

薄荷属植物精油成分の微量定量に関する研究*

清水 純 夫**

(信州大学農学部農産化学研究室)

- 1 p-Dimethylaminobenzaldehyde による Menthol の微量定量
- 2 薄荷油ケトン成分の紫外外部吸収スペクトルによる定量
- 3 薄荷油ケトン成分の Betainylhydrazoneによるペーパークロマトグラフィー
- 4 ポーラログラフ法による Menthone の定量
- 5 ポーラログラフ法による薄荷油中の Piperitone の定量

戦前に於ては世界市場を制覇した我国の薄荷栽培も、現在はブラジル、中国等の新興産地の発展及び合成薄荷工業の進出を受けて、その栽培面積は約2648町歩(昭和25年度)全盛期の一割に近い状態である。然し腦分の高率を特徴とする日本薄荷はにわか¹⁾にその真価を失つたわけではなく、品質良好のものを経済的に多収出来るならば、その将来は当分は必ずしも悲観するにあたら²⁾ないと考える。銹病に強く多肥にたえて栽培の容易なる優良新品種の育成に成功するならば、合成薄荷にその優位を譲る日が近いということ³⁾はなからう。即ち合成薄荷は合成原料の量産、光学異性体の分離、不快副成分の除去という可成り困難な問題を解決しなくてはならないからである。

著者は薄荷精油成分の植物体内に於る生成機構を究明しようと試み、この研究を進めるためには、精油主要成分の微量定量法を決定するの必要に迫られ、第一に総メントールの微量定量次いで、ケトン成分の微量定量化を、Paperchromatography、紫外線吸収スペクトル、Polarography 等により試みた。

これらの定量法は単に植物生理化学的方法としてのみでなく、前述の優良品種育成のために不可欠の事項と考えられる。即ち Menthol の含量の高かるべきことは言うまでもないが、日本薄荷の缺点とされる苦味、異臭の原因の一つとして不飽和ケトン類が挙げられているのであつて、薄荷油の品質は不飽和ケトン類の含量によつて著しく左右されるからである。

本研究の一部は昭和27年3月より昭和28年4月まで文部省内地研究員として京都大学農芸化学教室派遣中に行つたもので、御指導を給りました武居三吉教授、三井哲夫教授、中島総助教授を始め同研究室の諸氏及び各種薄荷油試料を分譲下された長岡実業株式会社、岡山農試倉敷分場茶村技師 Pennyroyal oil を分譲下された農林省輸出品検査所波多野技官の方々に厚くお礼申し上げます。

* 本報告の一部は「ポーラログラフ法による精油の研究」一報、二報と題し、昭和28、29両年度の日本農芸化学会大会にて発表した。

** 信州大学助教授

1 p-Dimethylaminobenzaldehyde によるMentholの微量定量

Mentholは栽培薄荷の最も主要な成分であつて、精油中に於るその含量の多少は品質決定上欠くことの出来ない事項であるから、既に多くの定量法が報告されている^{3) 4)}。これらのうち公定法としては醋化法に基礎をおく macro の方法である。著者は植物体に於る精油成分の生化学的研究を行うため、精油 1~0.1mg 程度の微量の Menthol を定量するの必要に迫られた。

最近京大の三井氏⁵⁾は pyridine と無水醋酸を醋化剤としてアンプル反応で行う遊離Mentholの微量定量法を發表された。一方醋化法によらず p-Dimethylaminobenzaldehyde による比色定量法が正宗氏により報告された⁶⁾。同氏は之の法を動物血液⁷⁾中に於るMentholの定量に応用し、その後三宅・石塚両氏は薄荷油の定量に用いたが、両氏は比色法そのものについては何も述べておられない。

正宗氏の原報は phenol red の pH 7.93 の buffer-solution を標準液としている。著者が行つた結果では光線により呈色に変化し Dobosque 法による正宗氏の法は、実施上繁雑な点が少ないので、この点を改良し迅速正確な定量を行うために Beckman D. U. Quartz Spectrophotometer を用いて p-Dimethylaminobenzaldehyde (以下 p-D. A. B. と略称) の H_2SO_4 溶液と Menthol のメタノール溶液とを加熱する場合に生成する赤紅色の極大吸収波長を求め、この波長のもとに於て、各種の呈色条件の影響を検討した結果、薄荷属精油中の微量Menthol定量に適用し得ると考えられたのでその詳細を報告する。

1) p-D. A. B. - H_2SO_4 溶液と Menthol との反応によつて生ずる呈色のスペクトル

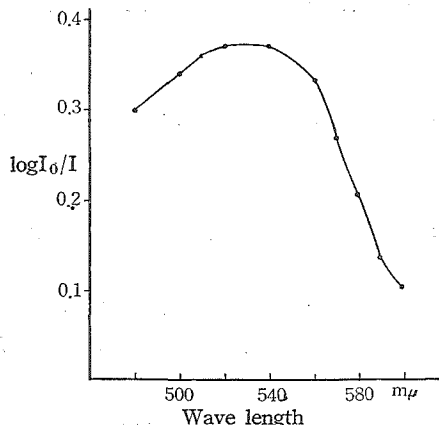


Fig. 1 Absorption curve of Menthol
Menthol 567/1ml MeOH + p-D. A. B. 5 ml

Menthol 567を含むメタノール溶液 1 ml に p-D. A. B. を 0.5% 含む H_2SO_4 溶液 (H_2SO_4 濃度 conc H_2SO_4 1.5部 + H_2O 1部) 5 ml を加え正確に 3 分間、煮沸水中に加熱した後流水で急冷して得られる赤紅色の溶液につき Beckman spectrophotometer で Menthol を含まぬメタノール溶液について行つたものを control として波長別に吸光度を測定したスペクトルは Fig. 1 の如くであり、極大吸収は sharp でなく、510~540 mμ の間では、吸光度はほぼ同一であつた。以下の実験は 540 mμ に於る吸収を測定することとした。

2) 反応加熱時間の影響

p-D. A. B. - H_2SO_4 溶液と Menthol との反応のための加熱時間は正宗氏は 2 分と限定しているが、この点を筆者が検討した結果は、Fig. 2 の如くであつた。この結果によると、2 分では呈色不十分であり、3~4 分では constant であり 5 分では若干濁濁を生じて来る。従つて加熱時間は 3 分と決定した。

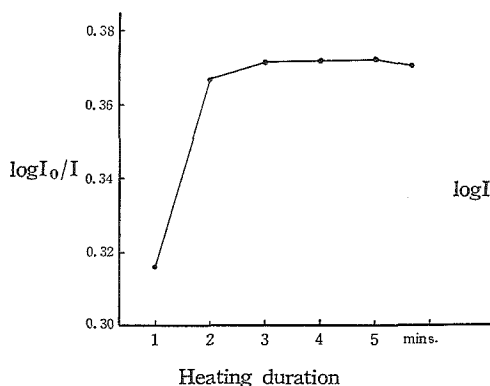


Fig. 2 Effect of heating duration on optical density

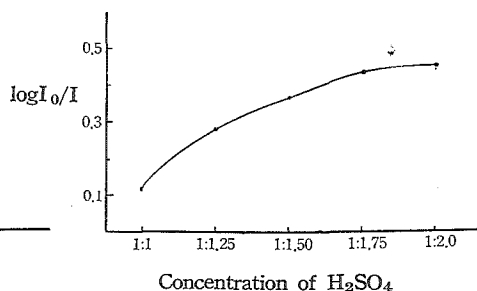


Fig. 3 Effect of concentration of H₂SO₄ on optical density

3) 硫酸濃度の影響

p-D. A. B. の溶剤となる硫酸の濃度が呈色に関係すると考えられるがその影響を試みた結果はFig. 3の如くであつた。この結果によるとH₂SO₄濃度が上昇すればする程呈色は強くなる。正宗氏は1:1.6の比を採用しているが、Fig. 3の結果からみれば、この比は必ずしも限定されるものでない。1:1.5より1:2.0の間に於てはどれにても差支えないことは、vの項に示すごとくである。著者は、試薬作成の便宜上1:1.5の比を採用して以後の実験に用いた。

4) p-Dimethylaminobenzaldehyde 試薬の濃度

p-D. A. B. のH₂SO₄溶液中に於る濃度が呈色に対し如何なる影響を与えるかを求めた結果は、Fig. 4の如くであつた。この結果によると試薬の量が吸光度に及ぼす影響はH₂SO₄濃度の変化する場合に比して遙かに小さく、200mlの硫酸溶液中に於て0.5g以下では少しく値が低いながら0.8~2.0gの間には著しい差を認めない。従つて200ml(1:1.5)のH₂SO₄溶液に対し1.0gが適當である。この点は正宗氏の結果と一致している。

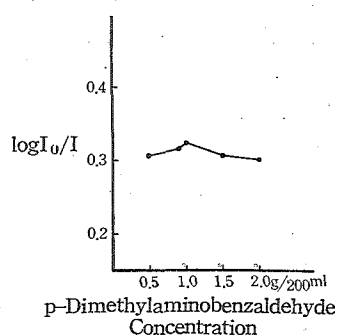


Fig. 4 Effect of reagent concentration on optical density

5) 呈色の時間的变化

比色法による定量が正確に行われるためには、反応液の呈色が安定であることが不欠缺の事項である。本定量操作に於て、直射光を避けて冷却した溶液を一定時間毎に吸光度を測定した結果は、Fig. 5の如き結果を得た。この結果によると硫酸の濃度に対しては吸光度が異つても、時間的経過に対しては殆んど変化なく呈色は直線光を避けて測定を行えば安定であるが、Fig. 5の[E]の様太陽光線に10分直射すると著しく吸光度を減ずる。従つて定量にあつては反応後冷却以後の操作に於ては直射光線を避けて測定することが肝要であることを知つた。

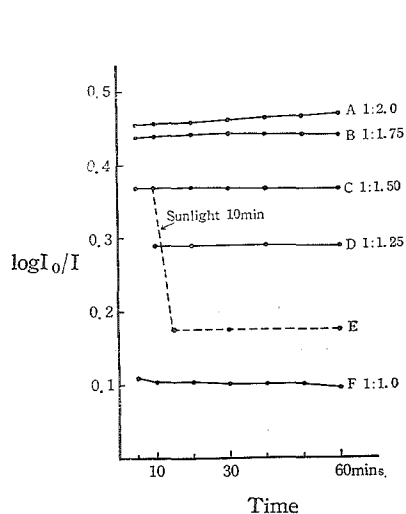


Fig. 5 Decomposition curves
Menthol 56 γ /1ml+Reagent 5ml,
(540 $m\mu$)

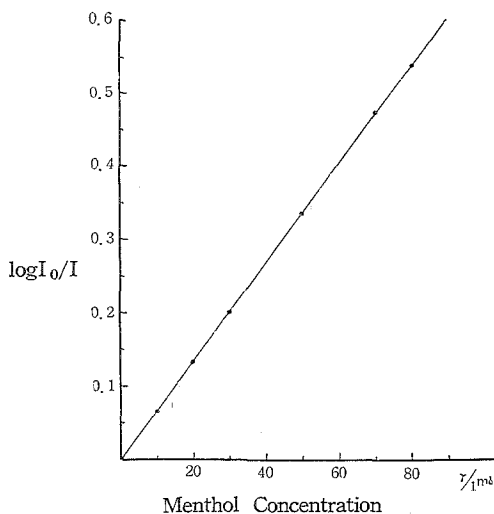


Fig. 6 Calibration curve of Menthol
by p-dimethylaminobenzaldehyde
(540 $m\mu$)

6) Menthol の Calibration-curve

Menthol 5 γ ~150 γ を含むメタノール溶液 1ml に p-D. A. B. 試薬 (本試薬は 1 : 1.5 H₂SO₄ 200ml に p-D. A. B. 1.00g を冷時溶解させて作成) 5ml を, 20ml 入りの大型試験管中にて加え, 硫酸紙コルク栓を附して 3 分煮沸水中で加熱し, 直ちに冷流水で急冷して 1 cm の厚さの Cell にて 540 $m\mu$ の波長に於て吸光度を測定する。(冷却以後の操作は可及的に光を避ける様注意する。) Menthol の各種の秤量値に対する吸光度をプロットすれば Fig 6 の如き原点を通る直線が得られる。従つてメタノール中に於る, 純 Menthol の微量を定量することが可能であることを知つた。

