

## A fulvósavak minőségi és mennyiségi meghatározása a molibdénkékek reakció alapján

BÉRES TIBOR és KIRÁLY ILONA

*Budapesti Orvostudományi Egyetem Gyógyszerismereti Intézete, Budapest*

A tőzeg-fulvósav frakció terápiás hatásának felismerése az emésztőszervek megbetegedéseinél [3], továbbá az eddigi mezőgazdasági jellegű kísérletek eredményei szükségessé tették, hogy a huminsavak előfokon („Vorstufe”) álló anyagaival behatóbban foglalkozunk.

A terápiás hatás vizsgálatával kapcsolatban a biológiai módszerek mellett a fulvósav jellegű vegyületek kimutatására olyan kémiai reakciót kellett keresnünk, amely alkalmas a vegyületes csoport minőségi és mennyiségi kimutatására.

Ezért vizsgáltuk az ún. molibdénkékek színreakciót.

Azt tapasztaltuk, hogy nemcsak a foszforsav (arzénsav, kovasav) képes ammóniummolibdenáttal savanyú közegben oly komplex vegyületek képzésére, melyeket a legkülönbözőbb redukálószeresek, mint ón(II)klorid [7, 8, 38], 1-2-4-aminonaftolszulfonsav [13, 27], hidrokinon [2], hidrazin [35, 12], fenilhidrazin [37], nátriumhidrogénszulfid [10], nátriumtioszulfát [28], aszkorbinsav [1, 11] molibdénkékké redukálnak, hanem egyes, a huminsavak csoportjába tartozó szerves vegyületek is képesek megfelelő redukálószerekkel a VI értékű molibdent V értékűvé redukálni.

Másrészt úgy találtuk, hogy ezek a fulvósav jellegű anyagok megfelelő ammóniummolibdenát töménység és pH érték mellett minden redukálószer hozzáadása nélkül is kék színreakciót adnak. A foszfátok ezt a reakciót nem adják és ilyen kísérleti körülmények között a fulvósav-ammóniummolibdenátos elegyhez hozzáadva a kék színeződést nem fokozzák.

Így kétféle reakciót vizsgáltunk:

I. A fulvósavakkal *redukálószer alkalmazásával* kapott molibdénkékek reakciót. Erre a célra a kis foszfátmennyiségek meghatározására szolgáló E r d e y, F l e p s és B o d o r által kidolgozott aszkorbinsavas módszert [11] használtuk.

II. A fulvósavaknak ammóniummolibdenáttal *redukálószer nélkül* adott kék színreakcióját. Kísérleteket végeztünk a reakció legjobb körülményeinek megállapítására, hogy alkalmassá tegyük a fulvósavaknak foszfátok jelenlétében történő meghatározására.

Kísérleteink során vizsgáltuk a reakció optimális kifejlődéséhez szükséges savnormalitást, ammóniummolibdenát-töménységet, időt és hőmérsékletet. További célunk az volt, hogy a színreakciókat a fulvósavak mennyiségi meghatározására felhasználjuk. Itt elsősorban az esetleg jelenlevő foszfátok kimutatására és meghatározására voltunk különös figyelemmel.

Miután a kísérleteink tárgyát elsősorban képező tőzeg-fulvósav frakció különböző foszfátokat, illetve foszfátnyomokat tartalmazhat, szükséges volt biztosan foszfátmentes fulvosavakkal is elvégezni a kísérleteket. Erre a célra olyan modell-kísérletet kerestünk *szintetikus fulvósavak* előállítására, mely az emésztőrendszerben élettani körülmények között is végbemeget.

Maillard [29] még 1912-ben leírta az egyszerű cukrok és az aminosavak szabad aminocsoportjai között végbemenő huminsav-képződési, ún. melanoidin reakciót. Az újabb irodalomban ezzel a kérdéssel Lea és Hannan [26], továbbá Gottschalk és Partridge [15], valamint mások is foglalkoztak.

Glukózból és glikokollból nyert szintetikus fulvósav jellegű készítményünket a fenti irodalmi adatok alapján bizonyos módosítással állítottuk elő. Ezt a készítményt használtuk fel a tözeg-fulvósav-frakcióval, a foszfáttal és az aszkorbinsavval felvett grafikonok összehasonlítására.

Az általunk alkalmazott kísérleti körülmények között az tapasztaltuk, hogy az aszkorbinsav maga is ad megfelelő mennyiségű ammóniummolibdenáttal savanyú közegben intenzív molibdénkéék reakciót. Ez a reakció bizonyos koncentráció határok között az aszkorbinsav mennyiségi meghatározására is megfelelőnek látszik. Az irodalomban foszformolibdénsavval [6] és szilikomolibdénsavval ismeretes aszkorbinsav meghatározás a molibdénkéék színreakció alapján.

Bár eljárásunk kidolgozásánál az emberi és állati szervezetre kifejtett hatások vezettek, azonban ezeknek a munkáknak alapját azok a mezőgazdasági szempontból jelentős növényélettani hatások képezik, melyeket a huminsavak, illetve a fulvósavak a növények fejlődésére kifejtenek. Niklewski és munkatársa [30] kimutatták, hogy a huminsavak nagy hígításban különösen a gyökérfejlődésre hatnak serkentőleg. További kutatások felderítették, hogy a növények huminsavas sók hatására több nitrogént, káliumot és foszfort vesznek fel [5, 33]. Niklewski a sejt permeabilitásának a sókkal szemben való megváltozását tételezi fel a huminsavak hatásának okául, Kutny és Pecznik [23] permeabilitásfokozást nem tapasztaltak, a gyökérfejlődés serkentését hormonhatással magyarázzák. Hriszteva szerint [17, 16] viszont a huminsavak iondiszperz állapotban a növényi szervezetbe jutva a növény anyagcseréjére fejtenek ki közvetlen hatást [9]. A növényben az enzimrendszerre, különösen a légzési enzimekre kifejlesztett aktiváló hatást több szerző is bizonyítja [4, 17, 23, 26]. Abból a tényből, hogy az élettani kísérletekben a huminsavak különböző eredetűek voltak, és mégis valamennyi ugyanazt a hatást mutatta, Kononova azt következteti, hogy a huminsavak polifenolvázában kell az élettani hatást keresni. A hidrokinnon, guajakol, tannin szintén a nátrium-humáthoz hasonló, de sokkal gyengébb hatást mutatnak. Ugyanerre az eredményre jut Otto [31] különböző szintetikus kinonoknak a gyökérfejlődésre megfigyelt pozitív hatásánál is. A mikroorganizmusok huminsavtermelő folyamatainak a talajképződésnél van nagy jelentősége. Újabban több, főként német szerző foglalkozott ezzel a kérdéssel [14, 24, 25, 32, 34, 36].

