

ar/Hall de/1985

BEITRÄGE ZUR BIOGENESE ÄTHERISCHER ÖLE ZUSAMMENSETZUNG ZWEIER ÄTHERISCHER ÖLE VON *MENTHA PULEGIUM* L*

F. W. HEFENDEHL

Pharmakognostisches Institut Freiburg, Deutschland

(Received 15 December 1969)

ab/de/

Zusammenfassung—Die qualitative und quantitative Zusammensetzung der ätherischen Öle von zwei *Mentha pulegium* L. Formen wurde untersucht, die sich charakteristisch in der Menthon- und iso-Menthon Fraktion unterscheiden. Mit neo- bzw. neoiso-Menthol treten die Alkohole mit axial angeordneter Hydroxylgruppe in den Ölen auf. In der iso- bzw. isoiso-Pulegonfraktion konnte (–)-isoiso-Pulegon nachgewiesen werden, das aus stereochemischen Gründen zu erwarten war. Unter Einbeziehung stereochemischer Aspekte werden mögliche biogenetische Umwandlungsreaktionen nach dem Reitsema Schema diskutiert. Ontogenetische Faktoren modifizieren nur die quantitative, nicht aber qualitative Ölzusammensetzung. Ein Einfluß der Umweltfaktoren (Licht, Temperatur, Feuchtigkeit) auf die qualitative Ölkomposition, unabhängig von der ontogenetischen Variabilität, konnte nicht festgestellt werden.

Abstract—The qualitative and quantitative composition of the essential oils from two forms of *Mentha pulegium*, which differ characteristically in the menthone-, and iso-menthone fraction, were investigated. The oils contain neo-, and neoiso-menthol both of which are menthols with axially orientated hydroxyl groups. (–)-Isoiso-pulegone was demonstrated in the iso-, and isoiso-pulegone fraction, as expected for stereochemical reasons. The stereochemical aspects and the sequence of biogenetic reactions as suggested in the Reitsema-scheme are discussed. The ontogenetic factors seem to modify the quantitative, but not the qualitative, oil composition. The influence of environmental factors, such as light, temperature and humidity, on the qualitative oil composition has not been determined.

EINLEITUNG

Mentha pulegium L. (= *Pulegium vulgare* Miller) ist der einzige in Europa vorkommende Vertreter des *Mentha*-Subgenus *Pulegium* (Miller) Lam. et DC.¹⁻³ Er unterscheidet sich von den übrigen Vertretern der Gattung *Mentha* besonders dadurch, daß er kaum mit anderen *Mentha*-Arten kreuzbar ist; Murray⁴ erreichte z.B. nur in einem einzigen Fall ein positives Ergebnis.

Untersuchungen über die Zusammensetzung des ätherischen Öls von *M. pulegium* wurden mit klassischen Methoden insbesondere von Naves⁵ durchgeführt. Er fand dabei z.T. große Unterschiede in der Ölkomposition, die auf Umweltfaktoren bzw. ontogenetische Einflüsse zurückgeführt wurden. Neuere, auf chromatographischem Wege durchgeführte Analysen stammen von.⁶⁻¹⁰ Quantitative Untersuchungen über die Ölkomposition im Zusammenhang

* Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

¹ R. HEGNAUER, *Ber. Schweiz. Botan. Ges.* 63, 90 (1953).

² R. HEGNAUER, *Bull. Galenica* 16, 114 (1953).

³ G. HEGI, *Illust. Flora von Mitteleuropa*, Bd. V, 4, p. 2339, J. F. Lehmanns Verlag, München (1906).

⁴ M. J. MURRAY, Private Mitteilung.

⁵ Y. R. NAVES, *Perf. Essent. Oil Rec.* 35, 221 (1944).

⁶ R. H. REITSEMA, *J. Am. Pharm. Assoc. Sci. Ed.* 47, 267 (1958).

⁷ K. L. HANDA, D. M. SMITH, J. C. NIGAM und L. LEVI, *J. Pharm. Sci.* 53, 1407 (1964).

⁸ F. J. SCHNELLE und H. HÖRSTER, *Planta Med.* 16, 48 (1968).

⁹ M. M. CHOPRA, V. N. VASHIST und K. L. HANDA, *Indian Soap J.* 30, 41 (1964); *N. Miltitzer Ber.* 118 (1965/66).

¹⁰ Y. FUJITA und SH. FUJITA, *Nippon Kagaku Zasshi* 88, 767 (1967).

TABELLE 1. ZUSAMMENSETZUNG VON OLEUM *Menthae pulegium* NORMAL U. C.R.

