

УДК 631.472.56:543.54

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ГЕЛЬХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ФРАКЦИЙ ГУМУСОВЫХ КИСЛОТ

КАРПУХИН А. И., КУЛЧАЕВ Э. М.

(Кафедра почвоведения)

В настоящее время для фракционирования и определения молекулярных масс многих высокомолекулярных органических веществ, в том числе и гумусовых кислот, широко используется метод гельхроматографии на декстрановых гелях типа сефадекс. Эти исследования [3, 4, 6—8, 10, 12—15, 17—20] показали, что гумусовые кислоты — гуминовые и фульвокислоты, неоднородны по молекулярной массе, их кривые элюции имеют 2—3 пика, при этом молекулярные массы гуминовых кислот значительно выше, чем фульвокислот.

Полученные разными авторами абсолютные значения молекулярных масс и соотношения фракций значительно различаются между собой. Это можно объяснить как несопоставимостью условий выделения и очистки гумусовых веществ, так и различиями условий проведения гельхроматографии (параметры гелевой колонки, рН, ионная сила, концентрация элюента и т. д.). Кроме того, нельзя признать абсолютные величины молекулярных масс гумусовых кислот, определяемых гельхроматографическим методом, достаточно близкими к истинным их значениям, поскольку при этом допускается целый ряд условностей. Данным методом на сефадексах можно определить молекулярную массу только тех веществ, молекулы которых имеют однородный молекулярный состав и полностью совпадают по геометрической форме с молекулами веществ, применяемых для калибрования гелевых колонок. Толщина гидратных оболочек у исследуемых молекул и молекул стандартных веществ должна быть при гельхроматографии в водной среде одинаковой. Но геометрическая форма молекул гумусовых кислот неоднородна и значительно отличается от формы частиц глобулярных белков и частиц декстранов, обычно употребляемых для калибрования гелевых колонок. Нет также доказательств равенства толщины гидратных оболочек молекул гумусовых и стандартных веществ [1, 5, 11, 12]. Подтверждением этому служат результаты исследования гуминовых кислот с применением гельхроматографии (сефадексы G-100 и G-200) и ультрацентрифугирования [15], показавшего, что применяемыми сефадексами во внешний объем исключаются молекулы массой 70 000—90 000, несмотря на то, что при калибровке колонок с этими гелями при использовании декстранов предел исключения составляет соответственно 100 000 и 200 000, а при помощи глобулярных белков — 150 000 и 300 000.

Одним из важных условий определения молекулярных масс на гелевых колонках является отсутствие взаимодействия между фракционируемым веществом и матрицей геля. В действительности молекулы гумусовых кислот, как всякие шестичленные ароматические системы, взаимодействуют с матрицей геля [5], что доказывается образованием налета гумусовых веществ в верхней части колонки с сефа-

дексом при ее многократном использовании. На сефадексах необратимо сорбируется от 6 до 32,5% первоначального количества вещества гуминовых кислот [15].

Значительную информацию можно получить путем применения этого метода для фракций, полученных на основе функциональных различий между молекулами в смеси гуминовых или фульвокислот. Удачное применение гелъхроматографии на геле сефадекса G-50 при исследовании гумусовых веществ позволило обнаружить фракцию P_g в смеси гуминовых кислот [18]. Другими примерами удачного применения являются использование сефадекса G-50 для установления оптической неоднородности фракций свободных, а также связанных бурых и серых гуминовых кислот [16] и деление на сефадексе G-25 фракций фульвокислот, полученных методом колоночной хроматографии на полиамидной смоле [20].

Большое теоретическое и практическое значение имеет сравнительное изучение химической природы гумуса разных по генезису и сельскохозяйственному использованию почв. Значительную информацию при этом можно получить при использовании метода гелъхроматографии на декстрановых гелях.

В настоящем сообщении излагаются результаты сравнительного гелъхроматографического исследования на сефадексах узких, предварительно полученных другим методом фракций гуминовых и фульвокислот. Работа проводилась с целью выяснения различий по условной молекулярной массе между фракциями гуминовых и фульвокислот, полученных из разных по генезису и сельскохозяйственному использованию почв. Предстояло также установить, в какой мере эти величины согласуются с другими физико-химическими характеристиками данных фракций, приводимыми в нашей предыдущей работе [9].

