

с. 200. 4062/6/9.

ANNALES

UNIVERSITATIS MARIAE CURIE - SKŁODOWSKA  
LUBLIN - POLONIA

VOL. VI. 9.

SECTIO C

3. III. 1952

Z Zakładu Fizjologii Roślin Wydziału Biologii i Nauki o Ziemi U. M. C. S.  
Kierownik: Prof. dr Adam Paszewski

Jerzy TROJANOWSKI

**Zastosowanie chromatografii do rozdzielania substancji próchnicznych**

**Применение хроматографии для выделения гумусных субстанции**

**The use of chromatography for the separation of humic substances**

I. Wstęp . . . . .	297
II. Wyniki nowszych badań nad humusem . . . . .	298
III. Badania chromatograficzne . . . . .	304
IV. Chromatogramy na MgO . . . . .	306
V. Ekstrakcja surowców wyjściowych . . . . .	310
VII. Ocena metod ekstrakcji na podstawie chromatogramów	316
VII. Elucja chromatogramów . . . . .	322
VIII. Dyskusja wyników . . . . .	323
Spis literatury . . . . .	328
РЕЗЮМЕ . . . . .	329
SUMMARY . . . . .	334

**I. Wstęp**

Dotychczasowe wyniki badań chemicznych nad humusem, prowadzonych zarówno metodą analizy jak i syntezy, nie są zadowalające.

Niewątpliwie natomiast stwierdzono bardzo ważne znaczenie humusu dla życia roślin. Szczególną uwagę do problemu wpływu próchnicy na wzrost roślin przywiązują tacy wybitni badacze radzieccy, jak W. Williams (27) i A. W. Błagowieszczenski (2). W „Gleboznawstwie“ Williamsa podkreślona jest doniosła rola

próchnicy jako kompleksu egzoenzymów, mających decydujące znaczenie dla życia mikroflory glebowej oraz jako czynnika warunkującego „gruzelkową“, przepuszczalną strukturę gleby.

Znany biochemik radziecki A. W. B ł a g o w i e s z c z e n s k i j i A. A. P r o s o r o w s k a j a (2) udowodnili bezpośredni wpływ substancji humusowych na zwiększenie pobierania azotu i potasu przez len.

Polscy uczeni, zajmujący się problemem próchnicy, jak B. N i k l e w s k i (13—18), J. W o j c i e c h o w s k i (17, 18, 28), G u m i ń s k i i inni, stwierdzili również dodatnie działanie humusu na wzrost roślin i na pobieranie przez nie soli mineralnych.

O doniosłym znaczeniu próchnicy dla rolnictwa świadczy praca R. L i e s k ' e g o (12), według której otrzymano 50% wzrost plonów pszenicy, buraków i ziemniaków pod działaniem substancji humusowych z węgla brunatnego.

W zrozumieniu ważności roli humusu od dawna starano się wyświecić mechanizm jego działania na rośliny, a w szczególności zdefiniować próchnicę chemicznie. Niestety, do chwili obecnej nie ustalono dokładnie nawet podstawowych cech fizykochemicznych substancji humusowych, a wyniki nawet najnowszych badań są często sprzeczne z sobą. Dlatego wydaje się rzeczą konieczną rozpocząć pracę od wstępu zawierającego krótki przegląd nowszych badań, dotyczących chemii humusu.

Zadaniem pracy niniejszej było zbadanie możliwości zastosowania metody chromatograficznej do rozdzielenia kompleksu substancji próchnicznych na skalę analityczną i preparatywną, co umożliwiłoby ich określenie chemiczne i dopomogło do wyświecenia mechanizmu działania humusu na rośliny. Główną bowiem przeszkodą w chemicznych badaniach nad próchnicą jest brak odpowiedniej metody otrzymywania substancji próchnicznych w stanie niezmienionym i czystym.

## II. Wyniki nowszych badań nad humusem

Skład humusu według monografii S v e n O d e n a (19) z roku 1922.

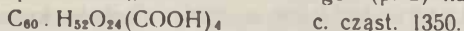
a) Jako główne substancje humusu podaje S v e n O d e n :

1. *Ulmia* albo tzw. „węgiel humusowy“, nierozpuszczalny w wodzie, alkoholu etylowym i lugach.
2. *Kwas humusowy* — rozpuszczalny w zasadach i wodnych roztworach szczawianu sodu.

3. *Kwas hymatomelanowy* (albo *ulminowy*) – rozpuszczalny w zasadach, w roztworze szczawianu i w alkoholu etylowym.
4. *Kwasy fulwonowe*, rozpuszczalne w wodzie, zasadach i alkoholu etylowym.
5. Estry kwasów żywicznych (woski).

Mieszanie tych związków można otrzymać przez peptyzację humusu z gleby lub torfu, przy pomocy szczawianu sodu.

Sven Oden podał dla „kwasu humusowego” (p. 2) następujący wzór:



b) Przygotowanie preparatów humusu według Odena.

Torf po rozdrobnieciu zadawano 1% HCl celem rozłożenia nierozpuszczalnych humianów wapnia. Następnie ekstrahowano przy pomocy 4n NH<sub>4</sub>OH. Z ekstraktu wytrącał Oden część koloidów przez zakwaszenie HCl. Osad po odsączeniu ekstrahował alkoholem etylowym, oddzielając w ten sposób frakcję rozpuszczalną w alkoholu etylowym (tj. „*kwas hymatomelanowy*”) oraz frakcję nierozpuszczalną w alkoholu (tj. „*kwas humusowy*”). Podkreślić należy, że sam Sven Oden zdawał sobie sprawę, że jego sposób rozdzielania jest nieilościowy i przybliżony ze względu na małą selektywność użytych rozpuszczalników w stosunku do substancji humusowych.

Szczególnie w odniesieniu do „*kwasu hymatomelanowego*” Sven Oden przyznaje, że otrzymanie stosowanymi przez niego metodami czystego związku jest niemożliwe. Jako zanieczyszczenia występują tu: żół „kwasu humusowego”, estry kwasów żywicznych i woski. Własności „*kwasu hymatomelanowego*”, otrzymanego przez Odena, były następujące:

barwa żółto-brunatna,

wsp. ekstynkcji 0,064 (stężenie 0,04 · 10<sup>-3</sup>g w 1 ccm, dł. fali 577 —  
9 milimikronów),

ciężar równoważnikowy („tymczasowy” — dop. Odena) = ca 200,  
sole wapniowców i met. ciężkich tego kwasu są w alkoholu nie-  
rozpuszczalne.

- 2) Przygotowanie preparatów humusu metodą K. Simona (23), (r. 1929).

Simon, stwierdzając zmiany humusu podczas traktowania zasadami, uważa ekstrakcję w środowisku alkalicznym za niewłaściwą i proponuje ekstrakcję humusu w środowisku słabo kwaśnym przy użyciu NaF lub (COONa)<sub>2</sub>. Metoda Simona polega na zadaniu rozdrobnionego surowca (torf lub węgiel brunatny) 1n HCl, a następnie po odsączeniu, 1% roztworem (NaOOC)<sub>2</sub> w stosunku 10 obj. roztworu na 1 cz. torfu. Przez dodatnie H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> doprowadza się wartość pH do 6. Po kilku dniach ekstrakt odsącza się i dla wytrącenia kwasów huminowych zakwasza 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Wytrącony żel po odsączeniu ponownie rozpuszcza się w szczawianie i powtarza wytrącenie celem oczyszczenia.

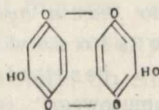
- 3) Krytykę wyżej opisanych metod przygotowania preparatów humusu przeprowadzili F. Fischer i G. Schröder (7), którzy wypowiedzieli pogląd, że otrzymanie „pierwotnych” kwasów humusowych (takich, jakie występują w glebie), jest rzeczą niemożliwą.

Fischer i Schröder uważają, że związki humusu otrzymane według tych metod ulegają zmianom chemicznym głównie wskutek utlenienia podczas parowania.

4) Van Bemmelen (1) pisze dosłownie: „Substancje humusowe, zarówno powstałe w przyrodzie z resztek roślinnych, jak i otrzymane działaniem kwasów i zasad na węglowodany, mają budowę złożoną. Wszelkie usiłowania rozdzielenia ich na chemiczne indywidualia przy pomocy rozpuszczalników — wody, alkoholu, kwasów i zasad, lub wytrącenia z roztworów kwasami i solami metali, pozostają bez rezultatów.

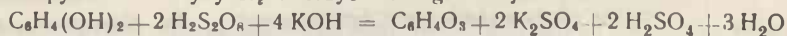
5) Chemia humusu w świetle monografii A. Waksmana „Humus“ (26), (r. 1936):

1. Przez utlenienie w alkalicznym środowisku fenolu, chinonu lub hydrochinonu można otrzymać „sztuczne“ kwasy huminowe o wyglądzie i właściwościach zbliżonych do naturalnych. Jako zasadniczy element budowy kwasu humusowego podaje Waksman grupę  $x(C_6H_4O_3)_2$  o strukturze przedstawionej na rys. 1.

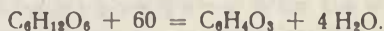


Rys. 1. Element budowy kwasu humusowego wg Waksmana  
The nucleus of the structure of humic acid after Waksman

Grupy takie miałyby się tworzyć według reakcji:



Powstawanie kwasu humusowego w przyrodzie według Waksmana polega prawdopodobnie na utlenieniu heksoz według reakcji:



2. Temperatura rozkładu naturalnego kwasu humusowego wynosi około  $100^\circ$ . Stąd wniosek o szkodliwym działaniu wyższej temperatury przy preparatyce humusu.

3. Waksman wymienia następujące związki chemiczne wyodrębnione z humusu:

Węglowodór nasycony  $C_{31}H_{64}$  — otrzymany przez ekstrakcję wrzącym alkoholem z torfu. Temp. top.  $68^\circ$ , c. wł. 0,78. Rozpuszcza się w eterze i w eterze naftowym.

Agrosterol i fytosterol — otrzymane jak wyżej.

Mieszanina wosków i estrów kwasów żywicznych — otrzymane przez ekstrakcję mieszaniną alkoholu i eteru, nierozpuszczalna w wodzie i alkoholu uwodnionym. Jest to brunatny proszek, topiący się w temp. około  $100^\circ$ .

Kwasy organiczne:

- a) szczawiowy,
- b) akrylowy,

- c) 11 — hydroksystearynowy  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{CHOH}(\text{CH}_2)_9\text{COOH}$  wyodrębniony przez Schreiner'a za pomocą eteru naftowego,  
d) 9, 10 — dwuhydroksystearynowy  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CHOH} \cdot \text{CHOH}(\text{CH}_2)_7 \text{COOH}$  wyodrębniony przez ekstrakcję eterem,  
e) benzoesowy (2 g na 25 kg gleby).

Oprócz wyżej wymienionych związków stwierdzono w humusie obecność pentozanów i pentoz oraz takich substancji białkowych, jak histydyna i kreatyna.

Oдноśnie „*kwasów huminowych*“, stanowiących główną masę humusu, W a k s m a n stwierdza, że dotychczasowe badania nie pozwalają na ich zdefiniowanie chemiczne i podaje w wątpliwość, czy są to proste indywidualia chemiczne.

6) G. L. St ad n i k o w (25), (r. 1930), podaje, że budowy kwasu hymatomelanowego nie można określić ze względu na trudności w jego otrzymywaniu.

7) G. J. S i d e r i (22), (r. 1936) stwierdził zdolność adsorbowania się „humianów“ na piasku kwarcowym, przy czym, jak podaje, nie mógł ich eluować żadnym odczynnikiem.

8) A. H o c k (10), (r. 1937) stwierdził zdolność adsorbowania się związków humusu z roztworu w  $(\text{COONa})_2$  na wyżarzonym tlenku glinu. Hock nie znalazł sposobu na desorpcję związków, które się zaadsorbowały.

9) U. S p r i n g e r (24), (rok 1938) wypowiada się w swojej pracy przeciwko metodzie ekstrakcji K. S i m o n a (23), uważając, że ekstrakcja szczawianem sodu nie pozwala na uchwycenie prawdziwych stosunków ilościowych i natury substancji humusowych. S p r i n g e r zaleca jako środek ekstrahujący 0,5% NaOH. Wnioski swoje wyprowadza autor na podstawie oznaczeń kolorymetrycznych.

