

Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Lehrstuhl für Lebensmittelchemie
Prof. Dr. Peter Schreier

Die grüne Fee
Thujon



Seminararbeit von

Annette Erb
Sommersemester 2003

Gliederung
Die grüne Fee: Thujon

1	Absinth – die grüne Fee	4
1.1	Was ist Absinth	4
1.2	Geschichte	4
1.3	Herstellung	7
1.4	Absinth-Wirkung	8
1.5	Absinth-Missbrauch	8
1.6	Hauptwirkstoffe	10
1.7	Wermut in der Medizin	12
	1.7.1 Wurmmittel und Insektizid	12
	1.7.2 Antidot	12
	1.7.3 Abortivum	13
	1.7.4 Magen-Darm-Mittel	13
	1.7.5 Epileptikum	13
	1.7.6 Malariaheilmittel	13
	1.7.7 Pharmazeutische Zubereitungen	14
2	Thujon	14
2.1	Chemische und physikalische Eigenschaften	14
2.2	Vorkommen in der Natur	15
2.3	Analytik	16
	2.3.1 DC-Analytik von thujonhaltigen ätherischen Ölen	16
	2.3.2 GC-MS-Analytik	18
	2.3.2.1 Analytik von thujonhaltigen ätherischen Ölen	18
	2.3.2.2 Analytik von Absinth	18
	2.3.2.3 Analytik von Thujon und Metaboliten	19
3	Biochemische Bedeutung von Thujon	19
3.1	Pharmakologische Eigenschaften	19
	3.1.1 Krampfauslösende Wirkung	20
	3.1.2 Schmerzhemmende Wirkung	21
	3.1.3 Porphyrogene Wirkung	21
	3.1.4 Wirkungen beim Menschen	22
3.2	Wirkmechanismen	23
	3.2.1 GABA _A -Rezeptor	23

	3.2.1.1 Studie an Drosophila	23
	3.2.1.2 Einfluss auf die Bindung von [³ H]EBOB	24
	3.2.2 CB1-Cannabinoid-Rezeptor	27
	3.2.3 Kondensation von Thujon mit biogenen Aminen und Aminosäuren	28
3.3	Stoffwechsel	30
	3.3.1 Enzymatischer Stoffwechsel	30
	3.3.2 Metabolite im Gehirn	31
	3.3.3 Weitere Stoffwechselprodukte	33
	3.3.4 Biologische Aktivität der Metabolite	35
4	Toxikologie	35
	4.1 Akute Toxizität	36
	4.1.1 Studie des NTP-Testprogramms	37
	4.1.2 Studie von Höld, Sirisoma, Ikeda, Narahashi und Casida [2000]	37
	4.2 Subakute (subchronische) Toxizität	38
	4.2.1 Studie von Surber [1962]	38
	4.2.2 Studie von Margaria [1963]	39
	4.3 Weitere Toxizitätsstudien	40
	4.3.1 Rainfarn-Öl (<i>Tanacetum vulgare</i>)	40
	4.3.2 Wermut-Öl (<i>Artemisia absinthium</i>)	41
5	Rechtliche Bestimmungen	41
	5.1 Frühere Beurteilungen	41
	5.2 Aktuelle rechtliche Bewertung	41
6	Zusammenfassende Bewertung	42
7	Literatur	44

1 Absinth – die grüne Fee

1.1 Was ist Absinth?

Absinth ist ein alkoholisches Getränk, für dessen Herstellung unter anderem Wermut (*Artemisia absinthium*) verwendet wird, wodurch es seinen bitteren Geschmack erhält. Weitere Kräuter sind z.B. Anis, Fenchel und Melisse. Seine aufgrund des Chlorophyllgehaltes smaragdgrüne Farbe hat zu der Bezeichnung „grüne Fee“ geführt.

Die Wirkung von Absinth ist sowohl auf den hohen Alkoholgehalt (über 50%) als auch auf Thujon, einen Bestandteil der Wermutspflanze, zurückzuführen. Absinth wird in der Regel mit kaltem Wasser verdünnt und unter Zugabe von Zucker konsumiert. Bei der Verdünnung kommt es zu einer opaleszierenden Weißfärbung, die auch von anderen Getränken wie z.B. Pastis bekannt ist. Ursache hierfür ist die fehlende bzw. sehr schlechte Wasserlöslichkeit der enthaltenen ätherischen Öle. Diese präzipitieren bei der Verdünnung aus der alkoholischen Lösung (Louche-Effekt). Zahlreiche, nahezu zelebrierte Trinkrituale sind bekannt. So wird z.B. auf einen durchlöchernten Absinth-Löffel Zucker gegeben und über dem Absinth-Glas mit Wasser geflutet. Nach der weiter verbreiteten tschechischen Variante wird der Zucker mit Absinth versetzt, flambiert und in karamellisiertem Zustand in den restlichen Absinth eingerührt.

1.2 Geschichte

Wermut wurde schon früh zur Herstellung verschiedener alkoholischer Getränke verwendet. Bereits Plinius erwähnte einen als Absinthithes bezeichneten Wein, dem Wermutextrakt zugesetzt wurde [Arnold, 1989]. Thujonhaltige Getränke waren folglich bereits sehr früh verbreitet. Die damaligen Extrakte wurden durch Auskochen in Wasser oder alkoholischer Lösung erhalten. Erst mit Aufkommen der Wasserdampfdestillation im 16. Jahrhundert wurde es möglich, hochkonzentrierte Auszüge zu gewinnen.

Im England des 17. Jahrhunderts war ein Tansy genanntes Getränk aus dem ebenfalls thujonhaltigen Rainfarn, Eiern und Sahne sehr beliebt. Ein u.a.

aus Strandbeifuß (*Artemisia maritima*) hergestelltes Bier war in England und Irland im 17. und 18. Jahrhundert weit verbreitet [Arnold, 1989]. Zum bekanntesten thujonhaltigen Getränk stieg aber ab Mitte des 18. bis Anfang des 19. Jahrhunderts in Mittel- und Südeuropa, insbesondere in Frankreich und der Schweiz, der Absinth auf.

Der Ursprung der Absinth-Herstellung lag vermutlich in der französischen Schweiz, die wahre Urheberschaft ist allerdings nicht bekannt. Ein Dr. Ordinaire, der 1768 aus Frankreich geflüchtet war, berichtete von der Entdeckung in einem Kloster im Val de Travers. Er soll den Absinth im Jahre 1792 eingeführt haben [Haines, 1998]. Ebenfalls als Ersthersteller wird eine Madame Henriod beschrieben. Berichte, dass die aus dem Algerienkrieg nach 1840 zurückkehrenden französischen Soldaten den Absinth als Malaria-Prophylaxe in Europa eingeführt haben [Aronson, 1999], sind von den Zeitdaten her nicht korrekt.

1797 gründeten Major Dubied, dessen Sohn Marcelin und sein Schwiegerohn Pernod eine Absinth-Brennerei. Das Rezept sollen sie von Madame Henriod gekauft haben. Das Produkt verkauften sie in der französischen Schweiz und Frankreich. 1805 wurde die Firma von einem Sohn Pernods beachtlich vergrößert [Conrad, 1988].

Der Aufstieg des Absinth hing vermutlich damit zusammen, dass im 18. Jahrhundert die Weinpreise anstiegen, wohingegen der Preis für Absinth – wahrscheinlich aufgrund der mittlerweile erfolgten Massenherstellung – sank. Auch Künstler aller Genres, die den Absinth zum Kultgetränk werden ließen, spielten eine große Rolle.

Klassische Absinth-Marken der damaligen Zeit waren, neben dem Absinth von Pernod, Fritz Duval Dubied Père & Fils, A. Vichet, La Cressonneé, Terminus, A. Junod, Cousin Jeune, Herbsaint, Oxygénée und L. Lemercier & Duval. Man unterschied den „absinthe ordinaire“ mit 47 Vol.-%, den „demi-fine“ mit 68 Vol.-% und den „absinthe suisse“ mit 80 Vol.-% Ethanol. Verdünnt wurde üblicherweise mit 5 Teilen Wasser.

Nach dem Deutsch-Französischen Krieg 1870/71 bekam die „heure verte“ (grüne Stunde) zwischen 17 und 19 Uhr ihren festen Platz im Tagesablauf vieler Menschen [Arnold, 1989]. Vor allem Professoren, Schauspieler, Musiker, Finanziers und Schriftsteller schätzten die belebende Wirkung des Absinth. Bei van Gogh soll der Absinth-Rausch die gelbe Phase verursacht haben, Picasso malte den Absinth-Trinker, und die Bezeichnung „Grüne Fee“ stammt von Oscar

Wilde. Die Schriftsteller und Poeten Charles Baudelaire, Arthur Rimbaud, Alfred Jarry, Guillaume Apollinaire und Paul Verlaine sollen ihre Kreativität dem Absinthkonsum verdankt haben. Der englische Dichter Ernest Dawson rühmte den Absinth sogar als Aphrodisiakum [Arnold, 1989].

Auch Eigenherstellungen waren damals weit verbreitet. Im einfachsten Fall wurde Wermutöl einem einfachen Getreideschnaps zugesetzt. Zur geschmacklichen Abrundung verwendete man Pflanzenextrakte von Anis, Fenchel, Ysop, Zitronenmelisse, Engelwurz, Wacholder, Muskatnuss, Sternanis und Ehrenpreis. Zur optischen Verbesserung wurde unter anderem Indigo, Anilingrün und Kupfersulfat beigemischt [Vogt & Montagne, 1982].

Bereits um 1850 wurde bei chronischer Aufnahme von einem als Absinthismus bezeichneten Syndrom berichtet. Als Hauptsymptome wurden Sucht, Übererregbarkeit und Halluzinationen beschrieben. Aufgrund der damals noch weit verbreiteten Lamarck'schen Vererbungs- und Evolutionstheorie glaubten einige Absinth-Gegner, dass der Absinthismus genetisch manifest und damit vererbbar sei.

1873 tauchte das Gerücht auf, dass Absinth das hochgiftige Antimon beigemischt würde, um die Farbänderung bei der Verdünnung zu verstärken [Arnold, 1989]. In der Fachliteratur sprach man zu diesem Zeitpunkt schon von Absinth-Epilepsie und verstärktem Drang zu Selbstmordversuchen. Auch eine Absinthblindheit wurde beschrieben [Vogt & Montagne, 1982; Arnold, 1988, 1989, 1992; Conrad, 1988].

Schließlich nahmen der Absinthkonsum und damit auch seine toxischen Nebenwirkungen derartige Ausmaße an, dass das französische Kriegsministerium eine drastische Reduzierung forderte. Zu diesem Zeitpunkt wurden in Frankreich zwei Drittel der Weltproduktion konsumiert. Die gesetzlichen Konsequenzen folgten zu Beginn des 20. Jahrhunderts. Offizielle Gesetze wurden in der Schweiz, Frankreich, Deutschland und den USA erlassen. Das Verbot in Frankreich erfolgte 1916 und wurde 1922 auch auf absinthähnliche Getränke ausgedehnt. Die Schweiz hatte schon 1910 die gesetzlichen Konsequenzen gezogen [Blocher & Steck, 1958; Conrad, 1988]. Nur in Spanien, Portugal und der damaligen Tschechoslowakei blieb der ursprüngliche Absinth erhalten; dort spielte er allerdings auch nie eine große Rolle [Strang et al., 1999; Reese, 1999]. In Deutschland wurden nach Inkrafttreten des Absinth-Gesetzes vom 27.04.1923 sowohl der Import von als Absinth bezeichnetem Trinkbranntwein oder ähnlichen

Erzeugnissen als auch die zur Herstellung derartiger Getränke notwendigen Grundstoffe verboten, des Weiteren auch Lagerhaltung und Verkauf sowie solche Getränke anderweitig in den Verkehr zu bringen.

Das Absinthgesetz wurde in Deutschland bereits 1981 wieder aufgehoben, die Aromenverordnung verbot jedoch weiterhin die Verwendung des Grundstoffes Wermutöl. Seit 1991 ist ein festgelegter Thujon-Anteil zulässig [EU, 1988].

Die Deutsche Hauptstelle für Suchtgefahren warnte bereits vor dem neuen Modegetränk, beschränkte sich dabei aber auf den hohen Alkoholgehalt. Heute steht der „Grünen Fee“ die Ablehnung als „devil in disguise“ entgegen [Haines, 1998].

1.3 Herstellung

Absinth galt, ähnlich wie die ebenfalls thujonhaltigen Liköre „Chartreuse“ und „Benediktiner“, als das Produkt alchemistischer Giftküchen oder der Suche von Mönchen nach dem „Elixier des Lebens“. Die ca. 800 Mönche, die sich in Europa mit der Destillation auskannten, hüteten die Verfahren zur Herstellung von Likören als Geheimnis.

Bei Eigenherstellung und Schwarzbrand von Spirituosen bestehen große Unterschiede, so auch beim Absinth. Im Internet und in der Literatur sind zahlreiche Rezepturen beschrieben. Die Rezepte der offiziellen Hersteller sind dagegen auch heute noch meist geheim.

Nach dem angeblichen Originalrezept von Henry-Louis Pernod erfolgte die Mazeration einer ganzen Reihe von Kräutern zusammen mit Wermutkraut. Dann wurde Wasser hinzugefügt und destilliert. Anschließend wurde bis zu einer Konzentration von 75 Vol.-% Alkohol hinzugefügt.

Einige Hersteller setzten zur Farbintensivierung Kupfersulfat, Indigo oder grünes Anilin zu; zur Verstärkung der Opaleszenz bei der Verdünnung mit Wasser hat man in einigen Fällen Antimonchlorid zugegeben.

1.4 Absinth-Wirkung

Die Absinth-Wirkung wird als „berauschend, euphorisierend, anregend und stimulierend“ beschrieben. Zunächst kommt es zu einer Steigerung des Wohlbefindens, häufig verbunden mit Halluzinationen. In der nächsten Phase kommt es dann zur Ausbildung von depressiven Stimmungen. Bei längerem Missbrauch treten neuronale Degenerationserscheinungen auf, die zu Krämpfen und sogar bis zum Tod führen können.