Объекты и методы исследований

Гумусовые препараты были получены из образцов следующих почв: 1) чернозема типичного среднесуглинистого (целина и пашня более 60 лет), глубина 0—25 см; Центрально-черноземный заповедник им. В. В. Алехина, Стрелецкая степь; 2) дерново-подзолистой среднесуглинистой, глубина 0—20 см; Лесная опытная дача (целина) и 9-польный севооборот кафедры растениеводства Тимирязевской академии (пашня более 60 лет).

Гумус из образцов почв извлекали методом Тюрина после декальцирования. Для осаждения минеральных коллоидов в вытяжках применялся коагулянт Na_2SO_4 .

Полученные вытяжки были разделены на фракции по методу Вильямса [2]. Препараты собственно гуминовых и ульминовых кислот были очищены по методу Вильямса, а фракции фульвокислот — сначала по В. В. Вильямсу, а далее на колонке с карбоксиметил-целлюлозой, имеющей Н-форму. В настоящей работе приводятся результаты исследований только тех препаратов, которые получены из вытяжки, извлеченной многократным экстрагированием 0,1 н. NaOH после декальцирования. Для гелъхроматографических колонок применяли следующие марки сефадексов: для разделения собственно гуминовых и ульминовых кислот — G-75 и G-150, а для фракций фульвокислот — G-50. Размер колонок $50 \times 2,5$ см. Изучаемые вещества наносили на колонки в виде растворов в 0,1 н. NaOH.

Элементный состав определяли на автоматическом анализаторе CHN (ЧССР). Кислород вычисляли по разности. Брутто-формулу рассчитывали так, чтобы в каждой формуле было по одному атому азота (элементарная ячейка Орлова). Зольность препаратов <3%.

Спектры электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) записывали на приборе РЭ-1306. Вещество вводили в сухом растертом состоя-

нии. Концентрацию парамагнитных центров рассчитывали в сравнении со стандартом — α , α -дифенил- β -пикрилгидразилом. Форму кривой сигнала ЭПР принимали за форму кривой Лоренца.

Фракционирование на гелях

При гельхроматографии выходные кривые препаратов фракций имеют по одному пику в начале кривой и длинный «хвост» (рис. 1) без заметных максимумов. Как в целинном черноземе, так и в целинной дерново-подзолистой почве значительная часть хроматографируемого вещества выходит со свободным объемом и имеет молекулярную массу $> 150\,000$. В пахотных вариантах обеих почв количество этой фракции значительно уменьшается, хотя у большей части вещества коэффициент распределения (K_d) < 0 , что указывает на присутствие веществ с молекулярными массами (M) $> 150\,000$.

Как видно на рис. 1, в левой части кривой элюции максимумы не выражены, однако неоднородность молекул ясно проявляется в графике изменения отношения E_{465}/E_{650} . Причем максимумы и минимумы на графиках для фракции собственно гуминовых кислот из разных почв генезису и сельскохозяйственному использованию почв совпадают. Абсолютные значения этого показателя для препаратов фракции собственно гуминовых кислот независимо от их происхождения также близки. Для всех препаратов характерна общая тенденция изменения коэффициента цветности в ходе фракционирования: сначала выходят фракции с меньшими его значениями, т. е. наиболее конденсированные, затем значения возрастают, но в самом конце фракционирования вновь снижаются. Выход в последнюю очередь фракций, имеющих низкое значение показателя E_{465}/E_{650} , можно объяснить либо высокой конденсированностью молекул этой фракции, несмотря на их относительно небольшие размеры, либо возможным нарушением молекулярно-ситового эффекта из-за повышенного сродства этих высокомолекулярных частиц и матрицы геля, вызывающего задержку их в процессе элюции.

Фракционирование собственно гуминовых кислот из целинных вариантов чернозема и дерново-подзолистой почвы на колонке с гелем сефадекса G-75 показало, что вещество препаратов почти полностью выходит в свободном объеме и кривые отношения E_{465}/E_{650} у обоих препаратов имеют несколько пиков, причем они располагаются очень близко и параллельно друг к другу.

