

Adatok a fulvosavak redukciós reakcióihoz és kromatográfiás vizsgálatához

BÉRES TIBOR és KIRÁLY ILONA

Orvostudományi Egyletem Gyógyszerismereti Intézete, Budapest

A fulvosavak kémiai és biológiai kutatása folyamán elsősorban olyirányú kémiai vizsgálatokkal foglalkozunk, melyek közelebb vezetnek élettani hatásuk felderítéséhez is.

Az irodalomban a biológiai természetű kutatások közül mezőgazdasági és növény-élettani vonatkozásban jelent meg több közlemény, melyek szerint a huminsavaknak és fulvosavaknak különösen a gyökérképződésre kifejtett serkentő hatása feltűnő (Niklowsky és munkatársai [23]). Kúthy és Pecznik [19] szerint a huminsavak növényeknél hormonjellegű hatást fejtenek ki. A növényi anyagcsere és elsősorban a légzési enzimek aktiválására kifejtett hatásának felismerése a legutóbbi évek eredménye (Hrisztéva [17, 18], Biber és Magazinov [6]). Ezek a növényi szervezetre kifejtett biológiai hatások is indokolták, hogy az állati szervezetre gyakorolt hatásokkal is foglalkozzunk, annál is inkább, mivel ilyen szempontból még nem vizsgálták e kérdést. A mezőgazdasági irodalomban főleg az istállótrágya humusz-anyagaival foglalkoztak és többen rámutattak arra, hogy ezek az anyagok nyilvánvalóan az állatok béltraktusából származnak [29].

Egy másik munkánkban beszámoltunk arról [2], hogy az emberi fécesz szárazanyagának mintegy 15–20%-a ún. fécesz-huminsav. A fécesz-huminsavak előállítása és izolálása bizonyítja, hogy az emésztés folyamán a béltraktusban valóban keletkeznek huminsavak. Az emberi és állati béltraktusban lezajló huminsav képződési folyamatot nem ismerjük és csak *in vitro* modellkísérletben valószínűsíthetjük annak egyes fázisait. A fehérje és szénhidrát lebontási termékek: az aminosavak és egyszerű cukrok egymásra hatásából tágabb értelemben a huminsavak csoportjába tartozó vegyületek keletkeznek [14, 20, 21]. Pl. glükoll és glükóz gyengén lúgos elegyében 37 fokon már 24 óra alatt fulvosav jellegű redukáló anyagok mutathatók ki. Ezek vízben még oldhatók és így felszívódásuk — ennek következtében élettani hatásuk — könnyebben lehetséges. Ennek alapján merül fel a huminsavak előanyagainak, a fulvosavaknak terápiás felhasználási lehetősége egyes emésztőszervi megbetegedések gyógyításában. Ezt a feltevést igazolták azok az eredmények, amelyeket a tőzegtől előállított fulvosavval terápiás kísérletekben, emésztőszervi megbetegedéseknél részben egyikünk saját beteganyagán, részben pedig klinikákkal és kórházakkal együttműködve, az ottani beteganyagon tapasztaltunk.

A kémiai irodalomban a fulvosavak alatt a huminsavaknak vízben, alkoholban sárga színnel oldódó, híg ásványi savval le nem csapható csoportját értjük, melyet a német irodalom egyrésze „Huminsäure Vorstufe” névvel jelöl. Molekulasúlyuk a régebbi irodalmi adatok szerint 800 körül van, de feltételezik sokkal kisebb molekulasúlyú fulvosavak létezését is. A fulvosavakat először Berzelius [5] állította elő; a Porla-forrás vizében sárga színű szerves savakat talált; rézsójuknak ecetsavban oldódó részét krénsavnak, a csapadékban maradó részt apokrénsavnak nevezte el (Görögül krén = forrás).

2. Másik módszerünk alapja az, hogy a fulvosavak nagyobb ammóniummolibdenát- és sav-koncentráció alkalmazásával redukálószer hozzáadása nélkül is adnak színreakciót. Ez a módszerünk a kidolgozott feltételek között alkalmas a fulvosavak meghatározására nagyobb mennyiségű foszfát jelenlétében is, viszont kismennyiségű aszkorbinsav jelenléte zavarja a meghatározást.

Ebből a tényből kiindulva vizsgáltuk a fulvosavak redukáló tulajdonságait az irodalomban az aszkorbinsav meghatározására ismeretes reakciók és módszerek segítségével.

