Zagadnienie frakcjonowania związków próchnicznych ze szczególnym uwzględnieniem chromatografii

Über die Humusfraktionierung unter besonderer Berücksichtigung der Chromatographie

JERZY TROJANOWSKI

Badania nad chromatograficznym rozdzielaniem substancji humusowych oraz ich aktywnością biologiczną zostały podjęte w ośrodku lubelskim z inicjatywy Kierownika Zakładu Fizjologii Roślin prof. dr Adama Paszewskego. Referat niniejszy uwzględnia zarówno dane z literatury, jak i wyniki własne.

Każde postępowanie zmierzające do wydzielenia związków próchnicznych z naturalnych materiałów humusowych, jak gleba, torf czy węgiel brunatny, jest równocześnie frakcjonowaniem tych związków. Jest bowiem rzeczą oczywistą, że dobór rozpuszczalnika przy ekstrakcji materiału oraz dostęp tlenu i temperatura wpływają w sposób istotny na to, jakie i ile poszczególnych związków humusowych znajduje się w ekstrakcie. Warunki ekstrakcji mogą niekiedy modyfikować budowę chemiczną tych substancji tworząc artefakty. Tezę powyższą można udokumentować bogatym materiałem doświadczalnym. Np. Fischer i Schröder (1921) wyciągnęli ze swych wyników pesymistyczny wniosek, że żaden z najczęściej stosowanych jako rozpuszczalniki roztworów, tj. NaOH lub $(\text{NaOOC})_2$, nie nadaje się do uzyskania „pierwotnych”, tj. nie zmienionych, naturalnych kwasów huminowych z gleby. To co badamy, to są niezupełnie zdefiniowane artefakty. Zwłaszcza poważne zastrzeżenia również u innych autorów wzbudza powszechnie stosowana ekstrakcja alkaliem. Przy pomocy pomiarów kolorymetrycznych i spektrofotometrycznych uchwycono wyraźne zmiany ekstynkcy w toku przechowywania alkalicznych roztworów kwasów huminowych (Simon 1929, Springer 1938, Scheele i wspóln. 1935 a, 1935 b, 1936 a, 1936 b, Scheffer i Welte 1950). Tyczy się to zwłaszcza tzw. frakcji brunatnych kwasów humusowych, które w środowisku alkalicznym wobec O_2 ulegają z biegiem czasu wyraźnej autooksydacji, pojawiającej się powstawaniem bezbarwnych produktów rozkładu. Welte (1952) wykazał przy pomocy spektrofotometru już po ośmiu dniach wyraźną zmianę w przebiegu krzywej absorpcji światła w roztworze brunatnych kwasów humusowych z Kasseler Braun w 0,04% NaOH. Autor ten zaleca

przeprowadzenie jakichkolwiek badań porównawczych różnych preparatów humusowych niezwłocznie po przygotowaniu ich roztworów w NaOH.

Widać więc, że już czasokres działania i stężenie roztworu NaOH użytego do ekstrakcji materiału działają jako czynnik frakcjonujący, ponieważ brunatne kwasy huminowe ulegają łatwo rozkładowi wobec NaOH, natomiast grupa kwasów szarych huminowych jest odporna na działanie NaOH (W e l t e 1952). Dlatego autor ten zaleca stosowanie możliwie niskiej koncentracji jonów OH, aby zmniejszyć do minimum szkodliwe oddziaływanie alkaliów. Decydującym czynnikiem jest oczywiście czas tego oddziaływania.

Pomiary spektrograficzne W e l t e g o (1952) nie wykazały żadnych zmian w przebiegu krzywych w ultrafiolet., jeżeli działanie 0,5% NaOH trwało tylko trzy godziny. To samo dotyczy 5% roztworu HCl. Wynikałoby stąd, że zabieg dekalcytacji rozcieńczonym kwasem solnym oraz krótkotrwała ekstrakcja rozcieńczonym roztworem alkaliów nie powoduje prawdopodobnie poważniejszych zmian w chemicznym rdzeniu związków humusowych.

Proponowana przez S i m o n a (1929) ekstrakcja roztworem szczawianu sodu lub fluorku sodu w środowisku niealkalicznym jest w pewnym stopniu również mimowolnym frakcjonowaniem. Tym sposobem przeprowadza się bowiem do roztworu głównie humiany wapnia, a przede wszystkim związane z Ca szare kwasy huminowe (W e l t e 1952), a także labilne, niskocząsteczkowe prekursorzy kwasów huminowych. Znaczna część związków próchnicznych pozostaje przy tym nie wyekstrahowana w materiale (S p r i n g e r 1938), a zwłaszcza humiany żelaza, glinu i wolne brunatne kwasy huminowe.