При гельхроматографии ульминовых кислот в отличие от собственно гуминовых на всем протяжении выходных кривых $K_d > 0$. Другим отличием является выделение во фракции ульминовых кислот трех близких по молекулярным массам и по своему содержанию фракций, образующих на кривых элюции один пик с двумя уступами по обеим сторонам. Здесь, как и в случае собственно гуминовых кислот, препараты, полученные из разных по генезису и сельскохозяйственному использованию почв, весьма сходны по молекулярно-массовому распределению и некоторым физико-химическим свойствам.

Если неоднородность препаратов фракций ульминовых кислот по массам молекул практически отсутствует, то неоднородность по степени конденсированности, как и у препаратов собственно гуминовых кислот, проявляется более заметно. Графики препаратов различного происхождения имеют много общего по характеру изменения и абсолютной величине отношения E_{465}/E_{650} . У препаратов ульминовых кислот в отличие от препаратов фракций собственно гуминовых кислот величина этого отношения возрастает только до половины кривой, а затем постепенно снижается. Такая форма кривой, по-видимому, обуславливается теми же причинами, что и в случае собственно гуминовых

кислот. Следует также отметить, что по форме кривые коэффициента цветности и абсолютные величины этого показателя близки аналогичным кривым и соответствующим значениям, приводимым К. Домке [17] для фракций гуминовых кислот: собственно гуминовые кислоты близки «серым», а ульминовые — «бурым» гуминовым кислотам. Исходя из этого, а также учитывая близость между ними по элементному составу, молекулярным массам, растворимости в горячей воде

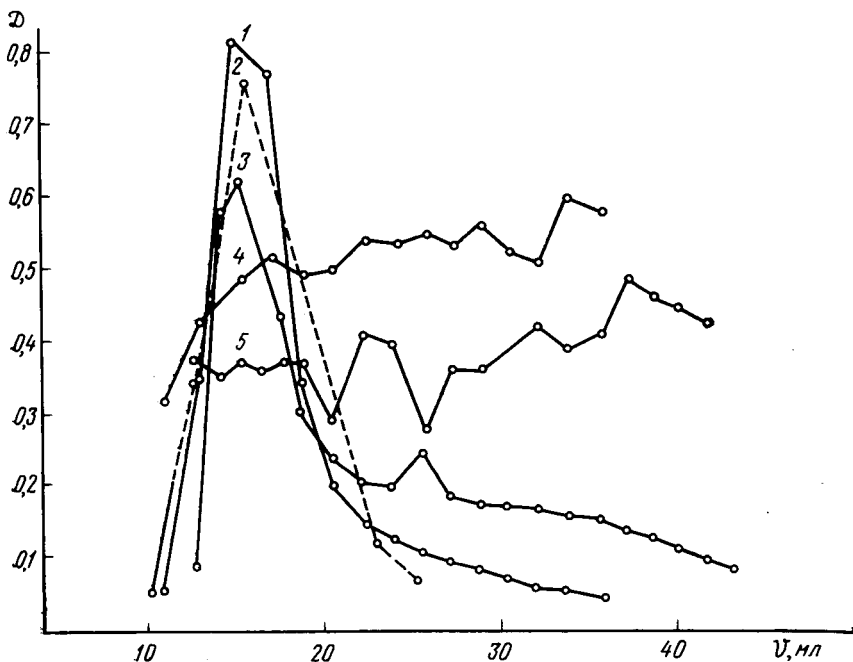


Рис. 1. Кривые элюции и изменения отношения E_{465}/E_{650} препаратов собственно гуминовых кислот на сефадексе G-75. 1 и 4 — дерново-подзолистая почва, целина; 2 — голубой декстран; 3 и 5 — чернозем, целина.

можно заключить, что по химической природе собственно гуминовые кислоты сходны с «серыми» гуминовыми, а ульминовые — с «бурыми» гуминовыми кислотами, полученными К. Домке [17].

