

(Aus dem Institut für Pflanzenzüchtung Quedlinburg der Deutschen Akademie der Landwirtschaftswissenschaften zu Berlin.)

## Halbmikromethoden zur Serienbestimmung von ätherischem Öl, Estermenthol, Menthol und Menthon in Pfefferminze\*.

Von WERNER MATTHIAS.

Mit 5 Textabbildungen.

Im Rahmen züchterischer Arbeiten an polyploiden Pfefferminzpflanzen erwies es sich als notwendig, schnell durchführbare Serienmethoden zu entwickeln, die es ermöglichen, an Tausenden von Einzelpflanzen den Gehalt an ätherischem Öl festzustellen und die pharmakologisch wichtigsten Bestandteile Menthol, Menthon und Estermenthol quantitativ zu bestimmen.

### Bestimmung des Gehaltes an ätherischem Öl.

Die Bestimmung des ätherischen Öls in Pfefferminzpflanzen erfolgt im wesentlichen nach der Methode der Wasserdampfdestillation, ein Verfahren, das in zahlreichen Modifikationen zur Anwendung gelangt. Eine quantitative Erfassung der gesamten in einer Pflanze enthaltenen Ölmenge wird jedoch in keinem Falle erreicht, vielmehr bestimmen alle Methoden nur die Ölausbeute, die durch Wasserdampfdestillation unter bestimmten Bedingungen erhalten wird und stellen demgemäß nur Konventionsmethoden dar.

Die wichtigsten dieser Verfahren unterzogen K. H. BAUER und POHLOUDEK in einer vergleichenden Studie über die Bestimmung der ätherischen Öle in Heil- und Gewürzpflanzen einer kritischen Prüfung und stellten fest, daß die bei ein und derselben Pflanze erzielten Werte je nach der angewendeten Methode deutliche Unterschiede aufweisen, während die Werte innerhalb einer Methode mehr oder weniger gut übereinstimmen.

Bei der Auswahl eines für unsere Zwecke geeigneten Verfahrens gingen wir von der Überlegung aus, daß die Notwendigkeit, Tausende von Einzelpflanzen in kurzer Frist auf ihren Ölgehalt zu prüfen, besondere Anforderungen an die Leistungsfähigkeit der Bestimmungsmethode stellt. Sie muß vor allem bei geringstem Zeit- und Arbeitsaufwand eine hinreichend große Zahl von Bestimmungen ermöglichen und darf dabei an Genauigkeit den üblichen Methoden nicht unterlegen sein.

Die im DAB VI vorgeschriebene Methode ist sehr umständlich und zeitraubend; darüber hinaus haften ihr individuelle Fehlerquellen an. Es hat daher nicht an Versuchen gefehlt, vereinfachte und besser reproduzierbare Verfahren zu entwickeln. Am besten bewährte sich hierbei die in den verschiedensten Variationen ausgearbeitete volumetrische Bestimmung des mittels Wasserdampf übergetriebenen Öls in Verbindung mit dem nach dem Prinzip der Florentiner Flasche von CLEVINGER eingeführten Rücklaufverfahren. Bei größeren Reihenuntersuchungen an Pfefferminzpflanzen ließen K. H. BAUER und Mitarbeiter zur Erzielung einer möglichst hohen Tagesleistung mehrere Clevinger-Apparaturen nebeneinander laufen. Nach Angabe der Autoren erwies es sich jedoch nicht als vorteilhaft,

mehr als 6 Apparate gleichzeitig in Betrieb zu nehmen, da dies die Beaufsichtigung der Destillation nicht zuläßt. Bei Aufstellung von 6 Apparaten erreichten sie die Erledigung von 18–24 Proben täglich von einer Person. Zu ähnlichen Ergebnissen kam O. MORITZ bei Reihenuntersuchungen mit einer von ihm entwickelten Apparatur. 4 dieser Apparate ermöglichten einer eingearbeiteten Kraft, täglich etwa 30 Bestimmungen durchzuführen.

Die hier in beiden Fällen erzielten Tagesleistungen genügten jedoch noch nicht unseren Erfordernissen. Es galt daher eine Methode zu finden, die die Durchführung einer noch größeren Zahl von täglichen Einzeluntersuchungen gestattet.

Auf Grund vergleichender Untersuchungen entwickelten wir eine Apparatur auf der Basis des Mikro-MORITZ-CLEVINGER. (Abb. I u. 2).

Das einzelne Destillationsgerät besteht aus einem 150 ml fassenden mit NS 29 versehenen Kurzhals-Rundkolben, auf den ein schräg nach unten gestellter Kühler mit Meßrohr und Rücklauf aufgesetzt ist. Das Meßrohr ist in 0,01 ml eingeteilt; an Stelle des einfachen Ablasshahnes wurde auf Vorschlag von Fr. B. МАСНОУ ein sog. Czakoahahn eingebaut, der es ermöglicht, Wasser und Öl nach der Messung getrennt abzulassen, um das Öl ohne zusätzliche Manipulation für weitere chemische Untersuchungen verwenden zu können.

Zur serienmäßigen Ölbestimmung wurden 10 dieser Apparate, wie aus der Abbildung ersichtlich, zu einem Aggregat vereinigt.

An einer Haltevorrichtung sind die Kühler der einzelnen Destillationsapparate in Abständen von 12,5 cm mit Stativklammern befestigt, die 10 Kolben tauchen in ein gemeinsames Paraffinölbad. Dieses Ölbad besteht aus einem rechteckigen Behälter aus Messingblech mit den Abmessungen 15 × 140 × 10 cm und einem Deckel aus Al-Blech mit 10 Öffnungen, in die 10 konisch ausgearbeitete Ringe eingesetzt sind. 5 seitlich in das Bad eingelassene Heizpatronen von je 500 W dienen zur Erwärmung des Öls; in einer neueren Konstruktion verwenden wir an Stelle der 5 Heizpatronen 3 Heizrohre von 10 mm Ø und je 750 W, die längs durch den ganzen Ölbehälter laufen und am Deckel befestigt sind. Die Temperatur wird mit Hilfe eines Kontaktthermometers über ein Relais auf 145° eingestellt. Um im gesamten Ölbad eine gleichmäßige Temperaturverteilung zu gewährleisten, läuft gleichfalls längs durch das Bad eine Welle mit 5 Rührern, die mittels eines kleinen Elektromotors mit Reduziergetriebe betrieben wird. Das Ölbad ruht auf einem 2 cm starken Holzbrett.

Um die Dauer der Beheizung bei allen Kolben gleichmäßig durchführen zu können, wurde eine Vorrichtung geschaffen, die es ermöglicht, alle 10 Kolben zur gleichen Zeit in das Ölbad einzutauchen und ebenso gleichzeitig nach beendeter Destillation aus dem Ölbad zu entfernen.

