

Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie, Universität Würzburg¹ und Institut für Lebensmittelchemie, Universität Frankfurt/Main² Germany

Enantiomere Monoterpene im ätherischen Öl von *Achillea millefolium* s. l. – eine zusätzliche taxonomische Bestimmungshilfe?

M. ORTH¹, D. JUCHELKA², A. MOSANDL² UND F.-CH. CZYGAN¹

Der *Achillea millefolium*-Komplex ist eine Gruppe morphologisch schwierig zu differenzierender Arten. Morphometrische Untersuchungen allein ersetzen daher nicht die Suche nach weiteren Bestimmungshilfen. Eine eindeutige Charakterisierung von Arten, Hybriden und Übergangsformen innerhalb der *Achillea-millefolium*-Gruppe ist nicht nur aus taxonomischer Sicht, sondern auch aufgrund einer besseren Qualitätsbeurteilung einer Schafgarbendroge (*Millefolii herba*) wünschenswert. Ein Großteil des Drogenmaterials stammt auch heute noch aus Wildsammlungen. Mischungen mit *Achillea*-Arten, die unerwünschte allergisierende Inhaltsstoffe führen, sind jedoch rein morphologisch nicht immer auszuschließen. Untersuchungen anhand einiger ausgewählter chiraler Monoterpene im ätherischen Blütenöl der Schafgarbe sollten erste Anhaltspunkte geben, ob auch enantiomere Inhaltsstoffe zur Differenzierung der Schafgarben-Arten herangezogen werden können. Aufgrund ihrer Häufigkeit im ätherischen Schafgarbenöl wurden zu vergleichenden Analysen die Stereoisomeren von α -Pinen, β -Pinen und Sabinen ausgewählt. Mittels M.C.S.S.-Systems (Moving Capillary Stream Switching) gelang die direkte Stereodifferenzierung dieser Komponenten aus destillierten und mittels Headspace bei Raumtemperatur gewonnenen Blütenölen. Die ausgewählten Monoterpene zeigten keine von der Methode der Ölgewinnung abhängige Stereoisomerenverteilung. Auch standort- oder entwicklungsbedingte Unterschiede wurden nicht festgestellt. Die Enantiomerenmuster verschiedener Arten, deren Hybriden und Übergangsformen sind jedoch unterschiedlich. Diese Ergebnisse liefern erste Anhaltspunkte, auch enantiomere Verbindungen als zusätzliche Bestimmungshilfe zu nutzen. Allerdings sind Untersuchungen aller Arten des *Achillea millefolium*-Komplexes und eventuell auch zusätzlicher chiraler Komponenten nötig, um diese Ergebnisse abzusichern.

Chiral monoterpenes as taxonomically useful markers for *Achillea* species differentiation

The *Achillea millefolium* complex is a group of taxonomically hardly separable species. Yarrow has the tendency to hybridize and to vary in phenotype. An obvious characterization of the species or hybrids is not just important for the taxonomical distinction but also for a reliable assessment of herbal drug quality. Most of the *Achillea* plants are still gathered from natural populations. According to the variation in phenotype, mixtures with *Achillea* species, which contain allergy setting compounds, often cannot be determined. Morphometric investigations exclusively do not replace a further chemical characterization. Therefore we tried to assess the composition of the chiral monoterpenes α -pinene, β -pinene and sabinene. They were selected because of their frequency in the essential oil of *Achillea* species. By method of M.C.S.S. (Moving Capillary Stream Switching) the differentiation of stereoisomers succeeded directly from the essential oil, which was distilled or extracted by headspace trapping at room temperature. The enantiomeric distribution neither depends on the method of extraction, nor on the habitat or the developmental stage of yarrow. Since the compositions of enantiomers from several *Achillea* species and their hybrids are of different pattern, it seemed to represent an additional marker. Though investigations of all species within the *Achillea millefolium* group and possibly of further chiral compounds are necessary to ensure these results.

1. Einleitung

Da die meisten natürlichen Stoffe asymmetrisch sind und viele Lebensprozesse stereospezifisch ablaufen, gilt der Isolierung und Zusammensetzung enantiomerer Inhaltsstoffe ein zunehmendes Interesse. Die Verteilung chiraler Verbindungen kann zur Qualitätsbeurteilung und -kontrolle von Fertigarzneimitteln, Drogen mit ätherischem Öl sowie von ätherischen Ölen selbst hilfreich sein [1]. Chirale Inhaltsstoffe sind aber nicht nur aus pharmazeutischer Sicht interessant. Sie können möglicherweise auch einen Beitrag zum Verständnis taxonomischer Zusammenhänge leisten.