При гельхроматографии фульвеновых кислот графики элюции (рис. 2) представляют собой пологие симметричные кривые типа кривых нормального распределения. Выходные кривые имеют только одну вершину, местоположение которой несколько иное, чем у препаратов из разных почв. У веществ этих препаратов $K_d > 0$ и $MM < 10\,000$. При фракционировании на геле препараты фульвиновых кислот так же, как и фульвеновых, имеют симметричные кривые с одной вершиной, причем местоположение ее у всех препаратов примерно одинаковое. У препаратов этой фракции, как и у предыдущей, $K_d > 0$ и $MM < 10\,000$.

При гельхроматографии лигнофульвоновых кислот высокомолекулярная фракция уже близка пределу исключения сефадексом G-50. Кривые у всех препаратов имеют несколько асимметричную форму с «хвостом» в левой части графика. Местоположения максимумов на графиках этих препаратов почти совпадают, что указывает на сходство их молекулярно-массового распределения.

Определение молекулярных масс гумусовых кислот

Наиболее высокими молекулярными массами, по данным гельхроматографии, характеризуются обе изучаемые фракции гуминовых кис-

лот. Однако эти фракции не удается четко разделить по молекулярной массе.

Большая часть молекул препаратов собственно гуминовых кислот, выделенных из всех изучаемых нами почв независимо от их генезиса и сельскохозяйственного использования, при фракционировании на хроматографической колонке с гелем сефадекса G-150 выходит со свободным объемом. В вариантах с препаратами, выделенными из

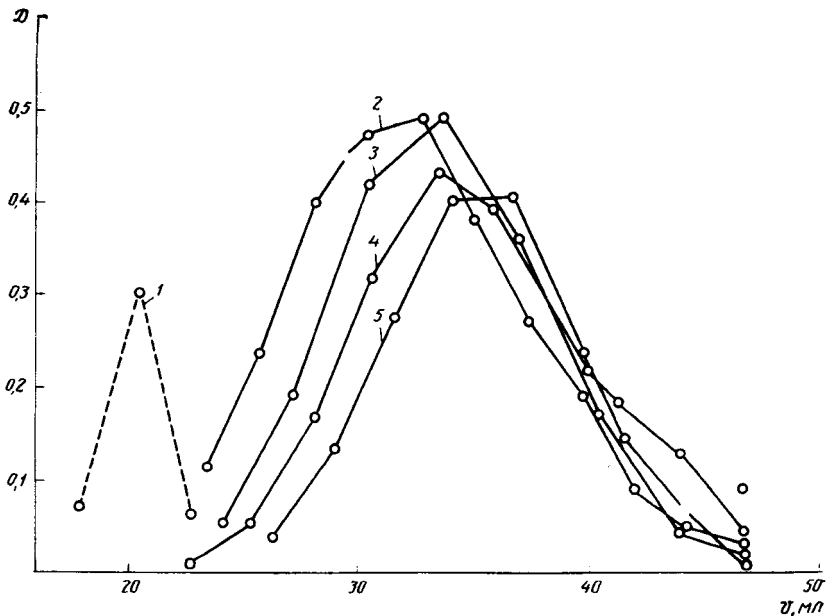


Рис. 2. Кривые элюции фульвиновых кислот на сефадексе G-50. 1 — голубой декстран (ММ 2 млн.); 2 — дерново-подзолистая целина; 3 — чернозем, целина; 4 — чернозем, пашня; 5 — дерново-подзолистая почва, пашня.

чернозема, элюируется фракция с ММ 132 000—116 000, а в вариантах дерново-подзолистой почвы фракция с ММ 89 000—85 000 и, наконец, фракция с ММ 81 000—87 000, близкой по величине для всех исследуемых препаратов гуминовых кислот. Эти величины подтверждаются тем, что изучаемые фракции целиком выходят со свободным объемом при фракционировании гумусовых веществ на сефадексе G-75.

Согласно литературным данным [5] предел исключения сефадекса G-150 для глобулярных белков составляет 400 000, а для декстранов — 150 000. При расчетах мы исходили из последней цифры, так как молекулы гуминовых кислот не имеют строго глобулярной формы и по конфигурации близки декстранам.

