liessen die Art sich dann von Südwestasien und Europa aus weltweit verbreiten und differenzieren..

Als Ausweitung der vorher beschriebenen Taxonomie und Charakterisierung der Gattung *Achillea* insbesondere auf das Balkangebiet können die Arbeiten von Rauchensteiner (Rauchensteiner 2002) und Nejati (Nejati 2002) gesehen werden.

Diese Arbeiten seien hier insbesondere deshalb auch etwas prominenter erwähnt, da die vorliegende Diplomarbeit Teil der Arbeitsgruppe und des Projekts war, aus denen heraus auch diese Arbeiten entstanden. In den Arbeiten wurden Einblicke in die Diversität und Merkmalsausprägung von *Achillea*-Sippen am Balkan gegeben. Es wurden 905 Belege von *Achillea*-Individuen in Bulgarien, Rumänien und Griechenland gesammelt und morphologisch, phytochemisch und flowcytometrisch untersucht. Der Großteil der Individuen wurde *Achillea collina* zugeordnet. Im Unterschied zu den mitteleuropäischen Vertretern wurde herausgefunden, dass die Vertreter von *Achillea collina* am Balkan nur zu einem Teil proazulenführend sind. Viele der gesammelten und untersuchten Belege waren Hybride, die mit *Achillea collina* in Zusammenhang gebracht wurden. Neben *Achillea collina* und deren Hybriden wurden auch Belege von *Achillea millefolium* gefunden, die sich wie die mitteleuropäischen Vertreter durch die starke Heterogenität auszeichneten.

Die Untersuchungen konnten die taxonomische Eigenständigkeit von *Achillea distans*, *Achillea clypeolata* und *Achillea setacea* auch im Balkangebiet belegen, bei den Belegen, die *Achillea collina*, *Achillea millefolium*, *Achillea asplenifolia* und *Achillea pratensis* nahestehen, konnte keine deutliche Abgrenzung gefunden werden. Die Gruppen sind

morphologisch und phytochemisch sehr ähnlich, weisen eine hohe Heterogenität auf und sind durch Hybridisierungen verbunden.

Nach Saukel et al. sind in Bulgarien 6 Kleinarten des Aggregats *Achillea millefolium* vertreten (*A. asplenifolia*, *A. setacea*, *A. collina*, *A. millefolium* s.str., *A. pannonica*). Das Auftreten von *A. asplenifolia* war eine neue Erkenntnis dieser Arbeit. *A. setacea* tritt relativ selten auf, *A. millefolium* s.str und *A. distans* kommen vor allem in gebirgigen Regionen vor. *A. collina* wird in dieser Arbeit als die am weitesten verbreitete und am häufigsten vorkommende Art angegeben (Saukel et al. 2003).

2.2 Inhaltsstoffe und medizinische Wirksamkeit

Nach Hofmann und anderen (Hofmann et al. 1992) wird die Schafgarbe seit dem Altertum für medizinische Zwecke verwendet. Sie zählt zu den am meisten verwendeten Heilpflanzen in Europa (DellaLoggia 1998), in Österreich steht sie an 7. Stelle unter den beliebtesten Pflanzen (Saukel & Kubelka 1994).

Die wirksamen Bestandteile und Indikationen von *Achillea* ähneln denen der Kamille (Orth et al. 1994). *Millefolii herba* weist spasmolytische, antiphlogistische und hämöostatische Wirkungen auf (Kastner et al. 1995). Die wirksamen Bestandteile sind vor allem die Bestandteile des Ätherischen Öls und die Sesquiterpene (Chandler et al. 1982). Weiters sind auch Flavonoide, Phenolcarbonsäuren, stickstoffhaltige Verbindungen und Cumarine Teile des breiten Spektrums von wirksamen Inhaltsstoffen von *Achillea*.

Die spasmolytischen Effekte rühren von Bestandteilen des Ätherischen Öls und Flavonoiden, die antiphlogistischen Effekte werden den Azulenen und Sesquiterpenen zugeschrieben. In einer Untersuchung wurden die entzündungshemmende Aktivität von Sesquiterpenlaktonen (Proazulenen) gezeigt (Zitterl-Eglseer et al. 1991).

Zu den Hauptbestandteilen des Ätherischen Öls zählen die Mono- und Sesquiterpene, wobei die Zusammensetzung der einzelnen Substanzen sehr stark variiert. Nach Eglseer et al. zählen z.B. Pinen, Campher, Caryophyllen und Proazulen zu den Hauptbestandteilen (Eglseer et al. 1988).

Die Monoterpene mit ihrem Gerüst aus 10 Kohlenstoffatomen können nach der Anzahl der Kohlenstoffringe in drei Untergruppen unterteilt werden, azyklisch, monozyklisch und bizeyklisch. Weitere Unterscheidungen zwischen den Monoterpenen ergeben sich durch das Vorhandensein von Doppelbindungen oder durch Alkohol-, Keton-, Aldehyd- oder Esterbildungen (Waterman 1993).

Sesquiterpene besitzen ein Gerüst aus 15 Kohlenstoffatomen. Dadurch sind sie weniger flüchtig als die Monoterpene. Innerhalb der *Achillea millefolium*-Gruppe werden die Sesquiterpene in Guaianolide, Eudesmanolide, Longipinene und Germacrene unterteilt.

Zitterl-Eglseer und andere isolierten 1991 die Hauptsesquiterpene aus *Achillea setacea*. Es handelte sich dabei um 11,13-Dehydroacetylmatricarin, Rupicolin A und Rupicolin B. Diesem Matricarin und Rupicolin B konnten auch entzündungshemmende Effekte nachgewiesen werden (Zitterl-Eglseer et al. 1991).

Aufgrund der pharmakognostischen Wirksamkeit wird besonderes Augenmerk auf das Vorhandensein von Proazulen gelegt. Proazulene gehören zur Gruppe der Guaianolide und sind dem Matricin ähnliche Sesquiterpene, die beim Erhitzen und bei Zusatz von Säure durch Dehydratisierung oder Dehydrierung Azulene bilden, die eine charakteristische blaue Färbung ergeben. Sowohl Proazulene (in der Pflanze enthalten) als auch Azulene (als Produkt bei Erhitzung und Destillation) sind antiphlogistisch wirksam. Aus verschiedenen *Achillea*-Individuen können Proazulene isoliert werden, andere Individuen besitzen diese Proazulene nicht. Bei proazulenhaltigen Individuen kann der Gehalt der Azulene im durch Destillation entstandenen Öl bis zu 40% betragen, im Durchschnitt beträgt der Gehalt bei proazulene führenden Individuen 2-19% (Werner 2001).

Die Bildung von Proazulen ist genetisch bedingt und die Pflanzen führen die Biosynthese der Proazulene auch unter den unterschiedlichen ökologischen Bedingungen weiter (Stahl 1952, Fischer et al. 2001).

Aus dem Vorhandensein oder der Abwesenheit von Proazulen wurde versucht, ein weiteres taxonomisches Unterscheidungskriterium zu bilden. Hegi (Hegi 1979) führte in seiner Flora noch *A. millefolium* L. als proazulenhaltig. Da Proazulene relativ leicht nachweisbar sind, und ihre antiphlogistische Wirkung bekannt ist, wird der Gehalt an Proazulen neben dem Gehalt an Ätherischem Öl in den Arzneibüchern als Qualitätskriterium gefordert (z.B. Europäisches Arzneibuch 2000: Mindestgehalt von 2ml/kg an Ätherischem Öl und 0,02% Proazulene).

Dieser Forderung stehen aber 2 Dinge entgegen:

Erstens sind auch Sesquiterpene mit antiphlogistischer Wirkung in der Pflanze enthalten, die kein Azulen bilden.

Zweitens wird paradoxerweise aber gerade die in den Arzneibüchern als Stammpflanze geforderte *A. millefolium* L. bei neueren Untersuchungen als proazulenefrei betrachtet. Nach Kastner et al. und Orth et al (Kastner et al. 1994, Orth et al. 1994) besitzen die tetraploide *A. collina* sowie die diploiden *A. asplenifolia* und *A. roseoalba* Proazulene, die hexaploide *A. millefolium* s. str., die diploide *A. distans* und die oktoploide *A. pannonica* hingegen nicht. Es wurden aber auch Ausnahmen für die Einteilung gefunden (Orth et al. 1994).

Diese unterschiedlichen Angaben beruhen vor allem auf einer unklaren taxonomischen Zuordnung der Sippen. In der Arbeit von Rauchensteiner (Rauchensteiner 2002) wurden aber auch morphologisch z.B. *A. collina* nahestehende Belege gefunden, die kein Proazulen enthalten, womit die Einteilung noch weiter in Frage gestellt wird.

Ebenfalls zu den Sesquiterpenen, zu der Gruppe der nicht-azulenogenen Guaianolide gehören die Guaianolidendoperoxide und die Rupocoline. Diese Verbindungen sind durch das Auftreten eines α -Methylen- γ -Laktonrings gekennzeichnet. Die exozyklische Methylengruppe dieser Struktur ist hochreaktiv und kann durch Bindung an körpereigene Proteine über SH-Gruppen allergene Reaktionen und Kontaktdermatitis auslösen (Rücker et al. 1991)

Glasl und andere entwickelten eine Methode der Extraktion und Auswertung von Material aus *Achillea*-Individuen mittels HPLC, Dünnschichtchromatographie und Massenspektroskopie. Zur Etablierung dieser Methode wurde die apolare Proazulene führende *A. collina* sowie *A. pratensis* (die polare Eudesmanolide enthält) verwendet. Dadurch ist die Methode tauglich zur qualitativen Bestimmung von Sesquiterpenen unterschiedlicher Polarität, und es können aus einem Individuum charakteristische Sesquiterpenmuster bestimmt werden. Weiters können dadurch die wesentlichen Sesquiterpenbestandteile auch quantifiziert werden (Glasl et al. 1999).

Rauchensteiner und andere stellten anhand einer umfassenden morphologischen und chemischen Untersuchung von 1523 Einzelpflanzen die Charakteristika der Arten des Aggregats *Achillea millefolium* in Mitteleuropa zusammen. Dabei wurde auf die

Zusammensetzung des Ätherischen Öles in der Gaschromatographie und das Sesquiterpenmuster anhand der Dünnschichtchromatographie besonders Wert gelegt (Rauchensteiner et al. 2002).

Werner (Werner 2001) beschrieb eine Methode zur Analyse der Sesquiterpenzusammensetzung in verschiedenen *Achillea*-Arten mittels IR-Spektroskopie eines Dichlormethanextraktes aus den Blütenköpfchen. Durch Darstellung der Absorptionsbanden können verschiedene Arten der Gattung unterschieden werden. Diese Methode kann somit erstens für chemotaxonomische Zwecke und Stichprobenanalyse verwendet werden (als Ergänzung zur Dünnschichtchromatographie), und liefert zweitens einen Hinweis auf verschiedene vorhandenen Strukturen, wie zum Beispiel die oben beschriebenen α -Methylen- γ -Laktone.

3. Analysenmethodik

3.1 Analyisierte Individuen

Die 76 analysierten Individuen stammen aus Aufsammlungen einer Exkursion nach Bulgarien im Blühzeitraum Juli 1996 durch Rauchensteiner und Nejati (Rauchensteiner 2002, Nejati 2002). Die Sammelorte sind in Tabelle 1 dargestellt. Herbarbelege der Individuen befinden sich im Herbar des Departments für Pharmakognosie an der Universität Wien.

Tabelle 1: Analyisierte Individuen (76), deren Fundorte und Funddaten

RN....Rauchensteiner, Nejati

Pflanze	Funddatum	Fundort
RN960021	02.07.1996	Südlich vom Quartier
RN960022		
RN960030	02.07.1996	Sofia, Südpark
RN960031		
RN960040		
RN960041		
RN960042		
RN960043		
RN960044		
RN960175	05.07.1996	Vitoscha Gebirge
RN960183		Goldene Brücke
RN960184		Autobusendstelle
RN960187		bis Alpenhütte Enzian
RR960189		
RN960191		
RN960192		
RN960196		
RN960200		
RN960201		
RN960203		
RN960205		
RN960206		
RN960208		
RN960210		
RN960217	05.07.1996	Vitoscha Gebirge
RN960249		Goldene Brücke
RN960250		ab H. Enzian
RN960251		bis zum Doppelmayer-
RN960254		Lift
RN960255		
RN960258		
RN960259		
RN960272		
RN960273		
RN960281		
RN960282		
RN960283		
RN960286		
RN960294		
RN960295		
RN960296		

Pflanze	Funddatum	Fundort
RN960436	07.07.1996	Berg hinter
RN960437		Rila-Kloster
RN960443		
RN960444		
RN960527	12.07.1996	Loss-Mountain
RN960528		Kalkgestein
RN960529		
RN960530		
RN960552		
RN960573	13.07.1996	Vitoscha Gebirge
RN960606		südlich vom
RN960607		Doppelmayer-Lift
RN960608		
RN960609		
RN960610		
RN960611		
RN960612		
RN960613		
RN960614		
RN960615		
RN960616		
RN960619		
RN960620		
RN960621		
RN960623		
RN960624		
RN960625		
RN960626		
RN960627		
RN960630		
RN960631		
RN960632		
RN960633		
RN960634		
RN960635		

Die Individuen RN960021 bis RN960044 wurden im Südwesten der bulgarischen Hauptstadt Sofia in Parkanlagen gesammelt. Durch das Fehlen von Flüssen in der Hauptstadt und dem Gegensatz zwischen einem teilweise hohen Baumbestand und den oberflächlichen trockenen Böden ergibt sich ein rascher Wandel in der Vegetation. Die auftretenden Steppenrasen im Südpark ähneln der Flora der pannonischen Gebiete.

Die Belege RN960175 bis RN960296, sowie RN960573 bis RN960635 wurden im Vitoscha-Gebirge gesammelt. Das Gebirge wurde 1934 zum Nationalpark erklärt und umfasst eine reiche Flora und Fauna. Die höchste Erhebung des Gebirges liegt auf 2290 m, das Gebirge ist reich an Quellen und Flüssen. Im höherliegenden Gebiet sind sehr artenreiche Rasen zu finden. Die unteren Teile des Gebirges sind von Steppen, Fettwiesen sowie von Eichen-Hainbuchen-Mischwäldern bedeckt. Es treten an flachgründigen Stellen auch Felssteppen auf.

RN960436 bis RN960434 wurden in der Nähe des Klosters Rila im Rila-Gebirge gesammelt. Es handelt sich dabei um ein hauptsächlich granitisches Gebirge mit einer sehr hohen Niederschlagsmenge. Die Bergwaldstufe wird von Rotföhren-Eichenmischwald dominiert. Darüber schließen sich Hochgraswiesen mit einer hohen Artenvielfalt an. Ab 2000 m sind dann alpine Rasen und Zwergstrauchheiden zu finden.

Das Lozen-Gebirge mit dem Loss-Mountain, indem die Belege RN960527 bis RN960552 gesammelt wurden, befindet sich südöstlich von Sofia. Es besteht aus Sedimentgestein, das auf Silikatgrund abgelagert ist. An der Nordseite dominieren Eichen-Hainbuchen-Mischwälder, am Südhang sind große Steppenrasen mit einem Reichtum an Endemiten zu finden (Rauchensteiner 2002).

Parallel zur Untersuchung der chemischen Merkmale wurden die Pflanzen auch morphologisch und karyologisch durch Rauchensteiner und Nejati charakterisiert (Rauchensteiner 2002, Nejati 2002). Dabei wurden vor allem habituelle Merkmale, die Ausformung der Blattfiedern und der Zungenblüten sowie der Ploidiegrad berücksichtigt. Unter Zuhilfenahme verschiedener Florenwerke wurden die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Individuen durch Rauchensteiner und Nejati folgenden Gruppen/provisorischen Taxa zugeordnet:

Tabelle 2: Zuordnung zu Gruppen und provisorische Artbestimmung der 76 Individuen (siehe Tab. 1, S.11) durch Nejati/Rauchensteiner (Rauchensteiner 2002)

Belegnummer	Zuordnung durch Nejati/Rauchensteiner
RN960021	COL
RN960022	COL
RN960030	COL
RN960031	COL
RN960040	COL
RN960041	COL
RN960042	COL
RN960043	COL
RN960044	COL
RN960175	COL
RN960183	COL
RN960184	COL
RN960187	COL
RN960189	COL
RN960191	MILCOL
RN960192	COL
RN960196	COL?
RN960200	COL
RN960201	MILCOL
RN960203	COL
RN960205	COL
RN960206	COL
RN960208	COL
RN960210	COL
RN960217	COL
RN960249	COL
RN960250	MILcrith
RN960251	MIL
RN960254	MILcrith
RN960255	COL
RN960258	COL
RN960259	MIL
RN960272	COL
RN960273	COL
RN960281	COL
RN960282	COL
RN960283	MIL
RN960286	COL

Belegnummer	Zuordnung durch Nejati/Rauchensteiner
RN960294	MILCOL
RN960295	MIL
RN960296	MILCOL
RN960436	DIS
RN960437	DIS
RN960443	DIS?
RN960444	DIS
RN960527	COL
RN960528	COL
RN960529	COL
RN960530	COL
RN960552	MILCOL
RN960573	MILCOL
RN960606	COLSET
RN960607	MILCOL
RN960608	MILCOL1
RN960609	COL
RN960610	MIL
RN960611	MILCOL1
RN960612	MIL
RN960613	MILCOL
RN960614	MILCOL
RN960615	MILCOL1
RN960616	MILCOL
RN960619	MILCOL
RN960620	MILCOL
RN960621	MILCOL
RN960623	CRICOL?
RN960624	CRICOL?
RN960625	MILCOL
RN960626	CRICOL?
RN960627	MILCOL
RN960630	CRICOL?
RN960631	MILCOL
RN960632	COL
RN960633	MILCOL
RN960634	DIS?
RN960635	MILCOL

COL: *A. collina* s.l.

Relativ heterogen, Unterschiede zu mitteleuropäischen Vertretern von *A. collina* sind erkennbar hinsichtlich der Zungenblüten

COL?: *A. collina* aber unterschiedlich zu COL

MILCOL: Hybriden zwischen *A. millefolium* und *A. collina*

MILcrith: Hybriden zwischen *A. millefolium* und *A. crithmifolia*

MIL: *A. millefolium* s.str.

DIS: *A. distans*

DIS?: *A. distans*, aber unterschiedlich zu DIS

COLSET: Hybriden zwischen *A. collina* und *A. setacea*

MILCOL1: Hybriden zwischen *A. millefolium* und *A. collina*, anders als MILCOL

CRICOL?: wahrscheinlich Hybriden zwischen *A. crithmifolia* und *A. collina*

3.2 Aufbereitung des Pflanzenmaterials

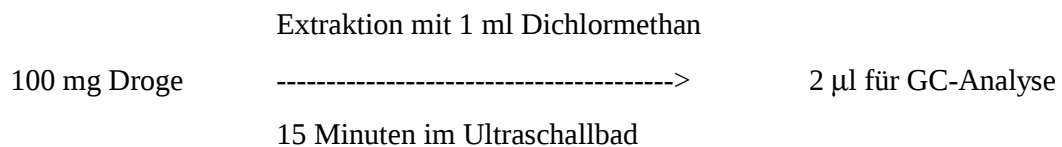
Zur Untersuchung wurden Extrakte aus den Blütenköpfchen der herbarisierten Pflanzen verwendet. Je 100 mg Blütenköpfchen wurden mit 1ml Dichlormethan 15 Minuten im Ultraschallbad extrahiert.

3.3 Gaschromatographie

Die Gaschromatographie eignet sich hervorragend, um die flüchtigen Komponenten im Monoterpenbereich des Ätherischen Öles zu erfassen (Kastner et al. 1992).

Zur Analyse gelangte direkt der Dichlormethanextrakt der Blütenköpfchen, von dem ca. 2 µl eingespritzt wurden (siehe Schema 1). Die GC-Analyse erfolgte mit dem frischen und nur kurzzeitig im Kühlschrank gelagerten Extrakt, um die leicht flüchtigen Komponenten des Ätherischen Öles quantitativ richtig zu erfassen.

Schema 1: Die Aufbereitung der Droge für die GC-Analyse



Das Hauptaugenmerk wurde auf 15 Komponenten des Ätherischen Öles gelegt, die sich in eingehenden früheren Untersuchungen als geeignet für die Charakterisierung von Individuen der *Achillea*-Gruppe erwiesen (Kastner et al. 1992) (siehe Kapitel 2, S. 5).

Verwendet wurden 3 GC-Systeme mit Flammenionisationsdetektor (System 1, System 2, System 3). Zusätzlich zu diesen 3 Systemen wurde ein System mit GC/MS Kopplung verwendet (System 4), welches weitere Aufschlüsse zur Identifizierung verschiedener Substanzen geben konnte. Die verschiedenen Systeme sind unten angeführt (siehe Tabelle 3, S. 15). Der Vergleich der Retentionszeiten mit denen von wiederholt eingespritzten Reinsubstanzen machte die qualitative Bestimmung der Substanzen möglich. Die gemittelten

Retentionszeiten und Kovats-Indices der 15 wichtigen Komponenten sind unten tabellarisch zusammengestellt (siehe Tabelle 4, S. 16).

Tabelle 3: Darstellung der verwendeten GC-Systeme

	System 1	System 2	System 3	System 4
Gas-chromatograph	PE-Autosystem XL	PE-Autosystem XL GC-IR	PE Sigma 300	GCMS-QP5050 Shimadzu
Säule	PE Elite Series SE-54 60m x 0,25mm 0,25µ Filmdicke	HP-5 50m x 0,32mm 0,52µ Filmdicke	Zebtron ZB-5 60m x 0,25mm 0,25µ Filmdicke	PE Elite Series SE-54 60m x 0,25mm 0,25µ Filmdicke
Trärgas	Stickstoff 5.0	Stickstoff 5.0	Stickstoff 5.0	Helium 5.0
Temperatur	60 °C-270 °C 3 °C/min Injektor: 270 °C Detektor: 280 °C	60 °C-270 °C 3 °C/min Injektor: 270 °C Detektor: 280 °C	60 °C-270 °C 3 °C/min Injektor: 270 °C Detektor: 280 °C	60 °C-270 °C 3 °C/min Injektor: 270 °C Interface: 280 °C
Septum	Thermogreen LB-2	Thermogreen LB-2	Thermogreen LB-2	Thermogreen LB-2
Detektor	FID	FID	FID	Massenspektro- meter/EI
Brenngase	Wasserstoff 5.0 Synth. Luft KW-frei	Wasserstoff 5.0 Synth. Luft KW-frei	Wasserstoff 5.0 Synth. Luft KW-frei	Wasserstoff 5.0 Synth. Luft KW-frei
Software	PE Turbochrom	PE Turbochrom	PE Turbochrom	Class 5000

Tabelle 4: Retentionszeiten und Kovats-Indices der untersuchten Hauptkomponenten

Komponente des Öles	System 1		System 2		System 3*
	Rt	KI	Rt	KI	Rt
α -Pinen	9,90	942	7,26	940	11,58
Camphen	10,45	958	7,76	956	12,25
Sabinen	11,28	979	8,56	977	13,24
β -Pinen	11,51	985	8,69	983	13,50
p-Cymol	13,47	1036	10,56	1034	15,86
1,8-Cineol	13,67	1040	10,69	1038	16,07
γ -Terpinen	14,72	1065	11,75	1064	17,34
α -Thujon	16,14	1096	13,04	1094	18,92
β -Thujon	16,89	1115	13,77	1111	19,79
Campher	18,75	1158	15,44	1152	21,91
Borneol	19,69	1176	16,36	1173	22,90
α -Terpineol	20,75	1199	17,42	1193	24,16
Bornylacetat	24,97	1304	21,58	1301	28,96
β -Caryophyllen	30,82	1434	27,34	1429	35,70
Elemol	36,04	1563	32,50	1560	41,40

Rt Retentionszeit (min)

KI Kovats-Index

* Das System 3 erwies sich als nicht konstant bezüglich der verschiedenen Parameter (v.a. Temperatur), die Retentionszeiten waren verschoben. Die Bestimmung der Substanzen nach den Retentionszeiten erfolgte relativ zum β -Pinen, welches einen immer vorhandenen und charakteristischen Peak aufweist. Die Bestimmung der Kovats-Indices war durch die fehlende Reproduzierbarkeit von Retentionszeiten ebenfalls nicht möglich.

Das Mengenverhältnis der verschiedenen Hauptkomponenten des Ätherischen Öles zeigte sich sehr charakteristisch für bestimmte Taxa der *Achillea*-Gruppe. Sowohl der Anteil einzelner Komponenten, als auch der Anteil von Summen wurde in früheren Arbeiten erfolgreich als Parameter für die Systematisierung verwendet (Kastner et al. 1992, Rauchensteiner et al. 2002, siehe Kapitel 2, S. 5). Dementsprechend wurde auch in dieser Arbeit vorgegangen. Die chromatographisch bestimmten Peakflächen der 15 Hauptkomponenten wurden addiert, und daraus der relative Anteil der einzelnen Komponenten bestimmt. Durch diese Art der Berechnung war die Absolutmenge des eingespritzten Extraktes nicht entscheidend. Auch wurden durch Addition der Prozentanteile „Summenmerkmale“ bestimmt. Diese verschiedenen Ergebnisse wurden dann einer statistischen Auswertung unterzogen.

Voruntersuchungen sollten die Reproduzierbarkeit der drei verschiedenen Systeme hinsichtlich der quantitativen Analyse gewährleisten:

Insgesamt 19 gleiche Proben wurden an den verschiedenen Systemen (siehe Tabelle 3, S. 15) hinsichtlich der relativen Anteile der 15 wesentlichen Substanzen in % getestet. Die Reproduzierbarkeitstests erstreckten sich im weiteren über den Verlauf der gesamten Laborarbeitszeit.

Tabelle 5: Ergebnisse der Reproduzierbarkeitstests von 2 Individuen (RN960196, RN960254) in 3 GC-Systemen (siehe Tabelle 3, S. 15) hinsichtlich der relativen Anteile der 15 Hauptkomponenten

Substanz	RN960196 System1	RN960196 System2	RN960196 System3	RN960254 System1	RN960254 System2	RN960254 System3
a-Pinen	4,02	4,03	3,33	5,69	5,02	4,70
Camphen	2,25	2,18	1,81	12,46	11,26	10,99
Sabinen	11,80	11,90	11,75	0,69	0,42	0,65
b-Pinen	20,46	22,25	20,07	8,12	7,66	7,03
p-Cymol	1,69	0,88	1,01	0,27	0,00	0,23
1,8-Cineol	9,54	10,32	8,54	6,66	6,28	5,81
g-Terpinen	0,78	0,33	0,37	0,17	0,00	0,00
a-Thujon	0,00	0,00	0,04	0,72	0,00	0,00
b-Thujon	0,00	0,00	0,00	3,31	3,09	2,81
Campher	0,57	0,60	0,13	11,08	11,65	10,74
Borneol	41,85	39,33	45,06	8,38	8,65	7,54
a-Terpineol	1,82	2,07	1,98	0,60	0,63	0,64
Bornylacetat	0,00	0,00	0,00	36,89	39,58	43,16
b-Caryophyllen	5,23	6,13	5,92	4,96	5,76	5,69
Elemol	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Summe	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

Die Ergebnisse zeigten, dass die Analysen mit den verschiedenen Systemen reproduzierbar waren, dennoch wurde aufgrund praktischer Gründe vor allem mit System 1 und System 2 gearbeitet.

3.4 DC-Analyse

Die in dieser Arbeit durchgeführte dünnschichtchromatographische Analyse des Pflanzenmaterials gibt eine gewisse Auskunft über das Spektrum der Sesquiterpene in der Pflanze. Durch den Vergleich der Laufstrecken und Detektion mit unterschiedlichen

Reagentien sollte durch die Dünnschichtchromatographie in erster Linie auf das Vorhandensein von Proazulenen getestet werden. Dabei sollten verschiedene Proazulene unterschieden werden, beziehungsweise auf das Vorhandensein von weiteren Sesquiterpenen geschlossen werden.

Die durch Ultraschallextraktion mit Dichlormethan erhaltene Lösung wurde eingedampft und anschließend wiederum in 200-300 µl Dichlormethan aufgenommen. Von dieser Lösung wurden 30 µl punktförmig nach Zwischentrocknen an der Luft mit Microcaps auf eine DC-Platte aufgetragen.

Voruntersuchungen zeigten, dass es notwendig ist, die Lösungen kühl zu lagern, und so schnell als möglich zu verwenden. Die Sesquiterpene bleiben relativ lange stabil, es treten aber dennoch Zersetzungsprozesse bei längerer Lagerung auf.

Die Flecken sind bei alten Proben im allgemeinen weniger stark ausgeprägt, vereinzelt verändert sich auch das Muster.

Die Dünnschichtchromatographie wurde aus praktischen Gründen 24 h nach der Extraktion des Pflanzenmaterials durchgeführt. Dazwischen wurde die Lösungen eingedampft und im Kühlschrank gelagert.

Nach der Chromatographie erfolgte die Detektion mit Ultraviolettlicht (Betrachten der Fluoreszenzlösung bei 254 nm). Danach wurde die Platte mit EP-Reagens nach Stahl besprüht und anschliessend bei 150 °C im Trockenschrank 3 Minuten erhitzt. Zur Detektion weiterer Sesquiterpene wurde dieselbe Platte mit Anisaldehyd/Schwefelsäure Reagens besprüht und eine weitere Minute erhitzt. Zu den Parametern des DC-Systems und den Reagentien siehe Tabelle 6, S. 20.

Schema 2: Schema für die Dünnschichtchromatographie:

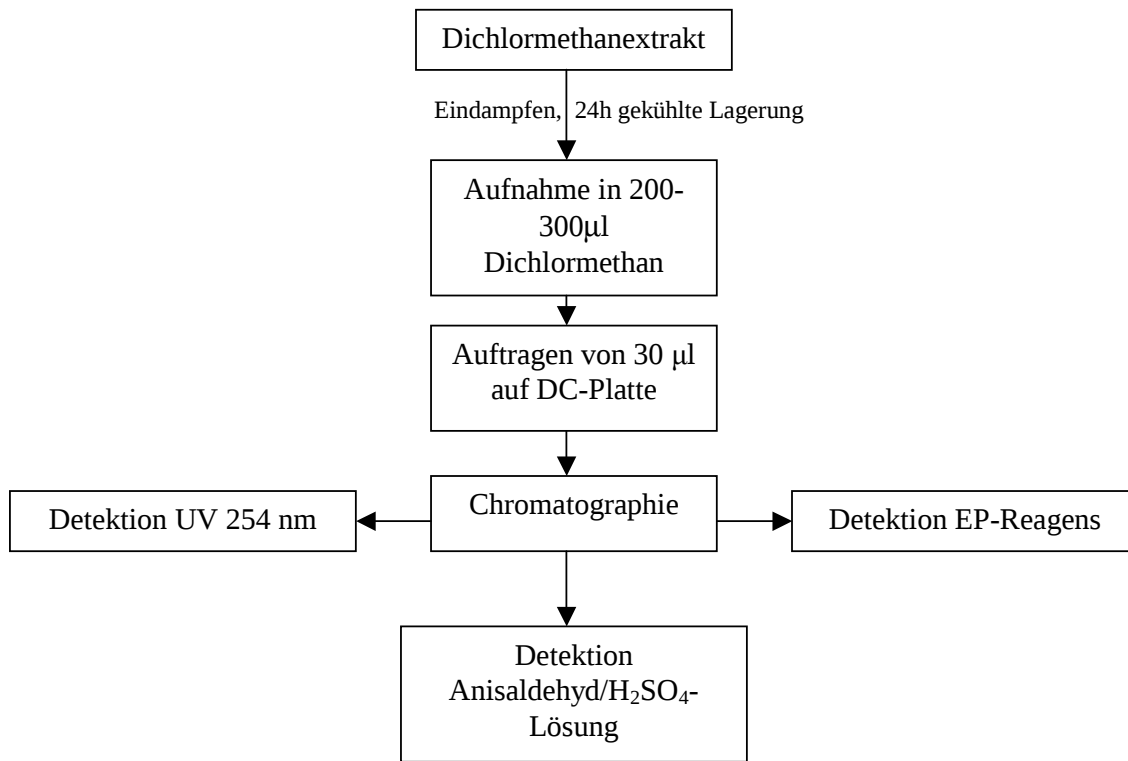


Tabelle 6: Parameter des verwendeten DC-Systems

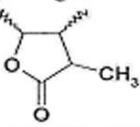
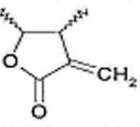
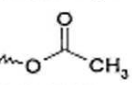
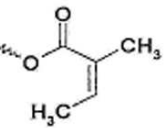
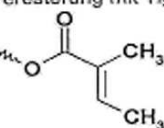
Stationäre Phase	Fertigplatte Merck Kieselgel 60 F254 Laufstrecke: 9 cm
Mobile Phase	Dichlormethan-Aceton 9:1
Referenzlösung	Extrakt aus Flos Chamomillae (gleiche Aufbereitung wie Probe) Unter UV 254 nm und nach Besprühen mit EP- Reagens zeigt sich charakteristischer Fleck von Matricin (blaue Färbung mit EP, $R_F=0,5$)
Auftragsmenge und Art	30 µl punktförmig mit zwischentrocknen
Detektion	UV 254nm EP-Reagens nach Stahl 1T...Dimethylaminobenzaldehyd 200T...Eisessig 20T...85 % Phosphorsäure 80T...Wasser Anisaldehyd/H ₂ SO ₄ - Reagens 17T...Ethanol 2T...konzentrierte Schwefelsäure 1T...Anisaldehyd

3.5 IR-Analyse

Die Untersuchung der IR-Spektren lässt Teilstrukturen von Molekülen erkennen. Im Fall dieser Arbeit wurden nicht Spektren von Reinsubstanzen aufgenommen, sondern das Spektrum eines vorgereinigten Gesamtextraktes. So kann Aufschluss über das Vorhandensein von funktionellen Gruppen (und damit Verbindungstypen) in der untersuchten Pflanze gewonnen werden. Wie vorhergehende Arbeiten zeigten, eignet sich dieses Verfahren zur Analyse von Sesquiterpenen, auch eine Charakterisierung von Pflanzenindividuen ist durch diese Spektren möglich. Gegenüber der DC, bei der ebenfalls der Sesquiterpenbereich dargestellt wird, hat diese Methode den Vorteil, dass die Resultate besser vergleichbar sind. Bei DCs lassen sich aufgrund des starken Einflusses unterschiedlicher Parameter (Alter der Sprühlösung, Stärke und Dauer des Erhitzens,...) oft nur Proben, die zur gleichen Zeit auf der selben Platte untersucht werden, wirklich vergleichen.

Proazulene sind durch charakteristische Banden zu erkennen, auch kann durch die Lage der Banden zwischen verschiedenen Proazulenen und den unterschiedlichen Esterbildungen unterschieden werden. Ebenfalls eine charakteristische Bande ergeben die exozyklischen Methylengruppen im α -Methylen- γ -Laktonring, wodurch aus dem Spektrum auch das Auftreten von potentiell allergenen Gruppen in der Pflanze erkennbar ist (Werner 2001).

Abbildung 1: Absorptionsbereich verschiedener wichtiger Teilstrukturen nach IR-Analyse von ausgewählten Reinsubstanzen (aus Werner 2001)

Kohlenstoffgerüst	Einfachbindungen	CH ₃	2970-2950 2880-2860 1480-1440 1385-1370	Spezielle Gruppen	gesättigtes Lakton
		R-CH ₂ -R	2940-2915 2860-2840 1475-1440		
Sauerstofffunktionen	Doppelbindungen	R-CH ₂ -CH=CH ₂	2940-2910 2870-2820 1455-1435		1784-1770 1173-1156
		RR'C=CH ₂	3095-3070 1660-1640 895-885		α -Methylen- γ -Lakton
		R-C=C-R cis	3040-3010 1660-1630 730-650		
		R-C=C-R trans	3040-3010 1680-1650 980-965		1770-1750 1150-1136
	Alkohole	RR'C=CRH	820-790		Veresterung mit Essigsäure
		In Ringen	3075-3010 1680-1600 730-650		
		OH primär	3550-3250 1450-1320 1075-1000		1740 1255
	Ether und Peroxide	OH sekundär	3550-3250 1450-1270 1130-1000		Veresterung mit Angelikasäure
		OH tertiär	3550-3250 1450-1320 1210-1110		
		Aliphatische Ether	1130-1110 940-920		1714 1233
		Ungesättigte Ether	1205-1150 1080-1030		Veresterung mit Tiglinsäure
	Carbonylverbindungen	Cyclisch gesättigte Ether	1120-1085 900-815		
		Peroxide	1030-1100 890-880		1706 1262
		Gesättigte Ketone	1720-1675 (1325-1210)		
		Cyclische Ketone	1780-1710 (1325-1210)		
		Einseitig ungesättigte Ketone	1685-1665 (1325-1210)		
		Beidseitig ungesättigte Ketone	1670-1650 (1325-1210)		
		Gesättigte Carbonsäureester	1745-1735 1260-1180		
		Ungesättigte Carbonsäureester	1730-1650 1330-1160		

Der in 200-300µl Dichlormethan aufgenommene eingedampfte Extrakt wurde durch Fraktionierung aufgereinigt. Dazu wurden die Lösungen auf Kartuschen aufgebracht, die mit je 1g Kieselgel 60 (Merck) gefüllt waren. Die Kartuschen waren nach oben und unten mit Fritten verschlossen.

Die Elution erfolgte unter Anlegung von leichtem Vakuum. Die ersten Fraktion wurde mit 20 ml Dichlormethan eluiert. Diese Fraktion, die verworfen wurde, enthielt die weniger polaren Bestandteile des Extraktes, also auch die Komponenten des Ätherischen Öles.

Die Elution der zweiten etwas stärker polaren Fraktion, die die Sesquiterpene enthielt, erfolgte mit je 20 ml eines Dichlormethan-Aceton-Gemisches, im Verhältnis 7:3. Die zweite Fraktion wurde zur Trockene eingedampft.

Wesentlich ist, dass das Lösungsmittel (Dichlormethan-Aceton 7:3) vollständig abgedampft wird. Verbliebenes Aceton stört die IR-Analyse, da die Keto-Gruppe des Acetons bei einer Wellenzahl von ca. 1700 cm^{-1} starke Absorption zeigt. Der Niederschlag wurde in ein paar Tropfen Dichlormethan aufgenommen. Diese Lösung wurde für die Aufnahme der IR-Spektren herangezogen (zu den Geräteparametern siehe Tabelle 7).

Tabelle 7: Parameter für die IR-Analyse

Gerät	Perkin Elmer FT-IR Spectrometer
Software	Spektrum 2000
Probenträger	- Silizium-IR-Fenster 13mm, 1mm dick Korth Kristalle
Wellenzahl	5200 cm^{-1} - 370 cm^{-1}

Die Darstellung der Ergebnisse aus der IR-Analyse erfolgte mittels Spektren und daraus ermittelten Blasendiagrammen (siehe Abbildung 6, S. 25). In den Spektren zeigt die y-Achse die prozentuelle Absorption, die x-Achse die Wellenzahl in cm^{-1} . Die Blasendiagramme geben ebenfalls sowohl die Lage der Banden, als auch die Stärke der Absorption wieder. Die Stärke der Absorption wird für jede Bande prozentuell zur Bande mit der stärksten Absorption angegeben. Der y-Wert des Blasendiagrammes zeigt die Lage der Bande (entspricht Wellenzahl der Absorption), die Größe der Blase entspricht der prozentuellen Absorption bezogen auf die Bande mit der stärksten Absorption. Für die Blasendiagramme wurde

aufgrund der Aussagekraft für die relevanten Strukturen der Absorptionsbereich zwischen 1900 und 700 cm^{-1} gewählt (Werner 2001).