Inni autorowie polecają stosowanie słabych alkaliów do ekstrakcji w postaci pirofosforanu sodu 0,15 M (B r e m n e r 1949, O k u d a A z u m a i H o r i S h i r o 1954).

Zagadnienie doboru środka ekstrakcyjnego nie jest więc jak dotąd ostatecznie rozwiązane. Idealnego rozpuszczalnika dla próchnicy nie mamy. Poniżej omówione zostanie bezpośrednie zastosowanie etanolu do ekstrakcji materiału humusowego, co umożliwia wydzielenie w „łagodnych” warunkach frakcji kwasów hymatomelanowych.

ROZDZIELENIE SUBSTANCJI HUMUSOWYCH NA GRUPY

Rozdzielenie związków próchnicznych na umownie przyjęte grupy odbywa się najczęściej przez sukcesywne wymywanie dekalcytowanego materiału wodą, etanolem i alkaliami. Wielu autorów zwraca jednak uwagę na obecność form przejściowych, stanowiących ogniwa łączące grupy kwasów fulwonowych, hymatomelanowych i huminowych (W e l t e 1952),

niektórzy zaś uważają kwasy fulwonowe i hymatomelanowe za prawdopodobnych prekursorów kwasów huminowych (L a a t s c h i wsp. 1950).

Krzywe absorpcyjne tych frakcji dla światła ultrafioletowego wykazują według W e l t e g o (1952) duże podobieństwo. Stromość krzywych maleje w szeregu: kw. fulwonowe — kw. hymatomelanowe — kw. huminowe, co wskazuje na wzrost cząsteczek, w miarę jak przechodziły od form prostszych (kw. fulwonowe) do bardziej złożonych (kw. huminowe). Według pomiarów współczynnika dyfuzji dokonanych przez S c h e e l e g o (1937) wielkość cząsteczki badanych przez niego próbek kwasów hymatomelanowych wahała się w granicach od 27,3 do 38 Å, natomiast dla kwasów huminowych wypadła od 29,9 do 70,1 Å, a więc nieco mniej.

Przebieg sedymentacji kwasów huminowych podczas wirowania przy $200\,000 \times g$ wskazuje wyraźnie na ich polihomologiczny charakter (S c h e f f e r, P l o t h o, W e l t e 1950). Trudno więc mówić o selektywnym rozfrakcjonowaniu substancji humusowych zwykłymi metodami na wspomniane trzy grupy ze względu na ich pokrewieństwo chemiczne.

Dobre oddzielenie kwasów huminowych od fulwonowych i hymatomelanowych osiąga się według T h i e l e g o i K e t t n e r a (1953) na drodze elektroforezy bibułowej w buforze o pH 8. Sposób ten nadaje się zwłaszcza do ostatecznego oczyszczenia tych frakcji rozdzielonych wstępnie zwykłymi rozpuszczalnikami.

Z przytoczonych badań wynika, że uzyskanie w stanie dostatecznej czystości nawet umownie przyjętej grupy substancji próchnicznych nie jest łatwym zadaniem. Tym bardziej, że skład preparatów z różnych surowców uzyskanych tą samą metodą może nie być identyczny, ponieważ wchodzi tu w grę jeszcze inne, trudne do skontrolowania czynniki, jak wiek materiału wyjściowego, warunki naturalnej syntezy humusu, obecność w materiale różnych towarzyszących substancji niehumusowych, stopień wysuszenia materiału, nie zawsze uchwytne działanie chemikaliów i wyższej temperatury w toku preparacji i wiele innych.

Przy pomocy konwencjonalnych metod ekstrakcji otrzymuje się więc z gleb i torfów preparaty o dość złożonym i zmiennym składzie, nie zawsze wystarczająco zdefiniowane samym tylko sposobem ich przygotowania. Takie więc określenia jak „kwasy humusowe” czy „kwasy fulwonowe” zawierać w sobie mogą treść tak szeroką i różnorodną, jak np. określenie „sterydy” albo „białka”.

Biochemia humusu stoi więc w chwili obecnej przed taką granicą, przed jaką stała biochemia białek, zanim wynaleziono metody ultrawirowania, elektroforezy i chromatografii, tj. przed hamującą dalszy postęp granicą sprawności metod analitycznych.

Tę granicę zakreślona przez stare metody preparacji i analizy humusu próbujemy na niektórych odcinkach przekroczyć przy pomocy współczesnych

metod fizykochemicznych, a głównie chromatografii i elektroforezy. Wydaje się, że rezultaty pierwszych prób w tej dziedzinie są obiecujące, a badania analityczne w tym kierunku godne są kontynuowania.

