

Der Nachweis von nahrungsmittel-hygienisch toxischen Thujon und Caranon

Farbreaktionsmechanismus auf Thujon und Caranon

Chung-Kyu Ryu

College of Pharmacy, Ewha women's University, Seoul, 120, Korea

(Received November 20, 1985)

Abstract □ Many monoterpen-derivatives are contained in edible plants. Some monoterpen-derivatives have been assessed as negative factors in the food safety. Among them thujone and 4-caranone are important toxic constituents of many plant essential oils. In this study, convenient detection methods of thujone and 4-caranone in oil were developed. The colour reactions of toxic thujone and 4-caranone were performed in order to detect those in foods and oils. Sodium pentacyanonitrosylferrate (II) reacts with thujone to produce thujaoximino-carboxylic acid which becomes the sixth ligand in the ferrate complex (red colour reaction for thujone).

Sodium pentacyanonitrosylferrate (II) cleaves 4-caranone to the red ferrate complex of caranone.

Keywords □ Thujone, Caranone, detection, colour reaction, Sodium pentacyanonitrosylferrate (II)

Thujon, ein bicyclisches Monoterpenon, ist ein Bestandteil des ätherischen Öles vieler Pflanzen, die oft verwandtschaftlich weit auseinanderstehen.

Gerade der Wermut und das aus ihm hergestellte Getränk, der Absinth, haben die Giftigkeit des Thujons erkennen lassen und dazu geführt, daß zu Beginn dieses Jahrhunderts in einigen Staaten das Herstellen Thujonhaltiger Getränke verboten wurde.¹⁾

Von den verschiedenen Wirkungen des Thujons wurde die psychotrope am häufigsten untersucht.

In geringen Mengen bewirkt Thujon beim Menschen Exzitation, Erregung sowie akustische und visuelle Halluzinationen, typische Erscheinungen für einen psychedelischen Zustand.

In höheren Konzentrationen treten unangenehme Halluzinationen, Pananoia, akute Manie und epileptische Krämpfe auf.

Lediglich DEL GASTILLO postulierte eine geometrische Ähnlichkeit des Thujonenols mit Tetrahydrocannabinol dem Wirkstoff des Marihuanas, dessen Genuß dem Thujon vergleichbare Folgen hat. Er stellte die Hypothese auf, daß für beide Substanzen derselbe Rezeptor im Zentralnervensystem in Frage kommen konnte.²⁾

Thujon läßt sich mit Natriumpentacyanonitrosylferrat(II) in alkalischer Lösung nachweisen. Die entstehende rote Farbe wechelt auf Essigsäurezusatz nach Rotviolett.

BRIESKORN und Mitarbeiter haben diese Farbreaktion zu einer Deutschen Arzneibuch-Methode entwickelt, um thujonreichen Salbei von thujonarmer Ware zu unterscheiden.^{3),4)}

ROTH und SURBORG haben den Mechanismus der analogen Farbreaktion mit Natriumpentacyanonitrosylferrat (II) zum Nachweis von Ketonkörpern in Diabetikerharnen untersucht.⁵⁾

Um den richtigen Mechanismus zu ergründen, wurde Thujon vorerst mit einem anderen NO⁺-aktiven Reagenz statt Natriumpentacyanonitrosylferrat (II) zur Reaktion gebracht.

(A) *Reaktionen von Thujon mit Methylnitrit*

Tropft man zu Thujon in einer Alkoholatlösung unter Eis/Kochsalz-Kühlung Methylnitrit, so findet eine rasche Umsetzung statt.⁴⁾

Nach Ansäuern des Reaktionsansatzes mit verdünnter HCl und Extraktion mit Chloroform erhält man α -Thujaketocarbonsäureester(1), das durch Massen, H-NMR, und IR-Spektrometrie identifiziert wurde. (Fig. 1)

Für die Reaktion zwischen Thujon und Methylnitrit in Alkoholatlösung kann somit folgender Reaktionsmechanismus angenommen werden. (Fig. 2)

In Alkoholatlösung entstehen beide Enolate im Gleichgewicht, doch erfolgt nur am 3, 4-Enolat die Reaktion.