Als Hauptwirkstoff im Absinth ist mit 50-70, teilweise sogar bis über 80 Vol.-%, der Alkohol zu sehen. Durch die Verwendung des Wermutöls bei der Herstellung spielt Absinth jedoch unter den alkoholische Getränken eine besondere Rolle. Im Wermutöl ist der aktive Bestandteil in erster Linie das Isomer α -Thujon. Ursprünglich wurde angenommen, dass die halluzinogene Wirkung des α -Thujons auf seiner strukturellen Ähnlichkeit mit Tetrahydrocannabinol, dem Wirkstoff der Cannabispflanzen (Haschisch) und seiner Bindung an die Cannabinoid-Rezeptoren beruht [Del Castillo et al., 1974]. Neuere Studien lassen vermuten, dass α -Thujon ein nicht-kompetitiver Antagonist des GABA_A-Rezeptors ist. Dadurch lässt sich auch die krampfauslösende Wirkung erklären [Höld et al., 2000].

1.5 Absinth-Missbrauch

Bei gewohnheitsmäßigem Absinthkonsum kompliziert das im Absinth enthaltene Thujon die Auswirkungen des chronischen Alkoholismus. Symptome der chronischen Intoxikation bei missbräuchlicher Langzeitanwendung, die als Absinthismus bezeichnet wird, sind: Hautkribbeln, Übelkeit, Erbrechen, gelbliches Kolorit, Anorexie, Schwindel, Sehstörungen mit heftigen Kopfschmerzen, Persönlichkeitszerfall, Gedächtnisstörungen, Krämpfe, Paralyse und Tod. Die klinischen Symptome des Absinth-Missbrauchs sind in Tab. 1 zusammengestellt.

Tab. 1 : Klinische Symptome des Absinth-Missbrauchs [Vogt & Montagne, 1982]

Gelegentliche Aufnahme	Chronische Aufnahme (Abusus)
Zentrales Nervensystem: <ul style="list-style-type: none"> ➤ Erregung gefolgt von Depression ➤ Gehobene Gemütslage, dann Stimmungsverschlechterung ➤ Auditiv und visuelle Halluzinationen ➤ Anstieg der Libido 	Haut: <ul style="list-style-type: none"> ➤ Haarausfall ➤ Bleicher Teint Sensorische Organe: <ul style="list-style-type: none"> ➤ Schädigung des Sehnervs ➤ Schwindel ➤ Ohrprickeln ➤ Taubheit Zentrales Nervensystem: <ul style="list-style-type: none"> ➤ Erregung, gefolgt von tiefer Depression ➤ Auditiv und visuelle Halluzinationen ➤ Kopfschmerz ➤ Klonische und epileptiforme Krämpfe ➤ Psychosen ➤ Demenz ➤ Ataxie ➤ Schlaflosigkeit ➤ Verlust der Libido ➤ Lärmendes und aggressives Verhalten ➤ Angst ➤ Gesichtszucken (Tics) ➤ Fehlbewegung und Lähmung von Lippen und Zunge Atmung: <ul style="list-style-type: none"> ➤ Röchelnd Magen-Darm-Trakt: <ul style="list-style-type: none"> ➤ Mundtrockenheit ➤ Morgendliche Übelkeit und Erbrechen ➤ Appetitlosigkeit Nieren: <ul style="list-style-type: none"> ➤ Urämie

Vincent van Gogh, Ernest Hemingway oder Ernest Dawson sind nur einige der populärsten Absinth-Trinker, deren seelischer Zerfall unter anderem auf den Absinthismus zurückgeführt wird.

Aus den früher beschriebenen Symptomen des Absinthismus ergeben sich große Übereinstimmungen mit den Symptomen des Alkoholismus (Halluzinationen, Schlaflosigkeit, Muskelzittern, Lähmungen und Krämpfe). Beim heutigen Wissensstand kann nicht ausgeschlossen werden, dass die beschriebenen

Absinthwirkungen eigentlich hauptsächlich ethanolbedingt waren. Mit der Verwendung minderwertigen Alkohols lassen sich Symptome wie Sehstörungen und Erblinden erklären. In der vorliegenden Literatur finden sich Hinweise, dass bei manchen Herstellungen auch noch andere Pflanzen mit psychedelischer Wirkung zum Einsatz gekommen sein könnten, z.B. Calamus.

W.N. Arnold hat sich intensiv mit dem Absinth-Missbrauch von Vincent van Gogh beschäftigt [Arnold, 1992]. Dessen Krankheitsgeschichte, die im dritten Lebensjahrzehnt begann, ist ausführlich dokumentiert und bietet Einblick in die Vielschichtigkeit der Problematik eines Absinth-Missbrauchs. Van Gogh hatte psychopathologische Symptome wie auditorische und visuelle Halluzinationen, Stimmungsschwankungen und Bewusstseinsstörungen. Auch von gastrointestinalen Beschwerden wie Bauchschmerzen und schwere Verstopfung wird berichtet. Die akuten Symptome traten häufig nach Phasen übermäßiger Arbeit, starkem Absinthkonsum und mangelhafter Ernährung ein, während Krankenhausbehandlungen mit Absinthabstinenz und verbesserter Ernährung zur Besserung führten. Es wird berichtet, dass van Gogh in seinen letzten zwei Lebensjahren Campheröl und Terpentin konsumierte. Diese Substanzen enthalten beide Pinen, ein dem Thujon chemisch eng verwandtes Terpen [Arnold, 1988].

Es wird diskutiert, dass die Hauptursache für diese Symptomatik eine durch den Absinthkonsum ausgelöste akute intermittierende Porphyrie gewesen sein könnte [Arnold & Loftus, 1991; Arnold, 1992; Bonkovsky et al., 1992]. Von Bedeutung scheint dabei das Zusammentreffen verschiedener Risikofaktoren zu sein: die Folgen des Alkoholmissbrauchs sind heute bekannt. Die daraus folgende Eiweißmangelernährung ist ebenso wie Stress ein Risikofaktor für die akute intermittierende Porphyrie, die nachweislich auch durch Thujon ausgelöst werden kann. Sowohl Porphyrie als auch Thujonvergiftungen können neuropsychiatrische Störungen auslösen, vor allem exogene Psychosen und Krampfanfälle. Durch Nikotinkonsum wird die Krampfbereitschaft noch zusätzlich erhöht [Arnold, 1988]. Durch diese Faktoren werden die Auswirkungen des Alkohols auf das Nervensystem noch verstärkt.

1.6 Hauptwirkstoffe

Als bitterste bekannte Pflanze gilt die Weinraute, direkt danach folgt Wermutkraut, *Artemisia absinthium*, das in Südeuropa, Nordafrika und Asien weit verbreitet ist. Wermut gehört zur Familie der Korbblütler. Es handelt sich um einen über 1 m hohen Halbstrauch mit weißgrauen, filzigen Blättern und hellgelben, kugeligen Blüten. Als Droge wird das getrocknete Kraut verwendet. Wermut wurde in geringen Mengen vor allem in der Antike von Kräuterkundigen angewendet und dient auch heute noch als homöopathisches Arzneimittel. Die Anwendung größerer Mengen führt zu Vergiftungserscheinungen wie Kopfschmerzen und Schwindel. Die krampferzeugende und lähmende Wirkung kann bis zur Bewusstlosigkeit führen.

Die im Wermut enthaltenen Hauptwirkstoffe sind Absinthin sowie ein ätherisches Öl, das in allen Pflanzenteilen vorkommt. Es enthält 40-70% Thujon, daneben Thujalkohol, Absinthin, Phellandren, Cadinen, Pinen, Azulen, Cineol und Salicylsäure (Abb. 1).

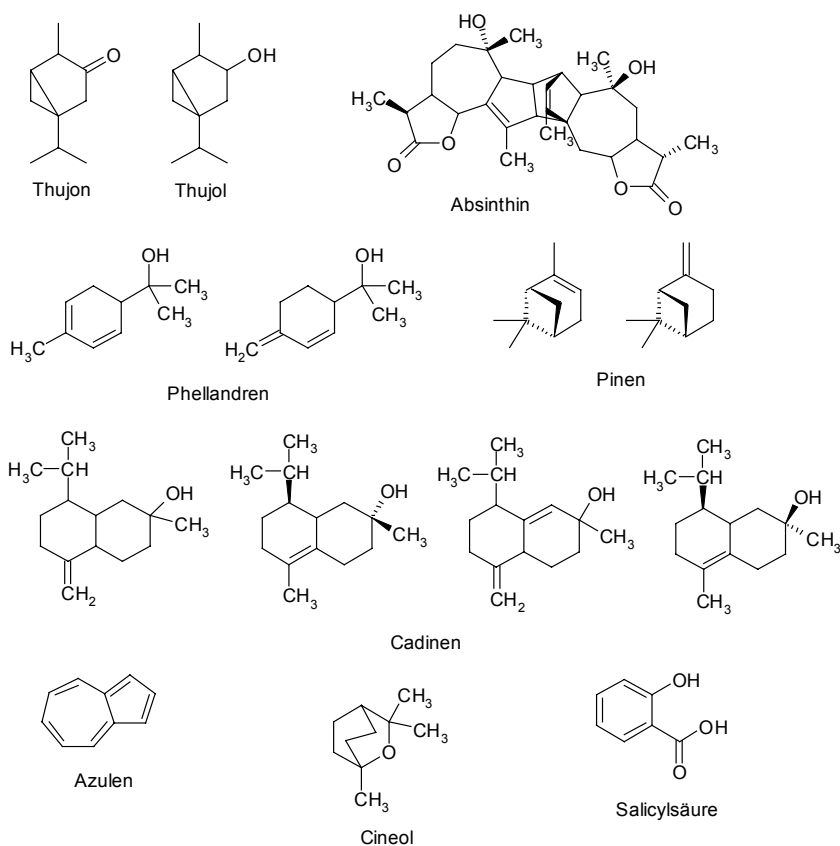


Abb.1: Inhaltsstoffe von Wermutöl

Verantwortlich für den bitteren Geschmack ist der Inhaltsstoff Absinthin, der noch in einer Verdünnung von 1:70.000 wahrgenommen werden kann [Arnold, 1989].

Die Bitterstoffe wirken hauptsächlich reflektorisch über die Mundschleimhaut. Sie regen die Sekretion der Magendrüsen an und werden daher auch als Amarum bei subazider Gastritis zur Magensaftsekretion angewendet.

Thujon und Phellandren sind Nervengifte, die Krämpfe auslösen und zu schweren Degenerationserscheinungen am zentralen Nervensystem führen können.

Im Absinth ist der aktive Bestandteil in erster Linie das Stereoisomer α -Thujon, wobei β -Thujon, das wesentlich weniger wirksam ist, meist in höherer Konzentration vorliegt [Höld et al., 2000].

α -Thujon wirkt bei Ratten neurotoxisch [Millet et al., 1981], und auch Fälle von Intoxikationen beim Menschen sind bekannt [Weisbord et al., 1997].

1.7 Wermut in der Medizin

1.7.1 Wurmmittel und Insektizid

Erste Berichte über die Anwendung von *Artemisia absinthium* und *Tanacetum vulgare* bei Wurminfektionen reichen bis ins 16. Jahrhundert zurück. 1955 konnte die Wirksamkeit von Thujon gegen den Rundwurm *Ascaris lumbricoides* nachgewiesen werden [Arnold, 1989].

Artemisia absinthium bzw. Wermutöl haben auch insektizide Eigenschaften [Grainge & Ahmed, 1988]. α -Thujon gehört nach Lee et al. [1977] zu den zwei wirksamsten untersuchten Substanzen gegen die Larven des Maiswurzelbohrers (*Diabrotica virgifera*).

1.7.2 Antidot

Plinius erwähnte die Anwendung von Thujon aus Beifuß gegen Opium oder den Milchsaft des schwarzen Schlafmohns. Die zentral stimulierenden Effekte erklären die neutralisierende Wirkung gegenüber narkotisch wirkenden Sub-

stanzen. Auch als Antidot bei Pilzvergiftungen und Schierlingintoxikationen sowie gegen den Biss des giftigen Seedrachens soll Wermut wirksam sein. Ein antagonistischer Effekt gegenüber Vergiftungen mit Narkotika konnte 1937 experimentell nachgewiesen werden [Bielenberg, 2002].

1.7.3 Abortivum

Schon im 2. Jahrhundert n.Chr. wurde die Wirkung von *Artemisia vulgaris* auf den Uterus beschrieben. Auch Berichte über eine Anwendung als Abortivum liegen vor. Experimentell hat man gezeigt, dass Thujon Kontraktionen des Uterus verursachen kann [Leung & Foster, 1996].

1.7.4 Magen-Darm-Mittel

Wie auch andere Bitterstoffdrogen wird Wermut Carminativa, Cholagoga und anderen Magen-Darm-Mitteln zugesetzt. Wermuttee und -tinkturen werden bei Appetitlosigkeit, dyspeptischen Beschwerden und Störungen der Gallenfunktion angewendet [Grünwald et al., 1998; Blumenthal, 1998].

1.7.5 Epileptikum

Schon früh wurden von Thujon nahezu identische Wirkungen wie bei Campher beschrieben: Erregung des vegetativen Nervensystems, Bewusstlosigkeit und Krämpfe, unwillkürliche Muskelkontraktionen, zuerst klonisch (Kontraktion und Erschlaffung in Abfolge), dann tonisch (Dauerkrampf). Beide Substanzen wurden als Epileptika genutzt, d.h. um Krämpfe künstlich zu erzeugen und fanden auch in die sog. Krampftherapie (z.B. bei Schizophrenie) Eingang [Arnold, 1989].

1.7.6 Malariaheilmittel

Die Legende des Malariaheilmittels entstand, da eine dem Wermut verwandte Pflanze (*Artemisia annua*) schon früher gegen Malaria genutzt wurde. Die in Algerien kämpfenden französischen Soldaten um 1840 sollen mit Wermutwein Malariaphylaxe betrieben haben. Die Wirksamkeit von *Artemisia annua* bei

Malaria wurde in den Siebzigern bestätigt. Die wirksame Substanz ist hier jedoch nicht Thujon, sondern Quinghaosu, wovon das Wermutkraut viel zu geringe Konzentrationen enthält [Arnold, 1989].