Das Brett mit dem Ölbehälter ist zu diesem Zweck mit Hilfe von Seilzügen und Rollen so aufgehängt, daß es durch ein an der Vorderseite des Tisches angebrachtes Handrad auf- und abwärts bewegt werden kann. Um das Heben und Senken des Ölbades, das mit etwa 20 Liter Öl gefüllt ist, zu erleichtern, sind unter dem Ölbad ebenfalls mit Hilfe von Seilzügen und Rollen Gegengewichte angebracht, die das effektive Badgewicht auf wenige kg redu-

\* Quedlinburger Beiträge zur Züchtungsforschung Nr. 11.

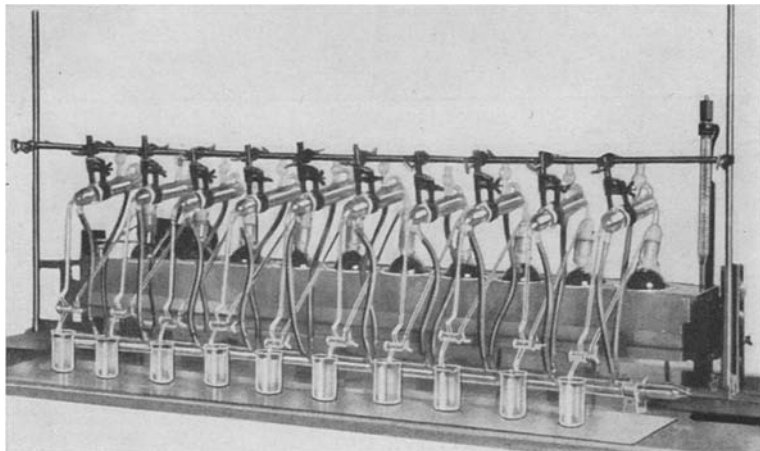


Abb. 1. Serienapparat zur Bestimmung von ätherischen Ölen.

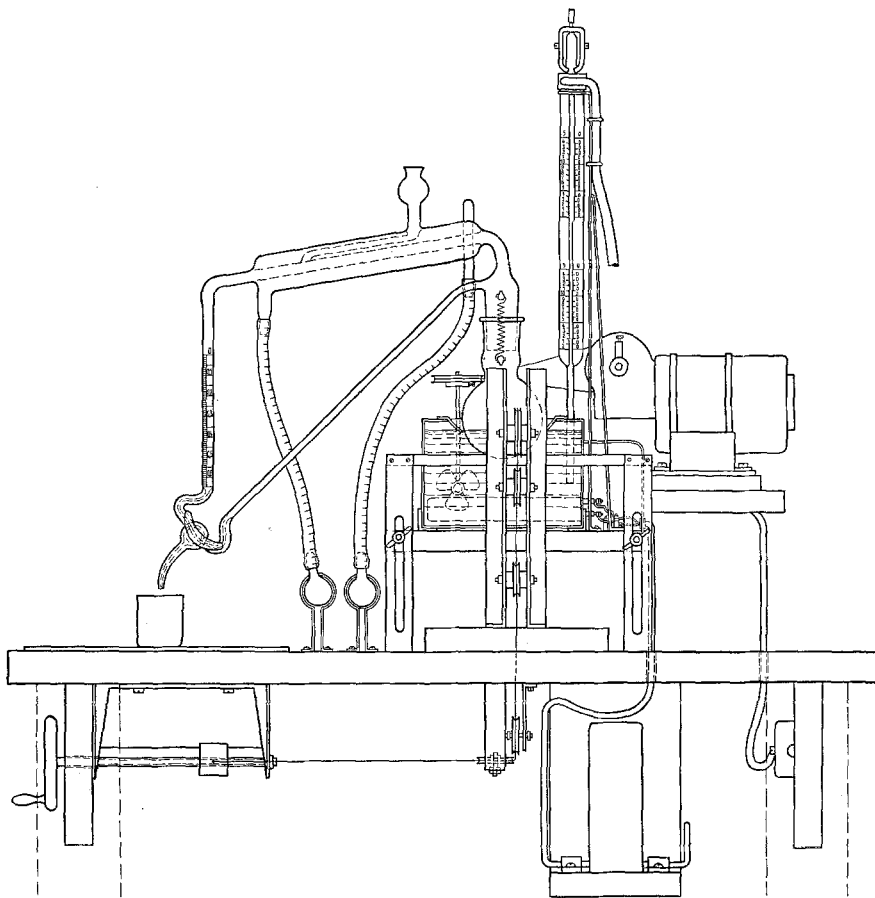


Abb. 2. Schematische Darstellung eines Schnittes durch die Serienapparat zur Bestimmung von ätherischen Ölen.

Tabelle 1. Reproduzierbarkeit der Meßergebnisse bei verschiedenen Einwaagen.

Material: Fol. Menthae Nr. 183.

Apparat Nr.	Einwaage 10g		Einwaage 5g		Einwaage 2g	
	Ausbeute in ml.	Vol.-%	Ausbeute in ml.	Vol.-%	Ausbeute in ml.	Vol.-%
1	0,205	2,34	0,100	2,28	0,035	2,00
2	0,209	2,38	0,092	2,10	0,040	2,36
3	0,198	2,26	0,100	2,28	0,040	2,36
4	0,207	2,36	0,102	2,32	0,039	2,23
5	0,200	2,28	0,096	2,19	0,042	2,40
6	0,200	2,28	0,102	2,32	0,035	2,00
7	0,202	2,31	0,095	2,17	0,040	2,36
8	0,200	2,28	0,100	2,28	0,038	2,17
9	0,198	2,26	0,105	2,40	0,038	2,17
10	0,200	2,28	0,098	2,24	0,040	2,36
	Mittel = 2,30		Mittel = 2,26		Mittel = 2,24	

zieren. Der Wasserzu- und -abfluß für die einzelnen Kühler erfolgt durch je ein 1,5 m langes Glasrohr von 25 mm  $\varnothing$  mit 10 angeschmolzenen Stutzen.

Die Bestimmung wird wie folgt durchgeführt:

Nachdem die Meß- und Rücklaufrohre mit Wasser gefüllt worden sind, werden in jeden Kolben 10 g unzerkleinerte Fol. Menth. eingewogen und mit je 100 ml Aqua dest. versetzt. Die 10 Kolben werden an die Kühler angeschlossen und mit Drahtfedern gesichert. Darauf wird das schon vorher auf 145° angeheizte Ölbad mit Hilfe des Handrades nach oben gedreht, so daß alle Kolben gleichzeitig in das Öl eintauchen. Die Kühlung wird angestellt und ohne weitere Wartung 50 Minuten destilliert. Etwa 5 Minuten vor beendeter Destillation wird das Kühlwasser abgestellt und anschließend die Destillation durch Herablassen des Ölbad unterbrochen. Darauf wird die Kühlung wieder angestellt.

Nach etwa 2 Minuten — das den Kolben anhaftende Öl ist inzwischen abgetropft — werden die Öffnungen des Ölbad mit Uhrgläsern abgedeckt. Das überdestillierte Öl wird durch Betätigung der Czakohähne in die Meßrohre gezogen und nach etwa 5 Minuten die Ölmenge abgelesen. Anschließend werden Öl und Wasser getrennt abgelassen.

