

## A hidroxilamin mikromeghatározása fotometrálással

### II. Vizsgálatok növényi anyagokkal

JÁMBOR BÉLA és KISS JENŐ

*Eötvös Lóránd Tudományegyetem Növényélettani Intézet, Budapest*

A növényi nitrát asszimiláció egyik közbelső termékének, a hidroxilaminnak a Blom-reakció alapján való meghatározását tanulmányozva, előző közleményünkben megállapítottuk a kvantitatív eredményt biztosító kísérleti feltételeket tiszta oldatban való meghatározás esetén [2]. Ennek keretében különösen a  $p_H$  és a fény döntő szerepét mutattuk ki a reakció menetére. A módszert növényi anyagra kipróbálva azonban 0–100% veszteség lépett fel az eredményben. Felmerült tehát a szüksége annak, hogy megállapítsuk a veszteség okait és elkerülésük módját. E végből bevontuk vizsgálatunk körébe a hidroxilamint a növényben levő zavaró anyagoktól elválasztani hivatott Lemoigne módszert is [4].

#### Kísérleti rész

A használt oldatok, készülékek tekintetében általában az előző közleményünkben [2] leírtak alapján jártunk el, az eltérésekre a megfelelő helyen rámutatunk.

*A javított Blom-módszer tanulmányozása növényi anyag esetében*

a)  $A p_H$  hatása az eldörzsöléskor

A továbbiakban a növényi anyagban közvetlenül való meghatározást zavaró ismeretlen tényezők hatásának mikéntjét kívántuk megállapítani. Két lehetőségre kellett gondolnunk: Először a növényben levő egyes vegyületek az eldörzsölés után reakcióba lépnek a hidroxilaminnal és így annak egy részét eltüntetik; másodsor a növényben levő egyes vegyületek a Blom-reakció során a keletkező termékek vagy az alkalmazott reagensek egyikével-másikával reakcióba lépve okoznak zavart.

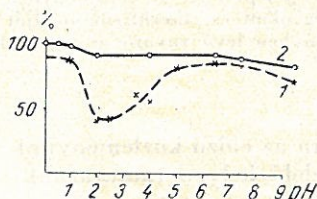
Az első lehetőség kérdését azzal kívántuk tisztázni, hogy a vizsgálandó növénynek már az eldörzsölését is különböző  $p_H$  értékekre beállított oldat hozzáadása után végezzük, majd a  $p_H$ -értéket 2,5-re állítva végezzük el a javított Blom-reakciót, ugyanis, ha különböző  $p_H$  mellett végezve az eldörzsölést, a meghatározás eredménye változik, ez arra vall, hogy a hidroxilaminnak az eldörzsölés és a tulajdonképpeni Blom-reakció elvégzése közötti időben lezajlott valamely reakcióját befolyásoltuk a  $p_H$ -val. További kísérleteinkben az eldörzsölés és Blom-reakció közötti időtartamot egységesen 15 percben szabtuk meg.

Az 1. ábra első görbéjén 1 g *Capsicum annum* termésfalhoz eldörzsölés előtt különböző  $p_H$ -jú oldat jelenlétében adott 8  $\gamma$   $NH_2OH$ -nitrogénből negyed órai állás után javított Blom módszerrel meghatározott  $NH_2OH$ -nitrogén mennyiséget mutatja a  $p_H$  függvényében. Amint látjuk lényeges hidroxilamin veszteség  $p_H = 1$  és 5 között észlelhető, vagyis a Blom-reakció optimális  $p_H$  értéke és a növényi levek szokásos  $p_H$  értéke e határok közé esik. Az is látható az ábrán, hogy legkisebb a veszteség ha az eldörzsölés  $p_H = 0$  mellett történik. *Capsicum annum*-ról lévén szó, önként adódott a gondolat, hogy annak ascorbinsav tartalma okozhatja a hidroxilamin veszteséget. Ezt alátámasztja Lemoigne és munkatársainak azon megállapítása [5], hogy a hidroxilamin és C-vitamin oximképződés közben reagál. Feltételezésünk helyességét két kísérlettel támasztottuk alá:

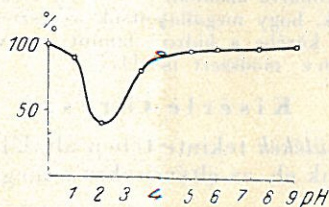
## b) A C-vitamin hatása

Az 1. ábra második görbéje az első görbéhez hasonlóan készült azzal a különbséggel, hogy a megfelelő  $p_H$ -jú puffer és hidroxilamin hozzáadása előtt dörzsöltük el a *Capsicum annuum* termésfalát és az ascorbinsav elroncsolása céljából hozzáadtuk *Cucurbita pepo* termésnek néhány ml-nyi levét és addig hagytuk így állni míg a jódos titrálással ellenőrzött ascorbinsav tartalom eltűnt. Ezután adtuk hozzá a hidroxilamint és a megfelelő puffert és hagytuk így 15 percig állni. Az így előkezelt *Capsicum annuum* lé mint az 1. ábrán látható, hidroxilamin veszteséget gyakorlatilag már nem okozott.

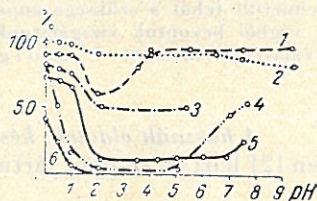
A másik kísérlet az volt, hogy a *Capsicum annuum* lé helyett megfelelő mennyiségű tiszta ascorbinsav oldatot használtunk és az előző kísérlettel azonos módon jártunk el; a 2. ábra görbéje teljesen analóg az 1. ábra első görbéjével.



1. ábra



2. ábra



3. ábra

1. ábra. 1 g paprika termésfal levéhez adott  $8 \gamma(NH_2OH)$ -N-ből a javított Blom-módszerrel meghatározott mennyiségek a hozzáadott mennyiségek %-ában a meghatározás előtt negyed óráig különböző  $p_H$ -érték mellett állva. 1. az ascorbinsav elroncsolása nélkül. 2. Az ascorbinsavat *Cucurbita pepo* lével elroncsolva. 2. ábra.  $\gamma(NH_2OH)$ -N-ből különböző  $p_H$ -érték mellett, 2 mg C-vitaminnal 15 percig való állás után meghatározott hidroxilamin mennyisége a hozzáadott mennyiség %-ában. 3. ábra.  $\gamma(NH_2OH)$ -N-ből különböző  $p_H$ -érték mellett, különböző növényi levek 1–1 ml-jével 15 percig való állás után meghatározott hidroxilamin mennyisége a hozzáadott mennyiség %-ában. 1. retekgyökér. 2. töktermés. 3. báh gyökér. 4. retek levél. 5. petrezselyem gyökér. 6. bab levél.