Substanzen	Oleum <i>Menthae pulegium</i> —Normal					Oleum <i>Menthae pulegium</i> —C.R.				
	%*	U.v.- max. (nm)	I.r.	$[\alpha]_D^{20}$	Verschiedenes†	%*	U.v.- max. (nm)	I.r.	$[\alpha]_D^{20}$	Vers
1. α -Pinen	0,38		+			0,50		+		
2. β -Fenchon	0,03					0,01				
3. Camphen	0,01		+			0,02				
4. β -Pinen	0,31		+			0,43		+		
4a. Sabinen	0,15		+			0,08		+		
5. Myrcen	0,27	225				0,27	225			
6. Unbekannt	0,03					0,02				
6a. α -Terpinen	Spur	265				Spur	265			
7. (-)-Limonen	0,41		+			0,74		+		
8. Cineol	—					0,02				
8a. β -Phellandren	0,08	232				0,03	232			
9. γ -Terpinen	Spur					Spur				
9a. Trans- β -Ocimen	0,04	232				0,01	232			A.A.-
10. Carbonyl-Verbindung	0,24		+		A.A.-Semic.	0,12		+		
11. <i>p</i> -Cymen	0,03		+			0,01				
11a. Terpinolen	0,01		+			0,01				
12. Octyl-3-acetat	0,29		+		Verseifung → Subst. 13 (i.r.)	0,12		+		Versci Sub
12a. Carbonyl-Verbindung	0,04					0,04				A.A.-
13. (+)-Octanol-3	1,49		+	+7,1°	A.A.-Semic.	2,08		+	+7,3°	A.A.-
14. Kohlenwasserstoff	0,08		+		A.A.-Methox.	0,03		+		A.A.-
15. Kohlenwasserstoff	0,01					0,02				
16. (-)-Menthon	30,80		+	-29,1°	A.A.-Semic.	0,50		+	-29°	A.A.-
16a. Menthofuran	0,02				DC-Nachweis	0,01		+	+99,8°	DC-N
17. (+)-iso-Menthon	5,21		+	+89,5°	A.A.-Semic.	19,75		+		A.A.-
18. Kohlenwasserstoff	0,43		+			0,15				
19. (+)-neo-Menthon	3,02		+	+14,6°	A.A.-Methox.	0,01		+	+18,8°	A.A.-
19a. Neoiso-Menthylacetat	0,30		+		Verseifung → Subst. 21 (i.r.)	1,43		+		Versci Sub
19b. Kohlenwasserstoff	0,10		+			Spur				
19c. (+)-Isoiso-Pulegon	0,22		+	+100°		0,38		+	+173°	A.A.-
20. (-)-Iso-Pulegon	0,65		+	-7,3°	A.A.-Semic.	0,77		+	-6,4°	A.A.-
21. (+)-Neoiso-Menthon	0,65		+	$\alpha = +$	A.A.-Methox.	5,75		+	+3,2°	A.A.-
21a. (-)-Menthon	0,11		+	$\alpha = -$	A.A.-Methox.	0,01		+	$\alpha = -$	A.A.-

22. (+)-Pulegon	52,00	+	+20°	63,47	+	+22,7°	A.A.
22a. Iso-Menthol	0,05	+		0,01	+		
22b. Kohlenwasserstoff	0,04	+		Spur			
23. Kohlenwasserstoff	1,68	+		2,36	+		
24. (-)-Piperiton	0,43	+	-45,1	0,09	+	-53°	A.A.
24a. Kohlenwasserstoff	Spur	+		0,01			
25. C=O, OH-Verbindung	0,06	+		0,12	+		
26. Piperitenon	0,33	+		0,62	+		

Erläuterungen und Abkürzungen Tabelle 1.

* Relative Gewichtsprocente. Die Angabe der Werte 2 Stellen hinter dem Komma sagt nichts über die Genauigkeit der Methode (s. Text).

† A.A.-Semic. = Ausscheidungsanalyse mit Semicarbazid. A.A.-Methox. = Ausscheidungsanalyse mit Methoxaisäureanhydrid.

mit eindeutigen qualitativen Analysen wurden von Handa *et al.*⁷ sowie von Fujita und Fujita¹⁰ durchgeführt. Die Ergebnisse beider Arbeitsgruppen differieren stark (Menthon z.B. 0,4–1,7 zu 26,4%).

ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Im Rahmen unserer biogenetischen Untersuchungen an Ölen verschiedener Menthaarten erschien uns das Öl von *M. pulegium* aus folgendem Grunde interessant: Reitsema⁶ stellte vor mehr als 10 Jahren ein Schema auf, in dem er alle damals bekannten oxygenierten Komponenten von Menthaoilen sequenzartig biogenetisch ordnete. Endstufen waren unter anderen die Menthole. Dieses Schema wurde inzwischen mehrfach variiert, blieb aber in den Grundzügen weitgehend unwidersprochen (Lit. s.b.¹¹). Dem gegenüber steht eine grundsätzlich andere Überlegung,¹² nach der die einzelnen Komponenten eines Öls durch eine parallele Bildung der Einzelkomponenten entstehen. Bei Gültigkeit des Sequenzschemas ist das Pulegiumöl in sofern biogenetisch interessant, als das Vorkommen des "Endglied" Menthol z.T. verneint wird. Weiter gelang es uns im Rahmen eines Screening-Testes eine *M. pulegium* Pflanze zu selektionieren, die in bezug auf die Ölzusammensetzung verändert ist. Sie wird in der Folge als Oleum Pulegium C.R. (=Chemische Rasse) bezeichnet.

Da die vorliegenden Analysenergebnisse für unsere Arbeiten nicht ausreichten, mußte für beide Öle eine detaillierte Inhaltsstoff-Analyse durchgeführt werden. Dabei standen folgende Fragen im Vordergrund:

- (1) Läßt sich das Reitsema-Schema bestätigen?
- (2) Erlaubt die unterschiedliche Ölzusammensetzung unserer Testpflanzen Rückschlüsse auf biogenetische Zusammenhänge?

ERGEBNISSE

Analyse des ätherischen Öls von M. pulegium Normal und M. pulegium C.R.