7) Menthol 以外のアルコール類の p-D. A. B. 反応

p-D. A. B. を用いる Menthol の微量定量法を天然物の分析に応用するには, 本試薬が各種のアルコール類に如何に反応するかを明らかにしなくてはならない。即ち本法の適用出来る限界は Menthol とともに共存する物質や如何なる種類の化合物が本反応を呈するかを知り, 試料中にこの様な物質が共存しない範囲に於て, p-D. A. B. の呈色による吸光度は Menthol に正比例すると考えられるからである。天然物中に Menthol と類似の呈色を示す物質が存在する場合には, 別の方法で補正するのなければ本法による分析は困難と考える。p-D. A. B. 反応を試みた物質を分類すると次表の如くである。

Table 1 Classification by p-Dimethylaminobenzaldehyde reaction

反応 ⊕ の 化 合 物 群	$ \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH} \\ / \quad \backslash \\ \text{H}_2\text{C} \quad \text{CH}_2 \\ \quad \\ \text{H}_2\text{C} \quad \text{CHOH} \\ \\ \text{CH} \\ \\ \text{CH} \\ / \quad \backslash \\ \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3 \\ \text{Menthol} \end{array} $	$ \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH} \\ / \quad \backslash \\ \text{H}_2\text{C} \quad \text{CH}_2 \\ \quad \\ \text{H}_2\text{C} \quad \text{CHO} \cdot \text{CO} \cdot \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH} \\ \\ \text{CH} \\ / \quad \backslash \\ \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3 \\ \text{Menthylacetate} \end{array} $	$ \begin{array}{c} \text{CH}_2 \\ / \quad \backslash \\ \text{H}_2\text{C} \quad \text{CH}_2 \\ \quad \\ \text{H}_2\text{C} \quad \text{CHOH} \\ \\ \text{CH}_2 \end{array} $	$ \begin{array}{c} \text{CH} \\ / \quad \backslash \\ \text{HC} \quad \text{C-OH} \\ \quad \\ \text{HC} \quad \text{CH} \\ \quad \\ \text{CH} \quad \text{CH} \end{array} $	
	$ \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{H}_2\text{C}-\text{C}-\text{CHOH} \\ \quad \\ \text{H}_3\text{C}-\text{C}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{H}_2\text{C}-\text{C}-\text{CH}_2 \\ \\ \text{H} \\ \text{Borneol} \end{array} $	$ \text{CH}_3 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}=\text{CH} \cdot \text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH} $			
反応 ⊖ の 化 合 物 群	$ \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH} \\ / \quad \backslash \\ \text{H}_2\text{C} \quad \text{CH}_2 \\ \quad \\ \text{H}_2\text{C} \quad \text{CO} \\ \\ \text{CH} \\ \\ \text{CH} \\ / \quad \backslash \\ \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3 \\ \text{Menthone} \end{array} $	$ \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{C} \\ / \quad \backslash \\ \text{HC} \quad \text{CO} \\ \quad \\ \text{H}_2\text{C} \quad \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH} \\ \\ \text{C} \\ / \quad \backslash \\ \text{CH}_2 \quad \text{CH}_3 \\ \text{Carvone} \end{array} $	$ \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{C} \\ / \quad \backslash \\ \text{H}_2\text{C} \quad \text{CH} \\ \quad \\ \text{H}_2\text{C} \quad \text{CO} \\ \\ \text{CH} \\ \\ \text{CH} \\ / \quad \backslash \\ \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3 \\ \text{Piperitone} \end{array} $	$ \text{CH}_3\text{OH} \quad \text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} \quad \text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{OH} $	
				$ \text{Methanol} \quad \text{Ethanol} \quad \text{Butanol} $	

第1表の結果のみからして直ちに一般的に速断することは危険であるが p-D. A. B. 反応が⊕を示すものは、環状アルコール類であり、環のないアルコールとしてはβ・γ-hexenol は、不飽和のアルコール類であつた。一方ケトン類は、環状不飽和ケトンでも negative であり、飽和の直鎖アルコール類は勿論⊖であつた。これらのスペクトルを示すと Fig. 7 の如くである。

この結果によると Menthyl acetate の λ_{max} は Menthol の 520~540mμ に対し、少しく長波側にあり530~550mμにあり、Cyclohexanol, Phenol は 510mμ附近に極大があり短波側にずれている。Borneol の λ_{max} は 505~510mμ であり Menthol より短波側にある。呈色の強度は Menthol が最も強く、他のアルコール類とともにその測定曲線を Fig 8 に示した。

以上により薄荷油中の主要成分の Menthol, Menthyl acetate 以外に存在するMenthone Piperitone 等がp-D. A. B. 反応に⊖であるので、本法による定量結果に対し他の共存物の影響は著しく障害になるとは考えられない。

このうち Menthylacetate の測定曲線は純 Menthol より強度が弱くなつている。これは Esterがメタノール硫酸中で加水分解して Menthol を遊離し之のものが p-Dime-

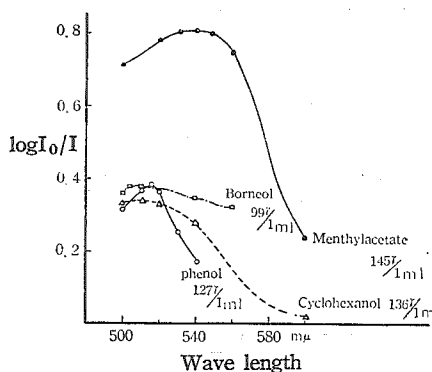


Fig. 7 Absorption curves of various alcohols with p-D. A. B.

酸により Ester 化され得る全アルコール類の定量であるが、薄荷油の場合アルコール類

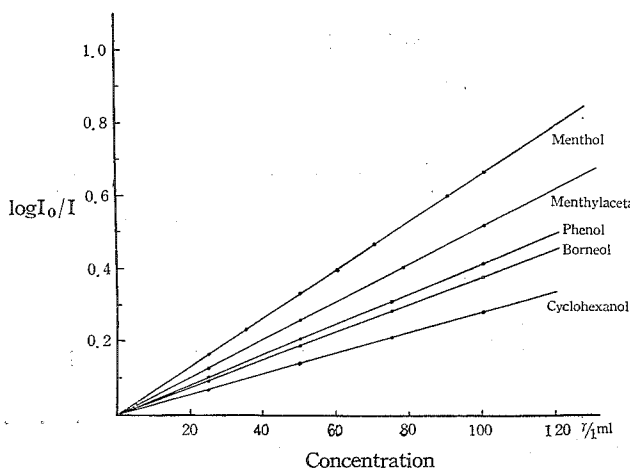


Fig. 8 Optical density vs. concentration of various alcohols.

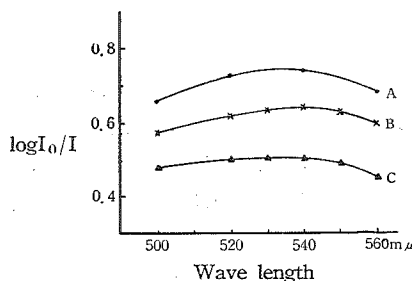


Fig. 9 Absorption curves of peppermint oil by p-D. A. B. method

A Nishimino wa conc. 1167/ml
B Ōta 1147/ml
Chiyo 857/m

thylaminobenzaldehyde と反応し呈色すると考えられ、理論的には Menthol/Menthyl acetate = $156/198 = 0.787$ となるべきである。実験の結果は Ester の加水分解率は 95~97% であつた。従つて、Menthol とともに Menthyl ester が混合している場合は、両者の合計、即ち総メントールの数値が得られることになる。

8) p-D. A. B. 法による薄荷油中の Menthol の微量定量

従来の醋化法による薄荷油中の定量は Menthol のみを特異的に定量し得るものでなく、醋酸により Ester 化され得る全アルコール類の殆んどすべてが Menthol 及び Menthyl ester であるから近似的に定量可能である。前項に於て、p-D. A. B. 反応は Menthol のみに特異的でなく、環状アルコール或は不飽和アルコールも呈色するのであることを知つたが、之等の化合物は従来の文献によると薄荷油中に於ては極めて僅少であるので本法による定量値を醋化法による値と比較する

ために行つた結果は、Table 2 の如くであり、Fig. 9 は脱脳油の p-D. A. B. 呈色の吸収スペクトルである。

Table 2 Total Menthol Contents: Comparative results obtained on Dementholized oil.

Dementholized oil	Acetylation Method	p-D. A. B. Method
Red oil	49.31%	49.01%
White oil	50.20	49.95

この結果によれば p-D. A. B. 法による値が低く出ているので白油に純メントールを加えその回収実験を試みたところ Table 3 の如き結果を得た。

Table 3 Recovery test of Menthol added into dementholized oil

Menthol values in dementholized oil	Added Menthol	MeOH	Found Menthol	Calcd. Menthol	Recovery ratio
0.5ml (42.5r)	0ml	0.5ml	42.5r	— r	— %
"	0.25 (13.5r)	0.25	54.0	56.0	96.0
"	0.50 (27.0)	0	66.5	69.5	95.5
0.25 (21.25)	0.75 (40.5)	0	59.0	61.75	95.6
0	0.50 (27.0)	0.5	27.0	—	—

上述の回収実験の結果からp-D. A. B.法により得られる Total Menthol の値は測定値がやや低く表われることを知った。本法により各種の野生薄荷栽培薄荷より得られる精油を分析した結果は Table 4, Table 8 (p74) に示した。Table 8 は紫外部吸収法による不飽和ケトン含量を併記したものである。この結果によれば不飽和ケトン成分の多いものは Total Menthol が少く、不飽和ケトン類は p-D. A. B. 法による定量に著しい障害を与えないと考えられる。三井法による遊離メントール含量の多いものは Total Menthol が大となっている (p74参照)。

Table 4 Total Menthol contents of Essential oils obtained on various *Mentha* plants by p-D. A. B. Method^{*}

Name of Kind	Total Menthol	Unsaturated Ketone
1 American	57.94%	12.40%
2 English white	20.50	57.60
3 Red × China	11.96	16.90
4 Blue × China	13.76	—
5 <i>Mentha rotundifolia</i>	33.33	—
6 <i>Mentha canadensis</i>	15.59	—
7 Wild A	32.14	34.10
8 " B	10.07	68.60
9 " C	22.01	—
10 American white	29.27	61.56
11 White × Red	73.97	2.10
12 Red × Blue	76.06	1.52
13 <i>Mentha sylvestris</i>	23.70	42.00

実 験

1) Reagent

- p-Dimethylaminobenzaldehyde…武田化学製品m. p. 73のものを用いた。
- Methanol…市販メタノールを精溜して64°の部分を取りp-D. A. B. 反応に対しその呈色の透過率が水100に対し540m μ にて97以上のものを用いた。
- H₂SO₄…S. G. 1.84の市販最純品を水1部に対し容積比にて硫酸1.5の割に加えて稀釈したものを用い、p-D. A. B. 反応により前項と同様透過率97以上のもの200mlにp-Dimethylamino-

* これらの精油は、昭和27, 28 両年度信大農学部附属農場に於て通常の方法で栽培したものを三井の方法(5)で蒸溜したものである。

benzaldehyde 1.00gを溶解して試薬とした。

- 2) *l*-Menthol 市販結晶を石油エーテルより再結しm.p. 42.5°のものを標準とした。
- 3) *l*-Menthyl acetate *l*-Menthol と無水醋酸を無水醋酸ソーダの存在のもとに2時間反応、esterification を行い水洗後油分を15mmの減圧で108°に溜出する部分を再溜して試料とした。
- 4) *l*-Menthol の濃度と吸光度との関係