Abbildungen 2-6 (S.23-25) zeigen die Umwandlung zweier IR-Spektren in Blasendiagramme. Die geringfügigen Unterschiede in der angegebenen Peaklage werden durch die Berechnungsmodi der Software verursacht, besitzen aber keine praktische Relevanz.

Abbildung 2: IR-Spektrum von RN960031

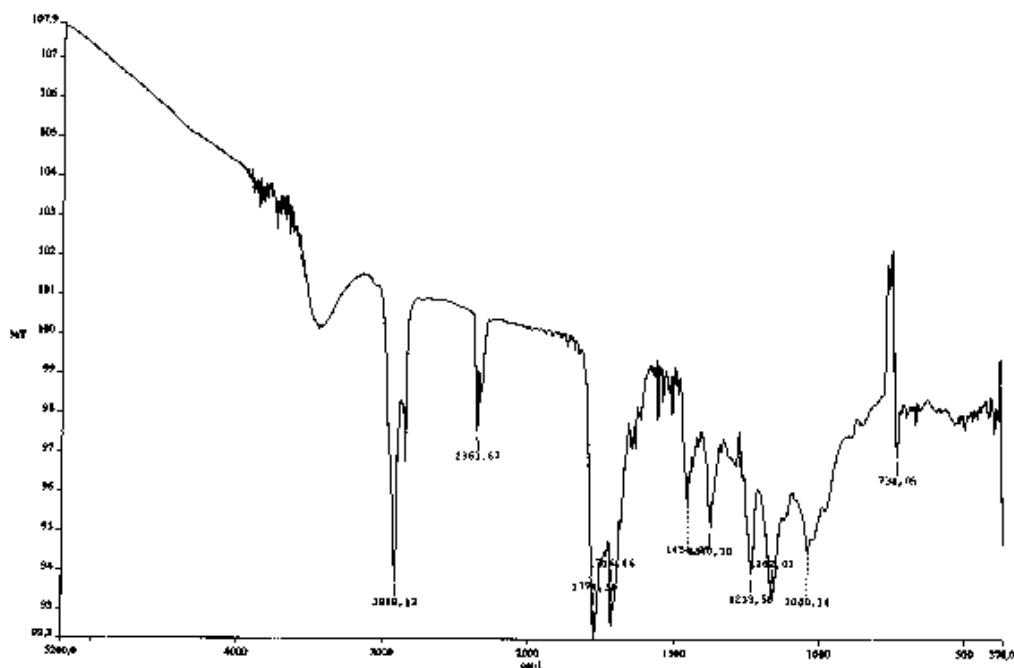


Abbildung 3: IR-Spektrum von RN960022

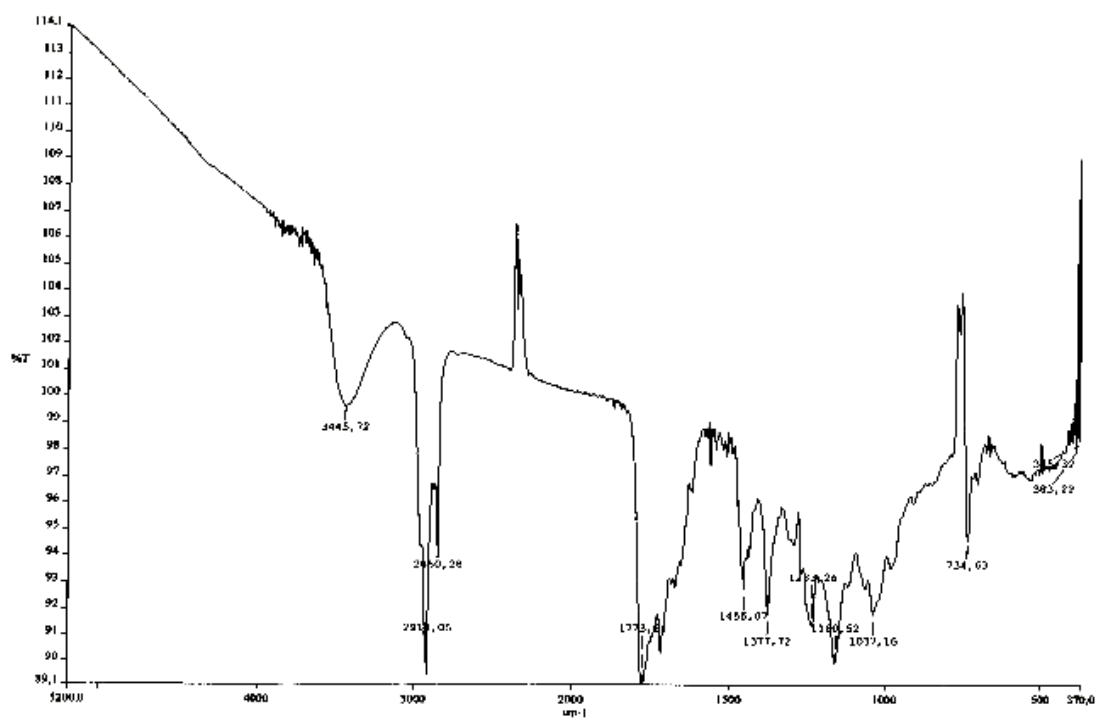


Abbildung 4: Zoom aus dem Spektrum von RN960022 (siehe Abbildung 3, S. 24) im Bereich von 1900 bis 700 cm^{-1}

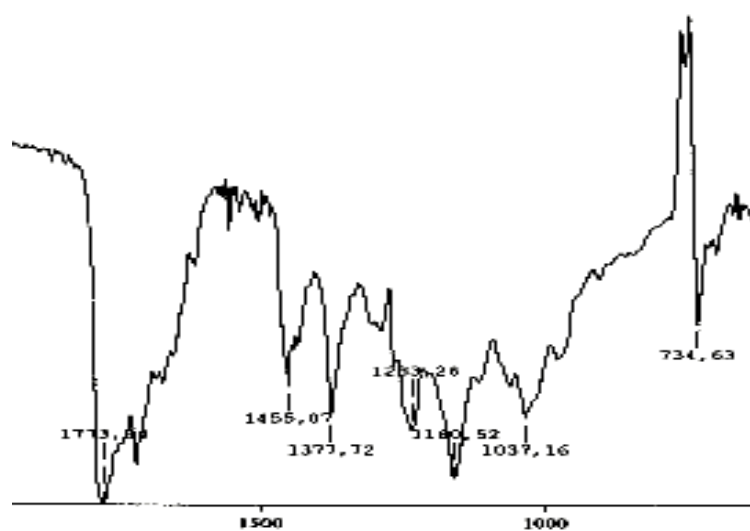


Abbildung 5: Zoom aus dem Spektrum von RN960031 (siehe Abbildung 2, S. 23) im Bereich von 1900 bis 700 cm^{-1}

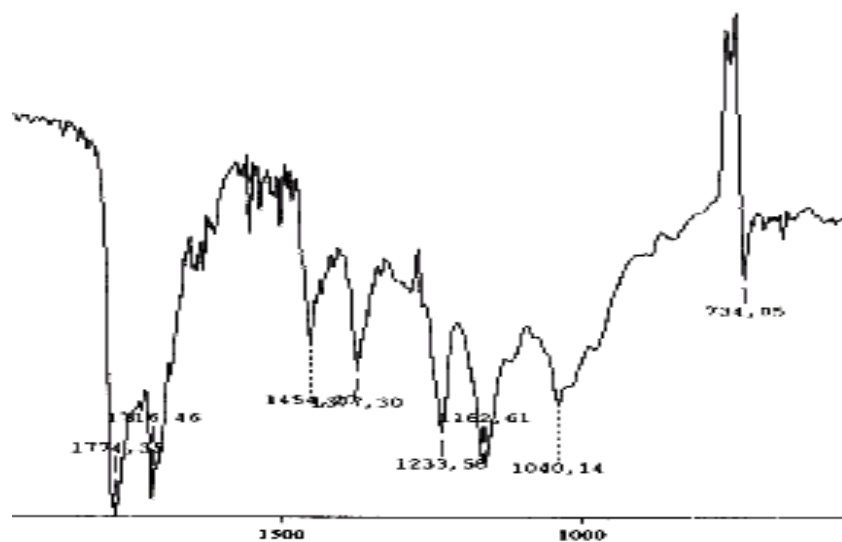
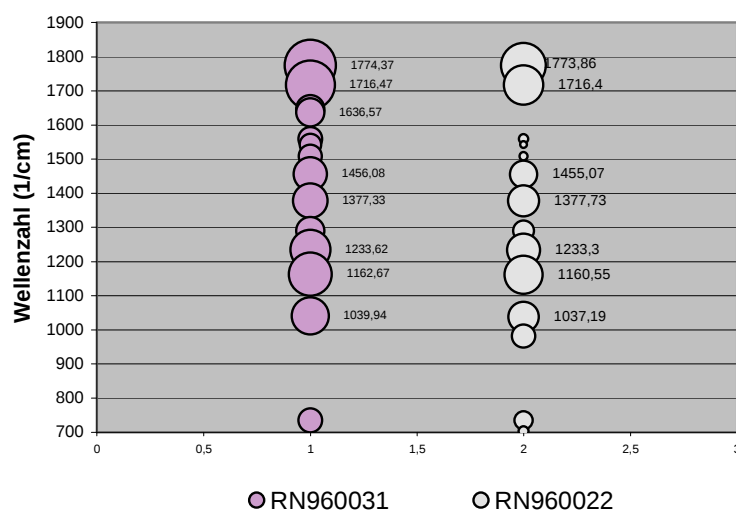


Abbildung 6: Blasendiagramm der IR-Spektren der beiden Individuen RN960022 (siehe Abbildung 3 und 4) und RN960031 (siehe Abbildung 2 und 5) mit Angabe der exakten Wellenzahl in cm^{-1}



Gleiches wie für die Dünnschichtchromatographie galt auch hier, die Sesquiterpene unterlagen vereinzelt Zersetzungsprozessen. Abbildungen 7-10 (S.26-27) zeigen die Unterschiede der IR-Spektren von frischen und 5 Tage alten Proben (eingedampfte und gekühlte Lagerung).

Abbildung 7: IR-Spektrum von RN960031 frisch

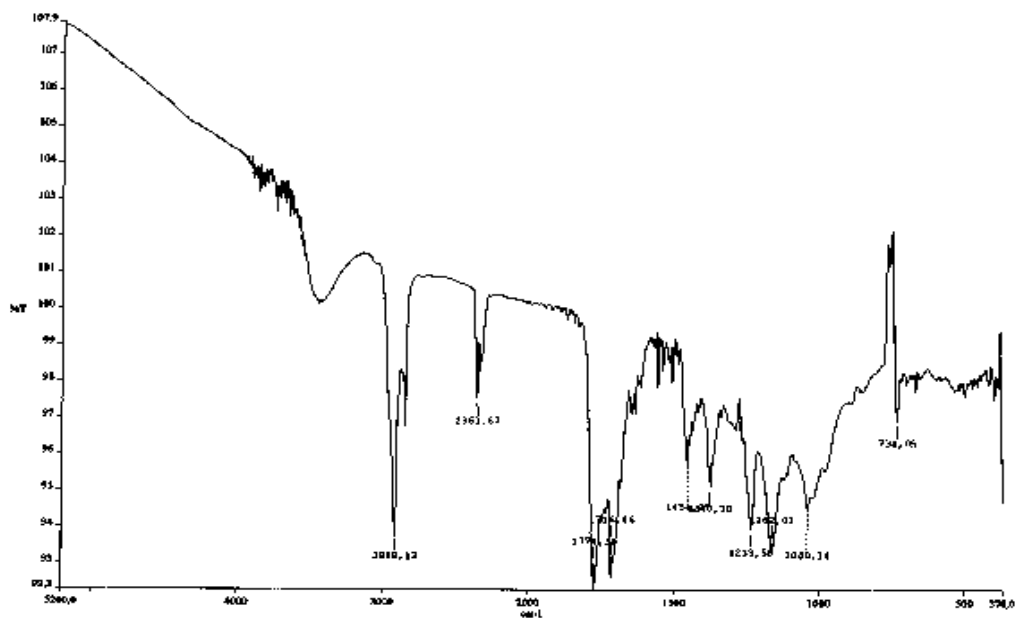


Abbildung 8: IR-Spektrum von RN960031 nach 5 Tagen

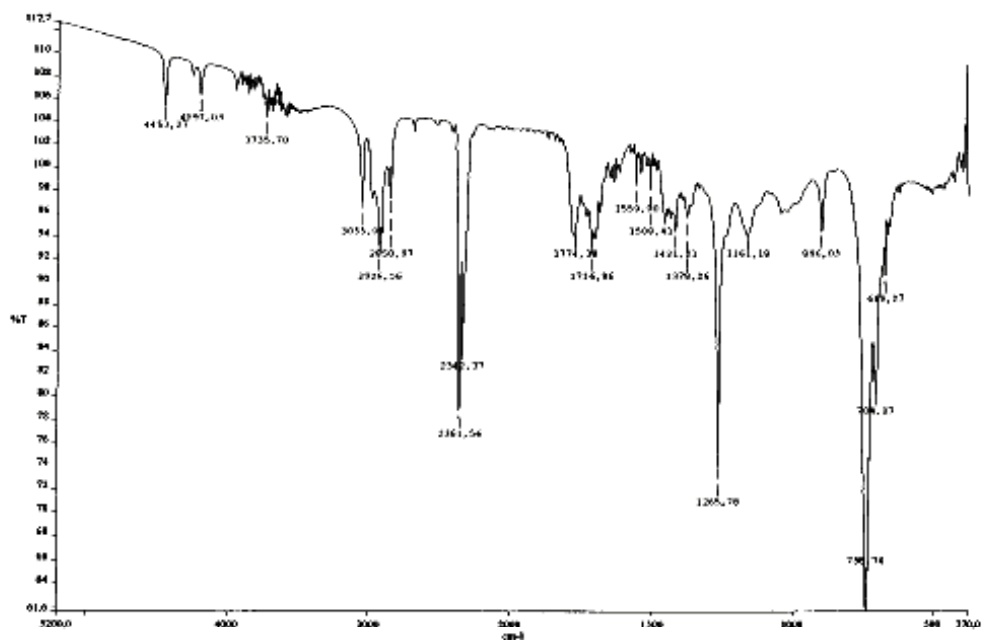


Abbildung 9: IR-Spektrum von RN960030 frisch

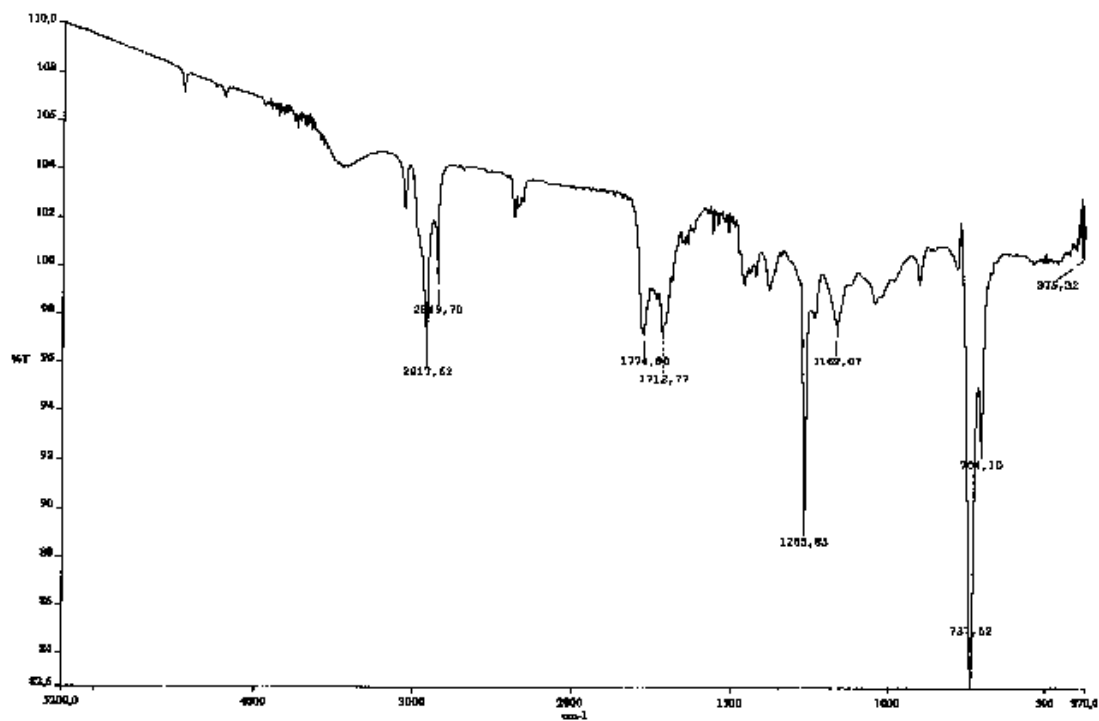
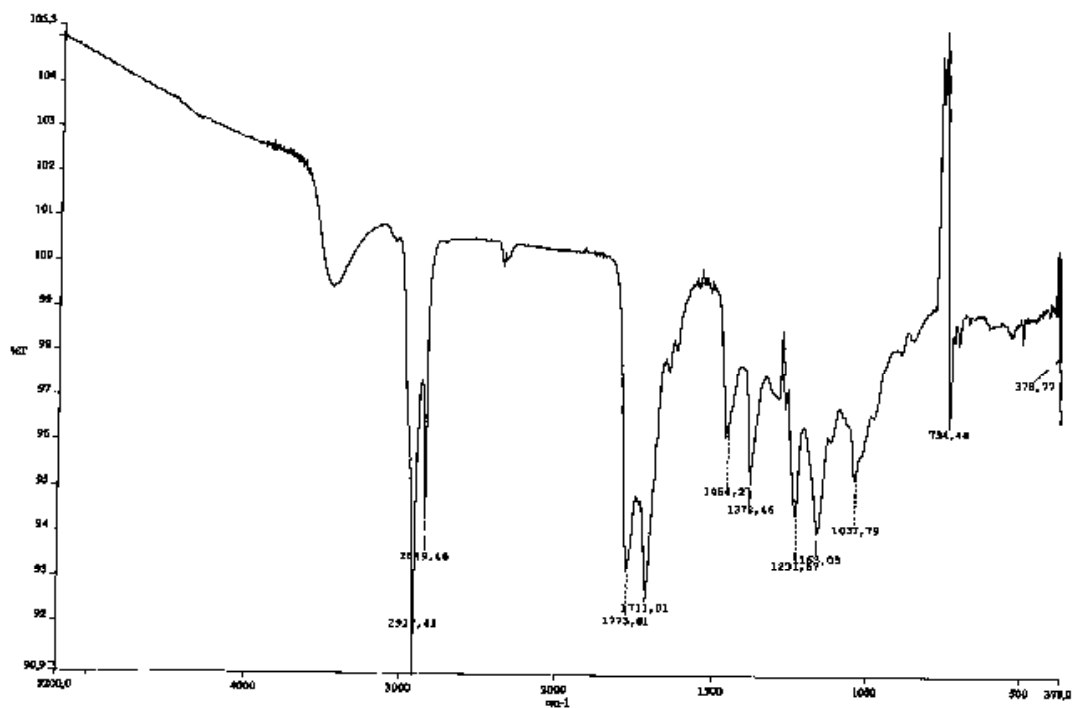
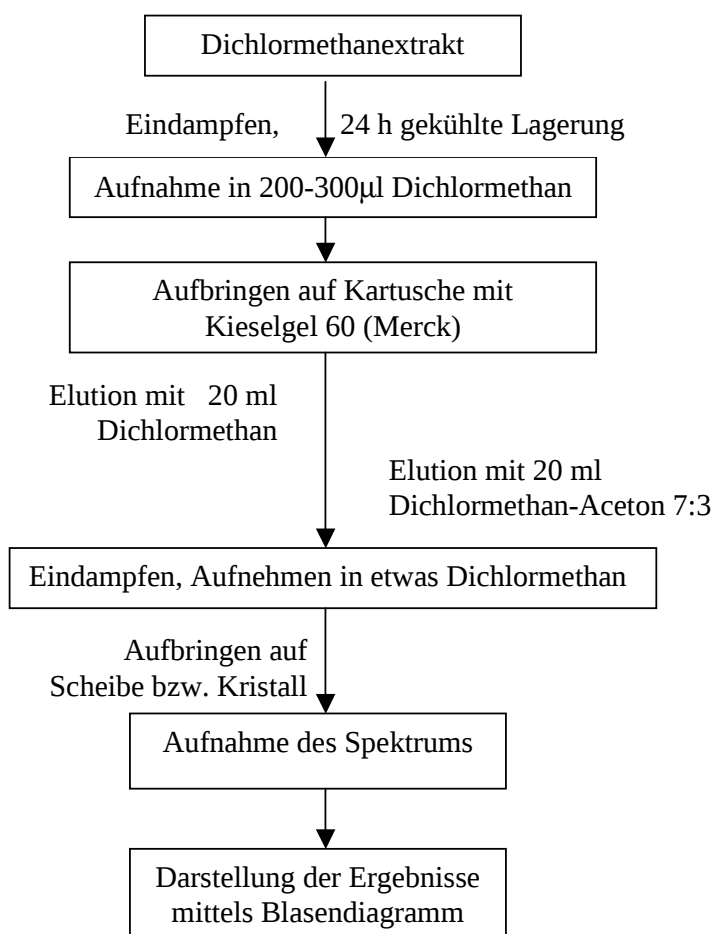


Abbildung 10: IR-Spektrum von RN960030 nach 5 Tagen



Die Peaks sind teilweise bei den 1 Woche alten Extrakten weniger stark ausgeprägt, es kommt auch zu einer Veränderung des Musters. Die Aufnahme der IR-Spektren erfolgte demnach mit frischem Extrakt (bis 1 Tag alt). Die Lagerung erfolgte eingedampft und gekühlt im Kühlschrank.

Schema 3: Schema für die IR-Analyse

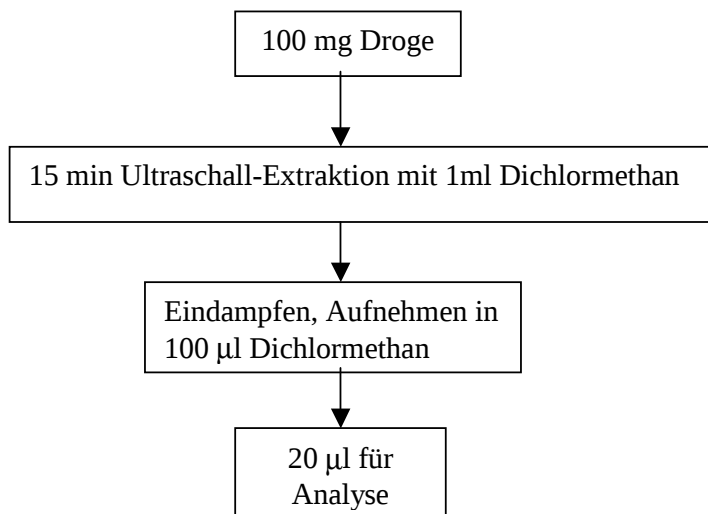


3.6 HPLC-Analyse

Die Analyse mittels Hochleistungschromatographie wurde verwendet um weitere Erkenntnisse über das Sesquiterpenmuster bestimmter Pflanzen zu gewinnen. Die HPLC wurde also nicht routinemässig angewendet, sondern nur bei einigen ausgewählten Individuen, deren DC eine genauere Analyse als interessant erscheinen liess. Vor allem von Pflanzen der Gruppe „Coll. D.“ (siehe Kapitel 4.1.1, S. 32) wurden HPLC-Läufe durchgeführt, und versucht charakteristische Substanzen zu identifizieren.

Das Extraktionsverfahren war das gleiche wie bei den anderen Analysemethoden. Der Dichlormethanextrakt wurde eingedampft und in 100 µl Dichlormethan aufgenommen. Aus dieser Lösung wurden 20 µl eingespritzt.

Schema 4: Schema für die HPLC-Analyse



Zur Identifizierung wurde die Co-Chromatographie mit Reinsubstanzen herangezogen, wobei hier entsprechende Verdünnungen und Einspritzmengen verwendet wurden (siehe Kapitel 4.1.1, S. 32).

Die Detektion erfolgte mit Hilfe eines UV-Detektors, wobei auch Spektren bei 220nm und 255nm zur Charakterisierung der Substanzen aufgenommen wurden.

Zur weiteren Identifizierung wurden die jeweiligen methanolisch-wässrigen Fraktionen aus der HPLC händisch gesammelt und mit der gleichen Menge Dichlormethan ausgeschüttelt. Die Dichlormethanphase wurde eingedampft, und die in etwas Dichlormethan aufgenommene Substanz dünnschichtchromatographisch kontrolliert bzw. für die Massenspektroskopie oder andere Analysen (GC-Vergleich, IR) verwendet.

Der Vergleich der Retentionszeiten mit bereits bekannten Verbindungen, das UV-Spektrum, die massenspektrometrischen Untersuchungen und zusätzliche Vergleiche mit anderen Methoden (GC) sollten die Identifizierung der charakteristischen Substanzen ermöglichen.

Die verwendeten HPLC-Systeme sind in nachstehender Tabelle 8 dargestellt.

Tabelle 8: Parameter für die HPLC

Gerät	Niederdruckmischer - Perkin Elmer Series 200 LC - Perkin Elmer Series 10 LC
Stat. Phase	LiChrocart 250-4 LiChrocart 100 RP-8 5µm
Mobile Phase	Methanol - Wasser
Gradient	System 1: 20% Methanol ---> 80% Methanol in 180 min (Gradient 0,33%/min) System 2: 30% Methanol 30 min isokratisch --> 90% Methanol in 180 min (Gradient 0,33%/min)
Fluss	1ml/min
Detektor	UV-Detektion: Perkin Elmer Diode Array Detector PE LC 235 Wellenlängen: 220 nm und 255 nm
Software	Turbochrom®

3.7 Massenspektrometrie

Neben der oben beschriebenen GC-MS-Kopplung wurde die Massenspektrometrie mit direkter Probengabe für die Identifizierung der verschiedenen charakteristischen Substanzen, die mittels HPLC isoliert wurden, verwendet.

Die direkten massenspektrometrischen Analysen wurden mit chemischer Ionisation (CI) durchgeführt, die Detektion für die GC-MS Kopplung mit Elektronenstossionisation (EI).

Die Parameter für die Massenspektrometrie sind in folgender Tabelle zusammengestellt:

Tabelle 9: Parameter für die Massenspektrometrie

Gerät:	Shimadzu GCMS QP 5050
Software	Class 5000
Reaktandgas für CI	Isobutan 4.0/C ₄ H ₉ ⁺
Ionenquelle	EI: 6*10 ⁻⁶ Torr 70eV, 250°C bzw. CI: 5*10 ⁻⁵ Torr 200eV, 180°C
Aufheizrate	80 °C/min
Scan	40-500amu/2sec

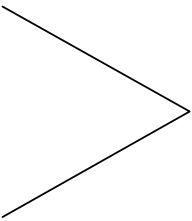
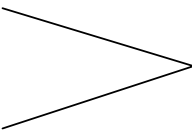
4. Ergebnisse

Im folgenden Kapitel sollen die Ergebnisse der verschiedenen chemischen Analysen dargestellt werden. Es soll dies auch eine Beschreibung der verschiedenen Individuen bezüglich der in dieser Arbeit untersuchten Parameter sein. Die Einteilung der Individuen erfolgt grundsätzlich nach 2 verschiedenen Gesichtspunkten (1. Sesquiterpene bzw. DC-Fingerprint; 2. Ätherische Öl-Komponenten bzw. Gaschromatogramme) in Gruppen deren Einführung uns als sinnvoll erschien - diese Einteilung soll zur Übersichtlichkeit dienen. Im Rahmen dieser Arbeit kann nicht von einer „systematischen“ Gruppierung im taxonomischen Sinne gesprochen werden, da die Anzahl der Parameter nicht ausreicht und ihre systematische Relevanz als unsicher angesehen werden muss (siehe Diskussion der Ergebnisse Kapitel 5, S. 93).

4.1 Einteilung nach Sesquiterpenmuster (DC-Fingerprint)

Nach dem Sesquiterpenmuster der DC erschien eine Einteilung in 8 Gruppen sinnvoll. Die Einteilung und Bezeichnung der Gruppen erfolgt nach Charakteristika im DC-Muster und darf nicht als systematisch missverstanden werden.

Tabelle 10: Einteilung der 76 Individuen (siehe Tabelle 1, S.11) in 8 Gruppen nach dem Sesquiterpenmuster in der DC

Nummer	Gruppenname	Anzahl der Individuen	
1	Coll. D	5	
2	EPblau	3	
3	AASrot	4	
4	Elemoldominiert	1	
5	Proazulenfrei	10	
6	EProsa	2	
7	Collinoid	30	
8	Proazulenhältig	21	
			76 untersuchte Individuen

Diese Gruppen sind unterschiedlich groß und unterschiedlich homogen, so sind die Gruppen „Proazulenfrei“ und „Proazulenführend“ Misch- oder Restgruppen, während sich z.B. die Gruppen „Coll. D“ oder „AASrot“ als sehr homogen und klar abgegrenzt erweisen. Die Gruppen 1-5 sind proazulenfrei, die Gruppen 6-8 proazulenführend.

4.1.1 Gruppe 1 „Coll. D“

4.1.1.1 Spezielle Untersuchungen an der Gruppe „Coll. D“

a) Problemstellung

Als „Coll. D“ wurde von Saukel ursprünglich eine in der Wachau (Dürnstein) vorkommende Form aus dem *Achillea*-Komplex bezeichnet, die morphologisch sehr stark an *Achillea collina* erinnert, die aber im Gegensatz zu *A. collina* keine Proazulene aufweist. Die Pflanze in Dürnstein zeichnete sich durch ein sehr charakteristisches Sesquiterpenmuster aus, das durch damals angefertigte Dünnschichtchromatogramme ersichtlich wurde.

In weiteren Untersuchungen am Institut wurde dieses charakteristische Muster in Extrakten aus Pflanzen aus Ungarn festgestellt. Glasl und andere charakterisierten das Sesquiterpenmuster dieser Pflanzen aus Ungarn mit Dünnschichtchromatographie und HPLC an verschiedenen Systemen und bestimmten die charakteristischen 5 Sesquiterpene als Desacetoxymatricarin (Leucodin), 8 α -Angeloxoy-Leucodin, Desacetylmatricarin, Achillin und 8 α -Angeloxoy-Achillin. Leucodin und Achillin sind Isomere, die sich in der Stellung der Methylgruppe unterscheiden (Glasl et al. 2003). Bei der Untersuchung der bulgarischen Pflanzen im Rahmen dieser Arbeit trat dieses Muster ebenfalls bei mehreren Individuen auf, eine der charakteristischen Substanzen trat auch bei der Analyse des Ätherischen Öles augenfällig in Erscheinung. Die Frage nach der systematischen Relevanz dieses charakteristischen Sesquiterpenmusters veranlasste uns, die Inhaltsstoffe der bulgarischen „Coll. D“ Individuen näher zu untersuchen und mit denen aus Dürnstein und Südungarn zu vergleichen.

b) Analytik der Gruppe „Coll. D“

Besonders charakteristisch erscheint der Fleck bei R_F 0,85 im Dünnschichtchromatogramm, eine zunächst unbekannte Substanz, die als PL2 bezeichnet wird und bei der es sich um die in früheren Untersuchungen am Institut gefundene Substanz PM1 (später als Desacetoxymatricarin bestimmt, siehe Glasl et al. 2003) handeln könnte. Charakteristisch ist auch der Fleck einer zweiten Substanz bei R_F 0,4 die als PL1 bezeichnet wird und bei der es sich um GT1 (später als Desacetylmatricarin bestimmt, siehe Glasl et al. 2003) handeln könnte, ebenfalls eine Substanz, die bei Untersuchungen an Individuen aus Dürnstein und Ungarn gefunden wurde. Hauptsächlich stellte sich die Frage, ob die Substanz PL2 in den bulgarischen Individuen dem PM1 entspricht. Es sollten auch Erkenntnisse zur Strukturaufklärung von PL1 und PL2 gewonnen werden.

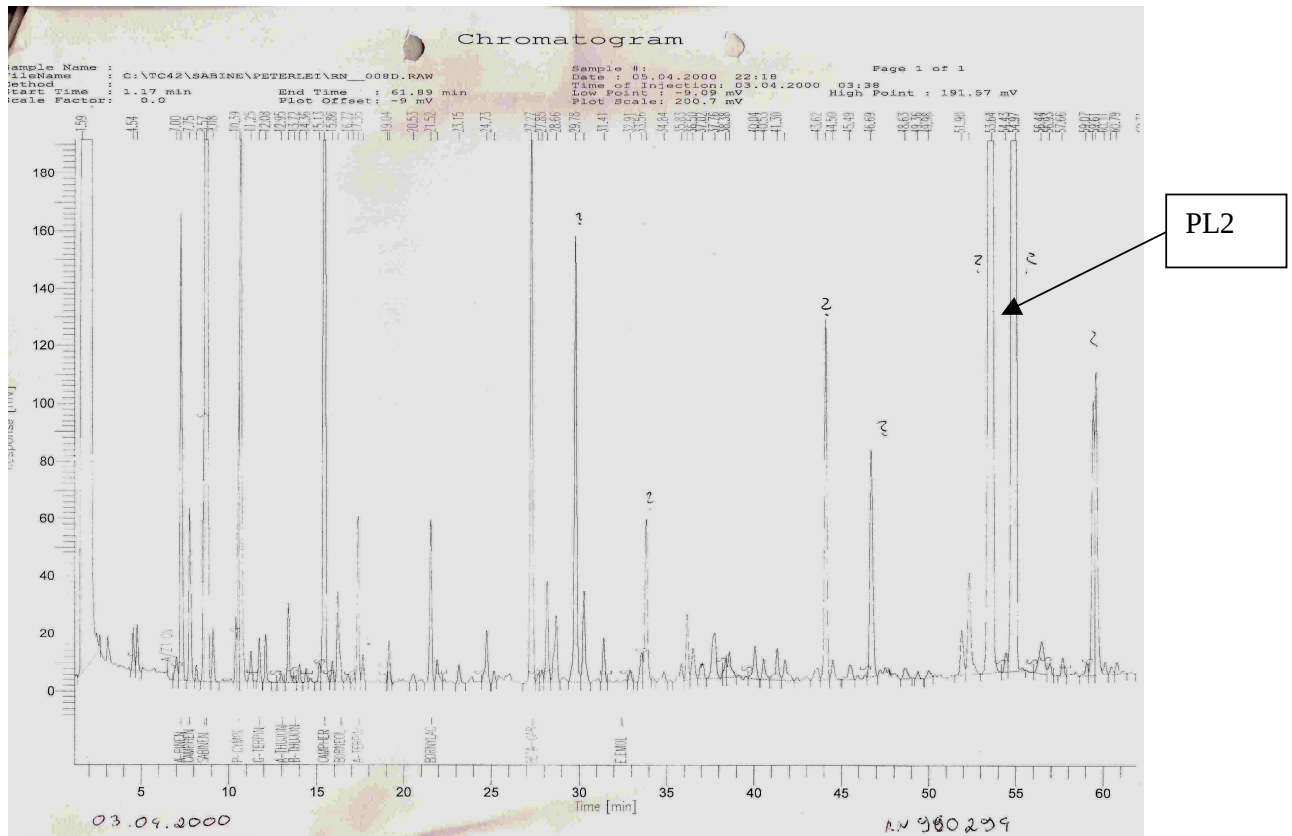
Tabelle 11: Vergleich der dünnschichtchromatographischen Parameter der Substanzen PM1, PL2, GT1 und PL1:

	PM1	PL2	GT1	PL1
R_F -Wert	0,85	0,85	0,4	0,4
UV 254	+	+	+	+
Färbung mit EP-Reagens	-	-	-	-
Färbung mit Anisaldehyd/H ₂ SO ₄	braun	braun	-	-

In den Gaschromatogrammen ist der charakteristische Doppelpeak von PL2 ebenfalls zu erkennen. Abbildungen 11 und 12 zeigen Gaschromatogramme aus Extrakten von 2 Individuen aus der Gruppe „Coll. D“:

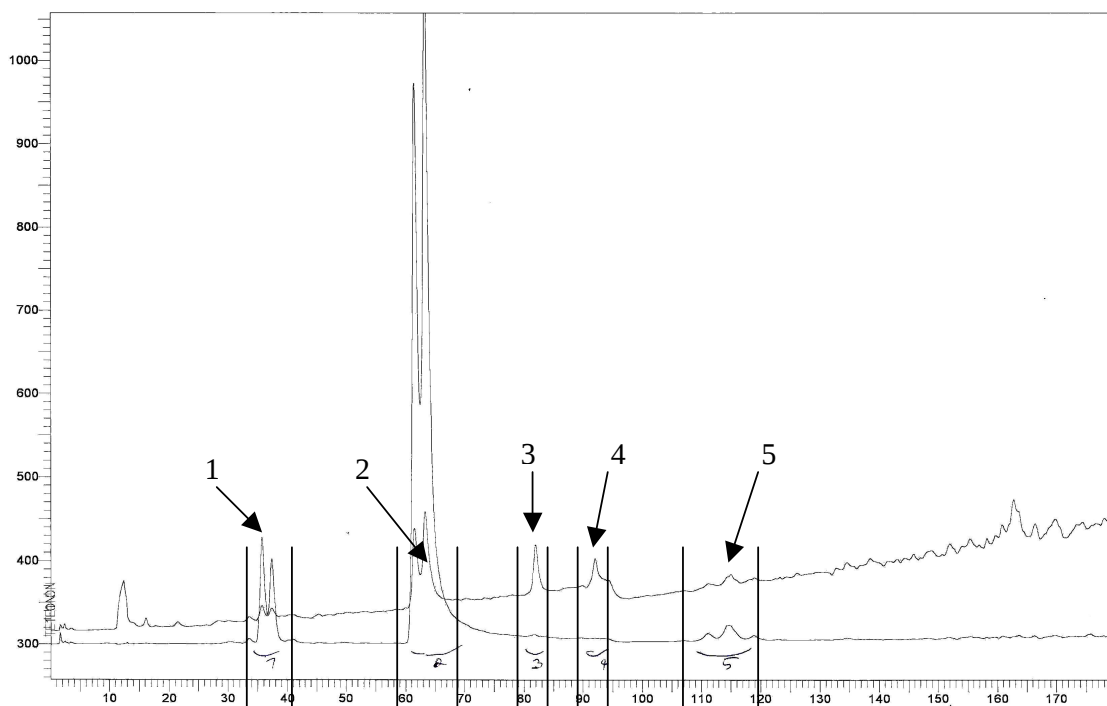
[illegible]

Abbildung 12: Gaschromatogramm des Individuums RN960294 aus der Gruppe „Coll. D“
(System 2, Parameter siehe Tabelle 2. S. 15)



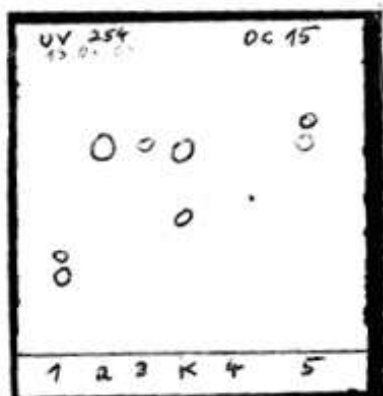
Der charakteristische Doppelpeak liegt bei beiden Individuen bei einer Retentionszeit von 54 bzw. 55 Minuten. Als Repräsentant der Gruppe „Coll. D“ wurde die Pflanze RN960294 der weiteren Analyse unterzogen. Zunächst wurde eine HPLC Analyse mit Fraktionierung durchgeführt.