Das durch Wasser-Wasserdampf-Destillation aus frischem bzw. getrocknetem Pflanzenmaterial (Ausbeute: 0,25–0,32% bezogen auf Blatt-Frischgewicht) gewonnene ätherische Öl wurde durch Säulenchromatographie an desaktiviertem Kieselgel in Kohlenwasserstoffe und oxygenierte Verbindungen vorgetrennt. Diese Fraktionen wurden durch präparative Gaschromatographie (GC) an Polyäthylenglykol-Säulen in Einzelverbindungen aufgetrennt, und der Erfolg dieser Trennung auf analytischen Säulen (Polyäthylenglykol, Apiezon L, Zuckeracetathexaisobutyrat, QF-1 und β , β' Oxidipropionitril) getestet. Bei fast allen Fraktionen mußte eine Nachreinigung angestellt werden. Außerdem erfolgte eine Überwachung durch gekoppelte GC-DC in verschiedenen Fließmitteln.

Zur Identifizierung der auf diesem Wege gereinigten Einzelverbindungen wurden die in Tabelle 1 aufgeführten Stoffkonstanten herangezogen. Weiter erfolgten auf mindestens 3 verschiedenen polaren Trennflüssigkeiten entsprechende Additionsanalysen. Da im Bereich der Monoterpen-Kohlenwasserstoffe bereits sehr viele Untersuchungen an Mentha-Ölen vorliegen, wurde hier die Identifizierung z.T. nur durch Additionsanalysen bzw. GC gekoppelt mit DC durchgeführt. Auf eine Wiedergabe der Rückhaltewerte kann verzichtet werden, da diese in der Literatur vorliegen.

¹¹ F. W. HEFENDEHL, E. W. UNDERHILL und E. VON RUDLOFF, *Phytochem.* 6, 823 (1967).

¹² M. VON SCHANTZ und R. NORRI, *Scient. Pharmac.* 36, 187 (1968).

Erläuterungen zur Tabelle 1

Die Substanzen 10 und 12a zeigen im i.r.-Spektrum Absorptionsbanden bei 1710 cm^{-1} bzw. 1720 cm^{-1} ; sie färben sich auf der DC-Platte mit 2–4 Dinitrophenylhydrazin gelb an. Es kann daher das Vorliegen einer Keto-Gruppe erwartet werden. Die bisher in *M. pulegium* Ölen identifizierten 1-Methylcyclohexanon, 3-Methylcyclohexanon und Octanon-3 konnten durch Additionsanalysen ausgeschlossen werden, für ungesättigte Verbindungen wie 1-Methylcyclohexen-1-on-3 fehlt die typische i.r.-Bande für die C=C Doppelbindung. Da aus Substanzmangel die Herstellung entsprechender Derivate nicht möglich war, bleibt die Identität dieser Verbindungen offen. Die in sehr geringen Mengen auftretenden Kohlenwasserstoffe 6, 14, 15, 18, 19b, 22b und 24a wurden nicht weiter untersucht. Das i.r.-Spektrum des Kohlenwasserstoffes 23 zeigte keine Ähnlichkeit mit den in der Literatur veröffentlichten Werten.

Das i.r.-Spektrum der Substanz 25 zeigt ausgeprägte OH— bzw. C=O Banden (3440 cm^{-1} bzw. 1705 cm^{-1}) sowie eine C=C Valenzschwingung bei 1670 cm^{-1} . Da diese Substanz bei der SC an Kieselgel angereichert wird, ist damit zu rechnen, daß sie nicht genuin im Öl auftritt.

Die in Tabelle 1 angegebenen relativen Gewichtsprozent bis zur 2. Stelle nach dem Komma sagen nichts über die Genauigkeit der quantitativen Methode aus. Diese "Genauigkeit" wurde nur gewählt, um die in sehr geringen Mengen vorkommenden Verbindungen zahlenmäßig ausdrücken zu können.

Die quantitative Bestimmung der im Öl vorkommenden Alkohole erfolgte nach Ausscheidung mit Methoxalsäureanhydrid und anschließender Regenerierung der Alkohole. Es konnte in Testversuchen ermittelt werden, daß Abscheidungs- bzw. Regenerierungsreaktionen praktisch quantitativ ohne Isomerisierungsreaktionen verlaufen. Die Angabe der Drehungswerte ergibt bei den meisten Verbindungen keine absolut gültigen Werte, da meist in sehr verdünnten Lösungen gearbeitet werden mußte.

DISKUSSION

Die Besprechung der gewonnenen Ergebnisse unter dem Gesichtspunkt ihrer Biogenese ist durch folgende Tatsachen erschwert: 1. Es ist nicht definitiv geklärt, ob die Einzelkomponenten eines Öls sequenzartig auseinander gebildet werden oder parallel entstehen. 2. Es besteht keine Klarheit darüber, ob die Terpene echte Exkrete darstellen oder weiter metabolisiert werden.

Zur Frage der möglichen sequenzartigen Bildung liegen eine Reihe von Befunden vor, die das Schema von Reitsema unterstützen.^{11, 13–15} Auch Analysen mit zellfreien Extrakten¹⁶ von *M. piperita* sprechen für diese These, obwohl hier mit Gesamtextrakten von Pflanzen, nicht aber mit Fermenten aus den eigentlichen Ölbildungsräumen gearbeitet wurde, so daß möglicherweise Reaktionsverschiebungen durch Vereinigung verschiedener Gewebe bzw. Zellkompartimente auftreten können.¹⁷ Eigene Versuche, Fermente in den Ölabscheidungsräumen histochemisch nachzuweisen, verliefen bisher negativ.¹⁸

¹³ F. W. HEFENDEHL, *Planta* **62**, 321 (1964).

¹⁴ F. W. HEFENDEHL, *Planta Med.* **14**, 66 (1966).

