

УДК 543.54:631.412

ОБОСНОВАНИЕ ПРИМЕНЕНИЯ СИСТЕМАТИЗИРОВАННОЙ ГЕЛЕВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ В ПОЧВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

А. И. КАРПУХИН

(Кафедра почвоведения)

Гелевая фильтрация является современным методом физико-химического анализа, позволяющим выделять однородные фракции и отдельные классы химических соединений в лабильных условиях, рассчитывать их молекулярные массы, а также решать многие задачи, связанные с химическим состоянием и функциями почвы.

Теория гелевой хроматографии базируется на общих закономерностях хроматографии и динамики сорбции [19].

Процесс гелевой хроматографии может быть выражен [1] следующей системой уравнений:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D^* \frac{\partial^2 C}{\partial z^2} - U \frac{\partial C}{\partial z} - S_c D^s \frac{V_{\text{пор}}^*}{V_0} \left(\frac{\partial C^s}{\partial z} \right)_{r=r_c}, \quad (1)$$

$$g \frac{\partial C^s}{\partial t} = D^s \left(\frac{\partial^2 C^s}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \cdot \frac{\partial C^s}{\partial r} \right), \quad (2)$$

$$(C^s)^* = f(C) |_{r_k = R_k}, \quad (3)$$

где C и C^s — концентрация раствора соответственно в подвижной и неподвижной фазах колонки; $(C^s)^*$ — концентрация раствора во внешней части пространства геля, которую можно считать равновесной; g — пористость геля; V — объем геля; D^* и D^s — эффективный коэффициент диффузии молекул соответственно в подвижной и неподвижной фазах; $V_{\text{пор}}^*$ — объем внешней части порового пространства геля; r_c — радиус сферических частиц геля; R_k — средний радиус каналов подвижной фазы; S_c — внешняя поверхность неподвижной фазы на единицу объема колонки (U — средняя скорость элюции).

Уравнение (1) описывает движение элюируемых молекул вдоль хроматографической колонки [1], наполненной гелем. Согласно уравнению (2) молекулы диффундируют внутрь зерен сорбента. Соотношение (3) определяет условия на границе раздела двух фаз, а уравнения (2) и (3) — скорость процесса гелевой хроматографии.

В каждом акте сорбции и десорбции при гелевой фильтрации можно выделить по крайней мере четыре стадии: 1) случайные блуждания элюируемых молекул в каналах подвижной фазы, 2) сорбция, т. е. удержание молекул в порах геля, 3) случайные блуждания в зернах геля; 4) десорбция, т. е. переход молекул из зерен сорбента в каналы подвижной фазы.

Отличительной особенностью геле-проникающей хроматографии является отсутствие адсорбции элюируемых макромолекул матрицей геля. Поэтому кинетика процесса гелевой хроматографии определяется в основном случайным блужданием макромолекул в каждой из фаз колонки вследствие краткотечности и малой масштабности стадии сорбции и десорбции по сравнению с 1-й и 3-й стадиями.

Поведение молекул в процессе гелевой хроматографии характеризует коэффициент распределения K_d , который может быть задан как соотношение средних концентраций разделяемых молекул C и C' соответственно в подвижных и неподвижных фазах колонки.

$$K_d = \frac{C'}{C} < 1, \quad (4)$$

где C' — средняя по зерну концентрация

$$C' = \frac{3}{r_c^3} \int C^s(r, z, t) r^2 dr. \quad (5)$$

Для описания процессов гелевой хроматографии удобно, чтобы K_d принимал в нем непосредственное участие.

$$V_{пор} \frac{\partial C}{\partial t} = V_0 \lambda C - V_{пор} \lambda' C', \quad (6)$$

$$\frac{\partial C}{\partial t} + \frac{V_{пор}}{V_0} \cdot \frac{\partial C'}{\partial t} = D^* \Delta^2 C - U \frac{\partial C}{\partial z}, \quad (7)$$

где λ и λ' — средние вероятности соответственно сорбции и десорбции молекул в единицу времени на каждом участке колонки.

Правая часть уравнения (7), описывающего кинетику процесса, — это разность потоков в единицу времени из подвижной фазы в неподвижную или из неподвижной в подвижную; левая часть — соответствующие этой разности изменения числа молекул в неподвижной фазе в данном сечении колонки.