Ezek a vizsgálatok azért is szükségesnek látszottak, mivel ismeretes, hogy az élelmiszerekben, különösen azok harnulási folyamatai során fulvosav jellegű, vagy legalább is a fulvosavakhoz közelálló anyagok (reduktonok) keletkeznek, és az elvégzett C-vitamin meghatározások az irodalmi adatok szerint sem adnak reális értéket [30, 31, 35, 36, 37].

Kutatásaink további során vizsgálat tárgyává tettük a kromatográfiásan elválasztott egyes fulvosav-frakcióknak a fenti reakciók segítségével való jellemzésének lehetőségét is.

Az egyes fulvosavak kromatográfiás szétválasztására az irodalomban több módszer ismeretes. Forsyth [12] aktív szén alkalmaz a talajfulvosavak adszorbeálására és különböző oldószerekkel eluálja az egyes frakciókat; ezenkívül több szerző, így Dragunov, Schlichting, Han, Drozdova [8, 9, 15, 25] is foglalkozott ezzel a kérdéssel. Kísérleteink során új és egyszerűbb módszert igyekeztünk kidolgozni a fulvosavak kromatográfiás szétválasztására.

Kísérleti rész

1. A tőzegfulvosavak és az aszkorbinsav molibdénkékes, α - α' -dipiridiles bromatometriás és diklórfenolindofenolos reakcióinak összehasonlítása

Kísérleteink első részében az előző közleményünkben [4] ismertetett fotometriás, molibdénkékes aszkorbinsav meghatározási módszer eredményeit hasonlítottuk össze Schulek és munkatársai [26, 28] által kidolgozott α - α' -dipiridiles módszer eredményeivel. Ez utóbbi eljárás során a szerzők által megadott 40-250 γ közötti aszkorbinsav mennyiség meghatározásához előírt körülmények között 30 mm-es küvettát, nagyobb mennyiségek vizsgálatakor pedig 20 mm-es küvettát használtunk.

Az általunk kidolgozott molibdénkékes meghatározást kísérleteink során a következőképpen végeztük:

25 ml-es mérőlombikba $5 \cdot 10^{-4}$ n, illetve 10^{-3} n aszkorbinsav oldat 1—10 ml-ét, továbbá 5 ml n kénsavat és 6 ml 5%-os ammóniummolibdenát oldatot mértünk be. Desztillált vízzel 25 ml-re kiegészítve 15 percen át 60 fokos vízfürdőben melegítettük, ezután folyóvízzel azonnal szobahőmérsékletre

1. táblázat

10^{-3} n aszkorbinsav oldattal végzett meghatározások

Oldat ml	Számított aszkorbinsav (γ)	Talált aszkorbinsav (%)	
		molibdenátos	dipiridiles
módszerrel			
0,5	44	42	46
1	88	86	91
1,5	132	128	137
2	176	173	182
2,5	220	214	218
3	264	258	256
3,5	308	300	305
4	352	351	345
5	440	441	418
6	528	539	498
7	616	639	578
8	704	730	654
9	792	854	—
10	880	947	—

hűtöttük. Az oldat extinkciós értékeit Pulfrich-féle fotométerrel S 72-es színszűrőt és 2,5, ill. 5 mm-es küvettát alkalmazva olvastuk le.

Az eredményeket az 1. táblázatban foglaltuk össze, melyből megállapítható, hogy az α - α' -dipiridiles módszerrel 350 γ -nál nagyobb aszkorbinsav mennyiség esetében az eredmények a számítottnál valamivel magasabbak. Módszerünk 50—500 γ közötti aszkorbinsav mennyiség meghatározására alkalmas a megadott kísérleti körülmények között. Tekintve, hogy a mérést 2,5, ill. 5 mm-es küvettában végeztük, amihez 1—2 ml vizsgálandó oldat elégséges, a végtérfoogat szükség esetén tizedére csökkenthető a vegyszerek mennyiségének arányos alkalmazásával. A meghatározás tehát 5 γ aszkorbinsavval is elvégezhető.

További kísérleteinkben a tőzegfulvosavval végeztük el az aszkorbinsav néhány ismert meghatározási módszerét.