¹⁵ F. W. HEFENDEHL, *Planta Med.* **15**, 121 (1967).

¹⁶ J. BATTAILLE, A. J. BURBOTT und W. D. LOOMIS, *Phytochem.* **7**, 1159 (1968).

¹⁷ F. W. HEFENDEHL, *Z. Pflanzenphysiol.* **60**, 370 (1969).

¹⁸ F. W. HEFENDEHL, unveröffentlicht.

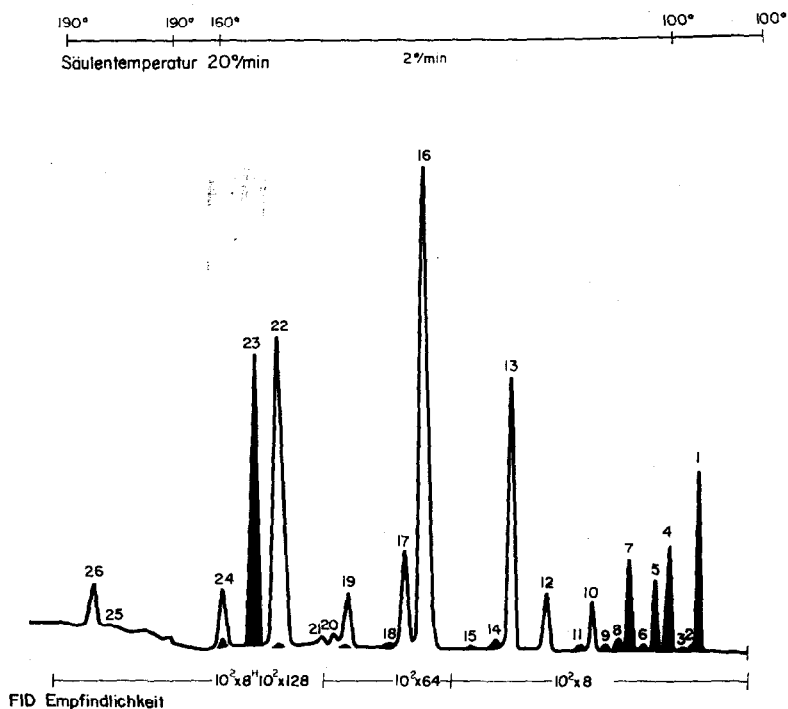


ABB. 1. GASCHROMATOGRAMM VON OLEUM *Menthae Pulegium* "NORMAL" 3 m x $\frac{1}{8}$ IN. SS-STAHL 12%
POLYÄTHYLENGLYKOL 4000 AUF CHROMOSORB W, DMCS BEHANDELT, 60-80 MESH.

Säulentemperatur bzw. Empfindlichkeit des Detektors (FID) s. Abb. Injektortemperatur 150°;
Detektortemperatur 250°. Gasdurchfluß: N₂ = 30 ml/min Brenngas: H₂:Luft = 30:300 ml/min.
Probenmenge: 0,5 µl. Die Bezifferung der Peaks entspricht der in Tabelle 1. Die geschwärzten
Peaks stellen Kohlenwasserstoffe dar.

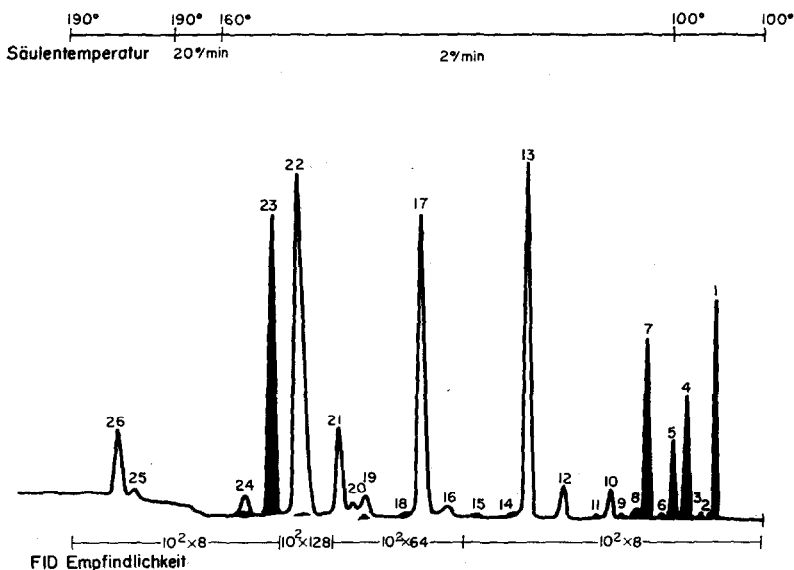


ABB. 2. GASCHROMATOGRAMM VON OLEUM *Mentha Pulegium* C.R.
Arbeitsbedingungen s. Abb. 1.

Die Frage einer möglichen Metabolisierung steht mit diesen Problemen im Zusammenhang, da auch hierbei entsprechende Fermente im (oder am?) bereits ausgeschiedenen Öl feststellbar sein sollten. Allein vom Vorkommen der Verbindungen sind bei *M. pulegium* alle Bedingungen für die Gültigkeit des Reitsema Schemas erfüllt.