Abbildung 13: HPLC-Analyse eines Extraktes von RN960294 (GC siehe Abbildung 12, S. 35, HPLC-Parameter siehe Tabelle 8, S. 30)



5 Fraktionen wurden gemäß den in Abbildung 13 eingezeichneten Schnittstellen gesammelt, anschließend in Dichlormethan ausgeschüttelt und die einzelnen Fraktionen nach dem Einengen zur Kontrolle dünnschichtchromatographiert. In der folgenden Abbildung sind die Flecken der den Fraktionen 1-5 entsprechenden Substanzen unter UV-Detektion zu erkennen.

Abbildung 14: DC-Kontrolle der Fraktionen 1-5 nach HPLC Fraktionierung des Extraktes von RN960294 (siehe Abbildung 13, DC-Parameter siehe Tabelle 6, S. 20)



Während des HPLC-Laufes wurden auch UV-Absorptionsspektren der einzelnen Fraktionen aufgenommen:

Abbildung 15: HPLC Analyse und UV-Spektrum des Individuums RN960294 (siehe Abbildung 13, S. 36) im Bereich der Fraktionen 1+2

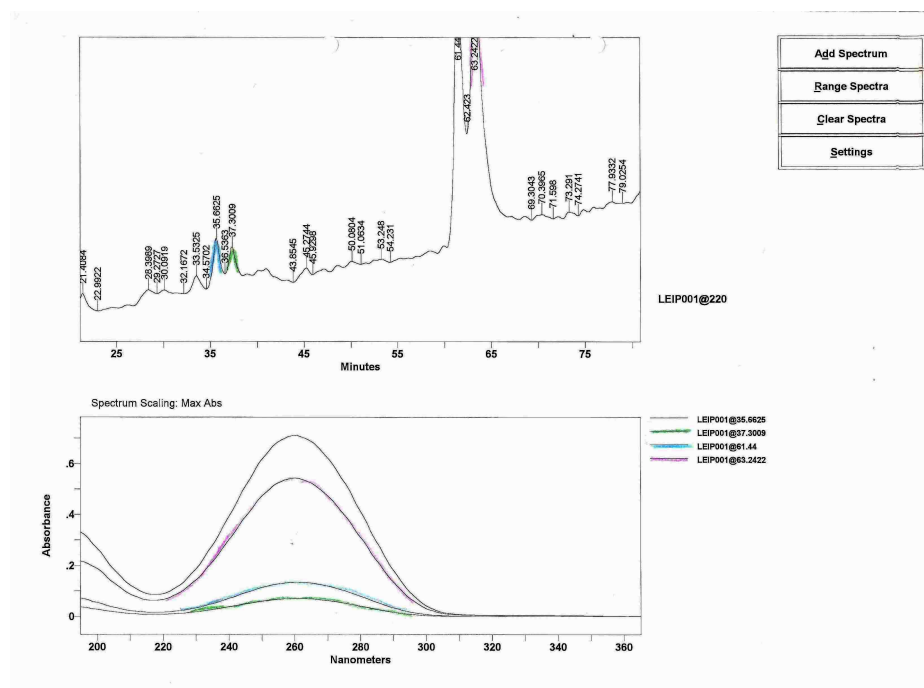
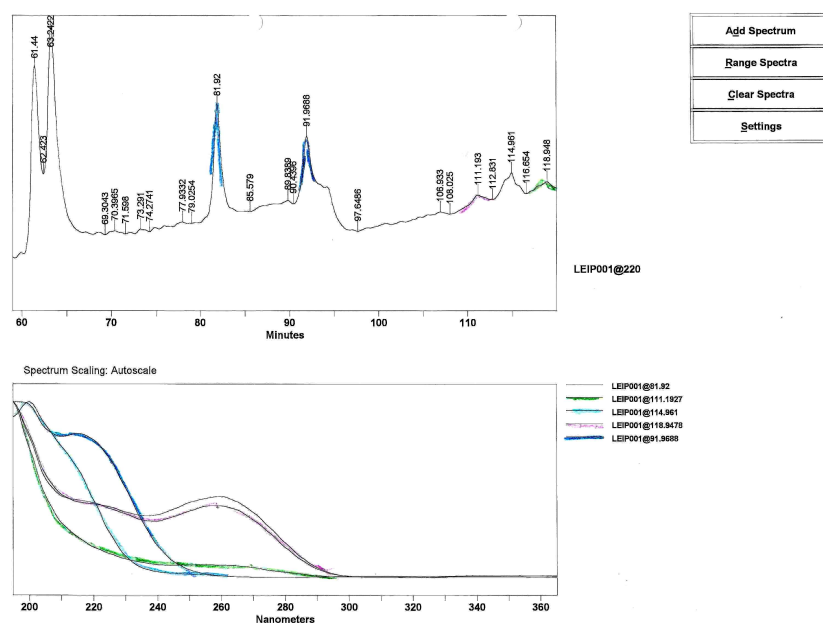


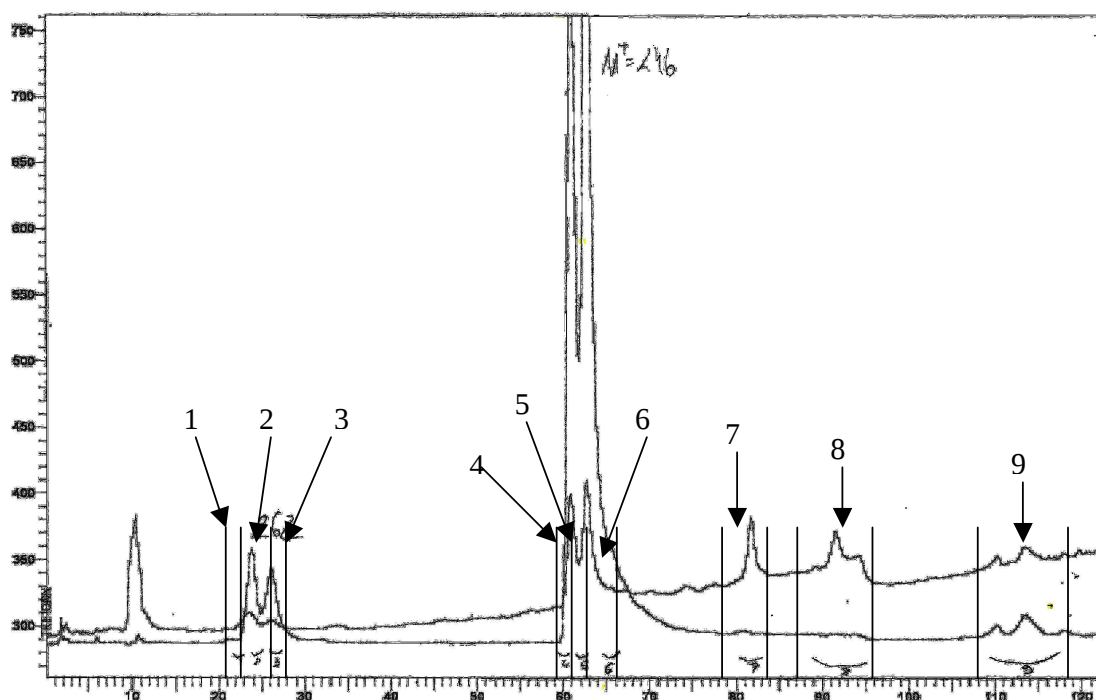
Abbildung 16: HPLC Analyse und UV-Spektrum des Individuums RN960294 (siehe Abbildung 13, S. 36) im Bereich der Fraktionen 3,4 und 5



Fraktion 1, bei einer Retentionszeit in diesem System von 35-40 Minuten, beinhaltet PL1, Fraktion 2, bei einer Retentionszeit von 60-70 Minuten, beinhaltet PL2. Die UV-Spektren zeigen ein Absorptionsmaximum von beiden Substanzen bei 260 nm.

In einer zweiten Analyse der Pflanze RN960294 wurden 9 Fraktionen detaillierter isoliert um Massenspektren aufzunehmen. Bei dieser Fraktionierung befindet sich PL1 in Fraktion 1, 2 und 3 und PL2 in Fraktion 4, 5 und 6. Diese 6 relevanten Fraktionen werden im folgenden genauer dargestellt.

Abbildung 17: Detaillierte Fraktionierung des Extraktes aus Individuum RN960294 (HPLC Parameter siehe Tabelle 8, S. 30) Sammlung von 9 Fraktionen



In den Abbildungen 18 bis 21 sind die Fraktionen 1, 3, 4 und 6 (siehe Abbildung 17, S. 38) dargestellt. (Parameter der Massenspektroskopie siehe Tabelle 9, S. 31)

Abbildung 18: Massenspektrum der Fraktion 1 (siehe Abbildung 17, S. 38) (Parameter der Massenspektroskopie siehe Tabelle 9, S. 31):

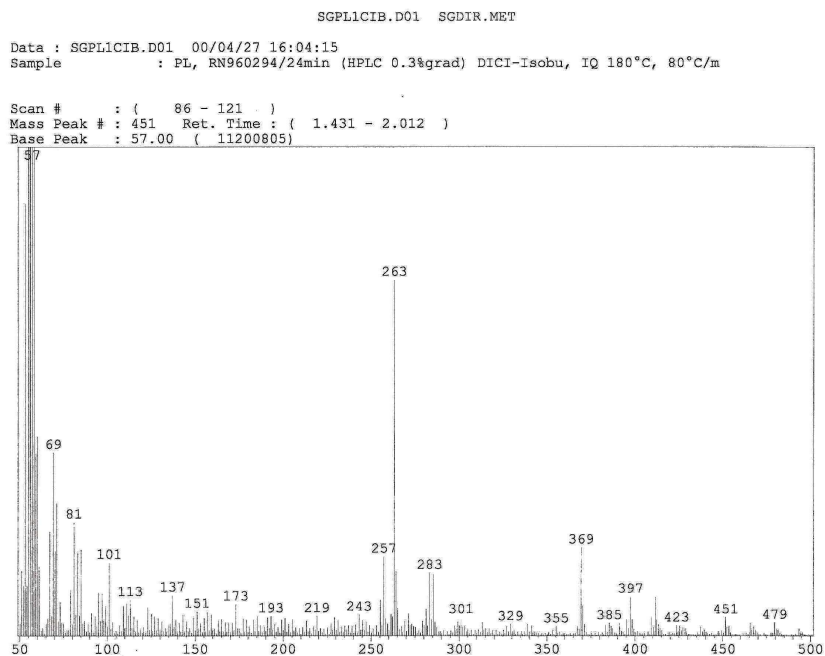


Abbildung 19: Massenspektrum der Fraktion 3 (siehe Abbildung 17, S. 38) (Parameter der Massenspektroskopie siehe Tabelle 9, S. 28)

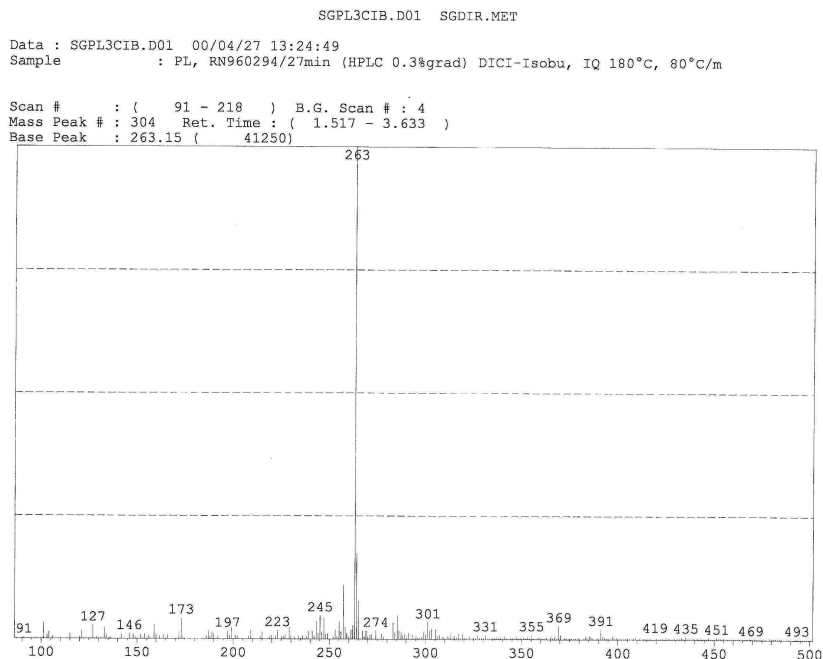


Abbildung 20: Massenspektrum der Fraktion 4 (siehe Abbildung 17, S. 38) (Parameter der Massenspektroskopie siehe Tabelle 9, S. 31)

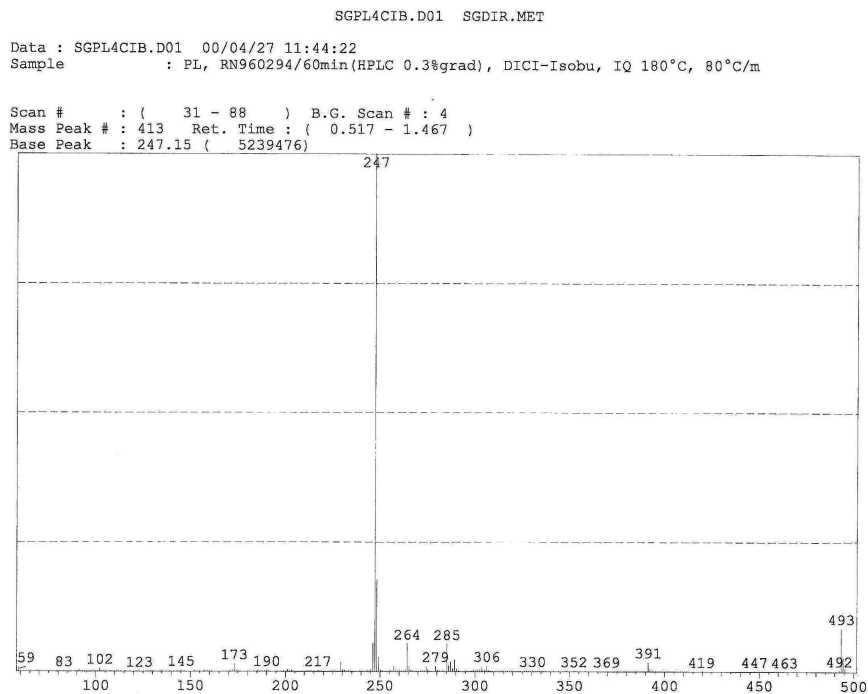
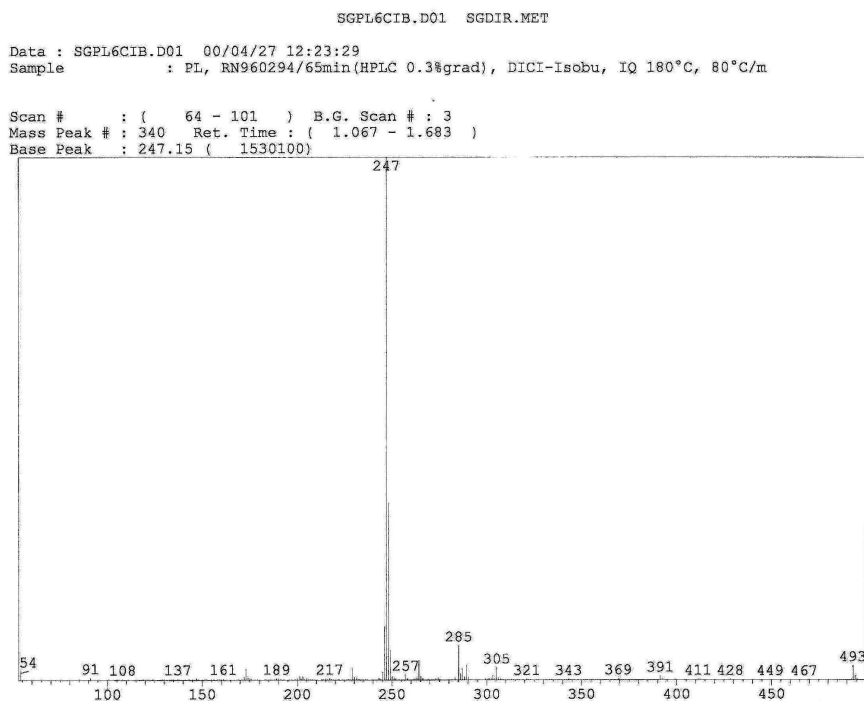


Abbildung 21: Massenspektrum der Fraktion 6 (siehe Abbildung 17, S. 38) (Parameter der Massenspektroskopie siehe Tabelle 9, S. 31)



Die Massenspektren zeigen, dass PL1 (Fraktion 1+3) eine Masse von 262 aufweist, PL2 weist eine Masse von 246 auf (Fraktion 4+6) (siehe Abbildungen 17, S. 38 und Abbildungen 18-21, S. 39-40)

Es wurden von den Fraktionen 1+2 bzw. 5 auch IR-Spektren aufgenommen:

Abbildung 22: IR-Spektrum Fraktion 2 (siehe Abbildung 17, S. 38) (Parameter der IR-Spektroskopie siehe Tabelle 7, S. 22)

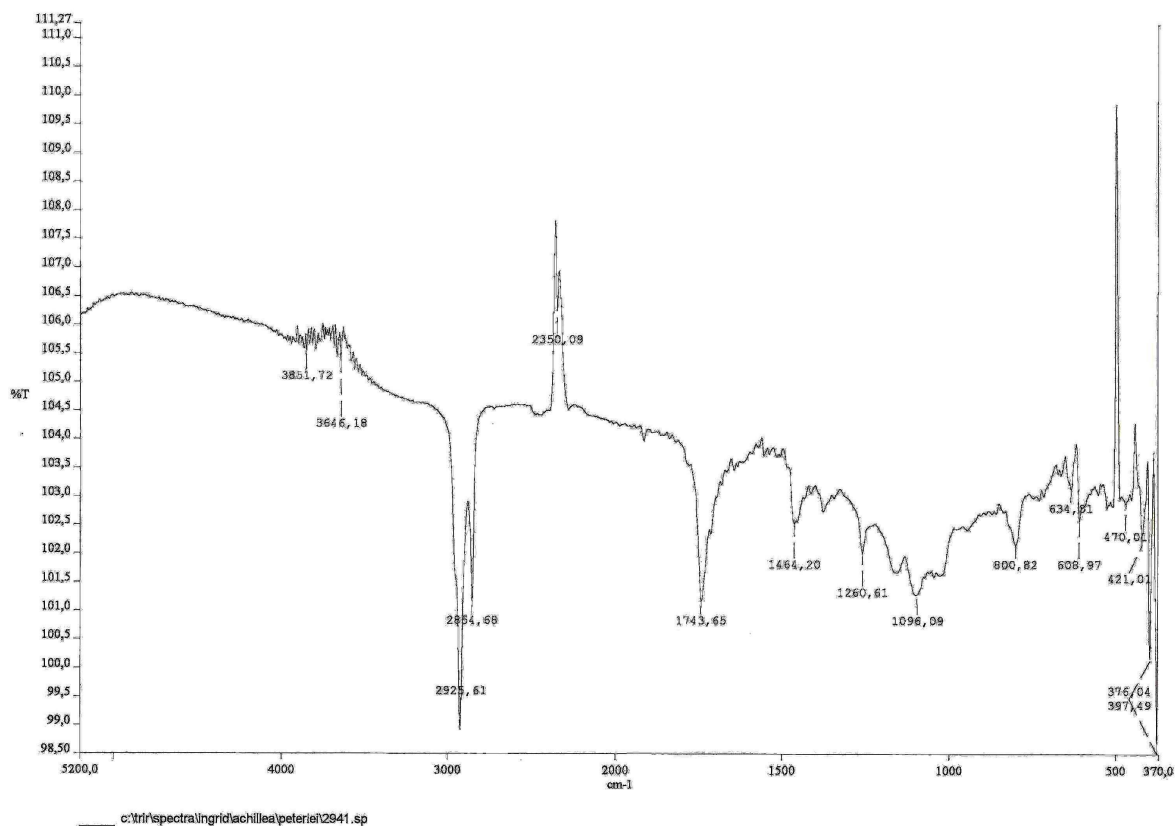


Abbildung 24: GC-MS Analyse des Extraktes von RN960294 (Parameter siehe Tabelle 9, S. 31) mit Massenspektren bei zwei Fraktionen

TIC

7641506

1

2

10 20 30 40 50 60 70 80 90

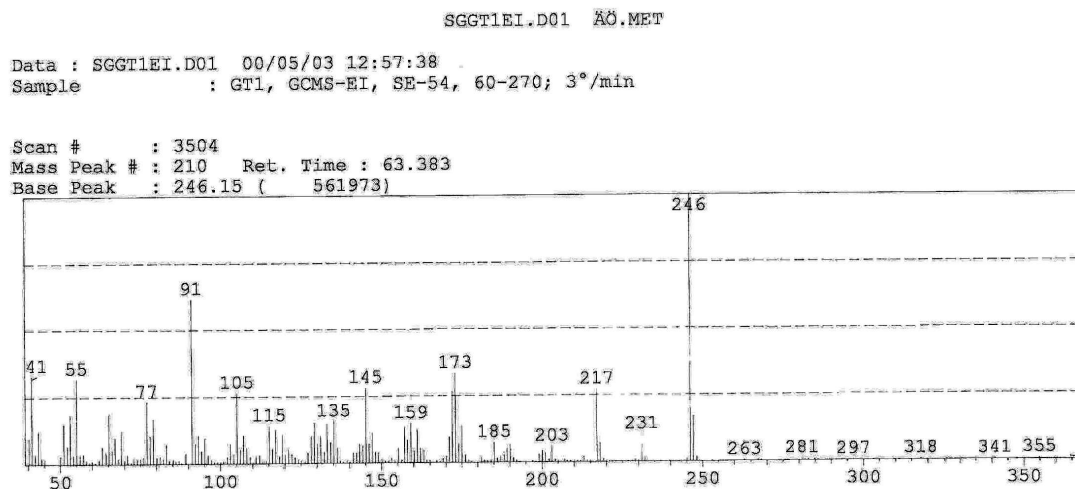
GC-Doppelpeak von
PL1 bei einer
Retentionszeit von 70
min

Base Peak : 246.13 (545337)

Mass spectrum showing relative intensity (0 to 100) versus m/z (0 to 450). The base peak is at m/z 246.13. Other labeled peaks include 41, 55, 77, 91, 105, 115, 135, 145, 159, 173, 185, 200, 217, 231, 253, 267, 281, 295, 311, 327, 340, 355, 383, and 415.

42

Abbildung 25: Massenspektrogramm der Fraktion 1 (siehe Abbildung 24, S. 42) (Parameter siehe Tabelle 9, S. 31):



Das GC MS des Extraktes bestätigte die Masse von PL2 von 246. Die Retentionszeit für die beiden Peaks von PL2 lagen bei 63 bzw. 65 Minuten. Nicht so charakteristisch, aber ebenfalls erkennbar ist der Doppelpeak bei ca. 70 Minuten, hier dürfte es sich um die Substanz PL1 handeln. Wie in der HPLC (siehe Abbildung 13, S. 36) bilden PL1 und PL2 also auch in der GC Doppelpeaks.

Als Vergleichssubstanzen wurde isoliertes PM1 bzw. GT1 verwendet.

Die GC-MS Analyse dieser beiden Substanzen mit dem gleichen System wie oben zeigte folgende Ergebnisse (siehe Abbildungen 26-28, S. 44-45):

Abbildung 26: GC-MS von isoliertem PM1 mit Massenspektren (Parameter siehe Tabelle 9, S. 31)

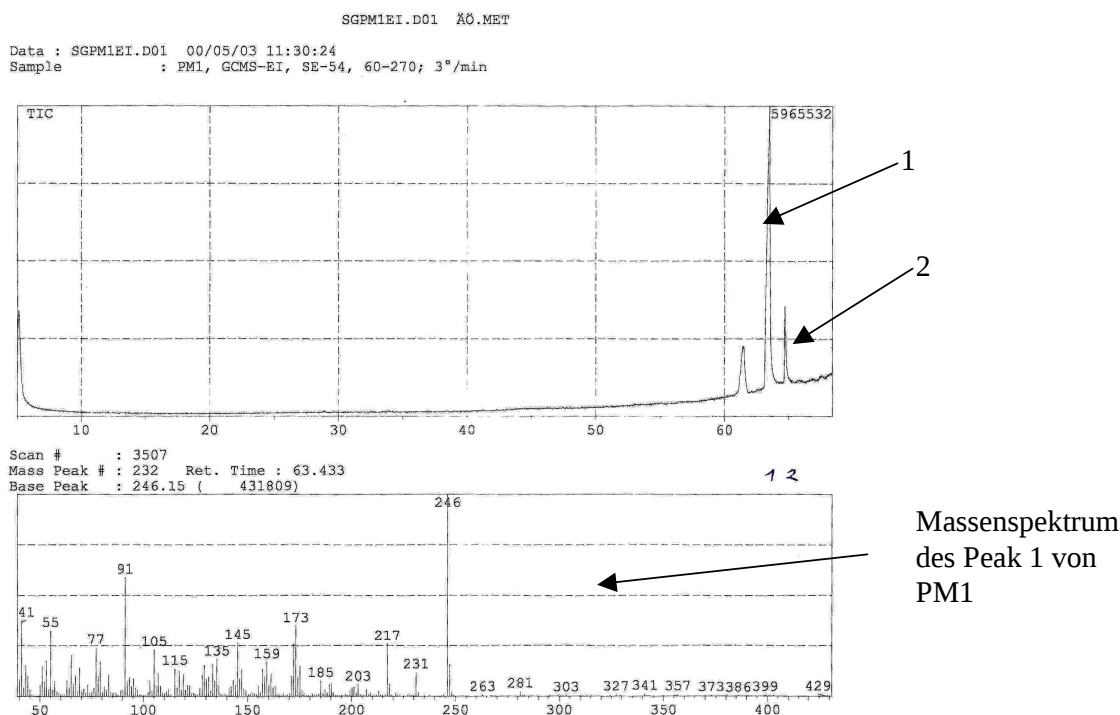
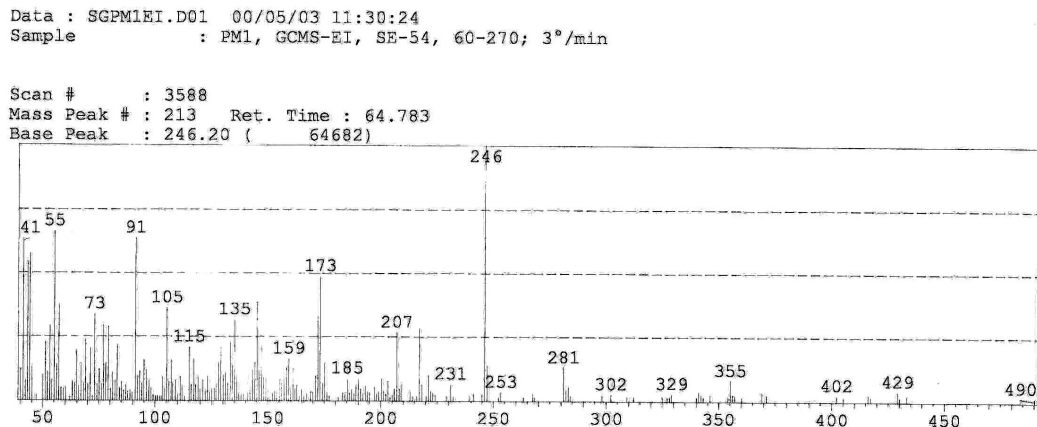


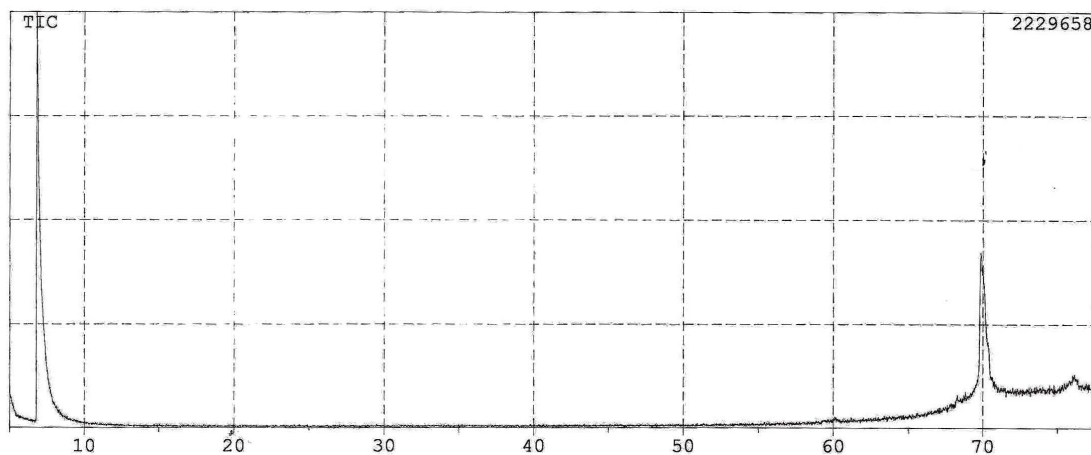
Abbildung 27: Massenspektrumspektrum des Peak 2 von PM1 (siehe Abbildung 26) (Parameter siehe Tabelle 9, S. 31)



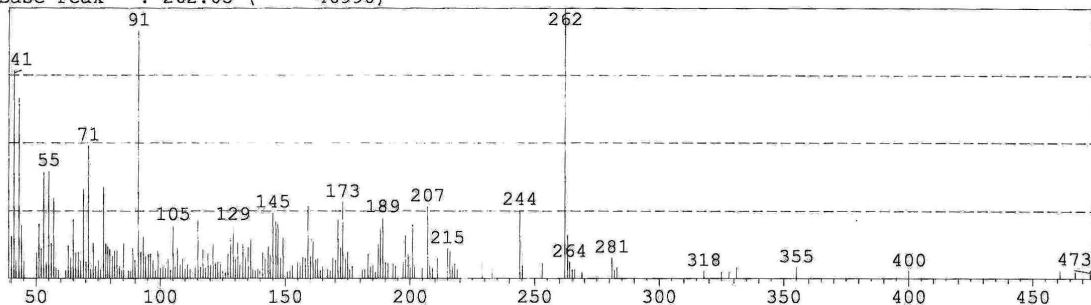
Isoliertes PM1 zeigt wie vorher PL2 (siehe Abbildung 24, S. 42) ebenfalls den Doppelpeak im Bereich von 63-65 Minuten nach GC-MS-Analyse, die Masse beträgt ebenfalls 246.

Abbildung 28: GC-MS von isoliertem GT1 mit Massenpektrum (Parameter siehe Tabelle 9, S. 31)

Data : SGGT1EI.D02 00/05/03 15:22:03
Sample : GT1, GCMS-EI, SE-54, 60-270; 3°/min



Scan # : 3895
Mass Peak # : 180 Ret. Time : 69.900
Base Peak : 262.05 (46990)



GT1 zeigt den Peak im Bereich von 70 Minuten nach GC-MS-Analyse, die molekulare Masse beträgt 262. Dies entspricht dem Verhalten von PL1 (siehe Abbildung 24, S. 42) Wie bei PL1 ist auch bei GT1 in diesem System der Doppelpeak schwach aufgelöst, aber durch eine Schulter im Peak zu erkennen.

Ein weiterer Vergleich wurde durchgeführt indem isoliertes PM1 und die Fraktion 5 einer GC- Analytik in 2 Systemen (die Parameter der Systeme zur Analyse des Ätherischen Öles siehe Tabelle 3, S. 15) unterzogen wurden. Diese Untersuchungen brachten folgendes Ergebnis (siehe Abbildungen 29-32, S. 46-47):

Abbildung 29: Gaschromatogramm PM1 im GC-System 1 (Parameter siehe Tabelle 3, S. 15)

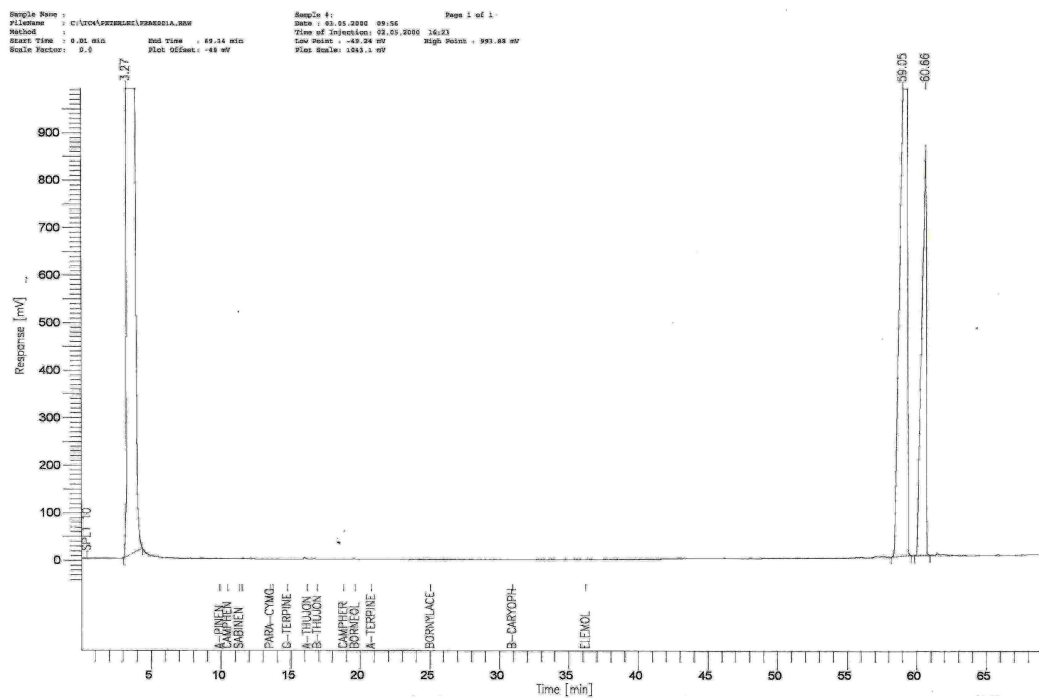


Abbildung 30: Gaschromatogramm HPLC-Fraktion 5 (siehe Abbildung 17, S. 38) im GC-System 1 (Parameter siehe Tabelle 3, S. 15)

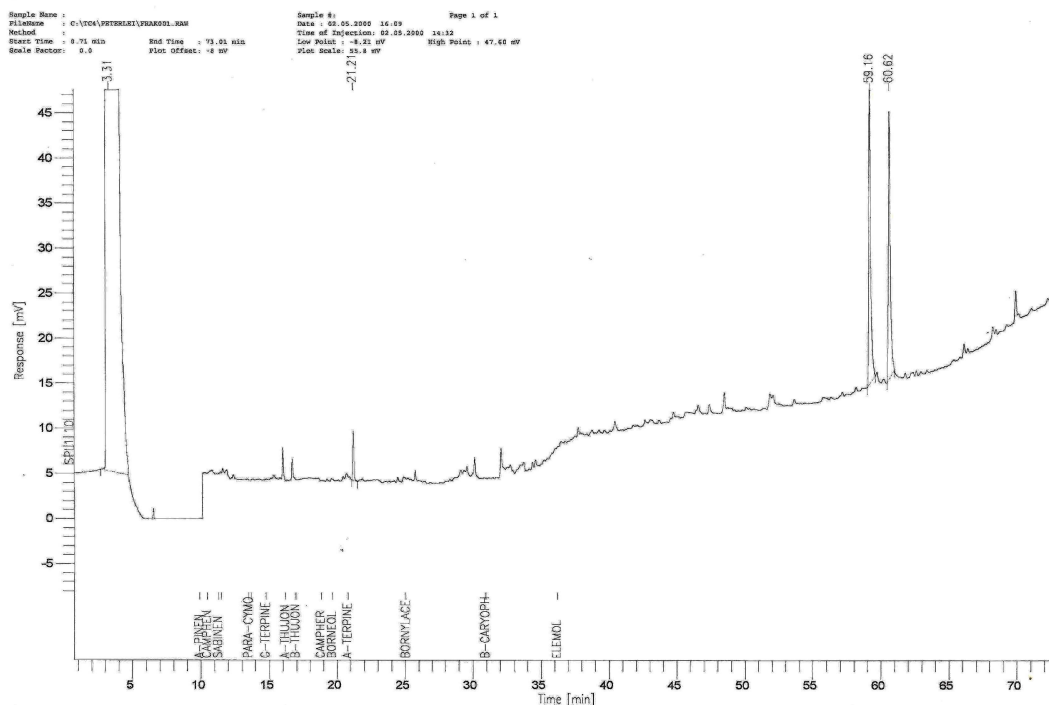


Abbildung 31: Gaschromatogramm PM1 im GC-System 2 (Parameter siehe Tabelle 3, S. 15)

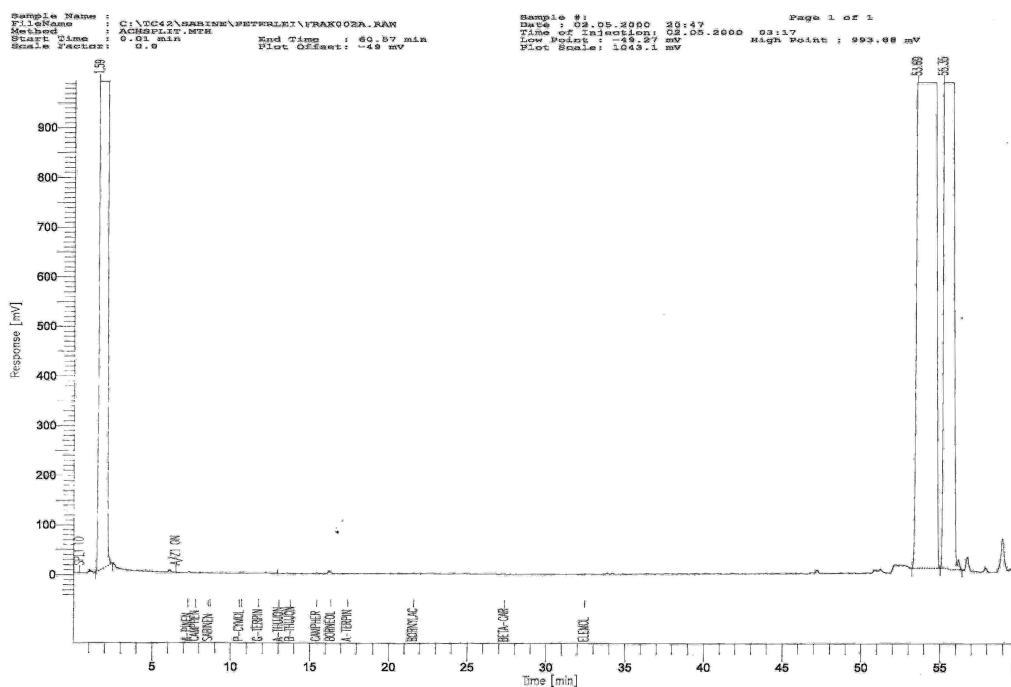
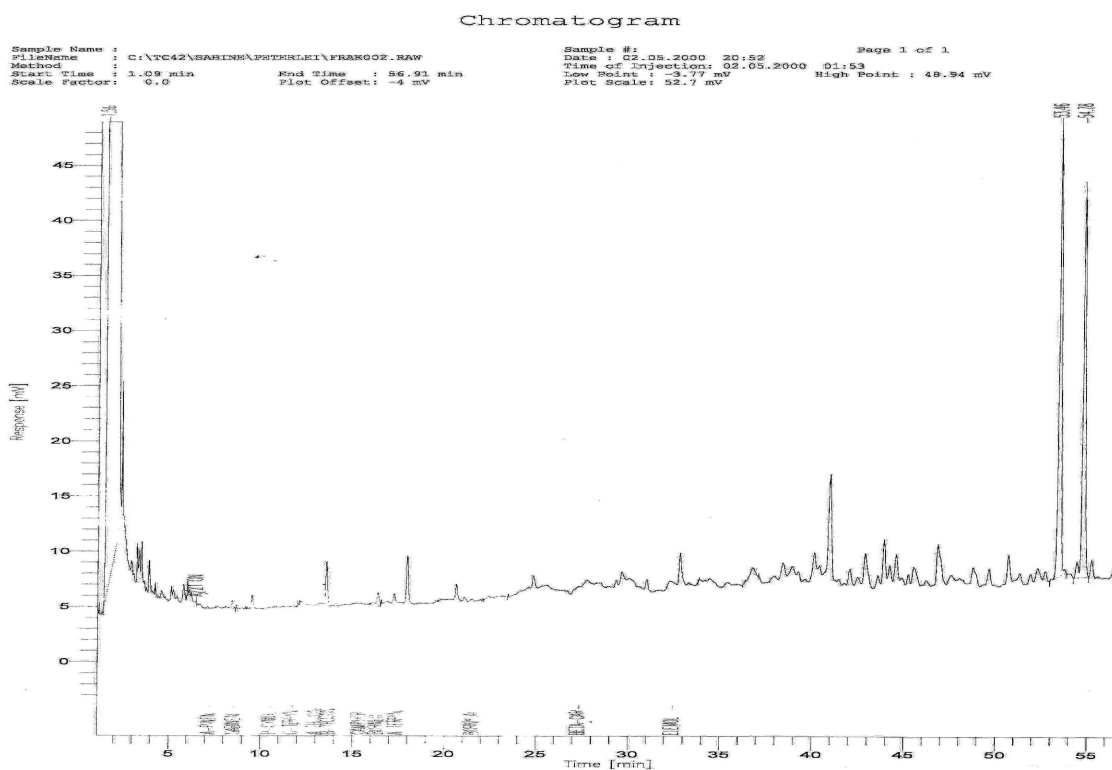


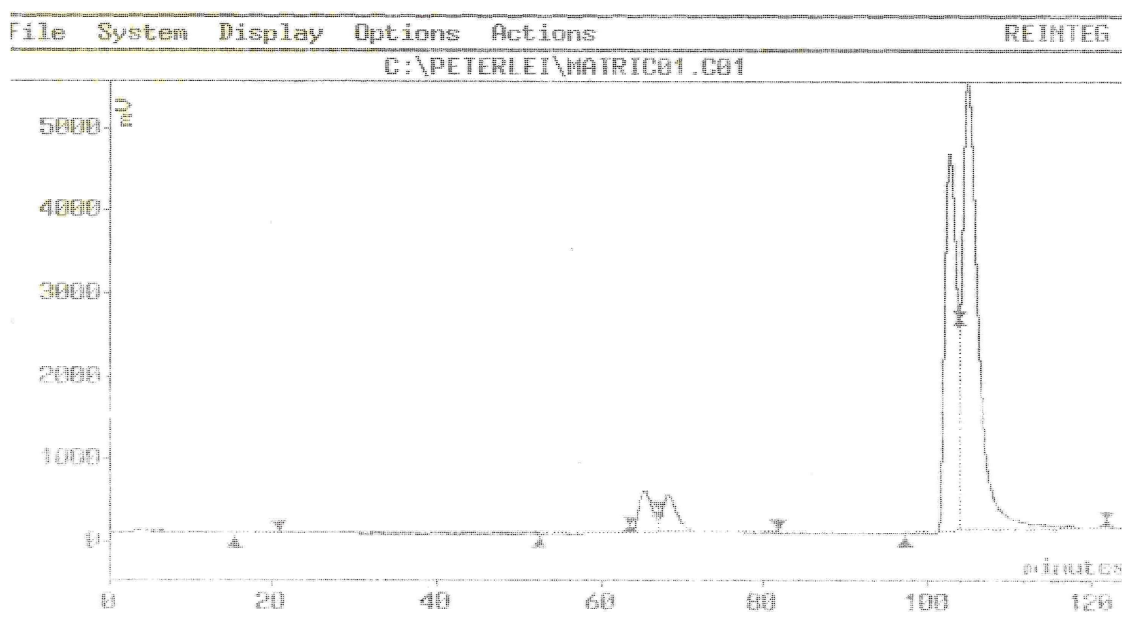
Abbildung 32: Gaschromatogramm HPLC-Fraktion 5 (siehe Abbildung 17, S. 38) im GC-System 2 (Parameter siehe Tabelle 3, S. 15)



Im ersten System liegen die Doppelpeaks der HPLC-Fraktion 5 (PL2, siehe Abbildung 17, S. 38) bei 59 bzw. 61 Minuten, die Doppelpeaks von isoliertem PM1 weisen genau die gleichen Retentionszeiten auf. Das gleiche gilt für das zweite System. Sowohl HPLC-Fraktion 5 (PL2, siehe Abbildung 17, S. 38) als auch isoliertes PM1 weisen Retentionszeiten der Doppelpeaks von 53 bzw. 55 Minuten auf.