Zur Reinigung der Apparatur werden auf jedes der Uhrgläser 250 ml Bechergläser gestellt und Kühler, Meß- und Rücklaufrohr mehrmals durchgespült. Danach kann die Destillation mit 10 weiteren Kolben, die während der vorherigen Destillation mit Droge beschickt wurden, sofort begonnen werden.

Der Vorteil dieses Serienaggregates gegenüber den bisher üblichen nebeneinander laufenden Einzelapparaturen besteht darin, daß es gelingt, durch Mechanisierung und Zusammenfassung von Arbeitsvorgängen den Zeit- und Arbeitsaufwand zu verringern. Dadurch ist es möglich, eine größere

Zahl von Apparaten gleichzeitig zu bedienen, und eine angelernte Kraft ist in der Lage, mit einem Aggregat täglich 60 Bestimmungen durchzuführen; bei Benutzung von 3 Serienaggregaten können zwei angelernte Hilfskräfte ohne Mühe täglich 180 Bestimmungen schaffen.

Die Reproduzierbarkeit der einzelnen Werte ist dadurch, daß die Bestimmungen unter weitgehend gleichen Bedingungen durchgeführt werden, sehr gut. Bei kleineren Einwaagen ist sie zwar vermindert, jedoch erhält man auch bei 5 g Einwaage noch verhältnismäßig befriedigend übereinstimmende Werte, während bei 2 g Einwaage die Übereinstimmung der erhaltenen Werte für orientierende Zwecke noch als ausreichend bezeichnet werden kann (Tab. 1).

Als Bezugsgröße des ätherischen Ölgehaltes dient die wasserfreie Trockensubstanz. Die Bestimmung des

Wassergehaltes erfolgt in flachen Wägegläschen durch Trocknen der Blattdroge bei 105° bis zur Gewichtskonstanz. Der bei dieser Wasserbestimmungsmethode durch den gleichzeitig auftretenden Verlust an ätherischem Öl bedingte Fehler ist im allgemeinen zu vernachlässigen.

### Bestimmung von Estermenthol, Menthol und Menthon im Pfefferminzöl.

Der Wert einer Pfefferminzdroge beruht nicht allein auf dem Gehalt an ätherischem Öl, sondern wird von der chemischen Zusammensetzung des Öles maßgeblich bestimmt.

Hauptinhaltsstoffe des Öles sind Menthol, Menthon und Estermenthol, hierbei insbesondere der Essigsäure- und Isovaleriansäureester; darüber hinaus kommen in geringen Mengen noch eine ganze Reihe anderer Verbindungen vor, z. B. Cineol, Menthofuran, Jasmon, Phenyllessigsäurehexylenester, Piperiton u. a. m. (SCHMIDT, GILDEMEISTER); jedoch hängt der pharmakologische Wert des Öles entscheidend ab von dem Gehalt an Menthol, Menthon und Estermenthol (DINCKLER). Die Bestimmung dieser drei Hauptkomponenten diene uns deshalb zur chemischen Charakterisierung der bei der Destillation der einzelnen Pfefferminzpflanzen gewonnenen ätherischen Öle.

Da die Untersuchungen an Einzelpflanzen vorgenommen werden mußten, und somit nur relativ wenig Öl zur Verfügung stand, war es notwendig, die einzelnen Bestimmungen mit weniger als 0,1 ml Öl durchzuführen. Die große Zahl der zu untersuchenden Öle stellte uns vor die Aufgabe, Serienmethoden zu entwickeln, die es gestatten, die Bestimmungen unter geringstem Aufwand an Zeit und Gerät durchzuführen, ohne jedoch den sonst üblichen Einzelbestimmungen an Genauigkeit nachzustehen.

#### 1. Estermentholbestimmung.

Zunächst ein kurzer Überblick über die wichtigsten Methoden der Estergehaltsbestimmung, die bisher bei Pfefferminzöluntersuchungen Anwendung fanden:

Im DAB VI ist eine Estergehaltsbestimmung nur im Zusammenhang mit der Mentholbestimmung angegeben, jedoch ist für die Neuausgabe des Arzneibuches die Aufnahme einer speziellen Bestimmung vorgesehen.

Die amerikanische Pharmakopöe XIV, ferner GILDEMEISTER u. a. bestimmen den Estergehalt in der Weise, daß 10 ml Öl mit 0,5 n äthylalkoholischer Kalilauge in einem 125 ml-Schliffkolben mit Rückflußkühler eine Stunde auf dem Wasserbad erhitzt werden. Durch Titration wird der Verbrauch an Kalilauge bestimmt und daraus der Estergehalt errechnet.

Durch einfache Reduzierung der Einwaage auf wenige mg und Verwendung eines 25 ml-Schliffkolbens mit Kühlrohr führten ULLRICH und SCHNEIDER bei ihren Untersuchungen an Pfefferminzen Esterbestimmungen im Mikromaßstab durch, ohne jedoch Angaben über die Genauigkeit der hierbei erzielten Ergebnisse zu machen. Eigene Versuche nach diesem Verfahren führten zu keinen befriedigenden Resultaten.

Ein spezielles Mikroverfahren zur Verseifung von kleinen Estermengen beschreibt GORVACH in seinen Mikromethoden auf dem Gebiete der Fettchemie. Er verwendet zur Verseifung einen Mikrobecher, über den er einen Überflurückflußkühler stülpt und erhitzt auf einem Metallheizblock. Er erzielte mit diesem Verfahren recht gute Ergebnisse.

Einen anderen Weg schlägt K. H. BAUER bei seinen Untersuchungen an Einzelpflanzen ein. Er bestimmt das im Öl vorhandene Estermenthol mit der Apparatur zur Acetylbestimmung nach R. KUHN und H. ROTH bei Ein-

waagen von 10–20 mg. Bei dieser Methode wird das Pfefferminzöl mit einigen ml n-methylalkoholischer Natronlauge im Destillierkolben der Apparatur unter Rückflußkühlung verseift und anschließend das mit Schwefelsäure angesäuerte Verseifungsprodukt unter Benutzung des Quarzkühlers einer Destillation unterworfen. Im Destillat wird die Essigsäure bzw. Isovaleriansäure mit n/100 NaOH durch Titration bestimmt und der Estergehalt wie üblich insgesamt als Menthylacetat errechnet. Dieses Verfahren benutzte auch ВОГННЪ bei entsprechenden Untersuchungen.

Die hier angeführten, im allgemeinen bewährten Methoden verlangen jedoch einen erheblichen apparativen und zeitlichen Aufwand, so daß sie für große Reihenuntersuchungen unzweckmäßig sind. Es bestand daher Veranlassung, eine für Serienuntersuchungen besser geeignete Methode zu entwickeln, und es gelang, ein Verfahren auszuarbeiten, das trotz geringsten Aufwandes an Material und Zeit in der Genauigkeit den vorgenannten Methoden mindestens gleichkommt.