Beide von uns bearbeiteten *M. pulegium* Öle sind durch einen hohen Gehalt an (+)-Pulegon charakterisiert. Dagegen ergeben sich im Bereich der stärker hydrierten, oxygenierten Monoterpene Unterschiede. Während das Öl C.R. praktisch ausschließlich (+)-Iso-menthon enthält, kommt beim Normalöl überwiegend (–)-Menthon vor. Bereits in früheren Untersuchungen an *M. piperita* Ölen konnten wir durch die Bestimmung der

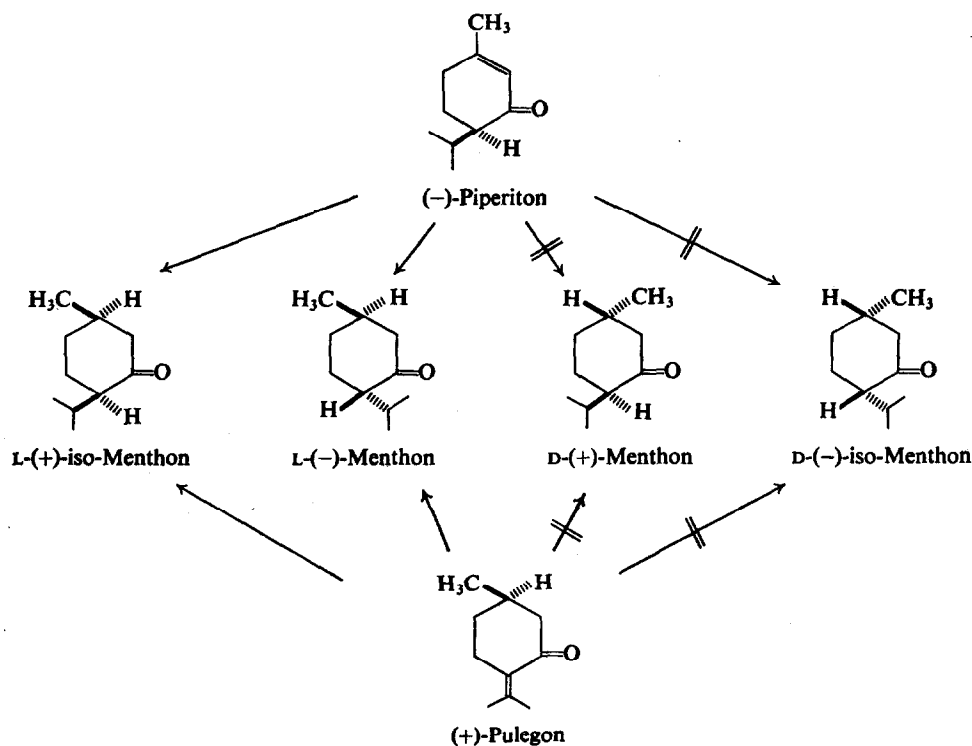


ABB. 3. MÖGLICHE BIOGENETISCHE BEZIEHUNGEN VON MONOTERPEN-KETONEN.

absoluten Mengen der beiden Menthon-Isomeren im Verlauf der Ontogenese¹⁹ bzw. durch einen Vergleich von spezifischen Radioaktivitäten¹¹ wahrscheinlich machen, daß Iso-menthon nicht das Produkt einer "chemischen" Isomerisierung von (–)-Menthon sein kann, die in der Pflanze oder bei den angewendeten Isolierungsverfahren oder Analysenmethoden erfolgt. Dies wird von Shimizu und Ikeda²⁰ bei Untersuchungen an *Mentha* Hybriden bestätigt.

Es erschien uns sinnvoll, stereochemische Aspekte in die biogenetischen Betrachtungen mit einzubeziehen (s. Abb. 3). Dabei sollen mögliche Isomerisierungserscheinungen, insbesondere auch enzymatischer Art, nicht berücksichtigt werden.

¹⁹ F. W. HEFENDEHL, unveröffentlicht.

²⁰ S. SHIMIZU und N. IKEDA, *J. Agri. Chem. Soc. Japan* 36, 907 (1962).

Die enzymatische Hydrierung von (+)-Pulegon kann zu (+)-iso-Menthon und (-)-Menthon führen, während aus (-)-Piperiton (+)-iso-Menthon und (+)-Menthon entstehen kann. (+)-Menthon kommt in den von uns getesteten Ölen nicht in nennenswerten Mengen vor. Da nach Interpretation des Cottoneffektes²¹⁻²³ (+)-iso-Menthon zumindest vorwiegend in einer Konformation mit axialer Isopropylgruppe und äquatorialer Methylgruppe vorliegt, müßte für das aus (-)-Piperiton gebildete (+)-iso-Menthon ein Umspringen in die entsprechende Sesselform gefordert werden, wenn man voraussetzt, daß bei (-)-Piperiton die Isopropylgruppe eine äquatoriale Lage einnimmt (Bezeichnung äquatorial in Anlehnung an den Cyclohexan-Ring).

Dabei wird der Wasserstoff beim (+)-Pulegon von der Vorderseite des Moleküls in die axiale Stellung zur Synthese des (-)-Menthons eingeführt, während (+)-iso-Menthon sowohl aus (-)-Piperiton als auch (+)-Pulegon durch eine Einführung des Wasserstoffs von der Rückseite, in äquatoriale Lage, gebildet werden kann.

Es erscheint bei der großen Spezifität der Enzyme im Terpenbereich unwahrscheinlich, daß die exocyclische Doppelbindung des (+)-Pulegons mit Hilfe eines Enzyms sowohl von der Vorderseite als auch Rückseite hydriert werden kann. Unter diesen Aspekten kann man annehmen, daß beim Öl C.R. die Funktion des Enzyms, das den Wasserstoff von vorne in axiale Stellung einführt, geblockt ist. Unentschieden bleibt, ob vielleicht (-)-Piperiton hier die alleinige Vorstufe ist. Eigene radiochemische Untersuchungen an *M. piperita* Ölen¹¹ lassen eine Beteiligung sowohl von (-)-Piperiton als auch (+)-Pulegon erwarten.