10) C. E n d e r s (5, 6), (r. 1942—1943) w serii prac starał się uzasadnić, że naturalne kwasy huminowe powstają z węglowodanów i aminokwasów przez tzw. reakcję „melanoidynową“. Dobierając różne komponenty zawierające grupę karbonylową i aminową zauważył E n d e r s, że największą szybkość reakcji powstawania sztucznych substancji humusowych osiąga się stosując metyloglioksal  $\text{CH}_3 \cdot \text{CO} \cdot \text{CHO}$  oraz aldehyd glicerynowy  $\text{CHO} \cdot \text{CHOH} \cdot \text{CH}_2\text{OH}$  przy wartości pH 7 — 10.

Badaczowi temu (6) udało się wyodrębnić metyloglioksal z gleby w ilościach jednak bardzo małych.

11) W. W i l i a m s (27), (r. 1950) ujmuje problem humusu dialektycznie. Jest on zdania, że substancje próchnicy nie są przejściowymi, abiotycznymi produktami utleniania substancji organicznych.

Według W i l i a m s a główną masą próchnicy glebowej (cytuje) są — „egzoenzymy trzech typów drobnoustrojów“, a mianowicie: bakterii tlenowych, beztlenowych i grzybów.

W i l i a m s uważa za niewłaściwy sposób ekstrakcji stosowanej powszechnie do humusu, tzn. przy pomocy zasad; twierdzi on, że rozpuszczalniki alkaliczne rozpuszczają też kwas krzemowy i tytanowy, których obecność uniemożliwia krystalizację substancji próchnicznych.

W i l i a m s otrzymał 3 kwasy próchnicowe w postaci krystalicznej. Stosował on wypłukiwanie wodą gleby w lizymetrach, w których były zachowane naturalne warunki wegetacji roślinnej. Do ekstrakcji brał po 4 m<sup>3</sup> gleby, do wypłukiwania której używał 5000 l. wody.

Otrzymał następujące frakcje, krystalizujące z wody:

1. *kw. ulminowy* (albo według Sven Odena (19) — *hymatomelanowy*),
2. *kw. huminowy* (humusowy według Sven Odena),
3. *kw. krenowy* (fulwonowy według Sven Odena).

Kwasy: ulminowy i huminowy są według Williamsa podobne w swoich własnościach. Pod działaniem  $\text{NH}_3$  rozkładają się, sole ich z metalami II i III wartościowymi oraz metalami ciężkimi są nierozpuszczalne w wodzie.

Ważnym spostrzeżeniem Williamsa jest stwierdzenie, że kwas ulminowy i huminowy łatwo przechodzą w formy nierozpuszczalne w wodzie, zwane odpowiednio ulminą i huminą.

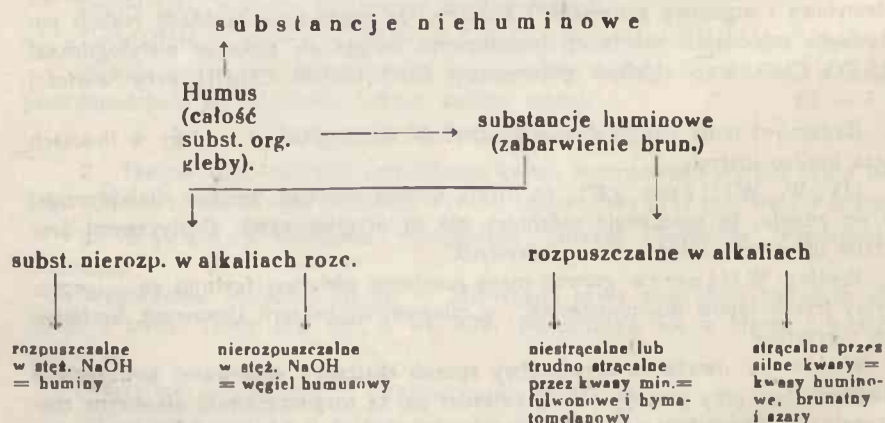
Czynnikami powodującymi to przejście mogą być: długotrwałe ogrzewanie w temp. wrzenia lub zamrażanie.

Williams uważa też, że przy wypieraniu kwasu ulminowego i huminowego z ich soli wydziela się humina lub ulmina, które pod działaniem zasad przechodzą w roztwór koloidalny. Przeobrażenie opisanych kwasów w ulminę lub huminę jest, zdaniem Williamsa, nieodwracalne.

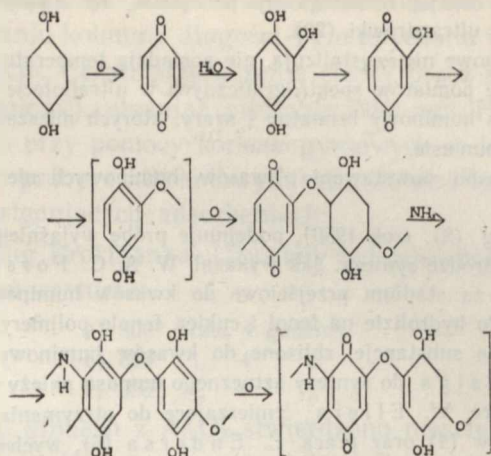
Kwas krenowy jest bezbarwny, rozpuszczalny w wodzie i kwasach, nie ulega przeobrażeniom, powoduje zmatowienie szkła, rozpuszcza cynę.

12) F. Scheffer i E. Weltz (21), (r. 1950), dokonali w swej pracy syntetycznego przeglądu współczesnego stanu wiedzy o humusie, uzupełniając go swoimi własnymi badaniami.

Przyjmują oni następującą systematykę substancji humusowych opartą na starym podziale Sven Odena (19).



Najlepiej zbadane są kwasy huminowe, chociaż i dla nich nie ustalono jeszcze dokładnego ciężaru cząsteczkowego (około 1200). Ważniejsze własności kwasów huminowych, podawane przez Scheffera i Weltzego podług W. Laatsch'a (15), są następujące:



Rys. 2.

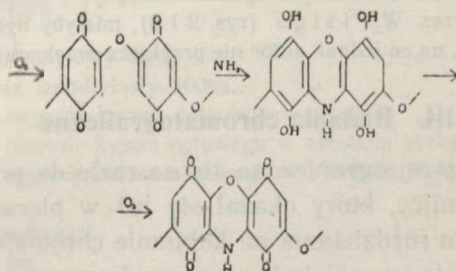
ciężar cząst. 253

mol. weight 253

2,75% N.

Synteza sztucznego humusu wg Flaiga

The synthesis of artificial humus after W. Flaig



Rys. 3.1

ciężar cząst. 257

mol. weight 257

5,45% N.

Synteza sztucznego humusu wg Flaiga

The synthesis of artificial humus after W. Flaig

- a) kwasy huminowe mają własności garbujące,
- b) odbudowa przy pomocy  $\text{ClO}_2$  daje pewien % kwasu maleinowego,
- c) związki te można chlorować, otrzymując trwale chloropochodne.
- d) sole  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Ba}^{++}$  i metali ciężkich są nierozpuszczalne w wodzie,
- e) kwasy huminowe są nierozpuszczalne w organicznych rozpuszczalnikach,

- f) tworzą one szereg homologiczny polimerów, co stwierdził Scheffer przy pomocy ultrawirówki (20),
- g) kwasy huminowe nie krystalizują, nie posiadają temperatury topnienia,
- h) na podstawie pomiarów spektrograficznych w ultrafiolecie można wyróżnić 2 typy: kwas huminowy brunatny i szary, których mieszaninę zwykle spotyka się w humusie,
- i) skład i sposób powstawania kwasów huminowych nie jest dotychczas ustalony.

13) W. Flaig (8), (rok 1950), podejmuje próbę wyjaśnienia budowy kwasów huminowych na drodze syntezy. Jak wykazał W. A. C. Forsyth (9), kwasy fulwonowe, uważane za stadium przejściowe do kwasów huminowych, są fenolowymi glukozydami. Po hydrolizie na fenol i cukier, fenole polimeryzujące wobec  $O_2$  na ciemno zabarwione substancje, zbliżone do kwasów huminowych.

Zdaniem W. Flaiga do syntezy sztucznego humusu należy więc użyć fenoli.

Dlatego też prace W. Ellera, zmierzające do otrzymania sztucznego humusu z węglowodanów (4) oraz praca C. Endersa (5), wychodząca z metylogliksalu, dawały produkty różniące się niektórymi własnościami od naturalnych kwasów huminowych.

Opierając się na tych przesłankach W. Flaig przeprowadził syntezę sztucznego humusu według następującego schematu:

Fenole poddawane były utlenianiu przy pH 8—9 w środowisku amoniakalnym (rys. 2), przy użyciu tlenu gazowego w stosunku 3 gramoatomu tlenu na 1 gramo-cząsteczkę fenolu (hydrochinonu).

Jeżeli natomiast zastosowano utlenienie w stosunku 4 gramoatomów  $O$  na 1 gramo-cząsteczkę hydrochinonu, wtedy otrzymano następujący przebieg reakcji (rys. 3).

Wzory podane przez W. Flaiga (rys. 2 i 3), miałyby być zbliżone do naturalnej budowy humusu, na co jednak autor nie przytacza przekonujących dowodów.

### III. Badania chromatograficzne

W pracy niniejszej ograniczono się na razie do prób z wyciągiem alkoholowym próchnicy, który okazał się już w pierwszych doświadczeniach podatny do rozdzielania na kolumnie chromatograficznej

Wyciąg alkoholowy próchnicy, sporządzony w sposób opisany w następnych rozdziałach, zawiera niemal wszystkie główne składniki humusu, ujęte w systematyce Sven Odena (19). Zawiera on bowiem „kwas hymatomelanowy” i poboczne zanieczyszczenia jako roztwór, zaś „kwas humusowy” jako roztwór koloidalny, czego dowodzi obserwowany w nim wyraźny efekt Tyndalla.

#### Próby chromatogramów na różnych adsorbentach

Do prób wstępnych używano rurek szklanych średnicy 4 mm, zwężonych z jednego końca. Koniec zwężony zapychano od wewnątrz



watą, następnie nasypywano porcjami adsorbent i ubijano przez wstrząsanie. Po uformowaniu kolumny długości 4 cm upychano warstwę waty grubości około  $\frac{1}{2}$  cm. Celem przesączenia cieczy przez kolumnę używano pompy próżniowej, stosując ciśnienie 300 mm Hg. Kolumny umocowywane były przy pomocy korków gumowych w kolbach ssawkowych. Wykonano próby z alkoholowymi ekstraktami torfów i węgla brunatnego na następujących adsorbentach:

1.  $\text{Al}_2\text{O}_3$  według Brokmanna. Używany był adsorbent nieprażony oraz prażony w temperaturze:

- a)  $300^\circ$  przez 4 godziny,
- b)  $600^\circ$  „ 4 „
- c)  $900^\circ$  „ 4 „

We wszystkich próbach z  $\text{Al}_2\text{O}_3$  stwierdzono nieselektywną i nieodwracalną adsorpcję. Kolumna w ultrafiolecie fluoryzowała fioletowo i żółtawo. Obserwowano większe nasilenie żółtej fluorescencji u góry kolumny, zaś większe nasilenie fioletu u dołu. Barwy te przechodzą stopniowo jedna w drugą. Brak wyraźnej granicy.

Opisany obraz uzyskano przy przepuszczeniu przez kolumny 10 ml ekstraktu alkoholowego z torfu i węgla brunatnego.

Do prób rozwinięcia chromatogramów na  $\text{Al}_2\text{O}_3$  użyto następujących odczynników:

- alkohol etylowy 96%,
- alkohol izobutyłowy 100%,
- 10% roztwór kwasu octowego w wodzie,
- 10% roztwór kwasu octowego w alkoholu etylowym 96%,
- 10% roztwór kwasu olejowego w alkoholu etylowym,
- eter,
- eter naftowy,
- 10% HCl,
- 10% NaOH.

Zadna próba nie dała rozsunięcia warstw ani wypłukania któregoś składnika. Tlenek glinu nie nadaje się zatem do chromatograficznej analizy i rozdzielania alkoholowej frakcji humusu.

2. *Węgiel aktywny  $\beta$ -my Mercka*. Stwierdzono całkowitą adsorpcję wyżej wymienionych roztworów. Przeprowadzone próby elucji opisanymi odczynnikami nie dały wyniku.

3. *Ziemia krzemkowa (Techn.)*. Adsorbent wyprażono w piecu elektrycznym do temperatury  $1000^\circ$  przez 3 godziny. Stwierdzono nieselektywną adsorpcję. Fluorescencja w świetle ultrafioletowym —

fioletowo żółtawa. Zaadsorbowane związki dają się łącznie wymywać z kolumny 96% alkoholem etylowym.

