

AINI LINDPERE

SFAGNUMITURBA JA KASEKÄSNA (*INONOTUS OBLIQUUS* (FR.) PIL.) HUMIINHAPPETAOLISTE ÜHENDITE FENOOLNE KOOSTIS

Muldade orgaanilise aine üheks tähtsaks koostisosaks on tumeda värvusega kõrgmolekulaarsed ühendid — huumusained, mille keemiline struktuur ei ole veel teada.

Huumusainete lõhustamisel moodustub rida madalmolekulaarseid ühendeid. M. Koņonova (Кононова, 1963) andmetel võib huumusainetes sisalduvast lämmastikust (mida on leitud kuni 5%) mineraalhapetega hüdrolüüsuda kuni 73%, kusjuures valdava osa hüdrolüüsunud lämmastikuühenditest moodustavad aminohapped (Bremner, 1955a; Ferguson jt., 1966; Stevenson, 1960; Waldron jt., 1961; Драгунов, 1962; Зырин jt., 1964).

Huumusainete happelisel hüdrolüüsil moodustub ka süsivesikuid, nagu glükoos, galaktoos, mannoos, ramnoos, lukoos, arabinoos ja riboos (Lynch jt., 1957). Seni on suurima kergesti hüdrolüüsuvate süsivesikute saagise saanud F. Scheffer ja R. Kickuth (1961a); siirdesooturba humiinhapetest hüdrolüüsus 2 N HCl toimel 42%, kusjuures hüdrolüüsunud osa koosnes praktiliselt *d*-glükoosist.

Huumusainete (tuhasus kuni 10%) hüdrolüsaatides on leitud ka rida anorgaanilisi elemente (Кононова, 1963).

Kuid hüdrolüüsil saadud eespool mainitud ühendid ja elemendid ei väljenda huumusainete keemilist spetsiifikat. On avaldatud arvamust (Forsyth, 1947), et kergesti hüdrolüüsuv osa hõlmab vaid huumusainete saastajaid ja et huumusainete klassi ühendite iseärasused on seotud mineraalhappe toimel mittehüdrolüüsuvaga osaga. Arvatakse, et huumusained on fenoolset tüüpi ühendid (Кононова, 1963). Paljudel juhtudel (Bremner, 1955b; Burges jt., 1963; Greene jt., 1962; Morrison, 1958, 1963; Драгунов, 1962; Шиврина jt., 1959) on muldade humiinhapete degradeerimisel moodustunud produktides identifitseeritud vanilliin-, sirel- ja *p*-hüdroksübensoehapet (või nendele vastavaid aldehüüde).

Käesolevas uurimuses käsitletakse vähelagunenud (lagunemisaste <10%) kõrgrabaturba humiinhapete fenoolset koostist. Kõrvuti sfagnumist, s.o. fülogeneetiliselt madala arenguastmega taimest pärinevate humiinhapetega uuriti võrdlevalt ka kaselt kui kõrgemalt arenenud õis- taimelt pärineva käsna (*Inonotus obliquus* (Fr.) Pil.) pigmentset kompleksi, mida keemilistelt omadustelt peetakse lähedaseks humiinhapetele (Шиврина jt., 1959).

Huumusainete koostise uurimiseks pole seni veel välja töötatud erimeetodeid. Nende lõhustamiseks kohaldatakse enamasti ligniini keemilise struktuuri uurimisel kasutatavaid meetodeid — nii oksüdeerimist ja redutseerimist kui ka happelist ja leeliselist hüdrolüüsi. Käesolevas töös

rakendati humiinhapete lõhustamiseks esmajoones suhteliselt lihtsalt teostatavat happelist hüdrolüüsi mitmesugustel HCl-lahuste kontsentratsioonidel. Võrdluseks hüdrolüüsiti ka NaOH-lahusega ning oksüdeeriti leeliselises keskkonnas nitrobenseeniga.

Moodustunud fenoolsed ühendid fraktsioneeriti paberkratograafiliselt ja identifitseeriti tõendainete R_f väärtuste ja diasoreaktiividega moodustunud laikude värvuste järgi.

Metoodika

Humiinhapete eraldamine. Rabaturbast eraldati humiinhapped, ekstraheerides võrdluseks 0,1 M $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ -lahusega 80 °C juures ja 0,1 N NaOH-lahusega toatemperatuuris. Õhukuivale peenestatud turbale lisati vahekorras 1:50 ekstraheerivat lahust. Nõu suleti korgiga, segu loksutati ja jäeti üheks ööks seisma. Seejärel ekstraktikiht sifooniti ja ekstraheerimist korrati uue portsjoni ekstraheeriva lahusega. Sifoonitud ekstraktikihid ühendati ja humiinhapped sadestati väävelhappega pH 1—2 juures (indikaatorpaberi järgi). Humiinhapetel lasti sadestuda järgmise päevani. Selge vedelikukiht eemaldati, sade külmutati, sulatati, tsentrifuugiti, pesti 3—4 korda 0,05 N H_2SO_4 -lahusega ja destilleeritud veega. Saadud preparaat kuivatati õhus.