メタノール 1 ml中に次記の如く各種の濃度の純 Menthol を含むもの20ml 入試験管に 1 ml とり、之に試薬 5 mlを加え硫酸紙をカバーしたコルク栓をつけて煮沸水中で3分間加熱し、後流水で冷却する。Beckman spectrophotometer を用い Menthol を含まぬものを対照として、540m μ に於る吸光度を測定する。得られた結果は Table5 の如くであつた。この結果を図示すればFig. 6の様に原点を通る直状線の Calibration curve が得られる。

Table5 Relation between Menthol concentration and optical density

Menthol concentration (r/ml)	15	25	50	75	100	120
Optical density	0.10	0.16	0.33	0.50	0.66	0.80

摘 要

- 1) *p*-Dimethylaminobenzaldehyde による Menthol の定量に於て、その極大波長が 520~540m μ にあるのを確認し、この波長のもとでは methanol 1 ml 中に於るMenthol 含量が10 r ~120 r の範囲に於てはその Calibration curve は原点を通る直線であることを明らかにした。
- 2) 試薬の作成に於て硫酸濃度により著しく、吸光度に相異を来す故1:1.5の稀釈のものを用いることが出来るが新試薬作成のごとに測定曲線を検討する必要がある。一旦作った試薬は密栓褐色瓶に貯蔵すれば数ヶ月は安定である。硫酸中に於る *p*-Dimethylaminobenzaldehyde の量は変化しても吸光度に大きく影響しない。
- 3) 加熱時間は3分によるのが最も再現性ある値が得られ、流水冷却後は直射光線を避けて測定する。暗所では呈色は安定であつて1時間後に於ても変化は僅少であつた。
- 4) *p*-D. A. B. の呈色反応は*l*-Menthol のみに特異のものでなく他の環状アルコール類も類似の反応を呈するから、これらの環状アルコール類の混入した薄荷油のメントールの定量に於ては正しい値は得られないが、通常の薄荷油中に於ては、この様な影響は僅少であると考えられる。
- 5) 脱脳油に対する本法の分析結果はエステルメントールの加わつた総メントールに相当する値が得られ、醋化法による値と可成りよく一致する。特に醋化法に対し本法は、10 r までの微量の Menthol を迅速に定量することの出来るのが特徴である。

2 薄荷精油ケトン成分の紫外部吸収スペクトルによる定量

日本産薄荷油のケトン成分に関しては後崎⁸⁾長沢⁹⁾両氏の詳細な報告があり、その後田中氏は脱脳油のケトン成分について報告した。これらの研究の結果、脱脳油中には、Menthone の外に Piperitone が含有されていること、野生薄荷の多くは Menthone, Piperitone の外に、Pulegone⁸⁾を含み「チリメンハッカ」の類は著しく Carvone を多量に含むことが明らかにされた。Menthone は Menthol に次ぐ薄荷の主要成分でありその定量

法は従来 Semicarbazone 法, Oxime 法或は還元して Menthol となし後醋化法による等の報告が行われているが, 微量の Menthone の定量としては Oxime 滴定を用いても, 試料少くとも 0.5g を要する。¹⁰⁾ 一方 Piperitone, Pulegone, Carvone は Menthone に対して不飽和の環状ケトンであり油中に於けるこれらの成分含量の増加は, 栽培品種に対して繁殖力の強い野生種 (これは犬薄荷と称せられる) の混入及び交雑が疑われるのである。⁸⁾ 栽培品種と野生種との外部形態的な観察及び長沢博士による粘度法を用いる鑑別法等が報告されているが, 微量の油に対する化学分析法は報告が少く, 従来は中性又は酸性亜硫酸塩による抽出法が広く行われている。これら不飽和ケトン類の検出は, 今後の輸出薄荷油の品質検査に重視されるべきものと考えられ又野生種の摘除, 優良品種育成のために数本の植物から得られる微量の油につき迅速に行える方法であることが希望される。これが微量定量法としてポーラログラフ法と紫外部吸収による方法とが考えられるが, 前者による方法は次項に譲ることとしてここには紫外部吸収について行つた結果を述べる。

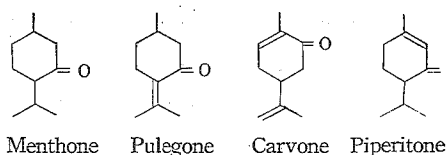
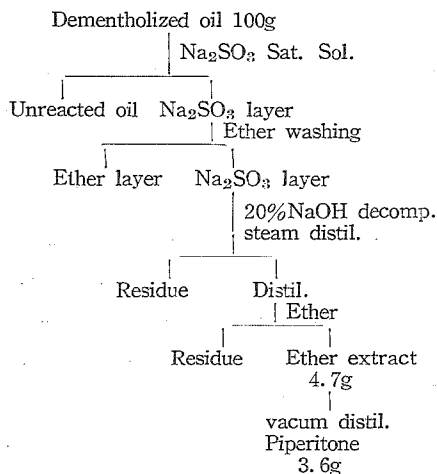


Table 6

Isolation of Piperitone



左図の如く Piperitone, Pulegone, Carvone は Menthone に対して α, β 不飽和ケトンに属し, $>CO$ 基と二重結合に基づく二つの紫外部吸収があることが推察される。この点^{13) 14)} に関しては Lowry 等の報告があり又 1936 年¹⁵⁾ Cooke and Macbeth はこれらの α, β 不飽和ケトン類につき総括して研究を發表した。Cooke 等の試料は, Carvone [α]_D¹⁸ + 54.6°, Piperitone は *F. dires* から得たものであるが, 著者は Carvone は *Mentha sylvestris* から H₂S 法で分離し [α]_D¹⁵ - 57°58' Piperitone は脱脳油から Na₂SO₃ 抽出により分離した試料につき methanol solvent で Beckman quartz spectrophotometer を用いて測定を行い更にこの結果を薄荷取卸油, 脱脳油に応用した結果について述べる。

1) 試料の分離

a) Piperitone

薄荷脱脳油 200g につき Table 6 の様に中性亜硫酸曹達で抽出される部分を 20% NaOH で分解し減圧蒸溜で精溜し, Semicarbazone 220~221 により精製した。

Oxime α 117~118, Read の述べる β は得られず α, β mixture 109~110° が得られた。

旋光度は $\pm 0^\circ$ で *dl*-piperitone と考えられる。

2,4-dinitrophenylhydrazone m. p. 118° であつた。

b) Pulegoneの分離

岡山県倉敷薄荷試験地昭和27年産の *Mentha Pulegium* の精油を Piperitone と同様に飽和中性亜硫酸ソーダ溶液で抽出分離して、1.0g の原油から $104\sim 105^\circ/15\text{mm}$ の溜分 0.5g を得た。 $[\alpha]_D^{15} + 22^\circ 19'$, semicarbazone はメタノールから再結して $167\sim 168^\circ$ 後崎氏は $168\sim 171^\circ$ Wallach は $167\sim 168^\circ$ と報告している。

2,4-dinitrophenylhydrazone 142° であつた。

c) Carvoneの分離

昭和27年信大農学部圃場に栽培した *Mentha sylvestris* の葉部を風乾水蒸気蒸溜して精油10grを得て之につき Piperitone と同様に Na_2SO_3 飽和溶液で抽出し不飽和ケトン部分を分離し8mmの減圧で $90\sim 93^\circ$ に溜出する部分から pyridine solvent で semicarbazone m. p. 142の物質を得て之を稀酸で分解水蒸気蒸溜によつて溜出する部分を減圧蒸溜すれば8mmで $90\sim 93^\circ$ にて殆んど溜出する。Gildemeister 法により精油1.0g のメタノール溶液につきアンモニヤ水の存在で硫化水素を通ずれば白色結晶の硫化水素化合物が得られメタノールから再結して m. p. 206° , クロロホルム溶液で $[\alpha]_D^{13} - 48^\circ 55'$, この硫化物1.0g を10%木精加里で分解して水蒸気蒸溜し、再び減圧蒸溜すると0.65g の Carvone が得られる。 $[\alpha]_D^{15} - 57^\circ 58'$ 醋酸曹達メタノール溶液で Semicarbazone に導けば 142° の柱状無色結晶で pyridine 溶媒のものと同一であり、従来の 162° という報告とは異なる⁴⁾。2,4-dinitrophenylhydrazone は m. p. 188° で Allen の結果と略同一であつた。

d) Menthone

l-Menthone は l-Menthol m. p. 42.5° の結晶をクロム酸酸化し8mmで減圧蒸溜し精製した。 $[\alpha]_D^{20} - 29^\circ 28'$ Semicarbazone 189° , Oxime 57° , 2,4-dinitrophenylhydrazone 145° の黄色結晶。

2) 薄荷ケトン類の紫外外部吸収

不飽和ケトン類は $10^{-4}\sim 10^{-5}\text{Mol}$, Menthone は 10^{-2}Mol 程度のメタノール溶液で紫外部に於る吸光度を測定した結果は, Fig. 10の如くであり, λ_{max} , ϵ_{max} を他の化学的性質と併記した結果は Table 7の如くであつた。この結果によると Piperitone と Carvone はともに同一の $\lambda_{\text{max}} = 235\text{m}\mu$ を有し, Pulegone は $253\text{m}\mu$, Menthone は $225, 287\text{m}\mu$ の二つの極大が認められた。 λ_{max} については Cooke 等の結果と一致しているが, ϵ_{max} は同一でなく, 著者の場合は Piperitone, Carvone はやや低く, Menthone, Pulegone は高い値を得ている。Cooke 等は, ethanol solvent であり, 著者は methanol solvent である外に, Cooke は *d*-carvone であるのに著者は *l*-carvone を試料としたことが原因と考えられる。又 Pulegone についても著者は二種の *Mentha Pulegium* の精油を用いたが Table 7の $253\text{m}\mu$ の外に $245\text{m}\mu$ のところに極大を有する油を得たが試料少量で精査出来な

かつた。Lowry も Pulegone につき両者の λ_{\max} を報告している。著者が入手した Pennyroyal oil から分離したものは d-pulegone で $\lambda_{\max}=253m\mu$ であつた。これは Pulegone-semicarbazone の分離に於て二重結合の転移した Isopulegone の生成のためとも考えられるが、今後の研究によつて確定したいと考える。

紫外外部吸収により薄荷油の不飽和ケトン類を定量するにあたり Piperitone, Carvone, Pulegone が共存する場合は、 λ_{\max} が同一及び近接していて分離定量は不可能である。

Table 7

	$[\alpha]_D^{15}$	Semicarbazone	2,4-dinitrophenylhydrazone	λ_{\max}	ϵ_{\max} (in methanol)
Piperitone	± 0	221°	118°	235	13300
Carvone	$-57^{\circ}58'$	142	188	235	10040
Pulegone	$+22^{\circ}19'$	168	142	253	7500
Menthone	$-29^{\circ}28'$	189	145	287	24.5

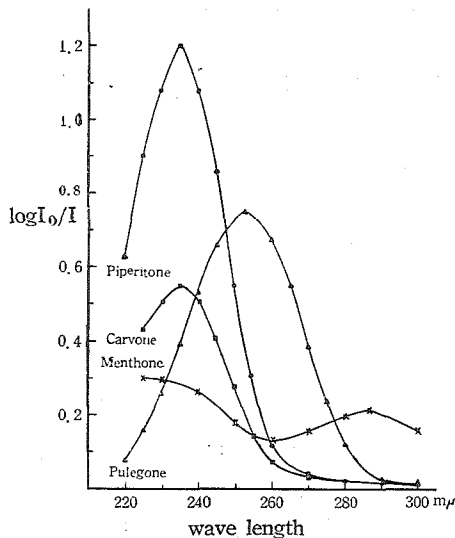


Fig. 10 Ultraviolet absorption curves of Ketones.