Выходные кривые гельхроматографии препаратов ульминовых кислот имеют по одному пику и по два плеча с обеих его сторон, ММ 67 000—84 000. Молекулярные массы фракций, соответствующих плечам на кривой элюции, мало отличаются от приведенной выше, и точные значения их не удается определить, поскольку эти фракции четко не отделились от средней фракции и не дали пиков.

Фракция ульминовой кислоты, имеющая меньшее значение молекулярной массы, определяемой на сефадексе G-150, характеризуется большим значением молекулярной массы одной элементарной молекулярной ячейки, вычисленной на основе брутто-формулы.

При сравнении значений молекулярных масс, определенных методом гельхроматографии, и чисел парамагнитных центров, приходящихся на одну молекулу, видно, что величины последних уменьшаются в ряду фракций от собственно гуминовой к ульминовой кислоте, как и значения первых. Наибольшие абсолютные значения этого показателя

Оценка молекулярных масс фракций гуминовых кислот

Фракция	Брутто-формула	Значение молекулярной массы		Число парамагнитных центров на 1 молекулу (по данным гельхроматографии)	E_{465}/E_{610} в максимуме кривой элюции
		на 1 элементарную молекулярную ячейку	по данным гельхроматографии		
Чернозем, целина					
СГК	$C_{12}H_{12}O_6N$	266	>150 000	1,98	3,24
			132 000	1,74	3,27
			84 000	1,11	3,38
УК	$C_{16}H_{16}O_9N$	366	78 000	1,02	7,10
Чернозем, пашня					
СГК	$C_{12}H_{13}O_6N$	267	>150 000	3,15	3,24
			116 000	2,43	3,39
			81 000	1,69	3,37
УК	$C_{15}H_{13}O_9N$	353	67 000	0,68	8,07
Дерново-подзолистая почва, целина					
СГК	$C_{11}H_{14}O_6N$	256	>150 000	1,55	4,41
			89 000	0,92	4,53
			87 000	0,89	4,71
УК	$C_{19}H_{25}O_{10}N$	424	84 000	0,49	8,18
Дерново-подзолистая почва, пашня					
СГК	$C_{11}H_{13}O_5N$	339	>150 000	1,60	3,80
УК	$C_{17}H_{21}O_9N$	383	85 000	0,91	3,96
			78 000	0,55	7,61

Примечание. СГК и УК — фракции соответственно собственно гуминовых и ульминовых кислот.

имеют фракции, извлеченные из обоих вариантов чернозема, что, по-видимому, связано с некоторыми особенностями физического состояния молекул, так как по элементному составу сравниваемые вещества мало различаются между собой. Эти различия могут быть объяснены, в свою очередь, особенностями почвообразования в зонах, где сформированы исследуемые почвы.

Важно также отметить, что на одну молекулу фракции, у которой $MM > 150\,000$, собственно гуминовой кислоты, выделенной из чернозема пахотного, приходится в 1,5 раза больше парамагнитных центров, чем в аналогичной фракции из целинного варианта.

У фракций фульвокислот значения молекулярных масс меньше — от 3800 до 7600, чем у гуминовых. Наибольшей молекулярной массой отличаются препараты лигнофульвоновых кислот — у этой фракции она в 1,5 раза больше, чем у фракции фульвеновых кислот. У фракции фульвиновых кислот большинства почв молекулярная масса близка соответствующей величине фракции лигнофульвоновых кислот. Молекулярные массы фульвокислот, вычисленные по данным ЭПР-спектрокопии, имеют очень большие абсолютные значения, но они, по-видимому, не могут быть выше значений, определяемых методом гельхроматографии, и поэтому далеки от истинных. Вероятно, не каждая молекула фульвокислот имеет парамагнитный центр, поскольку число этих центров на единицу массы вещества в десятки раз меньше, чем число молекул. Количество молекул, приходящихся на один парамагнитный центр, у фракции фульвеновой кислоты больше, чем у двух остальных фракций. Эта фракция, по всей вероятности, является менее зрелой, так как количество парамагнитных центров выше у более зрелых гумусовых веществ [1]. Кроме того, фульвокислоты, у которых абсолютный возраст, определяемый радиоуглеродным методом, мень-