4. *Celuloza* (sączi ilościowe szwedzkie, marki Munktell Nr  $\overline{OB}$ ). Do chromatografii „papierowej“ używano pasków wymienionej bibuły dł. 10 cm i szerokości 1 cm. Stosowano proste urządzenie, składające się z probówki zatłkanej korkiem gumowym, na dnie której znajdował się badany roztwór, a w nim zanurzony był koniec paska bibuły. Pozwala to na uzyskanie chromatogramu „wstępującego“, tworzącego się w atmosferze nasyconej pary rozpuszczalnika, co ma duży wpływ na ostrość powstałych pasów.

Gdy chromatogram „wstępujący“ osiągał  $\frac{1}{2}$  wysokości paska, wyjmowano pasek z „kamery“, suszono na powietrzu, a następnie „rozwijano“ w identycznej „kamerze“ przez zanurzenie do alkoholu etylowego 96%, dolnego końca paska.

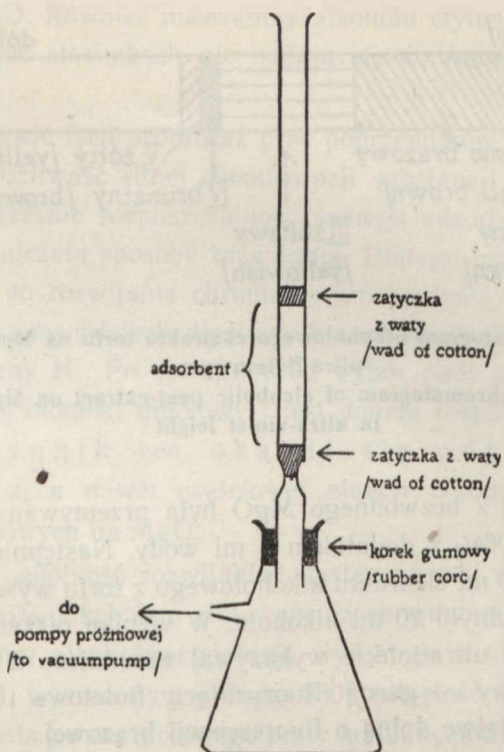
Próby przeprowadzone z ekstraktem alkoholowym torfu wysokiego dały pozytywne wyniki. Otrzymano wyraźne warstwy fioletowe (w świetle ultrafiolet.) i żółte, przy czym warstwa żółta przy „rozwijaniu“ chromatogramu przesuwa się do góry, warstwa fioletowa pozostaje na miejscu.

5. *Tlenek magnezu* gruboziarnisty matki „British Drug Houses Ltd.“, oznaczony „B.D.H. Laboratory Reagent — Magnesium Oxide— heavy“. Adsorbent ten dał pozytywne wyniki przy chromatografii wyciągów ze wszystkich opisanych niżej materiałów. Powstają wyraźne warstwy szczególnie dobrze widoczne w ultrafiolecie; rozsunięcie zwiększa się po przemyciu alkoholem. Bliższy opis zastosowania metody chromatografii na MgO do rozdzielania alkoholowego ekstr. humusu znajduje się w dalszych rozdziałach pracy.

#### IV. Chromatogramy na MgO

Używano rur cienkościennych ze zwykłego, miękkiego szkła. Przeważnie stosowane były średnice 13—14 mm, niekiedy i 20 mm. Dla uformowania kolumny rurę zwężano w odległości około 8 cm od końca, a po napełnieniu adsorbentem umocowywano w kolbie ssawkowej na korku gumowym (rys. 4).

Napełnienie rury tlenkiem magnezu „ciężkim“ (heavy) odbywało się przez wsypywanie małych ilości adsorbenta i długotrwałe uderzanie końcem rury o stół. Napełnienie rury o średnicy 13 mm 8-ma gramami

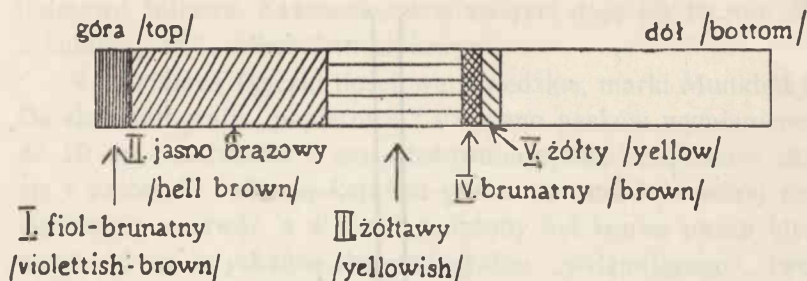


Rys. 4. Aparatura używana do adsorpcji chromatogr.  
 Fig. 4. The apparatus used for the chromatographic adsorption

MgO przez wstrząsanie w sposób opisany wymaga około 1 godziny. Stwierdzono, że ubijanie adsorbenta prętem od góry daje nierównomierne napełnienie kolumny, co potem wywołuje nierówne ułożenie się warstw chromatogramu. Tak przygotowane kolumny były używane do niżej opisanych doświadczeń. Jako źródło ultrafioletu była używana lampa z palnikiem kwarcowo-rtęciowym, o mocy 1000 W, zaopatrzona w filtr Wooda.

#### Doświadczenie 1. Zbadanie zdolności rozdzielczej MgO w różnych warunkach uwodnienia

Kolumny formowane były z tlenku magnezu „ciężkiego“ w sposób wyżej opisany (8 g MgO), przy czym stosowano następujące stopnie uwodnienia:



Rys. 5. Chromatogram alkoholowego ekstraktu torfu na MgO w świetle ultra-fioletowym.

Fig. 5. The chromatogram of alcoholic peat-extract on MgO column in ultra-violet light

a) Kolumna z bezwodnego MgO była przemywana 20 ml alkoholu etylowego 96% z dodatkiem 5 ml wody. Następnie przesączono przez kolumnę 60 ml ekstraktu alkoholowego z torfu wysokiego, o wartości pH 5 i przemyto 20 ml alkoholu. W wyniku otrzymano chromatogram, który w ultrafioletcie wykazywał zasadniczo 2 nie ostro zaznaczone warstwy — górną fluoryzującą fioletowo i przechodzącą stopniowo w warstwę dolną o fluorescencji brązowej.

b) Powtórzono doświadczenie a) z tą różnicą tylko, że zmniejszono dodatek wody do 20 ml alkoholu z 5 ml do 2 ml. W wyniku otrzymano ostrzejszą granicę strefy górnej chromatogramu.

c) Do napełnienia kolumny użyto tlenku magnezu ogrzewanego w temperaturze 230°C przez 7 godzin. Do przemycia użyto 20 ml 96% alkoholu bez dodatku wody. Otrzymano chromatogram o wyraźniej zaznaczonych warstwach. (Rys. 5 -- naturalna wielkość).

d) Analogiczne próby wykonano z tlenkiem magnezu prażonym w temperaturze 300°, 400°, 500° i 700°. Nie stwierdzono zmian w układzie stref adsorpcyjnych i ich ruchliwości przy rozwijaniu.

Do wszystkich następnych prób stosowano wobec tego MgO prażony w 230—250°. Dla przeforsowania cieczy wystarczyło ciśnienie 600 mm Hg.

### Rozwijanie chromatogramu

Długotrwałe nawet przemywanie alkoholem etylowym nie doprowadza do rozsunienia warstw chromatogramów otrzymanych w opisany

sposób na MgO. Również mieszaniny alkoholu etylowego z izobutylo-  
wym w różnych stosunkach nie nadają się do rozwijania chromato-  
gramu.

Na podstawie tych prób oraz prac poprzedników (10 i 22), brano  
pod uwagę możliwość silnej chemisorpcji substancji humusowych na  
MgO. Równocześnie rozpuszczalność samego adsorbenta w mocnych  
kwasach ograniczała sposoby rozwijania. Dlatego uznano za możliwe  
zastosowanie do rozwijania chromatogramu jedynie związku o silnie  
zaznaczonych własnościach dipolowych oraz możliwie mało zdysocjo-  
wanego na jony H: Po szeregu prób wybór padł na *kwas olejowy*,  
który ma duży moment dipolowy i jest dobrze rozpuszczalny w alko-  
holu. Odczynnik ten okazał się odpowiedni do  
rozwijania, a nawet częściowej eluacji chromatogramów sub-  
stancji humusowych na MgO.

Zbadano „zdolność rozwijania“ następujących mieszanin kwasu  
olejowego z 96% alkoholem etylowym na chromatogramach, otrzyma-  
nych z wyciągu alkoholowego torfu wysokiego z Chlebowa (pH 5)  
na MgO (8 g), wysuszonym w temp. 230° (objętość mieszaniny 5 ml).  
Dla przesączenia kwasu olejowego przez kolumnę potrzeba było obniżyć  
ciśnienie do 100 mm Hg.

Stosunek kwasu olejowego do alkoholu: Wynik rozwijania chromatogramu:

1 : 50	nie rozwija,
1 : 25	przesuwa warstwy o 2—3 mm, lecz nie po- lepsza ostrości rozdziału,
1 : 10	przesuwa warstwy od 5—10 mm, zwiększa ostrość ich granic,
1 : 7,5	przesuwa warstwy o 10—15 mm, daje ostre granice warstw,
1 : 5	nie może być użyty, gdyż adsorbent zostaje w górnej warstwie częściowo rozpuszczony i tworzą się „kanały“ w kolumnie.

Wniosek — w danych warunkach optymalnie roz-  
wija chromatogram mieszanina składająca  
się z 1 objętości kwasu olejowego w stosunku  
do 7,5 objętości alkoholu. Stwierdzono, że niewielkie  
odchylenia od tego stosunku, np. 1 : 8 lub 1 : 7 nie wpływają w sposób  
widoczny na zdolność rozwijania chromatogramu.

## Chromatogramy ekstraktów alkoholowych z różnych surowców wyjściowych

Po opracowaniu metodyki chromatografii alkoholowych ekstraktów humusu, wykonano próby przy zastosowaniu wyciągów otrzymanych z następujących surowców:

1. Torf „niski“ z głębokości 1 m (Zemborzyce pod Lublinem).
2. Preparat kwasów humusowych otrzymanych z torfu niskiego (Zemborzyce) metodą K. Simona (23), tj. przez ekstrakcję roztworem szczawianu sodu.
3. Preparat kwasów humusowych otrzymanych z torfu niskiego (Zemborzyce) metodą U. Springera (24), tj. przez ekstrakcję rozcieńczonym roztworem NaOH.
4. Torf niski z Parku Narodowego w Białowieży.
5. Torf wysoki (*Sphagnum*) z miejscowości Chlebowo pow. Oborniki, woj. Poznańskie.
6. Torf wysoki z Parku Narodowego w Białowieży.
7. Węgiel brunatny z miejscowości Trzydnik woj. Lubelskie.
8. Ziemia kompostowa z Plantacji Miejskich w Lublinie (dwuletnia).

Dokładny opis ekstrakcji podany jest poniżej. Należy tu podkreślić pewną modyfikację metod, a mianowicie wprowadzenie dodatkowej ekstrakcji eterem naftowym surowców oznaczonych numerami od 1—5. Modyfikację wprowadzono w celu usunięcia związków bitumicznych, które podczas ekstrakcji alkoholem mogłyby przejść do roztworu.

### V. Ekstrakcja surowców wyjściowych

#### Torf niski Zemborzyce

##### a) Ekstrakcja eterem.

Torf wysuszony na powietrzu rozłarto i przesiano przez sito o średnicy oczek 2 mm. Ciężar suchego torfu -- 6 kg. Ekstrakcja w temp. pokojowej eterem naftowym (frakcja 30°--60°).

Sposób ekstrakcji:

Torf zalewano 4 l eteru naftowego, a po 24 godzinach wyciskano na ręcznej prasie śrubowej, po czym natychmiast wlewano dalsze 4 l eteru. Torf z rozpuszczalnikiem znajdował się w naczyniu szklanym ze szlifem. Powyższą operację wykonano 25 razy.

Ekstrakty były bezbarwne. W celu zagęszczenia poszczególne ekstrakty były odparowywane aż do chwili, gdy ich temperatura wrzenia osiągnęła 65°C. Początkowe wyciągi miały po zagęszczeniu barwę żółtą, końcowe były bezbarwne.

#### b) Ekstrakcja alkoholem.

Część torfu po ekstrakcji eterem naftowym i po wysuszeniu, o ciężarze 2,7 kg., zalano 4 l 0,2 n H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i pozostawiono przez 24 godziny. Po odsączeniu przepłukiwano torf wodą destylowaną porcjami po 1 litrze 40 razy. Podczas działania kwasem i wypłukiwania torf był zamknięty w naczyniu uniemożliwiającym dostęp powietrza.