Megállapítható a fentiekből, hogy az általunk vizsgált *Capsicum annuum* esetében annak C-vitamin tartalma volt a legfontosabb zavaró tényező. Ami a zavaró hatás mechanizmusát illeti, igen valószínűnek látszik az oximképződés. Ennek  $p_H$  optimuma az 1. és 2. ábra szerint három körül van. Az igen alacsony  $p_H$ -nak a zavart kiküszöbölő hatása így azzal magyarázható, hogy az oximképződés egyensúlyát a hidrolízis irányába tolja el.

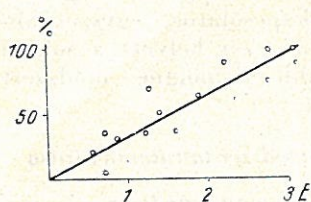
Felmerülhet az a gondolat is, hogy a C-vitamin nemcsak az oximképződés révén okoz zavart, hanem úgy is, hogy a diazóniumsót redukálja fenilhidrazin származékká. Ezzel azonban a Blom-reakcióban, tehát jó jelenlétében csak annyiban kell számolnunk, hogy sok C-vitamin jelenléte esetében esetleg elfogyasztja a jódot. Így egyrészt a jódhány másrészt a fölöslegben maradt C-vitamin okozhat zavart. A C-vitamin redukáló hatásán alapuló zavart egyébként csak a nitrit meghatározásánál tapasztalunk ahol jó nem szerepel. Itt nem közölt vizsgálataink szerint, az Ilosvay—Griess-reakció során már létrejött diazóniumsóhoz 1–2 mg C-vitamint adva,  $\alpha$ -naftilamin hozzáadása után színeződést egyáltalán nem kaptunk; ha a C-vitamint csak az azofesték képződése után adjuk hozzá, úgy azt észrevehetően nem befolyásolja.

A következőkben *Capsicum annuum* helyett különböző más növényekkel ismételtük meg a kísérletet s az eredményeket a 3. ábra mutatja. E kísérleteket fentiekhez hasonlóan *Cucurbita pepo* termésle-kezeléssel is megismételtük, azonban

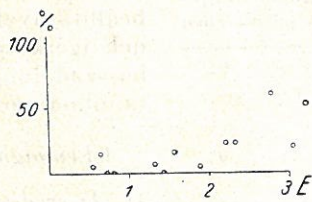
annak a *Capsicum annum*hoz hasonló hatását nem észleltük, hanem a veszteségek csaknem változatlanul megmaradtak a legtöbb esetben. Sőt ezen túlmenően azt is megvizsgáltuk, hogy van-e valamilyen korreláció a hidroxilamin veszteség és a vizsgált növényi anyagok C-vitamin tartalma között: Ilyen korrelációt egyáltalán nem találtunk, a C-vitamin tehát nem az egyedüli zavart okozó tényező.

c) *A fenolok hatása*

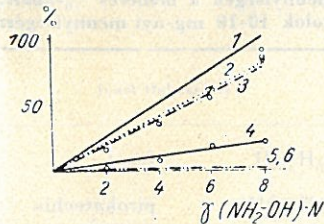
E másik zavaró tényező mibenlétének felderítése céljából arra gondoltunk, hogy ennek hatása nem a hidroxilamin eltüntetésén, hanem a Blom-reakció valamely lépésének megzavarásán alapszik. Mivel a növények sok fenol jellegű vegyü-



4. ábra



5. ábra



6. ábra

4. ábra. Különböző növényi anyagok 1–1 g-jához adott 8  $\gamma$ (NH<sub>2</sub>OH)—N-ből eltűnt mennyiségek a jelenlevő fenol tartalom függvényében. (A fenoltartalom helyett a p-nitro anilines reakcióval kapott extinkció-értékek szerepelnek.) 5. ábra. A 4. ábrán közölt kísérlet azon változata, hogy NH<sub>2</sub>OH helyett nitritet használtunk, a javított Blom meghatározási módszert pedig jód nélkül végeztük. 6. ábra. 1 g különböző növényi anyaghoz pH = 0 mellett való eldörzsölés előtt adott különböző mennyiségű (NH<sub>2</sub>OH)—N extinkció értéke a javított Blom módszer alapján meghatározva. 1. Növénymentes tiszta oldat. 2. retek gyökér. 3. paprika termésfal. 4. retek levél. 5. muskátli levél. 6. muskátli gyökér.

letet tartalmaznak, első sorban ezekre gondoltunk, már csak azért is, mert ezek a Blom-reakció II. lépésében az  $\alpha$ -naftilamin helyett a diazóniumsóhoz kapcsolódhatnak, halványabb színű, esetleg színtelen vegyületeket képezve.

A legkülönbözőbb növényi anyagokkal paralel meghatározásokat végeztünk a következő módon: 1–1 g növényi anyagnak megfelelő levét jóddal „megtitráltunk” az ascorbinsav eltüntetésére, majd hozzáadtunk 8  $\gamma$  NH<sub>2</sub>OH-nitrogént és elvégeztük a javított Blom előírás szerinti meghatározást. A növényi anyag másik részletének fenol tartalmára utaló extinkció értéket p-nitro-anilinnal végzett színreakcióval [7] állapítottuk meg, az összetartozó érték párokat a 4. ábrán megjelöltük. Az értékpárok nagy szórása ellenére, szembeötlő a hidroxilamin veszteség és a fenol reakció extinkció értéke közötti egyenes arányosság.

Érdekességként megemlítjük, hogy hidroxilamin helyett nitrittel végezve a kísérletet (s a meghatározáshoz természetesen jódot nem használva) a keletkező veszteség sokkal kisebb mértékű, s a fenol extinkcióval való arányosság sem állapítható meg határozottan (5. ábra).

A fenolok ezen hatását növényi anyagtól mentes tiszta oldatban, ismert fenol hozzáadásával is tanulmányoztuk és az eredményeket az 1. táblázat mutatja.

Látható a táblázat adataiból, hogy a tiszta oldatban alkalmazott ismert fenolok ugyanolyan értelemben hatnak a Blom, ill. Ilosvay—Griess reakcióra.

Visszatérve a 3. ábrán közölt eredményekre láthatjuk, hogy a közeg pH-értéke a nagyjából C-vitamin mentes növényi anyagok zavaró hatását is befolyásolja. Ebből arra lehet következtetni, hogy a fenolok nemcsak az  $\alpha$ -naftilammal való konkurencia révén, hanem a hidroxilammal való reakció révén is zavarják.