Оценка молекулярных масс фракций фульвокислот

Фракция	Брутто-формула	Значение молекулярной массы		Количество молекул на 1 парамагнитный центр
		на 1 элементарную молекулярную ячейку	по данным гель-хроматографии	
Чернозем, целина				
ФЕК	$C_{12}H_{16}O_{12}N$	366	4100	840
ФИК	$C_{14}H_{31}O_{14}N$	437	6500	131
ЛФК	$C_{11}H_{17}O_8N$	291	6400	520
Чернозем, пашня				
ФЕК	$C_{12}H_{15}O_{12}N$	365	4200	670
ФИК	$C_{17}H_{36}O_{15}N$	494	6000	127
ЛФК	$C_{11}H_{16}O_8N$	290	6400	206
Дерново-подзолистая почва, целина				
ФЕК	$C_{11}H_{16}O_{10}N$	322	3800	1267
ФИК	$C_{12}H_{17}O_{12}N$	367	6600	363
ЛФК	$C_{10}H_{16}O_8N$	278	7600	337
Дерново-подзолистая почва, пашня				
ФЕК	$C_{12}H_{16}O_{11}N$	350	4000	716
ФИК	$C_{14}H_{16}O_{13}N$	406	5000	370
ЛФК	$C_{11}H_{16}O_8N$	290	7600	270

Примечание. ФЕК, ФИК и ЛФК — фракции соответственно фульвеновых, фульвиновых и лигнофульвоновых кислот.

ше, чем у гуминовых кислот, отличаются и меньшим количеством парамагнитных центров. С увеличением абсолютного возраста гумусовых веществ усложняется их строение и возрастает число парамагнитных центров. Возможно, этим объясняется меньшее, чем у гуминовых кислот, содержание свободных радикалов в фульвокислотах. В почве, достигшей равновесного состояния, когда количество вновь образующегося гумуса равно количеству минерализовавшегося за это же время, по-видимому, обновление центральных частей гуминовых кислот с повышенным содержанием парамагнитных центров практически отсутствует. При длительном сельскохозяйственном использовании почв предполагается полное исчезновение наиболее подвижных и подверженных минерализации фульвокислот, однако этого не происходит. Соотношение между гумусовыми кислотами в большинстве случаев мало изменяется, так как часть гуминовых кислот и даже гумина может перейти во фракции фульвокислот. Однако эти фракции фульвокислот не отличаются от фульвокислот, полученных из целинных почв, по содержанию парамагнитных центров. Это, на наш взгляд, возможно, поскольку при превращении гуминовых кислот в фульвокислоты их молекулы расщепляются, свободные радикалы дестабилизируются и парамагнитные центры элиминируются.

Выводы

1. Из препаратов собственно гуминовых кислот выделено по 3 фракции с пределами значений ММ 150 000—75 000. Ульминовые кислоты и фракции фульвокислот разделить на фракции не удалось.

2. По величине молекулярных масс фракции гумусовых кислот, выделенных из почв, можно расположить в следующий ряд: собственно фульминовые > ульминовые > лигнофульвоновые \geq фульвиновые > фульвеновые. При этом бо́льшая часть молекул собственно гуминовых кислот имеет ММ > 150 000.