Kasekäsna pigmentse kompleksi eraldamiseks lisati peenestatud käsnaale vahekorras 1:10 destilleeritud vett (80°), loksutati ja segu jäeti kaheks päevaks suletud nõusse seisma. Ekstraktikiht sifooniti ja hapustati HCl-lahusega pH-ni 1—2 (indikaatorpaberi järgi). Humiinhapete taolisel massil lasti järgmise päevani sadestuda, seejärel eemaldati selge vedelikukiht ja sade külmutati. Pärast sulatamist pigmentne kompleks tsentrifuugiti, pesti destilleeritud veega ja kuivatati õhus.

Lõhustamine. Happeliseks hüdrolüüsamiseks kaaluti lihvitud kaelaga 100 ml mahuga koonilistesse kolbidesse 1,0 g humiinhapete preparaati, lisati 50 ml 2%-list HCl-lahust ja kolbide sulgemiseks kasutati lihvitud korgiga õhkjahutit. Hüdrolüüsiti, keetes segu

1) 4 tundi

2) 20 tundi

3) järkjärgult, s. o. pärast 20-tunnist hüdrolüüsirist jäänud jääk (0,5 g) keedeti

a) 2% HCl-lahusega 4 tundi ja seejärel

b) 6 N HCl-lahusega 4 tundi

Leeliseliseks hüdrolüüsamiseks lisati eelnevalt HCl-iga hüdrolüüsitud humiinhapete mittehüdrolüüsuvatele jääkidele (0,5 g) 50 ml 10%-list NaOH. Segu keedeti õhkjahutiga suletud kolbides 4 tundi.

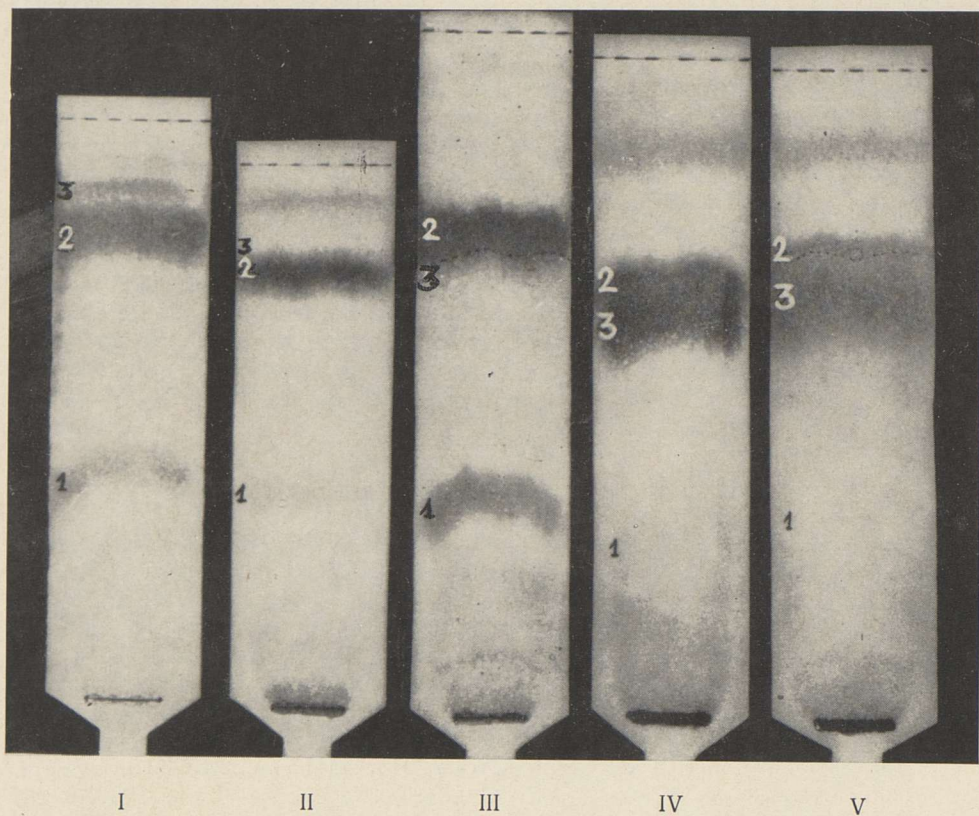
Leeliselis-oksüdatiivseks hüdrolüüsiks kaaluti 50 ml mahuga metallküvetitesse 0,2 g eelnevalt 2%-lise HCl toimel 4 tunni jooksul hüdrolüüsitud humiinhapete mittehüdrolüüsuvaid jääke, lisati 0,12 ml nitrobenseeni ja 2,2 ml 2 N NaOH. Küvetid suleti, asetati õliga täidetud autoklaavi ja kuumutati, sealjuures segades, 160° juures 3 tundi (Milius, 1967).

