
Themenkreis E: Wildsammlung, Inkulturnahme, Züchtung

EPL 17 Intraspezifische Variabilität und Drogenqualität des Wermuts (*Artemisia absinthium* L.)



Intraspecific chemical variability and drug quality of wormwood (Artemisia absinthium L.)

T. Huong-Nguyen^a, J. A. Llorens-Molina^b, É. Zámoriné-Németh^{a*}

^aLehrstuhl Arznei- und Gewürzpflanzen, Szent István Universität, Villányi Str. 29-35, 1118 Budapest, Ungarn

^bMediterranean Agroforestry Institute, Universitat Politècnica de València, Universitat Politècnica de València, Camino de Vera, s/n, 46022 Valencia, Spanien

E-mail: Zaborine.Nemeth.Eva@kertk.szie.hu

DOI: 10.5073/jka.2018.460.017

Zusammenfassung

Einhundert zwanzig Einzelpflanzen aus zwölf Herkünften von *Artemisia absinthium* waren unter den gleichen Umständen angebaut um ihre Drogenqualität zu bestimmen. Der ätherische Ölgehalt wurde durch Wasserdestillation und seine Zusammensetzung durch die GC-MS Methode bestimmt. Der Ätherischöl Gehalt variierte stark mit signifikanten Unterschieden zwischen Herkünften. Der grösste Ölgehalt wurde von den spanischen Herkunft produziert (3.215ml/100g), die Herkünften "Norwegen", "German 2" und "Belgien" gaben mittlere Werte (1.569-2.089 ml/100g) und acht Materiale zeigten Ölgehalte unter 1% (0.349-0.832 ml/100g). Die Hauptkomponente der Öle waren α -Thujone (0%-51.7%), β -Thujone (0%-89.8%), *cis*-Epoxyocimen (0%-75.7%), *trans*-Sabinyl Acetat (0%-94.5%), Sabinene (0%-33.8%), β -Myrcen (0%-68.4%), Linalool (0%-52.1%), *cis*-Chrysanthenol (0%-37.3%), (*Z*)-Iso-Citral (0%-49.2%), Selin-11-en-4- α -ol (0%-58%) und (*E*)-Nuciferol Isobutyrate (0%-33.2%). Aufgrund dieser Verbindungen, zehn charakteristische Chemotypen wurden beschrieben. Die meisten Herkünften waren heterogen betrachtend die Chemotypen. Keine Zusammenhang konnte zwischen den Chemotypen und der Origin der Samples bestimmt werden. Die Drogenqualität sowohl der Wildherkünften als auch der gekauften Marktmuster ist unsicher.

Stichwörter: Wermut, Chemotyp, Herkunft, ätherisches Öl, Thujon

Abstract

One hundred and twenty individuals from twelve accessions of *Artemisia absinthium* were grown under universal circumstances in order to evaluate the quality of the drug. The essential oil was obtained by hydrodistillation and analyzed by the GC-MS method. The essential oil yield was quite variable with significant differences among accessions. Highest yield was produced by "Spanish" accession (3.215ml/100g), "Norwegen", "German 2" and "Belgien" produced medium values (1.569-2.089 ml/100g) and eight accessions showed EO yields below 1% (0.349-0.832 ml/100g). Major components of the oils were α -thujone (0%-51.7%), β -thujone (0%-89.8%), *cis*-Epoxyocimene (0%-75.7%), *trans*-sabinyl acetate (0%-94.5%), sabinene (0%-33.8%), β -myrcene (0%-68.4%), linalool (0%-52.1%), *cis*-chrysanthenol (0%-37.3%), (*Z*)-iso-citral (0%-49.2%), selin-11-en-4- α -ol (0%-58%) and (*E*)-nuciferol isobutyrate (0%-33.2%). Based on these main compounds ten characteristic chemotypes were identified. The majority of the accessions were heterogenous concerning appearance of chemotypes. A connection between chemotype and habitat can not be justified in most cases. Drug quality of both natural populations and those purchased on market is variable.

Keywords: wormwood, chemotype, accession, essential oil, thujone

Einleitung

Artemisia absinthium (Wermut) ist eine aromatische Pflanze in der Familie Asteraceae. Die Pflanzenhöhe beträgt 40 - 150 cm, hat eine grosse Blattrosette und einen verholzenden, aufwärts wachsenden, verzweigenden Stängel der mit weissen Haaren bedeckt ist. Wermut ist für das Würzen von Getränke und für seine Heilwirkungen sowohl in der Volksheilkunde als auch in der