Значение λ может быть найдено как величина, обратная времени, при котором решение уравнения

$$\frac{\partial W}{\partial t} = D^* \Delta^2 W - U \frac{\partial W}{\partial z} \quad (8)$$

при граничном условии

$$\left\{ \tilde{\lambda} W + (1 - \tilde{\lambda}) \left[\frac{\partial W}{\partial x} + \frac{\partial W}{\partial y} \right] \right\}_{x^2 + y^2 = z^2} = 0$$

оптимальное. (9)

Здесь $W(x, y, z, t)$ — вероятность пребывания молекулы в единичном объеме с координатами x, y, z, t ; $\tilde{\lambda}$ и $(1 - \tilde{\lambda})$ — вероятность появления поглощающей и отражающей границ при достижении блуждающей молекулой поверхности сорбента.

$$\lambda = \frac{S_{пор}^{дост}}{S}, \quad (10)$$

где S — полная поверхность сорбента; $S_{пор}^{дост}$ — площадь входных отверстий, доступных по размерам для данных молекул пор сорбента.

Вероятность десорбции может быть определена как значение, обратное среднему времени запаздывания τ при установлении термодинамического равновесия между фазами колонки; τ находим, решая уравнение (2),

$$\tau = \frac{gr_c^2}{15D^s}. \quad (11)$$

Коэффициент распределения в области максимума распределения фракционируемого вещества в хроматографической зоне описывается уравнением

$$K_d = \frac{V_0}{V_{пор}} \cdot \frac{\lambda}{\lambda'}. \quad (12)$$

Соотношение между λ и λ' представлено в виде

$$\lambda' = \lambda \frac{V_0}{V_e - V_0}. \quad (13)$$

Хроматографическое поведение растворенных веществ следует рассматривать с двух сторон: с одной стороны, оно аналогично распределению раствора низкомолекулярных веществ, с другой, — связано с проявлением специфических свойств макромолекул, закономерности которого не свойственны низкомолекулярным соединениям. Это, например, зависимость элюиционных объемов V_e и конформационных изменений макромолекул при попадании в поры сорбента, а также зависимость V_e и скорости элюции, концентрации раствора, его температуры, свойств растворителя [2].

При гелевой фильтрации объем выхода максимума элюиционной волны V_e хроматографируемого вещества зависит от скорости элюции. Эта зависимость определяется несколькими эффектами. Из-за малой диффузионной подвижности высокомолекулярных соединений, для которых коэффициент диффузии D лежит в пределах $10^{-6} - 10^{-8}$ см²/с, вероятность их сорбции уменьшается с увеличением скорости элюции U , что приводит к уменьшению значения V_e , а следовательно, и K_d . Вследствие вязкости раствора и неоднородности упаковки колонки возрастает не только скорость элюции, но и ее поперечный и продольный локальные градиенты. Это приводит к деформации макромолекул и ориентации их в направлении потока, что влечет за собой уменьшение вероятности сорбции и значения удерживаемого объема V_e . С увеличением скорости элюции процесс становится более неравновесным, профиль скорости более резким, хроматографические пики принимают более асимметричную

форму и их максимумы сдвигаются в сторону меньших значений удерживаемых объемов. Профиль скорости потока в каналах подвижной фазы при соизмеримости значений их радиусов с размерами молекул обуславливает более высокую среднюю скорость движения крупных молекул по сравнению с таковой малых молекул и большую скорость движения макромолекул по сравнению со скоростью растворителя. Этот эффект возрастает по мере увеличения скорости элюции и уменьшения диаметра каналов подвижной фазы. Отмеченные закономерности становятся существенными при $U > 5 \cdot 10^{-2}$ см, что необходимо учитывать в практике применения гелевой хроматографии.

Зависимость между удерживаемыми объемами и концентрацией раствора определяется также несколькими факторами. При повышении концентрации раствора взаимное отталкивание молекул может привести к уменьшению размеров макромолекул и к увеличению доступной для их проникновения области геля и, следовательно, значений V_e хроматографируемых веществ. При элюировании многокомпонентного раствора имеет место взаимное термодинамическое вытеснение компонентов в каждой фазе, особенно в подвижной, что обуславливает увеличение V_e меньших по размеру молекул разделяемых веществ. Специфической особенностью полимерных растворов является сложная зависимость между диффузионной подвижностью молекул, в результате которой коэффициенты диффузии уменьшаются с возрастанием концентрации растворов в низкомолекулярной области и повышаются в высокомолекулярной. Это приводит к некоторому увеличению неравновесности процесса гелевой хроматографии для молекул малых размеров, что объясняет наблюдаемое при увеличении концентрации растворов расширение хроматографических пиков, появление у них «хвостов». В конечном счете возрастает их асимметрия — сдвиг максимумов в сторону больших значений V_e . Определенное влияние на V_e оказывают также эффекты, обусловленные особенностями течения полимерного раствора значительной вязкости. Поток элюента может деформировать хроматографическую зону и, прорываясь через нее, нарушать соотношение между скоростями движения элюента и зоны полимера. Этот эффект проявляется в увеличении V_e фракционируемого вещества при повышении концентрации растворов.