Fenoolsete ühendite eraldamine. Humiinhapete happelised hüdrolüüsandid filtreeriti, leeliselised hüdrolüüsandid hapustati eelnevalt pH-ni 1 ja ekstraheeriti etüületriga. Eeter aurustati tugeva tõmbe all. Jääk lahustati 1,0 ml etanoolis ja saadus nimetati tinglikult fenoolseks fraktsiooniks.

Fenoolsete ühendite identifitseerimine. Etanooli ekstrakti eraldunud fenoolsed ühendid identifitseeriti paberkratograafiliselt.

Humiinhapete degradeerimisel moodustunud fenoolkarboksüülhapete — *p*-hüdroksübensoe-, vanilliin- ja sirelhape — üksteisest hästi eralduvate teravapiiriliste laikude saamiseks tuli paljudest solventsüsteemidest otsida sobiv. Uuritava aineterühma jaoks osutusid sobivamateks benseen-äädikhape-vesi vahekorras 6:7:3 (Ibrahim jt., 1960) ja kloroform-äädikhape-vesi vahekorras 50:25:25 (Ловягина jt., 1958), kuigi ka nendega ei saadud mitte alati vanilliin- ja sirelhapet teineteisest täielikult eraldada.

Kasutatud vahekorras ei segune solventsüsteemide üksikud komponendid omavahel, mistõttu esimesel juhul kasutatakse pealmist, teisel juhul läbiloksutatud solventsüsteemi alumist kihti.



Rabaturba (I, II, III) humiinhapete ja kasekäsna (IV, V) pigmentse kompleksi happelisel hüdrolüüsil moodustunud fenoolkarboksüülhapete kromatogrammid: 1 — *p*-hüdroksübensoehape; 2 — vanilliinhape; 3 — sirelhape. I — solventsüsteem CHCl_3 - CH_3COOH - H_2O , ilmuti DNA; II — solventsüsteem CHCl_3 - CH_3COOH - H_2O , ilmuti DSH; III — solventsüsteem C_6H_6 - CH_3COOH - H_2O , ilmuti DNA; IV — solventsüsteem C_6H_6 - CH_3COOH - H_2O , ilmuti DSH; V — solventsüsteem C_6H_6 - CH_3COOH - H_2O , ilmuti DNA.

Aldehüüdide eraldamiseks kasutati solventsüsteemi 1-butanool — 3%-line NH_4OH vahekorras 9:4, mis on andnud häid tulemusi (Milius, 1967) ligniini nitrobenseeniga lagundamisel moodustunud aldehüüdide paberkromatograafilisel fraktsioneerimisel. Käesoleval juhul kasutati solventsüsteemi pealmist kihti.

Fenoolsed ühendid eraldati ühedimensioonilise tõusva paberkromatograafia meetodil. Leningradis toodetud kromatograafiapaberist «M» lõigati 28×4 cm mõõtmetega ribad. Pabeririba ühest otsast 4 cm kõrgusele lõigati mõlemasse serva 1,3 cm laiune ja 1 cm kõrgune väljalõige, millest ülespoole, nn. stardijoonele (~ 2 cm pikk), kanti kuni 30 korda klaaskapillaari abil fenoolset fraktsiooni.

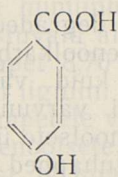
Kromatograferimisel kasutati 30 cm kõrgust ja 16 cm läbimõõduga klaasanumat. Anumasse valati 200 ml valitud solventi, suleti klaasplaadiga, hermetiseeriti leukoplas-tiga ja peale õhu küllastumist solventi aurudega asetati sellesse spetsiaalsele klaasstatii-vile kinnitatud paberiribad. Fenoolkarboksüülhappeid voolutati 6 tundi ja aldehüüde 20 tundi 22° juures. Siis kuivatati paberiribad õhus, vaadeldi ultravioletvalguses ja ilmutati fenoolkarboksüülhapped, pritsides kromatogramme pulverisaatori abil kas diasoteeritud *p*-nitroaniliini ja 10%-lise Na_2CO_3 - või diasoteeritud sulfaniilhappe ja 10%-lise Na_2CO_3 -lahusega. Aldehüüdid ilmutati 2,4-dinitrofenüülhüdraasiinilahusega.