Concentration : piperitone, 11.1×10^{-5} Mol,
Carvone, 5.5×10^{-5} Mol,
Pulegone, 10.2×10^{-5} Mol,
Menthone, 8.5×10^{-5} Mol (methanol solution)

に紫外外部吸収を示す物質は不飽和ケトンのみがなく、その他の共存成分の影響を補正しなくてはならないのであるが、これらの物質で存在してもその油中に於る量が僅少であり Menthol, Menthone 等の含量が大であるものは ϵ_{\max} が Piperitone に比して極めて小さくその影響は少く、従つて $235m\mu$ に於る吸光度は大部分 Piperitone と見做し得る場合が多いと考えられ Fig. 11 の Calibration curve でその量を求めた結果は Table 8 に示す如くであつた。

Menthone は ϵ_{\max} が前三者に比して極めて小さいので、不飽和ケトンを含む薄荷油中に於て Menthone の含量は大であるけれども、紫外外部吸収によつてはその存在は認められない。メタノール溶液中に純 Piperitone 単独に含まれる場合は勿論、薄荷油中の主成分である Menthol, Menthone, Mentylester を加えた場合も、Piperitone の濃度にプロットした吸光度は、原点を通過する直線状の Calibration curve を与える (Fig. 11)。さて通常の薄荷取卸油脱脳油に於て macro の方法で分離証明されているのは不飽和ケトンとしては Piperitone のみであり野生種その他の不良品種が混入した場合には Pulegone, Carvone が共存すると考えられる。従つて通常の栽培品種の場合は不飽和ケトンとしては、大部分 Piperitone であろうと考えられる。

そこで各種の脱脳油、取卸油についてその紫外外部吸収スペクトルを示すと、多数の場合は $235m\mu$ に λ_{\max} を示す (Fig. 12)。薄荷油中

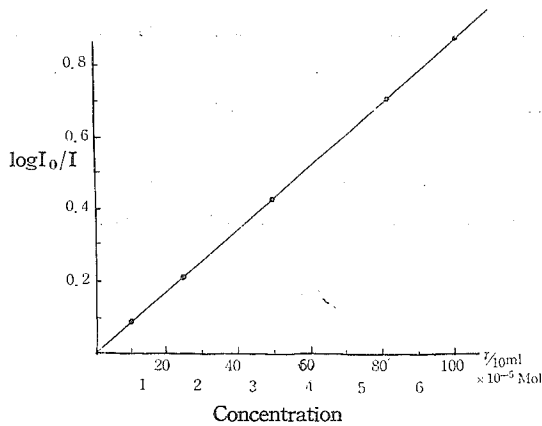


Fig. 11 Calibration curve of Piperitone at λ_{max} 235m μ in methanol solution

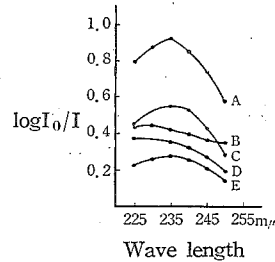


Fig. 12 Absorption curves of various peppermint oil (A) *Misuzu*, (B) *Nishiminowa* (C) *M. Sylv.*, (D) *English white*, (E) *American white*.

Table 8 Piperitone contents in various Peppermint oil by ultraviolet absorption method.

No.	Name of place Peppermint cultivated	Piperitone %	Total by p-D. A. B. method %	Menthol %	Free by Mitsui method %	Menthol %
1	<i>Ota</i>	1.57		83.5		71.0
2	<i>Chiyo</i>	1.15		88.1		66.5
3	<i>Muroga</i>	1.40		89.0		74.0
4	<i>Misuzu</i>	3.77		69.0		60.2
5	<i>Nakano</i>	2.43		81.5		61.7
6	<i>Ina</i>	0.40		87.3		71.8
7	<i>Tomigata</i>	0.74		89.3		65.7
8	<i>Nishiminowa</i>	1.24		84.5		55.7
9	<i>M. Sylv.</i>	42.0 *		23.7		—

Table 8 は、235m μ に於る吸収が大部分 piperitone であると考えた場合の実験値であるが、Fig. 12に示す様に 235m μ に極大を示さないスペクトルを有するものについては勿論正確に適用出来ないし、235m μ に極大を示していても *Mentha Sylvestris* の場合には、Piperitone の外に Carvone が含有されていることは 2,4-dinitrophenylhydrazone の生成及び次項に示す polarograph 法によつても知ることが出来るので、正確には紫外部吸収スペクトル以外に他の定性分析を必要とするのであるが、この様な場合は栽培種以外の野生種の混入によるものである。

従つて通常取卸油、脱脳油中に 235m μ 吸収物質が多いということは、野生種の混入していることを示すものであり、この事実を正確迅速に検出することは今後の薄荷油品質検定上、脳分、遊離メントール及びメントンの定量とともに重視されるべきものと考えられる。既述の Table 4 の結果の示す如く、総メントールの多いものは概して 235m μ 吸収物質は少く表われていることも亦このことを裏書きすると思われる。

実 験

1) Piperitone

Piperitone semicarbazone : Piperitone 0.1gをpyridine 3mlに溶解し之に0.1gの塩酸semicarbazideを少量の水にとかして加える。一夜放置し注意して水を加えれば208°の結晶を得る。エタノールから二回再結し224°に止つた。

Subst.	V (cc)	P (mm)	t°(C)	N
3.423	0.617	758.6	26.7	20.50%
1.268	0.229	754.3	25.0	20.49
Calcd. for C ₁₁ H ₁₉ ON ₃				20.09

Piperitone-2,4-dinitrophenylhydrazine 常法¹⁶⁾によりPiperitone 0.1gに2,4-dinitrophenylhydrazineのH₂SO₄エタノール溶液を加えれば直ちに反応し橙赤色の結晶を得る。メタノールから再結すればm. p. 118°

Piperitone Oxime…メタノール5ccにPiperitone 0.5gを溶解する。別に0.5gのKOHを0.25ccの水にとかし之を塩酸 hydroxylamine 0.5gを0.5ccの水に溶解した液に加え、之れに前記 Piperitone を加える。一夜放置し沈澱を濾別して水蒸気蒸溜を行うと溜液中に結晶を生ずる。二種の物質が得られメタノールから再結しm. p. 117~118の物質はα型と考えられる。別に109~110°のものが分離されたので之はReadのα, β両者の mixtureに相当すると思われる。α-OximeについてReadは118~119°, 篠崎長沢のOximeは107~108°と報告した。

Substance(mg)	V (cc)	P	t°C	N
4.994	0.369	754.0	25.5	8.37%
5.007	0.378	754.0	25.8	8.56
Calcd. for C ₁₀ H ₁₇ ON				8.39

Hydrogenation of Piperitone…Piperitone 0.3025gをabs. ethanol 20ccに溶解しPtO₂30mgを用いて水素添加を20°Cにて行えば30分にして49ccの水素を吸収し20°C, 762mmの理論量48ccと殆んど一致した。この水素添加によつて得られたoilをsemicarbazoneに導くとメタノール難溶部m. p. 210°, 易溶部からm. p. 165~170°の二物質を得た。微量のため精査しなかつたがReadの報告するdl-isomenthoneのsemicarbazoneに相当すると思われる。

2) Pulegone

Pulegone-semicarbazone. Pulegone 0.1gにつきPiperitoneの項で述べたと同様の方法で semicarbazoneを作成した。メタノールから三回再結してm. p. 165~168°の物質40mgを得た。

Subst	V (cc)	P (mm)	t(C)	N
2.511mg	0.450	775.0	25.3	20.41%
2.597	0.464	754.2	25.0	20.31
Calcd for C ₁₁ H ₁₉ ON ₃				20.09

Pulegone-2,4-dinitrophenylhydrazine Piperitoneと同様に処理し、赤色プリズム状結晶を得る。メタノールから再結しm. p. 142

3) Carvone

Carvone semicarbazone *Mentha Sylvestris*の精油からNa₂SO₃で抽出されるCarvone部分2gを用いPiperitoneと同様にpyridine solventによる場合もmethanol solventにて常法で行う場合も柱状又は針状無色のm. p. 142の結晶を得る。三回Methanolから再結するも融点は変らない。収量1.8g

Carvone-2,4-dinitrophenylhydrazine…Carvone部分0.2gにつきPiperitoneと同様に処理すれば直ちに反応して赤橙色の結晶を得る。醋酸エチルメタノール混合溶剤で再結しm. p. 188°の結晶を得る。収量0.25g

4) Piperitoneの濃度の変化と吸光度との関係

Piperitone を水に対し235m μ に於て75以上の透過率を有するメタノールで下記の量を含む様に稀釈したものにつき吸光度をプロットした結果は次表の如くであつた。

Table 9 Relation between Optical density at 235m μ and Concentration of Piperitone

Piperitone Conc. (r/10ml)	10	25	50	80	100
Optical density	0.083	0.225	0.437	0.700	0.876

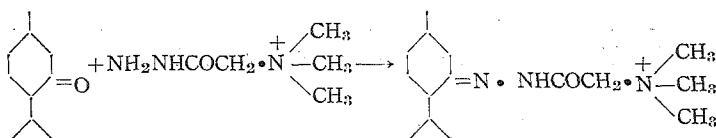
摘 要

- 1) 脱脳油から中性亜硫酸ソーダ飽和溶液で抽出精製したPiperitoneを用いてその紫外吸収を求め $\lambda_{\max}=235\text{m}\mu$, $\epsilon_{\max}=13300$ の結果を得た。235m μ に於てPiperitoneはよくLambert-Beerの法則に従い原点を通る直線状のCalibration curveが得られる(Fig11)。
- 2) 各種の脱脳油, 取卸油につきその紫外部吸収スペクトルを求めたところ大部分が235m μ に λ_{\max} を有し, 栽培種の場合はその殆んどがPiperitoneによると考えられ, その量を定量し, 脱脳油の一例につき6.9~7.3%の値を得, 取卸油については0.4~3.7%であることが判明した。
- 3) Carvoneも235m μ に λ_{\max} を有しPulegoneの $\lambda_{\max}253$ であり, 野生薄荷が混入する場合は, 235m μ の吸光度は大略の不飽和ケトン含量を示すがPulegoneの ϵ_{\max} がPiperitone, Carvoneに比して小さいのでこれらの分離定量は紫外部吸光測定のみでは困難であると考え。
- 4) Menthoneも225m μ と287m μ の二つの λ_{\max} を有するが ϵ_{\max} が極めて小さいので, Menthone, Mentholのみの混合物ならば定量出来るがPiperitoneその他の不飽和ケトンが共存するときはこれらの ϵ_{\max} が極めて大きいためその影響を強く受け紫外部吸収によるMenthoneの定量を不可能とする。
- 5) 従つて薄荷油紫外部吸光度は不飽和ケトン, 主としてPiperitoneの検出定量上, 極めて有効適切な方法であり, 今後の薄荷油の品質検定には是非とも行われねばならない重要な項目と考える。

3 薄荷油ケトン成分のBetainylhydrazone によるペーパークロマトグラフィ

各種薄荷精油のケトン成分についての微量定性を行う方法として, Paper chromatographyによる方法を試みた。前項に於て紫外部吸収の結果は各種のケトンを含む場合はその総和になるから, 別に定性分析を行うことが希望されるからである。

精油成分中のケトンは水に不溶であつてそのままではPaper chromatographyによる分離は困難であるのでGirard¹⁸⁾試薬と反応させると次式の如く反応してケトン類のBetainylhydrazone即ち水溶性の誘導体を得られることが既に報告されている。



Girard 試薬による Paper chromatography については Zaffaroni¹⁹⁾ の Ketosteroids に関する報告がある。

しかし、精油成分の Girard 試薬による分離の報告はあるが、Paper chromatography については未だ見あたらない。

分離に用いたケトンには前項に述べた Piperitone, Menthone, Pulegone の外に Cyclopentanone, Cyclohexanone 及び Acetone を比較対照として使用した。これらは市販品を精製して試料とした。Girard T 試薬は市販品がないので原報及び Organic Synthesis の方法に準じて Monochloroacetic ester, Trimethylamine, Hydrazinehydrate を用いて合成した。absolute ethanol で再結し分解点192°の物質を用いた。本品はやや冷エタノールには難溶でメタノールの方が溶解度が少しく良好であるので、ケトン類の Girard 化反応は無水メタノール中で行った。

1) Betainylhydrazone の調製

試料ケトン 10mg 前後を精秤し之に無水メタノール 5cc に溶解し之に Girard T 試薬 30mg を含む無水メタノール 1cc を加え湿気を避けて湯煎上で加熱反応させること 2 時間後、メタノールを溜去して、残溜分を Paper chromatography による試料とする。