ROZDZIAŁ CHROMATOGRAFICZNY ZWIĄZKÓW HUMUSOWYCH

F r a k c j o n o w a n i e k w a s ó w f u l w o n o w y c h

Mianem „kwasów fulwonowych” określa się zazwyczaj grupę związków humusowych rozpuszczalnych w wodzie. W surowych wyciągach wodnych próchnicy znajdują się nadto liczne substancje niehumusowe, trudne do oddzielenia.

Do oczyszczenia kwasów fulwonowych od towarzyszących im zanieczyszczeń nadaje się metoda chromatograficzna wg F o r s y t h ' a (1947). Wyciąg z torfu lub gleby przygotowuje się w 0,5n NaOH. Z tego surowego ekstraktu usunięto przez wytrącenie kwasem solnym zarówno kwasy huminowe, jak i hymatomelanowe. Pozbawiony tych związków kwaśny roztwór rozpuszczalnej w wodzie frakcji próchnicy adsorbuje się na warstwie węgla „zwierzęcego”. Przez kolejne wymywanie adsorbenta 0,1n HCl acetonem, wodą i 0,5n NaOH uzyskuje się 4 frakcje, które F o r s y t h nazwał A, B, C i D (1947).

Frakcja A obejmowała aminokwasy, cukry, zasady purynowe i inne drobnocząsteczkowe związki towarzyszące. We frakcji B znaleziono glikozydy, pentozy i fenole. Frakcja C składała się głównie z poliuronidów, w których F o r s y t h wykazał chromatograficznie galaktozę, glikozę mannozę, arabinozę, ksylozę, kwas aldobionowy i kwas glikuronowy. Składniki te partycypują stale w zbliżonych stosunkach bez względu na surowiec wyjściowy.

Frakcja D obejmowała właściwe kwasy fulwonowe o zawartości ca 47—48% C oraz około 4—6% N. Zebrane w tej grupie związki miały charakter kwasów; znaleziono w nich chemicznie związany fosfor i pentozy. W torfie znalazł F o r s y t h 0,38 g frakcji D w 100 g masy organicznej, natomiast w glebie — 2,6 g/100 g.

Interesujące jest stwierdzenie F o r s y t h ' a, że część świeżo strąconych kwasów huminowych można zhydrolizować na produkty rozpuszczalne, a te rozdzielić w opisany wyżej sposób na 4 frakcje. Stąd wniosek o możliwości istnienia złożonych połączeń kwasów huminowych i fulwonowych.

W lubelskiej pracowni fizjologii roślin przeprowadzono próbę uzyskania 4 frakcji F o r s y t h ' a z torfu. Udało się wydzielić tylko 2 frakcje B i D, które w doświadczeniach biologicznych wykazały efekt hamujący wybitnie wzrost liści i korzeni sałaty w pożywce Pfeffera-Knopa. Dodatek 4 mg tych frakcji do 1 litra pożywki powodował obniżenie potencjału redox o około 50 mV, co mogło wpłynąć na obniżkę plonu (T r o j a n o w s k i 1957).

Pewne udoskonalenie do chromatograficznej metody rozdzielania fulw kwasów wg F o r s y t h a wniosła D r o z d o w a (1955), która po adsorpcji na węglu zastosowała jeszcze dalsze oczyszczenia frakcji na kationicie. Wydzieliła ona w ten sposób z grupy fulw kwasów kwas z grupami chinonowymi, o m.c.z. ca 190 i temp. top. 121—122°.

Fulw kwasy w stanie wolnym wydzielala P o n o m a r i e w a (1947) z gleb stosując elektrodializę soli amonowych tych kwasów, przy czym towarzyszące im kwasy huminowe wytrącają się w miarę oddializowania jonów amonowych i mogą być w ten sposób usunięte.

R o z d z i e l a n i e c h r o m a t o g r a f i c z n e k w a s ó w h y m a t o m e l a n o w y c h

Grupa kwasów hymatomelanowych jest dotychczas najmniej zbadaną frakcją humusu, mimo że odkryta została przez H o p p e - S e y l e r a już w r. 1889.

Pokrewieństwo chemiczne tej frakcji z kwasami huminowymi jest bardzo prawdopodobne (L a a t s c h, B a u e r, B i e n e c k 1950). Między innymi obie te frakcje mają bardzo zbliżony (około 200) ciężar równoważnikowy, współczynnik dyfuzji, masę cząsteczkową (S c h e e l e 1937), a także wspólną cechę zależności rozdrobnienia micelnego od pH. Podział na frakcję rozpuszczalną i nierozpuszczalną w etanolu nie jest więc podziałem racjonalnym, lecz zwyczajowym.