Die Arten des *Achillea-millefolium*-Komplexes sind bekannt für ihre morphologische Vielgestaltigkeit und für die Problematik bei der taxonomischen Differenzierung [2–5]. Daher wurde die Enantiomerenverteilung cyclischer Monoterpene aus verschiedenen Arten der *Achillea-millefolium*-Gruppe hier erstmals unter chemotaxonomischen Aspekten untersucht. Eine hinreichende Differenzierung der Schafgarben-Arten spielt auch für die Qualitätskontrolle der seit jeher als Arzneipflanze genutzten Schaf-

garbe eine wichtige Rolle. Denn einige Arten dieser Gruppe enthalten die als Auslöser der Schafgarbendermatitis diskutierten Sesquiterpenlactone und Guaianolid-Peroxide [6–8]. Es sind Inhaltsstoffe, die gerade in einer Zeit, in der sich Allergien zur Volkskrankheit entwickelt haben, unerwünscht sind.

Anhand einer für eine *Achillea*-Art spezifischen Enantiomerenverteilung könnten möglicherweise die chiralen Verbindungen als zusätzliche chemische Marker zur taxonomischen Einordnung und Qualitätsbeurteilung einer Art herangezogen werden.

2. Untersuchungen und Ergebnisse

Zunächst wurde der mögliche Einfluss des Standortes auf die Verteilung der enantiomeren Monoterpene α -Pinen, β -Pinen und Sabinen untersucht. Abb. 1 zeigt die Verteilung der Enantiomerenpaare von Pinen und Sabinen im ätherischen Öl von Wildpflanzen (Guttenberger Forst) und Kulturpflanzen (Botanischer Garten) der *Achillea collina*.

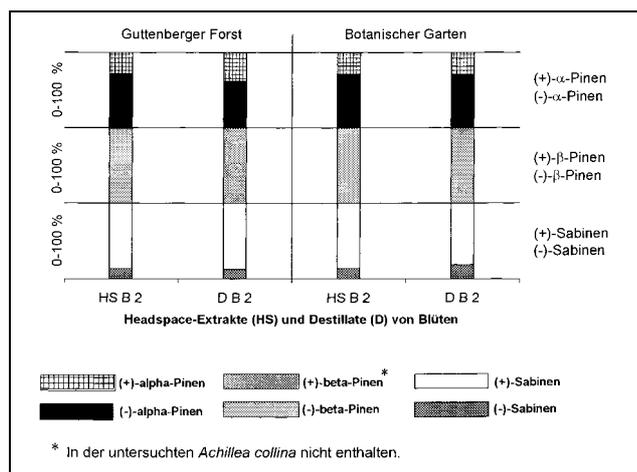


Abb. 1: Verteilung von Enantiomeren von Pinen und Sabinen in vollständig entwickelten Blüten (B2) von *Achillea collina*

Die Anteile der Stereoisomeren sind in Prozent pro Enantiomerenpaar ausgedrückt. In Abb. 1 und 2 ist die Aufteilung der Y-Achse so gewählt, dass im ersten Intervall die prozentualen Anteile von (-)- und (+)-Sabinen, im zweiten Intervall die Anteile von (-)- β -Pinen und (+)- β -Pinen und im dritten Intervall die Anteile von (-)- und (+)- α -Pinen dargestellt sind. Die Anteile eines jeden Enantiomerenpaares ergeben 100%. Die Daten beziehen sich auf Proben, die aus Blütensprossen zum Zeitpunkt der Vollblüte (B 2) gewonnen wurden. Die Standardabweichungen betragen in der Verteilung von α -Pinen und Sabinen nicht mehr als durchschnittlich etwa 3%, beim β -Pinen sind es durchschnittlich weniger als 1%.