1.7.7 Pharmazeutische Zubereitungen

Verschiedene Extraktionsverfahren modifizieren den Thujongehalt ebenso wie der stark schwankende Gehalt der verwendeten Pflanzen. Bei der Herstellung von Extrakten für pharmazeutische Zubereitungen mit niedrigem Thujongehalt lassen sich so toxische Nebenwirkungen vermeiden. Bei einer Kaltextraktion mit wässrig-alkoholischer Lösung geht nur ein kleiner Teil des apolaren Thujon über. Die destillative Abtrennung liefert die größte Ausbeute an Thujon, während der Gehalt via Perkolation mit Wasser am geringsten ist (Tab. 2).

Tab. 2: Extraktionsverfahren zur Gewinnung von Thujon [Bielenberg, 2002]

Extraktionsverfahren	Extraktionsmittel	Gefundene Menge an Thujon*
Perkolation	Wasser, gereinigt	0,63 ± 0,11
	30% Ethanol	2,79 ± 0,25
	90% Ethanol	7,88 ± 0,53
Digestion	30% Ethanol	1,42 ± 0,16
Destillation	Wasser, gereinigt	7,59 ± 0,88

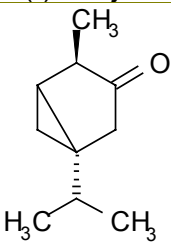
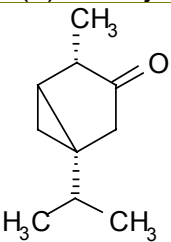
* Angabe in mg bezogen auf g extrahierter Ausgangsdroge (MW ± SD; n = 6)

2 Thujon

2.1 Chemische und physikalische Eigenschaften

Thujon, C₁₀H₁₆O (M = 152,24 g/mol), ist ein bicyclisches Monoterpen aus der Reihe der Thujonderivate, das in zwei stereoisomeren Formen existiert (Tab. 3).

Tab. 3: Physikalisch-chemische Eigenschaften von Thujon

Name	α -(-)-Thujon	β -(+)-Isothujon
Struktur		
Siedepunkt (17 hPa)	83,8-84,1 °C	85,7-86,2 °C
$[\alpha]_D$ (unverd.)	-19,2 °	+72,5 °

Es handelt sich um ein farbloses Öl mit erfrischendem, mentholähnlichen Geruch. Das Öl ist unlöslich in Wasser, löst sich jedoch in Alkohol.

In der Natur ist das Gemisch aus (-)-Thujon (α -Thujon, CAS-Nr. 546-80-5) und (+)-Isothujon (β -Thujon, CAS-Nr. 471-15-8) in den ätherischen Ölen verschiedener Pflanzen enthalten. Das Verhältnis der Diastereomeren variiert je nach Herkunft.

Entdeckt wurde Thujon von Otto Wallach als Bestandteil des Thujaöls aus dem Lebensbaum (*Thuja occidentalis*). Die chemische Struktur wurde 1900 von Friedrich Wilhelm Semmler publiziert [Arnold, 1992].

2.2 Vorkommen in der Natur

α - und β -Thujon treten nebeneinander in den ätherischen Ölen und Pflanzenteilen unterschiedlicher Pflanzen auf (Abb. 2), vor allem in verschiedenen *Artemisia*-Arten, Salbei und dem Lebensbaum [Arnold, 1989].

Asteraceae Korbblütengewächse <i>Artemisia absinthium</i> 	Lamiaceae Lippenblütengewächse <i>Salvia officinalis</i> 	Cupressaceae Zypressengewächse <i>Thuja occidentalis</i> 
Wermut	Salbei	Lebensbaum
<i>Artemisia vulgaris</i> 	<i>Salvia triloba</i> 	<i>Thuja plicata</i> 
Beifuß	Griechischer Salbei	Rote Zeder
<i>Tanacetum vulgare</i> 	<i>Salvia sclarea</i> 	<i>Juniperus sabina</i> 
Rainfarn	Muskatellersalbei	Stinkwacholder

Abb. 2: Beispiele thujonhaltiger Pflanzen

Der Gehalt an α - und β -Thujon variiert je nach Herkunft. Einige Beispiele sind in Tab.4 zusammengestellt.

Tab. 4: Thujongehalte (in %) verschiedener ätherischer Öle [Pinto-Scognamiglio, 1967]

Herkunft	α -Thujon	β -Thujon	Gesamt
<i>Artemisia absinthium</i>	2,3	59,9	62,2
<i>Artemisia austiaca</i>	-	31,0	31,0
<i>Artemisia brevifolia</i>	14,0	6,0	20,0
<i>Artemisia campestris</i>	-	4,0	4,0
<i>Artemisia capillaris</i>	-	-	-
<i>Artemisia coerulescens</i>	18,0	39,2	57,2
<i>Artemisia fukudo</i>	13,0	40,0	53,0
<i>Artemisia japonica</i>	-	Spuren	Spuren
<i>Artemisia klotzchiana</i>	33,8	-	33,8
<i>Artemisia kurramensis</i>	55,0-62,0	-	55,0-62,0
<i>Artemisia maritima</i>	15,5	31,5	47,0
<i>Artemisia nilagirica</i>	0,23	0,58	0,81

Artemisia piacea	-	Spuren	Spuren
Artemisia vestita	5,3	-	5,3
Artemisia vulgaris	-	1,0	1,0
Juniperus scopulorum	0,5	0,3	0,8
Salvia officinalis	14,5	28,3	42,5
Salvia triloba	2,8	2,3	5,1
Tanacetum vulgare	58,0	19,4	77,4
Thuja occidentalis	9,5	55,0	64,5
Thuja orientalis	-	5,6	5,6
Thuja plicata	5-10	70-80	75-90
Tsuga canadensis	-	1,3	1,3

2.3 Analytik

2.3.1 DC-Analytik von thujonhaltigen ätherischen Ölen

Das Verfahren zur dünnschichtchromatographischen (DC) Analytik von Thujon (Tab. 5) ist am Beispiel von Salbei-Extrakt aufgezeigt. Ätherische Öle sind komplexe Mischungen von Kohlenwasserstoffen (hauptsächlich Terpenen), Aromastoffen, Aldehyden, Ketonen, Alkoholen und Estern. Die Zusammensetzung hängt von der Herkunft ab.

Tab. 5: DC-Bedingungen für die Analytik von thujonhaltigen ätherischen Ölen [Camag, 1996]

Schicht	Kieselgel Fertigplatten F ₂₅₄ , mit Methanol vorgewaschen
Fließmittel	Dichlormethan - Ethylacetat - Aceton (95:3:2)
Derivatisierung	Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz, 5-10 min auf 110 °C erhitzen

20 ml Salbeiextrakt werden unter mehrmaligem Schütteln mit je 10 ml Hexan zweimal extrahiert. Die vereinigten Extrakte werden bei Raumtemperatur auf 0,5 ml eingengt. 5 µl werden direkt auf die Schicht aufgetragen. Als Referenz zur quantitativen Bestimmung werden 10 mg Thujon in Toluol gelöst und auf 10 ml aufgefüllt. 2, 4, 6 und 8 µl werden direkt auf die Schicht aufgetragen. Entwickelt wird in Dichlormethan - Ethylacetat - Aceton (95:3:2) mit einer Laufstrecke von 50 mm. Durch Tauchen in Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz wird derivatisiert und anschließend 5-10 min auf 110 °C erhitzt. Thujon erscheint als blau-violette

Zone. Die quantitative Auswertung erfolgt durch Absorptionsmessung mit Deuterium-Lampe (600 nm) über die Peakfläche mittels linearer Regression.

Nachweisgrenze: 1,3 mg/100 ml Extrakt

Bestimmungsgrenze: 1,9 mg/100 ml Extrakt

Variationskoeffizient: 3,6% (n=6) [Camag, 1996]

2.3.2 GC-MS-Analytik

2.3.2.1 Analytik von thujonhaltigen ätherischen Ölen

Die ätherischen Öle thujonhaltiger Pflanzen lassen sich nach geeigneter Probenvorbereitung, wie z.B. Wasserdampfdestillation, vorteilhaft mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) untersuchen (Tab. 6).

Tab. 6: GC-Bedingungen für die Analytik thujonhaltiger ätherischer Öle [Demirci et al., 2003]

Trägergas	Helium
Säule	HP-Innowax FSC (Länge: 60 m; Durchmesser: 0,25 mm; Schichtdicke: 0,25 µm)
Injektionstemperatur	250 °C
Temperaturprogramm	10 min bei 60 °C; 4 °C/min auf 220 °C; 10 min bei 22 °C; 1 °C/min auf 240 °C
Split	50:1

2.3.2.2 Analytik von Absinth

Verschiedene Handelsmarken wie Fuchs, Tabu und Ulex hat man mittels GC-MS qualitativ untersucht; eine Quantifizierung der flüchtigen Bestandteile wurde nicht vorgenommen. Der Ulex-Absinth enthielt als einziger Thujon [Emmert, 2003]. Die gaschromatographischen Bedingungen sind in Tab. 7 zusammengestellt.

Tab. 7: GC-Bedingungen für die Analytik von Absinth [Emmert, 2003]

Trägergas	Helium
-----------	--------

Injektionsvolumen	1 µl
Säule	DB-1 (Länge: 30 m; Durchmesser: 0,25 mm; Schichtdicke: 0,25 µm)
Injektionstemperatur	250 °C
Temperaturprogramm	4 min bei 44 °C; 3 °C/min auf 74 °C; 5 °C/min auf 134 °C; 12 °C/min auf 312 °C; 5 min bei 312 °C
Split	1:10

2.3.2.3 Analytik von Thujon und Metaboliten

Die Arbeitsgruppe um K.M. Höld, die den Wirkmechanismus und Stoffwechsel von Thujon untersuchte, verwendete zur Analyse ebenfalls Standardmethoden der GC-MS (Tab. 8). Die Derivatisierung der Alkohole erfolgte mit N-Methyl-N-trimethylsilyltrifluoracetamid zu den Trimethylsilylethern; die Ketone wurden mit Methoxyamin zu den Methyloximen umgesetzt [Höld et al., 2000].

Tab. 8: GC-Bedingungen für die Analytik der Thujon-Metaboliten [Höld et al., 2000]

Trägergas	Helium
Injektionsvolumen	1 µl
Säule	DB-5 FSC (Länge: 30 m; Durchmesser: 0,25 mm; Schichtdicke: 0,25 µm)
Injektionstemperatur	250 °C
Temperaturprogramm	80 °C; 5 °C/min auf 200 °C; 20 °C/min auf 300 °C; 2 min bei 300 °C
Detektortemperatur	280 °C

3 Biochemische Bedeutung von Thujon

3.1 Pharmakologische Eigenschaften

Die pharmakologischen Wirkungen thujonhaltiger Pflanzen werden durch die Begleitsubstanzen stark modifiziert. Generell lassen sich dem Thujon folgende pharmakologischen Eigenschaften zuordnen:

- Anthelminthisch

- Psychedelisch
- Uterusstimulierend
- Antidot von Opium bzw. zentral depressiv wirkenden Substanzen

[Leung & Foster, 1996].

Im Vordergrund einer Vergiftung durch Thujon stehen zentrale Erregung und daraus folgende klonische Krämpfe. Es kommt zur Anoxie des Gehirns, Reizungen des Magen-Darm-Trakts und fettiger Degeneration der Leber mit dem Bild einer akuten Leberatrophie. Symptome einer schweren Thujon-Vergiftung sind Erbrechen, Leibschmerzen, Durchfälle, Gastroenteritis und nach Resorption Sehstörungen, Mydriasis, Kopfschmerzen, zentrale Erregung und tonisch-klonische Krämpfe. Auch Nierenschäden, Arrhythmie und Herzmuskelblutungen können auftreten [Bielenberg, 2002].

3.1.1 Krampfauslösende Wirkung

Die durch Thujon induzierten Krämpfe sind epileptiformer Art und werden von allgemeiner Gefäßerweiterung, Blutdruckabfall, Verlangsamung des Herzschlags und Anstieg der Atemfrequenz begleitet [Pinto-Scognamiglio, 1967]. Ratten, die über längere Zeiträume mit Thujon behandelt wurden, zeigten in ihrer Tagesrhythmik eine erhöhte Spontanaktivität. Die Injektion höherer Dosen löst zuerst tonische und dann klonische Krampfanfälle aus. Die Wahrscheinlichkeit für Krampfanfälle steigt in Verbindung mit der Gabe von Nikotin [Arnold, 1988].

Die krampfauslösenden Eigenschaften von Thujon und thujonhaltigen Pflanzenextrakten sind schon lange bekannt [Pinto-Scognamiglio, 1967]. Die in Tierversuchen krampfauslösenden Dosen sind in Tab. 9 zusammengestellt.

Tab. 9: Krampfauslösende Thujonmengen im Tierversuch

Spezies	Verabreichtes Produkt	Aufnahmeweg	Krampfauslösende Dosis (mg/kg Körpergewicht)	Literatur
Maus	α - und β -Thujon	i.p.	590	Wenzel & Ross, 1957
Maus	α -Thujon	i.p. ^{a)} i.p. ^{b)} p.o. ^{b)}	260 72 250	Le Bourhis & Soenen, 1973
Ratte	α - und β -Thujon	i.p.	100	Sampson & Fernandez,

				1939
Kaninchen	α -Thujon	i.v.	4	Keith & Stavaky, 1935
Katze	α -Thujon	i.v.	7	Keith & Stavaky, 1935; Opper, 1939
Katze	α -Thujon	i.v.	20	Keith & Stavaky, 1935

a) verabreicht als Lösung in Olivenöl

b) verabreicht als wässrige Emulsion in 1% Tween 20

α -Thujon wurde in einer Reihe von Koordinations- und Verhaltenstests an Mäusen auf psychotrope Aktivität sowie analgetische und hypnotische Eigenschaften untersucht. In niedrigen, nicht krampfauslösenden Mengen bewirkt Thujon bei einer intraperitonealen Dosis von 3 mg/kg einen leichten Anstieg des Bewegungsvermögens, bei 24 mg/kg i.p. Abnahme der Aktivität und des Erkundungsverhaltens. Die krampfauslösende Wirkung von Pentetrazol und elektrischen Schocks wurde durch die Gabe von Thujon nicht verstärkt.