V_e зависит от чувствительности макромолекул к температуре окружающей среды, V_e возрастает при уменьшении размеров макромолекул и уменьшается при их увеличении.

Результаты гелевой хроматографии зависят от выбора растворителя. Элюент при гель-хроматографии должен предотвратить приводящее к адсорбции взаимодействие молекул фракционируемых веществ с матрицей геля. Выбор растворителя предопределяет также размеры молекул разделяемых веществ. При этом существенное значение имеет вязкость растворителя. С ее увеличением уменьшается диффузионная подвижность сепарируемых молекул и процесс фракционирования в большей степени отклоняется от равновесного, вследствие

чего хроматографические пики становятся более размытыми и асимметричными.

Хроматографический пик деформирован, т.е. размыт в сторону переднего фронта для гелей с достаточно большим объемом доступных пор, для которых $K_d V_{пор} \gg V_0$ — максимум концентрации в подвижной фазе смещен в сторону движения раствора, а в неподвижной фазе — в противоположном направлении. Для сорбентов с малым объемом доступных пор ($K_d V_{пор} \ll V_0$) наблюдается обратная картина. Степень асимметрии пика тем меньше, чем длиннее колонка, она возрастает по мере увеличения неравновесности процесса и неравновесности поля скоростей в колонке.

Наличие нетривиального профиля скорости в гелевой колонке приводит также к дополнительному размыванию хроматографической зоны, при этом увеличивается время ее выхода из колонки.

Эти положения послужили основанием для калибровки хроматографа не только по элюионным объемам, но и по таким характеристикам хроматографируемого пика, как дисперсия, асимметрия, эксцесс. В частности, из теории гелевой фильтрации следует, что дисперсия пика зависит от молекулярной массы исследуемого вещества, что согласуется с экспериментальными данными. Руководствуясь значениями статистических моментов, можно оценить погрешность, допускаемую вследствие асимметрии хроматографических пиков при интерпретации хроматограмм с целью оценки молекулярных масс (ММ), их среднеэффективных значений (СММ) и молекулярно-массового распределения (ММР) без предварительной коррекции на асимметрию.

Механизмы, обуславливающие процесс гелевой фильтрации

В заполненной гелевой колонке растворитель образует две фазы — внутри гранул геля и между ними. В соответствии с этим полный объем колонки V_t , определяемый как произведение внутреннего ее сечения πr^2 и высоты геля (h), складывается из следующих объемов:

$$V_t = V_0 + V_i + V_g, \quad (14)$$

где V_i — полный рабочий объем колонки; V_i — объем растворителя, связанного с гелевыми частичками; V_0 — свободный объем подвижного (несвязанного) растворителя гелем; V_g — собственный объем гелевых частиц.

При гелевой фильтрации в такой системе хроматографируемые вещества передвигаются по колонке со скоростью, которая определяется суммарным действием нескольких механизмов [2, 3, 23—27]. Основными из них являются молекулярно-ситовой, сорбционный, диффузионный и эксклюзионный. Преобладание того или иного механизма определяется воздействием друг на друга геля, растворимого вещества и растворителя. Оно также обусловлено скоростью элюции, концентрацией раствора, температурой и свойствами растворителя.

Растворенные молекулы элюируются из гелевой колонки в порядке уменьшения их размеров или молекулярных масс. Такой обратный молекулярно-ситовой эффект можно объяснить неодинаковой степенью

проникновения этих молекул внутрь набухших гранул. Способность молекул разделяемой смеси проникать в гелевые частицы зависит от пористости геля и размера молекул смеси. При нанесении хроматографируемого раствора на колонку, заполненную гелем, небольшие молекулы свободно диффундируют внутрь гранул и равномерно распределяются по всему объему колонки. Молекулы большего размера не могут проникнуть в гранулы, поскольку они больше пор набухшего геля, и остаются в слое растворителя, т.е. в свободном объеме несвязанного растворителя. Если эту колонку промывать растворителем, то в первую очередь начнут перемещаться вдоль нее молекулы большего размера, находящиеся во внешнем (свободном) по отношению к гранулам геля растворе. Скорость передвижения молекул, которые меньше пор геля, будет меньше и определяется диффузией внутрь гранул неподвижного геля. Поэтому возникает обратный молекулярно-ситовой эффект и компоненты смеси будут элюироваться из колонки в порядке уменьшения значений ММ.