(-)-Iso-Pulegon und (+)-isoiso-Pulegon könnten, nach stereochemischen Gesichtspunkten ebenfalls an der Synthese des (+)-iso-Menthons und des (-)-Menthons beteiligt sein. Wichtig ist, daß die Annahme von Ohloff *et al.*²² über das Vorkommen von (+)-isoiso-Pulegon und (-)-iso-Pulegon durch unsere Analysen bestätigt werden konnte. Die in der Regel angegebene positive Drehung für iso-Pulegon (s.b. 22) scheint auf eine Verunreinigung des (-)-iso-Pulegons durch (+)-isoiso-Pulegon zurückführbar zu sein. Die beobachtete Rückisomerisierung²² von (+)-isoiso-Pulegon in Pulegon (19% Pulegonanteil) bei der GC ließ sich durch Einsatz nicht zu häufig verwendeter Polyäthylenglykol-bzw. QF-1-Säulen fast vollständig vermeiden.

Folgende Menthole konnten bestimmt werden: Im Öl C.R. tritt (+)-neoiso-Menthol in Mengen über 5% auf, während (+)-neo-Menthol, (-)-Menthol und iso-Menthol nur in Spuren zu finden sind. Im Normalöl herrscht (+)-neo-Menthol vor, neben (+)-neoiso-Menthol und Spuren von (-)-Menthol und iso-Menthol. Im Öl C.R. kommt also von den beiden in größeren Mengen zu erwartenden (+)-iso-Menthol und (+)-neoiso-Menthol der energetisch ungünstigere Alkohol mit einer axial angeordneten OH-Gruppe vor. Entsprechendes gilt für das Normalöl, wo nur die beiden Isomeren mit axialer OH-Gruppe, also (+)-neo-Menthol und (+)-neoiso-Menthol in größeren Mengen auftreten, wobei einmal der Wasserstoff von vorne, einmal von hinten an das Menthon-bzw. iso-Menthonmolekül herangebracht werden muß. Allerdings werden diese Diskussionen durch die Tatsache erschwert, daß für die Menthole mit axialer OH-Gruppe auch Konformere mit äquatorialer Stellung der OH-Gruppe diskutiert werden.²⁴⁻²⁶ Es sei erwähnt, daß (+)-iso-Menthon mit axialer Isopropylgruppe und äquatorialer Methyl-

²¹ C. DJERASSI, *Optical Rotatory Dispersion*, p. 105, McGraw-Hill, New York (1960).

²² G. OHLOFF, J. OSIECKI und C. DJERASSI, *Chem. Ber.* **95**, 1400 (1962).

²³ P. CRABBE, *Optical Rotatory Dispersion and Circular Dichroism in Organic Chemistry*, p. 76, Holden-Day, San Francisco (1965).

²⁴ E. L. ELIEL, *Experientia* **9**, 91 (1953).

²⁵ S. MIGNAT und F. PORSCH, *Pfefferminzöle und Menthol*, p. 75, Dragoco Holzminden.

²⁶ M. HANACK, *Conformation Theory*, p. 130, Academic Press, New York (1965).

gruppe ohne Umklappen der Sesselform in ein neoiso-Menthol Konfomerer mit äquatorial gelagerter Hydroxylgruppe übergehen muß.

Erwartungsgemäß tritt im Öl C.R. als verestertes Menthol lediglich (+)-neoiso-Menthylacetat auf. Überraschend ist dagegen, daß auch im Normalöl als einziger Ester der des (+)-neoiso-Menthols gefunden werden konnte. Sieht man einmal von den in geringen Mengen in beiden Ölen vorkommenden Mentholen mit äquatorialer Hydroxylgruppe ab, so beschränkt sich das Problem auf die beiden Menthole mit axialer Hydroxylgruppe. Wie schon diskutiert (s.b. 25, 26), liegt die relative Veresterungsgeschwindigkeit des neoiso-Menthols erheblich höher als die des neo-Menthols, was mit einer Konformationsänderung des neoiso-Menthols (äquatoriale Lage der OH-Gruppe bzw. Zwischenform) erklärt wird. Es wäre hiernach anzunehmen, daß neo-Menthol, wie nach verschiedenen Untersuchungen zu erwarten (s.b. 26) ausschließlich mit axial gelagerter OH-Gruppe vorliegt, für die kein veresterndes Enzymsystem vorliegt.

Um die enzymatischen Reaktionen näher zu beleuchten, versuchten wir Reduktionen bzw. Oxydationen in der D- und L-Menthon- bzw. Mentholreihe mit folgenden Fermenten durchzuführen: 1. Leber ADH, 2. Hefe ADH, 3. Erbsen ADH²⁷ und 4. Fermente aus *M. piperita*²⁸ (NADH bzw. NADPH als Kofermente). Alle Versuche verliefen negativ.