E kérdés részleteire vizsgálatunk nem terjedt ki. Ennek oka az volt, hogy az eldörzsölést  $p_H = 0$  mellett végezve is a legtöbb növényenél igen nagy hidroxilamin veszteséget tapasztaltunk.

A közvetlen módszerrel járó nagy veszteségekről tájékoztat a 3. ábrán kívül a 6. ábra is, melyen a különböző növényekhez adott különböző mennyiségű hidroxilaminból meghatározott mennyiségek láthatók. A meghatározásokat úgy végeztük, hogy a javított Blom-módszer alkalmazása előtt  $p_H = 0$  mellett dörzsöltük el

1. táblázat.

8  $\gamma$  ( $NH_2OH$ ) — ill. ( $NO_2^-$ )-N-ből a javított Blom, ill. annak jódmentes változatával meghatározott mennyiségek a bemérés %-ában, különböző fenolok 10-10 mg-nyi mennyiségének jelenlétében

Hozzáadott fenol		Meghatározott	
		$NH_2OH$ %	$NO_2^-$ %
$C_6H_5OH$	fenol . . . . .	80	97
$C_6H_4(OH)_2$	pirokatechin	0	55
	rezorcín . . . .	0	48
	hidrokinon ..	15	10
$C_6H_3(OH)_3$	pirogallol ..	0	35
	floroglucin ..	0	90
$C_6H_2(OH)_3COOH$	gallussav ..	0	85

zást az eddig optimálisnak vélt javított Blom módszerrel végeztük. Ezért részletes vizsgálatnak kellett alávetnünk a Lemoigne módszer egyes mozzanatait. Célszerűség kedvéért úgy jártunk el, hogy az egyes mozzanatokat fordított sorrendben tanulmányoztuk, hogy ezzel több zavaró tényező egyidejű fellépését megakadályozzuk.

b) A desztillátum vizsgálata

Fenti elv alapján először a Lemoigne módszer utolsó mozzanatát, a desztillátummal való Blom-reakciót tanulmányoztuk, az általunk megállapított optimális kísérleti feltételeket betartva. Előkísérleteink azt mutatták, hogy az acetonos hidroxilamin oldat Lemoigne szerint készült desztillátumához adott ismert mennyiségű további hidroxilaminnak is csak tört részét sikerült megkapnunk. Ez növénymentes, tiszta acetonos hidroxilamin oldat desztillátuma esetén is így történt. Első gondolatunk az volt, hogy az acetoximmal együtt átdesztillált aceton okozza a zavart. Fennállt azonban annak a lehetősége is, hogy az aceton hidrolizálására (a hidroxilamin felszabadítására) nem megfelelő a Lemoigne által leírt eljárás. Ez utóbbi feltételezés azonban csakhamar mellőzhetővé lett, mert különböző oximokat különböző módon hidrolizálva kiderült, hogy nem is szükséges az erős savval való főzés, hanem a Blom-reakció első lépése (diazotálás  $p_H = 2,5$  mellett) során is már felszabadult az acetoximból a hidroxilamin jó része. A teljes hidrolizishez ilyen feltételek mellett a diazotálási időnek kb. egy órára való növelése szükséges (7. ábra). A Lemoigne módszerrel kapott desztillátumból azonban még egyórás diazotálási időt alkalmazva is csak mintegy 10%-át kaptuk meg a bemért hidroxilamin mennyiségnek. Ez alátámasztotta a fenti elképzelést, hogy az acetoximmal együtt átdesztillált aceton okozza a zavart. Bár L e m o i g n e [4] is rámutat

a növényeket a hozzáadott hidroxilamin jelenlétében. Ezen elháríthatatlannak látszó nagy veszteségek miatt célszerűnek látszott a  $p_H$ -nak megfelelő beállításával kapcsolatos, egyszerűbbnek ígérkező módszer helyett a sokkal hosszadalmasabb Lemoigne módszert tanulmányozni.

A Lemoigne módszer tanulmányozása

a) Az eredeti Lemoigne módszer

az aceton eltávolításának szükségességére, azonban az eltávolítás módját nem közli pontosan. Megállapítottuk, hogy a sósavval való félperces forralás egyrészt nem távolítja el az acetont, másrészt az igen illékony acetoxim egy részének elillanását okozhatja.

Arranéze, hogy az aceton a Blom-reakció, melyik mozzanatát zavarja, azt a kísérletet végeztük, hogy a reakció különböző mozzanatai előtt adtunk az addig aceton mentes oldathoz 1 ml acetont. Kísérletünket úgy is megismételtük, hogy a kiindulási anyag hidroxilamin helyett nitrit volt. (2. táblázat.)

A nitrites sorozatot azért iktattuk be, mert ennél az  $\text{NH}_2\text{OH} \rightarrow \text{NO}_2^-$  reakció elmarad és így az acetonnak erre a reakcióra való hatásáról is választ kaphatunk. Ebben a sorozatban nem lett volna szükség jó hozzáadására, mivel nem kell nitritté oxidálni. Mégis hozzátettük a jódot itt is, hogy a másik sorozattal egyezők legyenek a feltételek, kivéve az  $\text{NH}_2\text{OH} \rightarrow \text{NO}_2^-$  reakció létrejöttét.

A 2. táblázat adataiból látható, hogy a jód és aceton együttes jelenléte a diazotálási reakciót is zavarja, de főleg az  $\text{NH}_2\text{OH} \rightarrow \text{NO}_2^-$  reakciót. Összevetve ezt az itt nem részletezett kísérleti adatainkkal, melyek szerint külön az aceton és külön a jód a diazotálási reakciót nem zavarják, megállapítható, hogy az acetontól jód hatására keletkező vegyület okozza a zavart, mely főleg a hidroxilamin oxidációját zavarja. A továbbiak szempontjából azt a konzekvenciát vontuk le ebből, hogy a Blom-reakció előtt az acetont el kell távolítani.

Céltalannak láttuk a zavaróhatás mibenlétét vizsgálni, mivel egyszerűbbnek látszott a kérdés az aceton eltávolításával megoldani. Ami egyébként a zavaróhatás mibenlétét, illeti arranéze a jódaceton vegyület specifikus hatásán kívül valószínűnek látszik, hogy az aceton ismét leköti a hidroxilamint és így kivonja a meghatározás alól.