Analoomiliselt tehti kontrollkatsed *p*-hüdroksübensoe-, vanilliin- ja sirelhappe ning nende vastavate aldehüüdide etaloonlahusega.

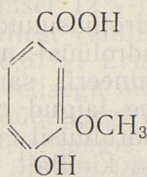
Diasoteeritud nitroaniliin valmistati Haisi järgi ja diasoteeritud sulfaniilhappe Kirby-Berryle vastavalt; 2,4-dinitrofenüülhüdraasiini lahus on 2 N soolhappes 0,4%-line (Мацек, 1962).

Tulemused

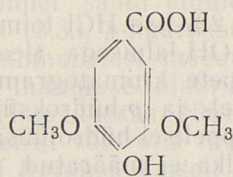
Rabaturbast eraldatud humiinhapete happelisel hüdroolüüsil moodustunud fenoolsete hapete paberkromatogrammidel täheldati ultravioletvalguses tavaliselt 4 fluorestseerivat laiku. Diasoteeritud nitroaniliiniga ja sulfaniilhappega ilmutatud kromatogrammidel võis loendada 4—7 laiku, selgelt nähtavaid oli 3—4 (joon.). Tõendainete R_f väärtuste ja laikude värvuse järgi diasoreaktiividega ilmutatud kontrollkromatogrammidel abil leiti, et kolmele laikule vastavad ühendid on:



4-hüdroksübensoe-karboksüülhappe ehk *p*-hüdroksübensoehappe



3-metoksü-4-hüdroksübensoe-karboksüülhappe ehk vanilliinhappe



3,5-metoksü-4-hüdroksübensoe-karboksüülhappe ehk sirelhappe

Neljas aine jäi identifitseerimata (tab. 1). Sirelhappe ja tundmatu ühendi (frondile lähim) laikud olid teistega võrreldes palju nõrgemad.

Aldehüüdide kromatogrammidel ilmutamisel 2,4-dinitrofenüülhüdraasiiniga ilmus nähtavale 5 laiku. Tõendainete abil tehti kindlaks *p*-hüdroksübensoealdehydi ja vanilliini esinemine, kuna teised 3 ühendit jäid identifitseerimata (tab. 2). Happelisel hüdroolüüsil moodustub *p*-hüdroksübensoealdehydi ja vanilliini tunduvalt vähem kui nende vastavaid happeid.

Korduva soolhappelise hüdroolüüsi igal etapil moodustusid humiinhapetest samad fenoolkarboksüülhapped (aldehüüde ei uuritud), kuid ainult jälgedena, kuigi rabaturba humiinhapetest lõhustus kuni $1/3$.

Tabel 1

Humiinhapete happelisel hüdrolüüsil moodustunud fenoolkarboksüülhapped

R_f		Värvus			Ühend
$\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{COOH-H}_2\text{O}$	$\text{C}_6\text{H}_6\text{-CH}_3\text{COOH-H}_2\text{O}$	UV	DNA	DSN	
0,40	0,31	ei fluorestseeri	roosa	kollane	<i>p</i> -hüdroksübensoehape
0,81	0,71	„	violett	oranž	vanilliinhape
0,88	0,66	„	sinine	punane	sirelhape
0,92	0,96	mustjas-pruun	rohekas-hall	punakas-pruun	?

UV — ultravioletvalgus; DNA — diasoteeritud nitroaniliin; DSN — diasoteeritud sulfaniilhape.

Tabel 2

Humiinhapete happelisel hüdrolüüsil moodustunud aromaatsed aldehüüdid

R_f	Värvus		Ühend
	UV+NH ₃	NFH	
0,16	ei fluorestseeri	kollane	?
0,44	sinine	oranž	vanilliin
0,53	mustjas	„	<i>p</i> -hüdroksübensaldehüüd
0,64	ei fluorestseeri	„	?
0,73	„	„	?

NFH — 2,4-dinitrofenüülhüdrasiin

2%-lise HCl toimel mittehüdrolüüsunud humiinhapete degradeerimisel NaOH-lahusega (leeliseline hüdrolüüs) moodustunud fenoolkarboksüülhapete kromatogrammidel domineeris samuti 4 laiku, kuid vanilliin-, sirel- ja *p*-hüdroksübensoehappe laigud olid tugevamini värvunud kui happelisel hüdrolüüsil. Kuna hüdrolüüsil moodustunud fenoolsete ühendite hulka ei määratud, ei või siiski kindlalt väita, et humiinhapped oleksid leeliselisel hüdrolüüsil sügavamalt lõhustunud.

p-hüdroksübensoe-, vanilliin- ja sirelhappe esinemine tehti kindlaks ka 2%-lise HCl toimel mittehüdrolüüsunud humiinhapete oksüdatiivsel lõhustamisel leeliselises keskkonnas nitrobenseeniga saadud segu fenoolse fraktsiooni hapete paberchromatograferimise abil. Fenoolse fraktsiooni aldehüüde ei uuritud.