modernen Therapie verwendet. Die Hauptwirkstoffe sind die flüchtigen Komponente der Blätter und Blüten, die der Pflanze einen charakteristischen, starken Geruch verleihen. Die am besten bekannte Komponente des ätherischen Öles ist der Thujon (Juteau et al., 2003; Meschler and Howlett, 1999). Aufgrund der Bestandteile des Öles wurden mehrere Chemotype des Wermuts beschrieben wie z.B. Myrcen, Sabinen, Linalool, *cis*-Epoxyocimen, *cis*-Chrysanthenol, Chrysanthenyl Acetate, *trans*-Sabinyl Acetat usw. (Nguyen and Németh, 2016). Zur gleicher Zeit, die Herkunft und Bemusterung der Pflanzen ist in vielen Mitteilungen nicht ausführlich angegeben, deshalb die wahren Hintergründe der beschriebenen Variabilität sind unsicher. Wir haben mit diesem Versuch eine ausführliche Untersuchung von 12 Herkünften der *A. absinthium* begonnen. Einerseits wurden die Pflanzen auf dem gleichen Standort, unter gleichen Bedingungen angebaut damit die Umwelteinflüsse ausgeschlossen werden können. Andererseits wollten wir durch die individuelle Musternamen die wirkliche intraspezifische chemische Variabilität betreffend der Anhäufung der Ätherischöl-Komponente erkennen.

Material und Methoden

• **Plant material and cultivation**

Zwölf Herkünfte wurden in dieses Experiment einbezogen, unter denen Saatgut aus Genebanken, von der internationalen Market und aus Wildsammlung vorkommen (**Table 1**). Wir haben die völlig ausgewachsene Blätter der Rosette am Anfang August 2016 geerntet. Aus jeder Herkunft wurden zehn Einzelpflanzen zufälligerweise ausgewählt und geschnitten. Das Pflanzenmaterial wurde auf Raumtemperatur (20-25°C) im Schatten getrocknet

• **Abtrennung des ätherischen Öles**

Das ätherische Öl wurde durch Wasserdestillation erzeugt, wobei 50 g getrocknete Blätter wurden in 500 ml Wasser in einem Clevenger Gerät durch 2,5 Stunden destilliert.

• **Bestimmung der Zusammensetzung des Öles**

Die gaschromatographische- massenspektrometrische Untersuchungen wurden in einem Agilent Technologies 6890N Gerät mit einem HP-5MS Kapillarkolonnen (30 m × 0.25 mm i.d. × 0.25 µm) und mit einem Agilent Technologies MS 5975 inert massenselektiv Detektor durchgeführt. Die Komponente über 1% des Gesamtareals wurden bestimmt. Dazu haben wir die linearen Retentionsindices gerechnet nach der Methode von Van Den Dool und Kratz (van Den Dool and Dec. Kratz, 1963) benutzt, ausserdem wurden die Massenspektren mit denen in der Massenbibliotheken NIST MS Search 2.0 und Adams (2007) verglichen.

Ergebnisse

• **Äthersicher Ölgehalt**

Der durchschnittlichen ätherischen Ölgehalt der untersuchten Herkünfte war 0.827 ml/100g der jedoch variierte auf einer breiten Skala von 0.347 ml/100g (Huw4) bis 3.215 ml/100g (Spa). Auf dem ANOVA Test basierend, waren die Unterschiede signifikant: $F_{(8,81)}=58.707$ ($p<0.001$), (**Tabelle 1**). Die Ergebnisse zeigen dass alle ungarischen Herkünfte, und dazu die Herkünfte "Eng", "Ger0" und "Ger1" sind statistisch ähnlich, mit Werten unter 1%. In Allgemeinen, diese Werte stimmen mit früheren Angaben überein (Orav et al., 2006) wo der ätherische Ölgehalt von verschiedenen europäischen Herkünften zwischen 0.1–1.1% lag und auch mit den Angaben von Basta et al. (2007) über griechischen wildwachsenden Pflanzen (0.31%).

• **Zusammensetzung des ätherischen Öles**

In den 120 Ätherischöl Mustern aus den Blättern des *Artemisia absinthium* L. konnten wir 69 Komponente (wenn wir die Komponente mit einem Arealgebiet über 1% des Gesamtarealgebietes in Betracht ziehen), unter dessen 30 Monoterpene und 39 Sequiterpene. Hauptkomponente (über 30% des GC Areal) dieser Öle waren die beiden Isomere von Thujon α -

Thujon (0%-51.7%) und β -Thujon (0%-89.8%), *cis*-Epoxy-Ocimen (0%-75.7%), *trans*-Sabinyl Acetat (0%-94.5%), Sabinene (0%-33.8%), β -Myrcen (0%-68.4%), Linalool (0%-52.1%), *cis*-Chrysanthenol (0%-37.3%), (*Z*) iso-Zitral (0%-49.2%), Selin-11-en-4- α -ol (0%-58%) und (*E*)-Nuciferol Isobutyrate (0%-33.2%). Aufgrund unserer Kentnisse, stellen die Pflanzen mit (*Z*)-iso-Zitral, Selin-11-en-4- α -ol, (*Z*)- und (*E*)-Nuciferol Isobutyrate neue Chemotypen dar, den diese sind bisher in der Literatur nicht erwähnt gewesen.