2. táblázat

1⁰/₀₀-es tőzegfulvosav oldat molibdénkékes és dipiridiles módszerrel meghatározott redukáló ereje

Oldat ml	Molibdénkékes módszer aszkorbinsav		k. é. mg/ml	Dipiridiles módszer aszkorbinsav γ -ban	k. é. mg/ml
	γ -ban	mg/ml			
1	23	0,230		57	
3	69	0,229		113	
5	115	0,230		191	
6	147	0,245	0,233	221	0,37
7	165	0,235		251	
8	183	0,228		278	
10	235	0,235		334	

3. táblázat

1⁰/₀₀-es tőzegfulvosav-oldat diklórfenolindofenolos módszerrel meghatározott redukáló ereje aszkorbinsavban kifejezve

Bemért diklórfenolindofenol oldat ml	Fogyott tőzegfulvosav oldat ml	Számított aszkorbinsav (γ)	Talált aszkorbinsav γ /ml vizsgált oldat	k. é. mg/ml
5	1,80	50	27,7	
10	3,75	100	26,7	
15	5,60	150	26,8	27,7
20	6,95	200	28,8	
25	8,75	250	28,6	

1. a) Az α - α' -dipiridiles meghatározást az V. Magyar Gyógyszerkönyv (I. kötet, 135. o.) előírása szerint végeztük.

b) Az általunk kidolgozott molibdénkékes fotometriás meghatározást az alábbiak szerint végeztük:

25 ml-es mérőlombikba bemértük a vizsgált tőzegfulvosav-oldat 1—10 ml-ét majd 0,5 ml n kénsavat adtunk hozzá, jól összeráztuk, ezután a törzsoldat eredeti savasságának semlegesítésére szükséges 0,1 n nátronlúgot és 6 ml 5%-os ammóniummolibdenát-oldatot adtunk hozzá. A reakciós elegyet 30 percen át szobahőmérsékleten állni hagytuk, majd az előbbieken leírt módon mértük az oldat fényelnyelését.

Az a) és b) pontban leírt meghatározásokat 1⁰/₀₀-es tőzegfulvosav-oldat 1—10 ml-ével több, jól egyező parallel kísérletben ($\pm 5\%$) végeztük el. A kapott értékeket a 2. táblázatban foglaltuk össze és a mérések eredményeit, tehát az oldat redukálóerejét aszkorbinsavban fejeztük ki.

A táblázatból megállapítható, hogy míg a molibdénkékes módszerünkkel a tőzegfulvosav szélesebb koncentrációhatárok között (23—235 γ) is jól egyező eredményeket ad, addig a dipiridiles módszer — aszkorbinsav meghatározására 40—250 γ között alkalmazható — a kísérletek eredménye szerint a tőzegfulvosav esetében csu-

pán 100—250 γ között ad összevágó eredményeket mg/ml aszkorbinsav értékben kifejezve. Ezen koncentrációs határok között kapott értékek is lényegesen magasabbak a molibdénkékes módszerrel kapott értékeknél. Ez a tény azzal magyarázható, hogy a tőzeg feltárásakor a feltehetően komplex alakban levő vasat a fulvosavak ferriónná redukálták, amely közvetlenül ferrodipiridil komplexet képez. Ezzel a kérdéssel további kísérleteink során behatóbban foglalkozunk.

2. A Tillmans-féle [32, 33, 34] diklórfenolindofenolos módszerrel úgy végeztük a meghatározást, hogy kb. 10/100-es tőzegfulvosav oldattal titráltuk a Hoffmann La Roche-féle készítmény oldatát, melynek 1 ml-e 10 γ aszkorbinsavat jelez. A vizsgált oldatok sárga színe miatt a színátcsapás így is igen nehezen volt észlelhető.

A kapott eredmények szerint a diklórfenolindofenolos módszer a molibdénkékes módszerrel nagyjában megegyező, de ennél valamivel nagyobb értékeket ad.

3. Schulek és Kovács [27] által kidolgozott bromatometriás módszert a következőképpen alkalmaztuk:

Az eredeti 1%-os tőzegfulvosav-oldat 1—10 ml-éhez 100 ml-es Erlenmeyer-lombikban 5 ml R-sósavat (2 mol) és 10 ml vizet adtunk, majd 0,5 g káliumbromidot oldunk fel benne. Az oldatot 0,01 n káliumbromát-oldattal, 1—2 csepp p-etoxikrizoidin oldatot használva indikátorul, halványsárga színig titráltuk. A kapott eredményeket a 4. táblázatban foglaltuk össze.