2) Paper chromatography

前述の試料を原線 2×40cm の東洋濾紙 No. 2 の (末端から 6cm のところに定める) 上の中央の一点にキャピラリーを用い注意して滴下する。風乾後、水飽和ブタノール又は水の代りに緩衝液 (pH=7) を以て飽和したブタノールを用い上昇法で展開する。展開温度は 20°C とする。展開は 8~15 時間を要し 20cm 前後まで溶剤が上昇するに至り、之を取出し風乾し塩化白金沃度溶液中に上記を濾紙を浸漬し、直ちに流水中で水洗する。然るときは茶褐色のバックグラウンドは消失し、Girard 試薬及び Ketone の Betainylhydrazone のある部分のみが青紫色の spot を生ずる。

3) 薄荷ケトン類の Paper chromatograms

この結果によると、Menthone, Piperitone, Pulegone は Rf がきわめて近接しており数回の実験に於て Girard 化された betainylhydrazone は水性溶液では分解が起り、Chromatogram 上に tail し易いため、分離確認はかなり困難と考えられた。しかしながら Acetone Cyclopentanone, Cyclohexanone とは

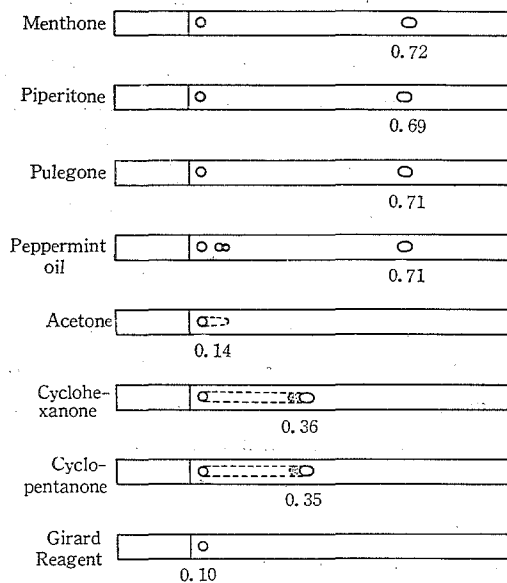


Fig. 13 Paper chromatograms of ketone betainylhydrazones

精油ケトン類は明らかに分離出来る。tail する現象は、水飽和ブタノールを用うる代りに pH=7 の buffer solution で飽和した butanol の方が少くなり、spot が明瞭に出る。原点の附近に Rf=0.1 に近い spot が出るが、之は、試薬のみの chromatogram にも見られるからして、試薬 Girard T の spot に相当すると考えられる。この点は Keto-steroids の場合について、Zaffaroni が指摘したる所である。しかしながら、テルペン系環状ケトンの betainylhydrazone は、Steroid の hydrazone に比して安定でないので、抽出による定量化は困難であるので、次項に於て Polarography による定量化を試みた。ketone betainylhydrazone の Polarography を行くと半波還元電位が比較的接近しているので低級ケトンが混入すると過大な値が得られるが、この様な低級ケトンを含むか否かはここに述べた paper chromatography により検定することが出来る。

実 験

1) Girard T 試薬の合成

Monochlor acetic ester 19.6g を absolute ethanol 40g に溶解しこの混合物を 0° に保ち、之に別に -10° に冷却した Trimethylamine 12g を加える。発熱し 10° にまで上昇するが内部を stirring しつつ外部を氷水で冷却すれば再び 0°C になる。15分程そのまま攪拌をつづけ後 30分間 50°C を越えない様に少しずつ温める。かくして加温するも温度が上昇しなくなるに至り、一夜放置する。之のものに翌日 xylene で精溜し濃度 95% の hydrazine hydrate 12g を攪拌下に滴加する。内温は上昇し半量の hydrazine hydrate が滴下する頃には多量の結晶が折出する。反応は 1時間つけ後 1時間水に冷却後急速に吸湿を避けて濾過し、無水エタノールで洗い、硫酸デシケーターで乾燥する。分解点 189° 収量 27g この収量は Organic Synthesis²⁰⁾ の収量より良好である。一回 absolute ethanol で再結すれば分解点 192° の無色結晶を得る。

2) Paper chromatography

Apparatus…ガラス摺合容器を用うる上昇式の装置によつた。

展開剤…水飽和ブタノールは通常の方法により作成し、pH7ブタノールは buffer solution としては Kolthoff 磷酸塩硼砂によるものを用いた。

呈色剤…沃化白金酸カリ液を用い次の様に自製した。5% の塩化白金を含む N-HCl5cc に 10% の KI の水溶液 45cc を加え之に更に水 100cc を加えて得られる濃褐茶色の液を用いた。

摘 要

- 1) Menthone, Pulegone, Piperitone, Cyclohexanone, Cyclopentanone, Acetone と Girard T 試薬を反応させこれらのケトンの Betainylhydrazone を作成し、水飽和ブタノール (水は pH=7.0 の buffer solution を用うると更に結果がよい) を展開剤として一次元の Paper-partition chromatography を試みた。
- 2) 呈色剤として沃化白金酸液を用いば、Ketone-betainylhydrazone 部分は青紫色の Spot となつて現れ Rf 0.1 のところに Girard T 試薬そのもののやや茶紫色の Spot を得る。
- 3) Rf は Menthone 0.72, Pulegone 0.71, Piperitone 0.68, Acetone 0.14, Cyclopentanone 0.36, Cyclohexanone 0.35 であつて、テルペン系環状ケトン中に存する低級ケトン類は分離するが、Menthone, Pulegone, Piperitone の三者は本法によつては Rf が近接していて適確に分離することは困難であつた。

- 4) 脱脳油について行つた結果は0.7附近に Spot があり之は Menthone に相当するが之の外に原点に近い0.15附近に2つ淡い Spot が認められる。低級のカーボニール化合物が存在するものと考えられるが、確認するに至らなかつた。

4 ポーラログラフ法による Menthone の定量

既述の如く Menthone は紫外部に二つの極大吸収を有するけれども薄荷油中に於ては, Piperitone, Carvone, Pulegone 等に比して ϵ_{\max} が極めて小さいので, 紫外部吸収による定量は困難であり又, Paper partition chromatography によつても分離定量には不充分であることを知つた。そこで Chromatography の項で述べた Menthone の betainylhydrazone につきポーラログラフ法を用いて定量する方法を試み, 更に之の方法を脱脳油に応用し, 良好な結果を得ることが出来たのでその詳細を以下に記述する。

Ketone 類を Girard T 試薬と反応せしめて betainyl-hydrazone に導き, Polarography を用いて行つた研究としては, 1940年 Wolfe, Hershberg, Fieser²¹⁾ による Ketosteroids に関するものと1949年 Prelog, Häfliger²²⁾ による大環状ケトン類に関するものがある。Wolfe 等は, Girard 化反応に醋酸を用い, 反応時間は10分であり, Prelog 等は醋酸を用いず2時間無水メタノール中で反応させている。Girard T 試薬を用いて Menthone の定量を Polarography により行うには, 反応速度が一定であることが不可欠である。

1) 氷醋酸を用いない中性反応に於る Menthone-betainylhydrazone の Polarography

Menthone 10mg を無水メタノール 5ml に溶解し之に 30mg の Girard T を加え CaCl₂ 管を附して2時間湯煎上にて reflux する。反応が終れば定量的に無水メタノールを以て 10ml に fill up する。之のものを 2 ml, n/5 Tetramethylammoniumbromide 1 ml Kolthoff buffer solution 7 ml の組成の電解液となして之に 0.5% zelatin solution 1 drop 加え直ちに水素気流15分通して

O₂除去し, 一定温度(25°C)に於て Polarography を行う。buffer solution の pH を変化せしめて得られる Polarograms は Fig. 14 の如くであつた。之を半波還元電位について表示すれば 13 表の如くである。定量の目的からは pH 7.0—8.0 の間が最も適当であることを知る。その理由は betainylhydrazone は一般に酸性では加水分解してもとの ketone を遊離し易く又アルカリ側では水に難溶となる。

然しながら同一 mol 濃度の Cyclohexanone, Cyclopentano-

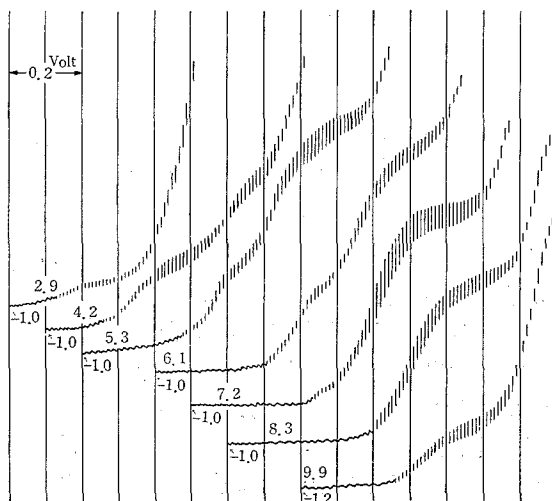


Fig. 14 Polarograms of Menthone betainylhydrazone reduced at different pH values.

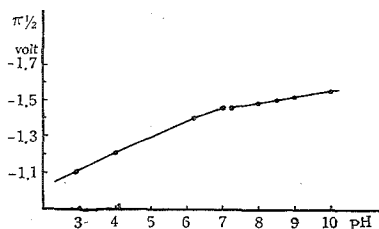


Fig. 15 Effect of pH on the Half Wave potential of Menthone betainyl hydrazone.

ne を対照とすると波高が極めて低く、Prelog 等の報告の如く、Menthone は反応が進行しないものと考えられた。そこで中性溶液で反応時間を増加し70時間にまで加熱したのであるがその間、波高は少しずつ上昇し全く Constant の状態に至らない。従つて Menthone は中性状態では Girard T との反応は極めて緩慢であると考えられ、この点前述の Steroids や Cyclo-alkane 類と異なるものであることが判明した。

この反応を促進する触媒として次に氷醋を添

加する酸性に於る Girard 化反応を試みた。

2) 氷醋酸性に於る Girard 化反応

Menthone, Girard-T を含む反応液 6 ml 中に 0.5 ml の純無水氷醋を加えて前回と同様に反応させ、反応時間の変化が波高に及ぼす影響を図示したのが Fig. 16 である。この結果によれば、中性反応の場合と異り 1 時間で既に Constant となり、3 時間以上加熱反応をつづけると波形がみだれて作図上波高が減少してくる。従つて、反応時間は氷醋添加の場合は 1.5 時間で充分であることを知った。

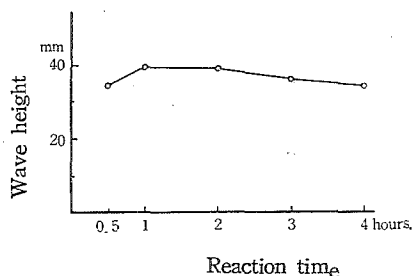


Fig. 16 Effect of Reaction duration on Wave heights (CH_3COOH 0.5ml)

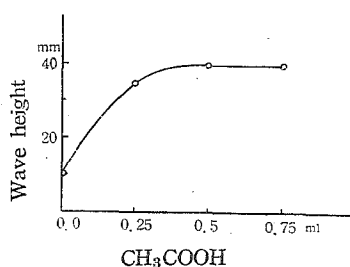


Fig. 17 Effect of glacial acetic acid on Wave heights of Menthone betainyl hydrazone. (Reaction duaration, 1.5 hours)

次に添加すべき氷醋の適量を知るべく反応を 1.5 時間として異なる量の氷醋を添加した場合の波高を求めた結果は Fig. 17 の如くであつた。この結果によれば 0.5 ml で充分であることを知った。(氷醋添加反応の場合には $n/2\text{NaOH}$ で中和せねばならないのであるから氷醋の量出来るかぎり少い方がよい。) 反応を NaOH で中和する場合に phenolphthalein を Indicator として注意して行つたが、其の後に於て 5.5 ml の buffer を加えるので、この間の中和点が微かに異なるものについて、波高を測定したが影響を認めなかつた。buffer の量が電解液の 50% 以上ない場合は波形が変化して作図が困難となる結果を得た。