Для любого растворенного вещества V_e является показателем, промежуточным между элюционным объемом вещества, полностью исключенного из гранул геля, равным V_0 , и элюентным объемом вещества, равномерно распределенного между двумя фазами, равным полному объему растворителя, V_p — рабочий объем, интервал объемов геля, в котором соблюдается закон молекулярно-массового распределения хроматографируемых веществ.

Этот интервал объемов лежит в пределах от V_0 до V_{\max} (максимальный объем), при котором соблюдается молекулярно-массовый эффект.

$$V_{\max} = V_0 + V_i. \quad (15)$$

Элюционный объем для хроматографируемых веществ будет равен

$$V_e = V_0 + K_d V_i. \quad (16)$$

K_d характеризует степень проникновения вещества внутрь геля и может принимать значения

$$0 < K_d < 1, \quad (17)$$

если в гель-хроматографическом процессе поведение разделяемых веществ определяется молекулярно-ситовым механизмом.

Другие механизмы можно отнести к вторичным исходя из принципа разделения по ММ, но в некоторых случаях они могут стать определяющими, так как проявляются в нарушении порядка элюирования (в соответствии с уменьшением ММ или размеров) в существенно завышенных $V_e > V_p$ или заниженных пределах по сравнению с ожидаемыми элюентными объемами. Наложение на молекулярно-ситовой эффект других механизмов выражается в появлении асимметричности хроматографических пиков, размытии фронтов, которые зависят от параметров элюирования, концентрации растворенного вещества, природы и концентрации элюента.

Аномально высокие значения V_e и K_d являются следствием сорбционных процессов. Известен ряд примеров (например, при гелевой хроматографии ароматических, гетероциклических соединений, а также их

производных, имеющих ионизируемые группировки, и многих неорганических солей), когда вещество вымывается объемом растворителя, превышающим значение $V_0 + V_i$, а $K_d > 1$. Хроматографируемое вещество в колонке может задерживаться за счет процессов ионного обмена, физической или химической сорбции гелем [2, 3, 12, 23—27].

При гелевой хроматографии на набухающих молекулярных ситах в отдельных случаях вещества вымываются из колонки раньше, чем это можно было ожидать исходя из их молекулярных размеров. Указанное явление называется эксклюзией. Данный факт объясняется различной термодинамической совместимостью элюируемых молекул с матрицей геля, отсюда неодинаковая способность хроматографических молекул, особенно полимерных, диффундировать в плотные области сорбента. Все это должно рассматриваться наряду с сорбцией как механизм, накладывающий отпечаток на суммарный процесс гелевой хроматографии. Эксклюзионный механизм обусловлен, например, типичным для макромолекул эффектом взаимного объемного исключения полимерных сегментов. Наличие небольшого количества отрицательно заряженных карбоксильных групп в гелях приводит к отталкиванию анионов хроматографируемого вещества, в результате последние исключаются из гранул геля и элюируются раньше [18].

Диффузионный механизм определяется подвижностью макромолекул в стационарной фазе колонки. Эта подвижность, в свою очередь, определяет неравновесность процесса гелевой хроматографии и зависит от внешней и внутренней диффузии хроматографируемых веществ [1].

Для установления истинных параметров ММ, СММ, ММР стараются проводить гелевую фильтрацию в условиях, близких к равновесным, при которых диффузионный механизм незначительно влияет на разделение молекул. Если при этом используются ненабухающие сорбенты, то в основе процесса гелевой фильтрации лежит только обратный молекулярно-ситовой эффект и тогда значения элюционных объемов, рассчитанных на основе теоретических выкладок, аналогичны значениям, полученным экспериментально [2, 3, 23].

Путем сравнения коэффициентов распределения (D), найденных в динамических и статических условиях, можно определить вклад диффузии растворенных веществ в суммарный процесс разделения на гелях. Более того, значение

$$D = \frac{C_0 - C_p}{C_0} \cdot 100, \quad (18)$$

(где C_0 — исходная концентрация хроматографируемого вещества; C_p — равновесная концентрация) отражает вклад сорбции, в результате которой $C_0 > C_p$ и $D > 0$. Взаимодействие высокомолекулярных веществ с гелем зависит от рН элюента и содержания гидрофобных групп в структуре анализируемого вещества. Это взаимодействие можно ослабить или совсем исключить путем применения систематизированной гелевой хроматографии, добавления электролита и подбора элюента [2, 3, 12, 18].