Kraszilnyikov [19, 20, 21, 22] a humuszanyagok kedvező hatását a magasabbrendű növények növekedésére a mikroorganizmusok élettevékenységi termékeinek hatásával magyarázza.

Dragunov 1949-ben megjelent közleménye szerint a huminanyagok különböző mólsúlyú heteropolikondenzátumok, és ennek következtében oldhatóságuk szerint több frakcióra különíthetők. Ennek megfelelően a fulvósavakat vízben oldódó huminsavaknak tekinti. Szerinte a csernozjom-huminsav polifenol vázán sok a kinoid elhelyezésű kettőskötés, a tözeghuminsav molekulában pedig az oxiflavonokhoz hasonló gyűrű, és ortokinon-csoportok találhatók.

Röviden összefoglaltuk azokat a munkákat, melyek mezőgazdasági szempontból fontossá teszik a kérdést. Megemlíjtük még az élelmiszerek barnulását okozó huminsavak és reduktonok képződési folyamatainak felderítésére irányuló kutatásokat is, mert úgy véljük, mind ezekhez, mind a fent felsoroltakhoz hathatós segítséget, megfelelő és használható új módszert nyújtunk.

## Kísérleti rész

A színreakció és a mennyiségi meghatározás optimális körülményeinek megállapítására végzett kísérleteink eredményét a következő pontokban rendszerezük:

- I. A pH helyes megválasztása.
- II. Az ammóniummolibdenát koncentráció helyes megválasztása.
- III. Az idő és hőmérséklet szerepe a színreakció kifejlődésében.
- IV. Különböző töménységű fulvósav- és foszfátoldatok pH görbéinek összehasonlítása.
- V. A szintetikus- és tőzegfulvósav, a foszfát és az aszkorbinsav megfelelő koncentrációjú oldataival kapott pH görbék összehasonlítása.

VI. A színreakciók használhatósága mennyiségi meghatározásokra.

A két módszer részletes tárgyalása előtt meg kívánjuk jegyezni, hogy méréseinket összes kísérleteinkben Pulfrich-féle fotométerrel, S 72-es színszűrővel, 2,5 mm-es küvetákban végeztük. A megadott extinkciók tehát 2,5 mm-es küvetára értendők.

## A. Ammóniummolibdenát-aszkorbinsavas módszer

## I. A pH helyes megválasztása.

A reakció feltételeit ezeknél a kísérleteknél Erdy és munkatársai [11] által kis foszfát-mennyiségek meghatározására kidolgozott módszer alapján választottuk. A vizsgált anyagok:

**Tőzeg-fulvósav.** 5 ml hússzorosra hígított, nátriumhidroxid oldattal fenoltalein jelenlétében közömbösített Fulvatinhoz (így nevezzük a tőzegből előállított és gyógyszerként alkalmazott, kb. 1% szerves szárazanyagot tartalmazó vizes fulvósav oldatot, amely még kb. 2% konyhasót és 0,16–0,22% sósavat tartalmaz) 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 5, 10 ml n kénsavat adtunk, majd 1 ml 5%-os ammóniummolibdenát- és 5 ml 0,1 n aszkorbinsav oldatot (0,88%-os), majd desztillált vízzel 25 ml-re kiegészítettük. Szobahőmérsékleten való 15 perces várakozás után mértük az oldat fényelnyelését.

**Szintetikus fulvósav.** Előállítás: Porcelánmozsárba 2,25 g glikokollt (Glavhimreaksiv Sz.Sz.Sz.R.) eldörzsöltünk 5,4 g glukózával és 0,7 g nátriumkarbonáttal (siccum), majd főzőpohárba téve 6 ml vízzel elegyítettük és lefedtük. A reakcióelegyet 37 fok hőmérsékleten tartottuk termosztátban 5 napon keresztül. A reakcióelegy néhány óra múlva átlátszó, homogén oldatot adott, sárgulni kezdett és az ötödik napon sötétbarnászörös szirup-sűrű anyagot kaptunk.

Az így nyert anyag 5 : 100 arányú vizes oldatának 5-5 ml-ét használtuk a kísérlethez, melyet az előbbi pontban leírt módon végeztünk el.

**Foszfát.** A sorozatvizsgálatokhoz 5-5 ml  $4 \times 10^{-4}$  mólos nátriumdihidrofoszfát oldatot használtunk.

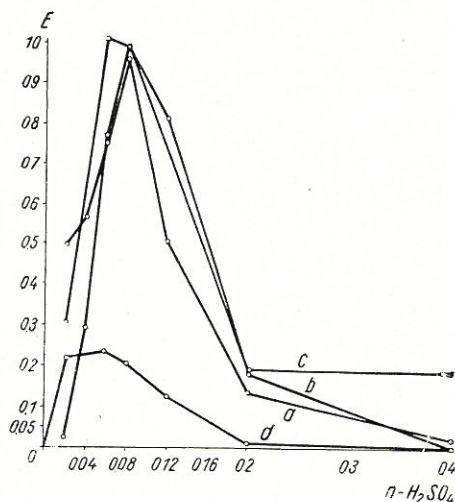
**Aszkorbinsav.** Mivel az előbbi mérések során megfigyelhető volt, hogy a fotometrálnál használt összehasonlító oldatok különösen kisebb savnormalitásnál szintén adnak extinkciós értéket, szükségesnek tartottuk az adott feltételek mellett az aszkorbinsav fotometriás vizsgálatát is. 5 ml 0,1 n aszkorbinsavhoz adtuk az ammóniummolibdenát oldatot és a különböző kénsav mennyiségeket az említett módszer szerint.