Po wysuszeniu przepłukanego torfu na powietrzu rozpoczęto ekstrakcję alkoholem etylowym 96%. Użyto 25 razy po 1,5 l rozpuszczalnika w odstępach 24 godzin. Poszczególne ekstrakty oddestylowywano pod zmniejszonym ciśnieniem 80 mm Hg w temperaturze 55°—65°C w atmosferze N<sub>2</sub>. Pierwsze ekstrakty były barwy żółtej, ostatnie bezbarwne.

Zagęszczone ekstrakty złączono. Po oziębieniu wytrącał się z nich żółtawo-biały osad, który oddzielono od płynu przez odwirowanie w ciągu 25 minut przy 3500 obr./1 min.

Osad ten jest rozpuszczalny we wrzącym alkoholu.

Zagęszczony wyciąg alkoholowy miał barwę rubinową (współczynnik ekst. 0,32 na fotokolorymetrze Langego) i zawierał 0,381 g substancji organicznej na 100 ml. Łącznie z 2,7 kg torfu niskiego z Zemborzyc wyciąg alkoholowy zawierał 10,887 g substancji organicznych, tj. z 1 kg torfu niskiego z Zemborzyc otrzymano 4,032 g tych substancji. Ilość tę oznaczono przez odparowanie 100 ml ekstraktu w temp. 70° pod ciśnieniem 80 mm w atmosferze N<sub>2</sub> do stałej wagi.

#### c) Ekstrakcja szczawianem sodu.

Drugą część tegoż torfu o ciężarze 2 kg, po wysuszeniu po ekstrakcji eterem naftowym, zalano 3,5 l 0,2 n H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Po 24 godzinach odsączono i przepłukiwano torf 40 razy H<sub>2</sub>O destylowaną po 1 l. Ostatni przesącz nie wykazywał obecności Ca<sup>++</sup> i Fe<sup>+++</sup>, wartość pH wynosiła 5,5. Rozpoczęto ekstrakcję 1% szczawianem sodu z dodatkiem 0,5 ml stęż. HCl na każdy litr roztworu.

Ekstrakcja odbywała się w naczyniu szczelnie zamkniętym, w którym 2 kg torfu zalewano wymienionym rozpuszczalnikiem w ilości 6 l, następnie wstrząsano 1/2 godziny i odstawiano do sedymentacji.

Ekstrakty miały barwę czarno-brunatną, wartość pH 5—6. Do ekstrakcji użyto 15 razy po 6 l. 1% szczawianu. Ekstrakty po sedymentacji odsączano na lejku Büchnera.

Pierwsze trzy ekstrakty złączono i w celu strącenia kwasów humusowych zadano HCl 1 : 1 w ilości 30 ml na 1 liter wyciągu. Jest to ilość, którą uznano za optymalną na podstawie serii próbnych strąceń.

Po sedymentacji osad odwirowano i przepłukano wodą. Następnie rozpuszczono w 1 l. 0,5% szczawianu sodu, dodając NaOH do wartości pH 6. Odsączono małe ilości substancji nierozpuszczalnych i ponownie strącono HCl 1 : 1 w stosunku 30 ml na 1 l. Po odwirowaniu koloidalnego osadu przepłukiwano na wirówce HCl 0,05 n i wodą (3.500 obr./1 min.) aż do osiągnięcia pH = 4 w cieczy nad osadem. Poniżej tej kwasowości wirowanie nie powodowało sedymentacji nawet po 5 godzinach.

Tak otrzymany brunatny koloid wysuszono w temperaturze 60°C pod ciśnieniem 100 mm Hg w atm. N<sub>2</sub>. Po sproszkowaniu umieszczono na 3 tygodnie w ekzykatorze nad H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Otrzymano 4,9828 g preparatu, który miał strukturę blaszkową, barwy czarnej. W dalszym ciągu pracy jest on nazwany „2 razy strącony“.

Resztę wyciągów łączono w grupy do objętości 20 l i strącano dodając optymalną objętość 1,5 molarnego H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> w stosunku 50 ml na 1 liter ekstraktu. Po sedymentacji odsączono na lejku Büchnera pod nakryciem i przemywano 0,05 HCl i H<sub>2</sub>O aż do obniżenia kwasowości przesączu do wartości pH — 4. Suszono w warunkach podanych poprzednio. W ten sposób otrzymano 27,755 g, tj. łącznie z preparatem „2 razy strąconym“ otrzymano z 2 kg torfu niskiego z Zemborzyc drogą ekstrakcji szczawianem sodu 32,7378 g preparatów humusowych.

#### Ekstrakcja torfu niskiego (z Zemborzyc) przy pomocy 0,5% NaOH.

Drugą część torfu Zemborzycznego po ekstrakcji eterem naftowym i wysuszeniu na powietrzu (w ilości 1 kg) zalewano 0,5% NaOH. Ekstrakcja odbywała się w szczelnie zamkniętym naczyniu w temperaturze pokojowej. Na wymienioną ilość torfu wlewano 3 l 0,5% NaOH, wstrząsano 1/2 godziny i pozostawiano do sedymentacji. Ekstrakcję powtórzono w opisanych warunkach 15-to krotnie (po 3 l).

Pierwsze 5 ekstraktów złączonych zadano stęż. 36% HCl w stosunku 8 ml kwasu na 1 l. wyciągu. Strącony brunatny koloid po se-



dymentacji odsączono na lejku Büchnera pod przykryciem i po przemyciu wodą ponownie rozpuszczono przez dodanie NaOH do wartości  $\text{pH} = 9$ . Następnie strącono osad 2-gi raz przez dodanie na 2,2 l roztworu 88 ml 1,5 molarnego  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .

Osad odwirowano i przemywano wodą na wirówce. Stosując szybkość 3500 obrotów na minutę udaje się doprowadzić osad do sedymentacji, gdy kwasowość cieczy nad nim jest mniejsza od wartości  $\text{pH} = 2$ .

Po wysuszeniu osadu w temperaturze  $70^\circ$  pod ciśnieniem 80 mm Hg i w atm.  $\text{N}_2$ , a następnie przez 3 tygodnie w ekzykatorze nad  $\text{H}_2\text{SO}_4$  otrzymano 13,4291 g preparatu barwy czarnej.

Oznaczenie — „preparat z NaOH 2 razy strącony”.

Resztę wyciągów łączono i strącono 1,5 molarnym  $\text{H}_2\text{SO}_4$  w stosunku optymalnym 50 ml kwasu na 1 litr wyciągu. Po sedymentacji odsączano brunatny koloid na lejku Büchnera pod nakryciem i przemywano 0,05n  $\text{H}_2\text{SO}_4$  oraz wodą, po czym suszono w wyżej opisanych warunkach. Otrzymano 64,681 g czarnego preparatu.

Łącznie z 1 kg torfu niskiego z Zemborzyc otrzymano więc 78,1101 g substancji humusowych.

### Ekstrakcja alkoholem preparatów suchych kwasów humusowych otrzymanych z torfu niskiego (Zemborzycy)

Opisane wyżej preparaty umieszczano w ilościach po 3 g na lejках Schotta z porowatym dnem porcelanowym (Nr 1b c3). Przemywano porcjami po 10 ml alkoholu etylowego 96% aż do chwili, gdy

Sposób otrzymania preparatu	Ilość alkoholu użyta do zupełnej ekstrakcji na 1 g preparatu	Zawartość suchej masy ekstraktu w 100 ml
1. Ze szczawianu sodu (2 razy strącony)	60 ml	0,097 g
2. Z NaOH, (2 razy strącony)	45 ml	0,029 g
3. Z NaOH, raz strącony	30 ml	0,026 g
4. Ze szczawianu sodu, 1 raz strącony	90 ml	0,089 g

przesącz nie wykazywał żółtawej barwy, co uważano za ekstrakcję zupełną (początkowo otrzymano przesącz cieńmo-brunatny).

Oznaczono następnie suchą masę substancji rozpuszczonych w 100 ml alkoholu z każdego preparatu przez obliczenie ubytku na wadze przed i po ekstrakcji tych preparatów, suszonych w temp. 60°, nad CaCl<sub>2</sub>, pod ciśnieniem 80 mm sł. Hg do stałej wagi.

Wyniki podaje tabela na str. 313.

Jak widać z tabeli preparaty otrzymane przy pomocy szczawianu sodu zawierają przeszło 3 razy więcej substancji rozpuszczalnych w alkoholu w porównaniu z preparatami, otrzymanymi z NaOH.

### Ekstrakcja torfu niskiego z Białowieży

#### a) Wyciąg eterowy.

Wysuszony na powietrzu, sproszkowany i przesiany torf w ilości 0,75 kg zalewano 0,75 l eteru naftowego (30°–60°), po 24 godzinach wyciskano na prasie śrubowej i wlewano nową porcję rozpuszczalnika. Torf zalany eterem naftowym był trzymany w szczelnie zamkniętych naczyniach szklanych. Ekstrakcję powtarzano 20 razy. Ostatni wyciąg eterowy po zagęszczeniu do chwili osiągnięcia temperatury wrzenia 65° nie wykazał zabarwienia żółtawego.

#### b) Przepłukanie kwasem.

Po wysuszeniu na powietrzu torfu wyekstrahowanego eterem naftowym zalano go 1,2 l 0,2n HCl i pozostawiono na 24 godziny. Następnie przemywano wodą destylowaną na lejku Büchnera aż do czasu, gdy przesącz wykazał wartość pH = 5 oraz ujemny wynik reakcji na Ca<sup>++</sup> ze szczawianem sodu oraz na Fe<sup>+++</sup> (z rodankiem).

#### c) Ekstrakcja alkoholem.

Wyekstrahowany eterem naftowym i przemyty HCl torf po wysuszeniu na powietrzu zalewano alkoholem etylowym 96% porcjami po 0,5 l, 25 razy co 24 godziny. Barwa pierwszych ekstraktów oliwkowo-zielona, następnych — żółtawa. Ostatni wyciąg bezbarwny. Wyciągi zagęszczano przez destylację w atm. N<sub>2</sub> przy 60° i 100 mm ciśnienia. Po uziębieniu z zagęszczonych złączonych ekstraktów wytrącił się żółtawy osad, który oddzielono przy pomocy wirowania (3500 obrotów na minutę). Wyciąg po oddestylowaniu miał barwę zielonkawo-brunatną i zawierał w 100 ml 1,096 g substancji organicznych.

Łącznie z 0,75 kg torfu niskiego z Białowieży wyekstrahowano w ten sposób alkoholem 3,288 g substancji org., tj. wydajność ekstrakcji wyniosła 4.110 g preparatu z 1 kg torfu. Opis suszenia preparatu — patrz torf Zemborzyce.

#### Ekstrakcja torfu wysokiego z Chlebowa

a) 0,90 kg torfu wysuszonego na powietrzu rozdrobnionego i przesianego, zalewano w szczelnie zamkniętym naczyniu szklanym porcjami eteru naftowego ( $30^{\circ}$ — $60^{\circ}$ ) w ilości po 4 l. Co 24 godziny torf wyciskano na ręcznej prasie śrubowej. Ekstrakcję powtórzono 30 razy. Barwa początkowych wyciągów — ciemno-żółta. Ostatni ekstrakt po zagęszczeniu w temperaturze  $60^{\circ}$  do małej objętości był bezbarwny.

#### b) Przemycanie kwasem.

Po wysuszeniu na powietrzu, wyekstrahowany eterem naftowym torf zalano nadmiarem 0,20 HCl na przecig 24 godzin. Następnie przemycano na lejku Büchnera wodą destylowaną aż do uzyskania wartości  $\text{pH}=4,5$  przesącza oraz do zaniku reakcji na wykrycie  $\text{Ca}^{++}$  i  $\text{Fe}^{+++}$ .

#### c) Ekstrakcja alkoholem

Po wysuszeniu przemytego kwasem solnym torfu na powietrzu, zalano całość alkoholem etylowym 96%, 25 razy po 2,5 l. Początkowe wyciągi były barwy ciemno brunatnej, ostatni wyciąg po zagęszczeniu w temp.  $60^{\circ}$  był bezbarwny. Poszczególne przesącze zagęszczano przez destylację w atmosferze N, w temp.  $60^{\circ}$  i pod ciśnieniem 100 mm Hg oraz złączono razem. Wykazywały one barwę brunatną. Zawartość substancji organicznych w 100 ml roztworu wynosi 0,602 g. Łącznie z 0,90 kg torfu wysokiego z Chlebowa wyekstrahowano alkoholem 21,070 g substancji, tj. wydajność z 1 kg torfu wynosi 23,177 g. Opis suszenia preparatu — patrz torf z Zemborzyc.