Die Nitrosogruppe addiert sich an das C-4, ein Alkoholatrest an das C-3. Durch Aufspaltung der C3-C4-Bindung und Umlagerung entsteht das Oxim des α -Thujaketocarbonsäureesters. Das Oxim ist hydrolyseempfindlich und ergibt nach Ansäuern den α -Thujaketocarbonsäureesters.

(B) *Aufklärung des Farbproduktes*

Um herauszufinden, ob bei der Farbreaktion

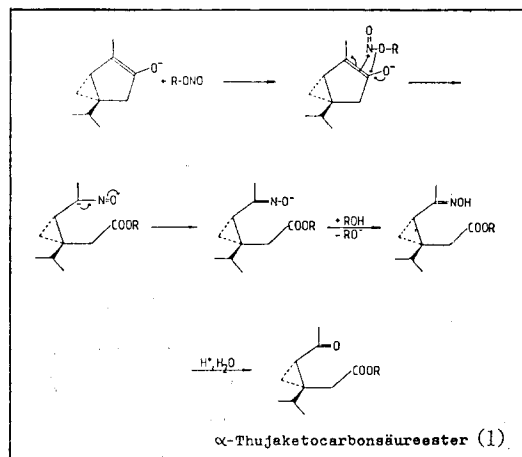


Fig. 1: Mechanism of reaction between Thujone and Methylnitrite

des Thujons mit Natriumpentacyanonitrosylferrat(II) Vergleichbares geschieht, wird das von ROTH und SURBORG vorgenommene Verfahren angewandt.⁵⁾

Thujon wird in methanol-KOH mit einer Natriumpentacyanonitrosylferrat(II) versetzt.

Das Farbprodukt hydrolysiert man anschließend mit HCl.

Die verbleibende Substanz wird mit Diazomethan verestert und ergibt ein gc-reines Öl, das sich chromatographisch und spektroskopisch als identisch erweist mit dem α -Thujaketocarbonsäuremethylester.

Daher sollte für die Farbreaktion einer der Fig. 1 analoger Mechanismus angenommen werden: (Fig. 2)

Die Addition an den Liganden NO^+ erfolgt in 4-Stellung. Daran schließt sich unter Anlagerung eines Hydroxylions die C-C-Spaltung an. Unter Umlagerung bildet sich das Oximat der α -Thujaketocarbonsäure bzw. in alkalischer Lösung das Salz diener Säure. In saurem Milieu liegt die α -Thujaoximincarbonsäure vor, die als 6. Ligand im Pentacyanoferrat(II)-Komplex fungiert.

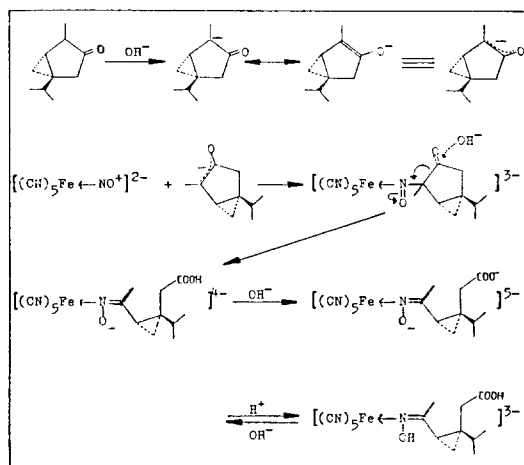
Farbreaktion von Monoterpenonen mit Natriump-

Fig. 2: Mechanism of color reaction

entacyanonitrosylferrat(II)

Wird die Nitrosierung statt mit Alkylnitrit (Fig. 3) mit Natriumpentacyanonitrosylferrat(II) durchgeführt, so läuft bei Thujon eine zunächst gleiche regiospezifische Nitrosierung mit ausschließender Spaltung ab. Zusätzlich tritt aber eine tiefrote Farbe auf, die DUPARC und MONNIER⁴⁾ als Nachweis für Thujon empfehlen. Um die Spezifität dieser Reaktion zu überprüfen, ließ ich auch auf die übrigen Monoterpenone und auch weitere Verbindungen mit einer aktivierten Methylenketogruppe als Nitrosierungsmittel Natriumpentacyanonitrosylferrat(II) einwirken (Tab. I).