Az egyes oldatokat a fényelnyelés mérése előtt szobahőmérsékleten 15 percig állni hagytuk.

A mérések eredményét az 1. ábra tünteti fel. Látható, hogy a tőzeg-fulvósavnál („a” görbe) és a szintetikus fulvósavnál („b” görbe) 0,08 n kénsavas oldat ad maximális extinkciós értéket, a foszfátoknál 0,06 n („c” görbe) az aszkorbinsavnál 0,04 n („d” görbe). A foszfátok pH görbéje lényegesen eltér a tőzeg- és szintetikus fulvósavétól, mert 0,2–0,4 n kénsavkoncentráció között egyenletes, és így jól mérhető fényabszorpciót ad.

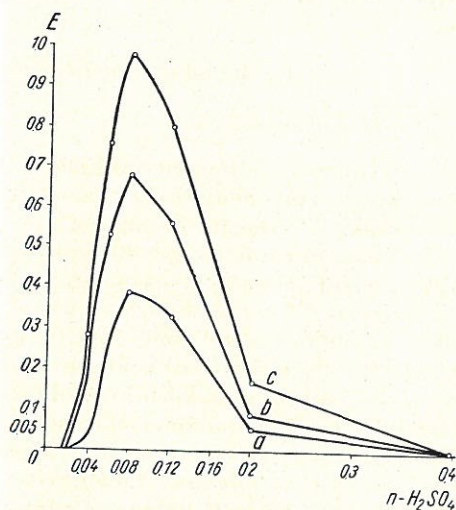
#### II. és III. Az ammóniummolibdenát-koncentráció a mérési idő és hőmérséklet optimális megválasztása.

Mivel a módszert csak összehasonlításra használtuk fel a szintetikus- és tőzeg-fulvósav, az aszkorbinsav és a foszfátok fényelnyelése között, a már említett Erdy cikkben [11] közölt optimális ammóniummolibdenát-koncentrációt és mérési körülményeket alkalmaztuk. Megjegyezzük, hogy igen gyorsan és pontosan kell dolgozni, mert a fulvósavaknál egy-két perces eltérés bizonyos pH értékeknél jelentős különbséget okozhat a szín intenzitásában.



1. ábra

A fényelnyelés változása a pH függvényében.  
a) tőzeg-fulvósav, b) szintetikus fulvósav,  
c) foszfátok, d) aszkorbinsav



2. ábra

Különböző szintetikus fulvósav minták pH görbéi. a) 5 nap múlva, b) 6 nap múlva, c) 8 nap múlva mérve

#### IV. A különböző töménységű fulvósav- és foszfátoldatok pH görbéinek összehasonlítása.

Az I. pontban egy-egy adott koncentrációval vizsgáltuk az extinkciós érték és a pH összefüggéseit. Az így nyert görbékről feltételeztük, hogy ezek az egyes fulvósavakra, illetve foszfátokra és aszkorbinsavra jellemzőek, tehát alkalmasak a fulvósavak minőségi kimutatására. Ennek bizonyítására különböző töménységű oldatokkal vettünk fel pH görbéket. (Vizsgálati módszer az I. pont szerint.)

Szintetikus fulvósavból az összeöntés utáni ötödik, hatodik és nyolcadik napon vettünk mintát (2. ábra a, b, c görbe). A kapott görbék hasonlóak, azonos pH mellett érik el a maximumot, és 0,02 n kénsavkoncentráció alatt és 0,4 n kénsavkoncentrációnál extinkciójuk zérus.

Különböző koncentrációjú foszfát oldatoknál ( $4 \times 10^{-5}$ ,  $4 \times 10^{-4}$ ,  $10^{-4}$ ,  $4 \times 10^{-3}$  mólosak voltak) a felvett görbék közül megállapítható, hogy a foszfát oldatok fényelnyelése az általunk vizsgált koncentrációban 0,06 n kénsavas oldatban maximális és 0,2–0,4 n kénsavkoncentráció esetében még jól mérhető. A  $4 \times 10^{-5}$  mólos oldat gyenge szint ad, csak 0,06 n kénsavban mérhető, a  $4 \times 10^{-3}$  mólos oldattal kapott szín annyira sötét, hogy mérésre alkalmatlan.

*V. A szintetikus- és tőzegfulvósav, a foszfát és aszkorbinsav megfelelő koncentrációjú oldataival kapott pH görbék összehasonlítása.*

A tőzeg-fulvósavak és a szintetikus fulvósavak hasonló pH görbét eredményeztek: azonos pH-nál van a görbe maximuma (0,08 n kénsavas oldatban) és azonos pH-nál (0,2 n savkoncentrációnál) válnak alig mérhetővé az extinkciós értékek.

Ezzel szemben a foszfátok — 0,2-0,4 n kénsavas oldatban — fulvósavakhoz hasonló maximális extinkció esetén is a foszfátmeghatározás céljaira alkalmas, jól mérhető extinkciós értéket adnak.

A foszfátok tehát jól meghatározhatók fulvósavak jelenlétében is (1. ábra, d görbe) az Erdey és munkatársai által megadott módszer szerint. Ezzel a módszerrel 0,08 n kénsavas oldatban a fulvósavak meghatározása is lehetségesnek látszik, azonban foszfátnyomok és 0,2%-nál nagyobb mennyiségben jelenlevő aszkorbinsav zavarhatja a pontos méréseket. A módszer így is nagy előrehaladást jelent, mivel eddig a fulvósavak kimutatására eljárást nem ismertek.

*VI. A módszer mennyiségi meghatározásra való felhasználása.*

A kérdés eldöntésére a már ismert módon vizsgáltuk a meghatározandó anyagok különböző mennyiségeit. 1-10 ml semlegesített, húszszorosra hígított Fulvatint, továbbá 1-10 ml semlegesített, hígított (1 : 100) szintetikus fulvósavat mértünk be és határoztunk meg. A kapott grafikonok (4. ábra „a” és „b” görbéi) azt mutatják, hogy az extinkció a koncentrációval lineárisan változik, tehát a módszer mennyiségi meghatározásra alkalmas.