Az aceton eltávolítása kapcsán a következő ellentétes követelményeket kellett kielégítenie a keresett eljárásnak: az acetont úgy eltávolítani, hogy sem az acetoxim, sem az aceton fogyásával szabaddá váló hidroxilamin ne illanjon el.

Mivel az aceton is s az acetoxim is egyaránt nagyon illékony, először valamilyen lecsapó szerre gondoltunk, mely vagy az acetont, vagy a hidroxilamint lecsapja. Ilyent azonban nem találtunk. Maradt a legkézenfekvőbb mód: megfelelő körülmények között melegítéssel eltávolítani az acetont. Minthogy azonban az acetoxim tapasztalatunk szerint még az acetonnál is illékonyabb, gondoskodnunk kellett a melegítés előtti elbontásáról. Az acetoxim elbontását kénsavval végeztük. Az optimális sav koncentrációt oly módon állapítottuk meg, hogy  $8\gamma (\text{NH}_2\text{OH})-\text{N}$ -hez 1 ml acetont és különböző normalitású kénsavat adtunk és a később ismeretendő feltételek mellett melegítettük:  $70^\circ\text{C}$ -on 20 percig. Ezután az oldatokat lehűtöttük, majd hűtés közben a  $\text{pH}$ -ját 2,5-re állítottuk be és elvégeztük a javított Blom-meghatározást másfélórás diazotálási idővel. A különböző kénsav koncentráció hatását a 8. ábra mutatja. Látható az ábrán, hogy  $\ln$  a kénsav optimális koncentrációja. Hígabb oldatban nem biztosítja a teljes hidrolízist és az acetoxim egy része elillan, töményebb oldat esetében viszont a semlegesítéskor keletkező sok nátriumsulfát kicsapja az azofesték egy részét megfigyelésünk szerint.

Az oxim alakjában kötött hidroxilamin meghatározására előírt [1, 3] módszerben a vizsgálandó anyag  $3n$  kénsavval hat óráig való főzése fentiek szerint

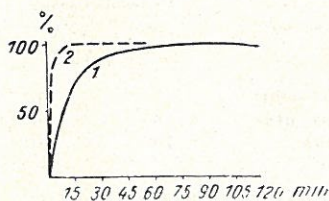
2. táblázat,

1 ml aceton hatása a Blom-reakcióra. (A kapott értékek a bemérés  $\%$ -ában kifejezve.)

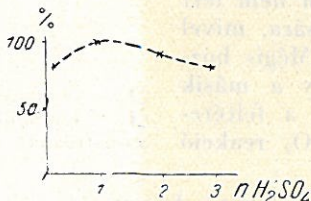
Az aceton hozzáadása	A kiindulási anyag	
	$8\gamma (\text{NH}_2\text{OH})-\text{N}$	$8\gamma (\text{NO}_2^-)-\text{N}$
$\text{J}_2$ + szulfanilsav előtt .	10	66
$\text{J}_2$ + szulfanilsav után .	85	86
$\alpha$ -naftilamin után ....	100	90

nem a hidrolízis miatt szükséges, hiszen az egy-két perc alatt lezajlik. A kénsav szerepe inkább az, hogy a hosszú melegítés alatt megakadályozza a hidroxilamin elillanását. A hatórási melegítés pedig azért bizonyult hasznosnak, mert a 3n kénsav ezalatt bizonyára elroncsolja a Blomreakciót zavaró anyagokat, vagy azok egy részét. Nem publikált kísérleteink szerint tiszta oximok (piroszólósv-, oxálecetsav-, acet-, dimetilglioxim) meghatározásához zavaró anyagtól mentes oldatban egyáltalában nincs szükség a kénsavval való hatórási melegítésre: a javított Blom módszerrel, kb. másfélórás diazotálási időt alkalmazva, ezek kvantitatívan meghatározhatók.

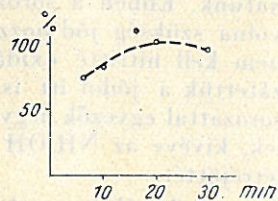
A melegítés idejének és hőfokának hatását a 9., ill. 10. ábra mutatja. Mindkét görbe egycsúcsú optimumot mutat. A melegítési időnek, továbbá a hőfoknak az optimum fölé emelésekor bekövetkező hidroxilamin veszteség arra látszik utalni,



7. ábra



8. ábra



9. ábra

7. ábra. 8  $\gamma$ N-t tartalmazó acetoximból (1) ill.  $\text{NH}_2\text{OH}$ -ból (2) a javított Blom-módszerrel meghatározott hidroxilamin mennyisége különböző hosszú diazotálási idő esetében. 8. ábra. A kénsav koncentrációjának hatása a desztillátumból való  $\text{NH}_2\text{OH}$ -meghatározásra. (1 ml aceton + 8  $\gamma$ ( $\text{NH}_2\text{OH}$ ) -N + különböző töménységű  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 70 °C-on 20 percig petricsészében való melegítés után lehűtve semlegesítés és a javított Blom-módszer alkalmazása). 9. ábra. A 8. ábrán közölt kísérlet, különböző ideig 70 °C-on való melegítéssel

hogy a hidroxilamin — bár kis mértékben, — de mégis illékony. Az utóbbi két kísérlet alapján az aceton elűzésére szolgáló melegítés optimális idejéről 20 percet hőfokául 70 °C-t állapítottunk meg.

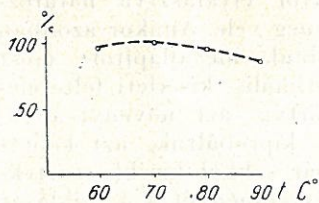
Mivel feltételezésünk szerint a fent leírt melegítés után az aceton kis része még mindig az oldatban marad, számolni kell azzal, hogy az a meghatározás folyamán egyrészt jódot fogyaszt, másrészt oxim alakjában újra lekötí az előzőleg felszabadított hidroxilamint. Erre az esetre nézve is meg kellett vizsgálnunk a jódmennyiség, valamint a diazotálási idő változtatásának hatását az eredményre. A 11. ábra szerint a 100%-os eredmény eléréséhez aceton nyomok jelenlétében nem elegendő a tiszta oldatnál megállapított 0,2, ml hanem kb. 1 ml szükséges. Tekintve, hogy a 11. ábrán közölt kísérlet 15 perc diazotálási idő mellett, a 12. ábra kísérlete pedig 0,5 ml jód alkalmazása mellett történt, e két kísérlet összevetésével megállapítható, hogy az 1 ml jód csak 15 perces diazotálás esetén szükséges, másfélórás diazotálás esetén a 0,5 ml is bőven elég. Miután a fölös jódmennyiséget a Sandmeyer-reakció miatt aggályosnak láttuk, a továbbiakban inkább az amúgy is megszokott 0,5 ml jód alkalmazásánál maradtunk s a diazotálási időt hosszabítottuk meg. A 12. ábra pedig a várakozásnak megfelelően azt mutatja, hogy a diazotálási időt is lényegesen meg kell hosszabbítani, hogy az újra képződött acetoxim ezalatt teljesen hidrolizálódhasson. Ez kb. másfélórás diazotálással érhető el. A túl sok jód alkalmazása a 11. ábra szerint szintén veszteséget okoz. Ez szintén a már említett Sandmeyer reakcióval magyarázható.