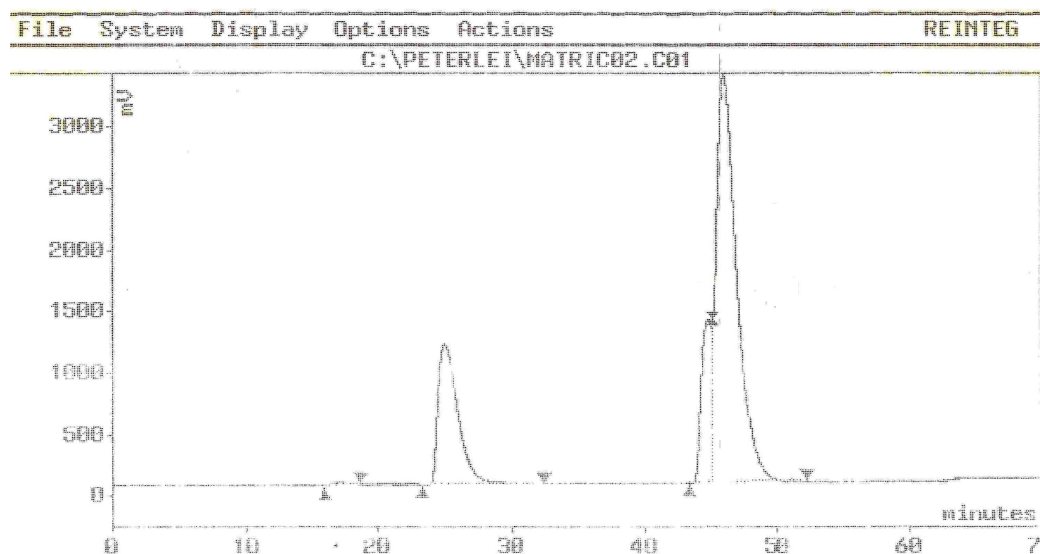
Der Extrakt aus RN960294 wurde mit isoliertem PM1 co-chromatographiert, um weitere Aufschlüsse über die Identität der fraglichen Verbindung zu erhalten. Zunächst wurden in Einzelanalysen die Flächen unter der Kurve von PL2 im Gesamtextrakt bestimmt (siehe Abbildung 33), anschließend die Peakfläche von aufgereinigtem PM1 (siehe Abbildung 34, S.49).

Abbildung 33: HPLC Analyse des Gesamtextraktes von RN960294 (10 µl Probelösung) (Parameter siehe Tabelle 8)



Die Peakfläche des ersten Peaks von PL2 beträgt 440 Einheiten, die Peakfläche des zweiten Peaks von PL2 748 Einheiten.

Abbildung 34: HPLC von 15 μ l Lösung von aufgereinigtem PM1

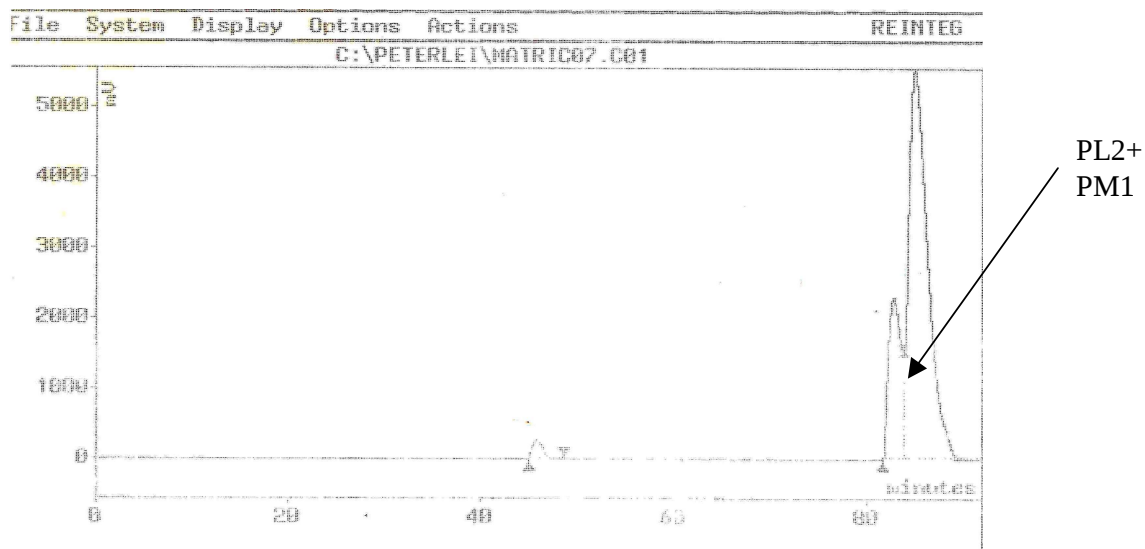


Die Peakfläche des ersten Peaks von PM1 beträgt 68 Einheiten, die Peakfläche des zweiten Peaks 348 Einheiten.

Zur Co-Chromatographie wurde der Extrakt von RN960294 auf das dreifache verdünnt, und dann 10 μ l dieses verdünnten Extraktes mit 15 μ l des reinen Extraktes von PM1 co-chromatographiert. In dem resultierendem Co-Chromatogramm (siehe Abbildung 35) müssten sich somit bei Identität der beiden Substanzen die Peakflächen ca. auf das Doppelte addieren und keine neuen Peaks entstehen.

Abbildung 35:

Co-Chromatographie RN960294 (10 μ l 3x verdünnt) und isoliertes PM1 (15 μ l)



Die Peakfläche des ersten Peaks bei der Co-Chromatographie beträgt 208 Einheiten, die Fläche des zweiten Peaks 756 Einheiten.

Die Gesamtpeakfläche müsste sich theoretisch aus folgender Rechnung ergeben:

1. Peak:

$440/3 = 147$ Einheiten aus dem Extrakt (weil 3 fach verdünnt)

+ 68 Einheiten aus dem isolierten PM1 →

Soll: 215 Einheiten

Ist: 208 Einheiten

2. Peak:

$748/3 = 249$ Einheiten aus dem Extrakt

+ 348 Einheiten aus dem isolierten PM1 →

Soll: 597 Einheiten

Ist: 756 Einheiten

Somit zeigt sich qualitativ eine Addition der Peakflächen und somit wird ein Hinweis auf die Identität der beiden Verbindungen gegeben. Der von der bisher als PL2 bezeichneten Verbindung stammende zweite Doppelpeak im Gesamtextrakt (siehe Abbildung 33, S. 48) entspricht also dem PM1. Es handelt sich dabei um Desacetoxymatricarin (siehe Kapitel c)).

c) Auswertung der Ergebnisse

Vor allem Desacetoxymatricarin (PL2 bzw. PM1) zeigt sich als besonders charakteristisch für die in der Gruppe Coll. D zusammengestellten Individuen. Die Verbindung zeigt einen charakteristischen Fleck im DC bei R_F 0,85, und ist auch im GC sehr charakteristisch. Auffällig hierbei ist die Aufspaltung in 2 Peaks mit geringfügig unterschiedlichen Retentionszeiten.

Die zunächst unbekannten Substanzen PL1 (HPLC Fraktionen 1,2,3) und PL2 (HPLC Fraktionen 4,5,6) (siehe Abbildung 17, S. 38) stimmen mit GT1 bzw. PM1 in den relevanten Parametern überein. Die R_F Werte der DC sind gleich, ebenso das Verhalten bei den

verschiedenen Detektionsmethoden. Das Verhalten bei der HPLC-Analytik ist ebenfalls vergleichbar, die Retentionszeiten in den untersuchten GC-Systemen stimmen ebenfalls überein.

PL1 und PL2 bzw. GT1 und PM1 setzen sich aus je zwei verschiedenen Substanzen zusammen, die mittels GC bzw. HPLC in zwei Peaks getrennt werden können.

Die jeweils beiden Substanzen unterscheiden sich nicht hinsichtlich ihrer Masse.

Sie beträgt für PL1 bzw. GT1 262 und für PL2 bzw. PM1 246.

Aus den erhaltenen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass es sich bei der Substanz PL1 um GT1 handelt, bei der Substanz PL2 um PM1, also um jene charakteristischen Sesquiterpene die bereits vorher aus Individuen der Gruppe Coll. D. isoliert wurden.

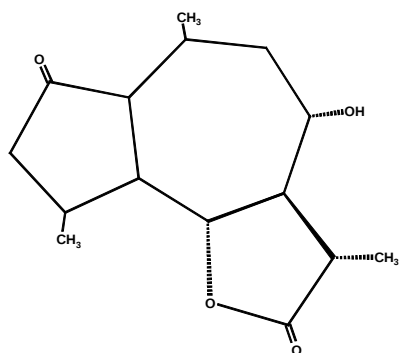
Die Co-Chromatographie bestätigte die Identität der Substanzen PL2 und PM1.

Die UV-Spektren der relevanten isolierten Fraktionen weisen ein Maximum bei 260nm auf und sind sehr ähnlich (siehe Abbildung 15, S. 37), daraus kann gefolgert werden, dass es keine Unterscheidung am Chromophor der Substanzen gibt.

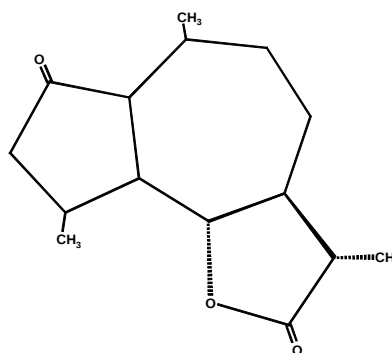
Das Verhalten in den HPLC-Systemen, das Verhalten bei den unterschiedlichen DC-Detektionen sowie die UV-Spektren legen die Vermutung nahe, dass es sich bei den Substanzen um Matricarine handelt.

Die molekulare Masse von Matricarin beträgt 304. Bei PL1/GT1 (M=262) könnte es sich demnach um Desacetylmaticarin handeln, bei PL2/PM1 (M=246) um Desacetoxymaticarin (Leucodin bzw. Achillin)

Abbildung 36: Strukturformeln von Desacetylmaticarin und Desacetoxymaticarin



Desacetylmaticarin



Desacetoxymaticarin

Die Aufspaltung von PL1/GT1 und PL2/PM1 in 2 Peaks bei HPLC und GC lässt eine Stellungsisomerie bezüglich der Methylgruppen vermuten (wie bei Leucodin und Achillin) (siehe Glasl et al. 2003).

Es sollte auch genügend Substanz isoliert werden um NMR-Analysen durchführen zu können. Das vorhandene Pflanzenmaterial war aber nicht ausreichend. Auch für aussagekräftige IR-Spektren müsste mehr Substanz isoliert werden.

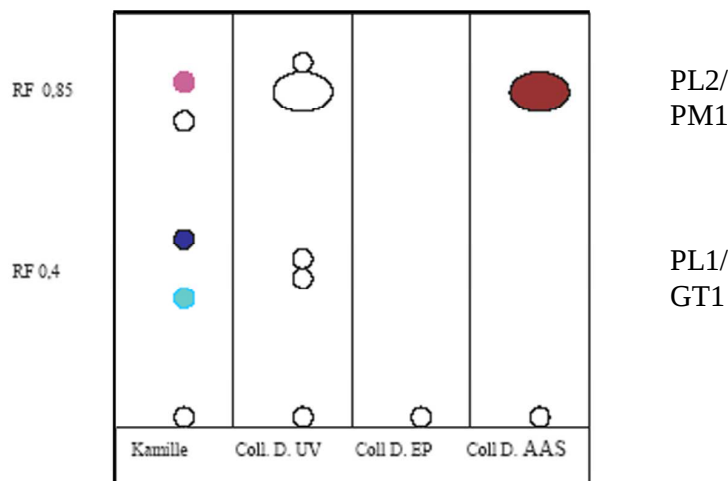
In weiterer Folge wären aber diese Analysen notwendig um endgültige Aussagen über die Struktur von PM1/PL2 und GT1/PL1 treffen zu können, insbesondere da ja je zwei unterschiedliche Substanzen mit in HPLC und GC divergierendem Verhalten (Doppelpeaks!) vorliegen.

4.1.1.2 Analyseergebnisse der Gruppe „Coll. D“

Dünnschichtchromatogramme der Gruppe 1:

Nach den speziellen Untersuchungen an der Gruppe Coll. D soll jetzt auch für diese Gruppe, wie in weiterer Folge bei allen anderen Gruppen (Gruppeneinteilung siehe Tabelle 10, S. 32), das dünnschichtchromatographische Verhalten, die IR-Spektren und die Zusammensetzung des Ätherischen Öles dargestellt und interpretiert werden.

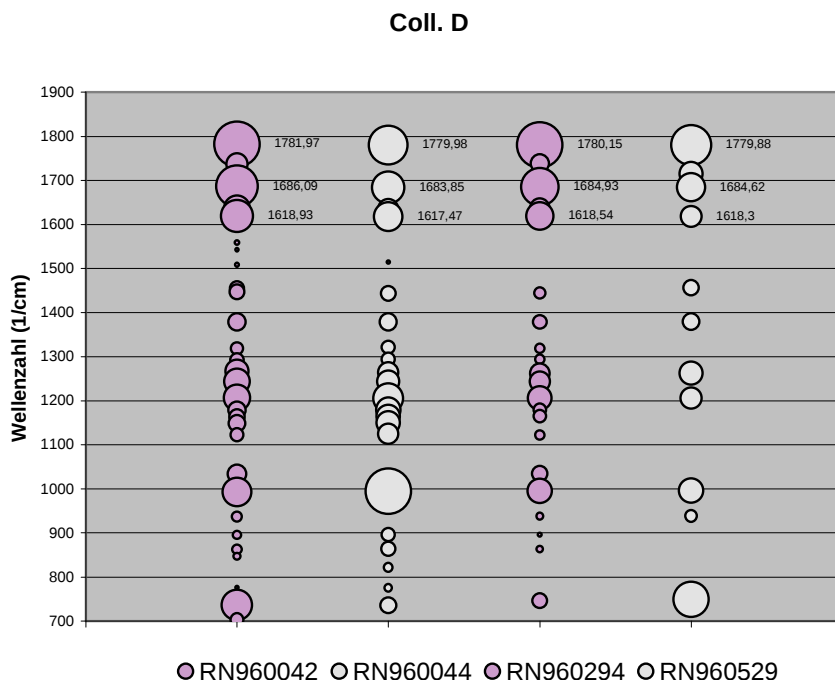
Abbildung 37: Schematisches DC der Gruppe Coll. D



Die oben dargestellte DC gibt schematisch die wichtigen Flecken für die Einteilung wider. Die Gruppe besteht aus 4 Individuen und ist anhand der DC-Muster relativ homogen. Charakteristisch für diese Gruppe ist der Substanzfleck bei R_f 0,85 . Dieser Fleck ist UV-löschend, zeigt mit EP-Reagens keine Färbung und färbt mit AAS-Reagens braun. Diese Substanz PL2 konnte mit großer Wahrscheinlichkeit als Desacetoxymatricarin identifiziert werden.. Weiters sind die UV-löschenden Substanzflecken bei R_f 0,4 auffallend (PL 1). Hier dürfte es sich um Desacetylmatricarin handeln. (siehe Kapitel 4.1.1.1 S. 32ff).

IR-Spektren der Gruppe 1:

Abbildung 38: IR-Spektren der Gruppe Coll. D



Als Darstellungsweise wurden Blasendiagramme gewählt. Die Größe der Blasen zeigt die Peakgröße (Stärke der Absorption), die Lage des Blasenmittelpunktes die absorbierte Wellenzahl. (siehe Kapitel 3.5, S.20ff)

Die IR-Spektren dieser Gruppe, die das Sesquiterpenmuster repräsentieren sind gleichermaßen homogen. Die charakteristischen Absorptionsbanden bei $1780 - 1782 \text{ cm}^{-1}$ (für die Laktonbande), bei $1683-1686 \text{ cm}^{-1}$ und bei $1617 \text{ bis } 1619 \text{ cm}^{-1}$ weisen auf das Vorliegen von Matricarinderivaten hin. RN960042 und RN960294 zeigen die Esterbande bei $1736 \text{ bis } 1738 \text{ cm}^{-1}$, ein Zeichen für das Vorliegen von Veresterungen mit Essigsäure, wie sie das Matricarin besitzt. RN960529 weist die Esterbande bei 1715 cm^{-1} auf, was eher auf Veresterung mit Angelikasäure hinweist.

Zusammensetzung des Ätherischen Öles der Gruppe 1:

Abbildung 39: Ätherisches Öl Coll. D - Einzelmerkmale

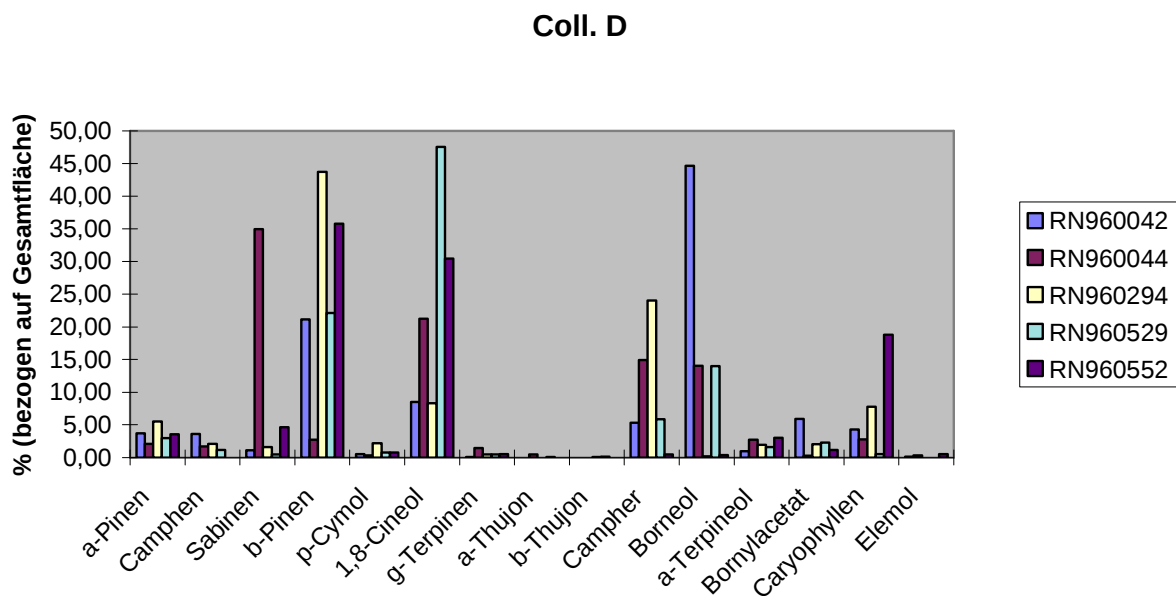
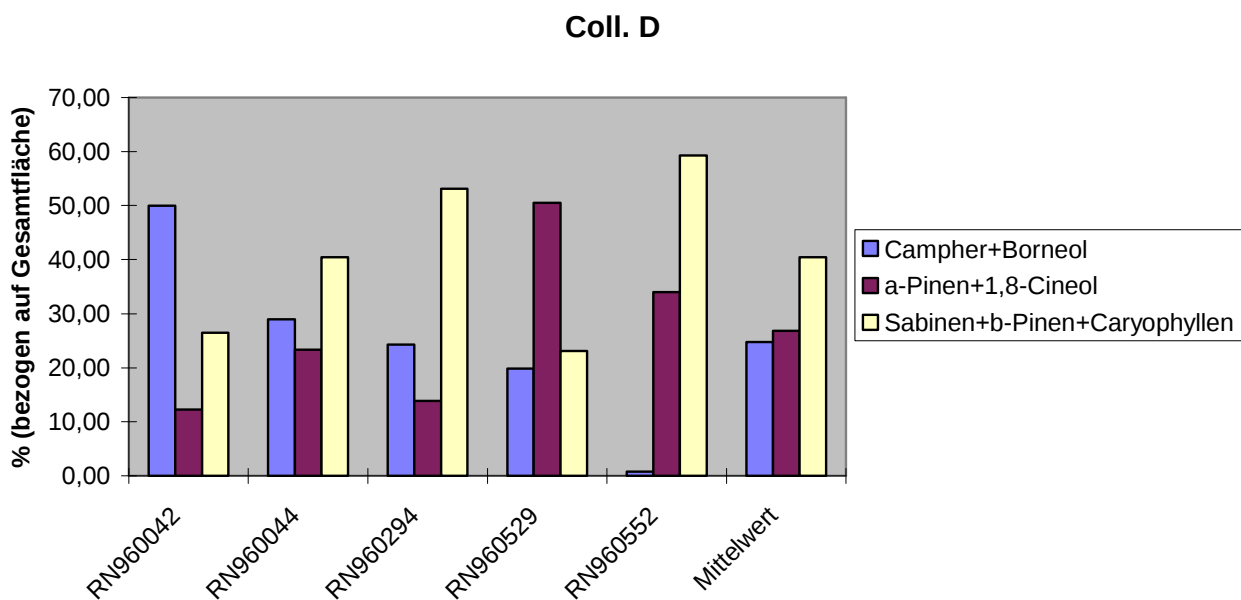


Abbildung 40: Ätherisches Öl Coll. D - Summenmerkmale



Bezüglich der Zusammensetzung des Ätherischen Öls ist die Gruppe inhomogen. Gemeinsam sind allen Vertretern der Gruppe die hohen Werte an 1,8-Cineol, zwischen 8 und 48%. Camphen, p-Cymol, Thujon, α -Terpineol, Bornylacetat und Elemol sind bei allen Individuen dieser Gruppe in nur ganz geringen Mengen vorhanden. Dominierend sind β -Pinen, 1,8-Cineol und Borneol. Interessant ist auch der hohe Sabinengehalt beim Individuum RN960044 mit fast 35%.

Bei den Summenmerkmalen dominiert bei 3 Individuen dieser Gruppe (RN960044, RN960294 und RN960552) die Summe aus Sabinen+ β -Pinen+Caryophyllen mit Werten zwischen 40 und 59%. Beim Individuum RN960042 treten eher Campher und Borneol mit einem Prozentgehalt von 50% in den Vordergrund. Individuum RN960529 wird von α -Pinen und 1,8-Cineol mit einem Prozentanteil von fast 51% dominiert. Interessant ist beim Individuum RN960552 die fast vollständige Abwesenheit von Campher und Borneol.

Interpretation der Gruppe 1:

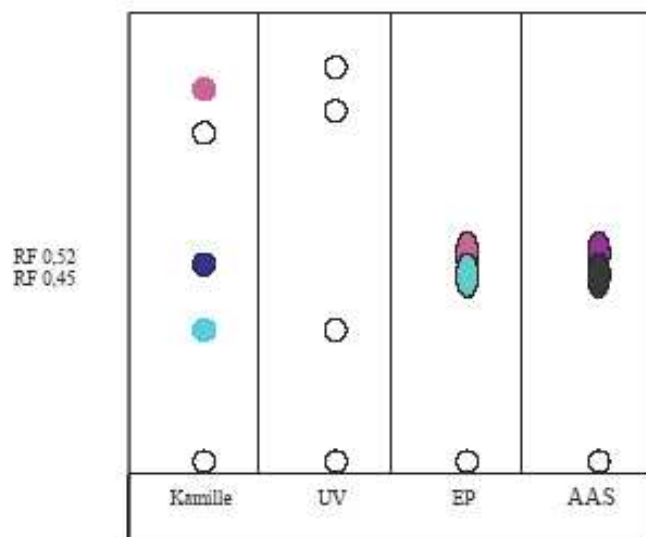
Die Individuen der ersten Gruppen weisen hinsichtlich ihrer chemischen Zusammensetzung eine große Ähnlichkeit mit den in Dürnstein und Ungarn gefundenen Individuen auf, die als „Coll. D“ bezeichnet wurden. Insofern ist die Bezeichnung der Gruppe berechtigt. Bezieht man nun auch die morphologischen Kriterien mit ein, nach denen Rauchensteiner und Nejati die Pflanzen zugeordnet haben, sieht man, dass es sich um Individuen handelt, die in die Nähe von *A. collina* zu stellen sind. Bei RN960294 und RN960552 handelt es sich um Hybriden zwischen *A. collina* und *A. millefolium* (siehe Tabelle 2, S. 13). *A. collina* ist proazulenführend, insofern ist anzunehmen, dass es sich um Hybriden handelt, die morphologisch an *A. collina* erinnern, in der chemischen Zusammensetzung jedoch der proazulenfreien *A. millefolium* ähneln. Mitteleuropäische Vertreter von *A. collina* weisen im allgemeinen einen hohen Gehalt von Summenmerkmal Sabinen+ β -Pinen+Caryophyllen auf. Bei den hier untersuchten Individuen ist dies auch der Fall, jedoch erreichen hier auch die anderen Summenmerkmale teilweise sehr hohe Werte.

4.1.2 Gruppe 2 „Epblau“

Zu dieser Gruppe wurden 3 Individuen zusammengefasst. Die drei Individuen weisen ein ähnliches Sesquiterpenmuster in der DC auf, und sind proazulenfrei (siehe Tabelle 10, S. 32)

Dünnschichtchromatogramme der Gruppe 2:

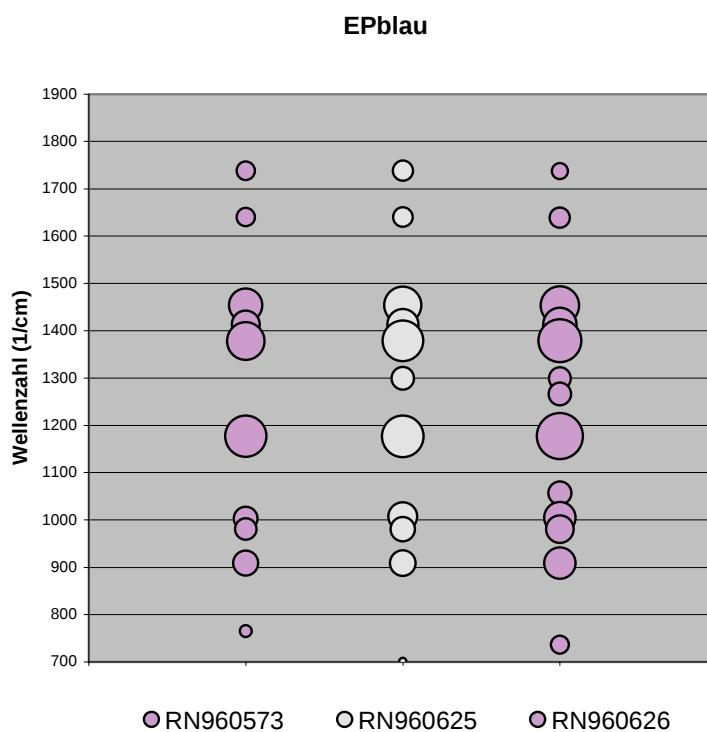
Abbildung 41: Schematisches DC der Gruppe Epblau



Die 3 Individuen der Gruppe „Epblau“ zeichnen sich durch zwei charakteristische Flecken im DC aus und sind recht einheitlich. Die beiden Flecken liegen in etwa auf der Höhe des Matricins. Der obere dieser Flecken (R_F 0,52) wird mit EP-Reagens rosa-braun gefärbt, der untere (R_F 0,45) färbt hellblau.

IR-Spektren der Gruppe 2:

Abbildung 42: IR-Spektren der Gruppe Epblau



Die IR-Analyse ergab entsprechend der DC ebenfalls ein sehr einheitliches Bild der Gruppe. In der Gruppe fällt auf, dass es keine dominierende Laktonebande gibt. Dafür sind die Banden im Bereich der Alkohole sehr stark ausgeprägt. Dies deutet auf das Vorhandensein von Longipinendervaten mit Alkoholresten hin, z.B. könnte Arglanin für die Ausbildung dieser Banden verantwortlich sein.

Zusammensetzung des Ätherischen Öles der Gruppe 2:

Abbildung 43: Ätherisches Öl Epblau - Einzelmerkmale

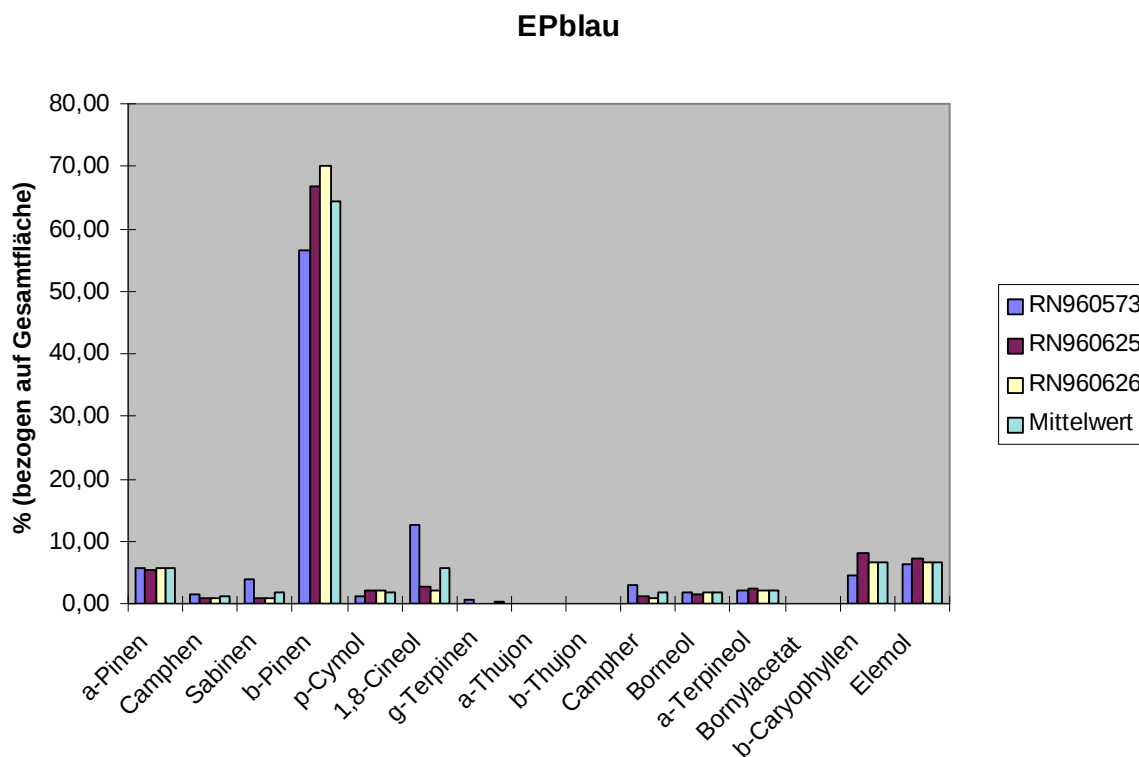
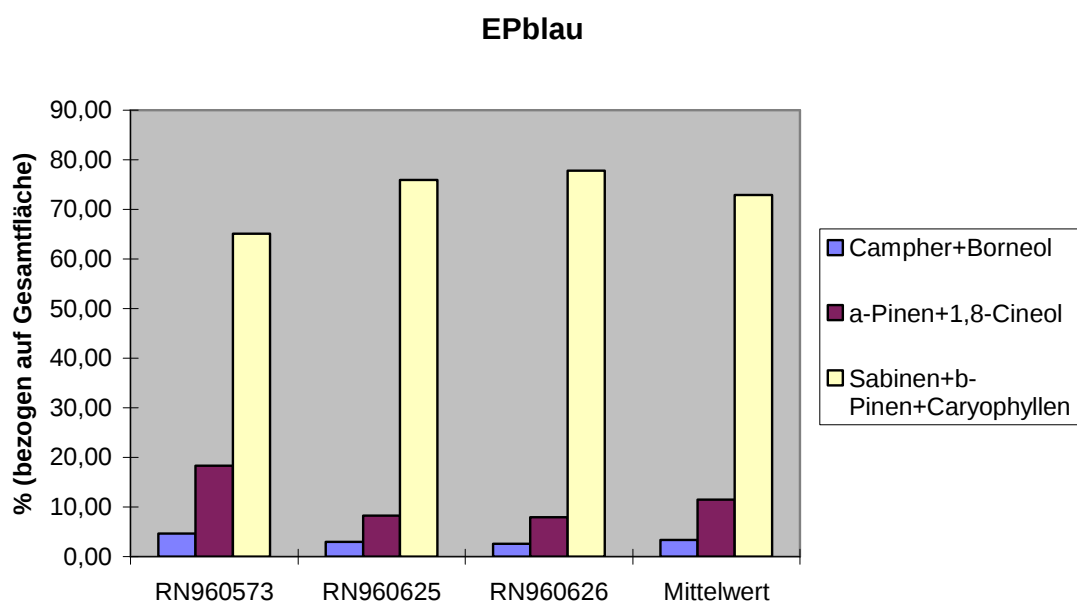


Abbildung 44: Ätherisches Öl Epblau - Summenmerkmale



Ebenfalls zeigen sich die Individuen in der Zusammensetzung des Ätherischen Öls sehr einheitlich, sowohl in der Analyse der 15 wesentlichen Einzelsubstanzen als auch bei Betrachtung der Summenmerkmale. Auffallend ist der hohe Gehalt an β -Pinen (56-70%). Campher und Borneol kommen nur in sehr geringen Prozentanteilen vor. So dominiert auch das Summenmerkmal Sabinen+ β -Pinen+Caryophyllen mit einem mittleren Anteil von 73%.