Выбор элюента или системы растворителей

При определении ММ исследуемых соединений необходимо, чтобы в процессе разделения они подчинялись механизму ММР, что важно прежде всего для нахождения ММ гумусовых веществ, так как ароматические и гетероциклические соединения задерживаются гелями декстрана. Фенольная группировка обладает сильным сродством к сефадексу, особенно в нейтральной среде [2].

Взаимодействие, например, гумусовых веществ с декстрановыми гелями затрудняет правильное установление их молекулярно-массовых характеристик. Взаимодействие фульвокислот с декстрановыми гелями малозаметно, особенно при его определении методом систематизированной гелевой хроматографии. Сорбция становится значительной при фильтрации гуминовых кислот.

Адсорбция вещества на геле зависит от условий фракционирования, среди которых важное значение имеет правильный выбор элюентной системы.

При гелевой фильтрации гуминовых кислот в качестве элюентов используют деионизированную воду, 0,1 н. раствор NaOH, 0,1 н. раствор NH_4OH , а также солевые буферные системы: фосфатные, боратные, карбонатно-бикарбонатные и др. [2, 12].

Солевые буферные системы ослабляют, но не устраняют эффекта адсорбции, только применение сильнощелочных аминных элюентов и диметилсульфоксида позволяет фракционировать гумусовые кислоты в соответствии со значениями ММ.

При гелевой хроматографии гумусовых кислот можно избежать адсорбции, применив методику «солевой границы». Сущность этого приема заключается в том, что нейтрализованный препарат гуминовых кислот растворяется в 0,2 н. растворе NaCl и элюируется из гелевой колонки дистиллированной водой. Согласно теории гелевой хроматографии при элюции гуминовых кислот дистиллированной водой создается градиент концентрации NaCl вдоль колонки с гелем, что способствует лучшему фракционированию. С другой стороны, введение в раствор электролита позволяет блокировать (по аналогии с белками) гидрофобные функциональные группы разделяемых молекул, что снижает эффект взаимодействия хроматографируемого вещества с матрицей геля.

Методика «солевой границы» имеет ограниченное применение [12]. При гельфильтрации гуминовых кислот выделенного чернозема на сефадексе G-50 с применением этой методики обнаружена их необратимая сорбция на матрице геля вследствие коагуляции. При проверке различных буферных систем в качестве элюента установлена их недостаточная эффективность для фракционирования гуминовых кислот. По увеличению сорбции вещества на сефадексе исследуемые элюенты можно расположить в следующий ряд: трис — HCl — 6,2%; глицин — NaOH — 28,9%; боратный буфер — 36,0%; деионизированная вода — 60,8%; фосфатный буфер — 72,5%.

Лучшим элюентом для фракционирования гуминовых кислот [12] является 4 М раствор мочевины (рН 9), использование

которого полностью исключает сорбцию хроматографируемых веществ.

Однако следует помнить, что растворы мочевины влияют на форму и размеры молекул биополимеров [3]. Так, хроматограмма элюирования сывороточного альбумина на сефадексе G-200 5М раствора мочевины содержит 2 пика, тогда как обычно $K_{av}=0,43$. Первая фракция элюируется гораздо раньше ($K_{av}=0,1$) при этом 60% белка не претерпевает никаких изменений. Вполне возможно, что часть молекул денатурировалась и занимает поэтому больший объем. Используя мочевины в качестве элюента, можно исключить сорбцию, но при этом могут изменяться размеры и конфигурация хроматографируемых веществ. Так, ММ рибонуклеазы, установленная на сефадексе G-100, после взаимодействия со щелочью увеличивается в 1,9 раза, после окисления муравьиной кислотой — в 3,0 раза, после обработки 4 М мочевиной — в 1,5 раза, а после обработки 8 М мочевиной — в 4,3 раза.

Эффект ионной эксклюзии можно ослабить или полностью исключить путем подбора подходящего растворителя или элюентной системы. Например, вторичные эффекты усиливаются, когда в качестве элюента используется вода без электролитического фона. При элюировании водой растворов некоторых электролитов значения K_d относительно малы, они возрастают по мере увеличения концентрации растворов. При использовании элюентной системы с меньшей ионной силой значения K_d повышаются. Элюентные кривые неэлектролитов, например, глюкозы, не зависят от этих факторов [1, 2, 18].