Eine gute Homogenität war in den Herkünften "Spa" (100% der Einzelpflanzen gehörten zum *cis*-Epoxyocimen Chemotyp), "Bel" (100% der untersuchten Individuen wiesen Thujon als Hauptkomponent auf) und "Ger2" (100% der Muster zeigten den *trans*-Sabinyl-Acetat Chemotyp) gefunden. Die meisten Herkünfte waren aber viel weniger einheitlich. In vier von den fünf ungarischen Herkünften waren die β -Myrcen Typen in 10-20% anwesend. Zu unsere Überraschung enthielt nur eine der ungarischen Wildherkünfte ("HuW4") Thujon Chemotyp Pflanzen, hier waren sie aber in 40% der Muster zu finden und auch die Konzentration von Thujon war hoch (68% - 90% des Öles). Die zwei Marktartikel "Eng" und "Ger0" haben keine besondere Chemotyp-verteilung gezeigt.

In dieser Arbeit kamen die Thujon-Typ Individuen also nur in den Herkünften aus Belgium und Norwegen in Mehrheit vor. Auch diese unterscheiden sich, in der ersten ist nämlich das Verhältnis zwischen der α - und β -Thujonen variierend, in der letzteren Herkunft kommen sie etwa im gleichen Verhältnis vor. Unsere Ergebnisse – zusammen mit früheren Angaben (z.B. Blagojević et al., 2006, Juteau et al., 2003, Nin et al. 1995) - weisen darauf hin, dass das Thujon Chemotyp in der nördlichen Hemisphäre weit verbreitet ist und beschränkt sich nicht auf bestimmten Regionen.

Cis-Epoxyocimene ist auch eine bekannte Komponent des ätherischen Öles von Wermut (Mucciarelli et al., 1995, Llorens-Molina et al., 2017). In unserem Experiment war das die charakteristische Hauptkomponent der spanischen Muster. Obwohl diese Komponent auch in manchen anderen Ölen detektiert war, die Häufigkeit und die Konzentration lag viel niedriger als in dem spanischen Material. Auch Literaturangaben unterstützen die Vermutung das *Cis*-Epoxyocimen in den südeuropäischen Bereichen weit verbreitet und meistens hier eine Hauptkomponent des Öles sei.

Sabinen und β -Myrcene sind häufige Komponente des Wermutöles (Nguyen and Németh, 2016). Die geschilderten Ergebnisse zeigen, dass auch diese Komponente nicht zu bestimmten Regionen gebunden sind sondern viel mehr als universale Bestandteile dieser Öle zu betrachten sind.

Durch unseren Angaben konnte das Vorhandensein der vielen Chemotypen des Wermuts bestätigt, eine gesicherte Zusammenhang zwischen den spezifischen Chemotypen und Standorte (Regionen) aber am meisten nicht gesichert werden. Die Angaben zeigen deutlich, dass sich die Drogenqualität eben unter einheitlichen Wachstumsbedingungen je Herkunft sogar in meisten Fällen auch innerhalb der Herkünfte verändert. Das kann keinesfalls eine entsprechende biologische Grundlage für standardisierten Produkte sichern.

Tab. 1: Die untersuchten Wermut Herkünfte und ihre ätherischen Ölgehalte (ml/100g TrM) in der getrockneten Blätter

Tab. 1 The examined accessions of wormwood and their essential oil contents (ml/100g DM) in the dry leaves

Herkunft	Origin der Population	Äth.Ölgehalt mg/100g Tr.M.
Bel	Gatersleben Genbank (gesammelt in Belgium)	1.892 b
Eng	Marktprodukt from England	0.673 a
Ger0	Marktprodukt from Deutschland	0.598 a
Ger1	Gatersleben Genbank (gesammelt in Leipzig – Deutschland)	0.831 a
Ger2	Gatersleben genbank (collected in Deutschland - Germany)	2.090 b
Hum	Market item from Hungary	0.361 a
HuW1	Wild collected in Csór, Hungary	0.520 a
HuW2	Wild collected in Pákozd, Hungary	0.553 a
HuW3	Wild collected in Soroksár, Hungary	0.349 a
HuW4	Wild collected in Oskü, Hungary	0.347 a
Nor	Gatersleben genbank (collected in Norway)	1.568 b
Spa	Wild collected in Teruel, Spain	3.215 c

Verschiedene Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Herkünften aufgrund des Games-Howell's post hoc Test bei $p=0.05$