Az eredmények szerint tehát az általunk vizsgált módszerek közül a bromatometriás módszerrel kaptuk a legmagasabb értékeket.

Az 5. táblázatban a különböző módszerekkel kapott 1%-os tőzegfulvosav oldatra átszámított és aszkorbinsav

4. táblázat
1%-os tőzegfulvosav-oldat bromatometriás módszerrel meghatározott redukálóereje aszkorbinsav mg-ban kifejezve

Bemért oldat ml	Fogyott 0,01 n bromát ml	k. é. mg/ml	Aszkorbinsav mg	k. é. mg/ml
1	0,60		0,528	
2	1,25		1,100	
3	1,90		1,672	
4	2,45		2,156	
5	3,00		2,640	
6	3,55	0,603	3,124	0,532
7	4,18		3,674	
8	4,80		4,224	
9	5,35		4,708	
10	5,95		5,236	

5. táblázat
1%-os tőzegfulvosav-oldat molibdénkékes, α - α' -dipiridíles, bromatometriás és diklórfenolindofenolos módszerrel meghatározott redukáló ereje aszkorbinsav mg-ban kifejezve

Bemért oldat ml	Molibdéná-	Dipiridíles	Bromato-	Diklórfenol-
	tos		metriás	indofenolos
módszerrel talált aszkorbinsav mg-ban				
1	0,230	0,570	0,528	0,277
2	—	—	1,100	0,554
3	0,688	1,130	1,672	0,831
4	—	—	2,156	1,108
5	1,150	1,910	2,640	1,385
6	1,470	2,210	3,124	1,662
7	1,650	2,510	3,674	1,939
8	1,830	2,780	4,424	2,216
9	—	—	4,708	2,493
10	2,350	3,340	5,236	2,770

mg-ban kifejezett értékeket tüntettük fel, összehasonlítás céljából. A táblázatból látható, hogy a molibdénkékes és diklórfenolinclófenolos módszerrel lényegében hasonló értékeket kaptunk, míg az α - α' -dipiridiles és bromatometriás módszer eredményei az előbbieknél mintegy kétszeresei voltak. Ezekből az összehasonlító értékekből a szerkezetre (esetleg enol-csoportra) nem lehet következtetni, mert a vizsgált tőzegfulvosav redukáló ereje különböző komponensekből tevődik össze, mint azt a továbbiakban ismertetendő kromatográfiás módszerünkkel elválasztott frakciók vizsgálatakor kapott eredmények mutatják.

A szintetikus jellegű fulvosavakkal (glükokoll + glükóz) is elvégeztük a fenti meghatározásokat és pozitív redukáló értékeket kaptunk. E kísérlet eredményeinek ismertetése meghaladja jelen munkánk kereteit.

2. A tőzegfulvosavak kromatográfiás szétválasztása és vizsgálata

A tőzegfulvosavak kromatográfiás elválasztásakor az volt az elgondolásunk, hogy a fulvosavakat mint sárga anyagokat szerves oldószerben vigyük megfelelő adszorbens oszlopra és a karotinoidok kromatografálásához hasonlóan az egyes gyűrtükbe széthúzott frakciókat az oszlop kitolása után szétvágva külön-külön elháljuk.

Oldószerül a 96%-os etanolt találtuk a legjobbnak. Kísérleteink eredményeként azt tapasztaltuk, hogy a különböző eredetű fulvosavak, mint a tőzegfulvosav, szintetikus fulvosav (glükokoll + glükóz) és a különböző reduktonok kitűnően oldódnak 96%-os etilalkoholban, ha megfelelő mennyiségű sósavat is adunk a feloldandó anyaghoz. Ha a száraz maradék nem elég savanyú kémhatású, az anyag nem oldódik és az alkohol szintelen marad. Ha azonban tömény sósavat adunk az alholos oldathoz, a fulvosavak sárga színnel azonnal oldódnak.

A kromatografáláshoz adszorbensül Brockmann-féle alumíniumoxidot használtunk. A vizsgálathoz sósavas 1%-os tőzegfulvosav-oldat 200 ml-ét használtuk, melyet pH 4-re állítottunk be. Az oldat vákuumban szárazra párolt maradékának 60 ml alkohollal és 2,5 ml konc. sósavval készült oldatát kromatografáltuk. (A jelenlévő nátriumklorid alkoholban nem oldódik.)