Ze względu na dobrą rozpuszczalność w organicznych rozpuszczalnikach (etanol, aceton) ta grupa związków humusowych szczególnie nadaje się do rozdziału chromatograficznego.

Pierwszą próbę chromatograficznego wydzielenia kwasów hymatomelanowych z torfu, gleb i węgla brunatnego przeprowadził T r o j a n o w s k i (1952). Wyciąg etanolowy wstępnie oczyszczonych kwasów hymatomelanowych rozdzielano na kolumnie z gruboziarnistego MgO. Do rozwijania chromatogramu stosowano układ: kwas olejowy-etanol (1 : 7,5 obj.). Dla indykacji warstw na kolumnie posługiwano się światłem u-fiolet. Mechanicznie wydobyte warstwy chromatogramu eluowano kwasem solnym przy pH 2. Metoda nadaje się do użycia na skalę preparatywną jak też i analityczną, nastrocza jednak pewne niedogodności techniczne przy mechanicznym wydobywaniu warstw z kolumny.

Przez zastąpienie MgO celulozą sproszkowaną (T r o j a n o w s k i 1957) usunięto tę trudność, gdyż z chromatogramu celulozowego można łatwo wymywać poszczególne strefy różnymi rozpuszczalnikami. Rozdzieleniu na celulozie poddano kwasy hymatomelanowe wyekstrahowane z ziemi kompostowej bezpośrednio etanolem. Materiał był przedtem pozbawiony bitumin oraz przemywany 0,2n HCl do zaniku reakcji na Ca i Fe.

Surowy ekstrakt etanolowy z ziemi wstępnie oczyszczono przez przeprowadzenie kwasów hymatomelanowych w nierozpuszczalne połączenie wapniowe, odwirowanie brązowego strątu od jasnobrązowego płynu oraz dokładne usunięcie Ca z osadu przez wymywanie 0,5n HCl na wirówce. Przemyty osad rozpuszczano w acetonie i uzyskany ciemnobrązowy klarowny roztwór chromatografowano. Była to więc frakcja kwasów hymatomelanowych odgraniczona od reszty substancji humusowych następującymi kryteriami:

1. rozpuszczalność wolnych związków w etanolu,
2. nierozpuszczalność połączenia z Ca w wodzie w środowisku obojętnym,
3. rozpuszczalność w acetonie,
4. nierozpuszczalność w 0,5n HCl.

Do rozwijania chromatogramu kolumnowego tej frakcji na celulozie sproszkowanej Whatmana dobrano układ:

n-butanol nasyć. H_2O
acetone

w stosunku objętościowym 1 : 1. Na chromatogramie wyróżniano 5 warstw fluoryzujących pod lampą kwarcową, które następnie kolejno wymywano z kolumny bezwodnym acetonem, acetonem + woda w stosunku 5 : 1, a wreszcie wodą. Wydzielono substancje z poszczególnych warstw na dużą skalę i obecnie opracowuje się ich charakterystykę chemiczną.

Taki sam rozdział uzyskano także na arkuszu bibuły Whatman Nr 1, co umożliwiło analityczne zastosowanie metody. Do rozwijania chromatogramu bibułowego kwasów hymatomelanowych dobrano układ:

n-butanol nasyć. H_2O
acetone
roztwór 0,5n HCl

w stosunku obj. 12 : 12 : 1,5 (ryc. 1).

Określano współczynniki R_f poszczególnych plam na bibule. Na tej podstawie można było wyciągnąć wniosek, że z różnych materiałów wyjściowych uzyskuje się w opisany sposób bardzo zbliżone chromatogramy badanej frakcji, przy czym plamy na bibule rozmieszczone są w 3 dość wąskich zakresach R_f : I — od 0,45 do 0,53; II — od 0,69 do 0,73 i III — około 0,95.

Dla porównania wykonano chromatogram bibułowy z roztworami kwasów hymatomelanowych przygotowanych metodą Springera (1938), tj. przy użyciu alkaliów. Uzyskany chromatogram wykazał brak plamy o $R_f = 0,94$, która występuje na chromatogramach preparatów przygotowanych metodą Trojanowskiego; poza tym inne plamy miały bardzo podobne rozmieszczenie i zabarwienie.