Die Aussagen von Bronovitskaya,²⁸ daß sowohl Hefe ADH, Weizen ADH als auch Fermente aus *M. piperita* auf Menthol einwirken, konnten nicht bestätigt werden. Auch nach Zusatz von Polyclar AT zu den zu verarbeitenden *M. piperita* Blättern^{29,30} waren keine positiven Aussagen zu erhalten. Die negativen Ergebnisse der Versuche mit Leber- bzw. Hefe-ADH waren nach den Ergebnissen von Robertson und Hussain³¹ (weit. Lit. s. dort) zu erwarten. Hiernach muß das Cyclohexanon-Molekül in Hinsicht auf die Oberfläche des Enzyms so gelagert sein, daß die C=O Gruppe in das Enzym hineinragt. Dies ist bei den Menthonen und Mentholen nicht möglich. Man muss also offensichtlich mit anderen Systemen rechnen. Eine Möglichkeit ist die direkte Hydroxylierung eines Kohlenwasserstoffes, z.B. Limonen.¹¹

Ontogenetische Variabilität der Ölzusammensetzung

Die Versuche wurden in Klimakammern mit Normalprogramm (s. experiment. Teil) durchgeführt. Wie schon bei anderen Pflanzen der Familie der Labiaten beobachtet (s. z.B. 32–34), beeinflußt das Alter der untersuchten Pflanzenteile sehr stark die Ölzusammensetzung. Diese Verschiebungen sollen hier nicht im Einzelnen diskutiert werden. Als Gesamt-tendenz ergibt sich,¹³ daß in älteren Pflanzenteilen die stärker hydrierten Verbindungen (und veresterten Substanzen) auf Kosten der stärker ungesättigten Ölbestandteile zunehmen. Wie bei *M. piperita*³² ist der relative Anteil des Limonens in jungen Pflanzenteilen wesentlich höher als in älteren. Iso- und isoiso-Pulegon treten, relativ gesehen, in größeren Mengen nur im jungen Gewebe auf, ebenso wie Piperitenon.

²⁷ Y. SUZUKI, *Phytochem.* **5**, 761 (1966).

²⁸ Z. S. BRONOVITSKAYA, *Dokl. Akad. Nauk SSSR* **111**, 155 (1956).

²⁹ W. D. LOOMIS und J. BATTAILE, *Phytochem.* **5**, 423 (1966).

³⁰ J. W. ANDERSON, *Phytochem.* **7**, 1973 (1968).

³¹ J. S. ROBERTSON und M. HUSSAIN, *Biochem. J.* **113**, 57 (1969).

³² F. W. HEFENDEHL, *Planta Med.* **10**, 241 (1962).

³³ E. VON RUDLOFF und F. W. HEFENDEHL, *Can. J. Chem.* **44**, 2015 (1966).

³⁴ F. W. HEFENDEHL, *Arch. Pharmaz.* im Druck.

Mentha pulegium Pflanzen anderer Provenienz

Neben den von uns eingehend getesteten *M. pulegium* Pflanzen wurden folgende Herkunftse getestet: * 1. *M. pulegium*—Oregon U.S.A.; 2. *M. pulegium*—Wisconsin U.S.A.; Öl 1 ähnelt in seiner qualitativen und quantitativen Zusammensetzung sehr stark unserem Normalöl (s. Tabelle 1), Öl 2 erinnert in seiner Zusammensetzung stark an unser Öl C.R. (Tabelle 1). In beiden Ölen fehlen die Menthole völlig.

Umweltbedingte Variabilität der Ölzusammensetzung

Naves (s.z.B., 5 weitere Lit. s. dort) berichtete in einer Reihe von Arbeiten über den Einfluß von Umweltfaktoren, Erntezeit usw. auf die Ölzusammensetzung von in Spanien, Portugal und Marokko angebauten *M. pulegium* Pflanzen. Trotz der Tatsache, daß es sehr schwer ist, die Umweltfaktoren von rein ontogenetischen Einflüssen zu trennen, geben unsere Versuche keinen Anhaltspunkt dafür, daß Licht und Feuchtigkeit einen Einfluß auf die Ölzusammensetzung ausüben.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Pflanzenmaterial und Ölisolierung

Die Pflanzen wurden auf dem Versuchsgelände des Pharmakognostischen Institutes kultiviert und vegetativ vermehrt; die Versuche zur Beeinflussung der Ölkomposition durch Ontogenese-Zeitpunkt bzw. Umweltfaktoren wurden in Klimakammern in Vermiculite-Kulturen (Hoagland-Nährlösung modifiziert nach den Erkenntnissen von Crane und Steward³⁵) durchgeführt. Unter Normalbedingungen galt für die Klimakammern folgendes Programm: 30 min 15,000 lx; 17 Stunden 30,000 lx; 30 min 15,000 lx (relative Luftfeuchtigkeit 55%); 6 Stunden Dunkelheit (relative Luftfeuchtigkeit 65%). Die Ölisolierung erfolgte durch Wasser-Wasserdampf-Destillation.³²

Säulenchromatographie

Die Vortrennung des Öls erfolgte an mit Polyäthylenglykol 4000 desaktiviertem Kieselgel (0,2–0,5 mm) mit Hexan bzw. Methanol.^{36,37} Verhältnis Kieselgel–Öl–Hexan (MeOH) = 35 g:1 ml:150 ml (300 ml). Unter diesen Bedingungen erscheint das Menthofuran fast quantitativ in der Hexan-Fraktion.