#### Ekstrakcja torfu wysokiego z Białowieży

a) 1,1 kg torfu wysuszonego na powietrzu, rozdrobnionego i przesianego ekstrahowano 25 razy eterem naftowym ( $30^{\circ}$ — $60^{\circ}$ ) po 2 l, wyciskając na prasie co 24 godziny. Barwa początkowych wyciągów — ciemno-żółta.

Ostatni ekstrakt po zagęszczeniu w temp.  $60^{\circ}$  do małej objętości był bezbarwny.

## b) Przemywanie kwasem.

Wyekstrahowany eterem torf zalano nadmiarem 0,2n HCl na 24 godziny, po czym przemowano na lejku Büchnera aż do ujemnego wyniku reakcji na wykrycie  $\text{Ca}^{++}$  i  $\text{Fe}^{+++}$  w przesączu, którego pH osiągnęło wartość 5.

c) Po wysuszeniu wyekstrahowanego eterem i przemytego kwasem torfu na powietrzu, ekstrahowano go alkoholem 96% 25 razy po 1 l. Barwa początkowych wyciągów ciemno-brunatna, ostatni ekstrakt po zagęszczeniu był bezbarwny. Wszystkie ekstrakty oddestylowano w atm.  $\text{N}_2$  w temperaturze  $60^\circ$  i pod ciśnieniem 100 mm Hg, a następnie złączono.

Barwa zagęszczonego wyciągu ciemno-brunatna. Zawartość substancji organicznych w 100 ml 0,994 g. Łączna zawartość związków organicznych rozpuszczalnych w alkoholu wynosi w 1,1 kg torfu wysokiego z Białowieży 5,964 g, tj. wydajność ekstrakcji wynosi 5,422 g substancji humusowych z 1 kg torfu.

### Ekstrakcja węgla brunatnego z Trzydnika

30 g sproszkowanego węgla brunatnego przemowano 0,2n HCl aż do usunięcia śladów  $\text{Fe}^{+++}$ . Po przepłukaniu wodą przesącz wykazywał  $\text{pH} = 4$ .

Następnie zalano proszek węglowy 150 ml alkoholu 96% i często wstrząsano w ciągu 12 godzin. Otrzymano po odsączeniu węgla roztwór barwy brunatnej, który wykazywał  $\text{pH} = 4$ , zaś wsp. ekstynkcji 0,35 (na fotokolorymetrze Langego).

### Ekstrakcja ziemi kompostowej z Plantacji Miejskich w Lublinie

1 kg ziemi kompostowej wysuszonej na powietrzu, po roztarciu na proszek i przesianiu zalewano 1 l. 0,5n HCl co 24 godziny, 10 razy, po czym przepłukano wodą aż do usunięcia śladów  $\text{Fe}^{+++}$ . Ekstrahowano następnie 5 x 200 ml 96% alkoholu, wartość pH roztworu = 5.

## VI. Ocena metod ekstrakcji na podstawie chromatogramów

Wobec sprzecznych poglądów na przydatność istniejących metod ekstrakcji próchnicy (19, 23, 24) przeprowadzono w identycznych warunkach chromatograficzne badania otrzymanych wyciągów (używano

kolumny średnicy 13,5 mm wypełnionych 8 g MgO „ciężkiego“ wysuszonego w 250°).

a) Po przemyciu kolumny 10 ml alkoholu wiano na kolumnę 100 ml wyciągu alkoholowego z preparatu otrzymanego z torfu niskiego „Zemborzyce“ przez ekstrakcję *s z c z a w i a n e m s o d u*. (Opis ekstr. podany poprzednio).

Obraz chromatogramu „nierozwiniętego“, lecz przemytego 20 ml alkoholu etylowego przedstawia rys. 6 lit. a<sub>1</sub>. Po „rozwinięciu“ chromatogramu roztworem 5 ml kwasu olejowego w alkoholu (stosunek 1 : 7,5) i przemyciu 20 ml alkoholu otrzymano obraz (w ultra-fioletcie), jak na rys. 6a lit. a<sub>2</sub>. Przez cały czas stosowano zmniejszone ciśnienie 500 mm sł. Hg, które przy „rozwijaniu“ trzeba było obniżyć do 100 mm Hg.

b) Zachowując te same warunki przemywania, „rozwijania“ i ciśnienia użyto 100 ml wyciągu alkoholowego z preparatu z torfu niskiego „Zemborzyce“, otrzymanego przy pomocy *s z c z a w i a n i u s o d u*, lecz dwukrotnie strąconego kwasem siarkowym dla oczyszczenia według *S i m o n a* (23). Chromatogram przed „rozwinięciem“ wyglądał jak na rys. 6, lit. b<sub>1</sub>, zaś po „rozwinięciu“ — rys. 6a, lit. b<sub>2</sub> (w świetle ultrafioletowym).

c) W tych samych warunkach co pod a) sporządzono chromatogram ze 100 ml ekstraktu alkoholowego, otrzymanego z preparatu stałego z torfu niskiego „Zemborzyce“ przez ekstrakcję *r o z t w o r e m N a O H* (opisana poprzednio).

Obraz przed „rozwinięciem“ — rys. 6, lit. c<sub>1</sub>.

Obraz po „rozwinięciu“ — rys. 6a, lit. c<sub>2</sub>.

d) W warunkach jak pod a) użyto 100 ml roztworu alkoholowego z preparatu stałego, który był otrzymany z torfu niskiego „Zemborzyce“ przez ekstrakcję *r o z c. N a O H* i dla oczyszczenia 2 razy strącany kwasem siarkowym (opis podany poprzednio).

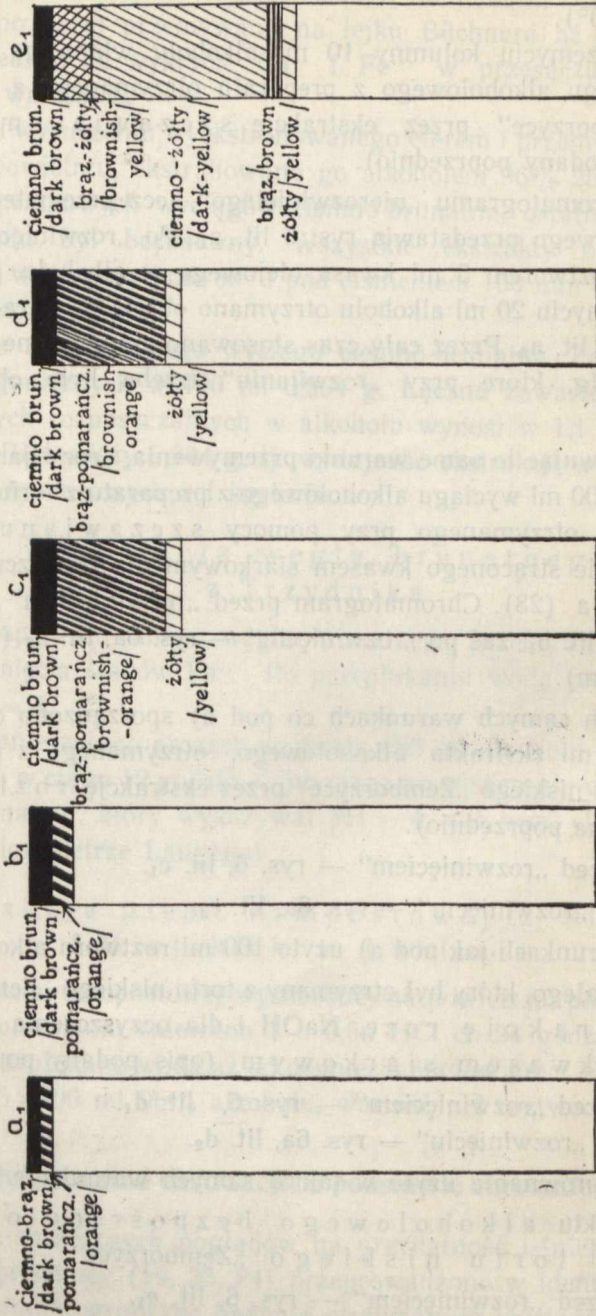
Obraz przed „rozwinięciem“ — rys. 6, lit. d<sub>1</sub>.

Obraz po „rozwinięciu“ — rys. 6a, lit. d<sub>2</sub>.

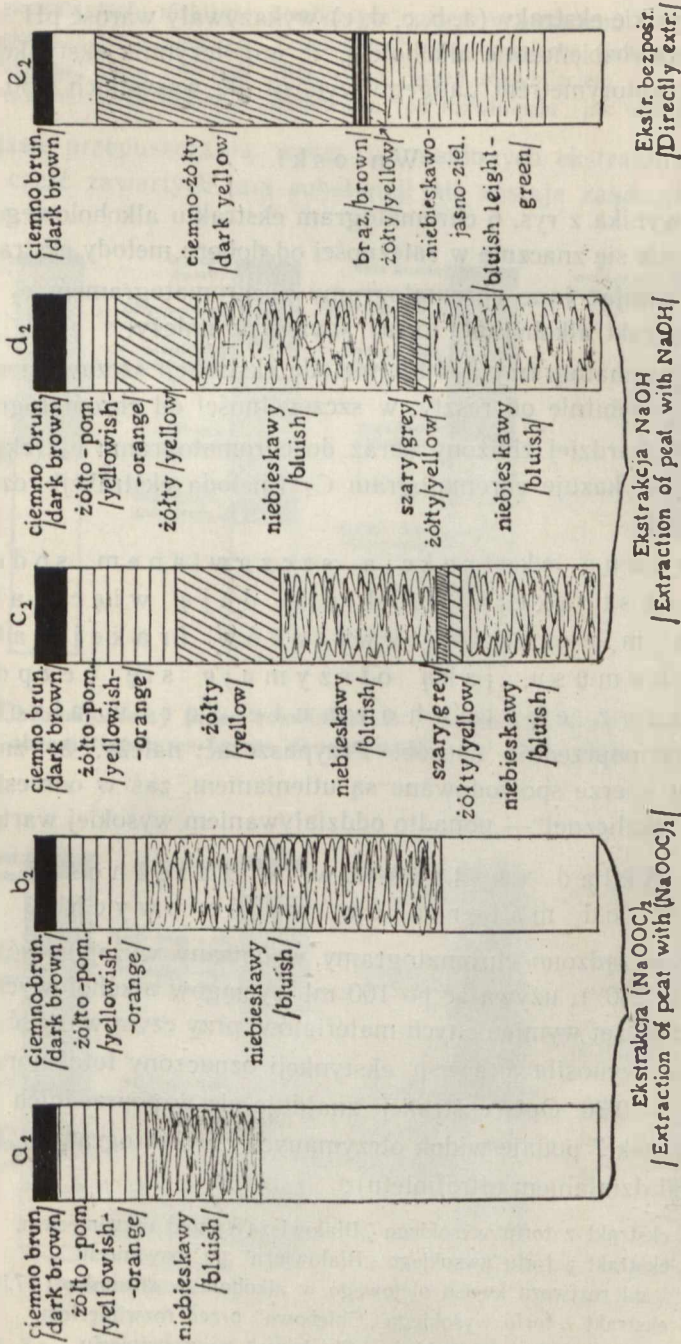
e) Dla porównania użyto w takich samych warunkach jak wyżej 100 ml ekstraktu alkoholowego bezpośrednio otrzymanego z torfu niskiego „Zemborzyce“.

Obraz przed „rozwinięciem“ — rys. 6, lit. e<sub>1</sub>.

Obraz po „rozwinięciu“ — rys. 6a, lit. e<sub>2</sub>.



Rys. 6. Chromatogramy porównawcze przed rozwinięciem — w świetle ultra-fioletowym  
 Fig. 6. The comparative chromatograms before development — in ultra-violet



Rys. 6 a. — Fig. 6a.

Wszystkie ekstrakty (a, b, c, d, e) wykazywały wartość  $\text{pH} = 5$  oraz zostały tak rozcieńczone alkoholem, że współczynnik ekstynkcji oznaczony fotokolorymetrem Langego wynosił dla wszystkich 0,30.

### Wnioski

Jak wynika z rys. 6 chromatogram ekstraktu alkoholowego próchnicy zmienia się znacznie w zależności od doboru metody ekstrakcyjnej.

Porównując inne chromatogramy z chromatogramem  $e_2$  (bezpośredni ekstrakt alkoholowy torfu) stwierdzić należy:

1) Chromatogramy  $a_2$  i  $b_2$  (metoda ekstrakcji szczawianem sodu) różnią się wybitnie od reszty, w szczególności od chromatogramu  $e_2$ .

2) Najbardziej zbliżony obraz do chromatogramu  $e_2$  (ekstr. bezpośredni) wykazuje chromatogram  $C_2$  (metoda ekstrakcji rozcieńczonym NaOH).