Dalszą kontynuacją zapoczątkowanych w tym kierunku badań jest praca Łobarzewskiego z Zakładu Biochemii UMCS przygotowana obecnie do druku. Łobarzewski zajął się chromatograficznym roz-

Ryc. 1. Chromatogramy bibulowe kwasów hymatomelanowych z różnych materiałów wyjściowych oraz niektórych frakcji oczyszczonych za pomocą chromatografii kolumnowej

1 — wyciąg z torfu niskiego; 2 — jedna z frakcji wyciągu z torfu niskiego; 3 — jedna z frakcji wyciągu z torfu niskiego; 4 — wyciąg etanolowy z preparatu przygotowanego metodą Springera; 5 — wyciąg z torfu wysokiego; 6 — jedna z frakcji wyciągu z torfu wysokiego; 7 — jedna z frakcji wyciągu z torfu wysokiego; 8 — wyciąg z ziemi kompostowej; 9 — 10 — 11 — 12 — frakcje wydzielone z wyciągu ziemi komp.

dzieleniem tej frakcji kwasów hymatomelanowych, która mimo swej rozpuszczalności w etanolu nie daje nierozpuszczalnych połączeń z Ca, a więc tej frakcji, którą pominięto w omówionej wyżej pracy Tr o j a n o w s k i e g o.

Rozdzielenie chromatograficzne kwasów huminowych

Frakcja kwasów huminowych wzbudzała dotychczas największe zainteresowanie tak biologów, jak chemików. Mimo licznych prób nie ma dotychczas praktycznej metody chromatograficznego rozdzielania tych kwasów na większą skalę.

Pierwszą próbą były doświadczenia H o c k a (1938), który sporządzał chromatogramy kwasów huminowych w roztworze NaOH, NaF, (COONa)₂ lub Na₂HPO₄ na kolumnie wypełnionej tlenkiem glinu.

Pod lampą kwarcową obserwował H o c k a na chromatogramie fluorescencję warstw, których barwa okazała się charakterystyczna dla poszczególnych materiałów wyjściowych, a więc mogła posłużyć w pewnym stopniu do głęboznowczej charakterystyki badanej próbki próchnicy. Silna chemisorpcja humianów na Al₂O₃ uniemożliwiła wymycie warstw z kolumny, co

pozbawia te doświadczenia praktycznej wartości, jeśli chodzi o frakcjonowanie humusu.

Souci i Heinen (1938) próbowali rozdzielić związki uważane za prekursory kwasów huminowych (niżejcząsteczkowe), rozpuszczalne w dioksanie, na kolumnach z Al_2O_3 , CaCO_3 lub cukru. Do indykacji warstw stosowano ultrafiolet, do elucji roztwór zasady. W zastosowaniu do oczyszczonych kwasów huminowych metoda nie dała pomyślnych rezultatów.

Na skalę analityczną, ale nie preparatywną, udało się rozdzielić kwasy huminowe na kilka frakcji za pomocą elektroforezy bibułowej. Możliwość elektroforezy kwasów huminowych stwierdził Beutelspacher (1952) w aparacie Nernsta. Potencjał „dzeta” kwasów huminowych naturalnych wynosi około — 22 mV przy pH około 8; potencjał sztucznych kwasów huminowych wynosił w tych warunkach około — 32 mV. Potencjał „dzeta” kwasów huminowych nie zależy od środka ekstrakcyjnego. Humiany alkaliczne są elektrycznie obojętne i nie podlegają elektroforezie. Thiele i Kettner (1953) zastosowali pierwsi elektroforezę kwasów huminowych w buforze o pH 8, na bibule Schleicher i Schüll Nr 2040.

Dokładniejsze przebadanie warunków i możliwości analitycznej elektroforezy kwasów huminowych na bibule zawdzięczamy Scheffferowi, Ziechmannowi i Schlüterowi (1955). Autorzy ci nie stwierdzili szkodliwego oddziaływania pola elektrycznego na te związki (nie było elektrokoagulacji). Najlepsze rozdzielenie na kilka frakcji uzyskano w buforze o pH 8,6. Do elektroforezy nadawała się najlepiej bibuła Schleicher — Schüll Nr 2045b Mgl. Autorzy nie stwierdzili zasadniczych różnic między elektroferogramami z kwasów huminowych sztucznych i naturalnych. Zarówno brunatne, jak i szare kwasy huminowe rozdzielały się w odpowiednich warunkach na szereg frakcji, dobrze widocznych jako oddzielne pasma na ferogramie. Ferogramy mogą posłużyć jako wskaźnik przy zaliczeniu badanej próbki do określonego typu kwasów huminowych. Szczególnie dobre wyniki uzyskano przy zastosowaniu wysokich napięć od 750 do 2500 V przy 2—10 mA. Cały proces rozdziału trwa wtedy tylko 3 minuty, lecz wymaga specjalnie chłodzonej aparatury (pasek bibuły pogrążony w cieczy chłodzącej — chlorobenzenie).