Table I. Color reaction by DUPAC and MONIER⁴⁾

Gruppe	Substanz	Ergebnis
1	Aceton	##
	Methylethylketon	##
	Methylisopropylketon	##
	Ethylpropylketon	++
	2-Acetylpropanol	++
2	Essigsäureanhydrid	—
	Ethylacetat	—
	Bernsteinsäureethylester	—
	Malonsäuredimethylester	##
	α -Thujaketocarbonsäuremethylester	##
	Caranketosäuremethylester	##
	Pinonsäuremethylester	++
3	Cyclopentanon	—
	2, 4, 4-Trimethyl-cyclopentanon	##
4	Cyclohexanon	+
	2-Methylcyclohexanon	##
	Cyclododecanon	+
	Menthon	—
	Carvomenthon	++
	Pulegon	—
	Caran-4-on	##
	3-Methyl-caran-4 on	++
	3-Hydroxymethyl-caran-4-on	++
	Campher	—
Pinocamphon	—	
3, 4-Dimethyl-norbornan-2-on	—	

: tief rot (positiv); ++ : hell rot (quasi positiv);
+ : hell rotorange oder orange (quasi positiv);
— : gelb (negativ)

Gruppe 1: Offenkettige Ketone mit Methyl-, Methylenketogruppe und α -alkylverzweigte Ketone

Die Farbreaktion fällt bei allen Ketonen der Gruppe 1 positiv aus, jedoch mit unterschiedlicher Intensität.

Je größer die Substituentengruppe (R, R') der Ketone ist, desto heller ist der entstehende rote Farbton (dunkelrot \rightarrow hellrot \rightarrow rotorange).

Gruppe 2: Ester mit α -Methylenketogruppe und Säureanhydride mit Methylenketogruppe

Die Farbreaktion fällt bei Gruppe 2 negativ aus. Damit ist aufgezeigt, daß die Methylengruppe in Nachbarschaft zur Carbonylgruppe eines Esters nicht ausreichend aktiviert ist.

Eine Ausnahme macht Malonsäuremethylester und Malonsäure. Sie ergeben eine positive Farbreaktion wegen der durch zwei Estergruppen aktivierten CH_2 -Gruppe.

α -Thujaketocaraonsäuremethylester(1) und Caranketosäuremethylester(2) reagieren positiv, womit gezeigt ist, daß nur die Methylenketogruppe, nicht aber die Ester-carbonylgruppe für den positiven Ablauf der Reaktion verantwortlich ist.

Gruppe 3: Die Cyclopentanderivate

Die Farbreaktion fällt bei 2, 3, 3-Trimethylcyclopentanon positiv aus, da ein α -methylverzweigtes Keton wie in Thujon vorliegt. Cyclopentanon gibt erwartungsgemäß keine Reaktion.

Gruppe 4: Die Cyclohexanonderivate und sonstigen Monoterpenone

Cyclohexanon und Cyclododecanon, die nur über eine Methylenketogruppe verfügen, reagieren langsam und ergeben nur eine rotorange Farbe im Unterschied zu offenkettigen Ketonen (Gruppe 1).