Kasekäsna pigmentse kompleksi happelise hüdrolüüsi igal etapil moodustub ka fenoolkarboksüülhappeid (pigmentsest kompleksist hüdrolüüsus ~20%). Samuti saadi neid leeliselisel hüdrolüüsil ja leeliselises keskkonnas nitrobenseeniga oksüdeerimisel. Paberchromatograafiliselt identifitseeriti neist *p*-hüdroksübensoe-, sirel- ja vanilliinhape (joon.), seega samad ühendid, mis tekkisid rabaturba humiinhapetest. Hapete kromatogrammidel ilmunud neljast laigust jäi frondile lähim tundmatuks. Ilmutatud laikude visuaalsel vaatlusel nähtub, et kasekäsna pigmentsest kompleksist moodustunud fenoolkarboksüülhapetest domineerib sirelhape. Sisalduselt teisel kohal on vanilliinhape, seejärel tundmatu ühend. *p*-hüdroksübensoehapet moodustub teistega võrreldes tunduvalt vähem.

Happelise hüdrolüsaadi kromatogrammidel leiti 2,4-dinitrofenüülhüdraasiiniga ilmutamisel 5 laiku, millest 2 identifitseeriti tõendainete abil. Need osutusid sirelaldehüüdiks ja vanilliiniks. *p*-hüdrosübensaldehüüdile vastav laik kromatogrammidel puudus. Aldehüüde moodustus vastavate hapetega võrreldes tunduvalt vähem.

Arutelu

Selgus, et sfagnumiturbast ja kasekäsna eraldatud humiinhappetaoliste ühendite lõhustamisel saadud fenoolsed ühendid — *p*-hüdrosübensoe-, vanilliin- ja sirelhape — ning nende vastavad aldehüüdid on samad, mis moodustuvad ligniini degradeerimisel. Seega osutavad meie katsete tulemused humiinhapete võimalikule polüfenoolsele iseloomule ja teatavale struktuurilisele sarnasusele ligniiniga. Pole sugugi võimatu, et humiinhapped on ligniini tüüpi ühendid.

Mitmed autorid (Johnston, 1961, 1964; Smith jt., 1964; Farmer jt., 1960) on tõestanud ligniini ja humiinhapete sarnasust infrapunase spektroskoopia abil. Paljud (Davies jt., 1960; Flaig, 1964; Johnston, 1964; Драгунов, 1953) peavad humiinhapete tekkimisel üheks oluliseks allikaks ligniini. I. Kurbatovi (Курбатов, 1953) hüpoteesi järgi kujutavad turba huumusained endast ligniini bioloogilisel depolümeerisatsioonil ning oksüdeerimisel tekkinud parkainetetaoliste ühendite reaktsiooniprojekte valkude, peptiidide või aminohapetega. Võib nõustuda oletusega, et humiinhapped on ligniini muundunud (võib-olla oksüdeerunud) vormid, mis on sidunud aminohappeid, ja võimalik, et ka süsivesikuid.

Selgesti nähtavate laikude saamiseks tuli fenoolset fraktsiooni kromatogrammidele kanda sagedasti mitukümmend korda. See näitab, et nii rabaturba kui ka kasekäsna humiinhapete lõhustamisel moodustus fenoolseid ühendeid vähe. Ka kirjanduse andmeil (Morrison, 1963; Greene jt., 1962; Scheffer jt., 1961b) on humiinhapete lõhustamisel vaatluse all olevaid ühendeid saadud väikeses koguses. Ühe suurematest fenoolkarboksüülhapete saagisest said A. Sivrina jt. (Шиврина jt., 1959): siirdesoor turba humiinhapete lõhustamisel 12%-lise HCl toimel saadi etüületris lahustuvaid aineid 7,00%, millest vanilliinhapet oli 13,33, *p*-hüdrosübensoehapet 8,70 ja sirelhapet 6,67%. Erinevalt humiinhapetest moodustub puidu ligniini lagundamisel leeliselega nitrobenseeni manulusel ülalnimetatud hapetele vastavaid aldehüüde isegi kuni 40% (Бардинская, 1964).

Fenoolsete ühendite väiksem saagis humiinhapetest võib olla tingitud sellest, et humiinhappeid on raskem lõhustada kui ligniine. Teiselt poolt ei saa katsetulemuste interpreteerimisel välistada võimalust, et humiinhapete degradeerimisel moodustunud fenoolkarboksüülhapete väike kogus võib olla tingitud preparaadi saastumisest eraldamisel kaasasadestunud ligniiniga.