Zarówno ekstrakcja szczawianem sodu, jak też i ekstrakcja NaOH nie dają więc takiego składu mieszaniny związków frakcji alkoholowej humusu, jaką otrzymuje się bezpośrednio przez ekstrahowanie torfu alkoholem w opisany poprzednio sposób. Przypuszczać należy, że zmiany te w pewnej mierze spowodowane są utlenianiem, zaś w odniesieniu do metody „alkalicznej” — ponadto oddziaływaniem wysokiej wartości  $\text{pH}$ .

### Skład ekstraktów w zależności od materiałów wyjściowych

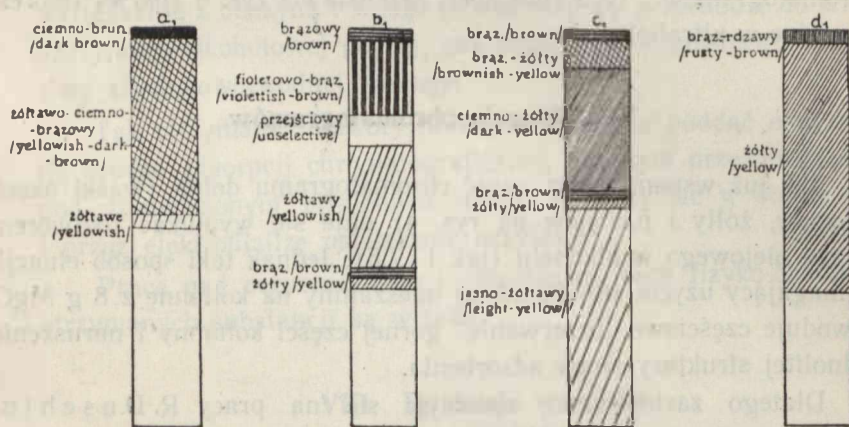
a) Sporządzono chromatogramy w opisany wyżej sposób ( $\text{MgO}$  suszony w  $250^\circ$ ), używając po 100 ml wyciągów alkoholowych, otrzymanych z wyżej wymienionych materiałów, przy czym wartość  $\text{pH}$  tych ekstraktów wynosiła 5, a wsp. ekstynkcji oznaczony fotokolorymetrem Langego — 0,30. Opis ekstrakcji znajduje się w poprzednich rozdziałach. Rysunek 7 podaje widok otrzymanych chromatogramów (fluorescencja pod działaniem ultrafioletu):

- $a_1$  — ekstrakt z torfu wysokiego „Białowieża” przed rozwinięciem,
- $a_2$  — ekstrakt z torfu wysokiego „Białowieża” po rozwinięciu,  
5 ml roztworu kwasu olejowego w alkoholu w stosunku 1 : 7,5,
- $b_1$  — ekstrakt z torfu wysokiego „Chlebowo” przed rozwinięciem,
- $b_2$  — ekstrakt z torfu wysokiego „Chlebowo” po rozwinięciu,  
roztworem kwasu olejowego w stosunku 1 : 7,5,

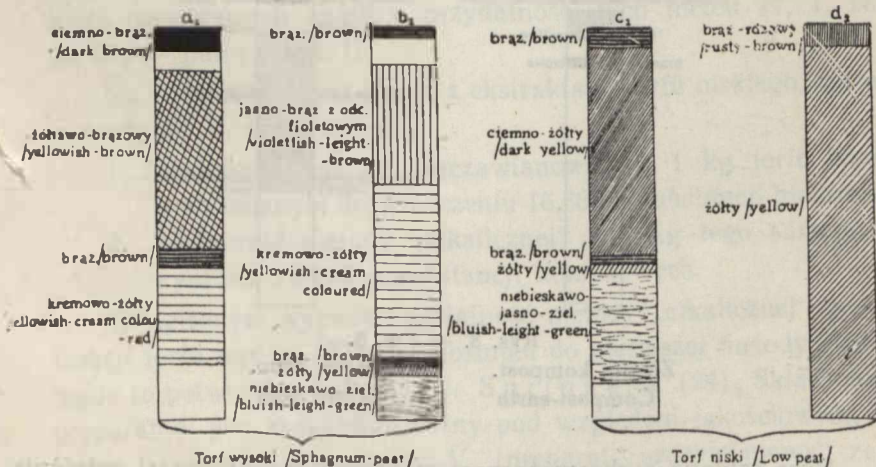


- $c_1$  — ekstrakt torfu niskiego „Zemborzyce” przed rozwinięciem,
- $c_2$  — ekstrakt torfu niskiego „Zemborzyce” po rozwinięciu (jak wyżej),
- $d_1$  — ekstrakt torfu niskiego „Białowieża” przed rozwinięciem,
- $d_2$  — ekstrakt torfu niskiego „Białowieża” po rozwinięciu (jak wyżej).

W czasie przepuszczania wyżej wymienionych ekstraktów przez kolumnę, część zawartych tam substancji nie zostaje zaadsorbowana



Rys. 7. Chromatogramy przed rozwinięciem — w świetle ultra-fioletowym  
The chromatograms before development — in ultra-violet light



Rys. 7 a. Chromatogramy po rozwinięciu kwasem oleinowym  
The chromatograms after development with oleic acid.

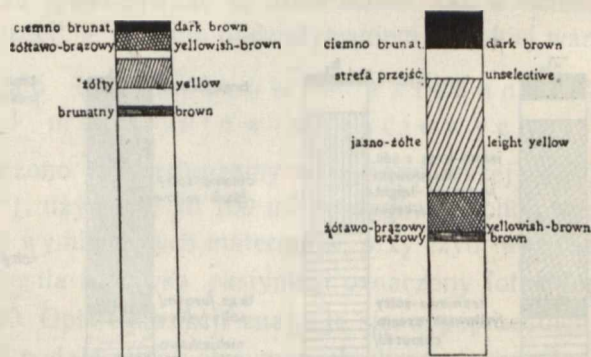
i nadaje jasno-żółtą barwę przesączowi. Przed „rozwinieniem“ chromatogramu przepłukiwano kolumnę alkoholem aż do zaniku żółtej barwy przesączu.

b) Dla porównania zbadano ekstrakty z rzadziej stosowanych materiałów humusowych, mianowicie użyto wyciągów z ziemi kompostowej i węgla brunatnego (opis w poprzednich rozdziałach). Widok chromatogramów z tych substancji przedstawia rys. 8 (barwy fluorescencyjne w ultrafioletcie).

## VII. Elucja chromatogramów

Jak już wspomniałem, część chromatogramu dolna (wąski pasek brązowy, żółty i następne na rys. 4) daje się wyplukać roztworem kwasu olejowego w alkoholu (jak 1 : 7,5). Jednak taki sposób elucji, wymagający użycia 10—20 ml tej mieszaniny na kolumnę z 8 g MgO powoduje częściowe „przerwanie“ górnej części kolumny i naruszenie jednolitej struktury słupa adsorbenta.

Dlatego zastosowano, wzorując się na pracy R. Duschinskiego (2) (izolacja follikuliny na CaO), metodę elucji przez rozpuszczenie adsorbenta kwasem solnym.



Rys. 8. — Fig. 8.

Ziemia kompost.  
Compost-earth

Węgiel brun.  
Brown coal

Rurę szklaną z chromatogramem przecinano na części wyróżniające się w świetle ultrafioletowym, a poszczególne warstwy wydobywano mechanicznie i zbierano w oddzielnych naczyniach. Następnie

zalewano je alkoholem etylowym i wkraplano kwas solny 1 : 1, dbając o to, by kwasowość roztworu nie przewyższyła pH 2. Naczynia były chłodzone z zewnątrz, a zawartość stale poruszana mieszadłem mechanicznym. W tych warunkach adsorbent rozpuszcza się, a roztwór zabarwia się na brązowo od substancji humusowych.

Poszczególne roztwory oczyszcza się od kwasu olejowego przez wytrząsanie z benzyną i wodą. (Kwas olejowy przechodzi do warstwy benzynowo-alkoholowej górnej, zaś substancje humusowe — do warstwy alkoholowo-wodnej, dolnej).

Tak otrzymane roztwory należy jeszcze raz poddać oczyszczeniu na drodze adsorpcji chromatograficznej, po czym przez odparowanie pod zmniejszonym ciśnieniem można je otrzymać w stanie stałym i przez elektrodializę ostatecznie oczyścić.

Prace nad oczyszczeniem i określeniem cech fizyko-chemicznych otrzymanych substancji są w toku.

## VIII. Dyskusja wyników

Większość dotychczasowych prac nad humusem wykorzystuje do otrzymywania substancji próchnicznych albo metodę „alkaliczną“ *Sven Odena* (1), względnie *U. Springera* (24), albo metodę „szczawianową“ — *K. Simona* (23). Jednak przytoczyć można wiele negatywnych opinii o przydatności tych metod (7, 1, 26, 25, 10, 27) — patrz rozdz. II.

Na podstawie doświadczeń z ekstraktami torfu niskiego, opisanych w rozdziale V, stwierdzono:

1. Wydajność metody „szczawianowej“ z 1 kg torfu wyniosła w wykonanym doświadczeniu 16,369 g substancji humusowych.
2. Wydajność metody „alkalicznej“ z 1 kg tego samego torfu wyniosła 78,110 g substancji humusowych.

W opisanym wypadku wydajność metody „alkalicznej“ przy ekstrakcji torfu wynosi 477% w stosunku do pierwszej metody. Spostrzeżenie to potwierdza badania *U. Springera* (24). Skład obu tych preparatów jest zasadniczo różny pod względem jakościowym, na co wskazuje tabela w rozdziale V (preparat „szczawianowy“ zawiera 3 razy więcej substancji rozpuszczalnych w alkoholu niż preparat z NaOH).

Przeprowadzona na podstawie chromatogramów ocena składu jakościowego wyciągów z obu omawianych preparatów (rozdział VI) wykazała poważne różnice widoczne na rys. 6. Stwierdzić należy na podstawie tego rysunku, że tak metoda „szczawianowa“, jak i „alkaliczna“ dają mieszaninę substancji, których powinowactwo adsorpcyjne i fluorescencja w ultrafiolecie, a zatem i budowa cząsteczek są zmienione w porównaniu z ekstraktem bezpośrednio otrzymanym z torfu. Ten ostatni wynik odnoszący się do ekstraktu alkoholowego torfu jest analogiczny do wyników badań Williamsa (27) nad wodnymi wyciągami torfu, jak również potwierdza przypuszczenia F. Fischera i G. Schrödera (7).

Metody ekstrakcji torfu przy pomocy szczawianu sodu lub zasad należałoby więc uznać za nieodpowiednie, gdyż nie pozwalają otrzymać w stanie niezmiennym substancji, zawartych w naturalnym humusie. Wydaje się natomiast bardzo prawdopodobnym, że ekstrakcja samym alkoholem etylowym przy zachowaniu podanych w niniejszej pracy ostrożności nie powoduje zmian chemicznych próchnicy.

Stosując bezpośrednią ekstrakcję przeprowadzono analizę porównawczą różnych materiałów humusowych. Otrzymano następujące wydajności z 1 kg torfu:

1. Torf niski z Zemborzyc — 4,032 g substancji rozpuszczalnych w alkoholu,
2. Torf niski z Białowieży — 4,110 g substancji rozpuszczalnych w alkoholu,
3. Torf wysoki z Białowieży — 5,422 g substancji rozpuszczalnych w alkoholu,
4. Torf wysoki z Chlebowa — 23,177 g substancji rozpuszczalnych w alkoholu.

W wykonanych doświadczeniach okazało się więc, że torfy wysokie mają więcej substancji rozpuszczalnych w alkoholu niż niskie.

Porównanie pod względem jakościowym tych mieszanin przeprowadzono chromatograficznie. Jak widać z rysunku 7 i 8 skład ekstraktów z torfów wysokich jest podobny, chociaż ich chromatogramy różnią się barwą II warstwy. Wyciąg z ziemi kompostowej (rys. 8) wydaje się różnić głównie ilościowo od ekstraktów z torfów wysokich. Ekstrakty z torfów niskich dają bardzo podobne chromatogramy (warstwa żółta

jako główny składnik). Zbliżony do nich jest też wyciąg z węgla brunatnego.

Natomiast między torfami niskimi a wysokimi istnieją poważne chemiczne różnice w składzie opisywanych wyciągów.

Biorąc pod uwagę:

1) że położenie danej warstwy na kolumnie (tj. powinowactwo adsorpcyjne) oraz barwa fluorescencyjna niezawodnie pozwalają odróżnić związki chemiczne jakościowo inne,

2) że zachowano identyczne warunki przy otrzymywaniu opisywanych ekstraktów i ich chromatografowaniu — można stwierdzić, że różnice w wyglądzie chromatogramów dowodzą niewątpliwie poważnych różnic w chemicznym składzie użytych materiałów humusowych.