Die Reaktion fällt bei 1-Methyl-cyclohexanon sofort positiv aus. Carvomenthon ergibt bei der Reaktion eine rotorange farbe (quasi positiv),

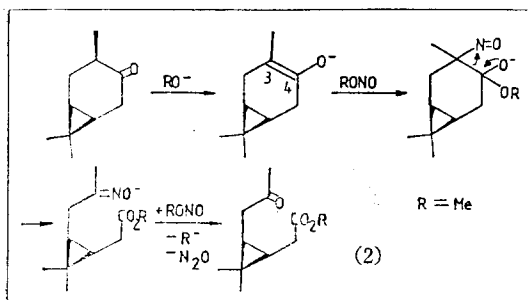


Fig. 3 Reaction between isocarane-4-one and methyl nitrite

während 1-Hydroxymethyl-carvomenthon und Menthon keine Farbreaktion ergeben.

Die Farbreaktion des Caran-4-ons

Caran-4-on gibt eine Farbreaktion von gleicher Intensität wie Thujon. Damit trifft die Angabe, die Farbreaktion sei allein für Thujon spezifisch, nicht mehr zu. Das Farbprodukt könnte über folgenden Reaktionsmechanismus an der aktiven α -methyl-verzweigten Ketogruppe entstehen. Analog BRIESKORN und SCHWACK⁴⁾ addiert das 3,4-Enolat an C-3 die Nitrosylgruppe (Fig. 4). Anschließend erfolgt Ringöffnung zum Eisenferratpentacyanyloximat der Caranketosäure. Sie liegt im alkalischen Milieu als Salz, im sauren Milieu als Oxim vor. Das Oxim hydrolysiert im alkalischen Milieu langsam zu Caranketosäure(2a). Um diese Annahme zu beweisen, veresterte ich das Farbprodukt aus Caran-4-on und Natriumpentacyanonitrosylferrat (II) mit Diazomethan und etherete die Mischung aus. Zahlreiche Substanzen waren im DC nachweisbar. Eine der Substanzen verhielt sich bei GC/MS-Kopplung wie Caranketosäuremthylester (Fig. 3). Aus dem Ergebnis ist zu folgern, daß bei der Reaktion des Caran-4-ons nach DUPARC und MONNIER nur z.T. eine dem Thujon ähnliche Reaktion abläuft. Die Reaktion ist also im Unterschied zu der des Thujons nicht

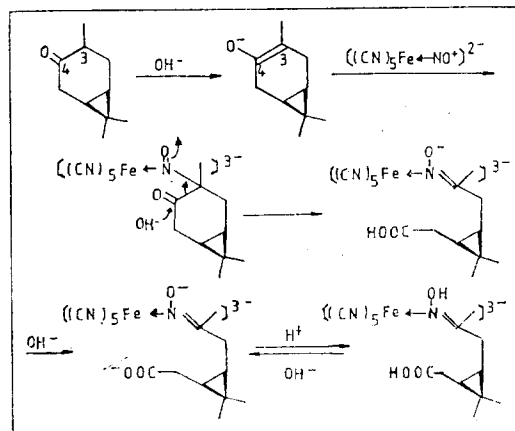


Fig. 4 Mechanism of color reaction of caran-4-one

regiospezifisch.

Caran-4-on und Thujon reagieren andererseits im Farbausfall verschieden, sobald das dem Carbonyl-C-Atom benachbarte C-Atom beider Monoterpenone nicht ein tertiäres sondern ein quartäres C-Atom ist. 4-Methyl-thujan-3-on⁷⁾ und 4-Hydroxymethyl-thujan-3-on geben keine Farbreaktion, wogegen 3-Methyl-caran-4-on⁶⁾ und 3-Hydroxymethyl-caran-4-on eine noch deutlich erkennbare rote Farbe liefern. Die Addition der Nitrosylgruppe kann beim 4-Methyl-caran-4-on nicht an C-3 erfolgen, da hier kein freies Proton mehr vorhanden ist. Im 3-Methyl-caran-4-on befindet sich noch eine reaktive Methylengruppe an dem zur Oxogruppe α -ständigen C-5. Sie sollte, anders als bei 4-Methyl-thujon, beim 3-Methyl-caran-4-on reagieren. Analog ROTH und SURBORG müßte das 3-Methyl-caran-4,5-enolat die Nitrosylgruppe addieren

EXPERIMENTELLER TEIL

IR-Spektren: Gerat IR 4240 der Fa. Beckman, NMR-Spektren: 100 MHz JEOL, Massenspektren: LKB 2091.