Erineva fülogeneetilise astmega taimedest pärinevate humiinhapete preparaatide lõhustamisel moodustunud fenoolkarboksüülhapetest ja aldehüüdidest domineerivad need, mis on iseloomulikud nende taimede ligniinile. Nii domineeris rabaturba humiinhapete lõhustamisel saadud produktides *p*-hüdrosübensoehape (ka *p*-hüdrosübensaldehüüd) ja vanilliinhape (ka vanilliin), kuna sirelhapet moodustus tunduvalt väiksemal hulgal (sirelaldehüüd kromatogrammil puudus). Kirjanduse andmetel (Smith jt., 1964; Lindberg jt., 1952; Лебедев jt., 1965) on sfagnumi ligniinile iseloomulikud *p*-hüdrosübensaldehüüd ja vanilliin. Kuid R. I. Morrisoni (1958) järgi moodustub lõhustamisel sfagnumi ligniini iseloomustava aromaate ühendina ainult *p*-hüdrosübensaldehüüd.

Erinevalt eeltoodust moodustus kasekäsna humiinhappetaoliste ühendite lõhustamisel kõige rohkem sirelhapet. Sisalduselt teisel kohal on

vanilliinhape ja viimasel kohal *p*-hüdroksübensoehape. Ka A. Šivrina jt. (Šivrina jt., 1959) on saanud mitmete kaskede käsnade humiinhapetest (hüdrolüüsides neid 12%-lise soolhappega) teiste fenoolkarboksüülhapetega võrreldes ülekaalukalt sirelhapet: 1,8—3,8 korda rohkem kui vanilliinhapet ja 8,2—9,3 korda rohkem kui *p*-hüdroksübensoehapet. Samade autorite andmetel tekib kase ligniini hüdrolüüsil sirel- ja vanilliinhapet umbes samas vahekorras, s. o. 2,3 : 1.

Ülaltoodud andmed osutavad võimalusele, et sfagnumiturba ja kasekäsna humiinhappetaolised ühendid moodustuvad vastavalt turbasambla ja kase ligniinist.

Kokkuvõte

Vähelagunenud rabaturba humiinhapete happelisel ja leeliselisel hüdrolüüsil ning oksüdeerimisel leeliselises keskkonnas nitrobenseeni manulusel moodustunud fenoolset tüüpi ühenditest domineeris kolm fenoolkarboksüülhapet: *p*-hüdroksübensoe-, vanilliin- ja sirelhape. *p*-hüdroksübensoe- ja vanilliinhapet moodustus tunduvalt rohkem kui sirelhapet. Degradeerimisel saadud produktides leiti jälgedena ka esimestele vastavaid aldehüüde.

Kasekäsna moodustus samade degradeerimismeetodite abil samuti sirel-, vanilliin- ja *p*-hüdroksübensoehapet. Neist domineeris sirelhape, kõige vähem leiti *p*-hüdroksübensoehapet. Paberchromatograafilise analüüsi abil tehti kindlaks sirelaldehüüdi ja vanilliini esinemine. Viimaseid moodustis märgatavalt vähem kui neile vastavaid happeid.

KIRJANDUS

- Bremner J. M., 1955a. Studies on soil humic acid. I. The chemical nature of humic nitrogen. *J. Agric. Sci.* **46** (2) : 247—256.
- Bremner J. M., 1955b. Recent work on soil organic matter at Rothamsted. *Z. Pflanzenähr., Düng., Bodenkunde* **69** (1) : 32—38.
- Burges A., Hurst H. M., Walkden S. B., 1963. Nature of humic acids. *Nature* **17** : 696—697.
- Davies R. J., Coulson C. B., Lewis D. A., 1960. Polyphenols in soil profile development. *Sci. Proc. Roy. Dublin Soc. A* **1** : 183—189.
- Farmer V. C., Morrison R. I., 1960. Chemical and infrared studies on Phragmites peat and its humic acid. *Sci. Proc. Roy. Dublin Soc. A* (4) : 85—104.
- Ferguson W. S., Sowden F. J., 1966. A comparison of methods of determining nitrogen fractions in soils. *Canad. J. Soil Sci.* **46** (1) : 1—6.
- Flaig W., 1964. Chemische Untersuchungen an Humusstoffen. *Z. Chem.* **4** (7) : 253—265.
- Forsyth W. G. C., 1947. Characterisation of the humic complexes of soil organic matter. *J. Agric. Sci.* **37** (2) : 132—138.
- Greene G., Steelink C., 1962. Structure of soil humic acid. II. Some copper oxide oxidation products. *J. Org. Chem.* **27** (1) : 170—174.
- Ibrahim R. K., Towers G. H. N., 1960. The identification by chromatography of plant phenolic acids. *Arch. Biochem. Biophys.* **87** : 125—128.
- Johnston H. H., 1961. Soil organic matter. II. Studies of the origin and chemical structure of soil humic acids. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* **25** (1) : 32—35.
- Johnston H. H., 1964. The relationship of brown humus to lignin. *Plant and soil* **21** (2) : 191—200.
- Lindberg B., Theander O., 1952. *Sphagnum* peat. II. Lignin in *Sphagnum*. *Acta Chem. Scand.* **6** (2) : 311—312.
- Lynch D. L., Wright L. M., Oln H. O., 1957. Qualitative and quantitative chromatographic analyses of the carbohydrate constitution of the acid-insoluble fraction of soil organic matter. *Soil Sci.* **84** (5) : 405—411.
- Milius A., 1967. Väetis- ja niiskusežiimi mõju oksüdeeritud C₆—C₁ aldehüüdide sisaldusele õunapuuvõrsetes seoses nende puitumisega. Diplomitöö. TRU.
- Morrison R. I., 1958. The alkaline nitrobenzene oxidation of soil organic matter. *J. Soil Sci.* **9** (1) : 130—140.