Ezek alapján tehát acetont tartalmazó desztillátumban a hidroxilamint a javított Blom-módszer alábbi módosításával határozzuk meg: Az oldatot kénsavval 1 n-ra hozzuk, majd lapos nyitott edényben 70 °C-os vízfürdőn 20 percig

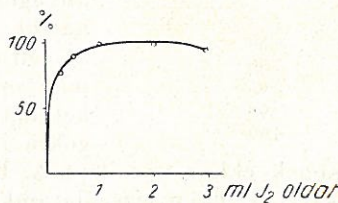
melegítjük, ezután hideg vízzel lehűtjük és 2n NaOH-val hűtés közben fenoltalein jelenlétében semlegesítjük. Ezután hozzáadunk 1 ml szulfanilsavat, 0,5 ml jódot és sötétben másfélóráig állni hagyjuk. A jódnak tioszulfáttal való elszíntelenítése után az oldatot kb. 48 ml-re deszt. vízzel felhígítjuk, hozzáadunk 1 ml  $\alpha$ -naftilamint, 50 ml-re feltöltjük és negyedóra múlva fotometráljuk.

c) Desztilláció kísérleti feltételeinek vizsgálata

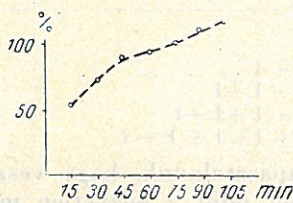
Mivel a meghatározás többi lépésének pontos kísérleti feltételeit már megállapítottuk, a desztilláció kísérleti feltételeit vizsgáltuk meg. Elsősorban az acetont optimális mennyiségét kellett megállapítanunk. Ez oly módon történt, hogy 8  $\gamma$  (NH<sub>2</sub>OH)-N-t tartalmazó 8 ml oldatot mikrodesztilláló készülék lombikjába bemértünk, az oldatot 5 körüli p<sub>H</sub>-értékre hoztuk, majd különböző



10. ábra



11. ábra



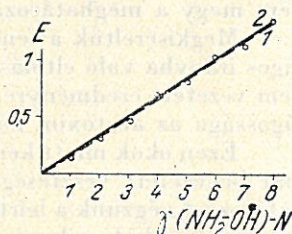
12. ábra

10. ábra. A 8. ábrán közölt kísérlet, 20 percig különböző hőfokon való melegítéssel. 11. ábra. A jódmennyiségnek hatása az acetont tartalmazó desztillátumban való hidroxilamin meghatározásra. 12. ábra. A diazotálási idő hatása az acetont tartalmazó desztillátumban való hidroxilamin meghatározásra.

mennyiségű frissen desztillált acetonnal átdesztilláltuk a hidroxilamint. A desztillátumot a már említett módon acetont mentesítettük és az oldattal másfélórás diazotálási idővel elvégeztük a javított Blom-meghatározást. A kísérlet során azt tapasztaltuk, hogy ha egyszerre 1–6 ml acetont adunk a desztilláló oldathoz, elvégezve a meghatározást a bemért hidroxilaminnak csak maximum 95–96 %-át kapjuk vissza, míg több részletben adva az acetont, már 4 ml-nél kapunk ugyanilyen eredményt, amint az a 3. táblázatból látható.

Megvizsgáltuk a desztilláció p<sub>H</sub> optimumát is, és azt a Lemoigne által megadott p<sub>H</sub> = 5 értékkel megegyezőnek találtuk. Az ettől a p<sub>H</sub> értéktől való eltérés meglehetősen nagy hibát okoz. Két p<sub>H</sub>-értékkel való eltérés akár savas — akár lúgos irányba 20–30 %-os veszteséggel jár.

Ezek alapján a desztillációt a következő módon kell elvégezni: a mintegy 10 ml térfogatú vizsgálandó anyagot teljesen zárt mikrodesztilláló készülékbe helyezük (ajánlatos a Schüle-kéfé [6] mikro-ammonia desztilláló készüléket használni, azzal a módosítással, hogy a bevezető tölcser csöve csak a lombik-nyak alsó hajlatáig ér). Az oldatot p<sub>H</sub> = 5 értékre hozzuk, 2 ml frissen desztillált acetont és forrkövet adunk hozzá. Ledesztilláljuk az acetont és még négyszer adunk hozzá 1 ml acetont külön-külön ledesztillálva. A desztillátumot 8–10 ml 2 n kénsavban fogjuk fel és a 3/b fejezetben említett módon kezeljük tovább. A 13. ábrán az ilyen módszerrel felvett standard-görbe látható.



13. ábra

A 3c és a javított Blom-módszerrel kapott NH<sub>2</sub>OH-standard görbe.

A desztillációval kapcsolatosan megvizsgáltuk továbbá azt, hogy bizonyos nitrogén származékok hogyan befolyásolják a meghatározás eredményét. Azt tapasztaltuk, hogy  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_3$ ,  $\text{HCN}$ , és karbamid nem zavarják a meghatározást tiszta oldatban. Oximokkal történt vizsgálatoknál azt tapasztaltuk, hogy a dimetilglioxim és a pirózólósav-oxim esetében, az acetonnal történt desztilláció során, az összes hidroxilamin átdesztillál. Ez gyakorlatilag azt jelenti, hogy az oxim-kötésű hidroxilamin is meghatározható e módszerrel, azonban a tömeghatás törvénye értelmében több acetonnal kell a desztillációt végezni.

### 3. táblázat,

A desztilláláskor alkalmazott aceton mennyiségének hatása a desztillátum hidroxilamin tartalmára (A kapott értékek a bemérés %-ában kifejezve.)

Az aceton mennyisége ml-ben	A meghatározás során visszanyert hidroxilamin %
2	84
2 + 1	90
2 + 1 + 1	95
2 + 1 + 1 + 1	98
2 + 1 + 1 + 1 + 1	100

tapasztalnunk, hogy veszteségek ekkor is fellépnek, bár sokkal kisebb mértékben, mint a közvetlen módszernél. Ezen vizsgálataink eredményét a 4. táblázat mutatja. (A táblázat adatai kettő, vagy több párhuzamos meghatározás középértékei.)