6. táblázat

Kromatografiával elválasztott tőzegfulvosav frakciók redukáló ereje aszkorbinsav mg-ban kifejezve, 1%-os oldatra számítva

Félezés	Bemért oldat ml	Redukáló erő aszkorbinsav mg-ban kifejezve			
		molibdénkékes	dipiridiles	bromatometriás	diklórfenolinclófenolos
		m ó d s z e r r e l			
I.	5	∅	0,921	1,008	0,364
I.	10	∅	1,200	1,760	0,728
II.	5	∅	0,993	0,817	0,750
II.	10	∅	1,343	1,320	0,900
III.	5	0,928	1,093	1,383	0,525
III.	10	1,875	1,893	2,860	1,050

A kromatografálást 14 cm hosszú, 3 cm átmérőjű csőben, előzőleg 96%-os alkohollal megnedvesített Brockmann-féle alumíniumoxid oszlopon végeztük. A vizsgált oldatot az oszlopra öntöttük, majd kb. 240 ml 96%-os alkohollal utánamosztuk.

A kromatográfiás oszlopon három főfrakciót tudtunk szétválasztani:

I. Vörösesbarna színű, kb. 4 cm széles réteg, mely analitikai kvarclámpa alatt szürkésfehér fluoreszcenciát mutat.

II. Szürkésbarna színű, kb. 7 cm széles réteg, mely UV fényben szürkén fluoreszkál.

III. Zöldesszürke színű, kb. 3 cm széles réteg, mely nem fluoreszkál.

Az oszlop átmosásakor gyengén sárga színű frakció ment át, mely az oszlopon nem adszorbeálódott.

A kromatográfiás oszlopot a fenti frakciók szerint szétvágtuk és az egyes frakciókat szárítószekrényben, 60 fokon a jelenlevő alkohol elűzése céljából kiszárítottuk. Mindhárom frakciót 75—75 ml n sósavval könnyen eluáltuk.

Az egyes eluált frakciók szárazanyag tartalma:

I. 0,7%, II. 0,67%, III. 1,4%.

A tőzegfulvosav kromatográfiásan szétválasztott és eluált frakcióival elvégeztük az előbbi részben ismertetett, a tőzegfulvosav-oldatra alkalmazott, annak redukáló tulajdonságán alapuló reakciókat.

A vizsgálatokat az egyes frakciók 5, 10, 15 ml-es részleteivel végeztük és azt találtuk, hogy a molibdénkékes reakciót az I. és II. frakció nem adja, viszont a III. frakció kifejezetten adta. Ezzel szemben redukálószer jelenlétében 0,08 n kénsavas oldatban mindhárom, a foszfátokhoz hasonlóan redukálja az ammóniummolibdenátot.

Az α - α' -dipiridiles, a bromatometriás és a diklórfenolindofenolos módszerrel mind a három frakció kifejezetten redukáló tulajdonságúnak mutatkozott.

A kapott mennyiségi értékek összehasonlítása céljából az eredeti tőzegfulvosav oldatnak megfelelően 1%-os oldatra számítottuk és a redukálóerőt aszkorbinsav mg-ban kifejezve a 6. táblázatban tüntettük fel.

A táblázatból megállapítható, hogy az α - α' -dipiridiles és bromatometriás módszerekkel kapott eredmények hasonlóak, míg a diklórfenolindofenolos módszerrel kapott értékek ezeknél lényegesen kisebbek. Az egyes frakciók 5 és 10 ml-ének bemérése esetén kapott eredmények eltérésének magyarázatára további kísérleteket végzünk.

Az eredeti tőzegfulvosav oldattal kapott eredményekkel összehasonlítva az egyes frakciók értékeit, az utóbbiak lényegesen kisebbek. Egyedül a molibdénkékes módszer eredményei — melyeket a kromatografálással nyert frakciók közül csak a III. frakció adott — egyeznek meg az eredeti tőzegfulvosavval nyert értékekkel.

Megállapítható, hogy a tőzegfulvosav kromatográfiás frakcióinak színreakciója alapján való megkülönböztetésére a molibdénkékes reakció alkalmas. A reakciót egyedül az alsó, III. frakció adja az eredeti tőzegfulvosav oldattal lényegében megegyező intenzitással.

