

## Stabile freie Radikale in Huminsäuren

In der Anfangsphase der Humifizierung von Polyphenolen in Modellversuchen treten im allgemeinen sehr unbeständige freie Radikale auf. ZIECHMANN<sup>1</sup> diskutiert eine Vielzahl von Reaktionsabläufen und Bindungsmöglichkeiten im Zusammenhang mit dieser Radikalbildung.

Freie Radikale besitzen mindestens ein ungepaartes Elektron; sie können durch die Messung der Elektronenspinresonanz (ESR) nachgewiesen werden. Auf diese Weise wurden in natürlichen Huminsäuren von STEELINK et al. zwei Arten stabiler freier Radikale nachgewiesen, welche dem Brenzcatechin-Resorcin- bzw. dem Chinhydron-Typ zuzuordnen sind<sup>2,3</sup>.

In der vorliegenden Arbeit wird über Untersuchungen an Huminsäuren verschiedener Herkunft berichtet, die aus folgenden Ausgangssubstanzen isoliert wurden: Cephalosporium gordonii (Pilz-Huminsäure) (P-HS)<sup>4</sup>; Moorboden (M-HS)<sup>5</sup>; Schwarzerde (Braun- und Grauhuminsäure) (B-HS, G-HS)<sup>6</sup>; Moorwasser (wasserlösliche Huminsäure (W-HS))<sup>7</sup>; Braunkohle (R-HS)<sup>8</sup>.

**Ergebnisse.** Die elementaranalytische Zusammensetzung der Präparate ist in der Tabelle wiedergegeben. Die Absorptionsspektren der verschiedenen Huminsäuren in 0,01*n* NaOH sind in der Figur 1 dargestellt. Die  $\epsilon$ -Werte sind im logarithmischen Maßstab als Funktion der Wellenzahl aufgetragen ( $\epsilon = E/c \cdot d$ ; *c*, Konzentration in mg/100 ml Lösung; *d*, Schichtdicke in cm; *E*, Extinktion). Gemessen wurde mit dem Universalspektralphotometer VSU 1 (VEB Carl-Zeiss, Jena, DDR).

W-HS (wasserlösliche Huminsäure = Fulvosäure) zeigt die geringste, G-HS die höchste Extinktion. M-HS, B-HS und R-HS sind aufgrund ihrer optischen Eigenschaften – wie sie auch in refraktometrischen und interferometrischen Befunden zum Ausdruck kommen – und ihrer elementaranalytischen Zusammensetzung den Braunhuminsäuren zuzuordnen; P-HS und G-HS sind Grauhuminsäuren<sup>6-8</sup>.

Die unterschiedliche Extinktion bei Grauhuminsäuren gegenüber Braunhuminsäuren kann aus den Ergebnissen der ESR-Messung (Messapparatur: ERS-X)<sup>9</sup> gedeutet werden. Im Anzeigenteil werden die Absorptionssignale bei Resonanz als Funktion der magnetischen Feldstärke registriert. In Figur 2 sind die gemessenen ESR-Signale für die pulverförmigen Huminsäuren wiedergegeben. In allen Substanzen lassen sich freie Radikale nachweisen. Vergleichsmessungen mit dem Standardradikal Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH; *g*-Wert, 2,0036) ergaben für die Huminsäuren einen *g*-Wert von 2,0055.

**Diskussion.** Bemerkenswert ist, dass die Grauhuminsäuren, denen die Pilzhuminsäure zugeordnet werden muss, einen wesentlich höheren Radikalgehalt aufweisen als die

Braunhuminsäuren. Berücksichtigt man, dass sich durch Mesomerie stabilisierte Radikale (Semichinone) aufgrund des angeregten Zustandes der Elektronen durch eine dunkle Färbung auszeichnen, so ist der höhere Radikalgehalt bei den Grauhuminsäuren als Ursache für die grössere Extinktion gegenüber den Braunhuminsäuren anzusehen.

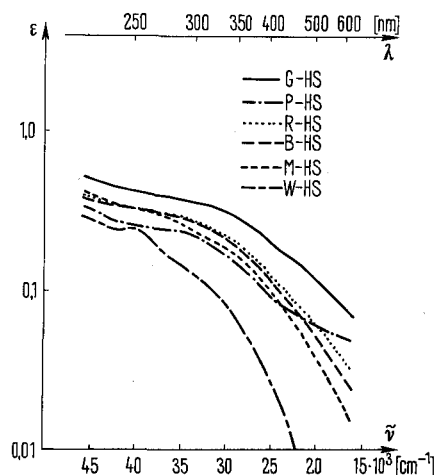


Fig. 1. Absorption der Huminsäuren im ultravioletten und sichtbaren Spektralbereich.