3) Girard T 試薬の量

反応に際して Ketone の量が未知のために Girard-T の量が過剰に入ると、波形が著し

く変化して作図が困難となる。被検 ketone の量の 2~3 倍を用いるを適當とするという Prelog の結論は Menthone の場合にも認められた。即ち大過剰の試薬を試みた結果は Table10 の如くであつた。

Table 10 Relations between Overplus of Girard-reagent and Wave heights

GirardT	Wave height
20mg	43.5mm
30	44
50	42
100	35

} Menthone 11.5mg
T=25±1°
S=1/10

4) 電解液の安定度 (Menthone betainylhydrazone の分解速度)

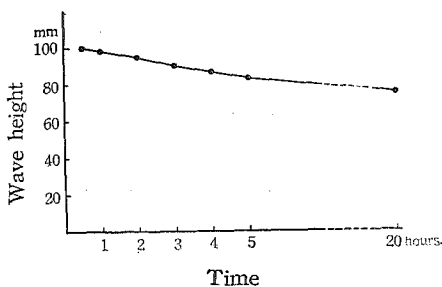


Fig. 18 Decomposition Velocity of Menthone-betainylhydrazone at 25±1°

Cyclohexanone betainyl hydrazone の場合は水溶液に於て可成り分解するのであるから、電解液調製後 1 時間以内に Polarograms を取らねばならないことが Prelog により明らかにされた。Menthone の場合に於て一定時間ごとに波高を測定した結果は Fig. 18 の如くであつた。この結果によると、Menthone の場合は分解速度は極めて緩慢で、1 時間以内に Polarograms を取る場合は誤差は僅少であることを知つた。

5) Menthone の betainylhydrazone による定量法と Calibration curve

Menthone の Polarography による定量法は以上の事実を基礎として次の二つの操作に分れる。

- | | | | |
|--------|----------------------------------|----------|---|
| (a) 反応 | Menthone-methanol solution | 1ml | } 1.5 時間湯煎上にて反応を行う。この際 CaCl ₂ 管を付して吸湿を避ける。反応が終つたら 10ml に absolute methanol で fill up する。 |
| | GirardT-methanol solution | 1ml | |
| | absolute methanol | 5ml | |
| | glacial acetic acid | 0.5ml | |
| (b) 電解 | Reaction-solution | 1.0ml | } この際 NaOH の中和は 2ml を越えない様に従つて buffer 5ml 以上となり電解液の 50~55% になる様にする。buffer が 5ml 以下となると、波形が変化し作図誤差が大となる。 |
| | Pure methanol | 1.0ml | |
| | n/2 NaOH | 1.5ml | |
| | n/5 Tetramethylammoniumbromide | 1.0ml | |
| | Buffer solution (pH7.0 Kolthoff) | 5.5ml | |
| | 0.25%Zelatin | 2-3drops | |

この二操作によつて得られた電解液を 25°C±1 の温度に於て水素気流を通ずること 15 分後に Polarograms を撮る。Menthone 含量の異なるものについて、その波高を測定すれば、原点を通過する直線状の calibration curve を得る。(Fig. 19)

6) 脱脳中の Menthone の Polarography による定量

脱脳中に於る Menthone 定量の目的で脱脳油そのままの control, 脱脳油の Girard 化反応を行つたもの、及び脱脳油に pure menthone を添加した場合の実験を試みた。v の項に述べた定量操作で電解液中に於る試料が 10mg 以下の場合には通常の脱脳油は殆んど

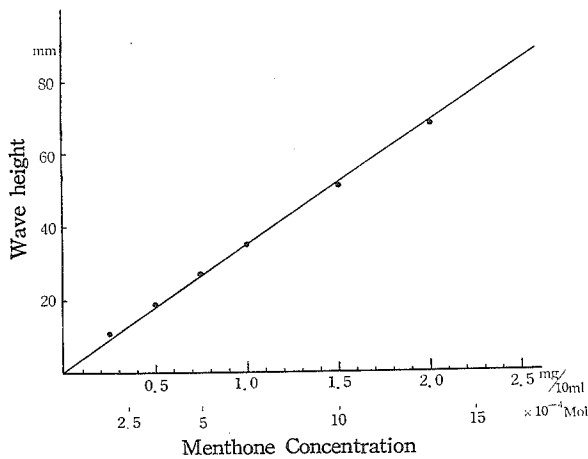


Fig. 19 Calibration Curve of Menthone ($S = \frac{1}{10}$)

波を生じない。波を生ずる場合はその精油中に不飽和ケトン類が多いのであつて、別に報告する方法による。脱脳油については試料 $10 \sim 30$ mgを精秤し、以下vの項の操作に準ずる。脱脳油のPolarogramsを撮る場合注意すべきことは、pure menthoneの場合と異り電解液にzelandinを加えてならない点である。即ちMenthoneのみの場合は極大波が現われるが脱脳油中には共存成分中に表面活性の物質が存在するため極大波が見られず之

にZelandinを加えると波形が変化し波高が減少する。又Polarogramsは電解液作成後1時間以内に撮る様にする。そのPolarogramsと波高によるMenthone含量をoxime titration^{**}によつた測定値とを併記して示すとTable11の如くである。

Table11 Menthone contents : Comparative results on various dementholized oil

Peppermint Sample	Menthone contents		Free Menthol contents
	by Polarography	by Oxime	
A	26.5%	26.0%	42.7%
B	23.4	22.4	47.3
C	28.6	26.7	36.4
D	15.3	13.7	57.9

脱脳油に pure menthone を添加した場合の回収率を示すと、Table11の如くであつた。又その場合のPolarogramsはFig.20に示す如くである。

Table12 Recovery test of Menthone to dementholized oil

Dementholized oil	Menthone added	Menthone resulted	Recovered Menthone	Recovery ratio
30mg	0mg	7mg	—mg	—
"	5	12.2	5.2	103.8%
"	10	17.2	10.2	102.0
"	15	21.5	14.5	96.5

Table11及びTable12の結果から判断すれば、Polarograph法によつて微量の脱脳油中のMenthone含量をかなり正確に定量出来ると考える。

* 次項 (ポーラログラフ法による薄荷油中のPiperitoneの定量) Fig.21参照

** この測定は長岡実業株式会社高野武之助氏が行われた結果を引用させていただいた。附記して同氏に謝意を表します。

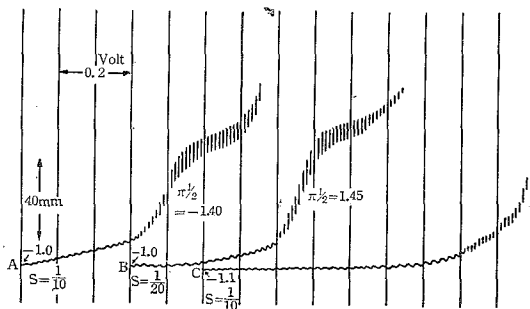


Fig. 20 Polarograms of Dementholized Oil

Reaction conditions {
 A = Dementholizedoil 30mg + GirardT 25mg
 B = { Dementholizedoil 30mg + Girard T40mg
 { Pure Menthone 10mg
 C = Control, namely dementholized oil not reacted with Girard T

実 験

1) Apparatus : ...島津製作所製 Heyrovsky-Shikata type を用いた。Galvanometer 感度 5.23×10^{-9} A/mm/m, -1.0volt に於る Capillary ; m=0.65mg/sec, t=5.8sec/drop 電解瓶は中島氏の報告²³⁾と同一のものを用いた。

2) pHが Menthone betainyl hydrazone の波高半波還元電位に及ぼす影響

Table13 Effect of pH on Halfwave potentials of Menthone betainylhydrazone

pH	$\pi^{1/2}$ (S. C. E)	W. H.	Reaction: Menthone 40mg+GirardT 80mg refluxed for 4hours in 10ml MeOH Electrolytic sol. 2ml of reaction solution 7ml of Buffersolution 1ml of n/5 T. M. A. Br. Buffer McIlvaine 2.9-5.3 Kolthoff 7.2-9.9 *Wave height for 1st wave
2.9	-1.11	4mm*	
4.2	-1.20	11*	
5.3	-1.35	15*	
6.1	-1.40	18	
7.2	-1.47	41	
8.3	-1.50	35	
9.9	-1.55	10	

3) 醋酸添加に於る反応時間の波高に及ぼす影響

Table14 Effect of Reaction duration on Wave heights

Reaction condition.			Reaction duration	Wave height
Menthone	GirardT	CH ₃ COOH		
11.5mg	30mg	0.5ml	0.5hour	34mm
"	"	"	1.0	40
"	"	"	2.0	40
"	"	"	3.0	37.5
"	"	"	4.0	35.5

} pH=7.0
T=25±1°

4) 醋酸添加量が波高に及ぼす影響

Table 15 Effect of Added glacial acetic acid on Wave heights

Added glacial acetic acid to 5ml MeOH Solution	Wave height	
0 ml	9.5mm	Reaction : Menthone 11.5mg+GirardT 30mg Reaction duration 1.5hours pH=7.0 T=25±1° S= $\frac{1}{10}$
0.25	35.0	
0.50	40.2	
0.75	40.0	

5) Menthone 濃度と波高との関係

Table 16 Wave heights of Menthonebetainylhydrazone at different concentration of Menthone ($S = \frac{1}{10}$)

Menthone concentration		Wave height mm
mg/1.0ml	$\times 10^{-4}$ Mol	
2.00	13.0	69.0
1.50	9.75	51.5
1.00	6.50	35.0
0.75	4.87	28.0
0.50	3.25	18.5
0.25	1.62	10.0

6) 脱脳油、白油中の Menthone の分析結果

Table 17 Menthone content of various dementholized oil by polarography

Name of Dementholized oil	Sample weight	Wave height	Menthone	Menthone
A	4.98mg	29mm	1.32mg	26.5%
B	5.13	25	1.20	23.4
C	4.48	28	1.28	28.6
D	4.18	23	0.64	15.3

摘 要

- Menthone を無水メタノール中で Girard T 試薬と反応して得られる Betainylhydrazone は pH7.0~8.0 に於て典型的なポーログラフ法を与えその半波還元電位は pH=7.2 に於て -1.47 volt (S.C.E) であつた。
- Menthone と Girard T との反応は中性では著しく緩慢であるが氷醋酸を 10% 添加すれば反応速度は 1.5 時間にて Constant となることを明らかにした。
- この条件で得られる Menthonebetainyl hydrazone は Cyclohexanone と比較し pH 7.0~8.0 では比較的安定であつた。
- 反応液 1 ml にメタノール 1 ml を加え、之を $n/2$ NaOH を用いて 2 ml 以下で中和し $n/5$ Tetramethyl ammonium bromide 1 ml buffer solution 5 ml を用いて 10 ml に fill up した液を還元して得られる Polarograms に於ては Menthone の濃度にプロットした波高はよく原点を通る直線状の Calibration curve となる。
- 本法を用いて脱脳中の Menthone を定量し、Oxime 法と近似した値を示し又、脱脳油中に添加した Menthone の検出率は良好であり、脱脳中の Menthone の微量定量に適することを明らかにした。

5 ポーラログラフ法による薄荷油中の Piperitone の定量

前項に於て薄荷油中の Menthone をポーラログラフ法により定量する場合、脱脳油のみで Girard T 試薬と反応させてない Control に還元性の物質がない場合には単純に適用し得るが、然らざる場合は Control の波を生ずる物質を精査することが必要である。Fig. 21 は栽培薄荷及びその他の薄荷の精油につき Girard 化を行うことなくして得られた Polarograms である。栽培種は一般に還元性物質が少ないので前項に於る Menthone の定量を行うにあたり著しい障害を認めない。本項に於ては之等還元物質のうち主として Piperitone の分離検出を目的とする実験結果を報告する。既述の如く紫外外部吸収スペクトルに於ては Piperitone, Carvone は同一の λ_{\max} 235m μ を有し Pulegone も λ_{\max} = 253 m μ を示し、分離定量は困難であるので之をポーラログラフ法により確認するには単離された各ケトンにつき半波還元電位を定めることが肝要と考えられる。1950年 B. Bitter は Pulegone, Carvone のポーラログラフ法による研究を發表したが Piperitone については、著者の知る限りでは、ポーラログラフ法による報告を見ない。