Таким образом, поведение веществ в гелевой колонке зависит от степени проявления различных механизмов взаимодействия разделяемых веществ с системой геля. Если проявляется только молекулярно-ситовой механизм, то элюентные кривые симметричны и значение K_d не зависит от концентрации, при этом $0 < K_d < 1$. Для веществ, у которых при малых концентрациях пики симметричны и $0 < K < 1$, изменение V_e и формы пика при увеличении концентрации можно объяснить тем, что повышение ионной силы раствора приводит к уменьшению гидратации иона и матрицы геля, а это, в свою очередь, вызывает увеличение коэффициента распределения. Кроме того, в результате изменения степени гидратации в растворе могут присутствовать гидратированные ионы различных размеров, кривая элюирования которых отличается от гауссовой. В этом случае действует главным образом молекулярно-ситовой механизм.

Асимметричность, дисперсия хроматографических пиков и значения K_d при малых концентрациях разделяемых веществ являются следствием вторичных процессов, которые ограничивают сферы применения гелевой фильтрации для фракционирования как органических, так и неорганических смесей.

Путем подбора растворителей, изменения скорости и концентрации элюента при гелевой хроматографии можно выбрать условия разделения, при которых вторичные процессы не будут существенно влиять на основной механизм разделения по ММ.

Систематизированная гелевая хроматография (СГХ)

Наряду с элюентной системой хорошие результаты дает систематизированная гелевая хроматография [3, 6—11].

В этом случае используются системы гелей с взаимно перекрывающимися пределами разделения. Для каждой марки геля имеется свой предел разделений, и если ММ вещества лежит на границе его разделения или выше, то средняя линейная скорость движения зоны этого вещества в колонке будет равна средней линейной скорости потока элюирующего растворителя. Для элюирования вещества через всю колонку потребуется объем растворителя, равный общему объему подвижного растворителя (V_0) в гелевой колонке. При $V_e = V_0$ молекулярная масса вещества или смеси веществ лежит выше верхнего предела разделений данной марки геля, что позволяет пространственно отделить их от низкомолекулярных соединений. Вещества, ММ которых находится в пределах разделений геля, передвигаются в колонке с меньшей средней линейной скоростью, чем высокомолекулярные вещества за пределами разделений. При этом линейная скорость тем ниже, чем меньше ММ вещества, т. е. возникает обратный ситовый эффект.

Поведение соединений, ММ которых ниже предела разделения геля, зависит от их концентрации и марки геля. Чаще всего при малых концентрациях они образуют узкую зону в верхней части колонки и передвигаются с меньшей линейной скоростью, чем разделяемые по ситовому эффекту вещества. При больших концентрациях данные соединения необратимо сорбируются в верхней части колонки или образуют широкие диффузные зоны, заполняющие часто всю колонку [16, 21]. Поэтому систематизированное разделение веществ необходимо начинать с марок геля G-10 и G-15, имеющих невысокие значения верхнего предела разделения. Неразделившиеся вещества, выходящие со свободным объемом, необходимо дальше делить на другом геле с более высокой верхней границей разделения и так далее для полного фракционирования изучаемой смеси веществ [3, 6—10].

Таким образом, СГХ происходит в оптимальных условиях проявления молекулярно-массового механизма, при этом уменьшается адсорбционный эффект, достигается полное разделение на фракции и получают более четкие зоны хроматографируемых веществ за счет повышения селективности хроматографического процесса и эффективности использования гелевых колонок [10, 11].

Систематизированная гелевая хроматография за короткое время зарекомендовала себя как надежный и сравнительно простой способ фракционирования сложных смесей веществ, определения их ММР, полного спектра ММ фракций и отдельных соединений, а также расчета средних значений ММ [3—11, 14—17, 20—22].

Благодаря молекулярно-ситовому эффекту стало возможным выделять однородные фракции и отдельные классы химических соединений в лабильных условиях [3, 6—10].

Применение СГХ позволяет более точно определять физико-химические параметры (ММ, СММ, ММР) изучаемых веществ, чем фракционирование на геле одной марки с оптимально подобранными параметрами. Этим методом при использовании гелей G-10, G-50, G-75 исходная смесь веществ фульвокислотной природы из горизонта A_0A_1 подзолистой почвы была разделена на 5 фракций, ММ которых лежит в пределах от нескольких сотен до десятков тысяч [3, 6, 8].

Данный метод с успехом применяется для выделения и пространственного разделения органических, неорганических и органо-минеральных природных соединений. Структурные исследования такого рода необходимы для выявления изменений, происходящих в почвенных соединениях в результате их выделения и очистки в процессе экстракции, переосаждения, электролиза и диализа.

Особенно перспективно применение СГХ для решения задач, связанных с функциями почв. С помощью гелевой фильтрации можно более точно и надежно определить роль тех или иных групп соединений, их фракций и отдельных химических элементов в современных почвообразовательных процессах, выяснить их функции в превращениях вещества и энергии в почвенном профиле [11, 13, 15, 17, 22].