Interpretation der Gruppe 2:

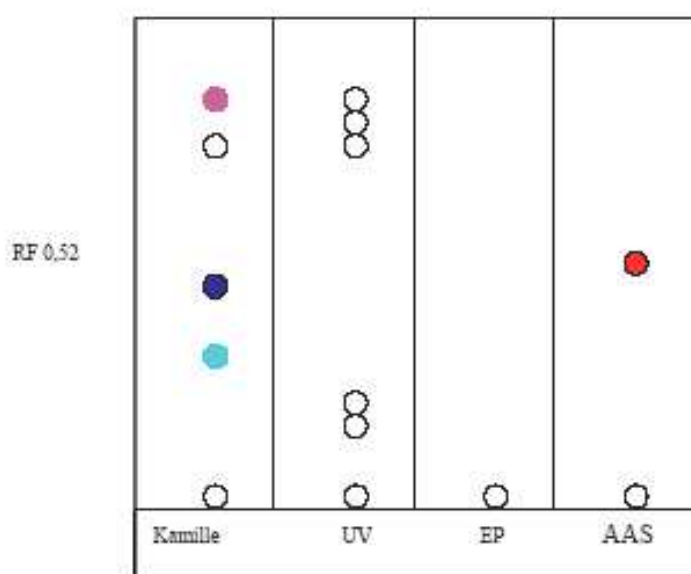
Obwohl die chemische Zusammensetzung in dieser Gruppe so homogen ist, müssen die Pflanzen morphologisch unterschiedlichen Gruppen zugeordnet werden. Es dürfte sich auch hier um Hybriden in der Nähe von *A. collina* handeln. RN960573 wird von Rauchensteiner/Nejati in die Nähe von *A. crithmifolia* gestellt, RN960625 und RN960626 wurden als Hybride von *A. millefolium* und *A. collina* bestimmt (siehe Tabelle 2, S. 13). Weder *A. millefolium* s.str. noch *A. collina* enthalten Arginin, insofern kann diese morphologische Einteilung durch die chemischen Untersuchungsmethoden nicht bestätigt werden. Es handelt sich also auch hier um Hybriden, die morphologisch mit *A. collina* in Zusammenhang gebracht wurden aber keine Proazulene enthalten. Auch für diese Gruppe gilt, dass das Summenmerkmal von Sabinen+ β -Pinen+Caryophyllen dominiert, was an die mitteleuropäischen Vertreter von *A. collina* erinnert.

4.1.3 Gruppe 3 „AASrot“

Zur Gruppe „AASrot“ wurden 4 Individuen zugeordnet. Kennzeichnend ist ein Substanzfleck knapp über dem Matricin aus der Kamille bei R_F 0,52. Auch diese Gruppe ist proazulenfrei (siehe Tabelle 10, S. 32)

Dünnschichtchromatogramme der Gruppe 3:

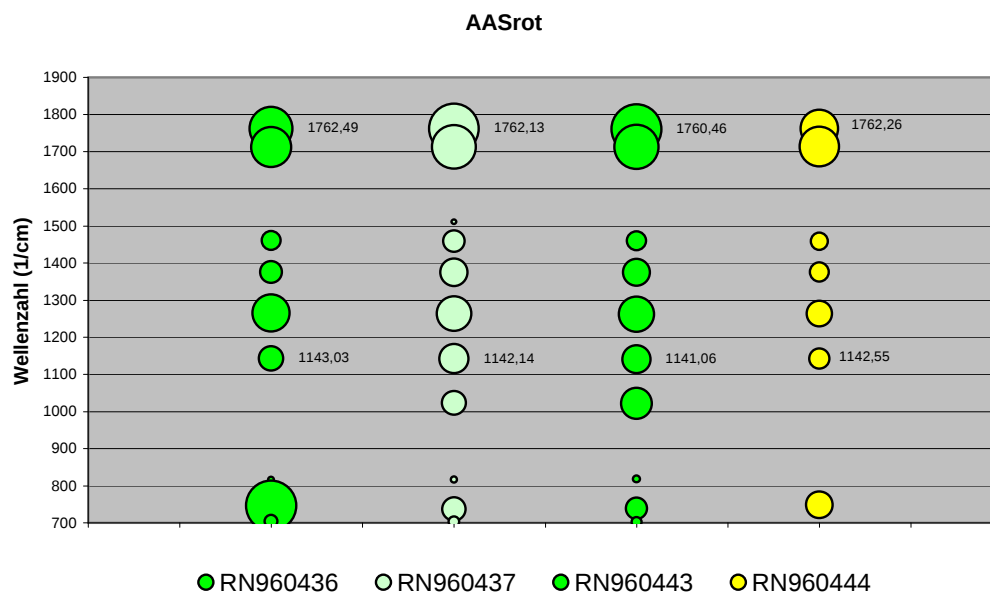
Abbildung 45: Schematische DC der Gruppe AASrot



Zu sehen ist der kennzeichnende Substanzfleck knapp über dem Matricin aus der Kamille bei R_F 0,52. Diese Substanz ist weder UV-löschend, noch färbt sie sich mit EP-Reagens, aber sie gibt einen charakteristischen roten Fleck mit Anisaldehyd-Schwefelsäure.

IR-Spektren der Gruppe 3:

Abbildung 46: IR-Spektrum der Gruppe AASrot



Die IR-Spektren der Individuen weisen sehr charakteristische Ähnlichkeiten auf. Auffallend ist das Auftreten der Laktonbanden bei 1760-1762 cm^{-1} (für die Carbonylbindung) und ca. 1142-1143 cm^{-1} (für die C-O-Bindung). Diese Absorptionsbereiche weisen sehr deutlich auf das Vorliegen von ungesättigten, α -Methylen- γ -Laktonringen aus Rupicolinen und/oder Guaianolidendoperoxiden hin.

Zusammensetzung des Ätherischen Öles der Gruppe 3:

Abbildung 47: Ätherisches Öl AASrot – Einzelmerkmale

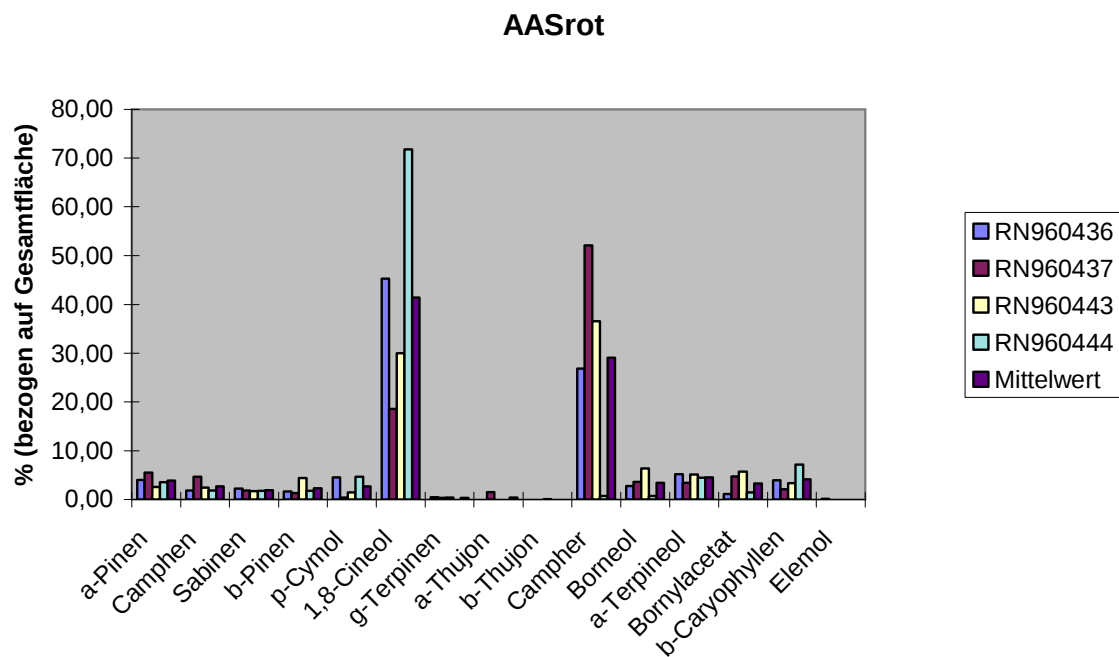
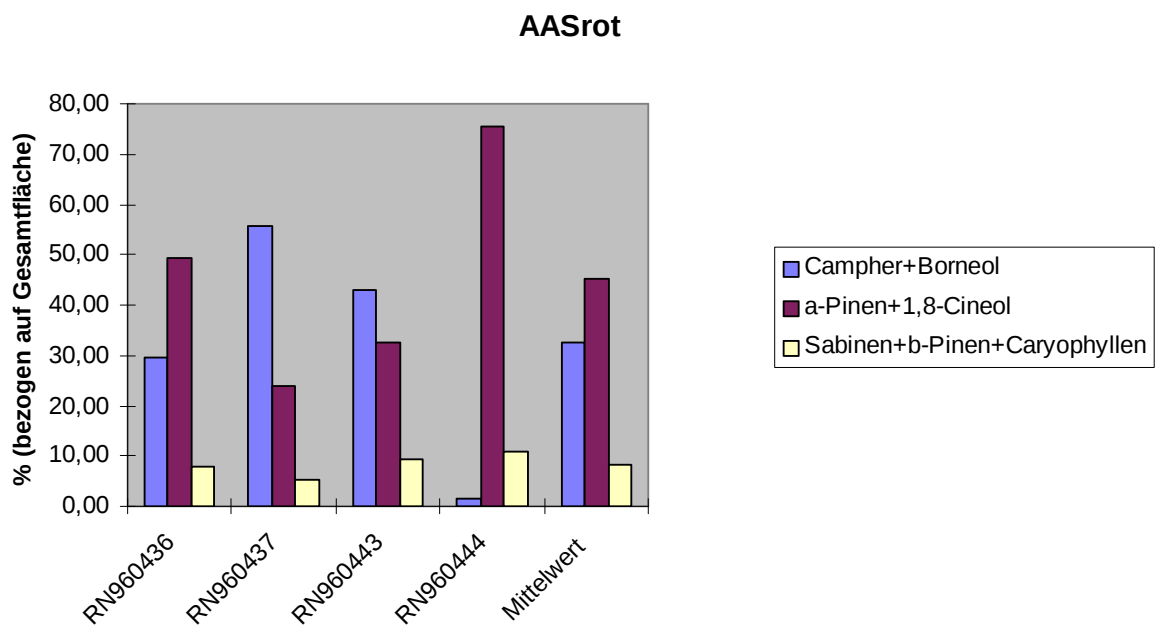


Abbildung 48: Ätherisches Öl AASrot - Summenmerkmale



Bezüglich der Einzelmerkmale weisen alle Mitglieder der Gruppe einen hohen Gehalt von 1,8-Cineol (-72%) und/oder Campher (-52%) auf. In den Summenmerkmalen äußert sich dies durch einen hohen Gehalt an Campher+Borneol und einen ebenfalls hohen, wenn auch niedrigeren Gehalt an α -Pinen+1,8-Cineol. Eine Ausnahme bildet RN960444, da hier Campher fast nicht vorhanden ist, und deshalb das Summenmerkmal Campher+Borneol nicht hervortritt.

Interpretation der Gruppe 3:

Die Individuen dieser Gruppe wurden morphologisch sehr einheitlich als *A. distans* bestimmt (siehe Tabelle 2, S. 13). Die hexaploide *A. distans* ist proazulenfrei. Außergewöhnlich im Rahmen der gesamten Untersuchung ist bei dieser Gruppe die Dominanz von Campher+Borneol, und der verschwindend geringe Anteil von Sabinen+ β -Pinen+Caryophyllen.

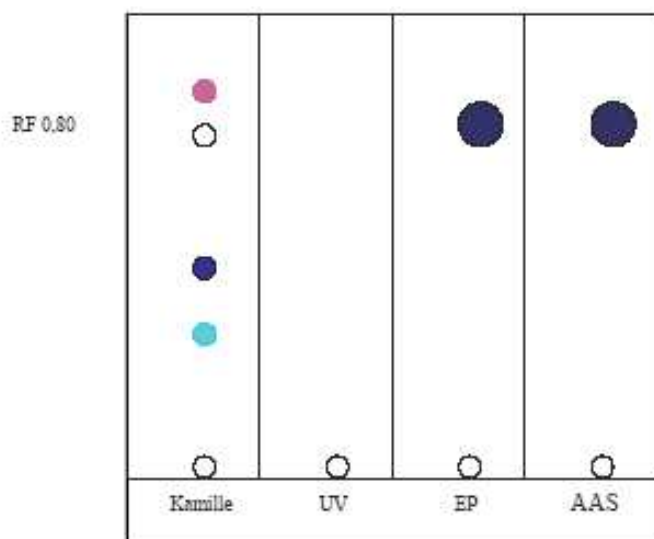
Der hohe Cineol-Gehalt und der hohe Gehalt an Campher und das daraus entstehende komplexe Muster der Inhaltsstoffe kann ebenfalls als Hinweis für die Zuordnung zu *A. distans* gesehen werden. Es dürfte sich also bei diesen Individuen tatsächlich um nahezu reine Individuen von *A. distans* handeln.

4.1.4 Gruppe 4 „Elemoldominiert“

Die Gruppe 4 besteht aus einem einzigen Individuum mit sehr hohem Elemolgehalt.

Dünnschichtchromatogramme der Gruppe 4:

Abbildung 49: Schematische DC Elemoldominiert



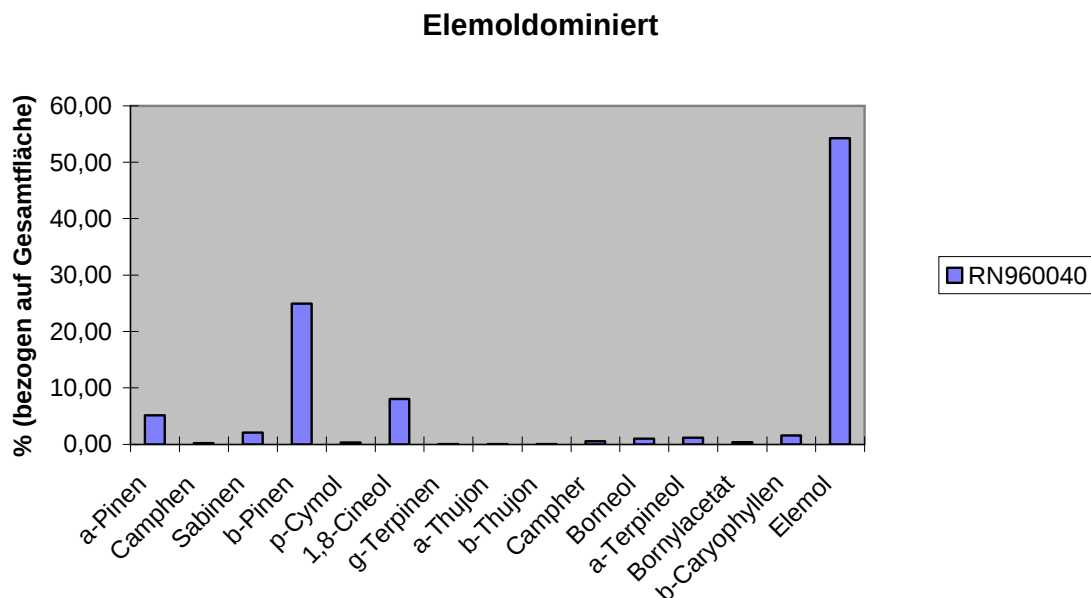
Das so einzigartige und charakteristische Dünnschichtchromatogramm einer Pflanze rechtfertigt ihre alleinige Zuordnung zu einer Gruppe. Kennzeichnend ist der Substanzfleck von Elemol bei R_F 0,80, der nicht UV-löschend ist, aber bei Behandlung mit EP und Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagens eine blaue Färbung ergibt.

IR-Spektren der Gruppe 4:

Von dieser Pflanze konnte aufgrund von Mangel an geeignetem Material kein IR-Spektrum erstellt werden.

Zusammensetzung des Ätherischen Öles der Gruppe 4:

Abbildung 50: Ätherisches Öl der Gruppe Elemoldominiert - Einzelmerkmale



Auch in der Analyse des Ätherischen Öls ist die Dominanz von Elemol als Inhaltsstoff erkennbar. Der Elemolgehalt beträgt mehr als 54%. Daneben tritt auch β -Pinen noch stark auf, mit einem Anteil von fast 25%. Nur dieser hohe Anteil erklärt auch die Dominanz von Sabinen+ β -Pinen+Caryophyllen bei den Summenmerkmalen.

Interpretation der Gruppe 4:

Die elemoldominierte Pflanze wurde morphologisch eindeutig *A. collina* zugeordnet (siehe Tabelle 2, S. 13). Das Auftreten einer *A. collina* Pflanze mit einem derartig hohen Elemolgehalt stellt eine Besonderheit dar. Bei den grundlegenden Untersuchungen zu den Inhaltsstoffen des Ätherischen Öles bei mitteleuropäischen Schafgarben wurde der Inhaltsstoff Elemol nicht erhoben. Insofern werden dadurch Fragen aufgeworfen, wieweit Elemol bei den mitteleuropäischen Vertretern ebenfalls immer wieder in so großer Menge vorkommt, oder eine Besonderheit dieser südosteuropäischen Vertreter ist.

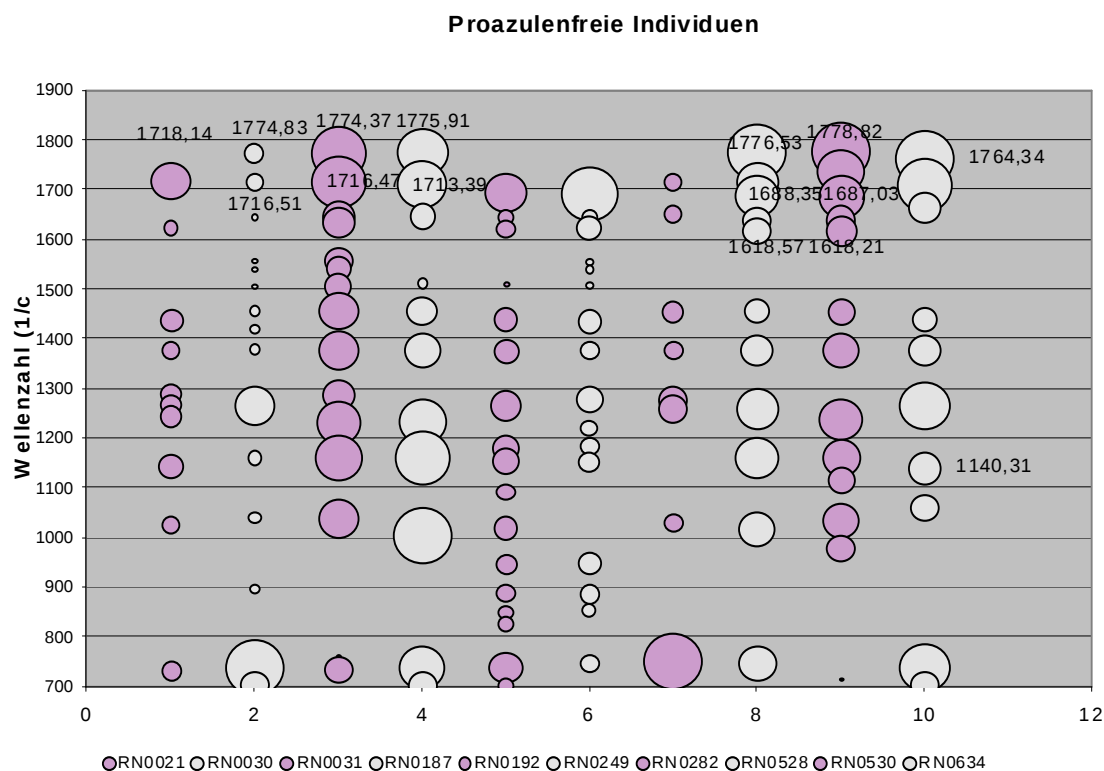
4.1.5 Gruppe 5 „Proazulenfrei“

Dünnschichtchromatogramme der Gruppe 5:

Die Gruppe 5 ist eine Sammelgruppe von 10 Individuen, deren wesentliches und einziges übereinstimmendes Merkmal die Abwesenheit von azulenogenen Verbindungen umfasst (siehe Tabelle 10, S. 32). Insofern ist eine Darstellung einer schematischen DC hier nicht sinnvoll.

IR-Spektren der Gruppe 5:

Abbildung 51: IR-Spektren der Gruppe Proazulenfrei



Dementsprechen inhomogen ist auch die Lage der Banden in den IR-Spektren und damit die Zusammensetzung der Sesquiterpene. Das Individuum RN960634 ähnelt dem IR-Spektrum nach sehr stark der Gruppe AASrot und weist charakteristische Absorptionen bei 1764 cm^{-1} und 1140 cm^{-1} auf, die auf das Vorhandensein von α -Methylen- γ -Laktonen schließen lassen.

Die Individuen RN960030, RN960031, und RN960187 zeigen Absorptionen im Bereich der Artabsinderivate bei 1774-1776 cm^{-1} . Die weiteren Banden bei ca. 1715 cm^{-1} (Esterbanden) deuten auf ein Überwiegen der Veresterungen mit Angelikasäure und somit auf das Vorliegen von nicht-proazulogenen Artabsinangelikaten (z.B. 8 α -Angeloxy-3-oxaartabsin) hin.

Die Individuen RN960530 und RN960528 hingegen weisen neben der Laktonbande bei 1776-1779 cm^{-1} eine weitere Bande bei 1687-1688 cm^{-1} auf und zeigen weiters starke Absorptionsbanden im Bereich von ca. 1618 cm^{-1} (cyclische C=C-Doppelbindungen) auf, was insgesamt der Absorption der Matricarinderivate entspricht. RN960530 besitzt die dominierende Esterbande bei 1738 cm^{-1} , was auf Veresterungen mit Essigsäure hinweist und dem Matricarin entsprechen könnte, die Esterbande von RN960528 liegt bei 1716 cm^{-1} , was auf mehrheitliche Veresterungen der Matricarinderivate mit Angelikasäure hinweist.

Die übrigen 5 Individuen dieser Gruppe zeigen keine ausgeprägte Laktonbande. Dies könnte auf das Vorhandensein von Longipinenderivaten hinweisen.

Zusammensetzung des Ätherischen Öles der Gruppe 5:

Abbildung 52: Ätherisches Öl Proazulenfrei - Einzelmerkmale

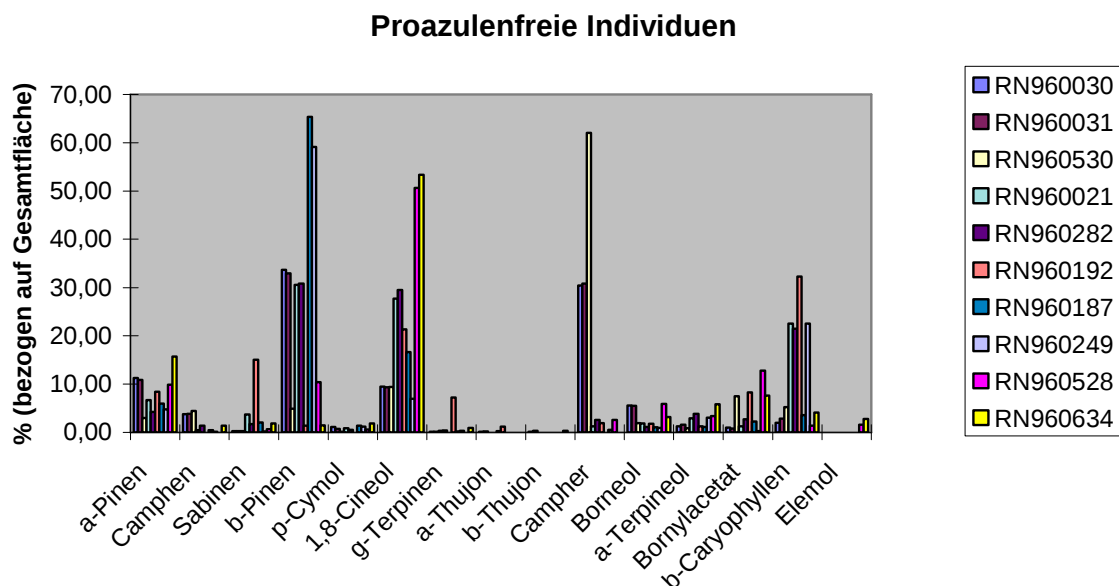
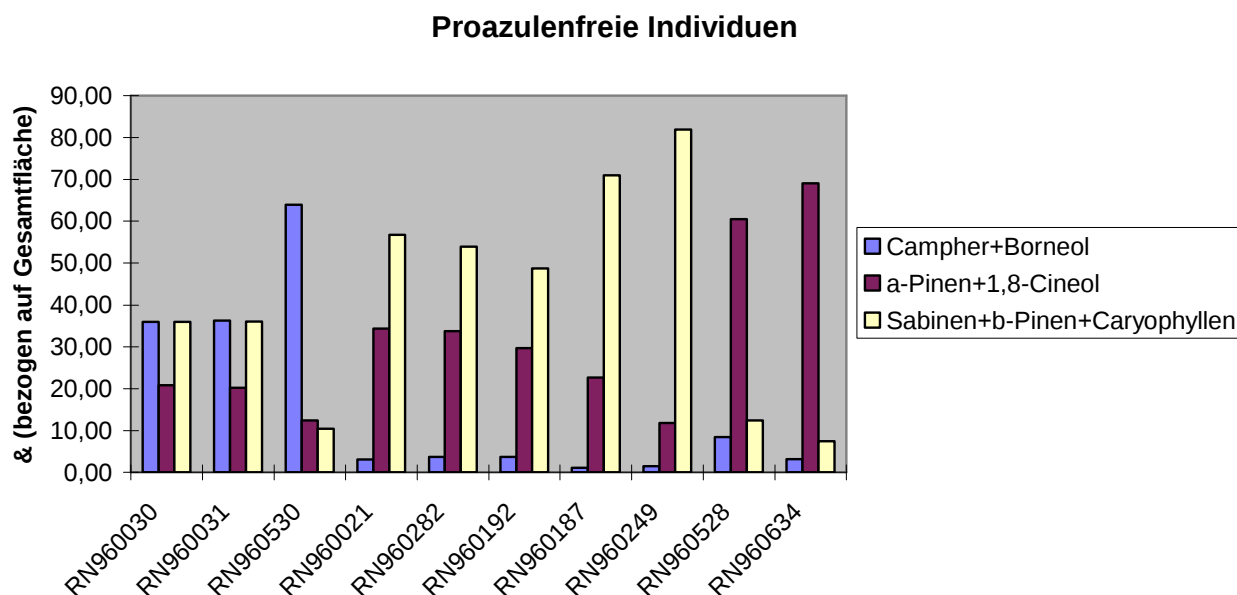


Abbildung 53: Ätherisches Öl der Gruppe Proazulenfrei - Summenmerkmale



Als Sammelgruppe ist die Zusammensetzung des Ätherischen Öls sehr inhomogen.

Gemeinsam ist, dass p-Cymol, Thujon und α -Terpineol bei den Individuen dieser Gruppe praktisch nicht auftreten. Bei Individuum RN960192 ist Sabinen (15%) und γ -Terpinen (7%) zu finden, sonst treten auch diese beiden Substanzen bei keiner Pflanze in nennenswertem Anteil auf.

Bei den Summenmerkmalen tritt bei RN960030, RN960031 und RN960530 Campher+Borneol sehr stark auf, mit Prozentanteilen von 36 bis 64%. Bei den restlichen Individuen tritt Campher+Borneol sehr stark in den Hintergrund. Die Individuen RN960021, RN960282, RN960192, RN960187 und RN960249 werden von Sabinen+ β -Pinen+Caryophyllen dominiert. Diese Dominanz ist eher auf das Vorliegen von β -Pinen und Caryophyllen zurückzuführen, Sabinen tritt nur beim Individuum RN960192 mit einem Anteil von 15% in nennenswertem Anteil auf. Die Individuen RN960444, RN960528 und RN960634 werden von α -Pinen+1,8-Cineol dominiert. Die Anteile dieses Summenmerkmals liegen bei diesen Individuen zwischen 60 und 75%. Es ist vor allem das 1,8-Cineol welches das Hervortreten dieses Summenmerkmals ausmacht.

Interpretation der Gruppe 5:

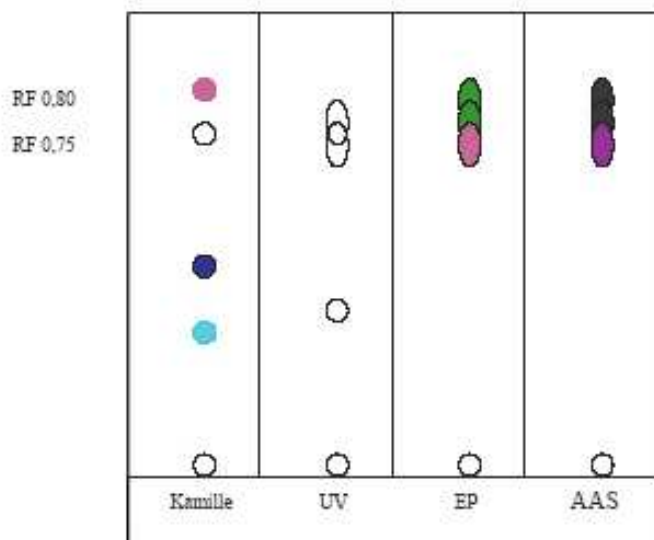
Morphologisch wurden alle bis auf ein Individuum dieser Gruppe zu *A. collina* gestellt. RN960634 wurde eher *A. distans* zugeordnet (siehe Tabelle 2, S. 13). Das IR-Spektrum des Individuums RN960634 bestätigt diese Einteilung, auch hier sind die charakteristischen Banden für die α -Methylen- γ -Laktone zu erkennen. Hinsichtlich des Musters des Ätherischen Öles erinnert auch der niedrige Anteil des Summenmerkmals Sabinen+ β -Pinen+Caryophyllen eher an die Gruppe AASrot die zu *A. distans* gestellt wurde.

4.1.6 Gruppe 6 „EProsa“

Die Gruppe 6 ist proazulenhältig und besteht aus 2 Individuen mit ähnlichem DC (siehe Tabelle 10, S. 32)

Dünnschichtchromatogramme der Gruppe 6:

Abbildung 54: Schematische DC der Gruppe EProsa

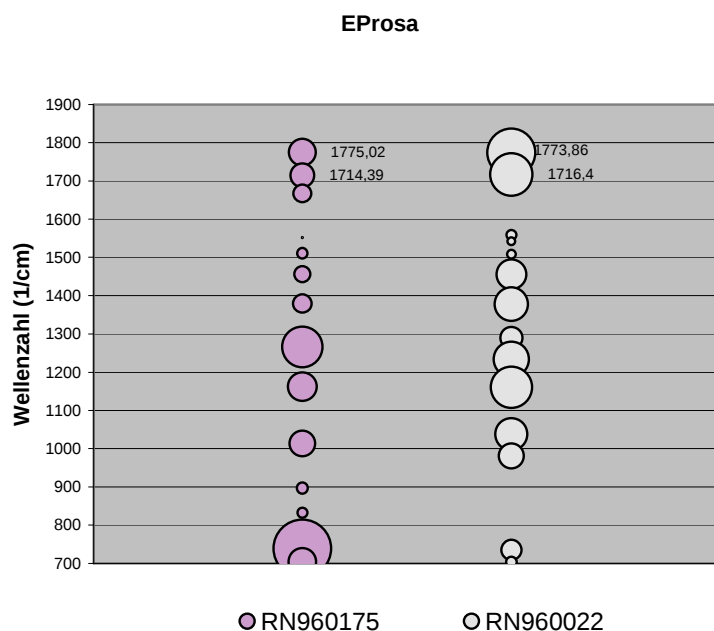


Bei R_F 0,8 sind 2 Flecken zu sehen, die sich bei EP-Detektion blau färben und beim Erwärmen im Wasserbad eindeutig als Proazulenfleck auszumachen sind. Es handelt sich hierbei um Artabsinderivate. Knapp darunter bei R_F 0,75 ist ein Substanzfleck zu erkennen, der sich bei

EP-Detektion rosa färbt. Diese rosa Färbung ist charakteristisch für die 3-Oxaderivate der obigen Verbindungen.

IR-Spektren der Gruppe 6:

Abbildung 55: IR-Spektrum EProsa



Die Laktonbande liegt mit 1774 und 1775 cm^{-1} im Bereich der Artabsine. Die Esterbande bei 1714 und 1716 cm^{-1} weist auf das Vorliegen von Artabsinangelikaten hin.

Zusammensetzung des Ätherischen Öles der Gruppe 6:

Abbildung 56: Ätherisches Öl EProsa - Einzelmerkmale

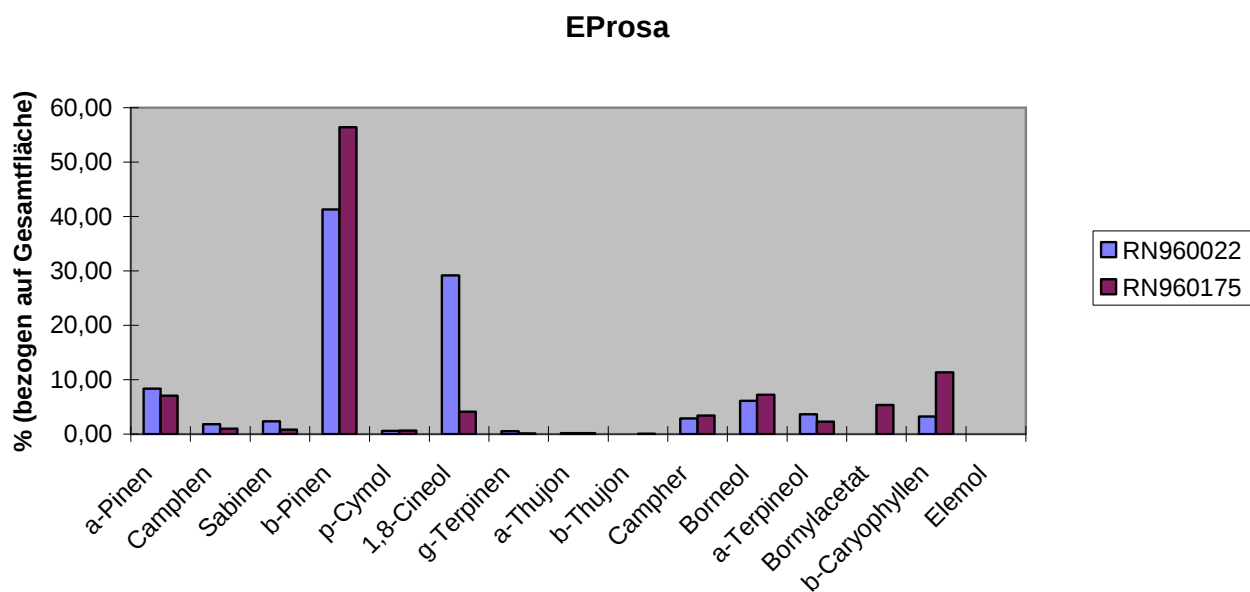
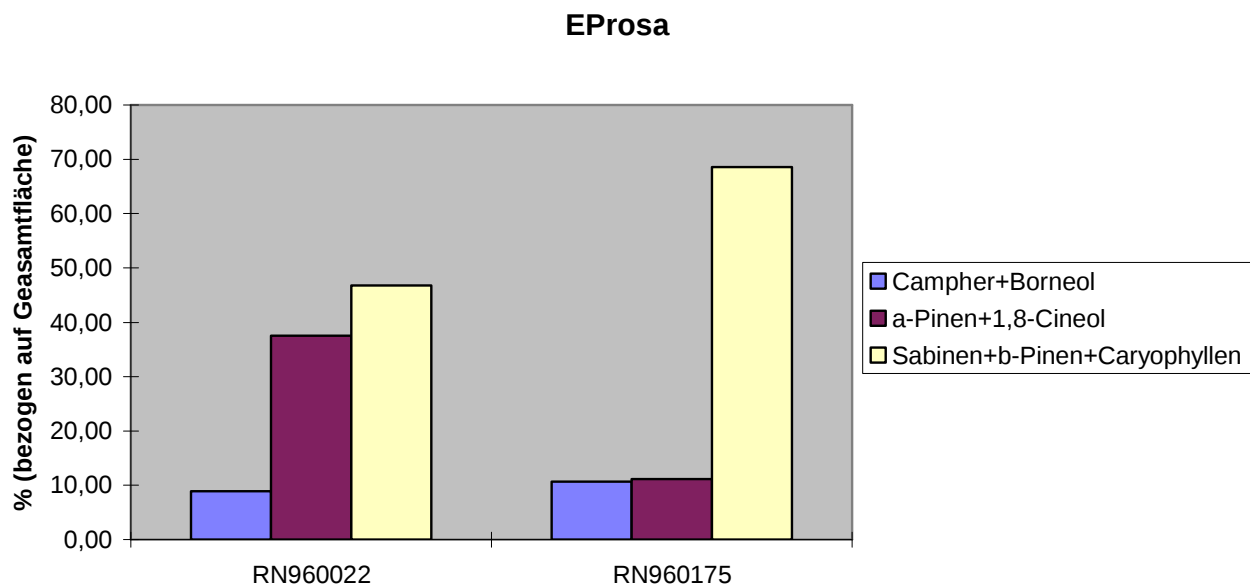


Abbildung 57: Ätherisches Öl EProsa - Summenmerkmale



Die zwei Individuen dieser Gruppe zeigen auch hinsichtlich des Ätherischen Öles Übereinstimmungen. β -Pinen ist mit 41% (RN960022) bzw. 56% (RN960175) bei beiden Pflanzen dominierend. Bei RN960022 tritt mit 29% auch noch ein sehr hoher 1,8-Cineol-Anteil auf. Dementsprechend zeigen sich auch die Summenmerkmale. Individuum RN960175 wird von Sabinen+ β -Pinen+Caryophyllen dominiert (69%), beim Individuum RN960175 beträgt diese Summe 47%, die Summe von α -Pinen+1,8-Cineol aufgrund des hohen 1,8-Cineol-Anteils 38%.

Interpretation der Gruppe 6:

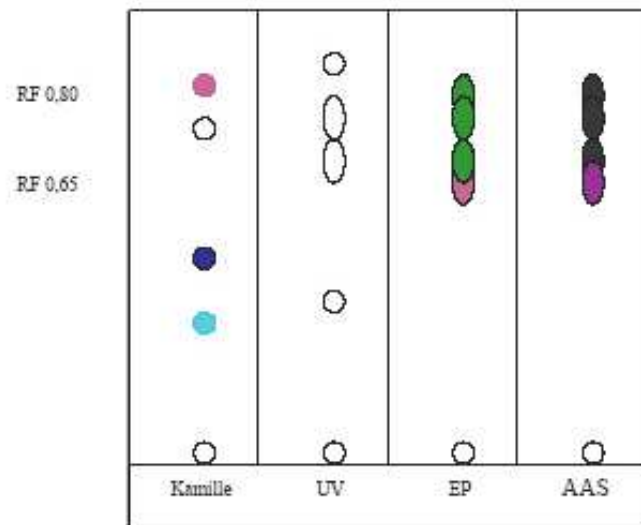
Auch diese beiden Individuen wurden morphologisch der Gruppe *A. collina* zugeordnet (siehe Tabelle 2, S. 13). Die Dominanz von Sabinen+ β -Pinen+Caryophyllen stimmt mit Erfahrungen bei mitteleuropäischen Untersuchungen überein. Bei Individuum RN960022 ist aber auch der Wert des Summenmerkmals α -Pinen+1,8-Cineol relativ hoch.