Im Gegensatz zu den bisher üblichen Methoden wird die Verseifung hierbei unter Vermeidung einer Rückflußkühlung im geschlossenen System durchgeführt und zwar wird das zu untersuchende Öl mit 0,5 n Kalilauge in einer zugeschmolzenen dünnwandigen 1 ml fassenden Ampulle aus Jenaer Glas durch Erhitzen im Wasserbade verseift.

Der sonst übliche Methyl- bzw. Äthylalkohol war als Lösungsmittel für das KOH bei den von uns gewählten Versuchsbedingungen auf Grund der wesentlich unter 100° liegenden Siedepunkte nicht verwendbar. Dagegen hat sich n-Propylalkohol für unsere Zwecke als sehr gut geeignet erwiesen. Dieser Alkohol hat einen ausreichend hohen Siedepunkt und ist noch in jedem Verhältnis mit Wasser mischbar; bei dem nächsthöheren Homologen, dem Butylalkohol, ist das schon nicht mehr der Fall.

Bei Verwendung von Äthylalkohol schreibt die amerikanische Pharmakopöe XIV eine Verseifungszeit von einer Stunde vor; hierbei wird jedoch keine vollkommene Verseifung der Mentylester erreicht. Nach den Angaben von GILDEMEISTER ist

Tabelle 2. Bestimmung von Menthylacetat.

Verseifungszeit Minuten	Einwaage mg	gefunden mg	Differenz mg
30	87,9	87,7	–0,2
	86,0	85,9	–0,1
60	113,4	113,5	+0,1
	90,2	90,6	+0,4
120	120,8	120,7	–0,1
	93,6	93,6	±0,0
180	89,9	90,0	–0,1
	53,2	53,4	+0,2
240	83,7	83,5	–0,2
	117,3	117,4	–0,1
360	88,7	88,4	–0,3
	60,9	61,1	+0,2

die Verseifung von Menthylacetat in äthylalkoholischer Kalilauge erst nach 1½ Stunden und bei Menthylisovalerianat sogar erst nach 6 Stunden beendet.

Der höhere Siedepunkt des n-Propylalkohols läßt den Verseifungsvorgang schneller vor sich gehen als bei Verwendung von Methyl- bzw. Äthylalkohol. Bei unserem Verfahren ist Menthylacetat bereits nach 30 Minuten vollkommen verseift, wie aus Tab. 2 hervorgeht. Um jedoch sicher zu gehen, daß auch der ebenfalls im Pfefferminzöl vorkommende Menthylester der Isovaleriansäure quantitativ verseift wird, erhitzen wir 150 Minuten im Wasserbad. Die Verseifungszeit von Menthylisovalerianat konnte nicht bestimmt werden, da uns kein entsprechendes Präparat zur Verfügung stand.

Nach beendeter Verseifung wird die Ampulle im Titrierbecher zertrümmert und nach Hinzugabe einer bestimmten Menge Wassers mit 0,02 n HCl das unverbrauchte KOH bestimmt. Aus dem Verbrauch der Lauge wird in bekannter Weise der Estergehalt errechnet.

Durch das Verseifen im geschlossenen System und das Überführen der zugeschmolzenen Ampulle in den Titrierbecher wird der störende Einfluß der Luftkohlenensäure auf ein Minimum reduziert.

Die Genauigkeit der Methode wird in den Tabellen 2 u. 5 veranschaulicht. Dieses Verseifungsverfahren bewährte sich auch bei anderen von uns geprüften Estern, z. B. Butylacetat (Tab. 3).

Tabelle 3. Bestimmung von Butylacetat.

Nr.	Einwaage mg	gefunden mg	Differenz mg
1	42,7	42,7	±0,0
2	45,1	44,9	-0,2
3	42,0	42,2	+0,2
4	37,7	37,9	+0,2
5	43,2	43,3	+0,1

Die Bestimmung wird wie folgt durchgeführt:

In eine gewogene 1 ml-Ampulle aus Jenaer Flialaxglas werden etwa 70 mg Pfefferminzöl mit Hilfe von Kapillarröhren einpipettiert und dann gewogen. Aus einer Bürette (V<sub>2</sub>A-Spitze) werden etwa ¾ ml 0,5 n n-propylalkoholische Kalilauge zugegeben. Die Ampulle wird darauf zugeschmolzen und abermals gewogen, um die genaue Menge der KOH zu bestimmen. Zur Titerbestimmung der Lauge

werden in eine zweite Ampulle unter Fortlassung des Pfefferminzöls ebenfalls annähernd 0,7 ml Kalilauge eingefüllt und die Ampulle zugeschmolzen und gewogen.

Nach kurzem Umschütteln werden die Ampullen in eine Haltevorrichtung eingeklemmt und im Wasserbad bei 100° 150 Minuten erhitzt. Für weniger als 20 Bestimmungen benutzen wir ein ringförmiges Gestell mit Halteklammern (Abb. 3) und als Wasserbad ein 800 ml-Becherglas, das mit einem Uhrglas bedeckt wird; für Reihenuntersuchungen wird als Wasserbad ein Sterilisator (16 × 34 cm) verwendet. In diesen ist ein rechtwinkliger Metallrahmen eingesetzt mit 10 Führungsleisten an den Längsseiten zur Aufnahme von 10 Metallstreifen mit je 10 Halteklammern für die Ampullen, so daß auf diese Weise gleichzeitig bis zu 100 Verseifungen durchgeführt werden können.

Nach beendeter Verseifung und Abkühlung werden die Ampullen mit Aqua dest. abgespült und in einen Jenaer 100 ml-Kantkolben überführt. Ein Glasstab, bei dem das eine Ende mit einem hufeisenförmigen Ansatz versehen ist, der so groß sein muß, daß er gerade die Ampulle umgreift und in dessen Scheitelpunkt ein kleiner Glasdrum angeschmolzen ist, wird auf die Ampulle aufgesetzt und diese durch einige kurze Schläge mit einem kleinen Holzhammer auf den Stab zertrümmert. Zweckmäßigerweise wird die Ampulle vorher mit einem Schreiddiamanten kreuz und quer leicht angeritzt; die Zertrümmerung läßt sich dann ohne Mühe durchführen.

Nach Zugabe von etwa 20 ml durch Abkochen kohlenstofffrei gemachtem Aqua dest. und Zusatz von 2 Tropfen 1%iger Phenolphthaleinlösung wird mit 0,02 n HCl titriert.

Zur Erleichterung und Beschleunigung der Titration benutzen wir einen Titriertisch, unter dem sich ein durch einen kleinen Elektromotor betriebener rotierender Magnet befindet<sup>1</sup>. In jeden Titrierkolben wird ein etwa 2 cm langes und 4 mm starkes Glasröhrchen mit einem eingeschmolzenen Eisendraht von etwa 1,5 mm Stärke gegeben; dieses rotiert nach dem Aufsetzen des Kolbens auf den Titriertisch und setzt die Flüssigkeit in lebhafte Bewegung, so daß das sonst notwendige Schütteln des Titrierkolbens entfällt.