Arra gondoltunk tehát, hogy a zavart okozó anyagok (főleg fenolok) a desztillációkor a vízgőzzel együtt a desztillátumba jutnak. Erről meg is győződünk úgy, hogy különböző növényi anyagok leírt módon készült desztillátumához adtuk csak a hidroxilamint és azt tapasztaltuk, hogy a meghatározáskor a bemért hidroxilaminnak gyakran jelentős részét, általában a bemérés 0–30%-át, de egyes esetekben, különösen nagy fenoltartalmú növényeknél lényegesen nagyobb %-át nem kaptuk vissza.

Mivel fentebb láttuk, hogy módszerünkkel a desztillátumban a hidroxilamint kvantitatíven meg tudjuk határozni, ha abban az acetoneon kívül más zavaró anyag nincsen, nyilvánvaló, hogy zavaró anyagok jutottak a növényi nedvből a desztillátumba. Ezek a már ismertetett fenol reakcióval kimutathatók voltak a desztillátumban. Azt is megállapítottuk, hogy a növényben levő eredeti fenol tartalmának mintegy egytized része desztillált át az adott feltételek mellett. Az általuk okozott veszteséget tehát a desztilláció egy kis tört részére csökkenti, ugyanakkor azonban az átdesztillált egytized rész megmagyarázza, hogy miért nem megy a meghatározás növényi anyagból kvantitatíven.

Megkíséreltük a fenolok visszatartására a desztillálendő oldat  $p_{\text{H}}$ -értékének lúgos irányba való eltolását, a fenolok sóba vitele céljából. Sajnos próbálkozásunk nem vezetett eredményre, mert a fenolok egy része így is átdesztillált, sőt a közeg lúgossága az acetoxim képződés szempontjából kedvezőtlennek bizonyult.

Ezen okok miatt kénytelenek voltunk a nitrít meghatározásával kapcsolatban már bevezetett veszteségi tényező használatát igénybe venni: két paralel meghatározást végzünk a leírt módszerrel úgy, hogy a vizsgálandó anyag feléhez ismert mennyiségű hidroxilamint adunk, a másik felében csak az eredeti hidroxilamin tartalmat határozzuk meg. Ha a veszteséget okozó tényezők nem lépnek fel, akkor az így kapott két eredmény különbsége éppen a minta egyik feléhez adott ismert hidroxilamin mennyiséget adja meg. Ha veszteség fellép akkor a hozzáért ismert



mennyiségnek és a két meghatározás különbsége hányadosával (ez a veszteségi tényező) beszorozzuk a hozzáadás nélküli, tehát eredeti anyagra kapott eredményt. Ha tehát veszteség nincs, a veszteségi tényező értéke 1-el egyenlő és így az eredeti anyagra kapott eredményt nem kell korrigálni. Itt nem közölhető vizsgálataink, alapján megállapítottuk, hogy a veszteségi tényező 0–10  $\gamma$   $\text{NH}_2\text{OH}$  mérés határok között arányos a hozzáadott hidroxilamin mennyiségével.

*Növényi anyagok és könnyezési nedv vizsgálata*

Már a 4. táblázatban közöltük, különböző növényi anyagokban maximális eredményt adó módszerünkkel talált hidroxilamin mennyiségek adatait. Láthatjuk, hogy a legtöbb esetben nem volt hidroxilamin eredetileg a növényben, mert hidroxil-

4. táblázat.

**Különböző növényi anyagokban végzett hidroxilamin meghatározások.**  
(A talált mennyiségek  $\gamma$ -ában kifejezve.)

Növényi anyag	Bemért mennyiség g	Desztillálás		Kénsavas oldat	
		Hozzáadott mennyiség			
		0 $\gamma$	8 $\gamma$	0 $\gamma$	8 $\gamma$
<i>Phaseolus vulgaris</i> gyökér	1	0	7	0	7
„ „ levél	1	0	5,5	0	4
„ „ termés	5	0	0,5	0	0
<i>Calystegia tricolor</i> levél	1	0	6	0	0
„ „ „	5	0	4	0	0
<i>Brassica oleracea</i> v. cap. levél	5	0	3,2	0	0
„ „ v. sab. „	5	0	0,5	0	0
<i>Pelargonium zonale</i> levél	1	1	4	0	0
„ „ „	5	2	6	0	0
<i>Petroselinum sativum</i> gyökér	1	0	5	0	4
„ „ „	1	0	1	0	0
„ „ „	5	0	2	0	0
<i>Tradescantia virginica</i> levél	1	0	1	0	0
<i>Raphanus sativus</i> levél	1	0	6	0	6
„ „ „	1	1,9	7	0	2
<i>Spinacia oleracea</i> levél	1	0	3	0	0
„ „ „	5	0	1	0	0
<i>Cucurbita pepo</i> levél	1	1	7,7	0	5
„ „ termés	1	0	2,5	0	0
<i>Cucumis sativus</i> termés	5	0	0,5	0	0
<i>Pelargonium zonale</i> levél	1	2	6. 5,7	0	0
<i>Capsicum annuum</i> termés	1	0,5	6	0	7,5
„ „ „ (Mirelit)	10	1	4. 5	0	4
<i>Cucumis sativus</i> termés (Mirelit)	10	6. 9	11. 14	0	0
<i>Cucurbita pepo</i> termés	10	1	6	0	7,5

amin hozzáadása nélkül mérhető mennyiséget nem találtunk, viszont a hozzáadott hidroxilamin meghatározási eredményéből számított veszteségi tényezők a legtöbb esetben azt mutatják, hogy a meghatározás során a hidroxilamin kisebb-nagyobb hányada meghatározható, tehát nem tűnik el teljesen. Csak azokban az esetekben nem tudjuk ajánlott módszerünket használni, ha paralelként hozzáadott hidroxilamin 100%-os veszteséget szenved, ez azonban ritkán fordul elő (4. táblázat).

Azok a növények, amelyek a 4. táblázat szerint saját hidroxilamin tartalommal is rendelkeztek, mind raktározott (Mirelite), illetőleg télen begyűjtött anyagok voltak. Feltehető, hogy a csökkent ütemű anyagcserével kapcsolatos a hidroxilamin tovább alakulásának lassúbbodása.