Z drugiej strony podkreślić należy widoczne podobieństwo, a mianowicie:

1) Ciemno-brązowa, I-sza od góry warstwa jest niemal identyczna we wszystkich chromatogramach. Ze względu na jej nieruchliwość przy rozwijaniu chromatogramu, jak też i na podstawie spostrzeżeń A. Hocka (10) przypuszczam, że składa się ona z kwasów humusowych (19) lub używając synonimu (27) — z kwasów huminowych.

2) Główną część wszystkich opisywanych chromatogramów stanowi warstwa II-ga od góry.

Jej barwa fluorescencyjna zmienia się od jasno-brązowej, poprzez żółtawo-brązową, ciemno-żółtą do jasno-żółtej, w zależności od surowca wyjściowego (rys. 7 i 8).

Z uwagi na bardzo podobne powinowactwo adsorpcyjne oraz na podstawie prac poprzedników (10) można przypuszczać, że jest to kwas hymatomelanowy (19), zwany inaczej ulminowym (27).

Możliwe, że następująca po tej strefie w chromatogramach a, b, c, na rys. 7 oraz na rys. 8 warstwa o innym odcieniu barwy żółtej jest drugim składnikiem „kwasu hymatomelanowego“, który przez niektórych badaczy uważany był za mieszaninę (21, 26).

Różnice w odcieniach barw fluorescencyjnych tych warstw są niewielkie i mogą być wyjaśnione różnym stopniem polimeryzacji, jeżeli przyjąć za F. Schefferem (21), że substancje humusowe stanowią homologiczny szereg polimerów.

Żółtawy przesącz, przechodzący podczas formowania chromatogramów (o którym wspomniałem poprzednio), oraz pozostałe strefy kolumny (pasek brązowy, żółty i strefa zielonkawo-niebieska na rys. 7 i 8) uważałbym za zanieczyszczenia, jeśli tak można nazwać substancje towarzyszące humusowi, cytowane według A. W a k s m a n a (26) w II rozdziale niniejszej pracy.

Kwasów krenowych nie ma na chromatogramie wobec poprzedzającej ekstrakcji wodą z HCl wszystkich opisywanych materiałów humusowych. Wydaje się, że opisana metoda oprócz zastosowań analitycznych nadawałaby się też do celów preparatywnych. Rozdzielanie i otrzymywanie na dużą skalę poszczególnych substancji alkoholowej frakcji próchnicy zostało zasadniczo umożliwione przez zastosowanie kwasu olejowego do rozwijania chromatogramu oraz „eluacji“ przez rozpuszczanie adsorbenta. Podkreślić należy, że w pierwszej próbie chromatografii humusu (wyciągów wodnych), której dokonał A. H o c k (10), nie znaleziono sposobu na rozwijanie i elucję chromatogramów (na tlenku glinu), ze względu na bardzo silną chemisorpcję.

Podana metoda chromatograficzna wyodrębniania substancji humusowych w połączeniu z dializą stwarza możliwości otrzymania w stanie chemicznie czystym poszczególnych związków humusowych, należących do frakcji alkoholowej, czego nie można było osiągnąć dotychczasowymi sposobami (7, 1, 25). Nadto praca niniejsza ostatecznie obala poglądy S v e n O d e n a (19), jakoby frakcja alkoholowa próchnicy zawierała tylko jeden składnik — kwas hymatomelanowy i wskazuje, że jest to kompleks różnych związków, którego skład ilościowy i jakościowy jest zmienny.

## W n i o s k i

1) Zastosowano metodę chromatograficzną do rozdzielania i wyodrębniania poszczególnych składników humusu, dających się ekstrahować alkoholem; jako adsorbenta użyto tlenku magnezu, do rozwijania chromatogramów użyto roztworu kwasu olejowego w alkoholu. Stwierdzono możliwość analizy chromatograficznej alkoholowych wyciągów próchnicy na paskach bibuły filtracyjnej.

- 2) Przy pomocy tej metody stwierdzono, że:
- a) frakcja alkoholowa humusu składa się z różnych związków, tworzących oddzielne warstwy na chromatogramie, dające się rozróżnić w świetle ultrafioletowym;
  - b) skład ilościowy i jakościowy frakcji alkoholowej próchnicy jest zmienny w zależności od surowca wyjściowego;
  - c) ekstrakty alkoholowe z preparatów otrzymanych przy pomocy ekstrakcji próchnicy szczawianem sodu lub zasadami, wykazują różnice ilościowe i jakościowe w porównaniu z bezpośrednim ekstraktem alkoholowym.

Składam serdeczne podziękowania Kierownikowi Zakładu Fizjologii Roślin UMCS — Prof. Dr. A. P a s z e w s k i e m u za cenne wskazówki i umożliwienie wykonania niniejszej pracy. Dziękuję również Dziekanowi Prof. Dr. Wł. H u b i c k i e m u oraz Prof. Dr. A. W a k s m u n d z k i e m u za krytyczne uwagi dotyczące pracy, zaś Adiunktowi Politechniki Warszawskiej T. B i s a n z za korektę merytoryczną.

---

## SPIS LITERATURY

1. Bemmelen J. M. van — „Die Adsorption“, 1910, str. 117.
2. Blagowieszczenskij A. W., Prosorowskaja A. A. — Bioch. Zeitschr. 1934.
3. Duschinsky R., Lederer E. — Bull. soc. chem. biol., 1935, 17.
4. Eller W. — Liebigs Ann. Chem., 1922.
5. Enders C. — Biochem. Zeitschr. 1942, 312.
6. Enders C. — Biochem. Zeitschr. 1942/3, 313.
7. Fischer F., Schröder G. — Brennstoff—Chemie 1937.
8. Flaig W. — Zeitschr. für Pfl.-ernähr. 1950, 5.
9. Forsyth W. A. C. — Biochem. Journal. 1941.
10. Hock A. — Bodenk. u. Pfl.-ernähr. 1937, 5.
11. Laatsch W. — „Beiträge zur Agrarwissenschaft“. Hannover, 1945.
12. Lieske R. — Zeitschr. f. angew. Chemie, 1932.
13. Niklewski B. — Jahrb. Wiss. Bot. 1933.
14. Niklewski B. — Bioch. Zeitschr. 1934.
15. Niklewski B. — Bioch. Zeitschr. 1936.
16. Niklewski B. — Bullet. de l'Acad. Pol. des Sc. 1937.
17. Niklewski B., Wojciechowski J. — Zeitschr. f. Bodenk. u. Pfl. ern. 1937.
18. Niklewski B., Wojciechowski J. — Acta Soc. Bot. Pol. 1938.
19. Oden Sven — „Die Huminsäuren“. 1922.
20. Scheffer F. — Landw. Forsch. 1949.
21. Scheffer F., Weltz E. — Die Naturwissenschaften, 1950, 14.
22. Sideri G. J. — Soil Sc. 1936, 42.
23. Simon K. — Zeitschr. f. Pfl.-ernähr. 1929, 14.
24. Springer U. — Bodenk. u. Pfl.-ernähr. 1938, 312.
25. Stadnikow G. L. — „Chimia torfa“. Moskwa, 1930.
26. Waksman A. — „Humus“. London, 1936.
27. Williams W. — „Gleboznawstwo“, tłum. pol., 1950.
28. Wojciechowski J., Wilska A. — Roczniki Nauk Leśn. i Roln. 1936.



## Р Е З Ю М Е

В большинстве работ, посвященных исследованиям гумуса, пользуются для получения перегнойной субстанции либо алкалическим методом Свен Одена (1) или Шпрингера (24), либо „щавелевым“ методом К. Симона (23). Однако, многие исследователи относятся весьма критически к этим методам (1, 7, 10, 25, 26, 27).

Задачей настоящей работы является выяснить, насколько возможно применение хроматографического метода для разделения и выделения составных элементов гумуса, растворяющихся или пептизирующихся в спирте.

## Методика работы.

Стеклянные трубки, которых диаметр равнялся 13 мм, наполнились 8 гр. окиси обезвоженного „тяжелого“ (heavy) магния. Сквозь столбик просачивается спиртовый экстракт гумуса с  $\text{pH} = 5$ . Затем колонка подвергалась размыванию раствором олеиновой кислоты в этиловом спирте (соотношение 1 : 7,5). В ультрафиолетовом свете были заметны цветные слои. Автор пытался выделить отдельные слои, разсекая колонку на части, растворяя адсорбент разбавленной НС 1 в растворе спирта, обращая при этом внимание, чтобы  $\text{pH}$  не стало ниже 2. Автором были также получены положительные результаты относительно хроматографии на поясках фильтратной бумаги.

После выработки методики автором были проведены эксперименты для выяснения, существует ли какая — либо зависимость между составом гумусных экстрактов и исходным материалом. В качестве материала для экстракции автором были взяты осоковые и сфагновые торфы, компостная почва и бурый уголь. Выше указанные материалы экстрагировались тремя способами:

1. способом У. Шпрингера (24) — посредством 0,5% — ого  $\text{NaOH}$ .
2. методом К. Симона — 1% щавелевым натрием.

### 3. непосредственно этиловым 96%, спиртом.

Перед каждой из упомянутых выше экстракций применялось тщательное перемывание бензином, кипящим при низших температурах, потом 0,2 н раствором HCl и дистиллированной водой. Из экстрактов полученных методом У. Шпрингера и К. Симона, действуя серной кислотой, получались осадки гумусных субстанций. Затем осадки подвергались высушению под сравнительно низким давлением при температуре ниже 70°C в атмосфере азота. Полученные таким путем препараты экстрагировались этиловым 96% спиртом.

На основании экспериментов, проведенных над экстрактами осокового торфа, установлено, что:

1. продуктивность „щавелевого“ метода (К. Симона, 23) из 1 кг. торфа составляла 16,369 г гумусных субстанций.

2. продуктивность „алкалического“ метода (У. Шпрингер, 24) из 1 кг. этого же торфа составляла 78, 110 г гумусных субстанций.

В приведенном выше случае продуктивность алкалического метода при экстракции торфа составляет 477% по отношению к первому методу. Этот факт подтверждает результаты, полученные У. Шпрингером (24). Составы обоих этих препаратов в качественном отношении в высшей степени отличаются друг от друга („щавелевый“ препарат включает 3 раза больше растворимых в спирте субстанций).

Произведенное на основании колонок сравнение качественного состава обоих экстрактов указывает на большие различия, представленные на рис. 6. На основании этого рисунка следует отметить, что как „щавелевый“ метод, так и алкалический дают смесь субстанций которых степень адсорбции и флюоресценция в ультрафиолетовом свете, стало быть, и структура частиц изменились по сравнению с экстрактом непосредственно полученным из торфа. Этот последний результат, относящийся к спиртовому экстракту торфа аналогичен результатам исследований Виллиамса (27) над водными экстрактами торфа, а также подтверждает предположения Ф. Фишера и Шредера (7).

Следовательно методы экстракции торфа при помощи щавелевого натрия или крепких щелочей следовало бы считать непригодными, так как, пользуясь ими, нельзя получить в неизменном состоянии субстанций, заключенных в натуральном

гумусе. Кажется весьма вероятным, что экстракция самим только этиловым спиртом не вызывает химических изменений перегноя.

Применяя непосредственную экстракцию 96%-ым этиловым спиртом, автор на основании полученных результатов дает сравнительный анализ разных гумусных материалов. Получена ниже следующая продуктивность из 1 кг. торфа:

1. Осоковый торф из Зембожиц (Люблинское воеводство) — 4,032 г субстанций растворимых в спирте.
2. Осоковый торф из Бяловежи (Национальный Заповедник) — 4,1102 субстанций растворимых в спирте.
3. Сфагновый торф из Бяловежи (Национальный Заповедник) — 5,422 г субстанций растворимых в спирте.
4. Сфагновый торф из Хлебова (Познанское воеводство) — 23,177 г субстанций растворимых в спирте.

Следовательно исследованные сфагновые торфы содержат гораздо больше субстанций растворимых в спирте, чем осоковые.

Затем автор сравнивает эти смеси в качественном отношении при помощи хроматографии. 7 и 8 рисунки указывают на то, что состав экстрактов из сфагновых торфов в общем похож на состав прочих экстрактов, хотя их колонки отличаются цветом II слоя. Экстракт из компостной почвы (рис. 8) отличается, по всей вероятности, от экстрактов из сфагновых торфов главным образом в количественном отношении. Экстракты из осоковых торфов имеют почти такие же колонки (желтый слой выступает здесь как главный элемент). Очень близок им также и экстракт из бурого угля.