Thujon hatte keinen Einfluss auf die Schlafdauer nach der Gabe von Barbituraten. Dahingegen unterdrückten Barbiturate (10 mg/kg) und trans-Anethole (200-300 mg/kg i.p.) im Versuch an Mäusen aber die krampfauslösende Wirkung von Thujon (150 mg/kg i.p.) [Le Bourhis & Soenen, 1973].

Thujon beeinflusste bei einer täglichen Dosis von 10 mg/kg über einen Zeitraum von 25 Tagen weder die Spontanaktivität von Ratten noch die Fähigkeit, Verhalten zu erlernen. Es wurde jedoch eine Verbesserung der Koordination beobachtet.

Aus früheren Studien ging hervor, dass Thujon in Dosen von 50 mg/kg subcutan bei Ratten einen deutlichen Anstieg der Aktivität bewirkte. Der beobachtete Effekt entsprach der Wirkung einer Dosis von 2 mg Amphetamin/kg Körpergewicht bewirkt [Pinto-Scognamiglio, 1968].

3.1.2 Schmerzhemmende Wirkung

α - und β -Thujon wurden mit Hilfe der Hot Plate- und Nilsen-Testmethoden auf antinoceptive Aktivität untersucht. Im Hot-Plate-Test stellte sich heraus, dass α -Thujon codeinähnlich wirkt ($ED_{50} = 6,5$ mg/kg) und genauso wirksam ist wie (-)- δ -Tetrahydrocannabinol. Die Wirkung der racemischen Mischung war nur etwa halb so stark. β -Thujon zeigte in beiden Testverfahren keine Wirksamkeit. Im

Nilsen-Test wurde eine geringere schmerzhemmende Aktivität festgestellt als im Hot-Plate-Test ($ED_{50} = 14,1 \text{ mg/kg}$) [Rice & Wilson, 1976].

3.1.3 Porphyroge Wirkung

Von der Stoffklasse der Terpene, zu denen auch Thujon zählt, ist bekannt, dass sie porphyroge Eigenschaften besitzen, d.h. sie beeinflussen die Bildung des Blutfarbstoffes. Vorstufen, die Porphyrine, sammeln sich insbesondere in der Leber an. Im Experiment an Leberzellen von Hühnern zeigte sich, dass die Gabe von Thujon zwar zu geringerer Akkumulation von Porphyrin führte als bei anderen Terpenen (z.B. Campher), es kam jedoch zu einer Ansammlung von Kopro- und Protoporphyrinen. Einige Drogen, z.B. Phenobarbital, Hydantoin, Carbamazepin oder Glutethimid zeigten eine ähnliche Wirkung [Bonkovsky et al. 1992].

Ein besonderes Risiko stellt die akute intermittierende Porphyrie dar, eine autosomal dominant vererbte Krankheit, die lebensbedrohlich sein kann. Ohne die Exposition von Risikofaktoren verläuft die Krankheit häufig latent. Thujon und andere im Absinth enthaltene Terpene können gemeinsam mit dem hohen Alkoholgehalt Cytochrom P450 und das Enzym ALA-Synthase aktivieren und letztlich einen Porphyrie-Anfall auslösen. Es kommt zur Störung der Häm-synthese und starkem Anstieg der Porphyrine im Körper mit unterschiedlichen Symptomen wie akuten Abdominalschmerzen, zerebralen Krampfanfällen, Extremitätenschmerzen oder Tachykardie [Bonkovsky et al., 1992].

Die Differenzialdiagnose ist schwierig. Der Nachweis erfolgt durch die Bestimmung ungewöhnlich hoher Porphobilinogen- und Aminolavulinsäurekonzentrationen im 24-Stunden-Urin [Petrides, 1997].

3.1.4 Wirkungen beim Menschen

Bei einem Patienten, der (über das Internet bestelltes) Wermutöl zu sich genommen hatte, soll es zu einem akuten Nierenversagen aufgrund von Rhabdomyolyse (Auflösung von Muskulatur, Einschwemmung von Myoglobinen in die Nieren) gekommen sein [Weisbord, 1997].

Anekdotische Berichte und Fallstudien über die akuten Wirkungen von thujonhaltigen ätherischen Ölen, die beim Menschen Krämpfe auslösten

[Anderson et al., 1996; Burkhard et al., 1999; Haines, 1998; Steinmetz et al., 1980; Strang et al., 1999] zeigten, dass die Daten aus Tierversuchen für den Menschen von Bedeutung sind. In den meisten Fällen sind die Dosen nicht bekannt, in einem Fall lösten ungefähr zwölf Tropfen essentielles Salbeiöl einen allgemeinen tonisch-klonischen Krampfanfall aus, gefolgt von einem postictalen 15-minütigen Koma.

Diese Berichte können jedoch nicht als ausreichend verlässliche Aussagen über die Langzeitwirkungen von nicht krampfauslösenden Dosen auf das Nervensystem oder die Leber gewertet werden.

3.2 Wirkmechanismen

3.2.1 GABA_A-Rezeptor

Die gesteigerte Krampfneigung durch Thujon ließ Rückschlüsse auf eine Wechselwirkung mit γ -Aminobuttersäure (GABA) zu [Meschler & Howlett, 1999]. Durch GABA-Blockade entfällt die hemmende Wirkung auf die Reizleitung, was zu einer erhöhten Krampfbereitschaft führt. GABA ist der wichtigste inhibitorische Neurotransmitter im ZNS.

In Tierversuchen wurde eine reversible Blockade des γ -Aminobuttersäure Typ A-Rezeptors (GABA_A) an Nervenzellen entdeckt. In diesen Experimenten hat man auch eine Verringerung der toxischen Thujonwirkungen durch Diazepam (angstlösendes Mittel) und Phenobarbital (Barbiturat) festgestellt. Diese Wirkungen ähneln dem klassischen GABA-Antagonisten Picrotoxin, dem bitteren Wirkstoff aus den Samen von *Anamirta cocculus* [Enna & Bowery, 1997; Kulkarni et al., 1999].

Angriffspunkt von Thujon ist der GABA-Chlorid-Ionenkanal, und die Wirkung von GABA auf das Gehirn kann durch α -Thujon blockiert werden. Der Effekt geht offensichtlich von der ursprünglichen Verbindung aus, während der Stoffwechsel zur Detoxifikation führt [Höld et al., 2000].

3.2.1.1 Studie an *Drosophila*

Die Toxizität von α -Thujon und seinen Metaboliten wurde an zwei Arten von Fruchtfliegen (*Drosophila melanogaster*) untersucht, die sich in ihrer Empfindlichkeit gegenüber Substanzen, welche die Chlorid-Ionenkanäle blockieren, unterscheiden. Die mittlere letale Konzentration (LC_{50}) von α -Thujon und Dieldrin wurde bei zwei verschiedenen *Drosophila*-Arten bestimmt, der Dieldrin-resistenten *Rdl*^{MD-RR} [Ffrench-Constant et al. 1991, 1993] und der gegenüber Dieldrin empfindlichen Canton-S. Die Dieldrinresistenz entsteht durch eine Mutation in der GABA-Rezeptor-Untereinheit von Ala³⁰² zu Ser.

Der Versuch wurde in einer Glasröhre (12x75 mm) durchgeführt, in der sich ein Filterpapierstreifen befand. Man gab jeweils fünf ausgewachsene Fliegen in die Röhre, die anschließend mit Parafilm verschlossen wurde. 5 μ l einer Lösung von α -Thujon bzw. Dieldrin in Propylenglykol wurden mit einer Spritze durch den Parafilm auf das Filterpapier gegeben und die Röhre mit einer weiteren Schicht Parafilm abgedeckt. Nach 8 h bei 25 °C wurde die Sterblichkeit anhand der Zahl bewegungsunfähiger Fliegen bestimmt. Um das Verhältnis der Resistenzen (LC_{50} *Rdl*/ LC_{50} S) zu berechnen, wurde der Versuch viermal wiederholt.

Die *Rdl*-Fliegen ($LC_{50} > 275$ μ g/Röhre) zeigten gegenüber den S-Fliegen (LC_{50} 5 μ g/Röhre) eine 55fach höhere Resistenz gegen Dieldrin. Die Resistenz gegen Thujon war 5fach höher, die LC_{50} betrug 65 μ g/Röhre für *Rdl* und 12 μ g/Röhre für S (Abb. 3). Das Ergebnis bestätigt eine durchschnittliche insektizide Wirkung von α -Thujon sowie eine Kreuzresistenz bei den Dieldrin-resistenten Fliegen [Höld et al., 2000].

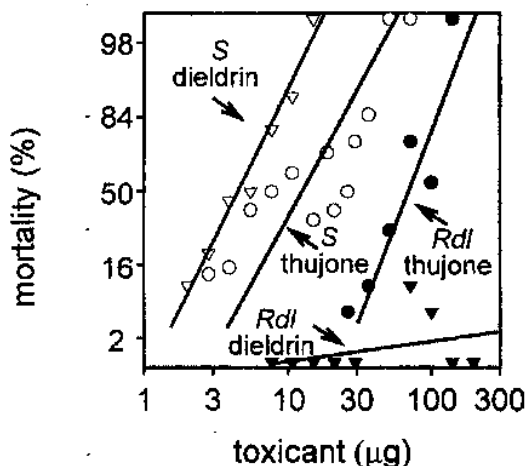


Abb. 3: Dieldrin-resistente *Drosophila* (Rdl) sind auch resistent gegenüber α -Thujon, (S) sind nicht resistent [Höld et al., 2000]

3.2.1.2 Einfluss auf die Bindung von [3 H]EBOB

[3 H]Ethynylbicycloorthobenzoat ([3 H]EBOB) ist eine nichtkompetitive Hemmstelle des GABA-gesteuerten Chlorid-Ionenkanals [Cole & Casida, 1992].

Eine Versuchsreihe wurde an aufgearbeiteten, GABA-freien Mäusehirn-Membranen durchgeführt [Cole et al., 1984]. Zur Untersuchung der Inhibitor-Wirksamkeit wurden die Membranen (200 μ g Protein) zusammen mit der Testsubstanz (1% in DMSO) und [3 H]EBOB in 1 ml 10 mM-Natriumphosphat-Puffer (pH 7,5) und 200 mM NaCl 70 min bei 37 °C inkubiert [Cole & Casida, 1992]. Die Analysen wurden ohne Inhibitor sowie mit 5 bzw. 25 μ M α -Thujon unter Verwendung von 0,08-26 nM [3 H]EBOB durchgeführt. Zum Vergleich hat man die inhibitorische Wirkung von Ethanol, Absinth (gemessen am Ethanolgehalt) und 5 μ M α -Thujon in Ethanol untersucht.

Die inkubierten Gemische wurden filtriert und zweimal mit 5 ml kalter 0,9%iger NaCl-Lösung gewaschen. Als spezifische Bindung wurde die Differenz zwischen Gesamtbindung und nichtspezifischer Bindung gemessen, die in Gegenwart von 5 μ M α -Endosulfan bestimmt wurde (α -Endosulfan ist ein wirksamer Antagonist des GABA_A-Rezeptors und ein spezifischer Inhibitor der [3 H]-EBOB-Bindung). Die mittlere inhibitorische Konzentration (IC₅₀) von α -Thujon für die Bindung von [3 H]EBOB beträgt 13 ± 4 μ M (Abb. 4). Die Analysen ergaben, dass die Bindung von α -Thujon kompetitiv mit der von [3 H]EBOB verläuft (Abb. 5). Zum Vergleich wurden die IC₅₀-Werte für β -Thujon (29 ± 8 μ M),

Wermutöl ($37 \pm 8 \mu\text{M}$; bezogen auf die Molekularmasse von Thujon) und Picrotoxin ($0,6 \pm 0,1 \mu\text{M}$) bestimmt.

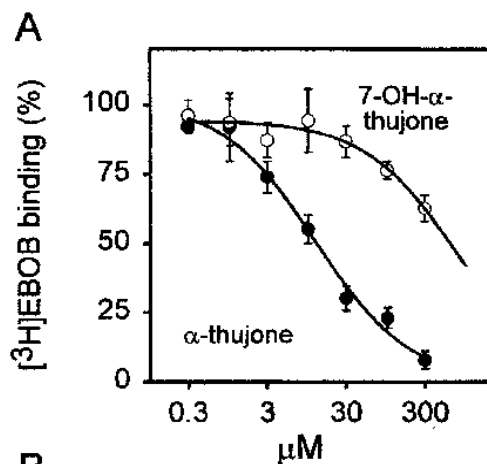


Abb. 4: Bestimmung der IC_{50} -Werte von α -Thujon und 7-Hydroxy- α -thujon

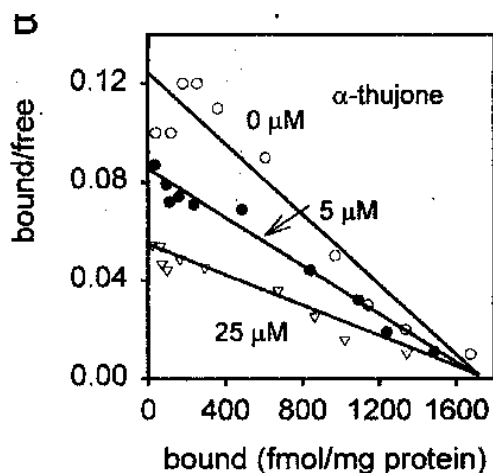


Abb. 5: Messung von $[^3\text{H}]$ EBOB alleine, sowie mit 5 bzw. 25 μM α -Thujon

Um die voneinander unabhängigen sowie die gemeinsamen Wirkungen von α -Thujon und Ethanol auf Chlorid-Ionenkanäle zu klären, wurde die inhibitorische Wirkung von Absinth, Ethanol und α -thujonhaltigem Ethanol auf die $[^3\text{H}]$ EBOB-Bindung verglichen. Die IC_{50} von Absinth betrug $263 \pm 47 \text{ mM}$ (bezogen auf den Alkoholgehalt), während die von Ethanol deutlich höher bei $370 \pm 4 \text{ mM}$ lag (Abb. 6). Es konnten keine eindeutigen Wechselwirkungen zwischen Ethanol und α -Thujon festgestellt werden, da die Inhibition durch 5 μM α -Thujon von einer Ethanolkonzentration bis zu 300 mM unabhängig ist (Abb. 7) [Höld et al., 2000].