Opisane doświadczenia nad elektroforezą kwasów huminowych mają jedynie znaczenie analityczne i jak dotąd nie stosowano ich do wydzielenia frakcji próchnicy w większych ilościach, wystarczających do doświadczeń biologicznych.

Metoda chromatograficzna daje pod tym względem większe możliwości. W pracowniach Zakładu Fizjologii Roślin i Biochemii UMCS w Lublinie wykonano już pierwsze doświadczenia nad aktywnością biologiczną tych frakcji humusu, które udało się nam wydzielić za pomocą kolumn chromatograficznych. W doświadczeniach Trojanowskiego (1954) nad wpły-

wem niektórych frakcji kwasów hymatomelanowych na salate w kulturach wodnych uwidocznili się wybitnie stymulujący wpływ jednej z wydzielonych frakcji na rozgałęzienie się systemu korzeniowego, podczas gdy inne frakcje nie wywierały tego wpływu.

W nie opublikowanych jeszcze doświadczeniach D z i k o w s k i e j badano wpływ wydzielonych chromatograficznie frakcji z różnych materiałów wyjściowych na wzrost tkanki roślinnej metodą testu grochowego. Określone frakcje dały p o w t a r z a l n y wynik, niemal identyczny jak użyty dla porównania 0,25% roztwór IAA, natomiast inne frakcje nie miały wpływu na wzrost tkanki w teście grochowym.

Sprawdzono, że w badanych frakcjach brak było pochodnych indolu. Wyłączono również możliwość działania mineralnych zanieczyszczeń preparatów w tym doświadczeniu.

Wyniki te pozwalają przypuszczać, że kontynuowanie badań nad chromatograficznym frakcjonowaniem związków próchnicznych ma przed sobą obiecujące perspektywy zarówno dla biologa zgłębiającego mechanizm oddziaływania humusu na rośliny, jak i dla chemika badającego próchnicę od strony analitycznej.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Anwendung der Chromatographie zur Trennung der Humusstoffe und Forschungen über die biologische Aktivität einzelner Fraktionen werden in unserem Laboratorium auf Anregung des Leiters des Instituts für Pflanzenphysiologie der M. S k ł o d o w s k a Universität Prof. Dr A. P a s z e w s k i vorgenommen.

Jedes Verfahren, welches bei der Extraktion der Humusstoffe verwendet wird, ist zugleich eine Fraktionierung, weil Extraktionsmittel und Extraktionsverhältnisse über die Menge und den chemischen Charakter der extrahierten Stoffe einen grossen Einfluss ausüben können.

Gegen die gebräuchteste Extraktion mit Natronlauge wird der Einwand erhoben, dass unter Einwirkung der OH' Ionen eine Veränderung des natürlichen Charakters der Humusstoffe eintritt. Diese Veränderung wurde von vielen Verfassern unter Zuhilfenahme der Kolorimetrie und Spektrophotometrie gezeigt [S i m o n (21), S p r i n g e r, (22), S c h e e l e (13), S c h e f f e r u. W e l t e (18), W e l t e (28)]. W e l t e (28) hat gezeigt, dass noch keine Veränderung des Ultraviolett-Kurvenbildes in einem Zeitraum von 3 Stunden durch 0,5% NaOH erfolgte. Besonders kleine Beständigkeit wurde bei den Braunhuminsäuren gezeigt (28).

Die von S i m o n (19) vorgeschlagene Extraktion mit Oxalatlösung unter Vermeidung alkalischer Reaktion, ist besonders für die Darstellung der Humusstoffe, die an Ca gekoppelt sind, geeignet (28). S p r i n g e r (22) und W e l t e (28) haben gezeigt, dass durch diese Extraktion ein gros-

ser Teil der Huminsäuren nicht erfasst wird. Sie geben daher dem alkalischen Extraktionsverfahren unter den angegebenen Versuchsbedingungen den Vorzug.

Zur Zeit gibt es also kein ideales Extraktionsmittel für die Darstellung von Humusstoffenpräparaten.

Die Trennung der Humusstoffe in Gruppen

Die Trennung der Humusstoffe in die Fulvosäuren, Hymatomelansäuren und Huminsäuren bereitet erhebliche Schwierigkeiten, weil diese Verbindungen chemisch näher verwandt sind (9, 12, 17, 28) und weil es gewisse Übergänge gibt. Es wurde mit der Ultrazentrifuge der polymer-homologe Charakter der Hymatomelan- und Huminsäuren nachgewiesen (17). Es scheint also unmöglich durch fraktionierte Fällung, diese Körperklassen abzutrennen.