Fentiek alapján tehát az ammóniummolibdenát-aszkorbinsavas módszerrel a következőképpen határozhatunk meg fulvósavakat :

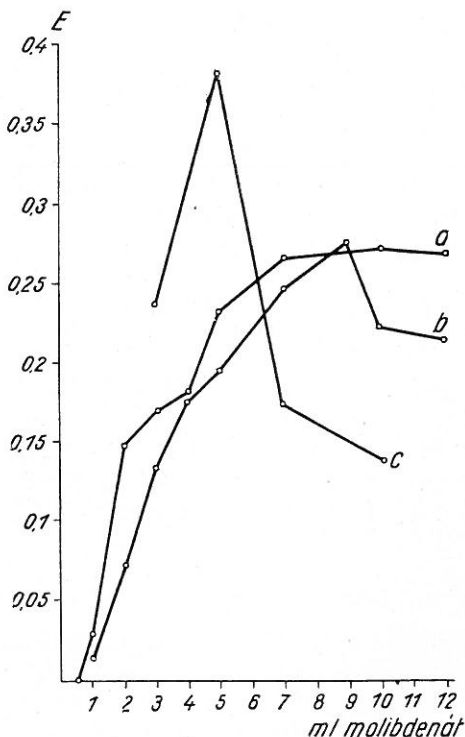
25 ml-es mérőlombikba 5 ml pontosan semlegesített vizsgálandó fulvósav-oldatot mérünk, majd 2 ml n kénsavat, 1 ml 5%-os ammóniummolibdenát-, és 5 ml  $10^{-1}$  n (0,88%-os) aszkorbinsavoldatot adunk hozzá, desztillált vízzel 25 ml-re kiegészítjük, 15 perces szobahőmérsékleten való várakozás után mérjük az oldat fényelnyelését.

*B. Ammóniummolibdenátos módszer redukálószer nélkül*

Amennyiben a reakcióhoz redukálószerrel nem alkalmazunk, más kísérleti körülményeket kell teremtenünk, hogy a jellemző kék szín kifejlődjék. Egyrészt emelni kell az ammóniummolibdenát koncentrációját, másrészt a színreakció kifejlődését melegítéssel kell gyorsítani és mérésre alkalmassá tenni. Az optimális körülményeket ugyanúgy vizsgálat tárgyává tettük, mint az ammóniummolibdenát-aszkorbinsavas módszer esetében.

## I. A pH helyes megválasztása.

Szintetikus fulvósav 1:100 arányú törzsoldatának semlegesített 5 ml-éhez 0,5, 1, 3, 6, 9, 12, 15 ml n kénsavat és 6 ml 5%-os ammóniummolibdenát-oldatot adtunk, majd 25 ml-re kiegészítettük. Az oldatot 15 percig 60 C° hőmérsékletű vízfürdőben tartottuk, 1 percen belül szobahőmérsékletre hűtöttük és leolvastuk a fényabszorpciót.



3. ábra

Az extinkciós értékek és az ammóniummolibdenát oldat mennyiségének összefüggése a szintetikus fulvósav (a), az aszkorbinsav (b) és a tőzeg-fulvósav (c) esetében

vósav 0,12 n kénsavas oldatban ad maximális extinkciós értéket. A kénsav-koncentrációt emelve az értékek lassan csökkennek és még 0,6 n kénsavas oldatban is jelentős extinkciót kapunk. Az aszkorbinsav extinkciós maximuma 0,2 n kénsavas oldatban van; a görbe lassan emelkedik a maximum után lassan csökkenve még a 0,5 n kénsavas oldatban is jól mérhető a fényelnyelés. A tőzeg-fulvósav esetében a maximális extinkció 0,02 n kénsavas oldatban mérhető. Savanyúbb közegben az eltérő zöldes színeződés miatt a görbe nem értékelhető.

## II. Az ammóniummolibdenát koncentráció helyes megválasztása.

A szintetikus fulvósav és az aszkorbinsav vizsgálatok az előbbi pontban leírt törzsoldatból indultunk ki. Az oldatok 5-5 ml-éhez a szintetikus fulvósav esetében 6, a tőzeg-fulvósav esetében 5 ml n kénsavat és 0,5-10 ml-ig különböző mennyiségű 5%-os ammóniummolibdenát-oldatot adtunk, majd desztillált vízzel

Az aszkorbinsavoldatot is azonos módon vizsgáltuk. Kiindulási oldatnak  $10^{-3}$  n aszkorbinsav oldat 5 ml-t használtuk, mert a  $10^{-1}$  és  $10^{-2}$  n oldatok olyan sötét színt adnak, hogy extinkciójuk nem mérhető.

A tőzeg-fulvósav-oldat viszont ezzel a módszerrel csak zöldeskék, vagy zöld színeződést adott, amely melegítéssel inkább halványodott. Kékes színeződést ilyen körülmények között csak 0,004-0,04 n kénsavas oldatban, szobahőmérsékleten való várakozással sikerült elérni. A fenti eljárást azért a következőképpen módosítottuk:

5 ml semlegesített Fulvatin-hoz 1, 2, 5, 10 ml 0,1 n kénsavat és 5 ml 5%-os ammóniummolibdenát-oldatot adtunk, majd 25 ml-re kiegészítettük. A vizsgálandó oldatot az extinkció mérése előtt 30 percig szobahőmérsékleten állni hagytuk.

A fent közölt kísérleti körülmények között a foszfátok nem adnak színreakciót. Ez a különbség lehetővé teszi a foszfátok és fulvósavak egymás melletti kimutatását és meghatározását.

Méréseink grafikus ábrázolásánál azt tapasztaltuk, hogy a szintetikus ful-

25 ml-re kiegészítettük. 15 percig 60°-os vízfürdőben melegítettük az oldatot, majd szobahőmérsékletre hűtve mértük a fényabszorpciót.

A tőzeg-fulvósav vizsgálatakor 5 ml semlegesített Fulvatin-hoz 5 ml 0,1 n kénsavat és 3-10 ml 5%-os ammóniummolibdenát oldatot adtunk, majd 25 ml-re kiegészítettük. 30 perces szobahőmérsékleten való várakozás után mértük a fényelnyelést.