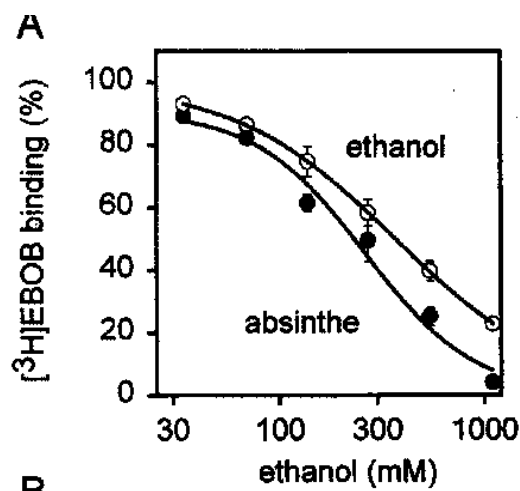


Abb. 6: Vergleich der Inhibition der [³H]EBOB-Bindung durch Absinth (bezogen auf den Ethanolgehalt) und Ethanol

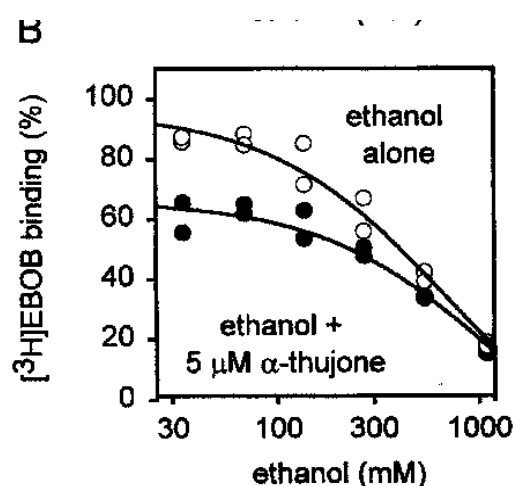


Abb. 7: Vergleich der Inhibierung der [³H]EBOB-Bindung durch Ethanol und α -thujonhaltigen (5 μ M) Ethanol

3.2.2 CB1-Cannabinoid-Rezeptor

Die halluzinogene Wirkung der früheren Absinth-Produkte mit hohem Thujon-Gehalt wurde zunächst auf die chemische Strukturähnlichkeit zwischen Thujon und Tetrahydrocannabinol (THC; Abb. 8), dem Wirkstoff aus *Cannabis indica*, zurückgeführt [Del Castillo et al., 1974]. Beide Substanzen sind Terpenoide, die über den gleichen Weg biosynthetisiert werden und eine ähnliche molekulare Geometrie und funktionelle Gruppen besitzen.

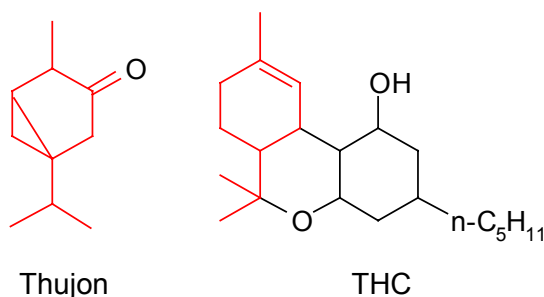


Abb. 8: Strukturähnlichkeit zwischen Thujon und THC

Die analoge psychoaktive Wirkung durch das Trinken von Absinth und das Rauchen von Marihuana führte zu der Annahme, dass Thujon und Tetrahydrocannabinol (THC), der Wirkstoff aus *Cannabis indica*, über identische Rezeptoren im ZNS wirken [Del Castillo et al., 1974]. Thujon ist ein schwacher Inhibitor von Acyl-CoA. Die Lysophosphatidylcholin-Acyltransferase-Aktivität an Mäusehirn-Synapsen ist vergleichbar mit der Wirkung von psychoaktiven Cannabinoiden [Greenberg et al., 1978].

Nach der Entdeckung des CB1-Cannabinoid-Rezeptors konnte diese These überprüft werden. Cannabinoid-Antagonisten müssen Cannabinoide am Rezeptor verdrängen. Tierversuche bestätigten einen Einfluss auf die Cannabinoid-Rezeptoren, allerdings nur in sehr hohen Dosierungen, wie sie – abgesehen von der möglichen Speicherung hoher Konzentrationen im Fettgewebe (wegen hoher Lipidlöslichkeit) und möglichen first-pass-Effekten (schneller Abbau) in der Leber – nur bei massiver Vergiftung auftreten [Meschler & Howlett, 1999]. Das Verhalten der Tiere im Versuch zeigte keine Cannabinoid-relevanten Veränderungen wie Schmerzdämpfung und Hypomobilität. Im Gegensatz zu den Cannabinoiden wirkt Thujon wie Picrotoxin erregend, was eher einen Einfluß auf den GABA-Rezeptor bestätigt [Olsen, 2000].

3.2.3 Kondensation von Thujon mit biogenen Amininen und Aminosäuren

Im Gegensatz zu Thujon haben strukturell ähnliche Ketone wie Carvon (Kümmel) und Menthon (Pfefferminze) keine Wirkung auf das ZNS. Ursache dafür könnte ein sterisch fixierter Cyclopropan-Ring sein. Auch andere sterische Einflüsse wie die Konfiguration der Methylgruppe modifizieren die Toxizität des Thujon.

Biogene Amine und Aminosäureester kondensieren mit Thujon zu den entsprechenden Azomethinen (Abb.9). Auch mit zahlreichen Neurotransmittern kann Thujon Azomethine bilden (Abb. 10) [Bielenberg, 2002].

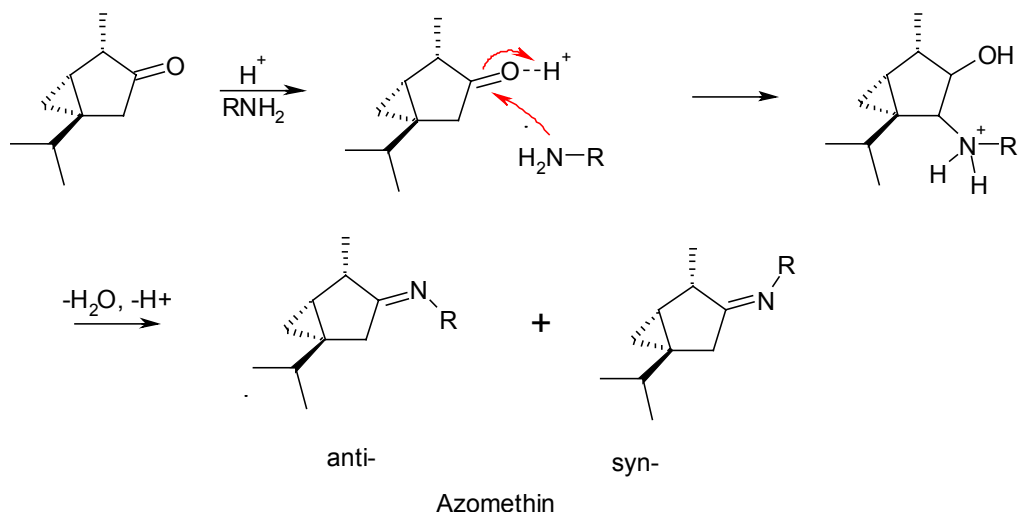


Abb. 9: Kondensation von Thujon mit biogenen Aminen

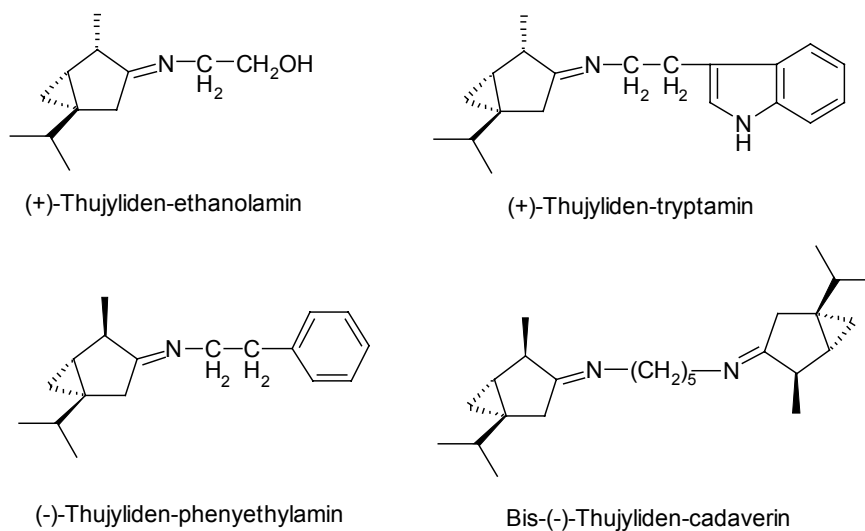


Abb. 10: Azomethine von Thujon mit Neurotransmittern

Analog zu anderen Ketonen kann Thujon mit Cystein an der Amin- und der Sulfhydryl-Gruppe zu einem Thiazolidin kondensieren, das im Gegensatz zu den Azomethinen eine höhere Stabilität aufweist (Abb. 11).

Cystein ist ein Baustein des Tripeptids Glutathion, das zahlreiche Stoffwechselreaktionen steuert und ein potentes Antioxidans darstellt. Nach einer Untersuchung am Max-Planck-Institut für Psychiatrie in München hat ein anderes zentral wirksames Keton, das Haloperidol, ebenfalls neurotoxische Effekte. Patienten, die mit Haloperidol therapiert wurden, zeigten eine Glutathion-Depletion mit dem Korrelat gesteigerter Lipidperoxidation. Auch Acetaldehyd, das neurotoxische Abbauprodukt des Ethanol, bildet mit Thiolen Thiazolidine [Bielenberg, 2002].

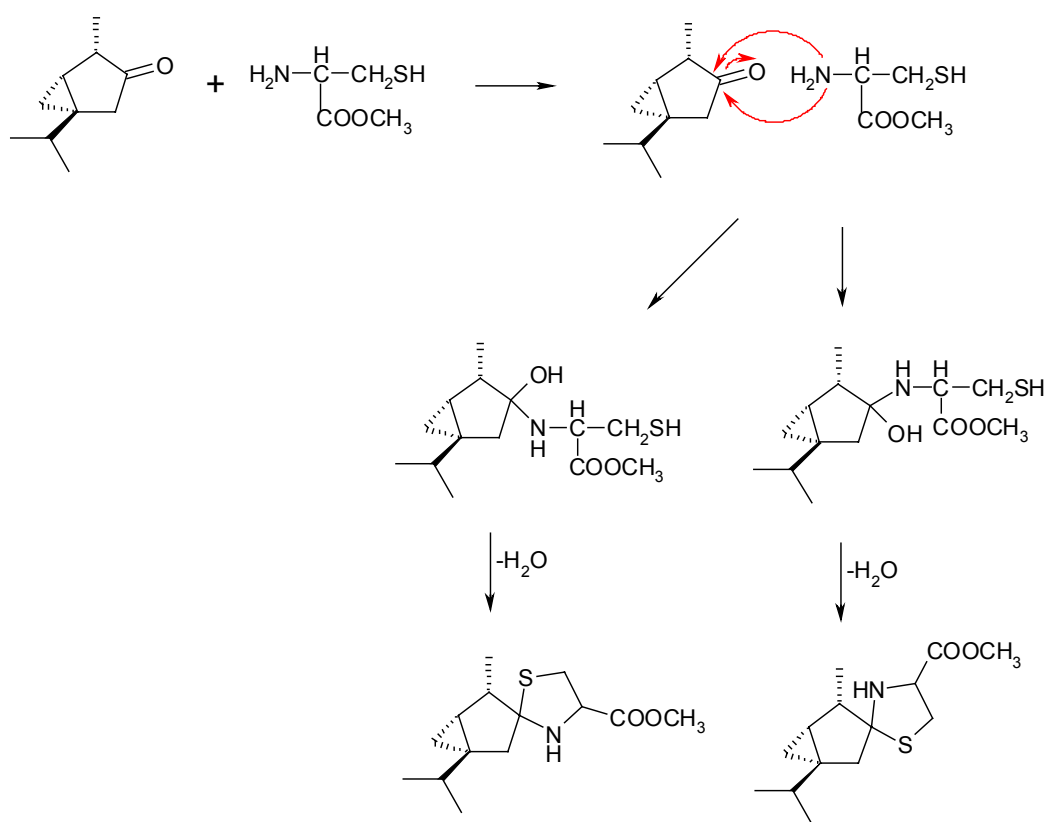


Abb. 11: Kondensation von Thujon mit Cystein zum Thiazolidin

3.3 Stoffwechsel

3.3.1 Enzymatischer Stoffwechsel

Der Abbau von Thujon in der Leber erfolgt durch Cytochrom P450 [Ishida et al., 1989]. Kaninchen- und Mäuseleber-Cytosol (1 mg Protein) sowie gereinigte Mäuseleber-Mikrosomen (1 mg Protein) wurden mit 1 mM NADPH (und anderen Cofaktoren) und 0,2 μ M α -Thujon (30 μ g) in 1 ml 100 mM-Phosphat-Puffer (pH 7,4) 1 h bei 37 °C inkubiert. Als interner Standard für die Analyse wurde 0,05 μ g S-Carvon in 10 μ l Ethanol zugegeben. Die Mischung wurde mit NaCl gesättigt und mit 3 ml Ethylacetat 30 min unter leichtem Schütteln extrahiert. Nach Zentrifugation bei 900 g wurde das organische Extrakt bei Raumtemperatur im Stickstoffstrom fast vollständig eingedampft und in 50 μ l Ethylacetat für die GC-MS-Analyse gelöst. Die Wiederfindungswerte betragen, ohne Verluste durch die GC, für α -Thujon und die Hauptmetaboliten > 60%.

Die Inkubation von α -Thujon mit Kaninchenleber-Cytosol lieferte als Stoffwechselprodukte in geringen Mengen Thujol und Neothujol. Diese enzymatische Reduktion ist NADPH-abhängig.