4.1.7 Gruppe 7 „Collinoid“

Die Gruppe Collinoid besteht aus 30 Individuen, deren DC der typischen DC von *A. collina* ähnelt (siehe Tabelle 10, S. 32). Die große Gruppe wurde in weiterem noch in 5 kleinere Gruppen unterteilt. Diese Unterteilung dient aber nur der Darstellung, und bezieht sich nicht auf Ähnlichkeiten.

Dünnschichtchromatogramme der Gruppe 7:

Abbildung 58: Schematische DC der Gruppe Collinoid



Die Dünnschichtchromatogramme der 30 Individuen dieser großen Gruppe ähneln dem typischen DC von *A. collina*. Charakteristisch dafür ist das Auftreten von drei Substanzflecken, die eine positive Azulenreaktion geben bei R_F 0,65 bis R_F 0,85. Es handelt sich hierbei um Arabsinderivate (Angeloxartabsin, Tigloxyartabsin und Achillicin). Weiters charakteristisch ist das Auftreten der 3-Oxaderivate der oben genannten Verbindungen, die mit EP-Reagens eine charakteristische rosa Färbung geben. Bei verschiedenen Individuen treten auch noch Matricarinderivate auf, oft bei R_F 0,4, die UV-löschend sind und keine positive Azulenreaktion ergeben.

IR-Spektren der Gruppe 7:

Abbildung 59: IR- Spektren Collinoid 1+2+3

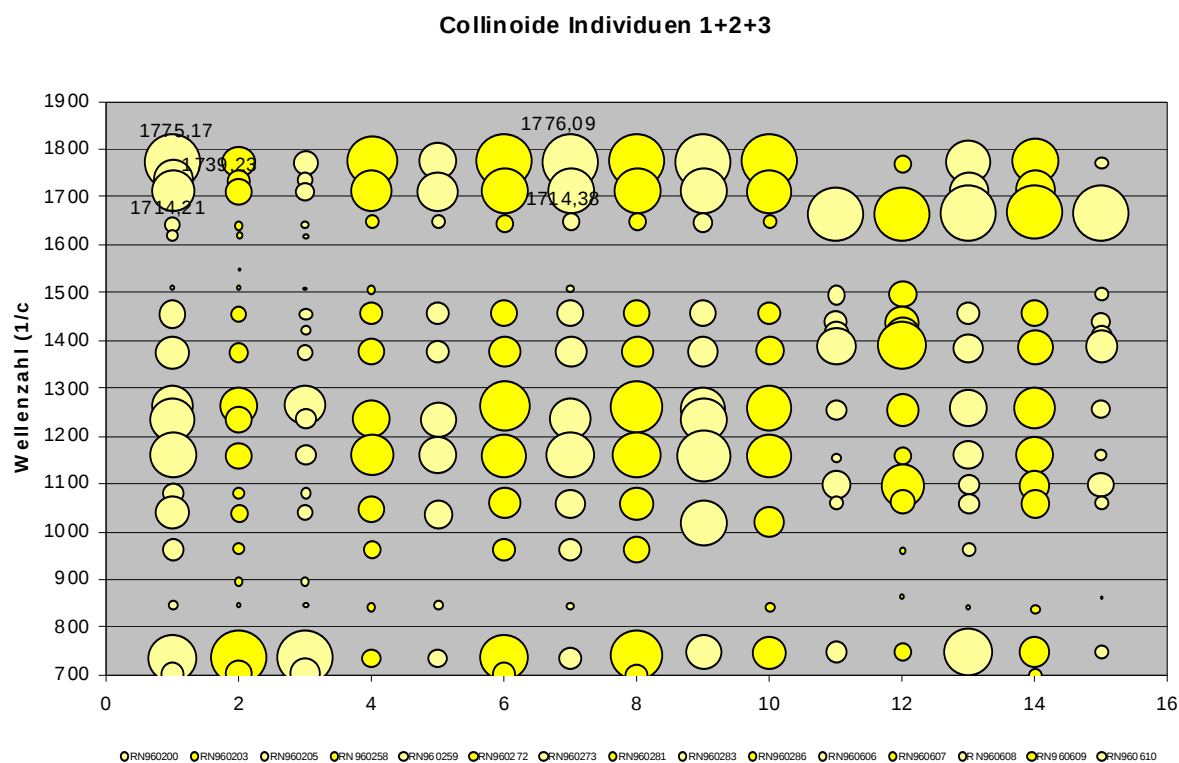
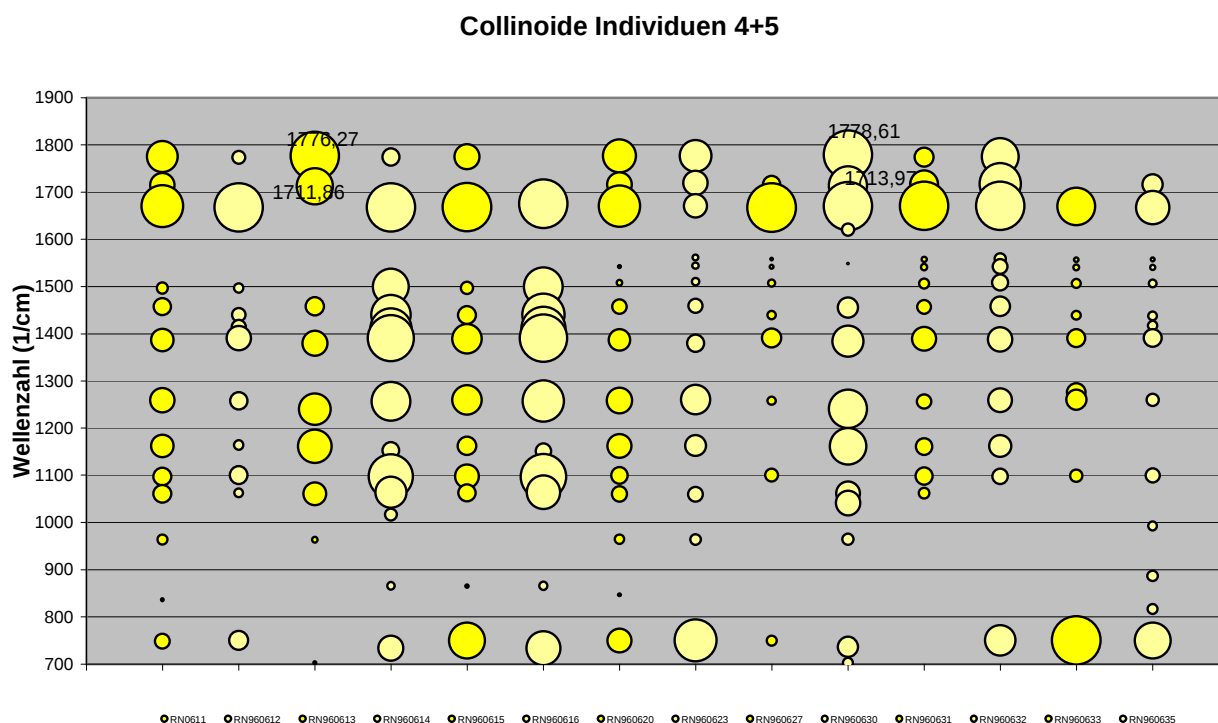


Abbildung 60: IR Spektrum Collinoid 4+5



Die Laktonbanden im Bereich von 1776 cm^{-1} bis 1779 cm^{-1} zeigen das Auftreten der Artabsinderivate. Bei den meisten Individuen dominieren die Angelikasäurederivate, die eine Esterbande von ca. $1713\text{--}1717\text{ cm}^{-1}$ hervorbringen. Beim Individuum RN960200 ist auffallend, dass auch die Esterbande bei 1739 cm^{-1} , die die Absorption durch Achillicin (Essigsäureester der Artabsine) zu sehen ist. Auffallend ist, dass die Matricarinbande bei ca. 1620 cm^{-1} nicht zu sehen ist, obwohl im Dünnschichtchromatogramm Hinweise auf das Vorliegen dieser Substanzen gegeben worden sind. Dies könnte auf die Dominanz der anderen Absorptionen und die Methode der relativen Berechnungen und Darstellung zurückzuführen sein. Bei genauerer Betrachtung der Spektren zeigt sich, dass bei 1620 cm^{-1} sehr wohl eine Absorption zu erkennen ist, die aber aufgrund der Darstellung im Blasendiagramm verloren geht. Ebenfalls auffällig ist, dass trotz der deutlichen Hinweise in der DC im IR-Diagramm oftmals die Laktonabsorptionsbanden nicht zu sehen sind. Auch hier dürfte die Dominanz anderer Absorptionsbanden dafür verantwortlich sein.

Zusammensetzung des Ätherischen Öles der Gruppe 7:

Abbildung 61: Ätherisches Öl Collinoid 1 – Einzelmerkmale

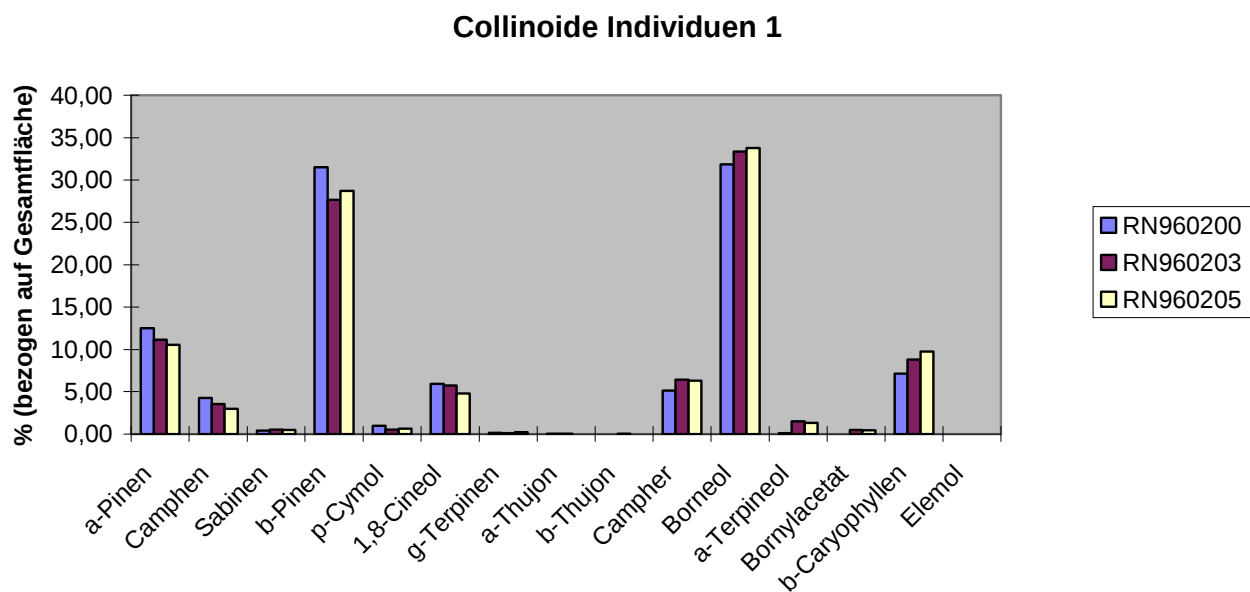


Abbildung 62: Ätherisches Öl Collinoid 2 - Einzelmerkmale

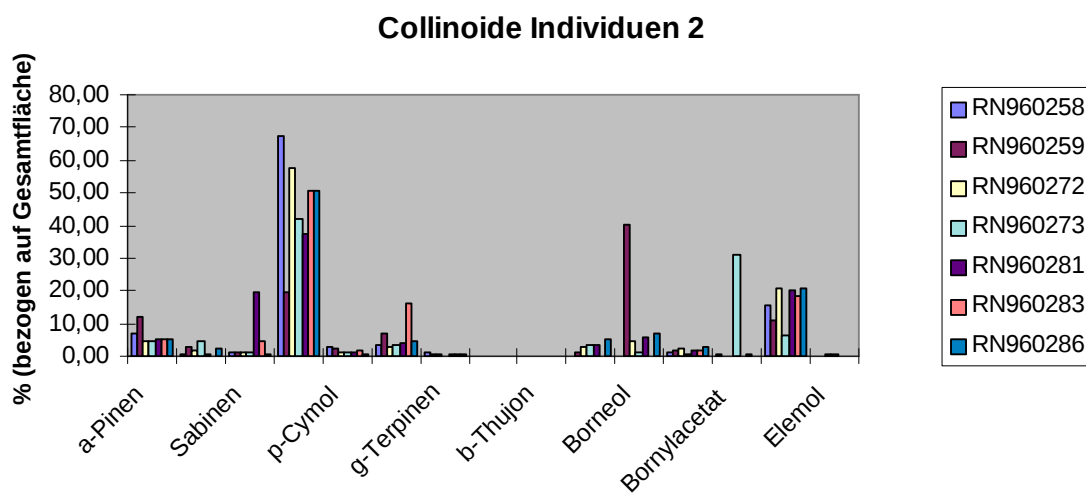


Abbildung 63: Ätherisches Öl Collinoid 3 - Einzelmerkmale

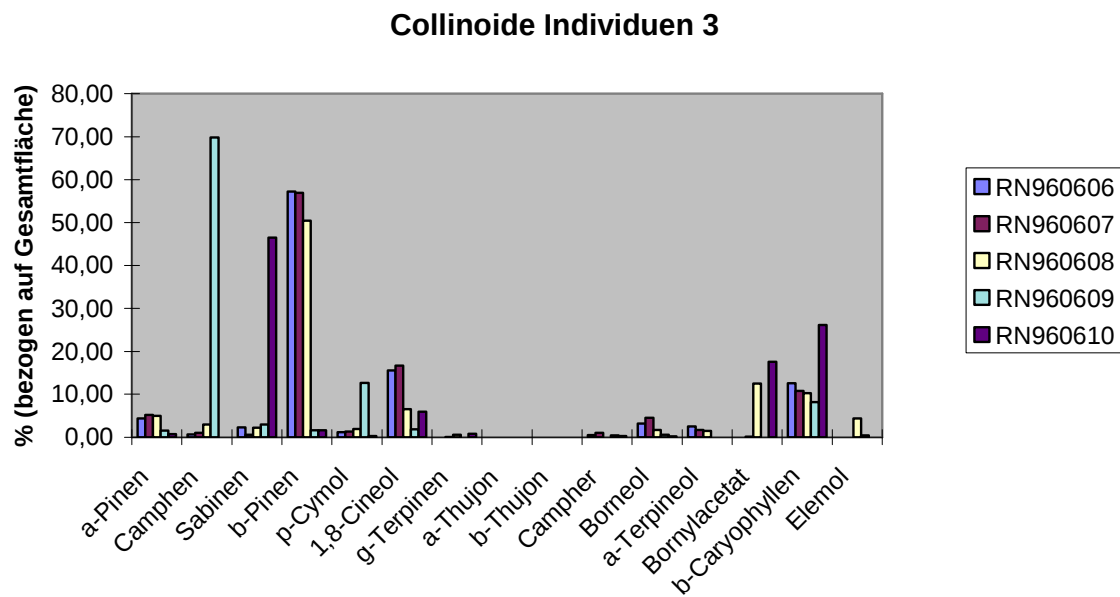


Abbildung 64: Ätherisches Öl Collinoid 4 - Einzelmerkmale

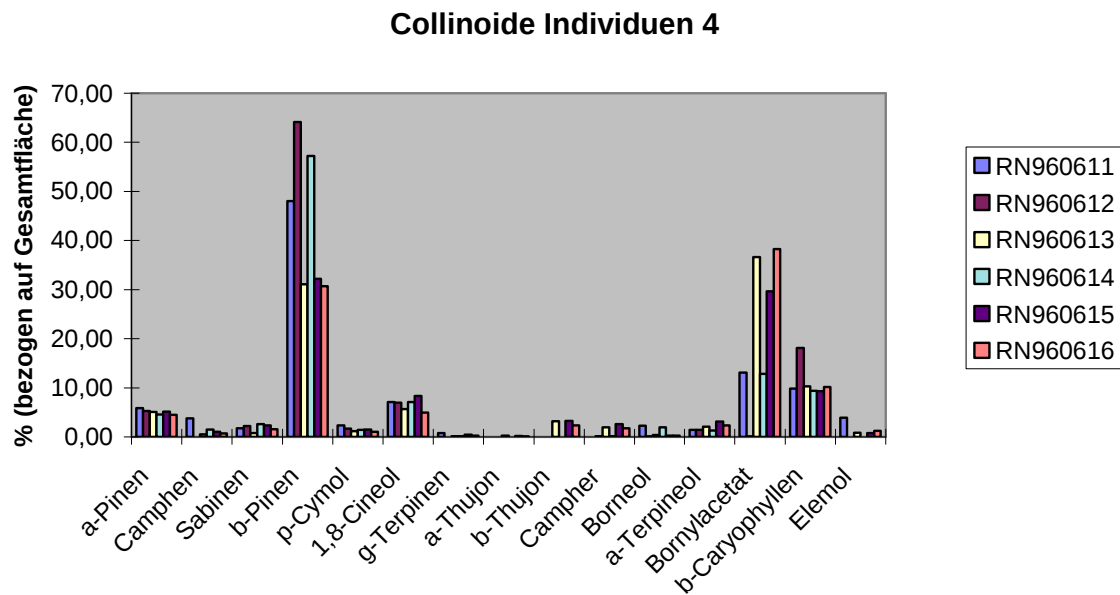


Abbildung 65: Ätherisches Öl Collinoid 5 - Einzelmerkmale

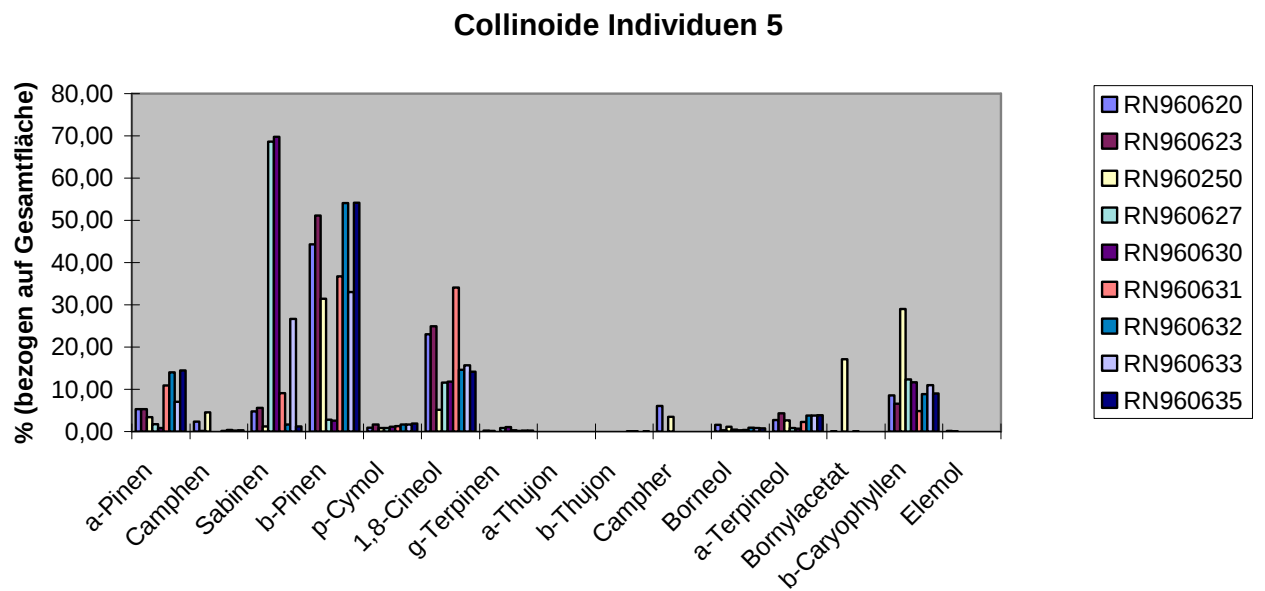


Abbildung 66: Ätherisches Öl Collinoid 1 - Summenmerkmale

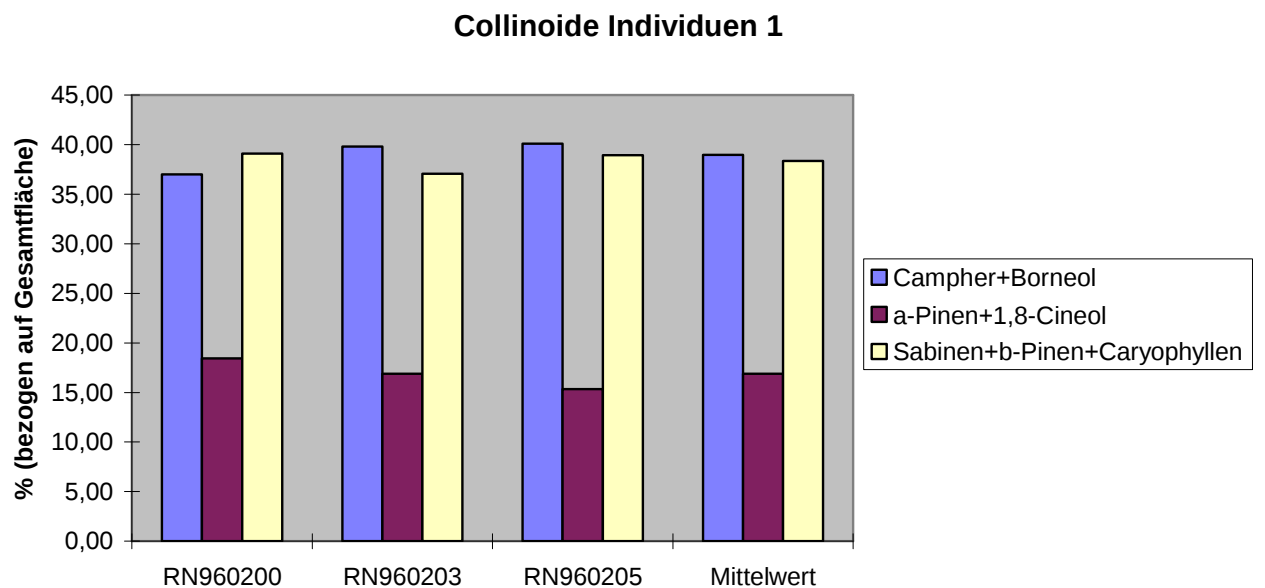


Abbildung 67: Ätherisches Öl Collinoid 2 - Summenmerkmale

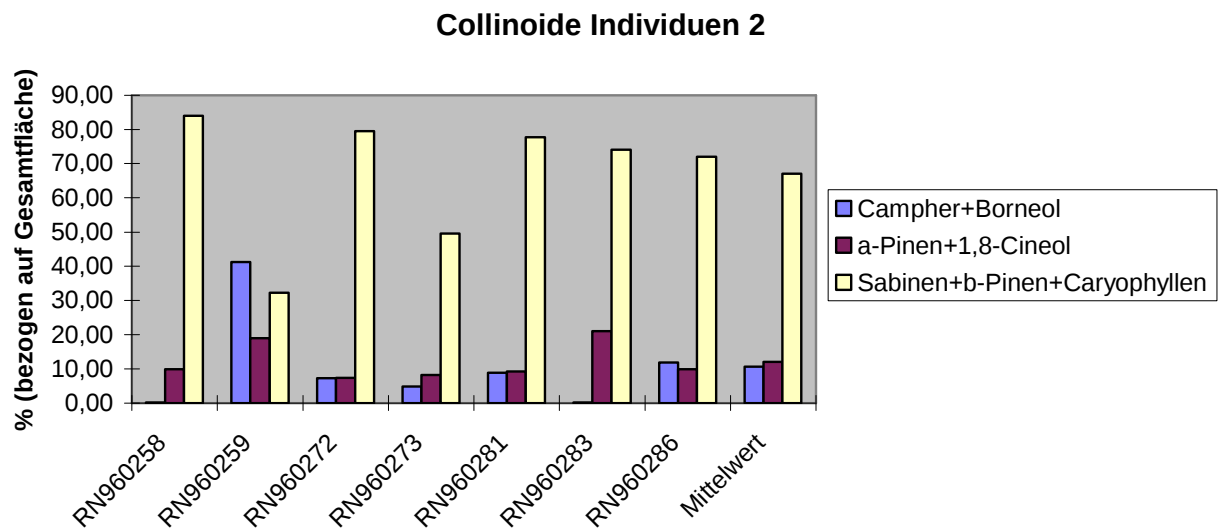


Abbildung 68: Ätherisches Öl Collinoid 3 - Summenmerkmale

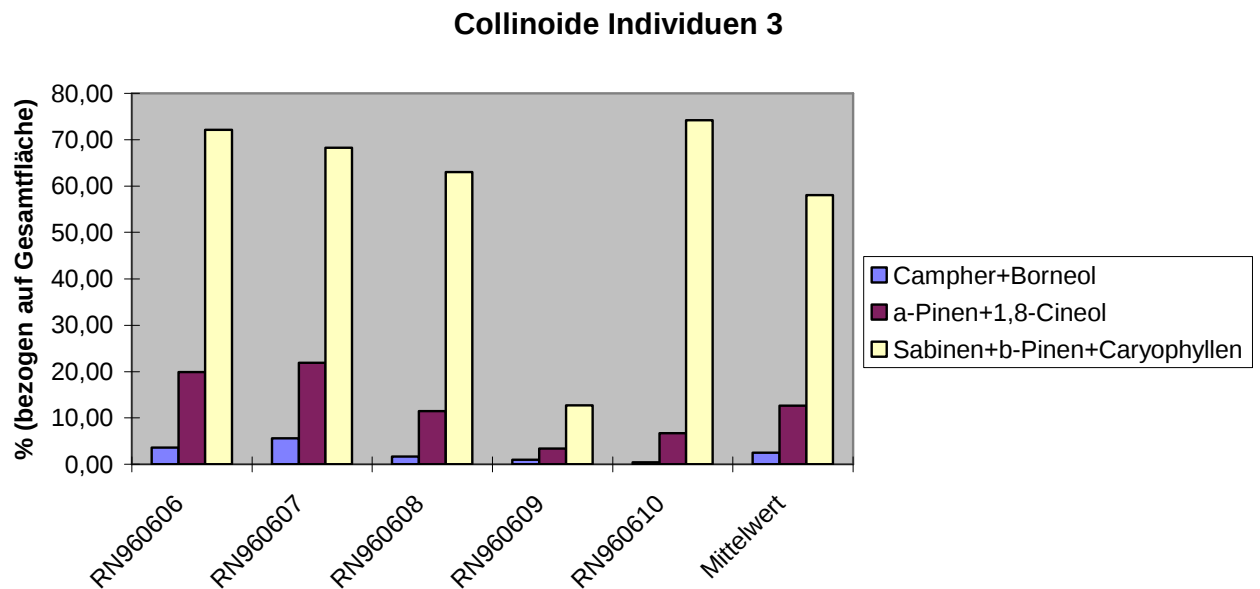


Abbildung 69: Ätherisches Öl Collinoid 4 - Summenmerkmale

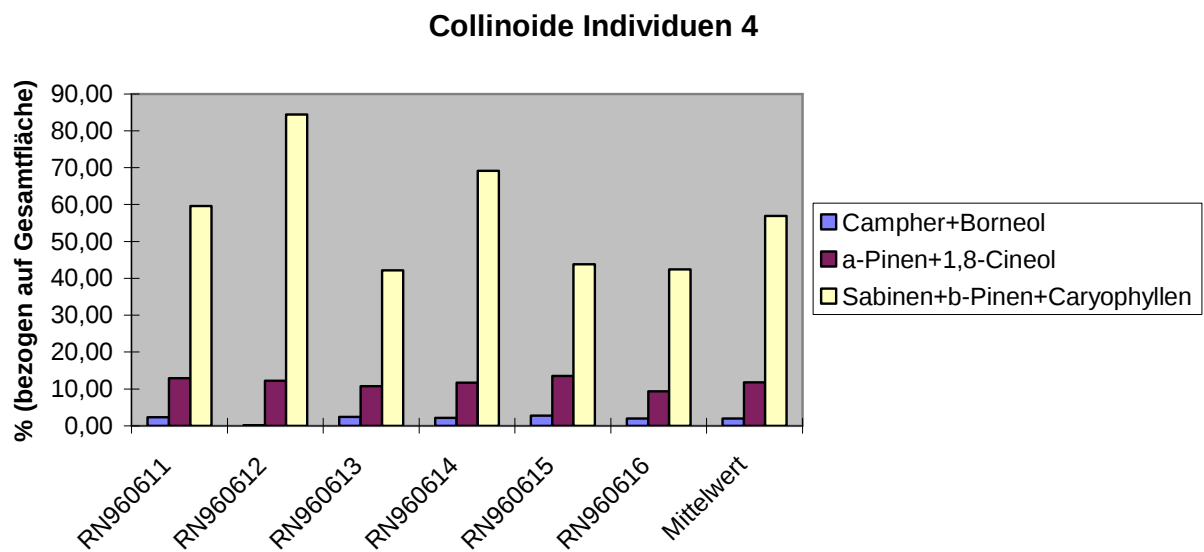
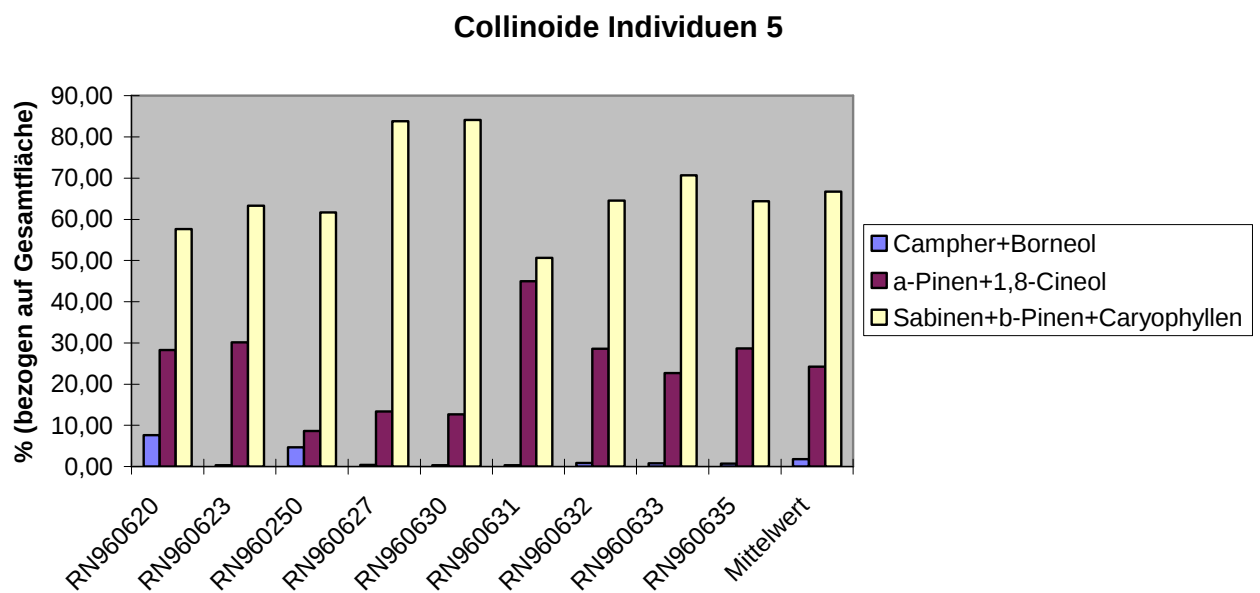


Abbildung 70: Ätherisches Öl Collinoid 5 - Summenmerkmale



Wie aus den obigen Diagrammen ersichtlich wird, ist die Zusammensetzung des Ätherischen Öles dieser großen Gruppe sehr uneinheitlich. Die Individuen RN960200, RN960203 und RN960205 besitzen beinahe die gleiche Zusammensetzung. Da sie auch am gleichen Standort gefunden wurden ist von einer direkten Verwandschaft auszugehen. Bei diesen 3 Individuen dominieren vor allem β -Pinen (28-32%) aber auch Borneol (32-34%). α -Pinen und Caryophyllen sind ebenfalls in relativ großen Mengen vorhanden (7-13%). Bei den Summenmerkmalen äussert sich dies in einem hohen Anteil der Summe Campher+Borneol (37-40%) und in einer fast gleich hohen Summe von Sabinen+ β -Pinen+Caryophyllen (37-39%). Eine ähnliche Zusammensetzung weist auch das Individuum RN960259 auf. Hier erreicht der Borneolgehalt sogar 40%.

β -Pinen ist auch bei allen anderen Individuen in einem hohen Anteil vorhanden (19-67%)
Ausnahmen bilden hier mit einem geringen β -Pinengehalt die Individuen RN960609, RN960610, RN960627 und RN960630 mit einem β -Pinengehalt von unter 3%. Bei RN960610, RN960627 und RN960630 tritt dafür Sabinen mit einem Anteil von 47-70% in den Vordergrund. Interessant ist die Zusammensetzung von RN960609. Hier ist es vor allem Camphen, das am deutlichsten hervortritt. Der Camphenanteil beträgt fast 70%. Das ist nicht nur der höchste Camphenanteil dieser Gruppe sondern der gesamten untersuchten Pflanzen überhaupt. Bei allen anderen Individuen liegt der Camphenanteil meist unter 5%.

Bei den Summenmerkmalen dominiert außer bei den oben genannten 3 Ausnahmen mit hohem Borneolgehalt und RN960609 mit hohem Camphengehalt Sabinen+b-Pinen+Caryophyllen mit Anteilen von 40-84%. Bei dieser Mehrheit der Pflanzen tritt dafür die Summe aus Campher+Borneol in den Hintergrund (0-14%)

Interpretation der Gruppe 7:

Diese Gruppe wurde morphologisch größtenteils zu *A. collina* gestellt, oder aber auch als Hybriden zwischen *A. collina* und *A. millefolium* bestimmt. RN960250 und RN960630 wurden als Hybride zwischen *A. collina* und *A. crithmifolia* bestimmt, bei RN960606 wurde ein Hybrid zwischen *A. collina* und *A. setacea* vermutet. Die Individuen RN960610, RN960612, RN960259 und RN960283 wurden morphologisch sogar *A. millefolium* ohne Hybridisierung zugeordnet (siehe Tabelle 2, S. 13). Auch hier ist ersichtlich, dass die

morphologische Zuordnung in diesen Fällen nicht dem Chemotyp entspricht, da *A. millefolium* an sich nicht proazulenführend ist. Die unterschiedliche morphologische Ausprägung spiegelt sich hier weder im Ätherischen Öl noch im IR-Spektrum wider. Im Allgemeinen zeigt der hohe Gehalt an Sabine+ β -Pinen+Caryophyllen Ähnlichkeiten mit *A. collina* aus Mitteleuropa. In diese Gruppe fallen auch die Pflanzen die morphologisch anders bestimmt wurden. Umgekehrt konnten die Ausnahmen dieses chemischen Musters morphologisch nicht als Ausnahmen bestimmt werden.

4.1.8 Gruppe 8 „Proazulenhältig“

In diese Gruppe, die aus 21 Individuen besteht wurden alle Individuen zusammengefasst, bei denen anhand der Dünnschichtchromatographie azulenogene Verbindungen nachgewiesen werden konnten, deren DC-Fingerprint aber nicht dem typischen *A. collina* Fingerprint entsprach. Meist wurde dies aufgrund des fehlenden Auftretens der bei EP-Detektion rosa Substanzflecken der 3-Oxa-Derivate der Artabsine bestimmt. Die Abgrenzung zur Gruppe „Collinoid“ gestaltete sich sehr schwierig, und es ist fraglich ob diese Abgrenzung aufrechterhalten werden kann, da die Artabsinderivate eigentlich immer mit ihren Oxa-Verbindungen gemeinsam auftreten. Das fehlende Auftreten der Oxa-Derivate könnte durch den Prozess der Dünnschichtchromatographie erklärt werden. Sie wären demnach zwar vorhanden, konnten jedoch nicht sichtbar gemacht werden. Auch in den DC der Gruppe „Proazulenhältig“ dominieren die Artabsinderivate und sind durch ihre Substanzflecken anhand der DC zu erkennen. Der UV-löschende Fleck der Matricarine bei R_F 0,4 tritt ebenfalls in den meisten Individuen auf.

Zum Zwecke der Übersichtlichkeit wird aber die Trennung zur Gruppe „Collinoid“ aufrechterhalten. Eine Darstellung einer schematischen DC ist auch bei dieser Gruppe aufgrund der großen Unterschiedlichkeit nicht sinnvoll.

IR-Spektren der Gruppe 8:

Zur Verbesserung der Übersichtlichkeit wurde die Gruppe bei der Darstellung der Blasendiagramme in 2 Diagramme aufgeteilt.