In der Stereoisomerenverteilung von β -Pinen ist zwischen Headspace-Extrakten und Wasserdampfdestillaten aus Blüten von Wild- und Kulturpflanzen (B 2) kein Unterschied zu erkennen. Anders verhält es sich beim α -Pinen, dessen (-)-Enantiomer in den Headspace-Extrakten von Wildpflanzen einen etwas höheren Anteil hat. In den Blüten der Kulturpflanzen aber sind die Chiralen des α -Pinsens gleich verteilt. Auch ein geringfügiger Unterschied von 4% weniger (+)-Sabinen in den Headspace-Extrakten der Wildpflanzen hat keinen Einfluss auf das eigentliche Enantiomerenmuster der ausgewählten Monoterpene in den Wild- und Kulturpflanzen der *Achillea collina*.

Neben der proazulenhaltigen *Achillea collina* sind auch Vertreter der proazulensfreien *Achillea*-Arten verschiedener

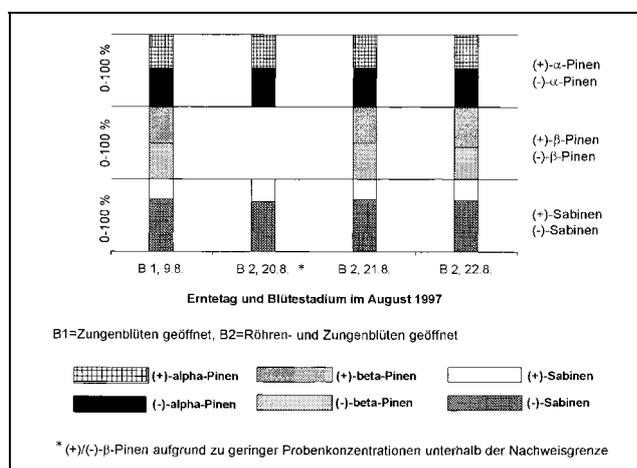


Abb. 2: Verteilung von Enantiomeren von Pinen und Sabinen in Blütenstadien einer proazulensfreien Schafgarbe

Herkunft auf ihre Enantiomerenmuster untersucht worden. Abb. 2 zeigt die Zusammensetzung der Stereoisomeren einer seit drei Jahren unter gleichen Kulturbedingungen gewachsenen *Achillea* aus dem Raum Hohensaaten/Saale, die in zwei verschiedenen Blütenstadien und zum Zeitpunkt der Vollblüte in drei aufeinander folgenden Tagen geerntet wurde.

Abb. 2 macht deutlich, dass die Anteile der Stereoisomeren in den gerade aufblühenden Infloreszenzen (B 1) und den vollständig entwickelten Blütenständen (B 2) gleich verteilt sind. Die Zusammensetzung der jeweiligen Stereoisomerenpaare ist im Stadium der Vollblüte auch an mehreren aufeinander folgenden Tagen unverändert. Nur der Gehalt an β -Pinen in vollständig entwickelten Blüten (s. B 2 am 20. August) lag aufgrund zu geringer Probenkonzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze und ist daher nicht dargestellt.

Nachdem in den vorangestellten Untersuchungen keine gravierenden Unterschiede in der Zusammensetzung der Enantiomeren bei unterschiedlichen Verfahren der Probenaufarbeitung festgestellt werden konnten, und damit auch für andere destillierte *Achillea*-Blüten und Headspace-Extrakte ein im wesentlichen genuines Muster anzunehmen ist, wurden Proben weiterer proazulensfreier Schafgarben hinsichtlich ihrer Enantiomerenmuster verglichen (Tabelle 1).

Die Stereodifferenzierung von β -Pinen ergab in der Regel eine eindeutige Verteilung zugunsten des (-)-Enantiomers. Lediglich Probe 6 ist eine „Art“, die zwischen *Achillea pannonica* und *Achillea millefolium* einzustufen ist. Sie fällt durch einen vergleichsweise hohen Anteil von fast 40% (+)- β -Pinen auf. Bei der Verteilung von Sabinen sind Anteile über 50% bis nahezu 100% an (+)-Sabinen in den Proben 3, 6, 7 und 9 auffällig. (+)- α -Pinen ist mit einem Anteil über 70% in den Proben 3, 4 und 6 enthalten. Die Enantiomerenmuster der verschiedenen Proben bzw. Arten sind sehr unterschiedlich. Ähnlichkeiten bestehen jedoch zwischen den Stereoisomerenverteilungen in den Proben 1, 2 und 5. Die Proben 1 und 2 stammen von Blüten der *Achillea millefolium* (Sippe nicht bestimmt) und der *Achillea millefolium* Sippe A, während die Probe 5 aus dem Pflanzenmaterial einer Zwischenform von *Achillea millefolium* und *Achillea pratensis* gewonnen wurde.