Zur Titerbestimmung der 0,02 n-HCl wird eine mit Oxalsäure eingestellte 0,1 n-NaOH benutzt (Indikator: Phenolphthalein). Durch Verdünnen mit abgekochtem Aqua dest. wird auf etwa dieselbe Konzentration wie bei der Titration der Verseifungsprodukte eingestellt.

## 2. Mentholbestimmung.

Zunächst wieder ein kurzer Überblick über die üblichen Verfahren zur Mentholbestimmung:

Nach dem DAB VI, der amerikanischen Pharmakopöe XIV u. a. wird das Menthol in folgender Weise bestimmt:

10 ml Pfefferminzöl werden mit 10 ml Essigsäureanhydrid und 2 bzw. 1 g wasserfreiem Na-Acetat in einem 100 ml-Acetylierungskolben mit Kühlrohr 1 Stunde erhitzt. Nach dem Abkühlen der Mischung wird mit Wasser versetzt, das Öl im Scheidetrichter von der wäßrigen Flüssigkeit getrennt und bis zur Säurefreiheit gewaschen. Danach wird mit getrocknetem Natriumsulfat behandelt und filtriert. 1,5 bzw. 5 ml des acetylierten Öles werden dann in einen Verseifungskolben genau eingewogen und unter Benutzung eines Rückflußkühlers mit 0,5 n alkoholischer KOH verseift und anschließend das unverbrauchte KOH mit 0,5 n Salz- oder Schwefelsäure titriert.

Das gleiche Verfahren wendete SPRINGER bei seinen Untersuchungen an Pfefferminzpflanzen an, reduzierte jedoch die Ausgangsmenge auf etwa 1,5 g. Diese Mengen sind aber für Untersuchungen an Einzelpflanzen noch zu groß. K. H. BAUER und Mitarbeiter arbeiteten deshalb ein Verfahren aus, das es gestattet, den Mentholgehalt in weniger als 0,1 g Pfefferminzöl zu bestimmen. Sie acetylierten etwa 80 mg des Öles nach der eben geschilderten Methode des DAB VI, führten dann aber die Verseifung des säurefrei gewaschenen und getrockneten Öles nach der Methode von R. KUHN und H. ROTH —

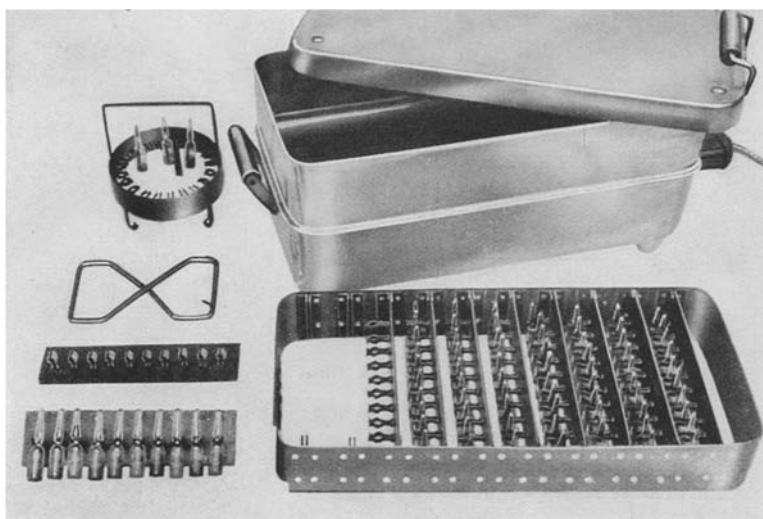


Abb. 3. Wasserbad und Einsätze zur Verseifung bzw. Veresterung in 1 ml-Ampullen.

<sup>1</sup> Fa. Friedrich Geyer, Ilmenau/Thür.

bei der Estergehaltsbestimmung näher beschrieben — durch und errechneten daraus den Gesamtmentholgehalt. Nach Abzug des gesondert bestimmten natürlichen Estermentholgehaltes ergibt sich dann der Gehalt an freiem Menthol.

Nach einem anderen Prinzip führten ULLRICH und SCHNEIDER die Mikrobestimmung des Menthols durch: Sie oxydierten das im Öl vorhandene Menthol nach BECKMANN mit Chromschwefelsäure zu Menthon und bestimmten dann mit der Hydroxylaminmethode den Menthongehalt. In einem zweiten Ansatz wurde nach dem gleichen Verfahren das im Pfefferminzöl an sich schon vorhandene Menthon bestimmt und unter Berücksichtigung dieses Wertes der Mentholgehalt errechnet.

Bei allen diesen Verfahren ist jedoch der Aufwand an Gerät und Zeit zu hoch, als daß sie für umfangreiche Reihenuntersuchungen in Betracht kämen.

Eine Vereinfachung der Acetylierungsmethode bei Phenolen, primären und sekundären Alkoholen erreichten VERLEY und BÖLSING dadurch, daß sie die zu untersuchende Substanz mit einer genau bekannten Menge Essigsäureanhydrid in Gegenwart von Pyridin veresterten. Durch Titration der nicht gebundenen Essigsäure mit NaOH und Phenolphthalein als Indikator ermittelten sie den Alkohol- bzw. Phenolgehalt. Das Pyridin hat hierbei neben der Katalysatorwirkung (KLAGES) noch den Vorteil, die bei dem Prozeß gebildete Essigsäure abzufangen. Bei diesem Verfahren entfällt das Auswaschen der acetylierten Probe und die sich anschließende Verseifung.

WILSON bestimmte nach dieser Methode in 1 g Pfefferminzöl den Mentholgehalt und schlug an Stelle des weiter oben genannten dieses Verfahren für das amerikanische Arzneibuch vor.

Eine noch weitergehende Vereinfachung bei der Bestimmung der Hydroxylzahl nach VERLEY und BÖLSING beschreibt B. WURZSCHMITZ: Unter Ausschaltung des sonst notwendigen Rückflußkühlers werden 5 g der zu untersuchenden Substanz mit 5 g Essigsäureanhydrid in ein Reagenzrohr genau eingewogen, das Rohr nach Zugabe von etwa 8 ml wasserfreiem Pyridin zugeschmolzen und anschließend eine Stunde im Kupferblock erhitzt. Danach wird das Rohr abgekühlt, in einer Flasche zertrümmert und nach Verdünnen mit 200 ml Wasser mit 1 n NaOH gegen Phenolphthalein titriert.

Auf der Grundlage dieses Verfahrens wurde nun von uns eine Halbmikro-Serien-Methode ausgearbeitet, die unter Verwendung der bei der Esterbestimmung bereits bewährten Technik in einer kleinen Ampulle durchgeführt wird. Ca. 70 mg Öl werden mit etwa 0,4 ml Essigsäureanhydrid-Pyridin-Gemisch in Ampullen von 1 ml Inhalt genau eingewogen, zugeschmolzen und im Wasserbad auf 100° erhitzt. Anschließend werden die Ampullen im Titrierkolben zertrümmert und nach Zugabe von Wasser — das unverbrauchte Essigsäureanhydrid wird dadurch zu Essigsäure hydrolysiert — durch Titration mit 0,1 n NaOH der Mentholgehalt bestimmt. Ein nochmaliges Erhitzen nach der Wasserzugabe zur Erzielung einer vollkommenen Zersetzung des Essigsäureanhydrids, die in kaltem Wasser erst nach Tagen erreicht ist (KLAGES), ist nicht notwendig, da die Hydrolyse des Essigsäureanhydrids in Gegenwart von Pyridin so schnell verläuft (A. LEMAN), daß bereits nach wenigen Minuten titriert werden kann.