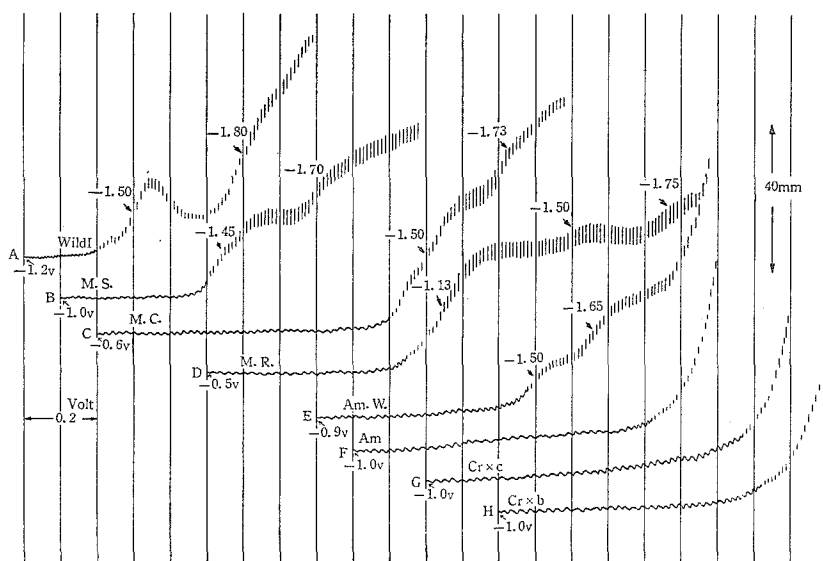


Fig. 21 Polarograms of Various Essential oils

A=Wild-1, B=*Mentha Sylvestris* C=*Mentha cadensis*

D=*Mentha rotundifolia*, E=American white

F=American peppermint G=Cross (red×China)

H=Cross (red×blue) ; S= $\frac{1}{10}$, T= $25 \pm 1^\circ$, pH=7.0

Supporting salt : 0.1N LiCl, MeOH 20% Sol.

1) pHの差による Piperitone の半波還元電位と波高

Piperitone の検定定量の基礎として、pHの差による $\pi_{1/2}$ と波高を測定した結果は Fig. 22, Table 17 の如きであった。

Table 18 Influence of pH on Half wave potentials of Piperitone

pH	Half wave Potential	$W \cdot H \left(s = \frac{1}{20} \right)$
1.9	-1.25 volt (S.C.E)	28mm
3.1	-1.30	37.5
4.2	-1.37	35
5.0	-1.45	29
6.2	{ -1.54 -1.78	— 29*
7.0	{ -1.55 -1.80	— 24*
8.1	{ -1.56 -1.80	— 21*
9.3	-1.72	20

* Wave height for 2nd wave.

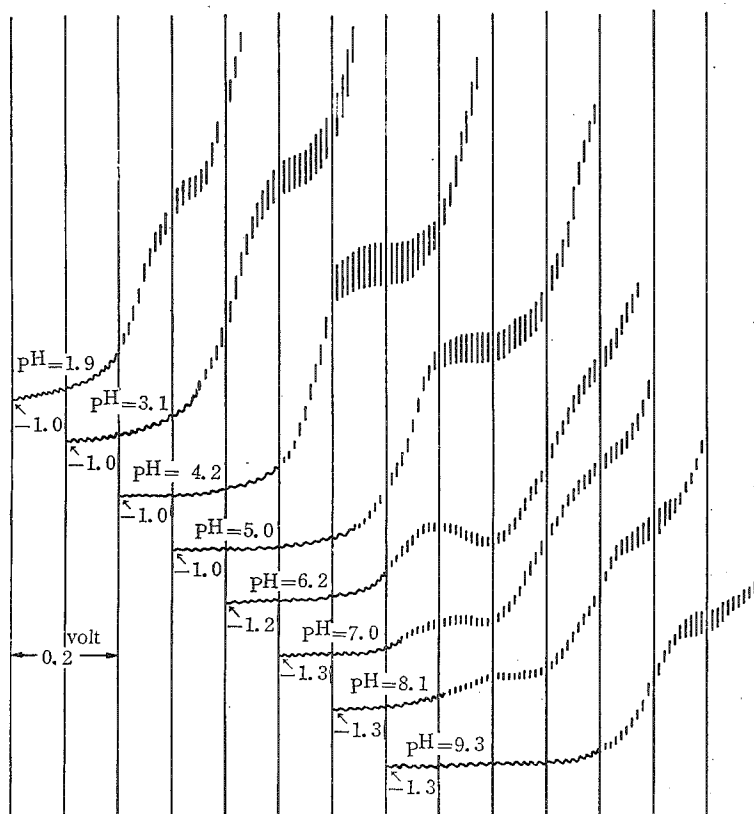


Fig. 22 Polarograms of Piperitone at different Hydrogen ion

2) 温度が波高に及ぼす影響

Fig. 22, Table 19 を種々検討した結果 pH=5 が最も Piperitone の定量に適當と考えこの場合に於る温度の影響による波高の变化を測定した結果は Fig. 23 の如くであつた。

3) ポーラログフ法による Piperitone の定量操作

脱脳油中の Menthone は含量多くしかも Girard 化合物は水溶性であるので電解液の作成に容易であるが脱脳中の Piperitone は微量であるので、電解液中の脱脳油の量を多くせねばならない。そうすると水性溶液では oil が析出するのでメタノールを 40%~50% にする必要がある。従つて、無関係塩である n/10 LiCl を用うるかほりに Tetramethylammoniumbromide を用うることとした。

即ち 10^{-3} ~ 10^{-4} M の Piperitone を含むメタノール 4 ml, pH=5.0 の Sørensen buffer solution 5 ml, n/5 Tetramethylammoniumbromide 1 ml の組成の電解液で得られる polarograms は Piperitone の濃度に対して波高を plot すると Fig. 25 図の如き原点通過の直線を得る。

pH=5.0 に於る Piperitone の波高は時間的経過に対して殆んど不変である。(Fig. 24) この点定量操作が容易である。

4) 白油, 脱脳油中のポーラログフ法による Piperitone の定量

pH=5.0 に於る Carvone, Pulegone と対比した polarogram は, Table 19 の様に異なる $\pi_{1/2}$ を示すが, Carvone と Pulegone とは近接していて分離困難である。Piperitone と Carvone Piperitone と Pulegone の場合は量の比によつては分離した波が得られる。白油中の polarograph 波が何によるかを Fig. 26 の様に対比してみると白油中の波は Piperitone であると考えられるのである。波高から calibration curve を用いて定量すれば Table 20 の如き結果を得る。この結果は既述の紫外部吸収スペクトルによる測定とよく一致しており、嘗て後崎長沢両氏及び

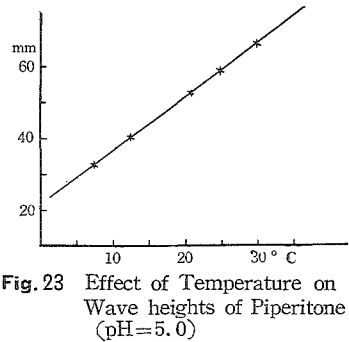


Fig. 23 Effect of Temperature on Wave heights of Piperitone (pH=5.0)

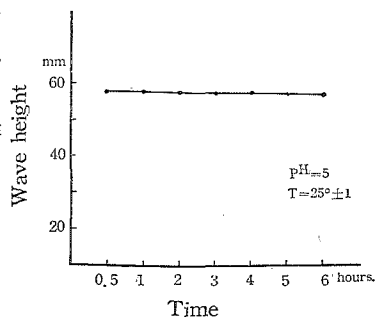


Fig. 24 Decomposition velocity of Piperitone

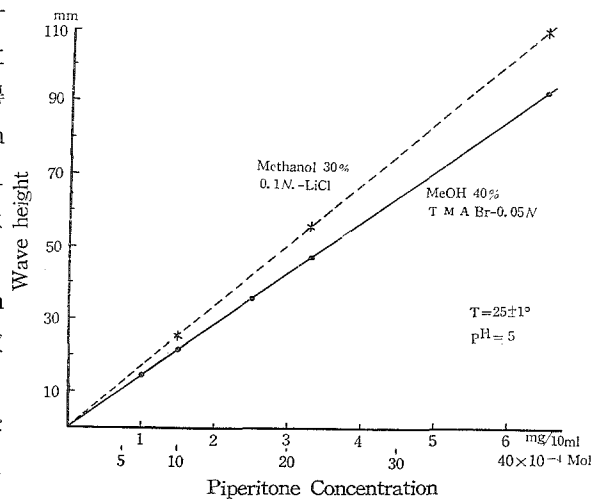


Fig. 25 Calibration curve of Piperitone

Table 19 Half wave potentials of Unsaturated Ketones in peppermint oil.

Ketone	LiCl	Tetramethylammoniumbromide	
Piperitone	-1.44volt(S.C.E)	-1.37 (S.C.E)	} pH=5.0 T=25±1° LiCl, MeOH 30% T.M.A.Br. " 40%
Carvone	-1.33	-1.25	
Pulegone	-1.35	-1.36	

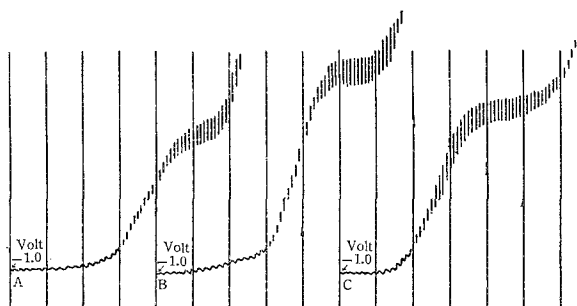


Fig. 26 Polarograms of

- A Dementholized oil $\pi_{1/2} = -1.35\text{Volt}$ (Conc. 65.50mg%)
 - B Piperitone $= -1.37$ (Conc. 6.55)
 - C Carvone $= -1.25$ (Conc. 3.80)
- $S = 1/20$, $T = 25 \pm 1^\circ$, $\text{pH} = 5.0$
Supporting Salt, T. M. A. Br. 10% ; MeOH 40%

Table 20 Piperitone contents : Comparative results obtained on various dementholized oils.