Die Ergebnisse der Enantiomerenverteilung im ätherischen Blütenöl von proazulensfreien Schafgarben verschiedener Herkünfte, die im Botanischen Garten unter gleichen Bedingungen kultiviert wurden, lassen sich für einen Überblick folgendermaßen zusammenfassen:

- Im Blütenöl der untersuchten *Achillea pannonica* ist fast ausschließlich (-)- β -Pinen enthalten. Der Anteil an (+)- α -Pinen beträgt 33% und der des (-)-Sabinens 86% der jeweiligen Enantiomerenpaare.
- Die Verteilung der Enantiomeren im Blütenöl der *Achillea millefolium*-Arten ist nicht einheitlich. Es ist grob zwischen zwei Mustern mit folgender Stereoisomerenverteilung zu differenzieren:
 1. der Gehalt an (+)- α -Pinen ist > 75%, der an (-)-Sabinen < 10% und
 2. der Anteil an (+)- α -Pinen ist < 20%, der an (-)-Sabinen > 75%.
- Eine Verteilung, wie unter 1. definiert, zeigt Probe 3 (Tabelle 1). Eine Zusammensetzung nach dem 2. Muster ist in den Blütenölen der Proben 1 und 2 (= *A. millefolium*) zu finden. Die Variabilität innerhalb dieser Art verwundert nicht, denn auch nach den Ergebnissen von Kastner et al. [9] wird für *Achillea millefolium* eine weitere taxonomische Differenzierbarkeit vermutet.

Tabelle 1: Stereoisomerenverteilung von α - und β -Pinen und Sabinen in verschiedenen proazulenfreien *Achillea*-Arten unterschiedlicher Herkünfte (Angaben in % pro Enantiomerenpaar)

Enantiomer	Probe*								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
(+)- α -Pinen	18	23	73	87	26	86	18	67	54
(-)- α -Pinen	82	77	27	13	74	14	82	33	46
(+)- β -Pinen	1	1		10	6	39	0	1	5
(-)- β -Pinen	99	99		90	94	61	100	99	95
(+)-Sabinen	13	23	91	4	6	95	55	14	99
(-)-Sabinen	87	77	9	96	94	5	45	86	1

* Zu Arten und Herkunft siehe Tabelle 2

- Die Enantiomerenverteilung der *Achillea setacea* (Tabelle 1, Probe 9) unterscheidet sich deutlich von derjenigen jeder anderen Probe.
- Die Muster der Chiralen in den *Achillea*-Arten, die eine Zwischenstellung von *Achillea millefolium* zu *Achillea pratensis* (Probe 5), zu *Achillea pannonica* (Probe 6) oder zu *Achillea setacea* (Probe 7) einnehmen, sind ebenfalls nicht mit den Mustern „reiner“ Arten vergleichbar. Teilweise zeigen die Muster der Übergangsformen nicht so deutliche Unterschiede zum Muster anderer Arten, wie es bei den morphologisch eindeutig einzuordnenden Pflanzen der Fall ist.

3. Diskussion

Nach den bisherigen Untersuchungen ist kein Unterschied in der Enantiomerenverteilung zu beobachten, der auf die Methode zur Gewinnung der Ätherisch-Öl-Komponenten zurückzuführen wäre (Abb. 1). Unter den gegebenen Versuchsbedingungen ist demzufolge auch nicht mit einer Artefaktbildung (Hydrolyse, Isomerisierung oder Umlagerung), wie von Baerheim Svendsen [10] beschrieben, zu rechnen. Auch waren am Beispiel der Wild- und Kulturpflanzen von *Achillea collina* keine standortabhängigen Unterschiede in der Stereoisomerenverteilung festzustellen. Die Zusammensetzung der Enantiomeren von α -Pinen, β -Pinen und Sabinen in aufblühenden (B 1) und geöffneten Blüten (B 2) ist ebenfalls weitgehend gleich (Abb. 2). Auch bei der Bildung terpenoider Verbindungen ist die Regulierung enzymatischer Prozesse ein Zusammenspiel genetischer und durch äußere Faktoren modifizierbarer Re-