Eine bessere Möglichkeit der Abtrennung von diesen drei Gruppen wurde durch Anwendung der Elektrophorese geschaffen (Thiele u. Kettner 24).

Die chromatographische Trennung der Humuskörperklassen in einzelne Komponente

Zur Fraktionierung der Fulvosäuren eignet sich die chromatographische Adsorptionsanalyse nach Forsyth (7). Als Sorbens verwendete er Tierkohle. Eluiert wurde sukzessiv mit 0,1N HCl, Azeton, Wasser und 0,5N NaOH. Auf diese Weise ist ihm die Zerlegung der Fulvosäuren in 4 Fraktionen gelungen. Die letzte Fraktion — D stellt die gereinigten Fulvosäuren dar.

In unserem Laboratorium in Lublin konnten wir nach dieser Methode nur die Fraktion B und D aus Torf isolieren. In den biologischen Versuchen stellten wir eine hemmende Wirkung der Fraktion B und D auf Längewachstum der Wurzeln (Trojanowski (26).

Weitere Versuche betreffend Reindarstellung der Fulvosäuren wurden unter Anwendung des Kationits von Drozdowa (3) und Ponomarieva (11) unter Anwendung der Elektrodialyse unternommen.

Die Hymatomelansäuren wurden bisher wenig untersucht, obwohl sie schon von Hoppe-Seyler 1889 beschrieben worden sind. In meiner ersten Arbeit (25) wurden die Hymatomelansäuren aus Torf und Kompost untersucht. Das Material wurde vorher von Bitumenstoffen, Kalzium und Eisenjonen befreit. Die Gewinnung der Hymatomelansäuren erfolgte durch Extraktion des Materials mit 95% Äthanol. Als Sorbens wurde MgO (heavy) angewendet. Entwickelt wurde mit einer Öl-säure-Äthanol Mischung 1 : 7,5. Das Chromatogram lässt unter der Analysenquarzlampe deutlich getrennte Schichten erkennen (braun, dunkelbraun und gelb). Die Schichten wurden einzeln herausgenommen, MgO wurde in verdünnter Salzsäure gelöst, die

Hymatomelansäurenfällung (voluminöser Niederschlag) abzentrifugiert und mit viel verdünnter Salzsäure, dann mit Wasser wiederholt gewaschen. Die auf diese Weise getrennten und isolierten Substanzen wurden dann im Brinztzinger-Apparat elektrodialysiert und in vacuo getrocknet. Die chromatographisch reinen Substanzen wurden dann auf ihre biologische Aktivität geprüft (26). Als Versuchspflanze wurde Salat in Wasserkultur gewählt. Es ergeben sich verschiedene Wachstumsbeeinflussungen als Wirkungen der angewendeten Substanzen. Einige von mir isolierten Substanzen zeigten eine fördernde Wirkung nicht nur auf das Längewachstum der Wurzeln, sondern auch auf den Zuwachs der Blätter. In den Versuchen wurden aber auch hemmende Einflüsse einzelner Präparate festgestellt.

In meiner späteren Arbeit (26) habe ich die verteilungschromatographische Methode zur Fraktionierung des azetonlöslichen Hymatomelansäureanteils angewendet. Diese Fraktionen wurden bisher nicht näher untersucht. Als Träger der stationären Phase wurde Zellulosepulver (Whatman ashless) im präparativen Massstab und Whatman Papier Nr 1 für analytische Zwecke verwendet. Zur Chromatographie gelang eine Lösung von Hymatomelansäuren in Azeton. Da sich die Polycarbonoxysäuren oft als freie Säuren mit sauren Lösungsmittelgemischen trennen lassen, wurde um die Jonisation der Hymatomelansäuren herabzusetzen und runde Flecke zu erhalten, Salzsäure als Lösungsmittelkomponent verwendet. Zur Entwicklung hat sich ein Gemisch von wassergesättigtem n-Butanol + Azeton + Salzsäure als geeignet erwiesen. Das Chromatogramm lässt unter der Analysenquarzlampe getrennte Zonen erkennen, die mit entsprechenden Lösungsmitteln (Azeton, Azeton + Wasser) eluiert werden können.

Die einzelnen Fraktionen wurden auf ihre chromatographische Homogenität geprüft. Sie werden auf Whatman Papier Nr 1 mit anderen Lösungsmitteln chromatographiert. Die sich als homologen erwiesenen Präparate wurden weiter wie üblich gereinigt und einer chemischen Analyse unterworfen.