Módszerünkkel szabadföldön termelt Zea mays és Cucurbita pepo növény könnyezési nedvének hidroxilamin tartalmát is vizsgáltuk a növény fejlődése során. Megállapítottuk, hogy saját hidroxilamin tartalom egy esetben sem volt kimutatható, a paralelhez adott hidroxilamin pedig kisebb-nagyobb veszteséget szenvedett, illetőleg a meghatározás a vártnál kisebb eredményt adott. Ez a megállapítás azért érdekes, mert azt bizonyítja, hogy az átmenetileg keletkezett hidroxilamin már a gyökérben tovább alakul. A könnyezési nedvben ugyanis nitrát és szerves nitrogén egyaránt található, tehát a felvett nitrátnak jó része már a gyökérben szerves gyületté alakul.

### Összefoglalás

Kritikai vizsgálat alá vettük a hidroxilamin meghatározására szolgáló Blom-és Lemoigne módszert, és a következő megállapításokra jutottunk:

1. Zavarja a Blom szerinti meghatározást C-vitamin, fenolok, aceton, ill. más ketonok jelenléte. Ha ezeket a vizsgált növény nagyobb mennyiségben tartalmazza, úgy a hidroxilamin direkt meghatározása csak nagy veszteséggel lehetséges.

2. Megállapítottuk a Lemoigne módszer optimális kísérleti feltételeit, melynek betartásával, növénymentes oldat esetén, kvantitatív eredményt kapunk.

3. Növényi anyaggal végezve a Lemoigne-féle meghatározást, a zavaró fenoloknak mintegy egytizede a hidroxilammal átdesztillált s ezt lúgosítás útján megakadályozni nem tudtuk.

4. Az optimális feltételeket be is tartva, a meghatározás eredményének kisebb-nagyobb csökkenése következik be, javasoljuk egy paralel mintához adott ismert mennyiségű hidroxilamin meghatározásával kapott eredmény alapján, az úgynevezett veszteségi tényező használatát.

5. Javasolt módszerünkkel, ha csak a zavaró anyagok által okozott veszteség nem 100%-os, a hidroxilamin tartalom reális értéke kb. 10%-ra pontos reprodukálható pontossággal megállapítható.

6. Módszerünkkel különböző növényeken és könnyezési nedvekben végzett meghatározások általában negatív eredménnyel jártak, kivéve a csökkent anyagcseréjű, (raktározott, télen begyűjtött) növényeket.

Érkezett: 1955. március 1.

### Irodalom

- [1.] Endres, G.: Liebigs Ann. 518. 109. 122. 1935.
- [2.] Jámbor, B.: Magy. Kém. Folyóirat. 57. 275. 1951.
- [3.] Lainei, T. & Virtanen, A.: Baumann és Myrbäck: Meth. Fermentf. 2719. Leipzig 1941.
- [4.] Lemoigne, M. & al.: Bull. Soc. Chim. Biol. 18. 841. 1936.
- [5.] Lemoigne, M. & al.: Bull. Soc. Chim. Biol. 19. 1350. 1937.
- [6.] Schulek, E. & Föti, Gy.: Magy. Kém. Lapja. 55. 7. 1. 1949.
- [7.] Thiel, A.: Absolutkolorimetrie. Berlin 1939.

### МИКРООПРЕДЕЛЕНИЕ ГИДРОКСИЛАМИНА ПРИ ПОМОЩИ ФОТОМЕТРА II. ОПЫТЫ С РАСТИТЕЛЬНОМ МАТЕРИАЛОМ

Ямбор Б. и Киш Е.

Кафедра физиологии растений Университета им. Л. Этвеша, Будапешт (Венгрия)

### Резюме

Авторы критически проверили метод определения гидроксилamina, разработанный Бломом (Blom) и Лемуань (Lemoigne), и установили следующее:

1. Реакции Блома мешает присутствие витамина С, фенолов, ацетона и прочих кетонов.
2. Установили оптимальные экспериментальные условия реакции Лемуань; при

соблюдении этих условий в случае чистого (свободного от растительного материала) раствора получаются количественные результаты.

3. При проведении определения по Лемуань в растительном материале в дистиллат с гидроксиламином вместе переходит примерно 1/10 часть мешающих фенолов.

4. Так как даже при соблюдении оптимальных условий результаты определения более-менее значительно понижены, поэтому авторы предлагают пользоваться т. н. фактором потерь, полученным в результате определения известного количества гидроксилamina, добавленного к параллельной пробе.

5. При помощи предложенного авторами метода содержание гидроксилamina определимо примерно с 10%-ой точностью, если только потеря, обусловленная мешающими веществами, не достигает 100%.

6. Данным методом авторы провели ряд определений гидроксилamina в различных растениях и в пасоке. Эти определения вообще привели к отрицательным результатам, за исключением растений с пониженным обменом веществ (амбарные или убранные зимой растения). Этот факт указывает на то, что при нормальных условиях гидроксилamin не накапливается в растениях в определяемых количествах.

*Рис. 1.* Количество  $(\text{NH}_2\text{OH})\text{—N}$ , определенное видоизмененным методом Блома в соке наплодника *Capsicum annuum* после добавления 8γ  $(\text{NH}_2\text{OH})\text{—N}$  (в %-ах от добавленного количества). Перед определением навеска выдерживалась в течение 1/4 часа при различных значениях рН. 1. Без окисления аскорбиновой кислоты. 2. Аскорбиновая кислота окислена соком *Cucurbita pepo*.

*Рис. 2.* Количество гидроксилamina, определенное в 8γ  $(\text{NH}_2\text{OH})\text{—N}$  при различных значениях рН после выдерживания навески в течение 1/4 часа с 2 мг-ми витамина С (в %-ах от исходного количества).

*Рис. 3.* Количество гидроксилamina, определенное в 8γ  $(\text{NH}_2\text{OH})\text{—N}$  при различных значениях рН после выдерживания навесок в течение 1/4 часа с 1 мг-ом сока различных растений (в %-ах исходного количества). 1. Корень *Raphanus sativus*. 2. Плод *Cucurbita pepo*. 3. Корень *Phaseolus vulg.* 4. Листья *Raphanus sativus*. 5. Корень *Petroselinum sativum*. 6. Листья *Phaseolus vulg.*

*Рис. 4.* Количество гидроксилamina, исчезнувшее из добавленного к 1 г-му различного растительного материала (в зависимости от содержания присутствующего фенола; вместо содержания фенола изображены величины экстинкции, полученной в результате реакции с п-нитро-анилином).

*Рис. 5.* Вариант опыта, показанного на рисунке 4., но вместо  $\text{NH}_2\text{OH}$  добавлен нитрит, а видоизмененный метод Блома проведен без иода.