aktionen [11]. Für zahlreiche Pflanzen, auch aus der Familie der Asteraceae, wie z. B. *Chrysanthemum*, wird die unterschiedliche Ausprägung der Monoterpenmuster auf eine genetische Fixierung zurückgeführt [12]. Auch die Fähigkeit, nur bestimmte Stereoisomere bei der Biosynthese bilden zu können, ist in verschiedenen Arten unterschiedlich ausgeprägt. Ein bekanntes Beispiel liefern die Arten *Mentha spicata* und *Mentha piperita* [13]. Während in *Mentha piperita* Geranylpyrophosphat über (-)-Limonen hauptsächlich zu (-)-Menthol und (-)-Menthon umgesetzt wird, verläuft die Biosynthese in *Mentha spicata* über (-)-Limonen zu (-)-Carvon [14]. In wie weit die Biosynthese der hier untersuchten chiralen Verbindungen mit den gefundenen Enantiomerenmustern in Zusammenhang steht, ist zum derzeitigen Stand der Forschung noch nicht zu beurteilen.

Offensichtlich aber ist, dass in der Verteilung der chiralen Monoterpene von α -Pinen, β -Pinen und Sabinen in verschiedenen Arten des *Achillea-millefolium*-Komplexes, die unter gleichen Bedingungen wuchsen, Unterschiede bestehen. Daraus ergeben sich erste Anhaltspunkte, auch stereoisomere Komponenten im ätherischen Öl der Schafgarbe als zusätzliche Bestimmungshilfe zur taxonomischen Einordnung heranzuziehen. Eine endgültige Beurteilung setzt allerdings noch weitere Untersuchungen voraus. Es sollten auch die hier nicht erfassten Arten der *Achillea millefolium*-Gruppe untersucht und die Muster durch die Stereodifferenzierung anderer chiraler Mono- und Sesquiterpene noch ergänzt werden.

Die Verteilung der Stereoisomeren innerhalb der Klone ist stabil. Die Tatsache aber, dass die Enantiomeren nicht in allen Arten und Übergangsformen gleich verteilt sind, liefert erste Anhaltspunkte dafür, dass die Stereoisomerenverteilung möglicherweise eine zusätzliche Bestimmungshilfe ist.

4. Experimenteller Teil

Neben Pflanzen einer *Achillea collina* von einer Wiese im Guttenberger-Forst bei Würzburg wurden weitere Schafgarben des *Achillea millefolium*-Komplexes verschiedener Herkünfte im Botanischen Garten der Universität Würzburg nach guter gärtnerischer Maßgabe kultiviert (s. Tabelle 2) und zu vergleichenden Untersuchungen herangezogen. Es wurden nur Blütenproben von mindestens seit zwei Jahren kultivierten Schafgarben verwendet. Von der *Achillea collina* aus dem Raum Würzburg wurden auch Proben des Wildstandortes auf der Wiese gesammelt und ebenfalls untersucht. Unter den Enantiomeren wurden die häufig vorkommenden Monoterpene α -Pinen, β -Pinen und Sabinen ausgewählt. Die flüchtigen Komponenten wurden sowohl durch vierstündige Wasserdampfdestillation [15] als auch

Tabelle 2: Pflanzenmaterial verschiedener proazulenfreier *Achillea*-Arten unterschiedlicher Herkunft

Probe	Herkunft		Standort	Art (morpholog.)	Ploidiegrad
1	Riederwald 1	D	Trockenrasen	<i>A. millefolium</i>	hexaploid
2	Riederwald 2	D	Wegrand	<i>A. millefolium</i> Sippe A	hexaploid
3	Tavannes	CH	Wiese (feucht)	<i>A. millefolium</i>	hexaploid
4	Karwendel	A	Wiese	<i>A. millefolium</i> ± <i>ssp. sudetica</i>	hexaploid
5	Salzachtal	A	Gebüschrand, steinig	<i>A. pratensis</i> ± <i>A. millefolium</i>	–
6	Bozen	I	Wiese	<i>A. pannonica</i> ± <i>A. millefolium</i>	pentaploid
7	Draguignan	F	Olivenhain (trocken)	<i>A. millefolium</i> ± <i>A. setacea</i>	–
8	Rätikon	CH	Trockenrasen	<i>A. pannonica</i>	–
9	Burgund	F	Wiese	<i>A. setacea</i>	tetraploid

– Ploidiegrad nicht bestimmt

± Zwischenform zwischen den beiden angegebenen „Arten“

A = Österreich, CH = Schweiz, D = Deutschland, F = Frankreich, I = Italien

durch Headspace bei Raumtemperatur gewonnen [16]. Zur Bestimmung der Isomerenverteilung wurden vier bis fünf Proben mittels Headspace gewonnener Blütenextrakte herangezogen.