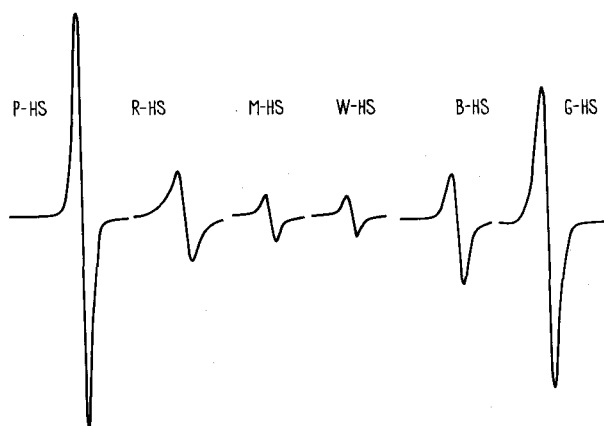


Fig. 2. ESR-Signale in den verschiedenen Huminsäuren.

|      | % C  | % H  | % N  | % Glührückstand |
|------|------|------|------|-----------------|
| P-HS | 55,8 | 4,00 | 6,65 | 0,5             |
| M-HS | 54,9 | 4,90 | 3,10 | 1,0             |
| B-HS | 57,2 | 3,85 | 3,94 | 0,6             |
| G-HS | 64,0 | 3,46 | 2,76 | 5,8             |
| R-HS | 58,0 | 5,17 | 1,53 | 9,0             |
| W-HS | 42,8 | 5,50 | 6,22 | 1,7             |

(C, H und N bezogen auf organ. Substanz)

<sup>1</sup> W. ZIECHMANN, Brennst.-Chem. 44, 52 (1963).

<sup>2</sup> C. STEELINK, G. TOLLIN und T. REID, Chem. Engng. News 40, 53 (1962).

<sup>3</sup> C. STEELINK und G. TOLLIN, Biochim. biophys. Acta 59, 25 (1962).

<sup>4</sup> D. MÜCKE, R. OBENAU und L. KIPKE, Acta biol. med. germ. 3, 221 (1959).

<sup>5</sup> H. KLEIST und D. MÜCKE, Thier-Arch., im Druck.

<sup>6</sup> W. WIESEMÜLLER, Thier-Arch. 9, 419 (1965).

<sup>7</sup> D. MÜCKE und R. OBENAU, Naturwissenschaften 48, 478 (1961).

<sup>8</sup> Bezogen von der Firma Riedel de Haen (Seelze bei Hannover, Deutschland).

Bedeutsam ist, dass bei der wasserlöslichen W-HS nur wenig Radikale nachgewiesen werden. Das geringe Teilchengewicht sowie der mögliche – und vielfach vermutete – Gehalt an aktiven Huminsäurevor- und -zwischenstufen in der wasserlöslichen Huminsäurefraktion liessen hier einen höheren Radikalgehalt erwarten. Offenbar handelt es sich bei diesen Teilchen jedoch um relativ stabile Aggregate, die die W-HS als selbständige Gruppe der Huminstoffe auszeichnen.

*Summary.* The electron spin resonance was measured with several humic acids. The preparations used here con-

tain stable free radicals. Grey humic acids contain more radicals than brown humic acids.

H. KLEIST und D. MÜCKE<sup>9</sup>

*Institut für Physiologische Chemie der Universität, Rostock (DDR), 20. September 1965.*

<sup>9</sup> Herrn Dr. SEIFERT und Fräulein Dr. EBERT (Deutsche Akademie der Wissenschaften Berlin-Adlershof, Arbeitsgruppe: Physikalische Methoden der Analytischen Chemie, Labor für Hochfrequenz-Spektroskopie; Dir.: Prof. Dr. KRIEGSMANN) danken wir für die Unterstützung bei der Durchführung der Messungen.

### Excited Molecular O<sub>2</sub> and Inactivation of Indolebutyric Acid (IBA)

The existence of a metastable excited molecular oxygen in solution is of outstanding interest in several problems. Originally KAUTSKY<sup>1</sup>, about 1935, had speculated on the existence of such a species in connection with dye (e.g. eosin) photosensitized oxidations<sup>2</sup>, but the suggestion was lost for want of direct evidence. The present report confirms KAUTSKY's earlier speculations and places them on a firm footing.