Feltűnő, hogy egyedül ez az alul adszorbeálódott III. frakció gyakorol biológiai (fungosztatikus) hatást az *Epidermophyton* Kaufmann—Wolf és a *Candida albicans*-ra, az eredeti tőzegfulvosavval megegyezően [3]. Florián vizsgálatai szerint. Ezekből a kísérletekből azonban még nem szabad következtetéseket levonni a molibdénkékes és biológiai reakciók összefüggésére, mert más vizsgált anyagok közül pl. az aszkorbinsav, bár adja a molibdénkékes reakciót, még sem fejt ki kellő biológiai hatást, még 0,88%-os oldatban sem.

Összefoglalás

1. Előző munkánkban [4] a fulvosavak meghatározására a molibdénkékes reakció alapján kétféle módszert dolgoztunk ki. Eljárásunkkal nem csak különböző eredetű fulvosavak — tőzegfulvosav, szintetikus fulvosav (glükokoll + glükóz), redukton — hanem az aszkorbinsav is meghatározhatók.

2. Jelen dolgozatunkban a tőzegfulvosav meghatározására az aszkorbinsav néhány ismert meghatározási módszerét — az α - α' -dipiridiles, diklórfenolindo-

fenolos, bromatometriás eljárást — alkalmaztuk és a kapott értékeket — aszkorbinsav mg-ban kifejezve — összehasonlítottuk molibdénkékes módszerünk eredményeivel.

Kísérleteink során a molibdénkékes és a diklórfenol-indofenolos módszerrel a tőzegfulvosav meghatározásakor lényegében hasonló értékeket kaptunk, míg az α - α' -dipiridiles és bromatometriás módszer mintegy kétszeres redukáló értékeket eredményezett.

3. Feltételeztük, hogy a vizsgált tőzegfulvosav oldat redukáló ereje több összetevőből adódik, ezért kromatográfiás módszerrel vizsgáltuk. Az alkoholban, kevés tömény sósav jelenlétében oldódó tőzegfulvosavakat Brockmann-féle alumíniumoxid-oszlopon három frakcióra és egy nem adszorbeálódott, átmenő részre sikerült szétválasztani. Az adszorbeálódott frakciók a sósavval könnyen eluálthatók. A frakciók közül különösen az oszlop alsó részén adszorbeálódott frakció keltette fel érdeklődésünket, mert az eredeti tőzegfulvosav oldathoz hasonlóan csak ez adta mind a molibdénkékes reakciót, mind az epidermofitonokra kifejtett biológiai gátló hatást. A két felső frakció ezeket a reakciókat nem adta, viszont az α - α' -dipiridiles, diklórfenolindofenolos és a bromatometriás módszerrel kifejezett redukálóerőt mutatott.

Kísérleti eredményeinkkel közelebb jutottunk munkánk céljához, az egyes fulvosav frakciók izolálásához és jellemző kémiai és biológiai tulajdonságaik megismeréséhez.

Érkezett: 1957. április 23.