Méréseinknél azt tapasztaltuk (3. ábra), hogy az ammóniummolibdenát-oldat mennyiségét 5 ml-ig növelve, mindhárom vizsgált oldat extinkciós értékei emelkednek. 5 ml-nél a tőzeg-fulvósavnak éles maximuma van („c” görbe), az ammóniummolibdenát oldat mennyiségének további növelésével a görbe meredeken lefelé tart. A szintetikus fulvósav („a” görbe) és az aszkorbinsav („b” görbe) esetében az emelkedés 6-8 ml-ig tart, a két görbe lényegében hasonló egymáshoz.

### III. Az idő és a hőmérséklet szerepe a színreakciók kifejlődésében.

A szintetikus fulvósav színreakciójának kifejlődése szobahőmérsékleten nagyon lassú. 15-30 perc múlva alig észlelhető, 1-3 óra után jól mérhető, 20 óra múlva majdnem teljes a kék szín. A hosszú várakozás elkerülése végett megpróbáltunk különböző időtartamú melegítést alkalmazni. A vizsgálandó oldatokat ugyanúgy állítottuk össze, mint az előző pontban és 5 ill. 7 ml 5%-os ammóniummolibdenát-oldattal 5, 10, 15, 20 percen át melegítettük 60°-os vízfürdőben, majd a lehűtött oldatok fényelnyelését mértük. Megállapítottuk, hogy a szín kifejlődéséhez gyakorlatilag 15 perces melegítés elegendő. A lehűtött oldatok extinkciója szobahőmérsékleten félóra múlva sem változik.

Mivel feltételezhető volt, hogy a kék szín erősségének fokozódása magasabb hőmérsékleten, ilyen kísérleti körülmények között az ammóniummolibdenát felesleg redukciójára vezethető vissza, vizsgálatokat végeztünk különböző töménységű oldatokkal. Ebből a célból 5 ml n kénsavhoz és 6 ml 5%-os ammóniummolibdenát oldathoz 1-10 ml-ig változó mennyiségű, semlegesített, 1:100 arányú hígítású szintetikus fulvósav törzsoldatot adtunk. A desztillált vízzel 25 ml-re kiegészített oldatok extinkcióját szobahőmérsékleten másfél órás várakozás után, szobahőmérsékleten 3 óra múlva, és 60 fokon, vízfürdőben 15 perces melegítés után leolvastuk.

Azt tapasztaltuk, hogy az ammóniummolibdenát oldat feleslege nincs befolyással a keletkezett kék szín intenzitására.

Az aszkorbinsav-oldat vizsgálatához  $10^{-3}$  n töménységű oldat 5 ml-ét használtuk és 5 ill. 7 ml 5%-os ammóniummolibdenátoldatot adtunk hozzá. 5, 10, 15, 20 percen át 60 fokos vízfürdőben melegítve azt állapítottuk meg, hogy 15 perces melegítés után az extinkciós értékek emelkednek ugyan, de elhanyagolható mértékben.

### V. A szintetikus-, a tőzeg-fulvósav és a foszfát megfelelő koncentrációjú oldataival kapott pH görbék összehasonlítása.

A módszer jelentőségét növeli az a körülmény, hogy segítségével a fulvósavak foszfátok jelenlétében is kimutathatók.

Ennek az állításnak igazolására fulvósavakat vizsgáltunk a fent közölt optimális feltételek mellett úgy, hogy az egyes vizsgálandó oldatok 5 ml-éhez szintetikus fulvósav esetében  $4 \times 10^{-4}$  mólos nátriumdihidrofoszfát oldatból adtunk 0-8 ml-ig különböző mennyiségeket, tőzeg-fulvósav vizsgálatok pedig 0-5 ml  $4 \times 10^{-3}$  mólos nátriumdihidrofoszfát oldatot adtunk.

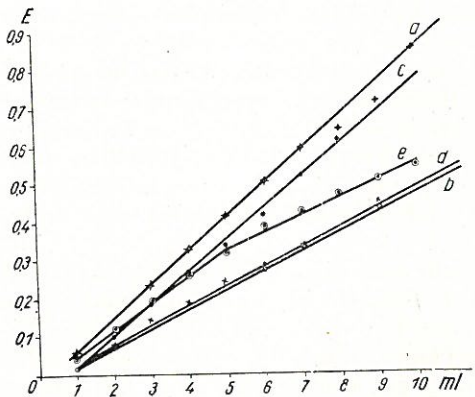
Méréseinkből megállapítottuk, hogy az adott kísérleti körülmények között a foszfát nem befolyásolja a fulvósav extinkciós értékeit. A felvett görbék kisebb-fokú eltolódása talán annak tulajdonítható, hogy a dihidrofoszfát az oldat pH-ját kismértékben megváltoztatja. Feltűnő eredmény, hogy a tőzeg-fulvósav értékeit a  $4 \times 10^{-3}$  mólos foszfát-oldat sem befolyásolta, holott E r d e y módszere [11] szerint az ilyen töménységű foszfát oldatok túltömények és ezért még nem határozhatók meg.

#### VI. A módszer mennyiségi meghatározásra való felhasználása.

A fényelnyelés és koncentráció összefüggésének vizsgálatához olyan oldatokat készítettünk, amelyekben a már tárgyalt optimális kénsav és ammóniummolibdenát mennyiség jelenlétében a vizsgálandó oldat mennyiségét 1-10 ml-ig fokozatosan növeltük, 25 ml össztérfogatban. Szintetikus fulvósavból a szokásos 1:100 hígítású oldatot, aszkorbinsav esetében  $10^{-3}$  n oldatot tőzegfulvósav vizsgálatkor pedig az eredeti Fulvatint használtuk a vizsgálathoz.

Az általunk megállapított legmegfelelőbb idő és hőmérsékleti feltételeket betartva mértük az extinkciót és eredményeinket a 4. ábrán közöljük.