Использование методик СГХ позволяет изучать скорость, масштабы и направленность минерализации и гумификации органических остатков, определять параметры биологического круговорота веществ и многие другие преобразования [17—22].

Результаты СГХ дают возможность делать выводы об аккумуляции, трансформации и миграции соединений в почвах и на этой основе характеризовать их доступность растениям [4, 10]. В процессе миграции, например, фульвокислот в подзолистой почве до горизонта В происходит их резкое качественное изменение, в них появляются новые фракции с меньшими значениями ММ, исчезает фракция с $MM > 10\,000$, изменяется соотношение фракций — несколько уменьшается среднее эффективное значение ММ.

С помощью метода СГХ было установлено, что миграционная способность железа, связанного различными молекулярно-массовыми фракциями водорастворимых органических веществ, возрастает по мере уменьшения ММ исходных фракций. Обнаружено также перераспределение меченых ионов железа между фракциями органических веществ, особенно у комплексов, образованных низкомолекулярными фракциями. Высокомолекулярные фракции могут ограниченно мигрировать в почве, не подвергаясь процессам трансформации, и постепенно теряют свою подвижность. Показана важная роль в трансформации и миграции железа органических веществ с ММ 600—800 и рК 20—25 [13, 15]. Установлен сложный молекулярно-массовый состав питательного раствора в водных культурах. Внесение фульвокислот активно влияет на ассоциацию и образование органо-минеральных агрегатов в питательной смеси [4, 10, 21].

СГХ открывает широкие перспективы для изучения состава и свойств органо-ми-

неральных соединений [3, 7, 10, 16]. Этим методом выявлен сложный молекулярно-массовый состав органо-минеральных соединений, выделенных из сильноподзолистых остаточно-карбонатных легкосуглинистых почв Архангельской области. Показано, что соотношение между фракциями и абсолютные значения их ММ зависят от генезиса почвенного горизонта, сельскохозяйственного использования и степени гидроморфности подзолистых почв. Общее содержание двух и трехвалентных катионов в составе металлоорганических соединений зависит от состава и свойств органических веществ, генетического горизонта, степени гидроморфности и сельскохозяйственного использования почв [11].

Наиболее эффективно применение СГХ в сочетании с методом меченых атомов, оптической и атомно-абсорбционной спектроскопией, масс-спектроскопией и некоторыми другими видами хроматографии [3, 7].

Таким образом, СГХ — это современный метод физико-химического анализа, позволяющий комплексно изучать природу, состав и свойства многих групп и классов химических соединений, отдельных фракций и их компонентов.

Выводы

1. Рассмотрение адсорбционного, эксклюзионного и молекулярно-массового меха-

низмов гелевой фильтрации показывает, что при фракционировании минеральных, органических и органо-минеральных соединений необходимо применять систему гелей. Рекомендуются следующие наборы гелей: для минеральных соединений — G-10 и G-50, для гумусовых и органо-минеральных соединений — G-10, G-50 и G-200.

2. Система гелей позволяет проводить хроматографию в оптимальных для проявления молекулярно-ситового механизма разделения условиях.

3. Применение системы гелей с взаимно перекрывающимися пределами разделений дает возможность за счет снижения адсорбционного эффекта повысить селективность хроматографического процесса и эффективность использования колонки.

4. Систематизированная гелевая фильтрация представляет собой современный метод физико-химического анализа, с помощью которого можно наиболее полно решать многие задачи, связанные с химическим состоянием и функциями почвы.

5. Наиболее эффективно применение систематизированной гелевой фильтрации в сочетании с методом меченых атомов, атомно-абсорбционной спектроскопией, масс-спектрометрией и другими методами физико-химического анализа.