Irodalom

- [1] Bartha, Gy.: Söripar. 2. aug. p. 4. 1955.
- [2] Béres, T.: Agrokémia és Talajtan. 6. 93. 1957.
- [3] Béres, T. & Flórián, E.: Agrokémia és Talajtan. 6. (2) Megjelenés alatt. 1957.
- [4] Béres, T. & Király, I.: Agrokémia és Talajtan. 5. 245. 1956.
- [5] Berzelius, I. J.: Lehrbuch der Chemie. Stuttgart. Metzler. 1839.
- [6] Biber, V. A. & Magazinov, K. M.: Dokladi Akad. Nauk. SSSR. 76. 609. 1951.
- [7] Deniges, G.: Compt. Rend. Acad. Sci. 171. 802. 26/10. 1920.
- [8] Dragunov, Sz. Sz.: Trudü pocsvennovo Institutu im Dokucsajev. Akad. Nauk. SSSR. 38. 65. 1951.
- [9] Drozdova, T. V.: Pocsvovedenie. (1) 83. 1955.
- [10] Enders, C.: Biochem. Z. 312. 349. 1942.
- [11] Erdéy, L., Fleps, V. & Bodor, E.: M. T. A. Kémiai Oszt. Közl. 4. 329. 1954.
- [12] Forsyth, W. G. C.: Biochem. J. 41. 176. 1947.
- [13] Fox, F. W. & Stone, W.: Nature. 140. 234. 1937.
- [14] Gottschalk, A. & Partridge, S. M.: Nature. 165. 684. 1950.
- [15] Han, D. V.: Trudi Pocsvonnovo Insztituta im. V. V. Dokucsajeva. A. N. SSSR. 38. 1951.
- [16] Harris, L. J.: Nature. 132. 27. 1933.
- [17] Hriszteva, L. A. & Manoilova, A. V.: Izv. Akad. Nauk. SSSR. 11. 10. 1950.
- [18] Hriszteva, L. A.: Rabotü o organicseszkomu vcszscesztvu pocsvü Izv. Akad. Nauk. SSSR. Moszkva. 1951.
- [19] Kúthy, S. & Pecznik, J.: Bodenkunde u. Pflernähr. 23. 83. 1941.
- [20] Lea, C. H. & Hannan, R. S.: Biochim. et Biophys. Acta. 3. 313. 1949.
- [21] Maillard, L. C.: Compt. Rend. Acad. Sci. 154. 66. 1911., 155. 1554. 1912., 156. 1159. 1913.
- [22] Mapson, L. W.: J. Soc. Chem. Ind. (London) 62. 223. 1943.
- [23] Niklewsky, B. & Wojciechowsky, J.: Bodenkunde u. Pflernähr. 4. 294. 1937.
- [24] Sarkadi, J.: Adatok a talaj szervesanyaga és termőképessége közötti összefüggések megvilágításához. Kandidátusi disszertáció. Budapest. 1957.
- [25] Schlichling, E.: Z. Pflernähr. Düng. 61. 1. 1953.
- [26] Schüle, E. & Floderer, I.: Angew. Chem. 52. 615. 1939.
- [27] Schüle, E. & Kovács, J.: Magy. Gyógysz. Tud. Ért. 16. 334. 1940.
- [28] Schüle, E. & Kovács, J.: Magy. Gyógysz. Tud. Ért. 16. 339. 1940.
- [29] Siegel, O.: Bodenkunde u. Pflernähr. 18. 168. 1940.
- [30] Spanyol, P.: Acta Chim. Acad. Sci. Hung. 3. 395. 1953.
- [31] Tauber, H. & Kleiner, J.: J. Biol. Chem. 110. 559. 1936.

- [32] *Tillmans, J.*: Z. Untersuch. d. Lebensmittel. 54. 33. 1927.
 [33] *Tillmans, J. & Hirsch, P.*: Biochem. Z. 250. 312. 1932.
 [34] *Tillmans, J., Hirsch, P. & Jakisch, J.*: Z. Untersuch. d. Lebensmittel. 63. 276. 1932.
 [35] *Vastagh, G. & Iván, E.*: Magyar Kémikusok Lapja. 2. 442. 1947.
 [36] *Vastagh, G.*: Magyar Kémikusok Lapja. 4. 129. 1949.
 [37] *Vastagh, G., Varga, E.*: Magyar Kémiai Folyóirat. 56. 234. 1950.
 [38] *Wokes, F., Organ, J. G., Duncan, J. & Jacoby, F. C.*: Nature. 152. 14. 1941.

О СОЕДИНЕНИЯ ФУЛЬВОКИСЛОТ С ЖЕЛЕЗОМ

Т. Береш и И. Кирай

Институт испытания лекарств Медицинского Университета, Будапешт (Венгрия)

Резюме

1. Установили, что растворы сырых фульвокислот торфа, полученных в щелочной вытяжке торфа после осаждения гуминовых кислот соляной кислотой, содержат катионы Ca, Mg, Al, Na и Fe. Нейтрализуя этот раствор до pH—5 получили осадок, содержащий органические и неорганические вещества, в которых содержится большое количество железа.

2. Показали, что солянокислый раствор сырых фульвокислот торфа содержит железо почти полностью в ферро-форме (рис. 1).

3. Фульвокислоты торфа способны к восстановлению дополнительно прибавленного ферри-железа. Такая восстановительная способность приостанавливается в присутствии фосфорной кислоты. Но даже избыточное количество фульвокислот не было способным количественно восстанавливать ферри-железа в ферро-железо. Здесь могут играть роль комплексные реакции (рис. 2).

4. Фульвокислоты торфа в присутствии солей железа взаимно выпадают в осадок при pH 5—8.

5. В осадке фульвокислот торфа и железа последний находится в виде комплексного соединения, и растворяется не только в 0,1 н. соляной кислоте, но и в 0,1 н. NaOH.