Но относительно состава описываемых экстрактов между сфагновыми и осоковыми торфами выступают большие химические различия.

На основании того, что:

1. Размещение данного слоя на столбике (т. е. степень адсорбции), а также цвет флюоресценции дают возможность безошибочно отличать наличие разных в качественном отношении химических соединений.

2. При изготовлении описываемых экстрактов и их хроматографировании автором были обеспечены идентичные условия можно предпологать, что наблюдаемые различия в колонках свидетельствуют несомненно о том, что в химическом составе взя-

тых для экспериментальных целей гумусных материалов выступают большие различия.

Но с другой стороны следует отметить бросающееся в глаза сходство, а именно:

1. Темно-коричневый, первый верхний слой почти идентичен во всех колонках. В виду его неподвижности при перемывании колонки, а также и на основании наблюдений А. Гока (10), автор полагает, что этот слой состоит из гумусных (19) или гуминовых кислот.

2. Главную часть всех описываемых колонок составляет II-ой верхний слой. Цвет его флюоресценции постепенно изменяется: справа выступает светло-коричневый цвет, затем желтовато-коричневый, темно-желтый и наконец светло-желтый, в зависимости от исходного материала (рис. 7 и 8). В силу очень сходной степени адсорбции, а также на основании работ разных исследователей (10) можно предполагать, что во II слое выступает гиматомелановая кислота (19) иначе называемая ульминовой кислотой (27).

Возможно, что нижняя часть II-ого слоя в колонках а, б, с на рис. 7 и 8 имеющая иной оттенок желтого цвета, является вторым элементом „гиматомелановой кислоты“, которую некоторые исследователи считали смесью (21, 26).

Различия в оттенках цветов флюоресценции этих слоев — не велики и могут быть выяснены различной степенью полимеризации, если согласиться с мнением Ф. Шеффера (21), что гумусные субстанции представляют собой гомологический полимеров.

На желтоватый фильтрат, просачивающийся во время формирования колонок, а также на все остальные слои колонки (коричневая, желтая полосы и зеленовато-синий слой на рис. 7 и 8) автор смотрит, как на результат загрязнений, если так можно назвать „негумусные“ субстанции — такие, как эрсты смолых кислот и прочие субстанции, выступающие совместно с гумусом которые перечисляет Ваксман (26).

Крепых кислот на колонке нет вследствие предварительной экстракции водой с HCl всех описываемых гумусных материалов.

Кажется весьма возможным, что описанный автором метод, кроме использования его для чисто аналитических целей, был бы также вполне пригоден для продукции. Разделение и полу-

чание в большом количестве отдельных субстанций спиртовой фракции гумуса в основном стало возможным, благодаря применению олеиновой кислоты для перемывания колонки, а также „элюации“ растворянием адсорбента. Следует особо отметить что в первом опыте хроматографии гумуса (водных экстрактов), сделанном Гоком (10), не удалось найти способа на перемывание и элюацию колонок (на окись алюминия) в следстве очень сильной химисорбции.

Представленный хроматографический метод выделяния гумусных субстанций вместе с диализой создает возможность получить в чистом химически состоянии отдельные гумусные соединения, относящиеся к спиртовой фракции, чего нельзя было достигнуть имеющимися до сих пор методами (1, 7, 25).

Настоящая работа, по мнению автора, опровергает взгляд Свен Одена (19), по которому спиртовая фракция гумуса включает лишь один элемент, а именно гиматомелановую кислоту, и кроме того доказывает, что это — комплекс различных соединений, состав которого как в качественном, так и в количественном отношении изменчив.

### В ы в о д ы

1. Автор применил хроматографический метод для разделения и выделения отдельных элементов гумуса, экстрагируемых спиртом; в качестве адсорбента автор пользовался окисью магния (тяжелого), для перемывания колонок был взят раствор олеиновой кислоты в спирте в отношении 1 : 7,5.

1. Пользуясь этим методом, установлено:

а) спиртовая фракция гумуса состоит из разных соединений образующих отдельные слои на колонке, которые легко заметны в ультрафиолетовом свете;

в) количественный и качественный состав спиртовой фракции перегной изменяется в зависимости от исходного материала:

с) в спиртовых экстрактах с препаратов, полученных путем экстракции гумуса щавелевым натрием или щелочами, наблюдаются в сравнении с непосредственным спиртовым экстрактом количественные и качественные изменения.

## SUMMARY

The majority of present works on humus make use for the obtaining of humic substances either of the Sven Oden's (1) alkalic method, or U. Springer's (24), or the K. Simon's (23) „oxalate“ method. Many scientists, however, regard those methods critically (1, 7, 10, 25, 26, 27).

The aim of the present work was to examine the possibilities of the use of the chromatographic method for the separation and isolation of the components of humus, dissoluble, or peptonizing in alcohol.

The following method of work was employed:

Columns of 13 mm. in diameter were filled with 8 g. of „heavy“ anhydrous magnesium oxide. Through the column an alcohol extract of humus of pH 5 was filtered. The chromatogram was developed with a solution of oleic acid in ethyl alcohol in proportion 1:7,5. In ultraviolet light coloured bands were observed. Attempts were made to separate the individual zones by dissecting the column into parts and the dissolution of the adsorbent with diluted HCl in a solution of alcohol and preventing from exceeding the value pH 2. The hydrous — alcohol „eluate“ was purified from oleic acid by extraction with petroleum-ether. Positive tests were also conducted with chromatography on straps of filter paper.

After the elaboration of the method experiments were conducted in order to examine the dependence between the composition of the extracts from the humus and the original raw material. As the material for the extraction were used: *Caricetum*- and *Sphagnum* peats, compost soils and brown coal (lignite). These materials were extracted according to three methods:

- 1) U. Springer's (24) method, by the use of 0,5% solution of NaOH,
- 2) according to K. Simon's (23) method by the use of 1% solution of sodium oxalate,
- 3) Directly with 96% solution of ethyl alcohol.

Before each of the mentioned exhaustive extractions with petroleum ether were used and subsequently with 0,2*n* solution of HCl and distilled water. From extracts obtained according to U. Springer's and K. Simon's methods the humic substances were precipitated by the acidification with sulphuric acid. The precipitated sediments were dried under low pressure at a temperature below 70°C and in the nitrogen atmosphere. Preparations obtained in this way were next extracted with 96% ethyl alcohol.

On the basis of experiments with extracts of *Caricetum* --- peats it was stated, that:

- 1) The efficiency of the „oxalate“ method (K. Simon, 23) using 1 kg. of peat amounted in the experiment to 16.369 g. of humic substances.
- 2) The efficiency of the „alkaline“ method (U. Springer, 24) using 1 kg. of the same peat amounted to 78.110 g. of humic substances.

In the described case the efficiency of the alkaline method in the extraction of peat amounts to 477% in respect to the first method. This observation confirms U. Springer's (24) results of investigations. The compositions of both of these preparations is fundamentally different as regards to the qualitative value (the oxalate preparation contains three times more substances, soluble in alcohol).

The chromatographic evaluation of the qualitative composition of the two discussed extracts revealed considerable differences, as shown on the Fig. 6. On the basis of this drawing it can be stated, that both the „oxalate“ as well as the „alkaline“ methods give a mixture of substances, of which the adsorption affinity and the fluorescence in the ultraviolet, and therefore also the molecular structure are changed in comparison with the extract directly obtained from the peat. The latter result referring to the alcohol extract of the peat is analogous to results of Williams (27) investigations on aqueous extracts of peat, and confirms also F. Fischer's and G. Schröder's (7) suppositions.

The methods of extraction of peat with sodium oxalate, or strong alkalines should be therefore regarded as unsuitable, because they do not permit to obtain in an unchanged state substances, contained in the natural humus. It appears, however, most probable, that the extraction with ethyl alcohol only causes no chemical change of the humus.

Using direct extraction with 96% ethyl alcohol a comparative analysis of various humic materials was performed. The following efficiencies from 1 kg. of peat were obtained:

- 1) *Caricetum* — peat from Zemborzyce (Lublin district) — 4.032 g. of substances soluble in alcohol.
- 2) *Caricetum* — peat from Białowieża (National Park) — 4.110 g. of substances soluble in alcohol.
- 3) *Sphagnum* — peat from Białowieża (National Park) — 5.422 g. of substances soluble in alcohol.
- 4) *Sphagnum* — peat from Chlebow (Poznań district) — 23.177 g. of substances soluble in alcohol.

The examined *Sphagnum* — peats have a higher content of substances soluble in alcohol, than the *Caricetum* — ones.

Qualitative comparisons of those mixtures were performed chromatographically. As shown on the Fig. 7 and 8 the composition of extracts of *Sphagnum* peats is similar, though their chromatograms differ in colour in the II zone. Extract from compost soil (Fig. 8) differs most probably mainly quantitatively from extracts of *Sphagnum* — peats. Extracts of *Caricetum* — peats give very similar chromatograms (the yellow layer is the main component). Closely resembling them is also the extract of brown coal.

Between the *Caricetum* — and *Sphagnum* — peats, however, there are considerable chemical differences in the composition of the described extracts.

Taking into consideration, that:

- 1) the localization of the given zone of the column (i. e. adsorption affinity) and the fluorescence colour permit infallibly to differentiate qualitatively other chemical compounds,
- 2) identical conditions were preserved during the obtaining of the described extracts and their chromatograms —

it can be stated, that the differences in the appearance of chromatograms prove undoubtedly, that there are serious differences in the chemical composition of the humic material used.

On the other hand, the appearing similarity should be stressed, namely:

- 1) the dark brown layer, the first from the top, is almost identical in all chromatograms. In view of its immobility during the development of the chromatogram and also on the basis of



- A. Hock's (10) observations I suppose, that it consists of humic acids (19), or using the synonym (27) — of humin acids,
- 2) The layer second from the top, is the main part of all described chromatograms.

Its fluorescence colour changes from light brown, through yellowish brown, dark yellow to light yellow, depending on the original raw material (Draw. 7 and 8).

In view of the very similar adsorption affinity and on the basis of previous works (10) it can be assumed, that it is the hymatomelanic acid (19), otherwise designated as ulminic acid (27).

It is possible, that following this zone on the chromatograms a, b, c, on the Fig. 7 and Fig. 8, the layers of a different shade of the yellow colour is a second component of the „hymatomelanic acid“, which was by some investigators regarded as a mixture (21, 26).

Differences in shades of fluorescent colours of those layers are not significant and can be explained by a different degree of polymerisation, if accepts after F. Scheffer (21) that humic substances form a homologous series of polymers.

The yellowish filtrate passing during the formation of chromatograms and the remaining layers of the column (brown band, yellow and a greenish-blue layer on the Fig. 7 and 8). I would regard as pollution, if one accepts after F. Scheffer (21) that humic substances accompanying the humus and reported by A. Waksman (26).

There are no crenic acids in the chromatogram in view of the preceding extraction with water and HCl of all the described humic materials.

It appears, that the described method besides analytic applications could be used on a large scale examinations. The separation and the obtaining on a large scale of the separate substances of the alcoholic fraction of humus was made fundamentally possible, by the use of oleic acid for the development of the chromatogram and the „elution“, by the dissolution of the adsorbent.

It should be stressed, that in the first test of the chromatography of the humus (hydrous extracts), performed by A. Hock (10) no method of the development and elution of chromatograms was found (aluminium oxide) in view of a very strong chemisorption.

The described chromatographic method of the separation of humic substances in conjunction with dialysis creates possibilities for the obtaining in chemically pure state of the separate humic compounds, belonging to the alcoholic fraction, what could not be achieved by previous methods (1, 7, 25).

I suppose the results of this work puts in doubt Sven Oden's (19) opinion, that the alcoholic fraction of humus contains only one component—„hymatomelanic acid“ and indicates, that it is a complex of various compounds, of variable quantitative and qualitative composition.

### Conclusions

1) Chromatographic method was used for the separation and isolation of the separate components of humus, which can be extracted with alcohol; as the absorbent „heavy“ magnesium oxide was used and for the development of chromatograms a solution of oleic acid in alcohol in proportion 1:7,5 (volumetric) was used.

Using this method it was concluded:

- a) alcoholic fraction of humus consists of various compounds forming separate zones on the chromatogram, which may be differentiated in the ultraviolet light;
- b) the quantitative and qualitative composition of the alcoholic fraction of humus is variable depending on the original raw material;
- c) alcoholic extracts of preparates obtained by means of extraction of humus with sodium oxalate, or alkalines show quantitative and qualitative changes in comparison with the direct alcoholic extract.