Zur Klärung der Frage, wie lange Zeit die Ampullen im Wasserbad erhitzt werden müssen, um eine quantitative Veresterung zu erreichen, wurde in einer entsprechenden Versuchsserie nach verschiedenen Zeiten der Umsatz des Menthols bestimmt (Abb. 4). Nach einer Erhitzungsdauer von 150 Minuten war die Veresterung beendet.

Als Acetylierungsgemisch erwies sich in Vorversuchen ein Essigsäureanhydrid-Pyridin-Gemisch, das aus einem Teil Anhydrid und drei Teilen Pyridin besteht, als am besten geeignet.

Für die Genauigkeit der Ergebnisse ist der Reinheitsgrad der verwendeten Reagentien von entscheidender Bedeutung. Das käufliche Essigsäureanhydrid

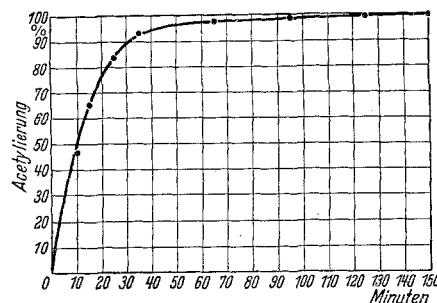


Abb. 4. Acetylierung von Menthol durch Essigsäureanhydrid-Pyridin (1:3) bei 100°. Mittelwerte aus je 3 Bestimmungen.

enthält häufig erhebliche Mengen Essigsäure und muß daher vor der Verwendung durch fraktionierte Destillation sorgfältig gereinigt werden. Ebenso muß das Pyridin, das stark hygroskopisch ist, mit festem NaOH getrocknet und destilliert werden.

Zur Titration dient eine 0,1 n NaOH, deren Titer mit reinstem Oxalsäuredihydrat und Phenolphthalein als Indikator bestimmt wird.

Die Genauigkeit der mit dieser Methode erhaltenen Resultate veranschaulichen die Tab. 4 u. 6.

Tabelle 4. Bestimmung von Menthol.

Menthol	
Einwaage mg	gefunden mg
43,6	43,9
46,3	46,5
70,9	70,7
48,0	48,4
45,5	45,3

Die Bestimmung wurde wie folgt durchgeführt:

In eine genau gewogene 1 ml-Ampulle aus Jenaer Fiolaxglas werden etwa 70 mg Pfefferminzöl eingefüllt und gewogen. Anschließend werden etwa 0,4 ml Acetylierungsgemisch hinzugegeben, die Ampulle zugeschmolzen, nach Abkühlung erneut gewogen und im Wasserbad (Abb. 3) bei 100° 150 Minuten erhitzt. Nach dem Abkühlen wird die Ampulle mit dest. Wasser abgespült und in einem 100 ml Jenaer Kantkolben zertrümmert. Es werden 20 ml abgekochtes dest. Wasser hinzugefügt, mit denen man gleichzeitig den Zertrümmerungsstab und die Kolbenwand abspült und mit 0,1 n NaOH mit Phenolphthalein als Indikator bis zur schwachen Rotfärbung titriert.

Zur Titration wird eine 10 ml fassende, in 0,02 ml unterteilte automatische Bürette verwendet, die zum Schutz gegen Luftkohlensäure mit einem Natronkalkrohr versehen ist.

Das Füllen, Erhitzen und Zertrümmern der Ampullen wird in derselben Weise durchgeführt wie bei der Bestimmung des Estermentholgehaltes; auch die Titrationstechnik ist die gleiche.

Zur genauen Feststellung des Titors des Essigsäureanhydrid-Pyridin-Gemisches wird eine Bestimmung ohne Zugabe von Pfefferminzöl durchgeführt.

Bei Reihenuntersuchungen laufen bei je 100 Bestimmungen 5 Bestimmungen zur Titerbestimmung bzw. -kontrolle mit.

Der Mentholgehalt errechnet sich aus der Menge der an Menthol gebundenen Essigsäure in üblicher Weise.

### 3. Menthonbestimmung.

Zur Auslese unerwünschter L-Carvonhaltiger Pflanzen wurde in einer Vorprobe mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin auf L-Carvongehalt geprüft. Etwa 0,01 ml

Öl wurden mit 0,5 ml Äthanol und 1 ml 2,4-Dinitrophenylhydrazinreagens versetzt. Während L-Menthon eine orangefarbene Fällung gibt, bildet sich bei Anwesenheit von L-Carvon nach längerem Stehen ein karminroter Niederschlag.

Für die Bestimmung des Menthons stehen drei Methoden zur engeren Auswahl:

Nach POWER und KLEBER wird das Menthon durch metallisches Natrium und Alkohol zu Menthol reduziert, und dieses unter Berücksichtigung des im Öl bereits vorhandenen Menthols in üblicher Weise bestimmt. Diese Methode ist sehr umständlich und vor allem nicht sehr zuverlässig.

Eine andere Möglichkeit, das Menthon zu bestimmen, bietet die Methode von C. SCHOLTENS, nach der Aldehyde und Ketone in ätherischen Ölen mit Hilfe von 2,4-Dinitrophenylhydrazin in die entsprechenden Hydrazone überführt werden. Die Bestimmung erfolgt durch Wägung dieser schwer löslichen kristallinen Verbindungen.

An Einfachheit unübertroffen ist die von WALTER vorgeschlagene und von C. T. BENNET und M. S. SALAMON verbesserte Hydroxylaminmethode zur Bestimmung von Aldehyden und Ketonen. Das Verfahren beruht darauf, daß die Carbonylverbindung durch Hydroxylaminchlorid in das entsprechende Oxim überführt wird; hierbei wird Salzsäure frei, die dann mit KOH und Bromphenolblau als Indikator titriert wird. Wie J. J. PERRET jüngst an Hand eines großen Versuchsmaterials feststellen konnte, liefert diese Methode zwar bei Aldehyden nicht immer genaue Resultate, kann jedoch bei Ketonen ohne Bedenken verwendet werden.

Diese Methode erwies sich auch für unsere Zwecke am besten geeignet, jedoch gingen wir von etwa  $\frac{1}{20}$  der sonst üblichen Einwaage aus. Die Genauigkeit der Ergebnisse geht aus der Tab. 7 hervor.