Der Stoffwechsel in Mäuseleber-Mikrosomen verläuft über eine wesentlich einfachere Reaktion und liefert kein Thujol oder Neothujol, jedoch verschiedene andere Metabolite. α -Thujon wurde in Anwesenheit von NADPH fast vollständig metabolisiert. Dagegen war α -Thujon alleine oder nach Zugabe von NADP, NADH oder NAD bei der Inkubation mit Mäuseleber-Mikrosomen stabil. Mittels GC-MS und Derivatisierungsmethoden (siehe Kap. 2.3.2.3) konnten sechs NADPH-abhängige mikrosomale Stoffwechselprodukte identifiziert werden (Abb. 12). Als Hauptprodukt wurde 7-Hydroxy- α -thujon bestimmt, daneben 7,8-Dehydro- α -thujon und die Diastereomere von 4-Hydroxythujon [Höld et al., 2000].

3.3.2 Metabolite im Gehirn

α -Thujon wurde Mäusen intraperitoneal verabreicht. Nach einer bestimmten Zeit wurden die Tiere getötet und das Gehirn vollständig zur Analyse entnommen. Die Proben wurden in 10 ml 100 mM-Phosphatpuffer (pH 7,4) gereinigt und homogenisiert. S-Carvon wurde als interner Standard zugegeben und die Mischung 10 min bei 1500 g zentrifugiert. Der Rückstand wurde in 2 ml Phosphat-Puffer aufgenommen, 1 min mit Ultraschall behandelt und zentrifugiert. Die vereinigten Lösungen wurden mit 6 ml Ethylacetat extrahiert und wie unter 3.3.1 beschrieben analysiert.

Im Gehirn konnten α -Thujon sowie die Metabolite, die man auch im P450-System der Leber beobachtet hatte, identifiziert werden (Abb. 12).

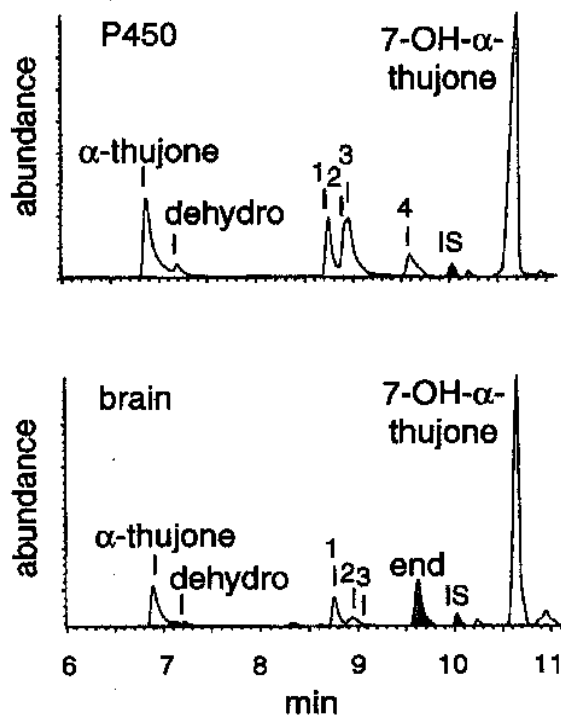


Abb. 12: Identifizierte Stoffwechselprodukte von Thujon (1: 4-Hydroxy- α -thujon; 3: 4-Hydroxy- β -thujon; 2 und 4: andere; end: Fremdschubstanz; IS: interner Standard) Höld et al. 2000)

Die Gehalt von α -Thujon und 7-Hydroxy- α -thujon im Gehirn nach intraperitonealer Gabe von α -Thujon waren abhängig von Dosis und Zeit (Abb. 13, 14). Von Bedeutung ist, dass α -Thujon in wesentlich geringeren Mengen und weniger lang vorhanden war als 7-Hydroxy- α -thujon. Bei toxischen α -Thujon-Dosen von 40-60 mg/kg betrug der Gehalt im Gehirn nach 30 min 0,3-1,0 ppm α -Thujon und 1,5-8,4 ppm 7-Hydroxy- α -thujon (Abb. 13), während der Anteil nach 2,5 min, d.h. bei den stärksten Vergiftungssymptomen, wesentlich höher war (11 ppm α -Thujon bzw. 29 ppm 7-Hydroxy- α -thujon; Abb. 14). Die Hydroxythujone, die in geringerer Menge auftraten, konnten nur bis zu 20 min nach der Gabe von 50 mg/kg α -Thujon identifiziert werden [Höld et al., 2000].

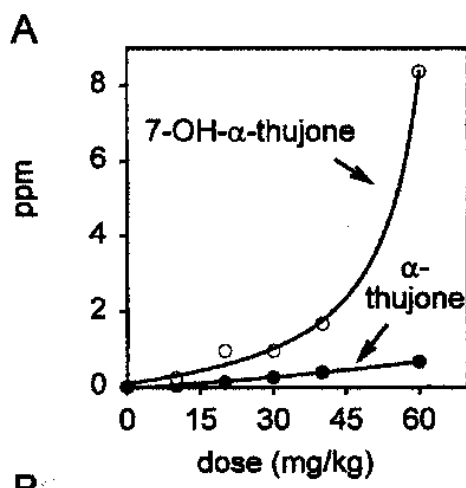


Abb. 13: Abhängigkeit des Gehalts im Gehirn von der Dosis, 30 min nach der Behandlung mit α -Thujon (Höld et al., 2000)

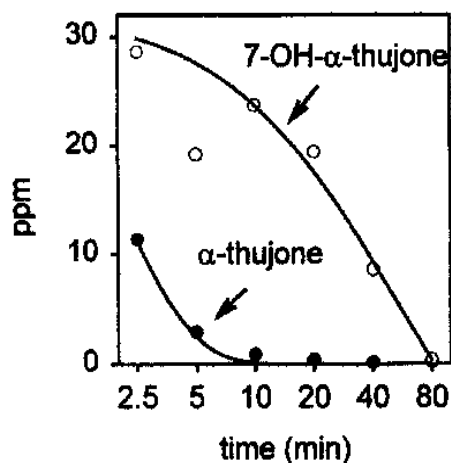


Abb. 14: Abhängigkeit des Gehalts im Gehirn von der Zeit, nach einer Behandlung mit 50 mg/kg α -Thujon (Höld et al., 2000)

3.3.3 Weitere Stoffwechselprodukte

Nach oraler Gabe von ca. 650-800 mg/kg Körpergewicht einer Mischung von α - und β -Thujon im Verhältnis 9:2 wurden bei männlichen Kaninchen zwei neutrale Metaboliten im Urin als 3- β -Hydroxy- α -thujan und 3- β -Hydroxy- β -thujan identifiziert. Daraus geht hervor, dass die Reduktion trotz der unterschiedlichen Konfigurationen der Methylgruppe stereospezifisch verläuft [Ishida *et al.*, 1989]. Bei Mäuse-, Ratten- und menschlichen Lebermikrosomen wurden Unterschiede im Stoffwechsel der Thujon-Diastereomere beobachtet. An Mäusen und Ratten

konnten diese Unterschiede auch *in vivo* festgestellt werden. Die 2-Hydroxylierung wurde nur bei Mäusen beobachtet, bei denen dieser konjugierte Metabolit ein Hauptstoffwechselprodukt im Urin ist.

Ein weiterer, wichtiger Stoffwechselweg ist die 4-Hydroxylierung. Der Hauptmetabolit im Urin von Ratten ist 4-Hydroxythujon.

Durch Spezifität bei der Glucuronidierung verläuft die Konjugation der (2R)-Hydroxy- und 4-Hydroxythujonglucuronide gegenüber den anderen drei Hydroxythujonen bevorzugt. Außerdem wurden 7,8- und 4,10-Dehydro-Stoffwechselprodukte identifiziert [Höld et al., 2001].

Die identifizierten Produkte des oxidativen Stoffwechsels sind in Abb. 15 zusammengefaßt [SCF, 2002].

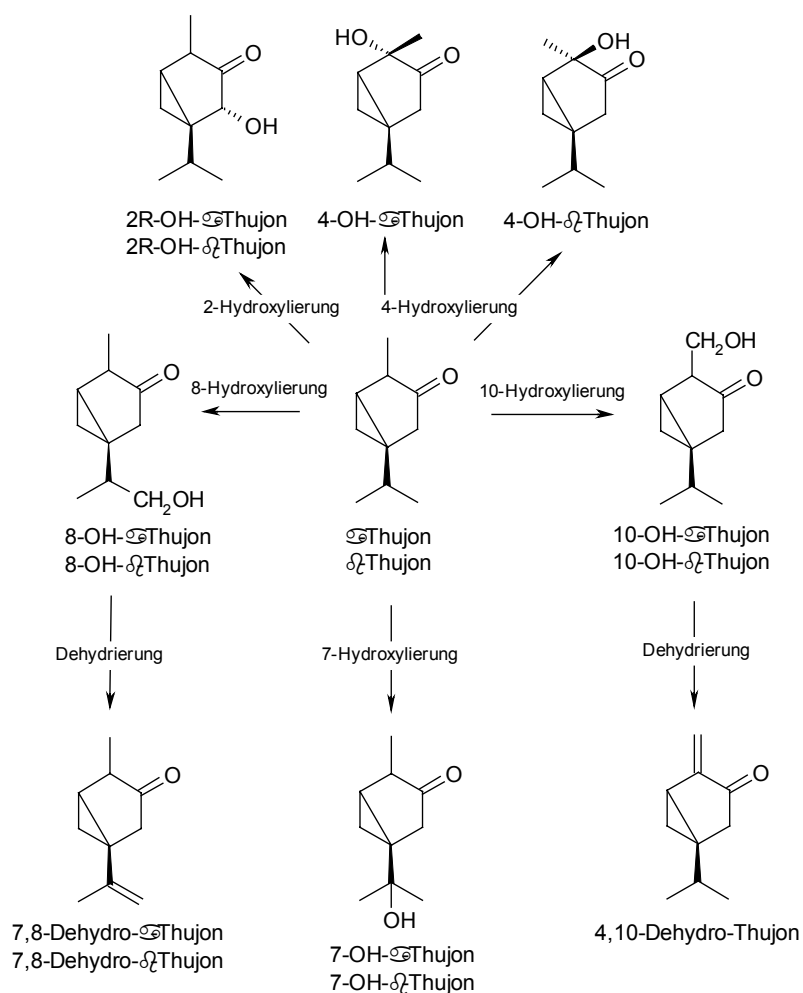


Abb. 15: Oxidativer Stoffwechsel von Thujon (zit. nach SCF, 2002)

3.3.4 Biologische Aktivität der Metabolite

Synthetische Standards von 7-Hydroxy- α -thujon, 7,8-Dehydro- α -thujon sowie Thujol und Neothujol wurden auf ihre Toxizität bei Mäusen und *Drosophila* sowie ihre Wirksamkeit als Inhibitoren der [3 H]EBOB-Bindung untersucht und mit α -Thujon verglichen. Es wurden jeweils 50 mg/kg i.p. bei Mäusen und 50 μ g/Röhre bei Dieltrin-empfindlichen *Drosophila* (siehe Kap. 3.2.1.1) verwendet. Bei Mäusen wirkte diese Dosis α -Thujon tödlich, während die gleiche Menge 7-Hydroxy- α -thujon, 7,8-Dehydro- α -thujon und Thujol/Neothujol nicht tödlich war. Bei *Drosophila* wirkte α -Thujon eine Sterblichkeit von 100%, während die Sterblichkeit durch 7,8-Dehydro- α -thujon 70%, und durch 7-Hydroxy- α -thujon und Thujol/Neothujol ungefähr 30% betrug.

Im Versuch zur Bindung von [3 H]EBOB (siehe Kap. 3.2.1.2) ergab sich für 7-Hydroxy- α -thujon ein IC_{50} -Wert von $730 \pm 265 \mu$ M (Abb. 4), der IC_{50} -Wert für 7,8-Dehydro- α -thujon lag mit $149 \pm 10 \mu$ M etwas niedriger. Beide Werte sind jedoch deutlich höher als derjenige von α -Thujon mit $13 \pm 4 \mu$ M [Höld et al., 2000].

4 Toxikologie

Die durchschnittliche tägliche Aufnahme von Thujon schätzte man in Frankreich auf 15,6 μ g/kg Körpergewicht bzw. mit einem Toleranzbereich von 97,5% auf 44,3 μ g/kg Körpergewicht/Tag. In England wurde sie mit 3,9 bzw. 14,2 μ g/kg Körpergewicht/Tag etwas niedriger beurteilt. Diese Schätzungen basieren auf den Grenzwerten, die vom Europäischen Rat vorgeschlagen wurden [EU, 2000]. Dabei fällt der größte Anteil auf Salbei- bzw. salbeiaromatisierte Produkte und alkoholische Getränke zurück.

Vergiftungen durch Wermut oder Rainfarn kamen früher nur bei der Anwendung als Wurmmittel oder Abortiva in der Volksmedizin vor. Vergiftungen durch Rainfarn können aufgrund des stark variierenden Thujongehalts verschiedener Chemotypen schon im üblichen Dosierungsbereich auftreten.

Symptome sind klonische und tonische Krämpfe, Mydriasis und Pupillenstarre sowie Leber- und Nierenschäden. 1-3,5 Stunden nach der Aufnahme kann der Tod durch Kreislauf- und Atemstillstand eintreten. Beim Menschen beträgt die letale Dosis an ätherischem Öl 15-30 g.

Akute Thujonvergiftungen durch Salbei traten nur nach der Einnahme größerer Mengen zu Abtreibungszwecken auf. Die Verwendung von Salbei zum Dauergebrauch in Form von Tee scheint im Gegensatz zur kurzfristigen Anwendung als Gurgelmittel und Antihydrotikum bedenklich. Auch Vergiftungen durch den Lebensbaum erfolgten hauptsächlich nach dem Missbrauch als Abortivum.

Nach dem Verbot der Absinth-Herstellung hatte Thujon kaum noch toxikologische Bedeutung. Die bei der Produktion von Wermutweinen und -likören verwendeten wässrigen Extrakte enthalten nur Spuren von Thujon. Einzige Ausnahme sollen die in einigen Ländern weiterhin hergestellten Benediktiner- und Chartreuse-Liköre mit relativ hohem Thujongehalt sein [Bielenberg, 2002].