- Morrison R. I., 1963. Products of the alkaline nitrobenzene oxidation of soil organic matter. *J. Soil Sci.* **14** (2) : 201—216.
- Scheffer F., Kickuth R., 1961a. Chemische Abbauprobungen an einer natürlichen Huminsäure. I. Mitteilung. *Z. Pflanzenernähr., Düng., Bodenkunde* **94** (2—3) : 180—188.
- Scheffer F., Kickuth R., 1961b. Chemische Abbauprobungen an einer natürlichen Huminsäure. II. Mitteilung. *Z. Pflanzenernähr., Düng., Bodenkunde* **94** (2—3) : 189—198.
- Smith D. G., Lorimer I. W., 1964. An examination of the humic acids of *Sphagnum* peat. *Canad. J. Soil. Sci.* **44** (1) : 76—87.
- Stevenson F. J., 1960. Chemical nature of the nitrogen in the fulvic fraction of soil organic matter. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* **24** (6) : 472—477.
- Waldron A. C., Mortensen J. L., 1961. Soil nitrogen complexes. II. Electrophoretic separation of organic compounds. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* **25** (1) : 29—32.
- Бардинская М. С., 1964. Растительные клеточные стенки и их образование. М.
- Драгунов С. С., 1953. Генезис и строение гуминовых кислот. В сб.: Химия и генезис твердых горючих ископаемых : 317—324.
- Драгунов С. С., 1962. Химическая природа гуминовых кислот. В сб.: Гуминовые удобрения. Теория и практика их применения. II. Киев : 11—22.
- Зырин Н. Г., Овчинникова М. Ф., Орлов Д. С., 1964. Аминокислотный состав гуминовых кислот и фульвокислот некоторых типов почв. *Агрохимия* (4) : 108—120.
- Кононова М. М., 1963. Органическое вещество почвы, его природа, свойства и методы изучения. М.
- Курбатов И. М., 1953. Роль лигнина и протеинов в образовании гуминовых веществ торфа. В сб.: Химия и генезис твердых горючих ископаемых : 335—343.
- Лебедев К. К., Черняева О. И., Ракитина М. А., Железнякова З. Н., 1965. Экспериментальное изучение лигнификации водорослей, мхов и хвощей. *ЦНИЛХИ. Сб. тр.* **16** : 259—278.
- Ловягина Е. В., Шиврина А. Н., Платонова Е. Г., 1958. Изучение продуктов гидролиза действующего начала чаги методами распределительной хроматографии. *Биохимия* **23** (1) : 41—46.
- Мацек К., 1962. Проявляющие реактивы (Д). В кн.: Хроматография на бумаге : 729—730; 732. М.
- Шиврина А. Н., Ловягина Е. В., Платонова Е. Г., 1959. К вопросу о природе и происхождении водорастворимого пигментного комплекса, образуемого трутовым грибом чаги. *Биохимия* **24** (1) : 67—72.

Eesti NSV Teaduste Akadeemia
Zooloogia ja Botaanika Instituut

Saabus toimetusse
18. IV 1969

АЙНИ ЛИНДПЕРЕ

ФЕНОЛЬНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ ГУМИНОПОДОБНЫХ ВЕЩЕСТВ СФАГНОВОГО ТОРФА И ОТРОСТКОВ ГРИБА *INONOTUS OBLIQUUS* (FR.) PIL.

Резюме

Изучались фенольные соединения, образующиеся при деградации гуминовых кислот сфагнового торфа и гуминоподобных веществ чаги (*Inonotus obliquus* (Fr.) Pil.).