Abbildung 71: IR-Spektrum Proazulenhältig 1

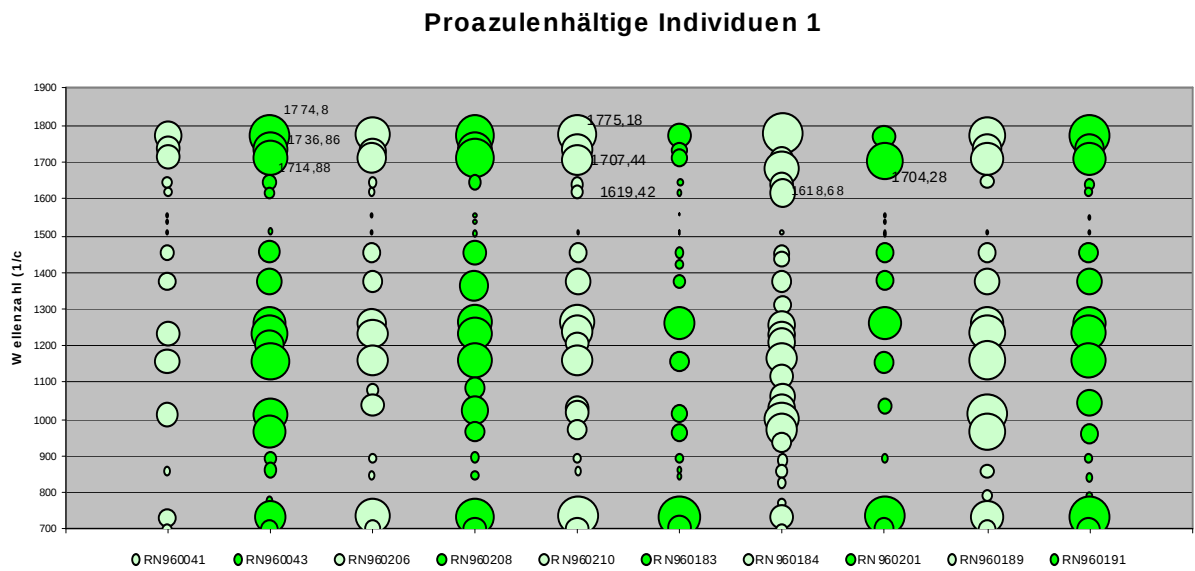
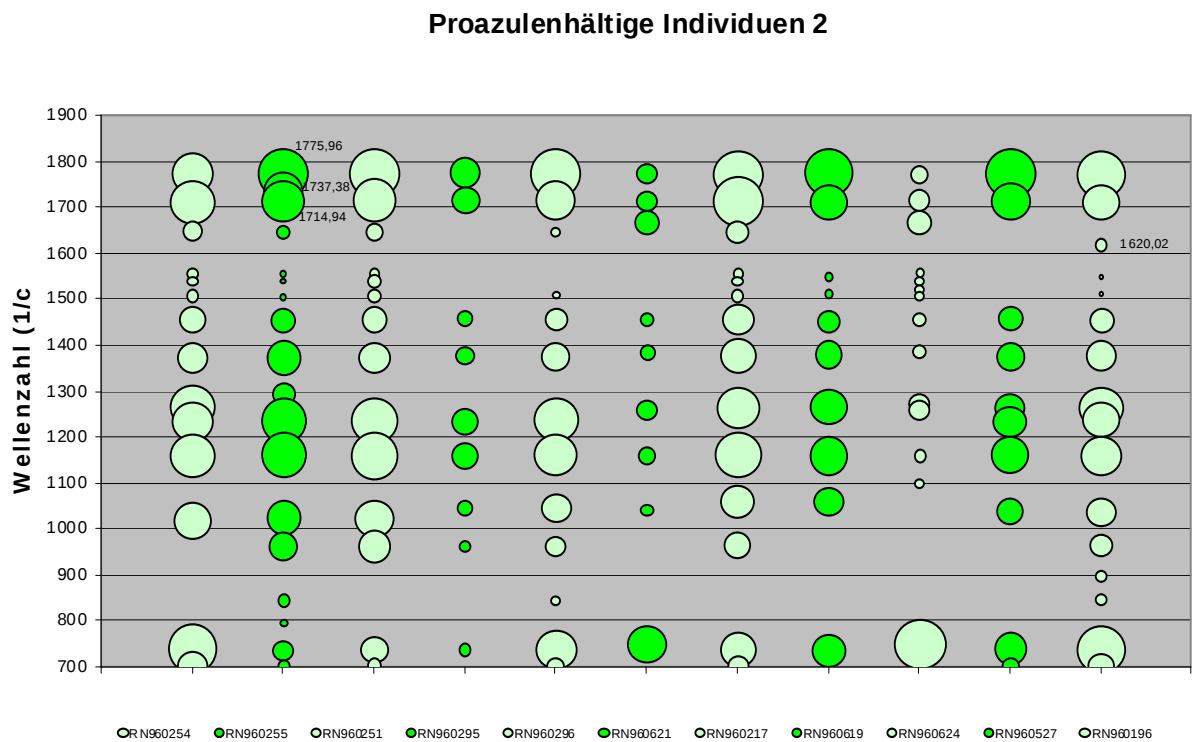


Abbildung 72: IR-Spektrum Proazulenhältig 2



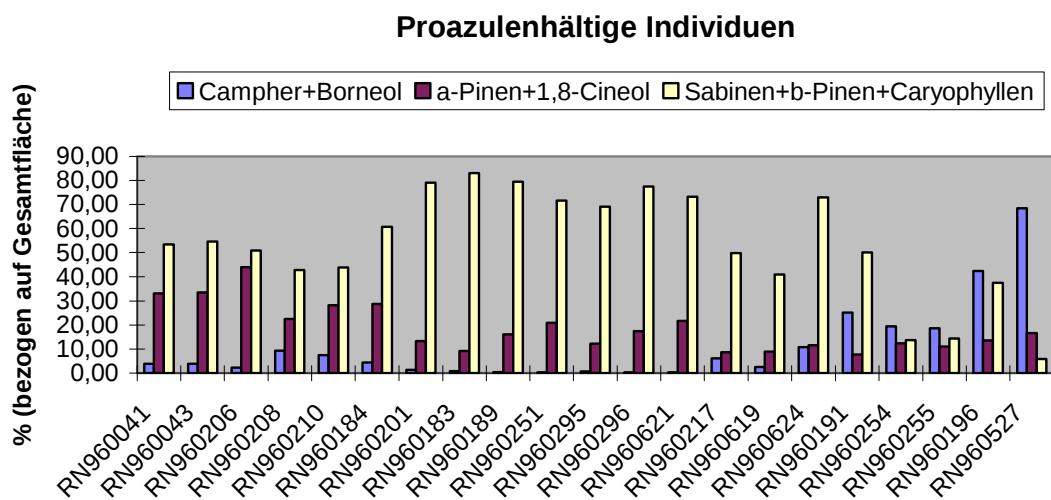
Auch im IR-Spektrum sind die Banden der Artabsinderivate zu erkennen. Die Laktonbande liegt bei allen Individuen im Bereich von $1773\text{-}1779\text{ cm}^{-1}$. Bei den Individuen RN960041, RN960043, RN960206, RN960208, RN960183, RN960189, RN960191 und RN960255 zeigen die Banden bei ca. 1738 cm^{-1} und im Bereich von $1713\text{-}1715\text{ cm}^{-1}$, dass in diesen Individuen die Acetat- und Angelikasäureester der Artabsine auftreten, also Angeloxyartabsin und Achillicin. Beim Individuum RN960210 tritt neben der Esterbande bei 1738 cm^{-1} die zweite Esterbande bei 1707 cm^{-1} auf, hier dürften also Veresterungen mit Tiglinsäure vorliegen. Ebenfalls Veresterungen mit Tiglinsäure sind beim Individuum RN960201 dominierend, hier ist die Bande der Tiglinsäure bei 1704 cm^{-1} die einzige erkennbare Esterbande.

Bei den restlichen Individuen dieser Gruppe liegt die Esterbande bei ca. 1715 cm^{-1} , es herrschen hier also vor allem Veresterungen mit Angelikasäure vor, die Esterbande des Achillicin ist nicht zu erkennen.

Die durch Matricarin verursachten Banden bei ca. 1620 cm^{-1} sind bei sehr vielen Individuen zu erkennen, was auch mit den Befunden der DC übereinstimmt.

Zusammensetzung des Ätherischen Öles der Gruppe 8:

Abbildung 73: Ätherisches Öl Proazulenhältig - Summenmerkmale



Sabinen+ β -Pinen+Caryophyllen sind bei den Summenmerkmalen meist dominierend, Campher und Borneol treten großteils in den Hintergrund. Ausnahmen sind Individuum RN960527 mit einem Campheranteil von 68% und Individuum RN960196, hier ist der Borneolanteil mit 42% sehr hoch. Die Individuen RN960254 und RN960255 weisen einen sehr hohen Anteil an Bornylacetat auf (37 bzw. 40%). Dadurch ist bei den berücksichtigten Summenmerkmalen, bei denen Bornylacetat keine Rolle spielt, keines dominierend. Wie bei allen untersuchten Individuen sind auch bei dieser Gruppe γ -Terpinen und Thujon praktisch nicht vorhanden.

Interpretation der Gruppe 8:

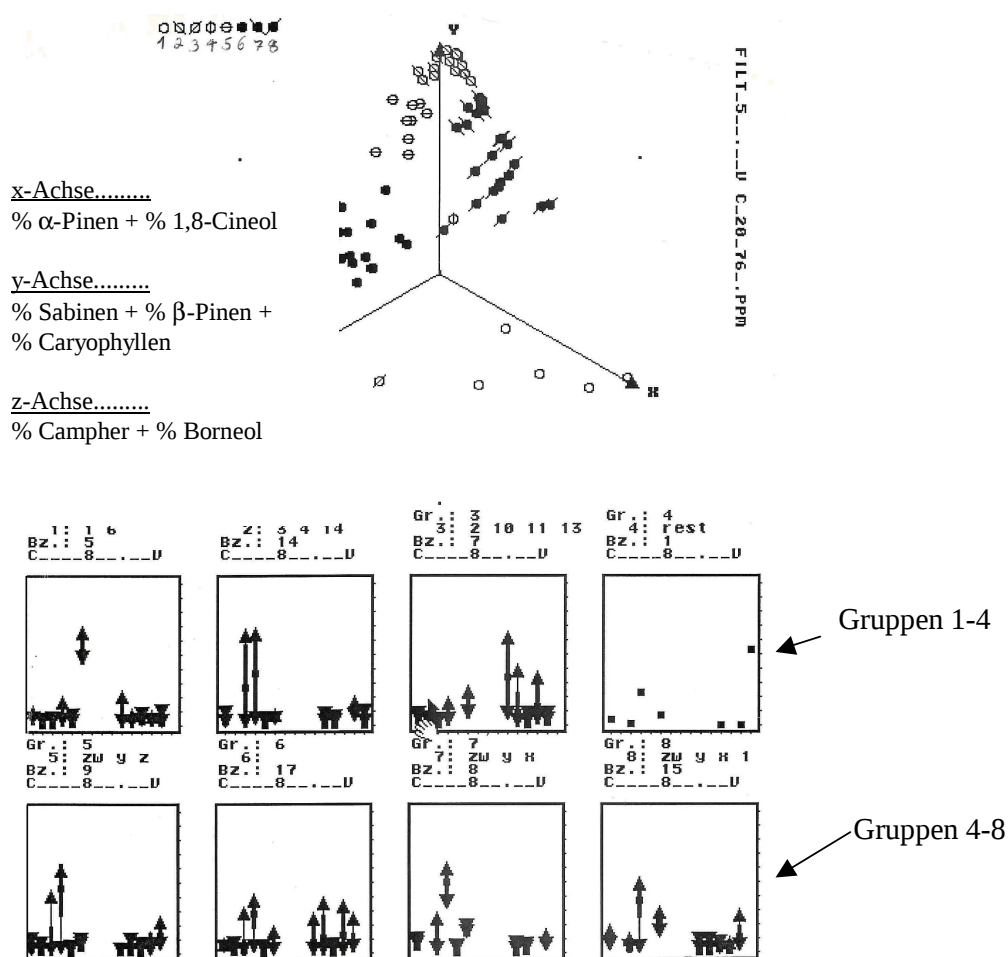
Für diese Gruppe gilt ähnliches wie für Gruppe 7. Auch hier wurden die meisten Individuen morphologisch *A. collina* zugeordnet bzw. als Hybriden zwischen *A. collina* und *A. millefolium* bestimmt. RN960251 und RN960295 wurden zu *A. millefolium* gestellt, bei RN960254 ein Hybrid zwischen *A. millefolium* und *A. crithmifolia* vermutet, bei RN960624 eine Hybridisierung zwischen *A. collina* und *A. crithmifolia* (siehe Tabelle 2, S. 13). Auch hier spiegeln die Unterschiede in der Morphologie nicht die Unterschiede im chemischen

Muster wieder und umgekehrt. Weiters gilt auch hier, dass morphologisch proazulenfreien Taxa zugeordnete Individuen eindeutig proazulenführend sind, und von der chemischen Zusammensetzung der Sesquiterpene und Monoterpene her eher *A. collina* ähneln. Der hohe Bornylacetatgehalt von RN960254 könnte ein Hinweis auf eine Hybridisierung mit *A. millefolium* sein, gleichzeitig kann aber bei Individuum RN960255, welches ebenfalls einen hohen Bornylacetatgehalt aufweist, morphologisch keine Hybridisierung ausgemacht werden.

4.2 Einteilung nach Ätherischem Öl (Summenmerkmale der Hauptkomponenten)

Die zweite grundlegende Einteilungsform neben jener anhand der Sesquiterpene (siehe Kapitel 4.1, S. 32ff) war jene nach der Zusammensetzung des Ätherischen Öles. Es erwies sich als sinnvoll, Prozentsummen zu bestimmen, da diese charakteristisch für bestimmte Taxa sind. Durch die Einführung dieser Prozentsummen werden die 15 Merkmale (Prozentanteil der einzelnen charakteristischen Substanzen) auf 3 Summenmerkmale (Prozentsumme Campher+Borneol; Prozentsumme α -Pinen+1,8-Cineol; Prozentsumme Sabinen+ β -Pinen+Caryophyllen) reduziert, was die Übersichtlichkeit erhöht, und eine Darstellung der Individuen und ihre Gruppierung in einem 3-achsigen Koordinatensystem ermöglicht. Bei der neueren Erforschung der Systematik von *Achillea* anhand verschiedenster Merkmale sind es diese Summenprozente die in die Betrachtung einfließen.

Abbildung 74: Einteilung der 76 untersuchten Individuen (siehe Tabelle 1, S. 11) nach charakteristischen Summenprozenten des Ätherisches Öls in 8 Gruppen



Anhand der oben beschriebenen Prozentsummen wurden die 76 untersuchten Individuen in einem 3-achsigen Koordinatensystem dargestellt. Die Gruppierung erfolgte anhand der Lage in diesem 3-achsigen System. Jedes der drei Summenmerkmale wird durch eine Achse repräsentiert. Es wurde eine Einteilung der Individuen in 8 Gruppen durchgeführt. Eine Gruppe (Nummer 4), die aus nur einem Individuum besteht (RN960040) ist dadurch gekennzeichnet, dass die Substanzen die die Achsen bilden nur zu einem sehr geringen Prozentsatz vorhanden sind, und eine andere Substanz (Elemol) stark dominiert. Zur Darstellung der Gruppen wurden Boxplotdiagramme verwendet, die den Prozentgehalt der Hauptkomponenten der Individuen der Gruppe zeigen. Anhand der Boxplotdiagramme sind der Mittelwert der Prozentgehalte zu sehen, die Standardabweichung des Gehaltes der einzelnen Substanzen, sowie der minimale und maximale Wert der Anteile.

Gruppe 1

RN960529
RN960436
RN960444
RN960528
RN960634

Die Gruppe 1 besteht aus 5 Individuen. Kennzeichnend sind mittlere bis hohe Anteile an α -Pinen+1,8-Cineol, etwas Campher+Borneol und sehr wenig Sabinen+ β -Pinen+Caryophyllen. 1,8-Cineol ist in dieser Gruppe die dominierende Substanz, der Prozentgehalt liegt zwischen 45 und 53 %. Bezüglich des Gehaltes der einzelnen Substanzen ist die Gruppe sehr homogen. Das Individuum RN960436 weist einen relativ hohen Camphergehalt auf, er beträgt fast 27%. Anhand der DC lässt sich erkennen, dass in dieser Gruppe nur proazulenfreie Individuen vertreten sind.

Gruppe 2

RN960626
RN960625
RN960249
RN960258
RN960272
RN960281
RN960609
RN960630
RN960612
RN960627
RR960189
RN960183
RN960296
RN960201

Die große Gruppe 2 mit 14 Individuen weist einen sehr hohen Gehalt an Sabinen+ β -Pinen+Caryophyllen auf. Die beiden anderen Prozentsummen sind nur sehr gering.

Der Anteil der Prozentsumme von Sabinen+ β -Pinen+Caryophyllen liegt zwischen 76 und 84%, dementsprechend niedrig sind die anderen Anteile. Die Summe aus Campher+Borneol liegt nur zwischen 0 und 9%. Bei manchen Individuen ist Sabinen dominierend, bei den anderen β -Pinen. Caryophyllen trägt nur wenig zu dieser hohen Summe bei. Das Individuum RN960609 ist ein Sonderfall. Hier ist der Anteil von Camphen mit 70% sehr hoch, Camphen ist ein Merkmal, das nicht in die Summenberechnungen Einzug findet. Wie bei allen

Individuen ist auch in dieser Gruppe γ -Terpinen und Thujon fast nicht im Ätherischen Öl enthalten. Die DC der Individuen lassen erkennen, dass in dieser Gruppe sowohl proazulenhältige als auch proazulenefreie Individuen vertreten sind.

Gruppe 3

RN960042
RN960437
RN960443
RN960530
RN960255
RN960527
RN960254

Die Gruppe 3 besteht aus 7 Individuen. In dieser Gruppe dominiert das Summenmerkmal Campher+Borneol. Die Summen liegen zwischen 43 und 64%. Ausnahmen bilden hier die Individuen RN960254 und RN960255. Hier ist der Bornylacetatanteil sehr hoch, ein weiteres Merkmal, das nicht in die Summenberechnungen einfließt. Deshalb ist Campher+Borneol mit jeweils ca. 19% bei diesen Individuen ebenfalls dominierend. Die Anteile von α -Pinen+1,8-Cineol liegen zwischen 12 und 33%, die Anteile von Sabinen+ β -Pinen+Caryophyllen zwischen 5 und 26%. Auch in dieser Gruppe sind proazulenefreie Individuen und proazulenhältige gemischt.

Gruppe 4

RN960040

Die Gruppe 4 besteht nur aus einem Individuum. Das Ätherische Öl dieser Pflanze wird mit einem Anteil von 56% von Elemol dominiert. Dieser hohe Elemolanteil ist für das Ätherische Öl von *Achillea* eine Besonderheit. Dadurch sind alle anderen Substanzen in nur geringem Maße vorhanden, lediglich β -Pinen mit einem Anteil von 25% sei hier noch zu erwähnen. Dieses Individuum wurde auch in der Einteilung nach Sesquiterpenmuster einer eigenen Gruppe zugeordnet.

Gruppe 5

RN960175
RN960286
RN960610
RN960614
RN960608
RN960611
RN960250
RN960624
RN960295

Die Gruppe 5 besteht aus 9 Individuen. Das Ätherische Öl wird wie bei Gruppe 2 von Sabinen+ β -Pinen+Caryophyllen dominiert, mit Anteilen von 60-73%. Die beiden anderen Merkmale sind mit 0-13% nur sehr gering ausgeprägt. Die Abgrenzung zur Gruppe 2 ist darin begründet, dass bei dieser Gruppe eine der beiden anderen Merkmalssummen etwas höher liegt als bei Gruppe 2. In dieser Gruppe sind alle Individuen proazulenhältig.

Gruppe 6

RN960044
RN960294
RN960030
RN960031
RN960273
RN960200
RN960203
RN960205
RN960259
RN960613
RN960616
RN960615
RN960208
RN960217
RN960196
RN960191
RN960619

Die Gruppe 6 besteht aus 17 Individuen. Kennzeichnend sind mittlere bis hohe Anteil an Sabinen+ β -Pinen+Caryophyllen (35-50%), niedrige bis mittlere Anteile an Campher+Borneol (2-42%) sowie eher niedrige Anteile von α -Pinen+1,8-Cineol (8-23%). Bei etwa der Hälfte der Individuen der Gruppe ist ein relativ hoher Anteil an Bornylacetat (13-39%) zu erkennen, bei den anderen ist Bornylacetat fast nicht vorhanden. In dieser Gruppe sind proazulenefreie und proazulenhältige Individuen vertreten.

Gruppe 7

RN960573
RN960606
RN960283
RN960607
RN960633
RN960251
RN960621
RN960187

Die Gruppe 7 besteht aus 8 Individuen. Es handelt sich hier um eine sehr homogenen Gruppe. Kennzeichnend sind wiederum sehr hohe Anteile an Sabinen+ β -Pinen+Caryophyllen (65-74%). Der Anteil von α -Pinen+1,8-Cineol liegt im mittleren Bereich (18-20%) und der Anteil von Campher+Borneol ist sehr gering (0-6%). Bis auf das Individuum RN960573 sind in dieser Gruppe alle Individuen proazulenhältig.

Gruppe 8

RN960552
RN960282
RN960192
RN960021
RN960022
RN960632
RN960623
RN960620
RN960635
RN960631
RN960184
RN960210
RN960041
RN960043
RN960206

Die aus 15 Individuen bestehende Gruppe 8 ist ebenfalls sehr homogen. Der Anteil von Sabinen+ β -Pinen+Caryophyllen ist mit 43-60% mittel bis hoch, der Anteil von α -Pinen+1,8-Cineol mit 28-45% ebenfalls. Mit 0-9% ist der Anteil von Campher+Borneol sehr gering. In dieser Gruppe sind sowohl proazulene, als auch proazulenhältige Individuen zu finden.

5. Diskussion der Ergebnisse

Die anhand der DC-Fingerprints getroffene Einteilung eignet sich gut für einen ersten Überblick, dennoch zeigt sich, dass sie, was die Systematik betrifft natürlich nicht aufrecht erhalten werden kann. Insbesondere die Unterscheidung zwischen „Collinoid“ und „Proazulenhältig“ ist nicht möglich. Die anderen Untersuchungen zeigten, dass *A. collina* zuzuordnende Individuen in praktisch allen DC-Gruppen vorhanden sind, und allgemein die untersuchten Bestände von *A. collina* dominiert werden. Jede der Einteilungsformen weist Vorteile auf, um Individuen zu charakterisieren und überschaubar darstellen zu können. Überschneidungen zwischen den verschiedenen Einteilungsformen sind aber nur in bestimmten Punkten zu erkennen.

Vergleicht man die Gruppierung anhand des Ätherischen Öles mit der Gruppierung anhand des DC-Fingerprints/Sesquiterpene fällt vor allem die Ätherische Öl Gruppe 1 auf. Alle 5 Individuen dieser Gruppe, deren Ätherisches Öl von α -Pinen+1,8-Cineol dominiert wird, sind proazulenzfrei. Sie gehören aber hinsichtlich der DC unterschiedlichen Gruppen an (Individuum RN960529 „Coll. D“, Individuen RN960436 und RN960443 „AASrot“, Individuen RN960528 und RN960634 „proazulenzfrei“). Hinsichtlich der Morphologie werden die 3 Individuen RN960436, RN960444 und RN960634 *A. distans* zugeordnet, die beiden anderen aber wiederum *A. collina*.

Bei den meisten Individuen dominiert bei den Summenmerkmalen Sabinen+ β -Pinen+Caryphyllen, was den Erfahrungen bei mitteleuropäischen Vertretern von *A. collina* betrifft. In den Gruppen 1+3, bei denen α -Pinen+1,8-Cineol bzw. Campher+Borneol dominieren, sind sämtliche Vertreter beinhaltet, die morphologisch *A. distans* zugeordnet wurden, aber auch viele Individuen, die *A. collina* angehören.

Daraus ist zu erkennen, dass *A. distans* auch chemisch sehr gut charakterisiert werden konnte, mit einer komplexen Ausprägung der Summenmerkmale, bei denen Sabinen+ β -Pinen+Caryphyllen eher in den Hintergrund treten. Weiters sind all diese Individuen auch proazulenzfrei. Zusätzlich konnten bei all den 5 Individuen die *A. distans* zugeordnet wurden anhand der Banden der IR-Spektroskopie α -Methylen- γ -Laktone nachgewiesen werden, und diese charakteristische Banden treten auch nur bei diesen 5 Individuen auf.

Die IR-Spektroskopie eignete sich hier also sehr gut um einen Hinweis auf das Auftreten dieser Strukturen zu finden, und damit auch weitere Hinweise für die Systematik zu bekommen.

Bei allen anderen Individuen entsprechen die Summenmerkmale den mitteleuropäischen Erfahrungen von *A. collina*, mit hohen Anteilen von Sabinen+ β -Pinen+Caryophyllen. Proazulenhaltigkeit dürfte hier kein entscheidendes Kriterium sein, was die systematische Zuordnung angeht. Das Verhältnis von proazulenhaltigen und proazuleneisen Individuen liegt in etwa bei 2:1, und es sind keine Übereinstimmungen zwischen diesem Kriterium und der morphologischen Zuordnung bzw. der Zuordnung nach Summenmerkmalen im Ätherischen Öl zu erkennen. Trotz der Abwesenheit von Proazulen müssen daher viele Individuen *A. collina* zugeordnet werden bzw. als Hybriden von *A. collina* gesehen werden.

Anhand der DC und als Ergänzung und Verbesserung dazu anhand des IR-Fingerprintes konnte das Auftreten der verschiedenen Proazulene sehr gut gezeigt werden. Insbesondere die Artabsine mit ihren unterschiedlichen Veresterungen sind durch die IR-Spektroskopie gut auszumachen.

Die 6 Individuen die morphologisch *A. millefolium* s.str. zugeordnet wurden (RN960612, RN960610, RN960259, RN960283, RN960295, RN960251) sind alle proazulenhaltig. Auch bei den Summenmerkmalen des Ätherischen Öles würden sie *A. collina* zugeordnet, und eine Zuordnung zu *A. millefolium* wäre nicht ersichtlich. Auch diese Erfahrung weist eher auf Hybridisierungen hin, und die eindeutige Zuordnung zu *A. millefolium* s.str. muss in Frage gestellt werden. Da bei RN960250 und RN960254 morphologisch Hybriden zwischen *A. collina* und *A. crithmifolia* ausgemacht wurden, die ein ähnliches Muster wie die oben genannten aufweisen und ebenfalls proazulenhaltig sind, könnten auch die oben genannten Individuen ebenfalls Hybriden mit *A. crithmifolia* sein, was auch die Proazulenhaltigkeit erklären würde.

Hervorzuheben ist das Individuum RN960040. Das Ätherische Öl dieser Pflanze wird mit einem Anteil von 56% vom Elemol dominiert, morphologisch wird sie *A. collina* zugeordnet. Dieser hohe Elemolanteil ist für das Ätherische Öl von *Achillea* eine Besonderheit. Es müssen weitere Untersuchungen folgen, um zu sehen ob diese Besonderheit auch in Mitteleuropa

auftritt oder speziell für bestimmte Individuen von *A. collina* in Bulgarien ist. Es ist auf jeden Fall bedeutsam, zukünftig neben den anderen Hauptkomponenten auch den Elemolgehalt des Ätherischen Öles zu bestimmen.

Die Individuen der Gruppe „Coll D“ weisen hinsichtlich ihrer chemischen Zusammensetzung eine große Ähnlichkeit mit den in Dürnstein und Ungarn gefundenen Individuen auf. Nach morphologischen Kriterien werden die Individuen *A. collina* zugeordnet bzw. RN960294 und RN960552 als Hybriden zwischen *A. collina* und *A. millefolium*. Es ist anzunehmen, dass es sich um Hybriden handelt, die morphologisch an *A. collina* erinnern, in der chemischen Zusammensetzung eher an die proazulenfreie *A. millefolium*. Mitteleuropäische Vertreter von *A. collina* weisen im allgemeinen einen hohen Gehalt von Summenmerkmal Sabinen+ β -Pinen+Caryophyllen auf. Hier erreichen auch die anderen Summenmerkmale teilweise sehr hohe Werte.

Aus einem Individuum dieser Gruppe wurden zwei Substanzen isoliert und analysiert. Die Ergebnisse weisen sehr stark auf Desacetylmatricarin mit einem Molekulargewicht von 262 und Desacetoxymatricarin mit einem Molekulargewicht von 246 hin.

Die Aufspaltung dieser Substanzen in jeweils 2 Peaks bei HPLC und GC lässt eine Stellungsisomerie bezüglich der Methylgruppen vermuten.

Das vorhandene Pflanzenmaterial war nicht ausreichend um NMR-Untersuchungen für eine genauere Bestimmung vorzunehmen, eine Isolierung von mehr Material hätte den Rahmen dieser Arbeit gesprengt. In weiterer Folge wären aber diese Analysen notwendig um endgültige Aussagen über die Struktur dieser beiden Substanzen zu gewinnen.

6. Zusammenfassung

76 bulgarische Vertreter von *Achillea* wurden anhand von Gaschromatographie, Dünnschichtchromatographie und IR-Spektroskopie analysiert und hinsichtlich der Zusammensetzung der Mono- und Sesquiterpene charakterisiert. Die Einteilung der Individuen erfolgte anhand der DC-Fingerprints und hinsichtlich dreier Summenmerkmale der Hauptkomponenten des Ätherischen Öles in Gruppen. Weiters wurde auch eine morphologische Bestimmung in die Interpretation der Individuen miteinbezogen. Hinsichtlich der verschiedenen Einteilungsformen gab es nur punktuell Übereinstimmungen. Die meisten Individuen müssen *A. collina* zugeordnet bzw. als Hybriden mit *A. collina* interpretiert werden. Es wurde gezeigt, dass die chemische Zusammensetzung dieser *A. collina* zuzuordnenden Individuen sehr unterschiedlich ist, das Verhältnis von proazulenhältigen und proazulenen Individuen lag in etwa bei 2:1. Ebenso wurden mehrere Individuen gefunden, die morphologisch *A. millefolium* zugeordnet wurden, aber eindeutig proazulenhältig sind. Insofern wurde bestätigt, dass beim Auftreten von *A. collina* und seiner Hybridisierungen ein wesentliches Augenmerk auf die morphologische Bestimmung gelegt werden muss, und die chemische Charakterisierung hier nur bedingt Aufschlüsse für die Systematik bringt.

Bei einer anhand der DC bestimmten Gruppe handelt es sich um Individuen, die in ihrer chemischen Zusammensetzung Ähnlichkeit mit in Ungarn und Dürnstein gefundenen Individuen haben, die als „Coll. D“ bezeichnet wurden. Es handelt sich dabei um Individuen, die morphologisch *A. collina* ähneln, aber proazulenenfrei sind und chemisch eher an *A. millefolium* erinnern. Eine genaue Bestimmung, ob es sich hier um Hybriden zwischen den beiden genannten Taxa handelt oder wie diese Gruppe sonst interpretiert werden könnte steht noch aus. Aus einem Individuum dieser Gruppe wurden mit HPLC zwei Substanzen isoliert, bei denen es sich um Desacetylmatricarin und um Desacetoxymatricarin handelt. Eine genaue Bestimmung mit NMR konnte aufgrund des geringen Pflanzenmaterials nicht durchgeführt werden. Die GC- und HPLC-Analysen lassen aber vermuten, dass von den beiden Substanzen je 2 Isomere vorliegen, die sich hinsichtlich der Stellung der Methylgruppen unterscheiden. Wie Glasl und andere feststellten, handelt es sich bei den Isomeren von Desacetoxymatricarin um Leucodin und Achillin (Glasl et al. 2003).

Achillea distans konnte anhand der chemischen Charakterisierung gut von den anderen Individuen abgegrenzt werden. 5 Individuen wurden dieser Gattung zugeordnet, alle 5 sind proazulenfrei und weisen potentiell allergene α -Methylen- γ -Laktone auf, die durch IR-Spektroskopie nachgewiesen werden konnten.

Die IR-Spektroskopie zeigte sich als wesentliche Ergänzung zur DC. Durch diese Methode konnten α -Methylen- γ -Laktone nachgewiesen werden, die bei 5 Individuen von *Achillea distans* auftraten. Bei allen anderen Individuen zeigte die IR-Spektroskopie die Abwesenheit der potentiell allergenen α -Methylen- γ -Laktone. Weiters gab die IR-Spektroskopie bei den proazulenhältigen Individuen Aufschluss über die Zusammensetzung der Artabsine und ihrer Veresterungen, sowie der Matricarine. Es wurde somit die Tauglichkeit der IR-Spektroskopie zur eleganten und aufschlussreichen Charakterisierung des Sesquiterpenbereiches bestätigt.

7. Literatur

Adler W., Oswald K., und Fischer R., 1994: Exkursionsflora von Österreich; Verlag Ulmer

Chandler R. F., Hooper S.N. und Harvey M. J. 1982: Ethnobotany and Phytochemistry of Yarrow, *Achillea millefolium*, Compositae; Econ. Bot. 36, 203-223

DellaLoggia R. 1998: Zur Bewertung der entzündungshemmenden Wirkung der Substanzen aus *Achillea millefolium*; in *Achillea – Botanik, Inhaltsstoffe, Analytik und Wirkung*; Wien, Gesellschaft für Arzneipflanzenforschung und Österreichische Gesellschaft für Phytotherapie; Drogenreport 11, 32

Eglseer K., Jurenitsch J., Saukel J., Franz Ch. und Kubelka W. 1988: Vergleichende Untersuchungen des ätherischen Öles verschiedener Sippen des *Achillea millefolium* Aggregates; Sci. Pharm. 56, 15

Ehrendorfer F. 1953: Systematische und zytogenetische Untersuchungen an europäischen Rassen des *Achillea millefolium* Komplexes; Öst. Bot. Z. 100, 583-592

Hegi G. 1979: Flora von Mitteleuropa; Band 6, Teil 3, 2. Aufl., 1964-1979, Parey Verlag, München

Ehrendorfer F. 1998: Die Systematik der *Achillea millefolium* – Gruppe; *Achillea – Botanik, Inhaltsstoffe, Analytik und Wirkung*; Wien, Gesellschaft für Arzneipflanzenforschung und Österreichische Gesellschaft für Phytotherapie, Drogenreport 11, 30

Glasl S. 1998: Ätherisches Öl, Sesquiterpene und Betaine verschiedener Schafgarben-Taxa und deren Analytik, in *Achillea – Botanik, Inhaltsstoffe, Analytik und Wirkung*; Wien, Gesellschaft für Arzneipflanzenforschung und Österreichische Gesellschaft für Phytotherapie, Drogenreport 11, 30-31

Glasl S., Kastner U., Jurenitsch J. und Kubelka W. 1999: Qualitative and quantitative determination of sesquiterpenoids in *Achillea* species by reversed-phase high-performance liquid chromatography, mass-spectrometry and thin-layer chromatography; J. Chromatogr. B 729, 361-368

Glasl S., Mucaji P., Werner I., und Jurenitsch J. 2003: TLC and HPLC characteristics of desacetylmaticarin, leucodin, achillin and their 8 α -angeloxy-derivatives; Pharmazie 58, 487-490

Guo Y-P., Saukel J., Mittermayr R. und Ehrendorfer F. 2005: AFLP analyses demonstrate genetic divergence, hybridization, and multiple polyploidization in the evolution of *Achillea* (Asteraceae-Anthemideae); New Phytologist 166, 273-290

Guo Y-P., Saukel J. und Ehrendorfer F., 2008: AFLP trees versus scatterplots: evolution and phylogeography of the polyploid complex *Achillea millefolium* agg. (Asteraceae); Taxon 57, 1-17

Hofmann L., Fritz D., Nitz S., Kollmannsberger H. und Drawert F., 1992: Essential oil composition of three polyploids in the *Achillea millefolium* „complex“; Phytochemistry 31, 537-542

Huber-Morath A., 1974: Die türkischen Arten der Gattung *Achillea* L.; Ber. Schweiz. Bot. Ges. 84, 123-172

Kastner U., Saukel J., Zitterl-Eglseer K., Länger R., Reznicek G., Jurenitsch J. und Kubelka W. 1992: Ätherisches Öl – ein zusätzliches Merkmal für die Charakterisierung der mitteleuropäischen Taxa der *Achillea millefolium*-Gruppe; Sci. Pharm. 60, 87-99

Kubelka W., Kastner U., Glasl S., Saukel J. und Jurenitsch J., 1999: Chemotaxonomic relevance of sesquiterpenes within the *Achillea millefolium* group; Biochem. Syst. Ecol. 27, 437-444

Nedelcheva A. et al. 1998: Morphological Investigation of naturally occurring Hybrids from Species of different *Achillea*-Sections in the Area of the Golo Burdo Mountains – Bulgaria; 46th Annual Congress Society for Medical Plant research, Posterpräsentation (Nr. A 10), Tagungsband

Nejati S. 2002: Biodiversität südosteuropäischer Schafgarben – Analyse und Nachzucht von Hybridmaterial aus Bulgarien; Dissertation, Universität Wien

Orth M., van den Berg T., und Czygan F-C. 1994: Die Schafgarbe – *Achillea millefolium* L.; Z. Phytoter. 15, 176-182

Rauchensteiner F. 2002: Biodiversität südosteuropäischer Schafgarben – Analyse von Wildaufsammlungen; Dissertation, Universität Wien

Rauchensteiner F., Nejati S., Werner I., Glasl S., Saukel J., Jurenitsch J. und Kubelka W. 2002: Determination of taxa of the *Achillea millefolium* group and *Achillea crithmifolia* by morphological and phytochemical methods I. Characterisation of Central European taxa; Sci. Pharm. 70, 199-230

Saukel J., Länger R. 1992: Die *Achillea millefolium* Gruppe (Asteraceae) in Mitteleuropa, 1; Phytol., 31, 185-207

Saukel J., Länger R., 1992: Die *Achillea millefolium* Gruppe (Asteraceae) in Mitteleuropa, 2; Phytol., 32, 159-172

Saukel J., Anchev M., Guo Y-P., Vitkova A., Nedelcheva A., Goranova V., Konakchiev A., Lambrou M., Nejati S., Rauchensteiner F. und Ehrendorfer F. 2003: Comments on the Biosystematics of *Achillea* (Asteraceae-Anthemideae) in Bulgaria; Phytologica Balcanica 9, 361-400

Stahl E. 1952: Ist der Proazulengehalt der Schafgarbe (*Achillea millefolium* L.) genetisch oder umweltbedingt?; Pharmazie 7, 863-868

Werner I. 2001: Charakterisierung von *Achillea pannonica* anhand der Terpenoide und vergleichende Untersuchungen an *Achillea* Arten mittels Infrarotspektroskopie; Dissertation, Universität Wien

Zitterl-Eglseer K., Jurenitsch J., Korhammer S. Haslinger E., Sosa S., Della Loggia R., Kubelka W. und Franz Ch. 1991: Entzündungshemmende Sesquiterpenlaktone von *Achillea setacea*; Planta Med. 57, 444-446

Anhang

Anhang 1: Zusammensetzung des Ätherischen Öles der untersuchten Individuen

Anhang 2: Ergebnisse der IR-Spektroskopie der untersuchten Individuen

Anhang 3: Lebenslauf

Anhang 1: Zusammensetzung des Ätherischen Öles der untersuchten Individuen - Einzelmerkmale

Coll.D:

	α -Pinen	Camphen	Sabinen	β -Pinen	p-Cymol	1,8-Cineol	β -Terpinen	α -Thujon	β -Thujon	Campher	Borneol	α -Terpineol	Bornylacetat	β -Caryophyllen	Elemol
RH00042	3,72	3,60	1,09	21,11	0,52	8,54	0,08	0,00	0,00	5,32	44,84	0,00	5,95	4,28	0,18
RH00044	2,10	1,89	34,95	2,73	0,30	21,24	1,49	0,44	0,00	14,92	14,04	2,71	0,38	2,78	0,34
RH00044	5,54	2,06	1,60	43,73	2,19	8,33	0,48	0,00	0,09	24,04	0,20	1,92	2,05	7,79	0,00
RH00639	2,97	1,18	0,45	22,14	0,79	47,55	0,48	0,11	0,13	5,84	14,00	1,82	2,30	0,49	0,00
RH00652	3,54	0,00	4,65	35,83	0,79	30,47	0,48	0,00	0,00	0,44	0,35	3,05	1,13	18,78	0,50
Mittelwert	3,58	1,70	8,55	25,11	0,92	23,22	0,60	0,11	0,05	10,11	14,65	2,06	2,34	6,82	0,20

Epblau

	α -Pinen	Camphen	Sabinen	β -Pinen	p-Cymol	1,8-Cineol	β -Terpinen	α -Thujon	β -Thujon	Campher	Borneol	α -Terpineol	Bornylacetat	β -Caryophyllen	Elemol
RH00673	5,81	1,56	3,96	56,48	1,23	12,72	0,75	0,00	0,00	2,90	1,73	2,18	0,07	4,83	6,18
RH00625	5,53	0,91	0,99	66,73	2,02	2,72	0,15	0,00	0,00	1,32	1,65	2,32	0,10	8,24	7,34
RH00626	5,88	0,86	0,89	70,21	2,00	2,08	0,09	0,00	0,00	0,84	1,78	2,02	0,00	6,67	6,70
Mittelwert	5,87	1,11	1,95	64,47	1,75	5,84	0,32	0,00	0,00	1,69	1,72	2,17	0,06	6,51	6,74

Elemoldominiert

	α -Pinen	Camphen	Sabinen	β -Pinen	p-Cymol	1,8-Cineol	β -Terpinen	α -Thujon	β -Thujon	Campher	Borneol	α -Terpineol	Bornylacetat	β -Caryophyllen	Elemol
RH00040	5,19	0,23	2,08	24,95	0,33	8,08	0,08	0,05	0,07	0,60	1,00	1,15	0,38	1,60	54,23