Studien über die pharmakologischen und toxikologischen Eigenschaften von Thujon werden durch die Verwendung nicht definierter Mischungen der beiden Isomere erschwert. Da sich die Isomere deutlich in Toxizität und krampfauslösender Wirkung unterscheiden, müssen quantitative Daten zu Mischungen unbekannter Zusammensetzung mit Vorsicht interpretiert werden.

Studien zur Genotoxizität, chronischen Toxizität und Karzinogenität des NTP-Testprogramms sind noch nicht abgeschlossen. Zu Reproduktions- und Entwicklungsstudien sind keine Daten erhältlich [SCF, 2002].

4.1 Akute Toxizität

Die orale LD₅₀ wurde bei Ratten mit 192 mg/kg Körpergewicht [Margaria, 1963] bzw. 500 mg/kg Körpergewicht [NLM, 1997] bestimmt, die intravenöse LD₅₀ bei Kaninchen beträgt 0,031 mg/kg Körpergewicht [NLM, 1997]. Die akute Toxizität von Thujon ist wesentlich stärker, wenn die Aufnahme nicht über den Magen-Darm-Trakt erfolgt.

Bei Ratten bewirkten intraperitoneale Injektionen von Thujon elektrokortikale Anfälle mit myoklonischer Aktivität. Die krampfauslösenden und

tödlichen Wirkungen traten bei einer Dosis von 0,2 ml/kg Körpergewicht auf [Pinto-Scognamiglio, 1968].

Die Ergebnisse verschiedener Studien sind in Tab. 10 zusammengefaßt.

Tab. 10: LD₅₀-Werte von Thujon aus verschiedenen Studien

Spezies	Verwendetes Isomer	Aufnahme	LD ₅₀ (mg/kg Körpergewicht)	Literatur
Maus	Nicht bestimmt	oral	230	Margaria, 1963
Maus	α -Thujon	oral	250	Le Bourhis & Soenen, 1973
Maus	α -Thujon	i.p.	260 ^{a)} 72 ^{b)}	Le Bourhis & Soenen, 1973
Maus	α -Thujon β -Thujon	s.c.	134 442	Rice <i>et al.</i> , 1976
Ratte	nicht bestimmt	oral	192	Margaria, 1963
Ratte	nicht bestimmt	i.p.	140	Sampson & Fernandez, 1939
Meerschweinchen	nicht bestimmt	oral	396	Margaria, 1963
Hund	β -Thujon	oral	250	Ionescu <i>et al.</i> , 1958

^{a)} verabreicht als Lösung in Olivenöl

^{b)} verabreicht als wässrige Suspension in 1% Tween 20

4.1.1 Studie des NTP-Testprogramms

Die Toxizität von α -Thujon sowie einer Mischung von α - und β -Thujon wurde in einer 14-tägigen Studie an Mäusen (B6C3F1) und Ratten (Fischer 344) untersucht. α -Thujon wurde in Dosen von 0, 1, 3, 10, 30 bzw. 100 mg/kg Körpergewicht im Futter verabreicht.

In der höchstdosierten Gruppe starben vier von fünf männlichen sowie alle fünf weiblichen Mäusen mit Anzeichen von Neurotoxizität (Hyperaktivität, Zuckungen, tonische Krämpfe). Histologische Veränderungen wurden nur in der höchstdosierten Gruppe beobachtet: eine leichte Gefäßerweiterung der Nieren, Fokaldegeneration, erhöhte Hämatopoiesis in der Milz sowie eine Myelzellen-Hyperplasie des Knochenmarks.

Bei den Ratten war die Sterblichkeit in der höchstdosierten Gruppe nur bei weiblichen Tieren erhöht (3/5). Wie bei den Mäusen waren die Todesfälle verbunden mit Krämpfen.

Die Mischung von α - und β -Thujon (genaue Zusammensetzung nicht bekannt) wurde in vergleichbare Dosen im Futter verabreicht. In der höchstdosierten Gruppe der Mäuse wurde eine erhöhte Sterblichkeit bei männlichen

(5/5) und weiblichen (2/5) Tieren beobachtet, jedoch ohne bemerkenswerte allgemeine oder histopathologische Ursachen. Ein Fünftel der männlichen Ratten starb in der höchstdosierten Gruppe, allgemeine und histopathologische Veränderungen waren jedoch minimal [SCF, 2002].

4.1.2 Studie von Höld, Sirisoma, Ikeda, Narahashi und Casida [2000]

Männliche Swiss-Webster Albino-Mäuse (22-28 g) erhielten die Testsubstanz in Propylenglykol (2 µl/g Körpergewicht) intraperitoneal verabreicht. Die Behandlungen wurden mit α -Thujon (100 mg/kg) ohne Vorbehandlung sowie nach 20minütiger Vorbehandlung mit Ethanol (0,5 bzw. 1,0 g/kg als 20 bzw. 40% in Kochsalzlösung) und nach 15minütiger Vorbehandlung mit Diazepam (1 mg/kg) oder Phenobarbital (15 mg/kg) durchgeführt.

Die intraperitoneale LD₅₀ von α -Thujon bei Mäusen betrug etwa 45 mg/kg, bei einer Sterblichkeit von 0% bzw. 100% bei 30 bzw. 60 mg/kg. Bei der höchsten Dosis wurden tonische Krämpfe beobachtet, die innerhalb von 1 min zum Tod führten. Bei einer Dosis von 30-45 mg/kg stellten die Mäuse innerhalb der ersten 2 min den Schwanz auf, gefolgt von einer Krümmung des Körpers und klonischer Aktivität der vorderen Gliedmaßen. Schließlich kam es zu anhaltenden tonisch-klonischen Krämpfen im gesamten Körper, die in einigen Fällen zum Tod führten.

Bei intraperitonealer Gabe von Diazepam oder Phenobarbital 15 min vor der Verabreichung einer Dosis von 100 mg/kg α -Thujon überlebten fast alle Mäuse die eigentlich tödliche Dosis. Auch die intraperitoneale Vorbehandlung mit 1 g/kg Ethanol unterdrückte die tödliche Wirkung von 100 mg/kg α -Thujon. Bei der Gabe von 0,5 g/kg Ethanol wurde diese Wirkung nicht beobachtet [Höld et al., 2000].

4.2 Subakute (subchronische) Toxizität

4.2.1 Studie von Surber [1962]

Gruppen von je 20 männlichen und weiblichen jungen Ratten erhielten über einen Zeitraum von 13 Wochen eine handelsübliche Mischung von α - und β -

Thujon in Dosen von 0, 12,5, 25 bzw. 50 mg/kg Körpergewicht/Tag. Die Dosis wurde an fünf Tagen pro Woche als Suspension in wässrigem Agar verabreicht. Fünf Ratten (vier männliche und eine weibliche) starben während der Eingewöhnung, drei weitere (je eine männliche aus der niedrig und mitteldosierten Gruppe sowie eine weibliche aus der Kontrollgruppe) starben während der Behandlung an einer viralen Infektion. Bei den Ratten, die 12,5 bzw. 25 mg/kg Körpergewicht erhielten, traten keine dosisbezogenen Todesfälle auf. In der höchstdosierten Gruppe wurde eine erhöhte Sterblichkeit von 60% bei weiblichen und 37% bei männlichen Tieren beobachtet. Nach der Behandlung auftretende Krämpfe wurden häufig beobachtet (Tab. 11).

Tab. 11: Krampfhäufigkeit nach der Gabe von Thujon [Surber, 1962]

Dosis (mg/kg/Tag)	Geschlecht	Betroffene Tiere		
		1. Monat	2. Monat	3. Monat
12,5	Männlich	0/18	0/16	0/16
	Weiblich	0/20	1/20	0/20
25,0	Männlich	0/18	3/18	0/18
	Weiblich	2/20	6/20	7/18
50,0	Männlich	7/19	13/17	10/12
	Weiblich	11/15	8/10	7/8

Die krampfauslösende ED₅₀ wurde auf 35,5 mg/kg/Tag für männliche und 26,3 mg/kg/Tag für weibliche Tiere geschätzt. Ein Zusammenhang zwischen der Anzahl der Krämpfe und dem Tod war nicht ersichtlich, im Extremfall hatte ein überlebendes Tier 10 Krampfanfälle und ein Tier starb ohne Krämpfe. Der NOEL für Krämpfe bei männlichen Tieren betrug 12,5 mg/kg Körpergewicht, für weibliche Tiere konnte in dieser Studie kein NOEL bestimmt werden, da bei einer Ratte in der niedrigsten Dosisgruppe zwei Krampfanfälle beobachtet wurden. Es wurde keine Wirkung auf Gewichtszunahme oder Hämatologie beobachtet, die histopathologische Untersuchung nach Abschluss zeigte keine dosisbezogenen Schädigungen [Surber, 1962].

4.2.2 Studie von Margaria [1963]

In einer Kurzzeitstudie an Ratten erhielten vier Gruppen von je 10 männlichen und weiblichen Tieren über einen Zeitraum von 14 Wochen an sechs Tagen pro Woche Dosen von 0, 5, 10 bzw. 20 mg/kg Thujon im Futter. Die Isomeren-Zusammensetzung des verwendeten Gemisches war nicht bekannt.

Bei neun weiblichen und sechs männlichen Tieren der höchstdosierten Gruppe wurden Krämpfe beobachtet. Drei weibliche und eine männliche Ratte dieser Gruppe starben an den Krämpfen. In der Gruppe, die 10 mg/kg Thujon erhielt, hatte nur ein weibliches Tier am 38. Tag einen Krampfanfall. Bei beiden Geschlechtern lag die ED₅₀ zwischen 10 und 20 mg/kg täglich über einen Zeitraum von 3 Monaten.

Nach Abschluss des Versuchs wurden zwischen den Gruppen keine Unterschiede hinsichtlich Gewichtszunahme, Hämatologie (Hb, RBC, WBC) und den Gewichten von Herz, Leber, Milz, Niere und Nebennieren beobachtet. Behandlungsbedingte schwere pathologische oder histopathologische Veränderungen traten nicht auf. Die Dosis ohne Wirkung betrug 5 mg/kg/Tag bei weiblichen und 10 mg/kg/Tag bei männlichen Tieren [Margaria, 1963].

4.3 Weitere Toxizitätsstudien

4.3.1. Rainfarn-Öl (*Tanacetum vulgare*)

Hauptbestandteile von Rainfarn-Öl sind α - und β -Thujon, Campher und Borneol. Der durchschnittliche Gehalt an Thujon beträgt etwa 50%.

Die akute orale LD₅₀ bei Ratten betrug 1,15 g/kg, die akute dermale LD₅₀ bei Kaninchen >5 g/kg. Bei Hunden mit Wurminfektionen wirkte Rainfarn-Öl bei oralen Dosen von 300 mg/kg toxisch.

Rainfarn-Öl löst Krämpfe und Vergiftungssymptome aus, die als Wirkung von Thujon identifiziert wurden: Erbrechen, Gastroenteritis, Erregung, Krämpfe, Bewusstlosigkeit, Erhöhung der Atemfrequenz, Herzrhythmusstörungen, innere Blutungen und Hepatitis. Der Tod tritt durch Kreislauf- oder Atemstillstand ein, außerdem wurde von degenerativen Organveränderungen berichtet. Auch Todesfälle bei Menschen sind bekannt.

Unverdünntes Rainfarn-Öl wirkte bei unbehaarten Mäusen und Schweinen nicht hautreizend. In einem 24 h-Pflaster-Test an Kaninchenhaut wurde eine leicht reizende Wirkung festgestellt. In einem 48 h-Pflaster-Test an menschlichen Versuchspersonen wirkte es nicht reizend. Es wurden keine Sensibilisierungsreaktionen und phototoxischen Wirkungen beobachtet [Opdyke, 1975].

4.3.2 Wermut-Öl (*Artemisia absinthium*)

Der Hauptbestandteil von Wermut-Öl ist Thujon. Die akute orale LD₅₀ bei Ratten beträgt 960 mg/kg, die akute dermale LD₅₀ bei Kaninchen liegt bei über 5 g/kg.

Das unverdünnte Öl wirkte im Versuch mit unbehaarten Mäusen nicht hautreizend, bei Kaninchen in einem 24 h-Pflaster-Test leicht reizend. Im 48 h-Pflaster-Test an menschlichen Versuchspersonen bewirkte es keine Reizung. Es wurden keine Sensibilisierungsreaktionen und phototoxischen Wirkungen beobachtet [Opdyke, 1975].

5 Rechtliche Bestimmungen

5.1 Frühere Beurteilungen

Der Europäische Rat setzte für Thujon einen TDI-Wert von 10 µg/kg Körpergewicht/Tag fest. Dieser Wert basiert auf einem NOEL von 5 mg/kg, der an weiblichen Ratten ermittelt wurde, denen über einen Zeitraum von 14 Wochen an 6 Tagen/Woche Thujon im Futter verabreicht wurde. Es wurde ein Sicherheitsfaktor von 500 hinzugefügt. Vom JECFA (Joint FAO/WHO Committee on Food Additives) wurde Thujon noch nicht beurteilt.

5.2 Aktuelle rechtliche Bewertung

Die Europäische Union hat in Anhang II der Richtlinie 88/388/EWG für Aromastoffe folgende Höchstwerte für α- und β-Thujon in Nahrungsmitteln und Getränken festgelegt [EU, 1988]:

0,5 mg/kg	in Lebensmitteln und Getränken, mit Ausnahme von:
5 mg/kg	in alkoholischen Getränken mit einem Alkoholgehalt von weniger als 25 Vol.-% Alkohol

10 mg/kg	in alkoholischen Getränken mit einem Alkoholgehalt von mehr als 25 Vol.-% Alkohol
25 mg/kg	in Nahrungsmitteln, die Zubereitungen auf der Basis von Salbei enthalten
35 mg/kg	in Bitterspirituosen.

In den USA ist Thujon als Aromastoff nicht zugelassen.

Das Codex Committee on Food Additives empfahl 1979, den Gebrauch von α - und β -Thujon auf folgende Höchstwerte in Endprodukten für den Verbraucher einzuschränken:

0,5 mg/kg	in Lebensmitteln und Getränken
5 mg/kg	in alkoholischen Getränken, die weniger als 25 Vol.-% Alkohol enthalten
10 mg/kg	in alkoholischen Getränken, die mehr als 25 Vol.-% Alkohol enthalten
35 mg/kg	in Bitterspirituosen.