Darstellung von α -Thujaketocarbonsäuremethyl-

l ester (1)

2.0 g Thujon (13.2 mmol) werden in einer Alkoholatlösung aus 50 ml Ethanol und 0.6g Natrium gelöst.

Zu dieser Lösung läßt man unter Kühlung mit einer Eis/Kochsalz-Kaltemischung und Röhren Methylnitrit zutropfen, das wie folgt hergestellt wird:

25 g Natriumnitrit und 10 ml Methanol werden in 100 ml Wasser gelöst. Zu dieser Lösung läßt man unter Röhren in feinem Strahl eine Lösung von 20 ml konz. H_2SO_4 und 10 ml Ethanol in 150 ml Wasser zulaufen. Nach beendeter Zugabe erwärmt man den Veresterungsanstaz auf $30^\circ C$. Das entstehende Methylnitrit wird direkt über eine Destillationsbrücke in das Reaktionsgefäß eingeleitet.

Nach 4 h Reaktionszeit wird mit 20 ml Wasser verdünnt und mit halbkonz. HCl angesäuert. Man extrahiert dreimal mit je 50 ml $CHCl_3$, trocknet die Chloroformextrakte mit Na_2SO_4 und destilliert das Lösungsmittel ab. Das verbleibende Öl wird i.Vak. fraktioniert. Ausbeute: 1.9 g (1) (68% d. Th.), farbloses Öl

IR (kap.): 3080, 3010, 2980~2880, 1745 (C=O Ester), 1705 (C=O Keton), 1435, 1395, 1365, 1165, 1090, 1015 cm^{-1}

1H -NMR (C_6D_6): $\delta=2.09$ (2H, S, C-2); 2.15 (3H, s, C-7); 1.66 (1H, dd, H-4cis, $J_{gem}=5.4$ Hz, $J_{H-4cis, H-5}=7.5$ Hz); 1.28 (1H, dd, H-4trans, $J_{gem}=5.4$ Hz, $J_{H-4trans, H-5}=4.2$ Hz); 0.8 (6H, d, C-9 und C-10); 0.54 (1H, dd, H-5, $J_{H-5, H-4cis}=7.5$ Hz, $J_{H-5, H-4trans}=4.2$ Hz)

MS (70 eV): $m/e=212$ (0.3%, M^+), 194 (1.3%), 167 (13%), 166 (8%), 125 (20%), 124 (41%), 69 (23%), 55 (15%), 43 (100%)

Darstellung von Caranketosäure (2a) und ihres Methylesters (2)

In 2.0g (-)-Isocaran-4-on (13.2mmol), gelöst in 25 ml Methanol unter Zusatz von 0.3 g Natrium leitet man Methylnitrit ein, Aufarbeitung wie unter Thujon.

Ausbeute: 1.4g (2) und 0.05g (2a) farblose Öle (2)

1H -NMR ($CDCl_3$): $\delta=3.68$ (3H, s, Methoxyl), 2.4 (2H, m, HC_2COOMe), 2.3 (2H, m, $CH_2 COMe$), 2.2 (3H, s, Acetoxy), 1.11 und 0.92 (2x 3H, s, 2x Me-2), 0.9~1.0 (2H, m, H-3 und H-1)

^{13}C -NMR ($CDCl_3$): $\delta=207$ (s, COMe), 176 (s, COOMe), 51.4 (q, $COOCH_3$), 39.2 (t, CH_2COMe), 30 (t, CH_2COOMe), 29.2 (q, $COCH_3$), 28.4 (q, Me-2), 23 (d, C-1), 22.7 (d, C-3), 17 (s, C-2), 14.8 (q, Me-2)

MS (70eV): $m/e=198$ (2%, M^+), 183 (1%), 180 (4%), 166 (6%), 115 (5%), 141 (14%), 125 (17%), 95 (31%), 81 (31%), 43 (100%)

2-Semicarbazon: Schmp. $119\sim 119^\circ C$ (2a)

IR (kap): 3450~2600 (Carbonsäure), 3000~2840, 1740 (Carbonsäure), 1710 (Keton), 1540~1520, 1380, 1360, 1170 cm^{-1}

2a wird mit Diazomethan verestert. 2a-Methylester ist identisch mit (2).