Dementholized oil	Piperitone contents	
	by Polarography	by Ultraviolet
A	7.8%	8.36%
B	8.1	8.89
C	7.5	7.90

田中氏の行つた macro の方法による値より大きい値となつている。紫外外部吸収法に比してポーラログラフ法による場合はその波形から定量のみでなく定性的考察が行える所に利点があると考えられる。

実 験

- 1) Apparatus : Galvanometer 感度 $5.23 \times 10^{-9} \text{A/mm/m}$
Capillary, $m = 1.57 \text{mg/sec}$, $t = 4.5 \text{sec/drop}$, $m^{2/3} t^{1/6} = 1.735$
- 2) 還元温度が Piperitone の波高に及ぼす影響

Table 21 Effect of Temperature on Wave heights of Piperitone

T (C)	10°	15	20	25	30	} Piperitone concentration 32.7mg% pH=5.0 (MeOH3ml, I_N LiCl 1ml, Buffer 6ml), $S = \frac{1}{10}$
$\pi_{1/2}$ (volt)	-1.41	-1.42	-1.43	-1.44	-1.45	
W.H. (mm)	34	40	55	58	66	

- 3) 電解液作成後の放置時間が Piperitone の波高に及ぼす影響

Table 22 Changes of Wave heights of Piperitone by Time

Time (hr)	1	3	5	20	Piperitone concentration, 32.7mg% T=25±1°, pH=5.0, S= $\frac{1}{10}$
W. H (mm)	58	58	58	55	

4) Piperitone の Calibration curve

Table 23 Wave heights of Piperitone at different concentrations

Piperitone Concentration		Wave height ($\text{pH}=5.0$, $T=25\pm 1$)	
mg/10ml	$\times 10^{-4}$ Mol	n/50 T. M. A. Br (MeOH 40%)	n/10 LiCl (MeOH 30%)
1.00	6.5	14mm	17mm
1.50	9.7	21	25
2.50	16.2	36	42
3.25	21.1	46	55
6.50	42.3	93	110

5) Polarography による脱脳油中 Piperitone 含量

Table 24 Piperitone contents in various dementholized oil by Polarographic method

Dementholized oil	Weight	Wave height	Piperitone	
A	23.6mg	26.6mm	1.86mg	7.8%
B	25.1	29.2	2.03	8.1
C	35.2	36.5	2.64	7.5

摘 要

- Piperitone は 30~40% メタノール溶液中で水銀滴下電極下に還元を行うと pH6~8 の間にては二段波を有する Polarograms を与える。pH3~5 の間に於ては極大波を示すが 0.25% Zelandin 1~2 滴加えれば抑制され、定量の目的には pH5 に於る波が適すると判断された。MeOH30% 0.1N-LiCl のとき $\tau_{1/2} = -1.45 \text{ Volt (S. C. E)}$ MeOH 40%, 0.05N-Tetramethylammoniumbromide のとき $\tau_{1/2} = 1.37 \text{ Volt (S. C. E)}$ であり、いずれも原点を通る Calibration curve が得られる。
- 脱脳油及び白油の波形及び半波還元電位から考察し、含まれるケトンには Carvone より、Piperitone によると考えられる場合が多いことを認めた (Fig. 26)。即ち紫外外部吸収では同一 $\lambda_{\text{max}} 235 \text{ m}\mu$ のため分離確認出来ないのであるが、ポーラログラフ法によれば定量のみでなく、定性的観察が行えるという利点を有している。通常の脱脳油では殆んど Piperitone のみであつてこの場合には、ポーラログラフ法による結果は、先きに述べた紫外外部吸収法による結果と略一致することを認めた。

文 献

- 農林統計速報
- 池田長守, 薄荷除虫菊篇 (1952) 養賢堂
- P. E. O. R. 9 (1918) 37. 平尾子之吉, 日本精油化学 (佐々木図書) 昭23
- Guenther, The essential oil I D. van Nostrand. C. (1949)
- 三井, 中山, 田中, 藤原: 日農化 24 (1950) 82
- Masamune: *Jap. J. Biochem* 18 277 (1933)
- 三宅, 石塚: 日土肥雑 12 557 (昭13)

- 8) 篠崎, 長沢: 大工試 7回, 10回, 13回
- 9) 田中: 日化 • 50 546
- 10) Stillman, Reed, *Perfumery E.O. Record* 23 (1932) 278
- 11) 長沢: 薄荷の科学 日本文教出版 (昭25)
- 12) " : 岡山県農業改良速報 3
- 13) Lowry, Lishmund: *J. Chem.Soc.* (1935) 1313
- 14) Lowry, Simpson, Allsop: *Loyal Soc. Ann.* 163 483
- 15) Cooke, Macbeth: *J.Chem.Soc.* (1938) 1408
- 16) Brady: *J. Am.Chem. Soc.* 53 (1931) 756
- 17) Read: *J.Chem Soc.* 121 (1922) 587
- 18) Girard Sandorenco: *Helv. Chem. Acta.* 19 (1936) 1095
- 19) Zaffaroni, Burton, Kentmann: *J. Biol. Chem.* 177 (1948) 109
- 20) Organic Synthesis Col. Vol II John Wiley 85
- 21) Wolf, Hershberg, Fieser: *J. Biol. Chem.* 136 2088 (1940)
- 22) Prelog, Häfliger: *Helv. Chem. Acta.* 32 II 2088 (1949)
- 23) Nakajima: *Memories of College Agric. Kyoto Univ.* No65
- 24) B. Bitter: *Collect. of Czechoslovak. Chem. Com.* (1950) Vol XV. 1

Summary

STUDIES ON MICRODETERMINATION OF MENTHOL, MENTHONE AND PIPERITONE IN THE PEPPERMINT OIL BY SPECTROPHOTOMETRIC AND POLAROGRAPHIC METHODS

Sumio SHIMIZU*

(Institute of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture)

1 Microdetermination of Menthol in the Peppermint oil by Spectrophotometric method

The acetylation method has been used to determine the content of Menthol in the Peppermint oil, but this method seemed to be rather difficult in the case of small amount of sample obtained from the biochemical point of view. Masamune reported the calorimetric method in which Borate buffer solution containing phenolred was used as a standard solution. The writer investigated this method in detail by Beckman quartz spectrophotometer and presented an improved method without phenolred standard solution. Satisfactory results were obtained by following procedure.

- A) *Reagent Preparation* : To 100ml Sulphuric acid (1.5volume part H_2SO_4 + 1part H_2O) 0.5g p-Dimethylaminobenzaldehyde is dissolved.
- B) *Procedure* : To 1ml of Menthol methanol solution in 20ml cork stoppered test tube, 5ml of reagent solution is added. Heat the solution in a boiling bath for three minutes, then cool under running water. The colour of the resulted solution is pink-red. A blank determination is made simultaneously by using 1ml of methanol in place of Menthol. The optical density of the reaction solution is determined by using a Beckman quartz spectrophotometer at the wave length $540m\mu$. The instrument is adjusted for 100% transmittance for the blank solution, no further correction for the blank being necessary. The measurement is made at $540m\mu$ and the Menthol is determined by the calibration curve prepared previously. The following notes are mentioned to carry out this procedure.
- 1) Sulphuric acid concentration of the reagent has influence on the optical density of Menthol, so the calibration curve must be corrected for renewed reagent (Fig3). Reagent solution stoppered tightly in brown glass bottle remains suitable for use for several months.

* Assistant Professor of Shinshu University.

- 2) Measurement of optical density must be carried out without sunlight. In dark place, the optical density of the reacted sample is quite stable for one hour. (Fig 5) (detection limit is about 10γ per 1ml).
- 3) Ester menthol is hydrolyzed in the reagent solution, so the optical density of peppermint oil gives the content of total Menthol. In this case the hydrolysis rate was about 95%.
- 4) It is noteworthy that the ring alcohols such as cyclohexanol, phenol, borneol, etc, react with p-dimethylaminobenzaldehyde. Consequently this method does not show the correct value if essential oil is contaminated with these alcohols. (Fig. 7, Fig. 8)

2 Ultraviolet spectrophotometric determination of unsaturated Ketones in Peppermint oil

It has been shown that α . β -unsaturated ketones such as piperitone, carvone and pulegone have two adsorption maxima in ultraviolet spectra.⁽¹³⁾⁽¹⁵⁾ The writer isolated these ketones from the essential oil of various *Mentha* plants for quantitative analyses. The results are as follows :

Piperitone and Carvone have same λ_{\max} 235m μ , so it was difficult to determine these ketones separately by spectrophotometric method when they were mixed in a peppermint oil. In this case the optical density at 235m μ seemed to be approximate value of total unsaturated ketones. For ordinary commercial oil in

	$[\alpha]_D^{15}$	Semicarbazone	λ_{\max} (in methanol)	ϵ_{\max} (in methanol)	
Piperitone	± 0	220~221°	235m μ	13300	<i>Mentha arvensis</i>
Carvone	-57°28'	142°	235	10040	<i>Mentha sylvestris</i>
Pulegone	+22°19'	167~168°	252	7500	<i>Mentha pulegium</i>
Menthone	-29°28'	189°	287	24.5	<i>Mentha arvensis</i>

Japan it may be concluded that the absorption at 235m μ is chiefly due to Piperitone. Menthone has two maxima (λ_{\max} 287m μ , 230m μ), but its intensity is too weak compared with piperitone. If a wild mint is mixed with cultivated plants, the intense absorption at 235m μ shows the presence of unsaturated ketone (detection limit is about 1γ per 1ml). The rapid determination of piperitone by u. v. spectrophotometric method is to be recommended for the quality control of peppermint oil.

3 Paperchromatography of Ketone betainylhydrazones in Peppermint oil.

The betainylhydrazones of Menthone, Piperitone, Pulegone, Cyclohexanone,

Cyclopentanone and Acetone were prepared by refluxing with Girard Reagent T, and were developed by butanol saturated with water. Potassium jodoplatinate solution was used as colouring agent. The results obtained were showed in Fig 13. The difference of R_f between terpene ketones and other ketones was clear, but it was difficult to distinguish Menthone from unsaturated ketones such as Piperitone and Pulegone because betainylhydrazones were not satisfactorily stable and tailing phenomena were apt to interfere with neighbouring spots. A paperchromatogram of dementholized oil showed three spots. A spot ($R_f=0.71$) seemed to be Menthone but other two spots could not be identified, but were presumed to be lower carbonyl compound.

4 Polarographic determination of Menthone in Peppermintoil by Girard Reagent T.

While menthone itself was completely indifferent to polarographic diffusion current in the range studied, Girard derivative gave a well defined polarographic wave under suitable conditions. For the separatory determination of Menthone in ordinary peppermint oil by polarographic method, satisfactory results were obtained when electrolytic reduction of betainylhydrazone was carried out in the Kolthoff buffer solution ($pH=7.0$) and $n/50$ Tetramethylammonium bromide was used as supporting salt. Prelog et al reported that many ketone betainylhydrazones were prepared only by refluxing with Reagent T in absolute methanol solution for several hours. In the case of Menthone the reaction with Girard T was exceedingly slow in neutral solution, so glacial acetic acid was added to accelerate the reaction velocity. (Fig16, Fig17)

The quantitative Procedure :

To 5ml absolute methanol solution which contains about 10mg Menthone or corresponding dementholized oil and 30mg Girard Reagent, 0.5ml glacial acetic acid is added and refluxed for 1.5 hours without moisture. The reacted solution is placed into a 10ml calibrated volumetric flask and is made to volume with absolute methanol. (stock solution) In a test tube carrying a glass stopper, 1 ml of this stock solution is neutralized with $n/2NaOH$ using a drop of phenolphthalein (Titration volume a ml should not exceed over 2ml).

Then add $(7-a)$ ml of buffer solution (Kolthoff $pH=7.0$), 1 ml of $n/5$ tetramethylammoniumbromide, and 2 drops of 0.25% zelatin solution. Transfer this electrolytic solution in electrolytic cell, remove oxygen gas by passing hydrogen gas and take a polarogram of this solution at $25\pm 1^\circ$. The wave height is measured and Menthone is determined by calibration curve prepared with pure menthone on the same conditions.

5 Polarographic determination of Piperitone in Peppermintoil

Polarographic studies on α · β -unsaturated ketone such as Carvone and pulegone were reported by B. Bitter but little information was obtained concerning with Piperitone. In this article the polarographic determination of Piperitone in peppermintoil was undertaken and satisfactory results were obtained, which agreed with the values by ultravioletspectrophotometric method mentioned previously. Both Piperitone and Carvone have the same maximum absorption ($\lambda_{\max}=235m\mu$). So it is difficult to conclude whether unsaturated ketone in the peppermintoil is Piperitone or not from the spectrophotometric results. By polarographic method Piperitone was distinguished from Carvone in the peppermint oil. Half wave potentials of these ketones are as follows :

Piperitone	-1.37volt (S. C. E.)	} MeOH 40% n/50 Tetramethyl ammonium bromide10% Sørensen buffer solution (pH=5.0) 50% 25±1°
Carvone	-1.25	
Pulegone	-1.36	

By careful observation of polarograms (Fig26) for ordinary dementholized oil it was pointed out that reduction wave was due to the presence of Piperitone.

The quantitative Procedure :

Electlytic solution is prepared as follows : To 4ml of methanol solution (piperitone concentration 0.1~1.0mg/ml) 1ml of n/5 tetramethylammoniumbromide and 5ml of Sørensen buffer solution (pH=5.0) are added. Transfer this solution in electrolytic cell maintained at 25±1°, remove oxygen gas by passing hydrogen gas, and take a polarogram.

The wave height is measured and Piperitone determined by calibration curves prepared with pure piperitone under the same conditions (Fig 24).