6. В случае быстрого определения содержания феррожелеза в осадке фульвокислот торфа и железа после растворения его в кислоте, получили низкие величины, но после 24 часового стояния уже обнаружено значительное содержание ферро-железа. (рис. 3. П.).

Такое же явление было замечено после растворения осадка в NaOH и последующего его подкисления. Значит, в кислой среде фульвокислоты торфа содержат железо в легко ионизированной форме и образуют с ним очень подвижные соединения.

7. После хроматографического распределения фульвокислот торфа было установлено, что та фракция, которая была адсорбирована на нижней части трубки имеет наибольшую восстановительную способность и биологическое влияние, одновременно содержит железо в наибольшем количестве. Содержание ферро-железа во всех трех фракциях было относительно низким.

Таблица 1. Определения, проведенные раствором аскорбиновой кислоты 10^{-3} н.

Таблица 2. Восстановительная способность 1%-ного раствора фульвокислот торфа, определенная методом молибденовой синни и дипиридилным методом.

Таблица 3. Восстановительная способность 0,1%-ного раствора фульвокислот торфа, определенная ди-хлорфенол — индофеноловым методом и выраженная в аскорбиновой кислоте.

Таблица 4. Восстановительная способность 1%-ного раствора фульвокислот торфа, определенная броматометрическим методом, выраженная в мг. аскорбиновой кислоты.

Таблица 5. Восстановительная способность 1%-ного раствора фульвокислот торфа, определенная методом молибденовой синни, α - α' -дипиридилным, броматометрическим и ди-хлорфенол — индофеноловым методами, выраженная в мг. аскорбиновой кислоты.

Таблица 6. Восстановительная способность фракций фульвокислот торфа, разделенных хроматографическим методом, выраженная в мг. аскорбиновой кислоты, в пересчете на 1%-ный раствор.

Reducing Reactions of Fulvo-Acids and their Chromatography

T. BÉRES and I. KIRÁLY

Institute of Pharmacognosy, Medical University of Budapest, (Hungary)

Summary

1. Two methods were established in a preceding study [4] for determination of fulvo-acids based on the molybden-blue reaction.

The methods were applicable for assaying fulvo-acids of various origin, — i. e. fulvo acids from turf, synthetic fulvo acids (glycocoll + glucose), reducton, — and also for the determination of ascorbic acid.

2. The results of some known methods for assaying ascorbic acid (α - α' -dipyridyl, dichlorophenol-indophenol and bromatometry) were compared in the present study with the results of the molybden-blue method. The molybden-blue and the dichlorophenol-indophenol method gave essentially the same results for turf fulvo-acids, the results of the α - α' -dipyridyl method and bromatometry were about the double of the first two.

3. Assuming that the reducing capacity of the fulvo-acid solution is being made out of more than one component chromatographic studies were conducted. The fulvo acids, soluble in alcohol in the presence of small amounts of cc. HCl solution then brought on a Brockmann Al_2O_3 column, gave three layers and a non-absorbed fraction. The absorbed fractions were readily eluable with hydrochloric acid. The lowest fraction in the column was the most interesting, this alone of the fractions gave the molybden-blue reaction and at the same time showed biological inhibitory action on epidermophytions.

The two upper fractions do not possess these properties, though they showed reducing capacity assayed by the other methods, (α - α' -dipyridyl, dichlorophenol-indophenol and bromatometry).

The experiments resulted in isolating fractions of fulvo-acids and they brought information about their chemical and biological properties.

Table 1. Determinations made with 10^{-3} n ascorbic acid solution.

Table 2. Reducing power of a 1 per cent fulvo-acid solution determined by means of the molybden blue- and dipyridil-method.

Table 3. Reducing power of a 0,1 per cent fulvo-acid solution determined by means of the dichlorophenol-indophenol method and expressed in ascorbic acid.

Table 4. Reducing power of a 1 per cent fulvo-acid solution determined by the use of a bromatometric method and expressed as ascorbic acid mg.

Table 5. Reducing power of a 1 per cent fulvo-acid solution determined by the use of the molybden blue-, α - α' -dipyridil-, bromatometric- and dichlorophenol-indophenol methods. The results are expressed as ascorbic acid mgs.

Table 6. Reducing power of fulvo-acid fractions separated by the use of chromatographic methods, expressed as ascorbic acid mgs; basis of reference: 1 per cent solution.