3. Препараты фракций ульминовых кислот по сравнению с другими гумусовыми кислотами имеют наиболее однородный молекулярно-массовый состав с пределами значений ММ от 84 000 до 67 000.
4. Фракции фульвокислот значительно различаются по величине молекулярных масс. Максимальна она у фракции лигнофульвоновых кислот (ММ = 7600—6400), минимальна — у фракции фульвоновых кислот (ММ = 4200—3800).
5. При спектрофотометрическом исследовании обнаружен неоднородный состав фракций гуминовых кислот по степени ароматичности, обусловленный разным соотношением ароматических и алифатических частей в составе их молекул.
6. Применение спектроскопий электронного парамагнитного резонанса выявило, что фракции гумусовых кислот содержат в сотни раз больше парамагнитных центров, чем фракции фульвокислот. При этом наименьшее количество парамагнитных центров обнаружено во фракциях фульвоновых кислот.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алиев С. А., Касимов Р. М. Парамагнитные свойства органических веществ почв. Баку, «ЭЛМ», 1972. — 2. Вильямс В. В. Разделение и количественное определение перегнойных кислот почвы. «Изв. ТСХА», 1965, вып. 2, с. 126—141. — 3. Вишняков А. П., Левина В. И., Семенов В. А. Материалы фракционирования на пористых декстрановых гелях гуминовых кислот почв разной степени окультуренности. Тез. докл. IV Всесоюз. делегат. съезда почвоведов, кн. 2, 4, 1, Алма-Ата, 1971. — 4. Ганжара Н. Ф. Фракционирование гумусовых веществ почв методом гелевой фильтрации. «Докл. ТСХА», 1969, вып. 149, с. 95—101. — 5. Детерман Г. Гельхроматография. М., «Мир», 1970. — 6. Дубин В. Н., Фильков В. А. Фракционирование гуминовых кислот некоторых почв Молдавии фильтрацией через сефадексы. «Почвоведение», 1968, № 5, с. 85—93. — 7. Евсеева Р. П., Кауричев И. С., Ноздрунова Е. М., Рышка Ф. Ю. Применение гелевой фильтрации (сефадексов) для разделения водорастворимых органических веществ почвы. «Изв. ТСХА», 1968, вып. 3, с. 124—131. — 8. Карпухин А. И., Фокин А. Д. Применение гелевой хроматографии для определения молекулярной массы фульвокислот. «Изв. ТСХА», 1970, вып. 5, с. 131—136. — 9. Кулчаев Э. М. Электронные и колебательные спектры поглощения гуминовых кислот. «Изв. ТСХА», 1978, вып. 2, с. 115—123. — 10. Найденова О. А., Андроничева Л. Е. Сравнительная характеристика фульвокислот основных типов почв СССР методом гельфильтрации. Зап. Лен. с.-х. ин-та, т. 165, вып. 2, с. 56—60. — 11. Олгелт К. Х., Мур Дж. С. Гель-проникающая хроматография. В кн.: Фракционирование полимеров. М., «Мир», 1971, с. 110—159. — 12. Орлов Д. С. Гумусовые кислоты почв. МГУ, 1974. — 13. Орлов Д. С. и др. Молекулярные веса, размеры и конфигурация частиц гумусовых кислот. «Почвоведение», 1971, № 11, с. 43—57. — 14. Степаненко Л. С. Исследование гуминовых кислот методом гельхроматографии. Автореф. канд. дис. Владивосток, 1975. — 15. Bailly I. R., Margulis H. «Plant and Soil», 1968, vol. 29, N 3, p. 343—361. — 16. Domke K. «Arch. Acker- u. Pflanzenbau u. Bodenkunde», 1972, Bd 16, H. 1, S. 3—11. — 17. Gyorgy F., Laslo T. «Agrokem. es talaj.», 1974, N 1—2, p. 343—361. — 18. Kumada K., Sato O. «Soil and Plant Food», 1962, vol. 8, N 31, p. 2. — 19. Schnitzer M., Skinner S. I. M. Isotopes and Radiation in soil organic-matter studies. Vienna, 1968, p. 41—55. — 20. Sequi P., Guidi G., Petruzzelli G. «Agrochimica», XVI, N 3, 1973.

Статья поступила 18 ноября 1977 г.

SUMMARY

A comparative gelchromatographic study of humic and fulvic acid fractions isolated from virgin and cultivated chernozem and soddy medium podzolic soils by Williams method has been conducted. According to the value of molecular masses the fractions of humic acids may be arranged in the following order: true humic > ulmic > lignofulvonic > fulvinic > fulvenic.

The fraction of true humic acids has been separated on the sephadex G-150 into 3 fractions with molecular masses > 150000, 132000—116000 and 87000—81000.

Each curve of elution of ulmic acid materials has one peak corresponding to molecular mass 84000—67000 and two arms on both sides of the peak. The fractions of fulvic acids could not be separated on the sefadex G-50. Molecular mass of lignofulvonic fraction is 7600—6400, that of fulvinic acid — 6600—5000, and that of fulvenic acid — 4200—3800.