Weitere Versuche auf dem Gebiet der Humusfraktionierung werden in unserem Labor. von Mgr Ł o b a r z e w s k i unter Verwendung der Papierchromatographie durchgeführt.

Der grösste Teil der Humusstoffe in Böden sind die Huminsäuren, die in den letzten Jahren besonders Gegenstand zahlreicher Forschungen gewesen sind.

Eine Aufspaltung des Huminsäureanteils unter Anwendung der Chromatographie wurde von H o c k (8) und S o u c i und H e i n e n (23) auf Al_2O_3 , CaCO_3 und Zucker vorgenommen. Diese Versuche haben wegen starker Chemisorption zu keinem befriedigenden Ergebnis geführt.

Zur Trennung der Braun- und Grauhuminsäuren hat Scheffer die Papierchromatographie in einem Gemisch von Ethylendiaminhydrat, Tetrahydro-

fulan und H_2O (3 : 3 : 1) verwendet. Die Chromatogramme von Bodenhuminsäuren zeigen 2—4 Komponente an. Die Ergebnisse sind aber schlecht reproduzierbar.

Zu besseren Resultaten führte die Anwendung der Papierelektrophorese durch Scheffer, Ziechmann und Schlüter (19). Bei pH 8,6 und 750 V Spannung wurden die besten Trennungen in mehrere Fraktionen erzielt.

Die bisherigen Resultate der Humusfraktionierung unter Anwendung von Chromatographie und Elektrophorese erlauben meiner Meinung nach bedeutende Fortschritte in der Humusbiochemie zu erhoffen.

LITERATURA

1. Beutelspacher H., 1952, Zeitschr. Pflanzenern., Düng., Bodenkunde 57: 57.
2. Bremmer J. M., 1949, J. Agr. Sci. 39: 274.
3. Drozdowa T. W., 1955, Pochvovedenije 1: 83.
4. Fischer F., Schröder G., 1921, Brennstoff-Chemie 2: 37.
5. Fischer F., Schröder G., 1922, Brennstoff-Chemie 3: 65.
6. Fischer F., Schröder G., 1933, Brennstoff-Chemie 14: 147.
7. Forsyth W. G. C., 1947, Biochem. J. 41: 176.
8. Hock A., 1938, Bodenkunde u. Pflanzenern. 5: 1.
9. Laatsch W., Bauer L., Bieneck O., 1950, Landw. Forsch. 2: 38.
10. Okuda Azuma, Hori Shiro, 1954. Mem. Research Inst. Food Sci., Kyoto Univ., 7: 1.
11. Ponomariewa W. W., 1947, Pochwowiedenije 12.
12. Scheele W., 1937, Kolloid. Beih. 46: 368.
13. Scheele W., Schulze W., Spandau H., 1935a, Kolloid. Zeitschr. 72: 301.
14. Scheele W., Schulze W., Spandau H., 1935b, Kolloid. Zeitschr. 73: 84.
15. Scheele W., Schulze W., Spandau H., 1936a, Kolloid. Zeitschr. 75: 73.
16. Scheele W., Schulze W., Spandau H., 1936b, Kolloid. Zeitschr. 77: 312.
17. Scheffer F., Plotho O., Welte E., 1950, Landw. Forsch. 1: 86.
18. Scheffer F., Welte E., 1950, Landw. Forsch. 1: 81.
19. Scheffer F., Ziechmann W., Schlüter H., 1955, Zeitschr. Pflanzenern., Düng., Bodenkunde 70: 260.
20. Simon K., 1929, Zeitschr. Pflanzenern. Düng., Bodenkunde 14: 252.
21. Simon K., 1930, Zeitschr. Pflanzenern. 18: 323.
22. Springer U., 1938, Bodenk. u. Pflanzenern. 6: 312.
23. Souci S. W., Heinen O. L., 1938, Die Chemie des Moores, Stuttgart.
24. Thiele H., Kettner H., 1953, Kolloid. Zeitschr. 130: 131.
25. Trojanowski J., 1952, Ann. Univ. M. Curie-Skłodowska, Lublin, Pol. Sec. C 6: 298.
26. Trojanowski J., 1954, Acta Soc. Bot. Pol. 23: 144.
27. Trojanowski J., 1957, Ann. Univ. M. Curie-Skłodowska. Lublin, Pol. Sec. C 10: 276.
28. Welte E., 1952. Zeitschr. Pflanzenern. Düng. u. Bodenkunde 56: 105.