The observation that a red-orange chemiluminescence is produced during the reaction of hydrogen peroxide and sodium hypochlorite in aqueous solution was reported by SELIGER<sup>3</sup>. KHAN and KASHA<sup>4</sup>, extended the spectroscopic study of this chemiluminescence and, in view of the nature of the reaction and the bands observed, they tentatively assigned the red chemiluminescence bands as the 0.0 and 0.1 bands of the  $^1\Sigma_k^+ \rightarrow ^3\Sigma_k^-$  transition of the *molecular oxygen*. The study of the mechanism of the reaction by CAHILL and TAUBE<sup>5</sup>, using isotopic labelling of the peroxide, also indicates that the O-O bond remains intact, reaffirming the possibility of excited *molecular oxygen* rather than *atomic oxygen* as a primary product. The results of the present investigation distinctly show that there is a direct *cause-and-effect* relationship between molecular oxygen and its capacity of inducing the oxidation of IBA.

In this endeavour, the author employed the 'bean test' devised by FERRI and CAMARGO<sup>6</sup> for the rapid assay of plant growth regulators. Y-shaped segments from 2- to 3-week-old plants of *Phaseolus vulgaris* L. var. 'Blue Lake' enhance the angle between the petioles while reposing in

water and decrease it while immersed in IBA solution (Figure). The behaviour is qualitatively the same whether the test objects are kept in light or in darkness and is not attributable to pH alterations or osmotic influences.

With the aid of this biological test, it was possible to evaluate the influence of excited molecular O<sub>2</sub> produced in aqueous solution by the interaction of sodium hypochlorite and hydrogen peroxide on IBA solutions. The mean values of a representative experiment are charted in the Table. It is apparent that, while the pieces reposing in water increased the average angle between the petioles, those resting in IBA solutions decreased it both in the light and in the dark. The two ingredients of the reaction mixture, viz. sodium hypochlorite and hydrogen peroxide (at pH 7.0), were unable to sensitize the destruction of IBA, as reflected in the response of the plant segments. But as the two constituents mingled together, the resulting red-orange chemiluminescence was instrumental in abolishing the IBA activity with unusual avidity and the test objects behaved as if they were in pure water. This highly reproducible experiment was repeated with other indole analogues, e.g.  $\beta$ -(indole-3)-*n*-propionic acid, with identical results.

<sup>1</sup> H. KAUTSKY, in *Luminescence, A General Discussion of the Faraday Society* (Gurney and Jackson, London 1938), p. 216.

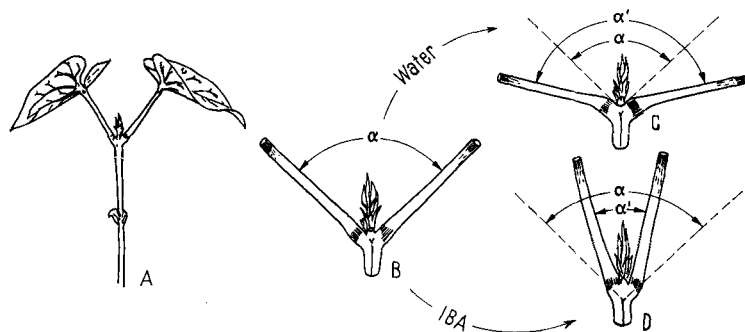
<sup>2</sup> R. K. KAKKAR, *Naturwissenschaften* 52, in press (1965).

<sup>3</sup> H. SELIGER, *Anal. Biochem.* 1, 60 (1960).

<sup>4</sup> A. U. KHAN and M. KASHA, *J. Chem. Phys.* 39, 2105 (1963).

<sup>5</sup> A. E. CAHILL and H. TAUBE, *J. Am. chem. Soc.* 74, 2312 (1952).

<sup>6</sup> M. G. FERRI and L. S. V. CAMARGO, *Ann. Acad. Brasil. Ci.* 22, 161 (1950) (in LINSEY und KIEMAYER, *Methoden zur Bestimmung pflanzlicher Wuchsstoffe* (Springer, 1957), Figur 39).



A upper part of the 2-week-old bean plant showing the primary leaves; B Y-shaped piece prepared from the same; C increase of  $\alpha$  in water; D decrease of  $\alpha$  in presence of IBA.