A „c” grafikon a szintetikus fulvósav, a „d” grafikon az aszkorbinsav, az „e” grafikon a tőzeg-fulvósav vizsgálatok kapott eredményeket tünteti fel. A „c” és „d” lineárisan halad, az „e” pedig csak kismértékben tér el a lineáristól. Így a redukálószer nélküli ammónium molibdenátos módszerrel mindhárom anyag mennyiségileg is meghatározható. Az aszkorbinsav kimutatás érzékenységére jellemző, hogy a vizsgálandó oldat végtérfogatának 1 ml-e 1-10  $\gamma$  aszkorbinsavat tartalmazott.



4. ábra

Koncentrációs grafikonok. Redukáló szer alkalmazásával: a) tőzegfulvósav, b) szintetikus fulvósav. Redukálószer alkalmazása nélkül: c) szintetikus fulvósav, d) aszkorbinsav, e) tőzeg-fulvósav

Összegezve a B. pontban tárgyaltakat, két új, kvalitatíve és kvantitatíve egyaránt alkalmazható módszert dolgoztunk ki. A redukálószer nélküli ammóniummolibdenátos módszert melegítéssel egybekapcsolva szintetikus fulvósavat és aszkorbinsavat mutathatunk ki és mérhetünk. Az eljárás a következő:

25 ml-es mérőlombikba bemérünk a megfelelő töménységű fulvósav, ill. aszkorbinsav törzsoldatából 5 ml-t, továbbá 5 ml n kénsavat és 6 ml 5%-os ammóniummolibdenát-oldatot. Desztillált vízzel 25 ml-re kiegészítve az oldatot 15 percen át 60 fokos vízfürdőben melegítjük és szobahőmérsékletre hűtve mérjük a fényabszorpciót.

Melegítés nélkül a módszer a tőzeg-fulvósavak kimutatására és meghatározására is alkalmas. Az eljárás a következő:

25 ml-es mérőlombikba bemérjük a vizsgálandó tőzegfulvósav-oldat 5 ml-ét és 0,5 ml n kénsavat. Ezután hozzáadjuk a vizsgálandó oldat eredeti savasságának semlegesítéséhez szükséges n lúgot, majd 6 ml 5%-os ammóniummolibdenát-



oldatot. A lombikot jelig töltjük és szobahőmérsékleten 30 percig várunk, majd leolvassuk az extinkciós értéket.

Módszereink alapján lehetővé vált a fulvósavak kimutatása és meghatározása, melyre eddig reakció nem volt ismeretes. A módszerek további kutatásainkhoz, pl. a tőzeg-fulvósav egyes frakcióinak elválasztásához és előállításához, továbbá meghatározásához is jelentős segítséget nyújtanak.

### Összefoglalás

A növényélettani és gyógyászati szempontból nagyjelentőségű fulvósavak minőségi és mennyiségi meghatározására eddig módszer nem volt ismeretes. Felismerve azt, hogy a fulvósavak redukálószer jelenlétében, sőt megfelelő körülmények között redukálószer nélkül is adják az un. molibdénkék színreakciót, két fotometriás módszert dolgoztunk ki meghatározásukra. Az *ammóniummolibdenát-aszkorbinsavas módszer* akkor alkalmas kismennyiségű fulvósavak minőségi és mennyiségi meghatározására, ha foszfátok vagy nagyobb mennyiségű aszkorbinsav nincs jelen. — A másik, *redukálószer nélküli ammóniummolibdenátos módszerünkkel* viszont nagyobb mennyiségű foszfátok jelenlétében is kimutathatók és meghatározhatók a fulvósavak, csak az aszkorbinsav jelenléte zavarja itt a meghatározást. Ez a módszer nemcsak a fulvósavak, hanem az aszkorbinsav mennyiségének meghatározására is alkalmas.

Érkezett : 1955. július 21.

### Irodalom

- [1] Ammon, R. & Hinsberg, K. : Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **239**. 207. 1936.
- [2] Bell, R. D. & Doisy, E. A. : J. Biol. Chem. **44**. 55. 1920.
- [3] Béres, T. : Közlés alatt.
- [4] Biber, W. A. & Magazinov, K. M. : Dokladi Akad. Nauk SSSR. **76**. 609. 1951.
- [5] Blagowestschenski, A. W. & Prosorowskaja, A. A. : Biochem. Z. **274**. 341. 1937.
- [6] Camozzo, S. : Ann. Chim. Roma. **41**. 188. 1951.
- [7] Denigès, G. : C. R. Acad. Sci. **171**. 26., 802. 1920.
- [8] Denigès, G. : C. R. Acad. Sci. **186**. 318. 1928.
- [9] Dolgopolov, N. N. & Ruban, B. L. : Priroda. **3**. 102. 1952.
- [10] van Eck, P. N. : Pharmac. Weekblad. Amsterdam. **55**. 1037. 1918.
- [11] Erdey, L., Fleps, W. & Bodor, E. : Magy. Tud. Akad. Kémiai Tud. Oszt. Közl. **4**. 329. 1954.
- [12] Etienne, H. : Bull. Soc. Chim. Belg. **45**. 516. 1936.
- [13] Fiske, C. H. & Subbarov, J. : J. Biol. Chem. **66**. 375. 1925.
- [14] Flaig, W., Küster, E., Segleg-Holzweissig, G. & Beutelspacher, H. : Z. PflErnähr. Düng. **57**. 42. 1952.
- [15] Gutschalk, A. & Partridge, S. M. : Nature. **165**. 684. 1950.
- [16] Hriszteva, L. A. & Manojlova, A. V. : Izv. Akad. Nauk. SSSR. **11**. 10. 1950.
- [17] Hriszteva, L. A. : Rabotü o organicseszkomu veszcesztvu pocsvü. Akad. Nauk. SSSR. Moszkva. 1951.
- [18] Isaace, M. L. : Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. **14**. 948. 1942.
- [19] Kraszilnyikov, N. A. & Gorkina, N. N. : Mikrobiologija. **8**. 952. 1939.
- [20] Kraszilnyikov, N. A. : Mikrobiologija. **8**. 523. 1939.
- [21] Kraszilnyikov, N. A. : Mikrobiologija. **9**. 395. 1940.
- [22] Kraszilnyikov, N. A. : Agrobiologija. **2**. 49. 1949.
- [23] Kuthy, S. & Pecznik, J. : Bodenkunde, PflErnähr. **23**. 83. 1941.
- [24] Küster, E. : Z. PflErnähr. Düng. **57**. 51. 1952.
- [25] Laatsch, W. : Beitr. z. Agrarwiss. Halle. **3**. 3. 1948.
- [26] Lea, C. H. & Hannan, R. S. : Biochim. Biophys. Acta. **3**. 313. 1949.
- [27] Lohmann, F. & Jendrassik, L. : Biochem. Z. **178**. 419. 1926.