[Codex Alimentarius Commission, 1979].

Die Begriffsbestimmung Spirituosen bezeichnet alkoholische Flüssigkeiten, „die zum menschlichen Verbrauch bestimmt sind und besondere organoleptische Eigenschaften haben, einen Mindestalkoholgehalt von 15 Vol.-% aufweisen und durch Destillation mit und ohne Zusatz von Aromastoffen oder Einmischung von pflanzlichen Stoffen oder Zusatz von Aromastoffen...“ [EU, 1989]. In der Deutschen Aromenverordnung von 1991 wurde der alte Begriff Bitter-Branntwein zwecks EU-Angleichung durch den Begriff Bitter-Spirituose ersetzt.

6 Zusammenfassende Bewertung

Absinth, die „Grüne Fee“, ist ein hochprozentiges alkoholisches Getränk, das unter anderem aus Wermutkraut hergestellt wird.

Nachdem Absinth Mitte des 18. bis Anfang des 19. Jahrhunderts zum Modegetränk wurde, führten die neurotoxische Wirkung und der zunehmende Missbrauch ab 1910 zu Verboten in der Schweiz, Frankreich und Deutschland.

1981 wurde das Absinth-Verbot in Deutschland aufgehoben.











Grund für die neurotoxische Absinth-Wirkung ist Thujon, ein bicyclisches Monoterpen, das im Wermutöl enthalten ist. Thujon ist ein Nervengift, das in höheren Dosierungen krampfauslösend wirkt.

Es wirkt über den γ -Aminobuttersäure-Typ A-Rezeptor. Mit Neurotransmittern kann es Azomethine bilden. Die ursprünglich vermutete Wirkung über den CB1-Cannabinoid-Rezeptor spielt, wenn überhaupt, nur eine geringe Rolle. Der Stoffwechsel, der in der Leber durch Cytochrom P450 erfolgt, führt zur Detoxifikation.

Ob Thujon ein eigenständiges Suchtpotential hat, ist noch ungeklärt. Fest steht aber, dass der heute auf dem Markt erhältliche Absinth mit den früheren Produkten nicht zu vergleichen ist, da die damaligen Absinth-Sorten die 10 bis 100-fache Menge an Thujon enthielten.

Die heutigen Absinth-Sorten enthalten vermutlich keine wirksamen Thujon-Konzentrationen, wie eine Rechnung von Max (1990) belegt: Die Destillation von Wermutkraut ergibt eine Ausbeute von 0,27-0,4% Öl. Die typischen Absinth-Rezepte verwenden etwa 2,5 kg der Pflanze pro 100 l Absinth. Umgerechnet auf einen Drink ergeben sich 4,4 mg Wermutöl bzw. maximal 2 mg Thujon. Dies liegt unter dem Gehalt, bei dem akute pharmakologische Wirkungen beobachtet werden [Max, 1990]. Hinzu kommt, dass der hohe Ethanolgehalt die Aufnahme von Thujon automatisch begrenzt. Die Aufnahme von 1 l Absinth mit einem Thujongehalt von 5 mg/l entspricht der Aufnahme von 0,08 mg/kg Körpergewicht Thujon bei einem 60 kg schweren Erwachsenen. Diese Menge ist 100fach geringer als der NOEL, der aus einer 14-tägigen Studie an Ratten ermittelt wurde.

7Literatur

-  Anderson, I.B.; Mullen, W.H.; Meeker, J.E.; Khojasteh-Bakht, S.C.; Oishi, S.; Nelson, S.D.; Blanc, P.D.; 1996: Pennyroyal oil toxicity: measurement of toxic metabolite levels in two cases and review of the literature. *Ann. Intern. Med.*, **124**, 726-734
-  Arnold, W.N.; 1988: Vincent van Gogh and the thujone connection. *J. Am. Med. Assoc.*, **260**, 3042-3044
-  Arnold, W.N.; 1989: Absinthe. *Scientific American*, **260**, 112-117
-  Arnold, W.N.; 1992: Vincent van Gogh: Chemicals, crisis and creativity. *Boston, Basel, Berlin: Birkhäuser Verlag*
-  Arnold, W.N.; Loftus, L.S.; 1991: Xanthopsia and van Gogh's yellow palette. *Eye*, **5**, 503-510
-  Aronson, S.M.; 1999: Absinthe makes the heart grow fonder. *Med. Health. R. I.*, **82**, 80-81
-  Bielenberg, J.; 2002: Die „Grüne Fee“. Zentralnervöse Effekte durch Thujon:
http://www.oeaz.at/zeitung/3aktuell/2002/12/haupt/haupt12_2002zent.html
-  Blocher, E.; Steck, H.; 1958: 50 Jahre Absinthverbot. In: Zurukzoglu, S. (Hrsg.): *Die Alkoholologie in der Schweiz*. Schwabe, Basel
-  Blumenthal, M. (ed.); 1998: The Complete German Commission E Monographs: Therapeutic Guide to Herbal Medicines. *American Botanical Council, Austin, TX*, 664-665
-  Bonkovsky, H.L.; Cable, E.E.; Donohue, S.E.; White, E.C.; Greene, Y.J.; Lambrecht, R.W.; Srivista, K.K.; Arnold, W.N.; 1992: Porphrogenic properties of the terpenes camphor, pinene and thujone (with a note on historic implications for absinthe and the illness of Vincent van Gogh). *Biochem. Pharm.*, **43**, 2359-2368

- Bundesrat; 1991: Bundesdrucksache 428/91:23
- Burkhard, P.R.; Burkhardt, K.; Haenggeli, C.A.; Landis, T.; 1999: Plant-induced seizures: reappearance of an old problem. *J. Neurol.*, **246**, 667-670
- Camag, 1996: Applikationsschriften zur Instrumentellen Dünnschichtchromatographie. http://www.camag.ch/pdf_dat/a-67_1d.pdf
- Codex Alimentarius Commission; 1979: Report of the 13th Session of the Codex Committee on Food Additives. Joint FAO/WHO Food Standards Programme, Codex Alimentarius Commission, 11-17th September 1979, Alinorm 79/12-A
- Cole, L.M.; Lawrence, L.J.; Casida, J.E.; 1984: *Life Sci.*, **35**, 1755-1762
- Cole, L.M.; Casida, J.E.; 1992: *Pestic. Biochem. Physiol.*, **44**, 1-8
- Conrad, B.; 1988: Absinthe: History in a bottle. *San Francisco: Chronicle Books*
- Del Castillo, J.; Anderson, M.; Rubottom, G.M.; 1974: Marijuana, absinthe and the central nervous system. *Nature*, **253**, 365-366
- Demirci, B.; Baser, K.H.C.; Yildiz, B.; Bahçecioglu, Z.; 2003: Composition of the essential oils of six endemic *Salvia* spp. From Turkey. *Flavour Fragr. J.*, **18**, 116-121
- Emmert, J.; 2003: Analytik (akt. Absinth). <http://www.emmert-analytik.de/analytik.htm>
- Enna, S.J.; Bowery, N.G. (eds.); 1997: The GABA Receptors. Humana, Totowa, NJ, 2nd Ed.
- EU; 1988: Richtlinie des Rates vom 22.06.1988 zur Angleichung der Rechtsvorschriften der Mitgliedsstaaten über Aromen zur Verwendung in Lebensmitteln und über Ausgangsstoffe für ihre Herstellung. *Amtsblatt L184 vom 15.07.1988*
- EU; 1989: Verordnung des Rates vom 29.05.1989 zur Festlegung der allgemeinen Regeln für die Begriffsbestimmung, Bezeichnung und Aufmachung von Spirituosen. *Verordnung 1576/89*
- EU, 2000: Document RD 4.11/1-46 (revised)
- Ffrench-Constant, R.H.; Roush, R.T.; 1991: *Genet. Res.*, **57**, 17-21
- Ffrench-Constant, R.H.; Steichen, J.C.; Rocheleau, K.; Aronstein, K.; Roush, R.T.; 1993: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 1957-1961

- Grainge, M.; Ahmed, S.; 1988: handbook of Plants with Pest-Control Properties. *Wiley, New York*, 35-36
- Greenberg, J.H.; Mellors, A.; McGowan, J.C.; 1978: Molar volume relationship and the specific inhibition of a synaptosomal enzyme by psychoactive cannabinoids. *J. Med. Chem.*, **21**, 1208
- Gruenwald, J.; Brendler, T.; Jaenicke, C. (eds.); 1998: PDR for Herbal Medicines. *Medical Economics, Montvale, NJ*, 1181-1183
- Haines, J.D.; 1998: Absinthe – return of the green fairy. *J. Okla. Med. Assoc.*, **91**, 406-407
- Höld, K.M.; Sirisoma, N.S.; Ikeda, T.; Narahashi, T.; Casida, J.E.; 2000: α -Thujone (the active component of absinthe): γ -aminobutyric acid type A receptor modulation and metabolic detoxification. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **97**, 3826-3831
- Höld, K.M.; Sirisoma, N.S.; Casida, J.E.; 2001: Detoxification of α - and β -thujones (the active ingredients of absinthe): Site specificity and species differences in cytochrome P450 oxidation in vitro and in vivo. *Chem. Res. Toxicol.*, **14**, 589-595
- Ionescu, C.N. et al.; 1958 : Extragerea principiilor activi din Tanacetum vulgare. *Communie Acad. Rep. Pop. Rom.*, **8**, 279
- Ishida, T.; Toyota, M.; Asakawa, Y.; 1989: Terpenoid biotransformation in mammals. V. Metabolism of (+)-citronellal, (+/-)-7-hydroxycitronellal, citral, (-)-perillaldehyde, (-)-myrtenal, cuminaldehyde, thujone, and (+/-)-carvone in rabbits. *Xenobiotica*, **19**, 843-855
- Keith, H.M.; Stavaky, G.W.; 1935: Experimental convulsions induced by administration of thujone. A pharmacologic study of the influence of the autonomic nervous system on these convulsions. *Arch. Neurol. Psych.*, **34**, 1022-1040
- Kulkarni, S.K.; Mehta, A.K.; Ticku, M.K.; 1990: *Life Sci.*, **46**, 481-487
- Le Bourhis, B.; Soenen, A.M. ; 1973 : Recherches sur l'action psychotrope de quelques substances aromatiques utilisées en alimentation. *Fd. Cosmet. Toxicol.*, **11**, 1-9
- Lee, S.; Tsao, R.; Peterson, C.; Coats, J.R.; 1997: *J. Econ. Entomol.*, **90**, 883-892

- Leung, A.Y.; Foster, S.; 1996: *Encyclopedia of Common Natural Ingredients Used in Food, Drugs and Cosmetics*, 2nd ed., New York: John Wiley & Sons, 1996, 1-3
- Margaria, R.; 1963: Acute and sub-acute toxicity study on thujone. Unpublished report of the Instituto di Fisiologia, Università di Milano (cited from CoE Datasheet RD 4.2/14-44, 1999)
- Max, B.; 1990: *TIPS*, **11**, 58-60
- Meschler, J.P.; Howlett, A.C.; 1999: Thujone exhibits low affinity for Cannabinoid receptors but fails to evoke cannabimimetic responses. *Pharm. Biochem. Behav.*, **62**, 473-480
- Millet, Y.; Jouglard, J.; Steinmetz, M.D.; Tognetti, P.; Joanny, P.; Arditti, J.; 1981: Toxicity of some essential plant oils. Clinical and experimental study. *Clin. Toxicol.*, **18**, 1485-1498
- NLM, 1997: RTECS (Registry of Toxic Effects of Chemical Substances). Bethesda, MD. National Library of Medicine
- Olsen, R.W.; 2000: Absinthe and γ -aminobutyric acid receptors. *Proc Acad Sci*, **97**, 4417-4418
- Opdyke, D.L.J.; 1975: Monographs on fragrance raw materials – Artemisia oil (wormwood). *Fd. Cosmet. Toxicol.*, **13** (suppl.), 721-722
- Petrides, P.; 1997: Die akute intermittierende Porphyrie. *Dt Ärztebl*, **94**, A-3407-3412 [Heft 50]
- Pinto-Scognamiglio, W.; 1967: Connaissances actuelles sur l'activité pharmacodynamique de la thuyone aromatisant naturel d'un emploi étendu. *Boll. Chim. Farm.*, **106**, 292-300
- Pinto-Scognamiglio, W.; 1968: Effetti del thujone sull' attività spontanea e sul comportamento condizionato dell ratto. *Boll Chim Farm*, **107**, 780-791
- Reese, K.M.; 1999: *Chem. Eng. News*, **77** (12), 56
- Rice, K.C.; Wilson, R.S.; 1976: (-)-3-Isothujone, a small nonnitrogenous molecule with antinociceptive activity in mice. *J. Med. Chem.*, **19**, 1054-1057
- Römpp Lexikon Chemie – Version 2.0, Stuttgart/New York: Georg Thieme Verlag 1999
- Sampson, W.L.; Fernandez, L.; 1939: Experimental convulsions in the rat. *J. Pharm. Exptl. Therap.*, **65**, 275

- SCF, 2002: Opinion of the Scientific Committee on Food on Thujone (expressed on 2 December 2002)
- Steinmetz, M.D.I.; Tognetti, P.; Mourgue, M.; Jouglard, J.I.; Millet, Y.; 1980: Toxicity of certain commercial essential oils of hyssop and oil of sage. *Plant Med. Phytother.*, **14**, 34-45
- Strang, J.; Arnold, W.N.; Peters, T.; 1999: Absinthe: what's your poison? Though absinthe is intriguing, it is alcohol in general we should worry about. *Br. Med. J.*, **319**, 1590-1592
- Surber, W.; 1962: Etude de toxicité sous-chronique de la thujone sur rats. Rapport Final. Institut Battelle: Genève
- Vogt D.D.; Montagne M.; 1982: Absinthe: behind the emerald mask. *Int J Addict*, **17**, 1015-1029
- Weisbord, S.D.; Soule, J.B.; Kimmel, P.L.; 1997: Poison on line – Acute renal failure caused by oil of wormwood purchased through the internet. *N Engl J Med*, **337**, 825-827
- Wenzel, D.G.; Ross, C.R.; 1957: Central stimulating properties of some terpenones. *J. Amer. Pharm. Ass.*, **46**, 77