Die Reaktionsgeschwindigkeit der einzelnen Ketone bei der Einwirkung von Hydroxylaminchlorid ist recht verschieden: während bei einigen die Oximbildung bereits nach wenigen Minuten beendet ist, benötigen andere, darunter auch das Menthon, mehrere Stunden. Zur Feststellung dieser Reaktionszeit wurde nach verschiedenen Zeiten der Umsatz von Hydroxylaminchlorid mit Menthon bestimmt (Abb. 5). Nach etwa

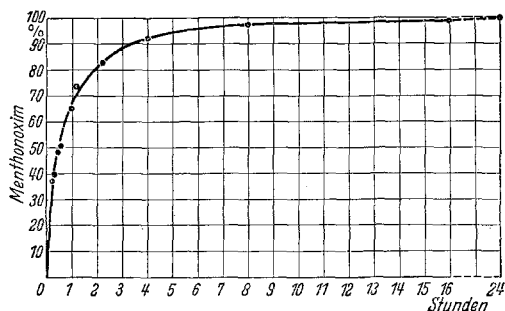


Abb. 5. Menthonoximbildung aus Menthon und Hydroxylaminchlorid bei 20°.

10 Stunden ist eine quantitative Umsetzung erfolgt. Aus arbeitszeitlichen Erwägungen wurde aber die freigewordene Salzsäure erst nach 16 Stunden titriert.

Die Technik des Titrierens ist hierbei von entscheidender Bedeutung für die Genauigkeit der Resultate. Um während der Titration einen lokalen Überschuß an KOH zu vermeiden, darf diese nur langsam und unter kräftigem Rühren zugegeben werden; hier bewährte sich wiederum die Benutzung des oben erwähnten elektromagnetischen Rührers.

Die zur Bestimmung benötigte Hydroxylaminchloridlösung wird in folgender Weise hergestellt:

In 45 ml heißem Aqua dest. werden 25 g Hydroxylaminchlorid gelöst. Zu dieser Lösung gibt man 400 ml 95%igen

Alkohol hinzu, ferner 10 ml einer Bromphenolblaulösung, neutralisiert nötigenfalls mit 0,5 n alkoholischer KOH und ergänzt mit 95%igem Alkohol auf 500 ml. Die Bromphenolblaulösung wird aus 40 mg Bromphenolblau, das mit 3 ml 0,05 n NaOH verrieben und mit H<sub>2</sub>O auf 25 ml aufgefüllt wird, bereitet.

Die Bestimmung wurde wie folgt durchgeführt:

Etwa 80 mg Pfefferminzöl werden in einem 10 ml Erlenmeyerkölbchen mit 2 ml Hydroxylaminchloridlösung versetzt. Nach 16 Stunden wird die freigewordene HCl durch Titration mit 0,1 n alkoholischer KOH bestimmt und daraus der Menthongehalt errechnet.

Abschließend ist in den nachstehenden Tab. 5—7 die Leistungsfähigkeit der geschilderten Halbmikroserien-Methoden an einem Gemisch von Estermenthol, Menthol und Menthon, den drei Hauptkomponenten des Pfefferminzöls, demonstriert. Die Mischung setzt sich zusammen aus 11,9% Menthylacetat, 60,0% Menthol und 28,1% Menthon.

Tabelle 5. Bestimmung von Menthylacetat in einem Gemisch von Menthylacetat, Menthol und Menthon.

Öleinwaage mg	Menthylacetat vorhanden 11,9%		
	ber. mg	gef. mg	gef. %
88,4	10,5	10,3	11,7
69,0	8,2	8,2	11,9
92,9	11,1	11,2	12,1
89,8	10,7	10,6	11,8
69,9	8,3	8,5	12,2

Tabelle 6. Bestimmung von Menthol (freies) in einem Gemisch von Menthylacetat, Menthol und Menthon.

Öleinwaage mg	Menthol vorhanden 60,0%		
	ber. mg	gef. mg	gef. %
68,4	41,0	41,2	60,2
75,4	45,2	45,1	59,8
64,7	38,8	38,8	60,0
58,7	35,2	35,4	60,3
68,0	40,8	40,9	60,1

Tabelle 7. Bestimmung von Menthon in einem Gemisch von Menthylacetat, Menthol und Menthon.

Öleinwaage mg	Menthon vorhanden 28,1%		
	ber. mg	gef. mg	gef. %
73,8	20,8	20,9	28,3
72,5	20,4	20,6	28,4
72,9	20,5	20,1	27,6
81,1	22,8	22,6	27,9
84,9	23,9	24,0	28,3

Die Ergebnisse der in den Tabellen aufgeführten Beleganalysen stammen aus Bestimmungen, die in die laufenden Serienbestimmungen eingeschaltet wurden.

Die geschilderten Serienmethoden ermöglichen bei züchterischen Arbeiten eine relativ schnelle und genaue Bestimmung der pharmakologisch wichtigsten Inhaltsstoffe der Pfefferminze.

Nachdem die Pflanzen in üblicher Weise züchterisch bearbeitet und in bezug auf die Blattausbeute, Krankheitsresistenz usw. bonitiert worden sind, erfolgt die quantitative und qualitative Prüfung des aus den Einzelpflanzen gewonnenen ätherischen Öls.

Zu diesem Zwecke werden die Pflanzen zu Beginn des Blühstadiums geerntet und auf dem Trockenboden

getrocknet. Anschließend werden die Blätter der einzelnen Pflanzen abgestreift und gut durchmischt, um so die Durchschnittsblattprobe einer Pflanze zu erhalten.

10 g dieser lufttrockenen Droge werden zur Bestimmung des ätherischen Ölgehaltes entnommen. Weitere 2 g werden bei 105° im Trockenschrank getrocknet, um die Ausbeute auf die Trockensubstanz beziehen zu können.

Das gewonnene ätherische Öl wird in drei etwa gleiche Teile geteilt und die Bestimmung von Estermenthol, Menthol und Menthon mit Hilfe der beschriebenen Serienmethoden durchgeführt.

Diese Bestimmungen ermöglichen eine weitgehende qualitative Auslese des Zuchtmaterials, da der Anteil der einzelnen Komponenten entscheidend ist für den pharmakologischen Wert der Droge.

Darüber hinaus wird die Geruchs- und Geschmacksqualität des Pfefferminzöls durch das Vorhandensein bzw. Nichtvorhandensein bestimmter Stoffe maßgeblich beeinflusst; der chemische Charakter dieser Stoffe ist z.T. noch nicht geklärt und die im allgemeinen außerordentlich geringen Mengen dieser Stoffe sind z.Z. einer einfachen serienmäßigen Bestimmung noch nicht zugänglich.

Eine ganze Reihe dieser den Geruchs- und Geschmackscharakter beeinflussenden Bestandteile des Pfefferminzöls wurden von H. SCHMIDT isoliert, wobei z.B. das von ihm nachgewiesene Jasmon in Mengen von weniger als 0,1% die Feinheit des Geruchs und Geschmacks deutlich beeinflusst.

Für die endgültige Auslese muß daher bei dem bereits weitgehend durch die geschilderten Prüfungen eingegangenen Material eine Geruchs- und Geschmacksprobe vorgenommen werden. Hierzu genügen geringste Mengen.