- [28] *Losana, L.*: Giorn. de Chim. ind. ed. appl. **4**. 60. 1922.  
 [29] *Maillard, L. C.*: C. R. Acad. Sci. **154**. 66. 1911., **155**. 1554. 1912., **156**. 1159. 1913.  
 [30] *Niklewski, B. & Wojciechowski, J.*: Bodenkunde, Pflernähr. **4**. 294. 1937.  
 [31] *Otto, H.*: Z. Pflernähr. Düng. **56**. 42. 1952.  
 [32] *Ploto, O.*: Z. Pflernähr. Düng. **51**. 212. 1950.  
 [33] *Prosorowskaja, A.*: Sbornik Rabot. NIUF, **12** 7. 1936.  
 [34] *Raitstrick, H.*: Transact. Roy. Soc. London. Ser. B. 220. 1931.  
 [35] *Riegler, F.*: Bull. Sect. Sci. Acad. Roumaine. **2**. 272. 1914.  
 [36] *Scheffer, F., v. Ploto, O. & Welte, E.*: Landw. Forsch. **1**. 81. 1950.  
 [37] *Terada, J.*: Biochem. Z. **145**. 426. 1924.  
 [38] *Wrangell, M. V.*: Landwirtsch. Jahrb. **63**. 669. 1926.

## КОЛИЧЕСТВЕННОЕ И КАЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФУЛЬВОКИСЛОТ ПРИ ПОМОЩИ РЕАКЦИИ С МОЛИБДЕНОВОЙ СИНЬЮ

Т. Береш и И. Кирай

Институт испытания лекарств Будапештского Медицинского Университета, Будапешт (Венгрия)

### Резюме

1. После открытия терапевтического действия фракций фульвокислот торфа, стало необходимым найти метод пригодный для качественного и количественного определения фульвокислот.

2. В ходе наших опытов выяснилось, что фульвокислоты наподобие фосфатов, дают так называемую реакцию с молибденовой синью.

3. Установили далее, что при использовании кислот и молибдената аммония соответствующих концентраций, фульвокислоты дают чувствительную синюю реакцию без добавления восстановителя.

4. В ходе опытов установили, что аскорбиновая кислота в определённой концентрации тоже даёт подобную реакцию.

5. На основании опытов для правильного выбора pH установили, что концентрация кислоты сильно влияет на интенсивность окраски (рисунки 1, 2).

Фульвокислота торфа и синтетическая фульвокислота, при методе с молибденатом аммония и аскорбиновой кислотой, максимальные экстинкционные величины дают в 0,08 н растворе серной кислоты, а в растворах ниже 0,02 и выше 0,4 экстинкционная величина равна 0 кривая pH между 0,04—0,12 очень крута, поэтому при количественном определении изучаемые растворы предварительно необходимо титровать и нейтрализовать. По этому методу фосфаты ( $4 \times 10^{-4}$  м раствора дигидрофосфата натрия) дали максимальную экстинкцию в 0,06 н растворе серной кислоты, а  $10^{-1}$  н раствор аскорбиновой кислоты — в 0,04 н растворе серной кислоты.

Кривые фульвокислот торфа, синтетических фульвокислот, фосфатов и pH аскорбиновой кислоты характерны для отдельных соединений.

В присутствии следов фосфата и значительных количеств аскорбиновой кислоты этот метод для определения фульвокислот применять нельзя. Но фосфаты можно определить и в присутствии фульвокислот и аскорбиновой кислоты по методу Эргеи, Фленс и Бодор (в растворе 0,4 н серной кислоты).

При методе с молибденатом аммония (без добавления восстановителя при нагревании на 60°C в течении 15 минут) синтетическая фульвокислота даёт экстинкцию в 0,12 н растворе серной кислоты и сравнительно медленно снижается, так ещё в 0,6 н серной кислоты показывает значительную величину экстинкции.

Раствор  $10^{-3}$  н аскорбиновой кислоты даёт менее крутую кривую pH, которая в 0,2 н растворе серной кислоты показывает максимальную величину экстинкции.

Фульвокислота торфа в таких опытах не даёт характерную реакцию с молибденовой синью. Окраска имеет зеленоватый оттенок и при нагревании интенсивность окраски снижается. Поэтому в случае определения фульвокислот торфа, вместо нагревания раствор выдерживается 30 минут при комнатной температуре и после этого определяется светопоглощение раствора. При таких условиях фульвокислота торфа даёт очень круто поднимающуюся кривую pH и показывает максимальную величину экстинкции в 0,02 н растворе серной кислоты.

6. В опытах методом молибдната аммония — аскорбиновой кислоты не было изучено благоприятное количество молибдната аммония, роль времени и температуры, а работа велась в оптимальных условиях, определенных Эргеи и его сотрудниками. Для получения максимальных величин экстинкции при методе молибдната аммония без восстановителя необходимо нагревание, при определении синтетических фульвокислот и аскорбиновой кислоты в случае если в 25 мм окончательного объема содержится 6–8 мл 5% раствора молибдната аммония производят нагревание на водяной бане при 60°C в течение 15 минут. Фульвокислота торфа с 5 мл раствора молибдната аммония даёт максимальную экстинкцию при комнатной температуре при выдерживании в течение 30 минут (см. рисунок 3.).

7. Разработаны два метода для определения фульвокислот. Метод молибдната аммония — аскорбиновой кислоты пригоден для определения фульвокислот, но в присутствии больших количеств фосфатов и аскорбиновой кислоты этот метод применять нельзя.