Гумусовые вещества торфа экстрагировались горячим раствором 0,1 М $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, а для сравнения также раствором 0,1 н. NaOH . Из чаги брали водную вытяжку при температуре 80°С. При подкислении (до pH 1—2) экстрактов осаждались вещества, называемые гуминовыми кислотами.

Гуминовые кислоты из торфа и чаги гидролизовали 2%-ным HCl при кипячении в параллельных опытах в течение 4 и 20 ч. После 20-часового кипячения оставшийся нерастворимый остаток снова гидролизовали 2%-ным HCl , а затем 6 н. HCl в течение 4 ч. Остатки первого гидролиза деградировали при кипячении 10%-ным раствором NaOH . Гуминовые кислоты подвергались и щелочно-нитробензольному окислению.

Образующиеся из всех гидролизатов органические соединения экстрагировались эфиром при pH 1 и исследовались при помощи хроматографии на бумаге. Для разделения фенольных кислот применялась система: бензол — уксусная кислота — вода (6:7:3) или хлороформ — уксусная кислота — вода (50:25:25). Для разделения фенольных альдегидов — 1-бутанол — 3%-ный NH_4OH (9:4).

Кислоты проявляли диазотированным раствором *n*-нитроанилина и диазотированным раствором сульфаниловой кислоты. Фенольные альдегиды проявляли раствором 2,4-динитрофенилгидразина.

При всех способах деградации из гуминовых кислот торфа и чаги образовывались фенольные соединения, соответствующие продуктам распада лигнина. Обнаружены сиреневая, ванилиновая, *n*-оксисбензойная кислоты (табл. 1) и их альдегиды.

Ванилиновая и *n*-оксисбензойная кислоты в больших количествах найдены в гидролизатах гуминовых кислот сфагнового торфа. Для гуминовых кислот чаги характерно присутствие сирингиловых групп, так как среди найденных фенольных соединений преобладает сиреневая кислота (рис. 1). Из гуминовых кислот торфа образовались ванилин и *n*-оксисбензальдегид (табл. 2), а из гуминовых кислот чаги — ванилин и сиреневый альдегид. По сравнению с соответствующими кислотами альдегидов образуется значительно меньше.

На основе результатов исследования можно предположить, что лигнин является одним из источников образования гуминовых кислот сфагнового торфа и отростков гриба *Inonotus obliquus* (Fr.) Pil.

Институт зоологии и ботаники
Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию
18/IV 1969

AINI LINDPERE

PHENOLIC COMPOUNDS OF HUMIC ACID-LIKE MATERIALS FROM SPHAGNUM PEAT AND FROM *INONOTUS OBLIQUUS* (FR.) PIL.

Summary

Humic substances of sphagnum peat were extracted with hot 0.1 M $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ and with 0.1 N NaOH. Birch cancer (*Inonotus obliquus* (Fr.) Pil.) bodies were extracted with hot water. The extracts were acidified to pH 1–2 to precipitate humic acid-like materials which were thereafter isolated by freeze-drying.

The preparations of humic acids obtained were repeatedly hydrolyzed with 2% HCl by boiling for 4 and 20 hours. The residues from acid hydrolysis were subjected to alkaline hydrolysis with 10% sodium hydroxide and to alkaline nitrobenzene oxidation.

Phenolic compounds were extracted with ether at pH 1. Phenolic acids were separated by paper chromatography with benzene-acetic acid-water (6:7:3) or with chloroform-acetic acid-water (50:25:25); phenolic aldehydes — with *n*-butanol — 3% NH_4OH (9:4).

The detection of phenolic compounds was carried out in ultraviolet light, with diazotized sulphanilic acid, with diazotized nitroaniline or with 2,4-dinitrophenylhydrazine.

In all the cases of degradations applied here, aromatic compounds similar to those for lignin were obtained. Vanillic, syringic, *p*-hydroxybenzoic acids (Table 1) and their aldehydes were identified.

Syringyl residues dominated in hydrolysates of humic acid formed from birch, but were found only in traces in hydrolysates of humic acids from sphagnum. Among the degradation products of humic acids of peat, *p*-hydroxybenzoic and vanillic acids dominated. *p*-hydroxybenzoic acid was discovered only in traces on hydrolysis of humic acid-like material from birch cancer bodies (Fig. 1).

Vanillin and *p*-hydroxybenzaldehyde were also identified from humic acids of peat (Table 2), whereas vanillin and syringaldehyde were obtained from the pigment of birch cancer bodies. Compared with acids, the amount of aldehydes formed was considerably lower.

The results seem to support the theory of a lignin origin of humic acid-like materials from sphagnum peat and birch cancer bodies.

Academy of Sciences of the Estonian SSR,
Institute of Zoology and Botany

Received
April 18, 1969