ЛИТЕРАТУРА

1. Виленчик Л. З. Исследование в области теории гель-проникающей хроматографии полимеров. — Автореф. канд. дис. Л., 1974. — 2. Детерман Г. Гель-хроматография. М.: Мир, 1970. — 3. Карпухин А. И. Исследование взаимодействия фульвокислот и ионов железа методом радиоактивных индикаторов. — Автореф. канд. дис. М., 1970. — 4. Карпухин А. И. Влияние фульвокислот на урожай некоторых сельскохозяйственных растений. — Изв. ТСХА, 1979, вып. 2, 78—87. — 5. Карпухин А. И., Кулчаев Э. И. Сравнительное гель-хроматографическое исследование фракций гумусовых кислот. — Изв. ТСХА, 1978, вып. 4, с. 94—101. — 6. Карпухин А. И., Фокин А. Д. Хроматографическое фракционирование фульвокислот. — Изв. ТСХА, 1969, вып. 5, с. 139—145. — 7. Карпухин А. И., Родионова Л. П., Гайсин В. Ф., Горюковенко А. Н. Гель-хроматография в изучении солонцовых почв. — В сб.: Науч. основы и практ. приемы повышения плодородия почв южного Урала и Поволжья. Уфа, 1982, с. 41—42. — 8. Карпухин А. И., Фокин А. Д. Применение гелевой хроматографии для определения молекулярной массы фульвокислот. — Изв. ТСХА, 1970, вып. 5, с. 131—136. — 9. Карпухин А. И., Фокин А. Д. Фракционный состав фульвокислот некоторых типов почв. — Изв. ТСХА, 1971, вып. 3, с. 126—130. — 10. Карпухин А. И., Фокин А. Д. Применение гелевой хроматографии для изучения фульвокислот и железосульфатных соединений. — В сб.: Особенности почв. процессов дерново-подзолистых почв. М.: ТСХА, 1977, с. 102—114. — 11. Карпухин А. И., Платонов И. Г., Ше-

стакон Е. И. Органо-минеральные соединения подзолистых остаточно-карбонатных легкосуглинистых почв Архангельской области. — Почвоведение, 1982, № 3, с. 37—45. — 12. Каспаров С. В., Тихомиров Ф. А. Выбор элюентных систем для гель-фильтрации гумусовых кислот чернозема. — Вестник МГУ, сер. Почвоведение, 1978, № 4, с. 33—39. — 13. Кауричев И. С., Карпухин А. И., Степанова Л. П. Изучение водорастворимых железоорганических соединений подзолистых и дерново-подзолистых почв. — В сб.: Особенности почв. процессов дерново-подзолистых почв. М.: ТСХА, 1977, с. 5—21. — 14. Кауричев И. С., Карпухин А. И., Степанова Л. П. О природе водорастворимых железоорганических соединений почв таежной зоны. — Почвоведение, 1977, № 12, с. 10—19. — 15. Кауричев И. С., Карпухин А. И., Степанова Л. П. Водорастворимые железоорганические соединения почв таежно-лесной зоны. — В сб.: Проблемы почвоведения. М.: Наука, 1978, с. 73—79. — 16. Кауричев И. С., Карпухин А. И., Степанова Л. П. Изучение состава и устойчивости водорастворимых железоорганических комплексов. — Почвоведение, 1979, № 2, с. 39—52. — 17. Кауричев И. С., Фокин А. Д., Карпухин А. И. Водорастворимые органо-минеральные соединения почв таежно-лесной зоны. — Докл. ТСХА, 1978, вып. 243, с. 35—42. — 18. Печковский В. В., Черчес Г. Х., Кузьменков М. И. Гель-хроматография конденсированных фосфатов. — Усп. химии, 1975, т. XIV, вып. 1, с. 172—190. — 19. Рачинский В. В. Введение в общую теорию динамики сорбции и хроматографии. М.: Наука,

1964. — 20. Степанова Л. П., Кауричев И. С., Карпухин А. И. Исследование водорастворимых органических веществ и природных вод методом гель-хроматографии. — Изв. ТСХА, 1976, вып. 6, с. 97—105. — 21. Фокин А. Д., Карпухин А. И. Исследование состава комплексных соединений фульвокислот с железом. — Изв. ТСХА, 1972, вып. 1, с. 132—137. — 22. Фокин А. Д., Карпухин А. И. Исследование гумификации растительных остатков и превращений гумусовых веществ в почве с использованием изотопа ^{14}C . — Почвоведение, 1974, № 11, с. 72—

78. — 23. Flodin P. — Dextrangels and their application in gel filtration. Dissertation. A. B. Pharmacia, Uppsala, Sweden, 1962. — 24. Lanrent T. C., Killander I.-J. Chromatog., N 14, 1964, p. 317—330. — 25. Lindguist I. — Acta Chem. Scand., vol. 29, N 9, 1967, p. 2564—2569. — 26. Porath I. — J. appl. Chem., N 6, 1963, p. 223—224. — 27. Söchtig Horst. — Landbanfoisch vöikeurode, 1966, Bd 16, N 1, S. 25—30.

Статья поступила 2 декабря 1982 г.

SUMMARY

Systematized gel filtration is shown to permit higher selectiveness of the chromatographic process and effectiveness of columns utilization. Application of gel system with inter-covering deviations limits allows to solve many structural and functional soil problems. Application of systematized gel chromatography combined with other modern physical-and-chemical analysis methods is especially efficient.