Второй наш метод, это метод молибдната аммония без восстановителя. Для определения фульвокислот он пригоден и в присутствии большого количества фосфатов, но небольшое количество аскорбиновой кислоты уже мешает определению. Этот метод пригоден для количественного определения не только фульвокислот, но и аскорбиновой кислоты. Полученный график показывает, что метод можно применять даже если в 1 мл окончательного объема раствора содержится 1–10  $\gamma$  аскорбиновой кислоты (рисунок 4.).

Рис. 1. Изменение светопоглощения в зависимости от pH. a) Фульвокислота торфа.

b) Синтетическая фульвокислота. c) Фосфаты d) Аскорбиновая кислота.

Рис. 2. Кривые pH образцов различных синтетических фульвокислот. a) SF II. через 5 дней. b) SF III через 6 дней. c) SF VI. через 8 дней.

Рис. 3. Взаимосвязь величин экстинкции и количества раствора молибдната аммония в случае синтетической фульвокислоты (a), аскорбиновой кислоты (b) и фульвокислоты торфа (c).

Рис. 4. Графики концентрации. При использовании восстановителя: «a» фульвокислота торфа, «b» синтетическая фульвокислота. При методе без использования восстановителя: график концентрации «c» синтетической фульвокислоты «d» аскорбиновой кислоты, «к» фульвокислоты торфа.

## Qualitative and Quantitative Determination of Fulvic Acids by Means of the Molybdenic Blue Reaction

T. BÉRES and I. KIRÁLY

Institute of Pharmacognosy, Medical University of Budapest (Hungary)

### Summary

1. Their therapeutic action recognised, peat fulvic acids call for suitable methods of qualitative and quantitative determination.

2. It has been found that fulvic acids give the same molybdenic-blue reaction as phosphates.

3. Even in the absence of a reductant, they yield a blue colour, provided acid and ammonium molybdate are applied in adequate concentrations.

4. At certain sulfuric-acid concentrations, ascorbic acid likewise gives these reactions.

5. Experiments to establish the right pH revealed the sulfuric-acid concentration in the solution to exert a marked influence on colour intensity (Figs. 1 and 2).

On applying the ammonium molybdate-ascorbic acid method peat fulvic acid and synthetic fulvic acid give the highest extinction values in 0,08 N sulfuric-acid solution. With the concentration of sulfuric acid less than 0,02 N or more than 0,4 N, the extinction values are zero. The pH curve between 0,04 and 0,12 N concentrations being very steep, the solutions to be tested must first be titrated and neutralized.

With the same method, phosphates ( $4 \times 10^{-4}$  mole of sodium dihydrophosphate solution) give an extinction maximum in a 0,06 N sulfuric-acid solution, and ascorbic acid ( $10^{-1}$  N solution) in a 0,04 N sulfuric-acid solution.

Peat and synthetic fulvic acids, ascorbic acid, and phosphates, being characterized by their respective pH curves, the method permits of determining the fulvic acids, but should not be applied in the presence of phosphates in traces, or ascorbic acid in substantial amounts. Phosphates, on the other hand, can be readily determined in the presence of fulvic acids and ascorbic acid, using the method of Erdey, Fleps, and Bodor.

On applying the ammonium molybdate method, without the addition of a reducing agent yet heating the compound at 60 °C for 15 minutes, synthetic fulvic acid gives the highest extinction value in a 0,12 N sulfuric-acid solution; the pH curve then descends relatively slowly, and the extinction value is still measurable in a 0,6 N sulfuric-acid solution.

The pH curve of the 10<sup>-3</sup> N ascorbic acid is less steep and shows an extinction maximum in a 0,2 N sulfuric-acid solution.

Peat fulvic acid, under these experimental conditions, fails to give the characteristic molybdic-blue reaction; instead, the discolouration is of a greenish blue, and its intensity diminishes on heating. On this account, the extinction of peat fulvic acid was measured without heating the solution, merely allowing it to stand for 30 minutes at room temperature. The resulting pH curve ascends very steeply, and indicated the highest extinction value in a 0,02 N sulfuric acid solution.

6. The optimum amount of ammonium molybdate to be used in our experiments with the ammonium molybdate-ascorbic acid method, and the roles played by time and temperature were not studied by us; instead, the experimental conditions described by Erdey and collaborators as the most favourable ones were accepted in making comparisons with the phosphates. Using the ammonium molybdate method (in the absence of a reducing agent but heating the solution) for the determination of synthetic fulvic acid and ascorbic acid, a sample of 25 ml is required to contain 6 to 8 ml of 5%-ammonium-molybdate solution and to be heated for 15 minutes over the water bath at 60°C, in order to yield the maximum extinction value. Peat fulvic acid gives this value on the addition of 5 ml of ammonium molybdate solution after it had been allowed to stand for 30 minutes at room temperature.

7. Ultimately, two methods have been elaborated for the determination of fulvic acids. One is the ammonium molybdate-ascorbic acid method which is suitable for the estimation of fulvic acids provided no phosphates or substantial amounts of ascorbic acid are present in the solution. The other is the ammonium molybdate method, without employing a reducing agent, which can be applied in the determination of fulvic acids irrespective of phosphates, but in which ever lesser amounts of ascorbic acid interfere with the determination. This method lends itself not only to an estimation of fulvic acids, but also to a quantitative determination of ascorbic acid. The curves obtained show that with our method 1 to 10  $\gamma$  of ascorbic acid can be determined in a sample of 1 ml.

#### Captions

Fig. 1. Changes in extinction in dependence on pH; a) peat fulvic acid; b) synthetic fulvic acid; c) phosphates; d) ascorbic acid.

Fig. 2. pH curves obtained for different synthetic fulvic acid samples when, a) measured after 5, b) after 6, and c) after 8 days.

Fig. 3. Interrelation of extinction values and amount of ammonium molybdate solution in, a) synthetic fulvic acid, b) ascorbic acid, and c) peat fulvic acid.

Fig. 4. Diagram of concentrations. In the presence of a reductant, a) peat fulvic acid, b) synthetic fulvic acid; in the absence of a reductant, c) synthetic fulvic acid, d) ascorbic acid, e) peat fulvic acid.