Dünnschicht-Chromatographie

Adsorbens: Kieselgel G-HR reinst Merck; Schichtdicke 0,25 mm. Fließmittel: 1. Benzol–Äthylacetat 95:5 (für oxygenierte Verbindungen); 2. Hexan (Entwicklung bei –20° für Kohlenwasserstoffe). Detektionsmittel: 1. Vanillin-Schwefelsäure; 2. 2,4-Dinitrophenylhydrazin (Herstellungsvorschriften nach.³⁸

Gas-Chromatographie

GC Aerograph 1520, Firma Varian MAT mit WLD (präparative Arbeiten) und FID (analytische Arbeiten). GC 5754 A, Firma Hewlett-Packard mit WLD und FID. Säulenlänge 3 m, Durchmesser 3 mm bei analytischen Arbeiten, 6 mm bei präparativen Bedingungen. Beladung des Trägers (Chromosorb W, DMCS-behandelt 60–80 mesh) bei analytischen Säulen 6% oder 12%, bei präparativen Arbeiten 20%. Die verwendeten Säulen (SS-Stahl) wurden intensiv mit heißer Detergenslösung, anschließend mit Chloroform, Methanol und Aceton gespült. Zur Beseitigung von katalytischen Restaktivitäten an der Säulenwandung wurden die Säulen mit einer 2% Lösung von Polyäthylenglykol 4000 in Methylenchlorid gespült und anschließend mit wenig Methylenchlorid nachgewaschen.

Der Injektor wurde so modifiziert, daß der Verdampfungsvorgang in einem Glassystem erfolgte.

Verwendete Trennphasen: Polyäthylenglykol 4000 Merck; Apiezon L (Associated Electrical Ind.); DC-200 (Applied Science Lab.); QF-1 (Varian MAT); SAIB (Varian MAT); Hyprose SP 80 (Varian MAT); β,β' -Oxydipropionitril (Varian MAT).

* Ich danke Herrn Dr. M. J. Murray, A. M. Todd Comp. Kalamazoo, USA, für die freundliche Überlassung dieses Pflanzenmaterials.

³⁵ F. A. CRANE und F. C. STEWARD, Memoir 379 der Cornell University Agricultural Experiment Station, New York State College of Agriculture, p. 63, Ithaca, New York (1962).

³⁶ E. KUGLER und E. SZ. KOVATS, *Helv. Chim. Acta* **46**, 1480 (1963).

³⁷ F. W. HEFENDEHL, *Arch. Pharmaz.* **300**, 438 (1967).

³⁸ E. STAHL, *Dünnschichtchromatographie*, Springer Verlag, Berlin (1962).

Quantitative Auswertung der Gaschromatogramme

Die Bestimmung der Peakflächen erfolgte mit einem Digital-Integrator Mod. 477 der Firma Varian MAT. Die relativen Substanzwerte wurden nach dem Prinzip der internen Normierung errechnet,³⁹ nachdem die Flächenwerte entsprechend dem Molekulargewicht bzw. dem Molekulaufbau der Verbindungen korrigiert wurden.⁴⁰

GC gekoppelt mit DC bzw. U.V.

Nähere Arbeitsbedingungen s.b.³⁷ Verwendete U.V.-Geräte: 1. Spektralphotometer PMQ-2, Firma Carl Zeiss; 2. Spektralphotometer Modell DB-Beckman.

I.r. Analysen

Verwendetes Gerät: I.r.-Gitter-Spektrophotometer Modell 257, Firma Perkin-Elmer. Die Substanzen wurden als Film vermessen (AgCl-Platten; KBr-Platten; Reflektionsplatten, Gerät MIR-15, GC-I.R. Analyser Firma Wilks).

Isolierung der gc getrennten Substanzen

Alle Einzelkomponenten wurden in Kapillarglasröhrchen (-70°) nach ihrem Austritt aus dem Gaschromatographen kondensiert.

Optische Drehung

Die Bestimmung der optischen Drehung erfolgte mit einem Polarimeter der Firma Schmidt & Haensch in 0,5 dm Röhren (Volumen = etwa 0,1 ml) in absolutem ÄtOH.

Ausscheidungs- und Regenerationsanalysen

(a) *Alkohole.* 0,5 ml ätherisches Öl wird mit 15 ml Methoxalsäureanhydridlösung (4% in Benzol) und 0,15 ml Pyridin 30 min bei Raumtemperatur und anschließend 30 min bei $+4^{\circ}$ stehengelassen. Die abgetrennte Benzolphase wird nach gründlichem Waschen mit H_2O und Trocknen (Na_2SO_4) im Vakuum eingengt und der Rückstand 3 Stunden am Rückfluß mit 10 ml Aceton und 0,5 ml Triäthylamin unter Zusatz von 2 ml H_2O gekocht. Die Mischung wird im Vakuum eingengt und einer Wasserdampfdestillation unterworfen (Rückflußsystem, wie bei der Öldestillation). Der wässrige Kolbenrückstand wird mit 3 ml NaOH 20% und 20 ml Äther versetzt und unter Umschütteln 3 Stunden stehengelassen. Die Ätherphase wird abgelassen, die wässrige Phase noch 2 mal mit 20 ml Äther extrahiert und die vereinigten Ätherfraktionen nach dem Trocknen im Vakuum eingengt.

(b) Die Bearbeitung der Ketone und Ester erfolgte auf dem üblichen Wege⁴¹ mit Semicarbazid bzw. 0,5 N alkoholischer KOH.

³⁹ E. BAYER, *Gaschromatographie*, Springer Verlag, Berlin (1959).

⁴⁰ R. G. ACKMAN, *J. Gaschromatog.* 2, 173 (1964).

⁴¹ E. GILDEMEISTER und FR. HOFFMANN, *Die Ätherischen Öle*, Bd. II, Akademie Verlag, Berlin (1960).