AA&rot

	α -Pinen	Camphen	Sabinen	β -Pinen	p-Cymol	1,8-Cineol	β -Terpinen	α -Thujon	β -Thujon	Campher	Borneol	α -Terpineol	Bornylacetat	β -Caryophyllen	Elemol
RH00436	4,02	1,84	2,25	1,88	4,48	45,28	0,47	0,00	0,02	26,81	2,80	5,19	1,11	3,98	0,10
RH00437	5,48	4,71	1,82	1,28	0,39	18,55	0,31	1,48	0,00	52,12	3,62	3,40	4,74	2,09	0,00
RH00443	2,57	2,38	1,74	4,38	1,39	29,99	0,37	0,00	0,08	38,58	6,37	5,09	5,74	3,35	0,00
RH00444	3,59	1,85	1,80	1,81	4,67	71,77	0,00	0,00	0,00	0,72	0,74	4,45	1,43	7,17	0,00
Mittelwert	3,91	2,70	1,90	2,28	2,73	41,39	0,29	0,37	0,02	29,05	3,38	4,53	3,26	4,14	0,02

Anhang 1: Zusammensetzung des Ätherischen Öles der untersuchten Individuen - Einzelmerkmale

Proazulenfrei

	α -Pinen	Camphen	Sabinen	b-Pinen	p-Cymol	1,8-Cineol	β -Terpinen	α -Thujon	b-Thujon	Campher	Borneol	α -Terpineol	Bornylacetat	b-Caryophyllen	Elemol
RN060030	11,31	3,72	0,24	33,69	1,11	9,45	0,09	0,10	0,10	30,40	5,54	1,27	0,69	2,00	0,00
RN060031	10,85	3,89	0,24	32,94	0,72	9,34	0,10	0,20	0,33	30,77	5,45	1,55	0,78	2,85	0,00
RN060530	2,08	4,42	0,23	4,93	0,15	9,38	0,29	0,00	0,00	62,07	1,93	0,90	7,48	5,25	0,00
RN060021	6,65	0,41	3,70	30,55	0,88	27,69	0,38	0,00	0,00	1,22	1,88	2,92	1,22	22,54	0,00
RN060262	4,24	1,58	1,85	30,87	0,51	29,51	0,00	0,27	0,00	2,54	1,12	3,83	2,65	21,42	0,00
RN060102	8,39	0,00	15,03	1,38	0,00	21,33	7,24	1,18	0,00	1,92	1,72	1,25	8,28	32,29	0,00
RN060187	6,00	0,43	2,03	65,39	1,38	16,64	0,20	0,00	0,00	0,00	1,08	1,10	2,23	3,58	0,00
RN060249	4,77	0,13	0,17	59,18	1,19	7,01	0,30	0,00	0,00	0,52	0,93	3,04	0,28	22,52	0,00
RN060528	9,88	0,00	0,84	10,41	0,57	50,87	0,00	0,00	0,31	2,58	5,83	3,39	12,78	1,40	1,58
RN060834	15,70	1,38	1,85	1,43	1,88	53,38	0,91	0,00	0,00	0,00	3,20	5,80	7,58	4,13	2,81

Eprosa

	α -Pinen	Camphen	Sabinen	b-Pinen	p-Cymol	1,8-Cineol	β -Terpinen	α -Thujon	b-Thujon	Campher	Borneol	α -Terpineol	Bornylacetat	b-Caryophyllen	Elemol
RN060022	8,38	1,84	2,33	41,28	0,58	29,14	0,49	0,18	0,00	2,88	6,08	3,67	0,00	3,19	0,00
RN060175	7,04	1,00	0,83	58,43	0,69	4,08	0,10	0,14	0,07	3,42	7,24	2,27	5,38	11,33	0,00

Anhang 1: Zusammensetzung des Ätherischen Öles der untersuchten Individuen - Einzelmerkmale

Collinoid

	α -Pinen	Camphen	Sabinen	b-Pinen	p-Cymol	1,8-Cineol	β -Terpinen	α -Thujon	b-Thujon	Campher	Borneol	α -Terpineol	Bornylacetat	b-Caryophyllen	Elemol
RN060200	12,51	4,25	0,43	31,51	0,97	5,94	0,13	0,03	0,00	5,13	31,85	0,11	0,00	7,15	0,00
RN060203	11,15	3,54	0,54	27,67	0,53	5,74	0,09	0,05	0,04	6,44	33,37	1,50	0,50	8,82	0,00
RN060205	10,54	2,99	0,51	28,69	0,65	4,81	0,21	0,00	0,00	6,29	33,79	1,30	0,47	9,75	0,00
RN060258	6,66	0,51	1,39	67,05	2,73	3,29	1,15	0,00	0,00	0,08	0,10	1,00	0,44	15,60	0,00
RN060259	12,22	3,16	1,35	19,83	2,10	6,78	0,29	0,00	0,13	1,10	40,12	1,45	0,14	11,13	0,19
RN060272	4,72	1,58	1,19	57,30	1,13	2,64	0,39	0,00	0,00	2,97	4,32	2,27	0,00	20,98	0,51
RN060273	4,63	4,44	0,93	42,05	0,88	3,53	0,10	0,00	0,04	3,57	1,27	0,75	30,81	6,58	0,42
RN060281	5,35	0,74	19,83	37,49	1,03	3,92	0,35	0,00	0,14	3,33	5,54	1,91	0,00	20,37	0,00
RN060283	5,15	0,28	4,61	50,81	1,91	15,85	0,41	0,00	0,02	0,00	0,19	1,79	0,35	18,62	0,00
RN060286	5,28	2,09	0,61	50,86	0,66	4,57	0,43	0,00	0,00	5,15	6,74	2,75	0,21	20,50	0,14
RN060606	4,36	0,61	2,33	57,24	1,19	15,55	0,00	0,00	0,00	0,47	3,17	2,52	0,00	12,56	0,00
RN060607	5,21	1,07	0,57	58,90	1,30	16,65	0,07	0,00	0,00	1,04	4,58	1,71	0,11	10,81	0,00
RN060608	4,99	2,97	2,24	50,46	1,91	6,49	0,58	0,00	0,00	0,00	1,67	1,47	12,50	10,29	4,44
RN060609	1,58	69,77	2,94	1,58	12,71	1,79	0,00	0,00	0,00	0,45	0,53	0,00	0,00	8,20	0,45
RN060610	0,72	0,00	48,50	1,62	0,28	5,98	0,74	0,00	0,00	0,25	0,20	0,00	17,61	28,13	0,00
RN060611	5,80	3,72	1,77	48,06	2,31	7,08	0,74	0,00	0,00	0,00	2,27	1,40	13,12	9,80	3,93
RN060612	5,28	0,00	2,24	64,09	1,64	6,99	0,00	0,00	0,00	0,10	0,08	1,43	0,07	18,09	0,00
RN060613	5,06	0,48	0,76	31,07	1,15	5,66	0,14	0,24	3,17	1,99	0,39	2,08	36,65	10,30	0,87
RN060614	4,52	1,48	2,58	57,24	1,42	7,13	0,12	0,00	0,00	0,12	1,97	1,28	12,79	9,37	0,00
RN060615	5,16	1,04	2,33	32,17	1,50	8,36	0,42	0,20	3,22	2,56	0,26	3,13	29,64	9,30	0,71
RN060616	4,46	0,68	1,51	30,72	1,04	4,97	0,26	0,09	2,32	1,72	0,26	2,31	38,24	10,18	1,25
RN060620	5,27	2,37	4,75	44,34	0,93	23,01	0,19	0,00	0,00	6,08	1,60	2,70	0,06	8,55	0,16
RN060623	5,27	0,13	5,61	51,14	1,65	24,91	0,15	0,00	0,00	0,00	0,27	4,25	0,00	6,53	0,10
RN060250	3,45	4,53	1,23	31,43	0,88	5,16	0,00	0,00	0,00	3,48	1,17	2,60	17,08	28,99	0,00
RN060627	1,70	0,00	68,69	2,77	0,75	11,64	0,83	0,00	0,00	0,00	0,42	0,66	0,00	12,33	0,00
RN060630	0,68	0,00	69,85	2,59	1,14	11,81	1,07	0,00	0,00	0,00	0,30	0,62	0,08	11,66	0,00
RN060631	10,90	0,14	9,07	36,77	1,26	34,08	0,29	0,00	0,05	0,00	0,35	2,26	0,00	4,83	0,00
RN060632	14,02	0,34	1,61	54,09	1,65	14,59	0,17	0,00	0,04	0,00	0,91	3,77	0,00	8,82	0,00
RN060633	7,03	0,22	26,61	33,08	1,61	15,67	0,18	0,00	0,00	0,00	0,82	3,79	0,00	10,69	0,00
RN060635	14,48	0,27	1,25	54,13	1,84	14,18	0,20	0,00	0,05	0,00	0,74	3,87	0,00	8,99	0,00

Anhang 1: Zusammensetzung des Ätherischen Öles der untersuchten Individuen - Einzelmerkmale

Prozentinhalt

	α -Pinen	Camphen	Sabinen	b-Pinen	p-Cymol	1,8-Cineol	β -Terpinen	α -Thujon	b-Thujon	Campher	Borneol	α -Terpineol	Bornylacetat	b-Caryophyllen	Elemol
RN060041	20,37	0,25	1,64	38,39	0,75	12,75	0,24	0,58	0,07	2,15	1,74	2,84	4,88	15,35	0,00
RN060043	21,24	0,31	1,30	39,03	0,82	12,18	0,22	0,00	0,00	2,08	1,75	4,43	2,24	14,40	0,00
RN060208	18,17	0,33	8,37	38,20	1,52	27,75	0,28	0,00	0,00	0,68	1,53	0,88	0,00	8,34	0,00
RN060208	4,65	2,63	2,21	28,09	0,00	17,82	0,00	0,00	0,00	8,39	0,98	2,83	20,09	12,51	0,00
RN060210	3,48	1,90	4,48	38,98	0,77	24,78	0,57	0,00	0,00	4,88	2,85	4,35	12,80	2,39	0,00
RN060184	5,23	0,74	2,30	45,44	0,73	23,54	0,19	0,33	0,40	3,31	1,01	3,59	0,00	13,04	0,13
RN060201	1,77	0,09	69,84	4,81	2,46	11,54	3,69	0,00	0,00	0,38	1,05	0,00	0,00	4,58	0,00
RN060183	3,38	0,08	58,31	3,31	1,25	5,88	1,90	0,00	0,07	0,49	0,39	0,31	3,29	21,39	0,00
RN060189	5,78	0,20	2,39	64,82	1,89	10,34	0,24	0,00	0,00	0,00	0,37	1,82	0,35	12,22	0,00
RN060251	4,11	0,20	30,91	34,63	2,13	18,80	2,37	0,00	0,00	0,00	0,19	2,27	0,06	6,15	0,18
RN060295	5,39	0,25	2,23	62,38	2,22	8,89	0,28	0,00	0,08	0,09	0,83	4,54	10,44	4,81	0,00
RN060298	3,44	0,00	33,18	38,08	1,13	13,98	0,97	0,18	0,00	0,19	0,00	2,57	0,00	8,28	0,00
RN060621	5,48	0,17	3,81	57,27	1,58	18,31	0,19	0,00	0,10	0,01	0,24	2,81	0,08	12,20	0,00
RN060217	5,00	5,00	0,88	42,81	1,12	3,59	0,17	0,00	0,00	4,80	1,48	0,78	28,14	6,14	0,34
RN060619	3,50	0,72	1,18	31,39	1,23	5,46	0,12	0,00	3,50	2,07	0,46	2,13	39,31	8,35	0,59
RN060624	5,58	2,24	0,78	64,74	0,79	5,97	0,18	0,00	0,18	9,88	0,84	1,19	0,25	7,41	0,00
RN060191	7,09	2,02	0,18	19,53	0,89	0,70	0,19	0,10	0,08	22,42	2,73	0,52	13,18	30,39	0,00
RN060254	5,89	12,48	0,89	8,12	0,27	8,88	0,17	0,72	3,31	11,08	8,38	0,80	38,89	4,98	0,00
RN060255	5,08	11,15	0,77	7,88	0,22	8,09	0,85	0,48	2,99	12,08	8,55	0,83	39,79	5,89	0,00
RN060198	4,02	2,25	11,80	20,46	1,89	9,54	0,78	0,00	0,00	0,57	41,85	1,82	0,00	5,23	0,00
RN060627	3,85	5,57	0,77	3,13	0,32	13,02	0,17	0,00	0,13	67,62	0,73	0,88	2,05	1,98	0,00

Anhang 1: Zusammensetzung des Ätherischen Öles der untersuchten Individuen - Summenmerkmale
 Coll D.

	Campher+ Bornesol	α -Pinen+1,8-Cineol	Sabinen, b-Pinen, Caryophyllen
RN060042	49,98	12,28	28,48
RN060044	28,98	23,34	40,46
RN060204	24,24	13,87	53,12
RN060520	19,84	50,52	23,08
RN060552	0,79	34,00	59,24
Mittelwert	24,78	28,80	40,48

Eptilau

	Campher+ Bornesol	α -Pinen+1,8-Cineol	Sabinen, b-Pinen, Caryophyllen
RN060573	4,64	18,33	65,07
RN060625	2,97	8,25	75,97
RN060628	2,62	7,94	77,77
Mittelwert	3,41	11,51	72,93

Elemoldominiert

	Campher+ Bornesol	α -Pinen+1,8-Cineol	Sabinen, b-Pinen, Caryophyllen
RN060040	1,60	13,28	28,62

AA Srot

	Campher+ Bornesol	α -Pinen+1,8-Cineol	Sabinen, b-Pinen, Caryophyllen
RN060436	29,61	49,28	7,89
RN060437	55,74	24,03	5,19
RN060443	42,93	32,56	9,45
RN060444	1,48	75,36	10,78
Mittelwert	32,44	45,31	8,33

Anhang I: Zusammensetzung des Ätherischen Öles der untersuchten Individuen - Summenmerkmale

Proazulenfrei

	Campher+ Bornesol	α -Pinen+1,8-Cineol	Sabinen,b-Pinen, Caryophyllen
RN060030	35,93	20,75	35,93
RN060031	36,22	20,18	36,03
RN060530	64,00	12,37	10,41
RN060021	3,09	34,34	58,79
RN060362	3,66	33,75	53,94
RN060192	3,64	29,72	48,70
RN060187	1,08	22,64	70,98
RN060249	1,45	11,77	81,85
RN060528	8,41	60,53	12,45
RN060634	3,20	69,06	7,41

Eprosa

	Campher+ Bornesol	α -Pinen+1,8-Cineol	Sabinen,b-Pinen, Caryophyllen
RN060022	8,92	37,52	48,81
RN060175	10,66	11,11	68,59

Anhang 1: Zusammensetzung des Ätherischen Oles der untersuchten Individuen - Summenmerkmale

Colloid

Diagramm 10

	Campher+ Borneol	α -Pinen+1,8-Cineol	Sabinen,b-Pinen, Caryophyllen
RN000200	36,98	15,44	39,09
RN000203	39,81	15,89	37,04
RN000205	40,08	15,35	38,94
RN000258	0,17	9,95	84,04
RN000259	41,22	19,00	32,31
RN000272	7,30	7,98	79,47
RN000273	4,84	5,18	49,57
RN000281	8,87	9,28	77,89
RN000283	0,19	21,00	74,05
RN000286	11,89	9,85	71,97
RN000606	3,64	19,91	72,12
RN000607	5,60	21,86	68,28
RN000608	1,67	11,48	82,99
RN000609	0,98	5,37	12,72
RN000610	0,45	5,68	74,25
RN000611	2,27	12,88	59,63
RN000612	0,18	12,27	84,41
RN000613	2,38	10,72	42,12
RN000614	2,09	11,85	89,19
RN000615	2,82	13,52	43,80
RN000616	1,98	9,43	42,40
RN000620	7,69	28,28	57,95
RN000623	0,27	30,18	69,27
RN000250	4,65	8,61	61,85
RN000627	0,42	13,34	83,79
RN000630	0,30	12,69	84,10
RN000631	0,35	44,97	50,67
RN000632	0,91	28,81	64,52
RN000633	0,82	22,70	70,69
RN000635	0,74	28,68	64,37

Anhang 1: Zusammensetzung des Ätherischen Öles der untersuchten Individuen - Summenmerkmale

Prozentwert (%)

	Campher+ Bornool	α -Pinen+1,8-Cineol	Sabinen, β -Pinen, Caryophyllen
RN080041	3,89	33,13	53,38
RN080043	3,84	33,42	54,72
RN080208	2,19	43,92	50,91
RN080208	9,37	22,48	42,80
RN080210	7,52	28,25	43,85
RN080184	4,33	28,77	60,78
RN080201	1,41	13,31	79,03
RN080183	0,88	9,24	83,02
RN080189	0,37	18,10	79,43
RN080251	0,19	20,91	71,89
RN080295	0,73	12,28	89,21
RN080298	0,19	17,42	77,54
RN080621	0,25	21,77	73,27
RN080217	8,08	8,59	49,81
RN080619	2,52	8,98	40,91
RN080624	10,70	11,55	72,69
RN080191	25,15	7,79	50,10
RN080254	19,48	12,35	13,77
RN080255	18,61	11,18	14,32
RN080198	42,42	13,55	37,49
RN080527	68,34	18,68	5,88

[illegible]

Anhang 2: Ergebnisse der IR-Spektroskopie der untersuchten Individuen															
RN60044		RN60175		RN60183		RN60184		RN60187		RN60188		RN60191			
Wellenzahl (1/cm)	Peakgröße	Wellenzahl (1/cm)	Peakgröße	Wellenzahl (1/cm)	Peakgröße	Wellenzahl (1/cm)	Peakgröße	Wellenzahl (1/cm)	Peakgröße	Wellenzahl (1/cm)	Peakgröße	Wellenzahl (1/cm)	Peakgröße		
3048.32	1.30	4453.03	12.80	4453.08	13.90	4456.08	9.50	4455.08	14.30	4455.43	13.70	4454.3	16.54		
3028.33	1.40	4353.78	7.40	4354.18	7.09	3943.01	1.60	3733.88	8.35	4353.28	8.35	4355.42	10.00		
3011.37	1.38	4187.34	8.87	4187.83	9.15	3727.75	1.81	3445.54	43.38	3842.38	1.38	4254.84	11.38		
3755.1	1.33	3844.03	5.37	3845.33	5.47	3844.08	1.50	3258.18	38.45	3727.38	1.38	4186.39	12.88		
3727.7	1.33	3845.01	3.89	3805.71	3.30	3452.84	34.80	3921.08	80.80	3453.71	43.33	3845.35	9.43		
3827.38	1.44	3827.38	2.94	3856.48	3.01	3827.68	23.00	3853.08	71.31	3856.48	48.81	3854.35	7.06		
3802.45	1.33	3757.87	3.33	3841.68	2.88	3816.68	48.05	3980.68	27.19	3874.4	75.05	3846.12	6.81		
3423.75	19.90	3737.37	3.79	3823.88	3.83	3853.21	48.34	3938.88	34.85	3821.37	80.17	3838.89	6.48		
3858.21	25.11	3864.54	4.32	3835.39	3.81	3381.58	38.88	1755.31	84.35	3852.38	83.34	3870.71	8.58		
3821.48	87.91	3454.03	24.13	3753.68	3.89	3340.04	23.33	1713.38	83.01	3380.38	38.18	3785.34	7.12		
3853.03	49.40	3865.21	27.70	3727.38	4.89	1780.85	103.00	1848.18	41.24	3340.08	38.64	3715.85	5.45		
3588.88	50.37	3843.18	45.45	3853.13	5.85	1713.33	88.78	1813.03	18.78	1775.88	83.87	3881.38	16.01		
3338.83	35.47	3825.18	58.75	3878.51	4.37	1887.48	84.85	1487.01	48.37	1788.3	72.78	3841.31	8.31		
3775.88	88.33	3875.01	34.84	3851.18	4.80	1835.8	57.37	1378.71	88.37	1791.88	88.33	3475.88	38.88		
3803.83	72.38	3863.38	38.83	3474.68	18.23	1818.68	84.45	1234.17	82.11	1848.4	31.23	3886.48	34.83		
1834.75	44.88	3888.88	10.34	3888.84	38.34	1813.3	8.35	1881.83	82.43	1832.18	7.88	3878.7	83.81		
1817.47	85.18	3471.11	8.83	3877.33	35.35	1483.81	34.78	1834.74	100.00	1488.33	43.38	3877.85	75.31		
1814.38	8.38	3581.14	22.34	3428.43	42.83	1438.38	45.18	737.43	78.01	1378.88	88.88	3874.87	48.08		
1443.54	33.13	3338.88	17.89	3878.04	28.74	1378.83	88.83	785.34	48.83	1384.04	81.45	3884.35	48.38		
1378.78	38.83	1775.83	48.83	3884.01	38.89	1313.43	41.88	481.33	54.35	1338.3	88.37	3738.14	11.38		
1328.83	30.34	1714.38	43.35	3888.81	8.78	1388.18	84.33	454.33	33.34	1181.8	88.31	3887.38	10.08		
1284.88	30.38	1887.33	32.18	3335.13	5.78	1251.48	88.33	384	33.88	1258.73	100.00	3412.31	5.88		
1283.83	45.37	1827.88	3.88	3471.15	8.87	1210.33	88.88	381.88	31.85	370.4	88.45	3488.84	-31.41		
1243.38	48.70	1818.18	18.47	3381.15	38.88	1188.28	35.38			881.34	31.34	3383.78	3.88		
1264.9	88.87	1488.11	28.33	3338.88	28.33	1121.38	38.88			788.78	38.88	2234.71	3.88		
1178.48	34.31	1378.71	32.31	1775.38	54.58	1088.8	82.18			737.31	81.08	1778.34	100.00		
1184.38	57.82	1388.74	71.38	1758.18	35.45	1034.27	88.33			785.28	48.38	1738.7	88.33		
1188.83	51.38	1181.88	80.81	1712.48	38.44	1004.88	82.72			848.38	38.84	1713.38	78.71		
1134.37	44.88	1013.03	45.18	1847.14	15.37	874.85	78.74			888.85	22.78	1843.18	34.84		
864.3	180.00	868.83	28.33	1838.38	12.18	838.7	48.34			481.37	48.88	1838.4	18.38		
888.88	28.33	832.18	18.33	1858.73	3.85	888.38	38.77			471.75	34.77	1851.89	3.43		
888.5	31.57	738.88	100.00	1818.87	5.13	883.18	38.43			342.81	28.87	1812.34	6.45		
821.43	28.38	784.23	48.88	1488.88	23.44	827.38	23.84			388.28	34.71	1488.8	48.38		
775.13	18.38	868.18	18.88	1423.3	23.84	775.07	17.78					1377.33	83.54		
738.88	38.34	578.88	11.48	1377.75	38.85	738.33	88.88					1388.87	83.87		
684.42	18.57	488.88	18.38	1388.84	77.83	701.48	28.81					1238.39	88.37		
648.87	28.37	488.78	18.85	1181.88	47.79	687.1	38.43					1181.35	88.88		
617.39	17.39	388.71	11.34	1017.47	41.73	688.88	38.85					1044.81	83.38		
584.47	28.34			887.33	38.85	538.33	38.78					883.9	43.18		
482.83	43.83			888.33	38.88	483.81	31.38					888.79	18.43		
488.14	28.83			883.71	13.85	428.38	18.33					848.39	18.81		
388.34	17.37			844.4	12.41	488.38	18.84					783.34	11.12		
				758.51	103.84	388.35	28.43					737.85	88.17		
				784.83	88.49							784.84	57.87		
				888.88	8.43							883.88	6.73		
				877.34	8.35							844.34	18.43		
				488.78	17.88							883.18	18.88		
				413.37	8.83							878.87	18.88		
				388.88	18.18							835.89	18.31		
				388.13	18.18							885.35	18.88		
												488.77	13.43		
												383.38	13.43		
												378.82	17.18		

Anhang 2: Ergebnisse der IR-Spektroskopie der untersuchten Individuen													
RN000001	Peakgröße	RN000210	Peakgröße	RN000217	Peakgröße	RN000246	Peakgröße	RN000254	Peakgröße	RN000255	Peakgröße	RN000251	Peakgröße
Wellenzahl (1/cm)		Wellenzahl (1/cm)		Wellenzahl (1/cm)		Wellenzahl (1/cm)		Wellenzahl (1/cm)		Wellenzahl (1/cm)		Wellenzahl (1/cm)	
4455,83	15,74	4454,78	14,02	3902,32	8,80	3852,68	8,79	4454,43	13,25	3822,57	8,54	3854,18	8,08
4382,08	12,48	4358	8,85	3754,98	13,20	3732,3	8,40	3856,11	5,11	3830,98	8,37	3830,98	7,90
4257,4	11,83	4255,41	9,08	3674,16	11,25	3674,31	8,11	3839,93	4,88	3822,23	4,83	3802,21	8,15
4203	12,52	4188,9	10,30	3648,04	13,00	3648,25	8,47	3822,18	3,81	3735,45	8,18	3735,35	11,73
3947,83	9,30	3948,78	7,48	3648,33	48,30	3626,04	8,15	3735,38	7,13	3675,34	8,39	3675,38	8,98
3903,17	8,33	3793,38	5,90	3587,42	23,77	3586,33	8,19	3874	7,28	3648,37	7,92	3648,37	11,73
3838,74	7,58	3714,42	4,55	3523,34	88,23	3523,68	103,00	3649,18	8,54	3631,48	38,52	3649,39	34,55
3802,43	7,21	3681,08	8,47	3523,58	84,24	3520,35	87,88	3648,08	58,33	3675,58	58,24	3676,5	77,18
3751,82	8,21	3675,87	39,48	3500,91	87,81	3500,68	37,42	3658,38	32,10	3630,98	88,37	3631,38	47,73
3714,39	8,58	3657,68	33,30	3548,08	49,90	3548,39	37,33	3678,3	88,48	3652,02	41,33	3588,85	84,75
3648,72	13,88	3675,68	88,71	1773,84	103,00	1894,68	88,02	3650,93	62,51	3380,97	22,80	3560,19	48,88
3675,83	48,18	3628,81	89,21	1714,98	88,85	1847,88	38,08	3380,98	47,87	3548,03	17,83	1774,51	100,00
3587,37	39,88	3583,38	42,58	1848,88	42,85	1825,00	38,89	3548,14	38,87	1775,58	100,00	1775,84	88,00
3523,31	100,00	3588,03	8,59	1827,8	17,44	1827,8	8,45	1774,38	82,78	1737,38	77,88	1648,94	32,88
3583,15	70,37	3523,05	5,30	1841,18	18,52	1841,17	10,33	1714,48	89,73	1714,94	84,88	1590	18,90
3582,32	2,81	3413,58	5,30	1808,88	21,14	1808,88	18,48	1848,91	38,37	1847,58	34,87	1841,15	21,88
3337,84	3,13	3383,07	3,79	1458,94	81,35	1458,83	37,84	1858,33	18,17	1858,34	7,80	1808,35	21,88
1773,85	88,79	3254,83	3,33	1378,73	88,18	1377,88	28,81	1841,28	18,03	1841,18	8,34	1487,89	48,27
1737,81	84,38	1775,18	87,48	1382,87	83,37	1278,0	42,48	1808,88	21,73	1808,38	8,94	1335,71	88,03
1713,87	85,74	1737,84	78,85	1181,18	88,91	1222,07	37,87	1487,98	53,88	1487,13	48,48	1235,88	91,88
1648,83	32,83	1709,44	78,14	1098,38	85,12	1098,02	38,88	1375,48	81,48	1374,71	87,18	1180,71	88,38
1588,81	8,85	1642,08	35,12	984,08	82,88	1083,78	33,88	1385,33	88,88	1288,18	43,38	1084,18	78,34
1541,87	8,35	1618,42	35,17	737,8	88,25	947,88	38,28	1234,34	78,87	1237,73	88,88	884,48	84,87
1518,47	13,34	1518,38	7,32	702,78	48,74	886,43	38,75	1180,32	88,18	1181,7	88,47	738,34	51,84
1458,88	58,21	1488,78	43,54	631,64	34,42	858,48	38,38	1057,58	78,83	1035,88	88,33	103,58	38,73
1388,83	73,10	1338,3	83,42	618,13	18,52	747,88	31,37	740,78	100,00	883,48	58,18	488,82	34,78
1288,74	88,82	1285,84	88,88			886,52	18,17	703,84	58,18	645,37	21,34	418,88	18,84
1237,87	82,31	1243,88	80,82					488,98	31,47	784,74	11,38		
1182,35	81,44	1208,41	54,51					418,58	38,38	758,8	58,53		
1088,87	48,75	1183,38	75,38					388,82	38,31	702,31	18,23		
1028,17	88,18	1032,48	87,28							647,32	18,34		
967,88	47,80	1021,84	81,03							806,31	17,11		
898,84	34,88	974	48,78							594,7	20,81		
848,88	17,58	887,81	33,10							418,5	11,01		
738,44	80,78	881,75	14,54										
703,88	54,80	738,3	100,00										
682,82	10,87	703,78	85,88										
668,78	18,88	688,53	15,32										
618,18	18,28	688,87	18,71										
631,88	32,78	631,84	18,45										
488,88	32,41	608,77	18,48										
588,77	22,38	488,88	18,83										

[illegible]

[illegible]

[illegible]

Anhang 2: Ergebnisse der IR-Spektroskopie der untersuchten Individuen													
RH900013		RH900014		RH900015		RH900016		RH900019				RH900020	
Wellenzahl (1/cm)	Peakgröße	Wellenzahl (1/cm)	Peakgröße	Wellenzahl (1/cm)	Peakgröße	Wellenzahl (1/cm)	Peakgröße	Wellenzahl (1/cm)	Peakgröße			Wellenzahl (1/cm)	Peakgröße
4391,60	24,00	4333,3	24,28	3336,33	4,51	4319,28	28,43	3635,05	6,59			3635,14	6,43
4087	10,99	4361,28	27,22	3734,82	7,31	4391,11	32,10	3675,18	6,23			3735,28	13,82
3494,81	89,72	4086,86	20,47	3445,13	44,75	4086,86	26,82	3654,37	6,61			3708,44	10,83
3093,51	29,34	3484,38	89,10	2915,34	54,25	3485,44	88,78	3642,01	6,53			3421,51	28,02
2933,43	77,38	3058,73	37,90	2851,18	37,54	3058,67	45,70	3625,18	6,27			2820,81	58,28
2887,27	85,48	2932,13	82,81	2591,12	82,28	2932,18	88,48	3605,88	6,40			2851,88	203,98
2606,23	6,89	2696,32	72,41	2336,62	29,87	2696,08	79,79	3752,86	18,88			2381,15	106,04
2582,83	10,88	2582,88	5,41	1774,34	51,48	2582,83	5,85	3737,98	11,43			2340,82	78,24
2336,82	10,81	2548,58	0,31	1687,78	103,80	2336,82	28,79	3692,98	11,43			1776,21	87,72
2274,47	6,32	2514,21	5,82	1496,86	28,48	2337,88	23,89	3676,08	11,70			1715,88	51,28
2117,64	7,41	2374,8	7,51	1436,18	37,59	2374,25	6,73	3652,22	12,88			1689,66	84,88
2046,89	6,39	2117,3	8,02	1398,11	83,86	2117,27	6,87	3631,98	14,88			1541,88	7,68
1982,44	6,38	2048,82	8,81	1284,28	87,33	2048,42	8,75	3609,48	17,88			1507,2	13,28
1887,21	180,88	1981,81	5,82	1181,87	29,88	1981,84	7,25	3448,18	27,20			1487,88	28,48
1498,87	89,22	1773,87	29,87	1097,81	49,86	1874,78	182,82	3656,32	18,80			1386,12	45,88
1438,83	78,42	1687,24	180,88	1062,8	25,84	1498,21	88,33	3627,14	21,24			1258,42	52,88
1418,44	83,38	1498,23	71,32	894,88	7,54	1438,88	87,87	3613,98	41,83			1181,88	48,84
1343,3	85,38	1438,88	81,58	746,82	74,28	1408,82	90,87	3581,88	81,18			1098,4	34,28
1284,83	75,81	1418,88	85,28	683,2	28,88	1388,88	87,14	3560,3	82,88			1080,18	21,82
1181,27	23,17	1398,18	85,28	488,2	18,86	1288,87	84,84	1776,78	88,87			884,81	28,87
1087,79	80,80	1288,88	79,85	413,77	18,17	1181,38	32,13	1758,21	78,84			848,88	6,88
1083,21	88,21	1182,48	28,15			1087,23	83,82	1671,82	188,22			748,51	48,82
888,42	12,12	1087,82	81,88			1083,91	88,22	1545,4	15,28			688,77	28,88
733,88	28,24	1083,88	83,88			888,48	17,88	1488,8	43,82			445,88	11,82
681,28	79,22	1018,45	24,82			733,2	78,22	1388,18	88,22				
578,88	48,22	888,42	18,28			688,44	51,84	1284,82	88,87				
488,18	25,88	733,84	82,18			681,4	85,78	1182,18	82,72				
		688,22	24,88			578,44	48,84	1098,28	44,22				
		681,42	79,88			488,8	44,18	1081,82	43,88				
		538,82	41,41					884,47	27,14				
		488,28	48,88					741,88	87,12				
		488,12	29,48					732,87	41,87				
								688,8	28,88				
								488,88	14,82				
								388,28	17,22				
								388	12,78				

Anhang 2: Ergebnisse der IR-Spektroskopie der untersuchten Individuen													
RNH00023		RNH00024		RNH00025		RNH00026		RNH00027		RNH00028		RNH00029	
Wellenzahl (1/cm)	Peakgröße	Wellenzahl (1/cm)	Peakgröße	Wellenzahl (1/cm)	Peakgröße	Wellenzahl (1/cm)	Peakgröße	Wellenzahl (1/cm)	Peakgröße	Wellenzahl (1/cm)	Peakgröße	Wellenzahl (1/cm)	Peakgröße
3682.79	12.48	3684.84	8.37	3684.3	10.33	4732.34	14.83	4737.43	10.59	4791.03	10.07	4790.42	10.00
3688.4	15.41	3685.88	7.50	3685.61	10.85	3850.67	6.81	3855.83	11.34	3480.85	58.33	3688.31	14.83
3693.03	10.03	3690.65	7.45	3690.42	10.85	3735.63	12.85	3690.76	11.03	3693.11	36.84	3691.91	16.81
3693.14	11.49	3692.34	8.87	3691.98	10.45	3890.07	10.84	3892.3	10.43	3894.11	36.73	3893.88	15.84
3698.63	11.78	3694.38	8.35	3693.96	10.17	3454.54	38.88	3734.04	18.88	3891.07	6.33	3690.14	14.83
3752.88	14.08	3758.38	12.55	3758.8	12.70	3981.58	13.02	3759.07	13.39	3758.97	7.38	3753.38	21.38
3757.11	10.38	3682.58	9.31	3691.77	12.55	3890.55	36.43	3874.03	13.85	1685.38	5.33	3709.98	16.77
3863.08	10.31	3877.08	8.48	3875.58	13.88	3381.33	67.33	3447.58	38.83	1887.9	100.00	3872.13	18.48
3878.17	14.41	3881.3	8.48	3883.67	47.89	3340.18	70.84	3893.37	18.84	1487.58	38.80	3847.33	22.38
3883.27	14.53	3832.04	11.00	3833.35	34.80	1888.03	103.03	3381.15	75.85	1439.89	41.59	3445.74	40.83
3932.08	17.00	3948.7	10.15	3968.5	23.84	1958.45	13.15	3389.87	87.14	1411.38	48.81	2632.35	51.34
3938.89	17.75	3958.68	9.48	3981.38	43.00	1581.53	15.83	1718.11	58.35	1390.38	75.88	3883	52.07
3448.18	22.82	3447.08	9.00	3540.17	33.55	1958.45	28.48	1886.44	100.04	1258.47	38.48	2380.77	88.38
2918.54	48.34	2918.37	21.78	1888.22	183.00	1438.02	51.31	1887.88	8.77	1880.31	83.08	2332.88	83.88
2881.18	39.38	2880.12	14.44	1958.53	10.35	1390.13	88.51	1541.14	8.83	1084.04	37.74	1773.85	38.67
2581.72	180.00	2581.31	100.00	1542.08	11.32	1258.88	37.18	1958.72	15.74	883.8	13.58	1715.93	57.78
2548.88	75.88	2548.43	75.85	1487.88	28.38	1178.14	15.13	1438.34	18.33	888.3	18.43	1870.5	180.00
1778.38	88.82	1774.37	18.35	1458.73	32.79	1887.81	43.11	1391.1	58.87	758.4	21.00	1888.85	11.34
1718.03	50.11	1717.78	18.85	1411.61	38.44	1884.08	21.17	1257.54	17.31	882.04	48.33	1540.34	14.13
1870.82	48.81	1870.75	22.80	1390.44	89.39	1988.57	13.39	1190.01	28.88	811.88	43.35	1986.4	21.81
1882.78	15.38	1882.41	8.78	1357.08	28.80	880.34	3.85	748.31	38.81	488.35	13.78	1488.81	38.04
1843.88	14.01	1843.37	8.84	1888.38	48.78	792.83	81.04	886.57	28.48	588.3	11.81	1388.73	48.38
1888.87	18.48	1832.53	8.89	1884.35	17.87	888.88	37.38	818.71	18.48	373.78	38.88	1388.47	38.43
1488.31	30.38	1808.04	9.00	888.61	1.83	577.43	3.84	418.87	8.88			1188.81	34.34
1378.58	35.73	1488.83	12.12	750.14	22.41	488.82	6.73	480.88	6.84			1088.89	38.57
1283	80.31	1288.08	11.39	882.83	25.81	418.48	10.74	380.73	7.92			1081.9	22.03
1182.88	43.00	1215.98	18.79	554.4	13.02	388.51	18.83	375.33	18.03			888.74	27.41
1088.74	31.88	1288.76	20.00	380.18	13.11	378.28	21.84					488.85	15.88
884.11	22.82	11881	10.45	380.08	14.44							418.4	14.75
788.33	88.87	1108.88	8.55									383.11	25.37
618.84	38.38	788.43	87.45									374.2	53.88
531.81	11.54	888.88	20.87										
488.88	12.88	487.4	8.22										
388.15	8.37	418.38	8.22										
		378.27	4.83										
									</				

Anhang 3

Lebenslauf

Peter Leidenmühler
Johannitergasse 7/10
1100 Wien

geboren am 5. Mai 1976 in Haslach an der Mühl

Eltern: Leidenmühler Franz, ÖBB-Bediensteter
 Leidenmühler Maria, geb. Kepplinger, Hausfrau

Ausbildung:	1982-1986	Volksschule in Haslach an der Mühl
	1986-1994	Bundesrealgymnasium, 4150 Rohrbach
	Juni 1994	Matura
	WS 94/95	Beginn Studium Biologie/ Botanik und Biologie und Erdwissenschaften-Lehramt an der Universität Wien
	März-Juli 2000	praktische Arbeiten zur vorliegenden Diplomarbeit
	Seit März 2003	Studium der Internationalen Entwicklung/Afrikanistik An der Universität Wien

Berufliche Tätigkeit:

2001-2007	VIAS – Rollstuhlservice Flughafen Wien
Seit 2007	Angestellter Baxter Innovations GesmbH Experimentelle Pharmakologie

Sonstige Tätigkeiten:

Seit 2003	Sprecher und Vorstandsmitglied der entwicklungs- und integrationspolitischen NGO „Dar al Janub - Verein für Antirassistische und Friedenspolitische Initiative“, verschiedene Auslandsaufenthalte im Rahmen dieser Tätigkeit
-----------	--