*Рис. 6.* Величина экстинкции различного количества  $(\text{NH}_2\text{OH})\text{—N}$  (определенная на основании видоизмененного метода Блома), добавленного к 1 г различного растительного материала перед измельчением последнего при рН = 0. 1. Чистый раствор, свободный от растительного материала. 2. Корень *Raphanus sativus*. 3. Наплодник *Capsicum annuum*. 4. Листья *Raphanus sativus*. 5. Листья *Pelargonium zonale*. и 6. Корень.

*Рис. 7.* Количество гидроксилamina, определенное видоизмененным методом Блома при различном времени диазотирования в ацетоксиде (1) и  $\text{NH}_2\text{OH}$  (2), содержащих 8 γ N.

*Рис. 8.* Влияние концентрации серной кислоты на определение  $\text{NH}_2\text{OH}$  в дистиллате (1 мл ацетона + 8 γ  $(\text{NH}_2\text{OH})\text{—N}$  +  $\text{H}_2\text{SO}_4$  различной концентрации, после нагревания в течение 20 минут при 70°C в чашке Петри охлаждение и нейтрализация, затем определение видоизмененным методом Блома).

*Рис. 9.* Опыт, изображенный на рис. 8., но нагревание при 70°C в течение различного времени.

*Рис. 10.* Опыт, изображенный на рис. 8., но нагревание при различной температуре в течение 20 минут.

*Рис. 11.* Влияние количества иода на определение гидроксилamina в дистиллате, содержащем следы ацетона.

*Рис. 12.* Влияние времени диазотирования на определение гидроксилamina в дистиллате, содержащем следы ацетона.

*Рис. 13.* Стандартные кривые  $\text{NH}_2\text{OH}$ , полученные методом 3/с и видоизмененным методом Блома.

## Microdetermination of Hydroxylamine by Photometry II. Studies made with Plant Substances

B. JÁMBOR and J. KISS

Institute for Plant Physiology, L. Eötvös University, Budapest (Hungary)

### Summary

The method of Blom and that of Lemoigne for the determination of hydroxylamine have been subjected to a critical study. The findings are as follows:—

1. The presence of vitamin C, phenols, acetone, or other ketones, interferes with Blom's reactions. If the plant contains them in appreciable amounts, direct determination of the hydroxylamine is not possible except at a great loss.

2. The optimal conditions for the application of Lemoigne's method have been established; they yield a quantitative result provided the solution is a pure one (i. e., free of plant substances).

3. Using plant substances in Lemoigne's method of determination, about one tenth of the interfering phenols is found to distill with the hydroxylamine.

4. In this manner, even though the optimal conditions are adhered to, a more or less substantial decrease is bound to take place. The proposition, therefore, is to add to a parallel sample a known amount of hydroxylamine and to compute from the results of the two determinations the so-called loss coefficient.

5. Unless the loss due to the interfering substances is 100 per cent, the method proposed allows of a reproducible determination of the actual hydroxylamine content, accurate to within 10 per cent.

6. Applied to different plants and bleeding saps the method of determination generally yielded negative results, except for plants of reduced metabolism (i. e., stored plants, or plants harvested in the winter).

*Fig. 1.* Amounts determined with Blom's modified method from 8  $\gamma$  of  $(\text{NH}_2\text{OH})-\text{N}$  added to 1 g of juice from the pod of *Capsicum annuum* and allowed to stand for 15 minutes at various pHs; expressed as percentages of the amounts added. (1) Without destroyed the ascorbic acid. (2) With the ascorbic acid destroyed with the juice of *Cucurbita pepo*.

*Fig. 2.* Amount of hydroxylamine determined from 8  $\gamma$  of  $(\text{NH}_2\text{OH})-\text{N}$  after standing at various pHs with 2 mg of vitamin C for 15 minutes; expressed as the percentage of the amount added.

*Fig. 3.* Amount of hydroxylamine from 8  $\gamma$  of  $(\text{NH}_2\text{OH})-\text{N}$  after standing at various pHs with 1 mg of each of different plant juices for 15 minutes; expressed as the percentage of the amount added. 1. Root of *Raphanus sativus*. 2. Fruit of *Cucurbita pepo*. 3. Root of *Phaseolus vulgaris*. 4. Leaf of *Raphanus sativus*. 5. Root of *Petroselinum sativum*. 6. Leaf of *Phaseolus vulgaris*.

*Fig. 4.* Amounts, as functions of the phenol contents, which disappeared from 8  $\gamma$  of  $(\text{NH}_2\text{OH})-\text{N}$  added to 1 mg of each of different plant substances (extinction values with the p-nitro aniline reaction figure in place of the phenol contents).

*Fig. 5.* A variant of the experiment presented in Fig. 4; nitrite takes the place of  $\text{NH}_2\text{OH}$ , and no iodine is used in Blom's modified method of determination.

*Fig. 6.* Extinction values of  $(\text{NH}_2\text{OH})-\text{N}$ , added in varying amounts to 1 g of each of different plant substances prior to trituration at  $\text{pH} = 0$ , as determined with Blom's modified method. (1) Plant-free pure solution. (2) Root of *Raphanus sativus*. (3) Pod of *Capsicum annuum*. (4) Leaf of *Raphanus sativus*. (5) Leaf of *Pelargonium zonale*. (6) Root of *Pelargonium zonale*.

*Fig. 7.* Amount of hydroxylamine, diazotized for different periods of time, as determined with Blom's modified method from (1) acetoxime and (2)  $\text{NH}_2\text{OH}$  each containing 8  $\gamma$  of N.

*Fig. 8.* Effect of sulphuric acid concentration on the determination of  $\text{NH}_2\text{OH}$  from the distillate (1 ml of acetone + 8  $\gamma$  of  $(\text{NH}_2\text{OH})-\text{N} + \text{H}_2\text{SO}_4$  in different concentration, heated in a Petri dish for 20 minutes at 70 °C, thereafter cooled, neutralised, and subjected to the modified method of Blom).

*Fig. 9.* The same experiment as in Fig. 8, but heated at 70° C for different periods of time.

*Fig. 10.* The same experiment as in Fig 8, but heated for 20 minutes at different temperatures.

*Fig. 11.* Effect of amount of iodine upon the determination of hydroxylamine in distillate containing acetone in traces.

*Fig. 12.* Effect of duration of diazotization upon the determination of hydroxylamine in distillate containing acetone in traces.

*Fig. 13.* Curve 3/c and the standard curve for  $\text{NH}_2\text{OH}$  obtained with Blom's modified method.