Die Gaschromatographie erfolgte mittels M.C.S.S.-System (modifiziert nach [17]) unter Verwendung folgender Geräte, Säulen und Trennparameter: Gaschromatograph: GC 8000 series (ThermoQuest) mit integriertem M.C.S.S.-System, Trägergas: Stickstoff: $12 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, Injektor: on-column (manuell) mit 10 sec Druckluftkühlung beim Programmstart, Detektoren: FID bei $250 \text{ }^\circ\text{C}$, Temperatur: $50 \text{ }^\circ\text{C}$ isotherm für 40 min, Säulen: $25 \text{ m} \times 0,25 \text{ mm ID}$, Octakis (6-*O*-methyl-2,3-di-*O*-pentyl/OV1701)- γ -Cyclodextrin $30 \text{ m} \times 0,25 \text{ mm ID} \times 0,25 \text{ }\mu\text{m}$ HP-Innowax (Hewlett Packard), Vorsäule und Verbindungssäulen: $0,25 \text{ mm}$ und $0,32 \text{ mm ID}$ desaktivierte Fused-Silica-Kapillarsäulen.

Literatur

- 1 Kreis, P.; Hener, U.; Mosandl, A.: Dtsch. Apoth. Ztg. **130** (18), 985 (1990)
- 2 Saukel, J.; Länger, R.: Sci. Pharm. **58**, 321 (1990)
- 3 Saukel, J.; Länger, R.: Phytol **32**, 159 (1992)
- 4 Saukel, J.; Länger, R.: Phytol **31**, 185 (1992)
- 5 Saukel, J.; Länger, R.: Phytol **32**, 47 (1992)
- 6 Hänsel, R.; Keller, K.; Rimpler, H.; Schneider, G. (Hrsg.): Hagers Handbuch, Drogen A-D. S. 45–53. Springer Verlag, Berlin Heidelberg 1992
- 7 Rodriguez, E.; Towers, G. H. N.; Mitchell, J. C.: Phytochemistry **15**, 1573 (1976)
- 8 Rücker, G.; Manns, D.; Breuer, J.: Arch. Pharm. **326**, 901 (1991)
- 9 Kastner, U.; Saukel, J.; Zitterl-Eglseer, K.; Länger, R.; Reznicek, G.; Jurenitsch, J.; Kubelka, W.: Sci. Pharm. **60**, 87 (1992)
- 10 Baerheim Svendsen, A.: Dtsch. Apoth. Ztg. **127** (47), 2458 (1987)
- 11 Banthorpe, D. V.; Charlwood, B. V.; Francis, M. J. O.: Chem. Rev. **72**, 115 (1972)
- 12 Von Schantz, M.: in: Banthorpe, D. V.; Charlwood, B. V.; Francis, M. J. O.: Chem. Rev. **72**, 115 (1972)
- 13 Murray, M. J.: in: Banthorpe, D. V.; Charlwood, B. V.; Francis, M. J. O.: Chem. Rev. **72**, 115 (1972)
- 14 Croteau, R.: Chem. Rev. **87**, 929 (1987)
- 15 Sprecher, E.: Dtsch. Apoth. Ztg. **103**, 213 (1963)
- 16 Karl, V.: Diss. Universität Frankfurt/Main 1994
- 17 Sulzbach, H.: Advancing the Art of Gas Chromatography by a New Developed Easy to Use Multi Dimensional Switching System for HRGC. CE-Instruments (Hrsg.), Mainz-Kastel 1996

Received July 15, 1999

Accepted October 19, 1999

Prof. Dr. Franz-C. Czygan

Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie
Julius-von-Sachs-Institut
für Biowissenschaften
Julius-von-Sachs-Platz 2
D-97082 Würzburg

Prof. Dr. Armin Mosandl

Goethe-Universität
Institut für Lebensmittelchemie
Marie-Curie-Str. 9
D-60439 Frankfurt/M.