Wir benutzen dazu die in den Auffangröhrchen verbliebenen Reste des Öls, die mit 2 mm breiten Filtrierpapierstreifen aufgesaugt und dann sofort einer Geruchs- und Geschmacksprüfung unterzogen werden.

### Zusammenfassung.

Zur Durchführung züchterischer Arbeiten an polyploiden Pfefferminzen wurden Halbmikromethoden entwickelt, die eine serienmäßige Bestimmung von ätherischem Öl, Estermenthol, Menthol und Menthon an Einzelpflanzen ermöglichen. Nach einer kurzen Diskussion der wichtigsten bisher verwendeten Methoden wird beschrieben, in welcher Weise die Bestimmungen durchgeführt wurden.

1. Zur Bestimmung des ätherischen Ölgehaltes wurde eine Serienapparatur entwickelt, bei der 10 Einzeldestillationsgeräte zu einem Aggregat vereinigt sind, die von einem gemeinsamen, elektrisch erwärmten und temperaturkonstant gehaltenen Paraffinölbad beheizt werden. Durch die Mechanisierung einzelner Arbeitsvorgänge wird erreicht, daß täglich 60 bis 90 Bestimmungen von einer Hilfskraft durchgeführt werden können.

2. Zur Bestimmung des Estergehaltes dient ein Verfahren, bei dem die Verseifung in einer zugeschmolzenen 1 ml-Ampulle mit  $n$ -propylalkoholischer Kalilauge

vorgenommen wird. Die Titration erfolgt nach Zerkümmerung der Ampulle in einem Kantkolben.

3. Das Menthol wird durch Acetylierung mit Essigsäureanhydrid-Pyridin (1:3) ebenfalls unter Verwendung einer 1 ml-Ampulle und anschließender Titration des unverbrauchten Essigsäureanhydrids bestimmt.

4. Es wird ein Wasserbad (16 × 34 cm) beschrieben, das gestattet, 100 Verseifungen bzw. Veresterungen in 1 ml-Ampullen gleichzeitig durchzuführen.

5. Die Menthon-Bestimmung erfolgt nach der Hydroxylaminchlorid-Methode mit Öleinwaagen von etwa 80 mg und Titration mit 0,1 n alkoholischer Kalilauge nach 16 Stunden.

6. Abschließend wird an einem Gemisch von Menthylacetat, Menthol und Menthon die Genauigkeit der beschriebenen Methoden demonstriert.

### Literatur.

1. BAUER, K. H.: Über die Abhängigkeit der Zusammensetzung des Pfefferminzöles von der vegetativen Entwicklung und von der Sorte. Pharm. Zentralhalle **80**, 353—356 (1939). — 2. BAUER, K. H., S. LIMBACH, und G. KÄPPLER: Zur Bewertung einheimischer Arzneipflanzen. 1. Fol. *Menthae piperitae*. Pharm. Zentralhalle **76**, 501 bis 504 (1935). — 3. BAUER, K. H. u. L.-R. POHLUDEK: Vergleichende Studie über die Bestimmung des ätherischen Öls in Heil- und Gewürzpflanzen. Pharm. Ind. **9**, 181—188 (1942). — 4. BENNETT, C. T., u. M. S. SALAMON: Analyst **52**, 693 (1927). — 5. DINCKLER, K.: Über die biologische Wirkung verschiedener Reinstoffe im ätherischen Öl von *Mentha*arten. Pharm. Zentralhalle **77**, 281—290 (1936). — 6. GILDEMEISTER, E., u. F. HOFFMANN: Die ätherischen Öle. 3. Aufl. Bd. 3, S. 786—867. Miltitz bei Leipzig 1928. — 7. GORBACH, G.: Über die Mikromethoden zur Fettanalyse. Mikrochemie **31**, 302—323 (1944). — 8. HEEGER, ERICH F.: Die Pfefferminze, eine monographische Darstellung unter Berücksichtigung neuer Erkenntnisse auf dem Gebiete des Anbaues, der Drogengewinnung und der Sortenfrage. Diss. Leipzig 1950. — 9. KLAGES, F.: Bildung und Spaltung von Organo-Oxyden. Im Hdb. d. Katalyse VII. 2, 321 u. 342. Wien 1943. — 10. KUHN, RICHARD, u. HUBERT ROTH: Mikro-Bestimmung von Acetyl-, Benzoyl- und C-Methylgruppen. Ber. dtsch. chem. Ges. **66**, 1274—1278 (1933). — 11. LEMAN, A.: Über die Hydrolyse von Essigsäureanhydrid. 3. Mitt. Hydrolyse bei 14° in Gegenwart von Pyridin. Bull. Soc. chim. France, Mém. (5) **18**, 178—183 (1951); Ref. Chem. Zbl. **123**, 3467 (1952). — 12. MORITZ, O.: Über die Bestimmung des Gehaltes an ätherischem Öl bei Drogen. Arch. Pharm. **276**, 368—388 (1938). — 13. PERRET, J. J.: Über die Bestimmung von Aldehyden und Ketonen durch Oximierung. Helv. chim. Acta **34**, 1531—1543 (1951); Ref. Chem. Zbl. **123**, 3382 (1951). — 14. The Pharmacopeia of the United States of America XIV (1950). — 15. POWER und KLEBER: Arch. Pharm. **232**, 655 (1894). — 16. SCHMIDT, HARRY: Zur Kenntnis des Pfefferminzöls. Vorkommen von Jasmon im ätherischen Öl von *Mentha piperita* L. Ber. dtsch. chem. Ges. **80**, 538—554 (1947). — 17. SCHMIDT, HARRY: Pfefferminzöl und Menthol. Vortrag. Ref. in Pharm. Zentralhalle **88**, 264—266 (1949). — 18. SCHOLTENS C.: Perfum. essent. Oil Rec. **38**, 235 (1947); (zit.) K. H. BAUER: Die organ. Analyse, S. 212, 2. Aufl. Leipzig 1950. — 19. SPRINGER, RUDOLF: Pfefferminze und Pfefferminzöl und die Abhängigkeit der darin erzeugten Inhaltsstoffe von Wachstum und Erntebedingungen. Bot. Arch. **39**, 102 bis 146 (1937). — 20. ULLRICH, H., u. M. SCHNEIDER: Zur Mikrobestimmung des Menthol, Menthon und Estermenthol sowie des ätherischen Öles von *Mentha*. Z. physiol. Chem. **245**, 181—184 (1937). — 21. VERLEY, A., u. F. BÖLSING: Ber. dtsch. chem. Ges. **34**, 3354 (1902). — 22. WILSON, CH. O.: J. America. pharm. Assoc. Sci. Edit. **31**, 85 (1942). — 23. WOITHE, B.: Züchtungsversuche mit Pfefferminze der Sorten Mitcham und Thüringer Art. Diss. Leipzig 1938. — 24. WURZSCHMITT, BERNHARD: In Chemisch-technische Untersuchungsmethoden. 8. Aufl., III. Erg.-Bd., S. 617. Berlin 1940.