Tab. 2 Verteilung der identifizierten Chemotypen in den untersuchten *Artemisia absinthium* Herkünften

Tab. 2 Distribution of the identified chemotypes in the studied *Artemisia absinthium* accessions

Chemotyp	Anteil in der Herkunft (%)											
	Bel	Eng	Ger0	Ger1	Ger2	Hu m	Hu W1	Hu W2	Hu W3	HuW4	Nor	Spa
Reine Chemotype (Hauptkomponente über 30% der total GC Areal)												
Thujon	100			30						40	20	
cis-Epoxy-Ocimen		20					10	30				100
trans-Sabinyl Acetat			10	10	100				10		40	
Sabinen		10										
β-Myrcen				20		20	10	10	30			
Linalool										10		
cis-Chrysanthenol						10						
Iso-Zitral (Z)		10		10								
Selin-11-en-4-α-ol								10				
(E)-Nuciferol-Isobutytrat			10									
Gemischte Chemotype (die Hauptkomponente zusammen über 30% der total GC Areal)												
Thujon + cis-epoxy-Ocimen											10	
Thujon + cis-epoxy-Ocimen + trans-Sabinyl Acetat											20	
Thujon + trans-Sabinyl Acetat											10	
Sabinen + β-Myrcen		20	30				40		10			
β-Myrcen + β-Caryophyllen				10		10	10	20				
β-Myrcen + (Z)-Nuciferol-Isobutytrat			10									
Linalool + β-Caryophyllen				10				10				
Linalool + (Z)-Nuciferol-Isobutytrat										30		
β-Caryophyllen + selin-11-en-4-α-ol						20		20				
selin-11-en-4-α-ol + Isocitral (Z)				10								
selin-11-en-4-α-ol + (Z)-Nuciferol-Isobutytrat						10			10			
Andere	0	40	40	10	0	30	30	0	40	20	0	0

Literatur

- Basta, A., O. Tzakou, M. Couladis, M. Pavlović, 2007. Chemical Composition of *Artemisia absinthium* L. from Greece. *J. Essent. Oil Res.* 19: 316–318.
- Blagojević, P., N. Radulović, R. Palić, G. Stojanović, (2006). Chemical Composition of the Essential Oils of Serbian Wild-Growing *Artemisia absinthium* and *Artemisia vulgaris*. *J. Agr. Food Chem.*, 54(13): 4780–4789.
- Julio, L.F., J. Burillo, C. Giménez, R. Cabrera, C.E. Díaz, J. Sanz, A.González-Coloma, 2015. Chemical and biocidal characterization of two cultivated *Artemisia absinthium* populations with different domestication levels. *Ind. Crops Prod.* 76: 787–792.
- Juteau, F., I. Jerkovic, V. Masotti, M. Milos, J. Mastelic, J-M. Bessière, J. Viano, 2003. Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil of *Artemisia absinthium* from Croatia and France. *Planta Med.* 69: 158–161.
- Llorens-Molina, J. A., S. Vacas, V. Castell, É. Németh-Zámboriné, 2017. Variability of essential oil composition of wormwood (*Artemisia absinthium* L.) affected by plant organ. *J. Essent. Oil Res.*, 29(1): 11–21.
- Mucciarelli, M., R. Caramiello, M. Maffei, F. Chialva, 1995. Essential oils from some *Artemisia* species growing spontaneously in North-West Italy. *Flavour Frag. J.*, 10(1): 25–32.
- Meschler, J.P., A.C.Howlett, 1999. Thujone exhibits low affinity for cannabinoid receptors but fails to evoke cannabimimetic responses. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 62: 473–480.
- Nguyen, H.T., É. Z. Németh, 2016. Sources of variability of wormwood (*Artemisia absinthium* L.) essential oil. *J. Appl. Res. Med. Aromat. Plants.* DOI:10.1016/j.jarmap.2016.07.005
- Nin, S., P. Arfaoli, M. Bosetto, 1995. Quantitative Determination of Some Essential Oil Components of Selected *Artemisia absinthium* Plants. *J. Essent. Oil Res.*, 7(3): 271–277.
- Orav, A., A. Raal, E. Arak, M. Muurisepp, T. Kailas, 2006. Composition of the essential oil of *Artemisia absinthium* L. of different geographical origin, in: *Proceedings-Estonian Academy of Sciences Chemistry. TRUEKITUD OU*, p. 155.
- Adams, R.P. 2007. *Identification of Essential Oil Components By Gas Chromatography/Mass Spectrometry*, 4th Edition, 4th edition. ed. Allured Pub Corp, Carol Stream, Ill.
- Van Den Dool, H., P. Dec. Kratz, 1963. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas—liquid partition chromatography. *J. Chromatogr. A* 11: 463–471.