Farbreaktion mit Natriumpentacyanonitrosylferrat (II)

1-2 Tropfen bzw. 30mg der Substanz in 10ml 60% Ethanol versetzt man mit 0.5 ml einer 10% Natriumpentacyanonitrosylferrat (II) Lösung und 1 ml einer 5% Methanol. KOH. Man beobachtet die sich entwickelnde Farbe. Danach wird mit Essigsäure angesäuert (siehe Tab. I).

Isolierung des Reaktionsproduktes

0.5 g (-)-Isocaran-4-on in 30 ml Methanol werden mit 10 ml 10% Natriumpentacyanonitrosylferrat(II)-Lösung und 10ml 5% Ethanol

KOH versetzt. Man läßt 1 h bei RT stehen, destilliert i. Vak. den Methanol ab und schüttelt nicht umgesetztes Isocaran-4-on mit Ether aus. Zu der wässrigen Phase gibt man 10 ml 4N-NaOH und läßt 30 min bei 40°C stehen. Unter Eiskühlung säuert man mit 10% H₂SO₄ schwach an und extrahiert dreimal mit je 20 ml Ether. Der Etherextrakt wird mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel abdestilliert. Der Rückstand wird in 1 ml Methanol aufgenommen und mit Diazomethan verestert. Nach Abdünsten des Lösungsmittels erhält man 0.2 g gelbes Öl. Durch GC/MS-Kopplung ließ sich eine Substanz identifizieren, deren Fragmentierung mit (2) übereinstimmte.

Isolierung des Reaktionsproduktes(3)

0.5 g Thujon in 30 ml Methanol werden mit 10 ml einer 10% wässrigen Natriumpentacyanonitrosylferrat(II)-Lösung und 10 ml einer 5% Methanol KOH versetzt. Aufarbeitung wie unter Caran-4-on. Nach Abdestillation des Lösungsmittels erhält man 0.17 g eines Öles (3), identisch mit (1).

DANKSAGUNG

Ich danke Herrn Prof. Dr. K.H. Brieskorn, Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Univ., Würzburg in west Deutschland, für die Anregung und vielfache Diskussion.

LITERATURE CITED

- 1) Absinth, *Encyclopedia Britannica*, 9 th ed., 57p (1982).
- 2) Del Castillo, J. und Anderson, M.: Marijuana, absinth and the central nervous system, *Nature*, **253**, 365(1975).
- 3) Böhme, H. und Hartke, K.: *Deutsches Arzneibuch*, 7 Ausgabe, Kommentar, s. 1336(1968).
- 4) Bieskorn, K.H. und Schwack, W.: C-C Spaltung bei α -methylverzweigten Ketonen nach Nitrosierung, *Arch. Pharm.* (Weinheim), **315**, 207 (1982).
- 5) Roth, H.J. und Surborg, K.H.: Zum Mechanismus und zur Spezifität der Legalschen Probe, *Arch. Pharm.* (Weinheim), **301**, 686(1968).
- 6) Bieskorn, K.H. und Ryu, C.K.: Regioselektive und stereoselektive Addition von Formaldehyde an Monoterpenone, *Arch. Pharm.* (Weinheim), **318**, 261(1985).
- 7) Brieskorn, K.H. und Schwack, W.: Reaktionen des (+) Thujons und (-)-Isothujons mit Formaldehyd, *Chem. Ber.*, **114**, 1993 (1981).