

A gélszűrési kromatográfia módszere és felhasználása a talaj humuszanyagainak vizsgálatánál

Nagy molekulájú anyagkeverékek szétválasztására újabban széles körben használják a *géliszűrés* vagy *gélkromatográfia* módszerét, mely mintegy 15 éve, PORATH és FLODIN [23] munkássága révén vált általánosan ismertté. Gyakorlati kivitelezése megegyezik az oszlopkromatográfia technikájával, álló fázisként azonban — adszorbeáló vagy ioncserélő anyag helyett — a vízoldható dextrán epiklórhidrinrel térhálósított változatát használják, mely vízben nem oldódik, de vízfelvétellel könnyen gél képez. A térhálót alkotó keresztkötések számát, így a géltre jellemző pórusméretet a gyártás során szabályozni lehet.

A molekulaszűrésre használt anyagok közül (Sephadex G, Sepharose B, Bio-gél P, Bio-gél A stb.) a Sephadex készítmények a legelterjedtebbek, így a módszerrel kapcsolatos fontosabb megállapításokat ezen anyagokra vonatkoztatva ismertetjük.

A módszer elve

A duzzasztott géllal megtöltött oszlopon (gélágy) végzett eluciós kromatográfia a gélzemcsék pórusméretével összefüggő *molekulaszűrő képességen* alapszik, melynek eredményeként az eltérő molekulásúlyú komponensek egymástól elkülönülnek. A tapasztalat szerint az eluátumban a legnagyobb molekulákból álló frakció jelenik meg először, majd rendre a kisebb molekulaméretű csoportok. A folyamat sémáját az 1. ábra mutatja.

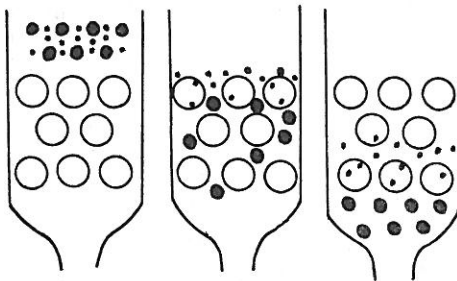
Mivel a molekulaszűrés a gél szerkezet és a molekulák fizikai, s kémiai kölcsönhatása révén jön létre, a szűrőhatást lényegesen befolyásolja a gélzemcsék keresztkötéseinek száma és térbeli elhelyezkedése.

A keresztkötések számától függően megkülönböztetik a szabályosabb térhálózati, több keresztkötést tartalmazó *tömött* és a kevésbé térhálós *laza* típusú géleket. E géltípusok tulajdonságai sok

tekintetben eltérnek. A tömött gélek (G-10, G-25, G-50) vízfelvételi képessége és duzzadása kisebb, mint a laza (G-200), vagy a közbeeső típusúaké (G-75, G-100). A vízfelvételi képesség (1 g száraz gél által felvehető víz mennyisége) pedig a dextrán gél fontos jellemzője, mely a kereskedelmi elnevezésekben is kifejezésre jut. (Így a G-25 grammonként 2,5 g; a G-100 pedig 10 g vizet képes felvenni). Ennek megfelelően a gél fajlagos térfogata (1 g xerogél duzzadás utáni ml-einek száma) mind egyik fajtánál más és más. Fentiekkel összefüggésben a laza szerkezetű gélek tökéletes vízfelvételéhez lényegesen több idő (a gyakorlatban 2—3 nap) szükséges.

Az eluáló folyadék átfolyási sebessége viszont a tömöttebb géleknél nagyobb. Az átfolyási sebességet bizonyos mértékig befolyásolni lehet a hidrosztatikus nyomással. A tömött és laza szerkezetű gélek azonban ebben a vonatkozásban is eltérően viselkednek. A lazább gél szerkezet ugyanis adott nyomás elérésekor némileg deformálódik, s ez akadályozza az áramlási sebesség további növekedését, illetve az áramlás nagymértékben csökkenhet. Ez a hatás a tömött géleknél jelentéktelen.

Az átfolyási sebesség növelése érdekében ma már gyöngy alakban hozzák forga-



1. ábra

A gélszűrési folyamat sémája az elució különböző fázisaiban

lomba a készítményeket. (A *fine* jelű termékek 20–80 mikrométer, a *coarse* jelűsűek pedig 100–300 mikrométer átmérőjű szemcsékből állnak).

A géliszűrés elméletei

A géliszűrés mechanizmusának felderítésére irányuló törekvések az eljárás gyakorlati alkalmazásával csaknem egyidőben megindultak. Az idevonatkozó elméletek döntő többségét két csoportba — volumetrikus és kinetikus elméletek csoportjába — lehet sorolni.

A *volumetrikus modellek* nem vizsgálják a gél és a különböző méretű molekulák közötti erőhatásokat. FLODIN és GRANATH [11, 12] szerint egy anyagkeverék szétválasztásának lehetőségét elsősorban a duzzasztott poliszacharid váz térhálózata, szerkezeti adottságai szabják meg. Így a gélággal egyensúlyban levő oldatból a gél szemcsék pórusméreténél kisebb molekulák behatolnak a gél fázisba, a nagyobb molekulákat viszont a gél kizárja, s ezek az oldószer áramlásakor viszonylag hamar leoldódnak.

A leggyakrabban használt Sephadex készítmények frakcionálási zónája, peptidok és globuláris fehérjék esetén, a következő: G-10 (–700); G-25 (1000–5000); G-50 (1500–30 000); G-75 (3000–70 000); G-100 (4000–150 000); G-150 (6000–400 000). A kevésbé térhálós szerkezetű gélekbe tehát nagyobb méretű molekulák képesek behatolni, s a frakcionálási sáv is tágabb.

Mivel a kísérletekből arra lehetett következtetni, hogy vizes közegben az elúciós térfogat — különböző átfolyási sebességek esetén is — közel állandó, feltételezték, hogy a diffúzió szerepe elhanyagolható és a *belső*, stacioner folyadékfázis (V_i), valamint a szemcsék között mozgó folyadékhányad (V_0) térfogata az eluálás folyamán nem változik.

Az oldott anyag megoszlása a külső és belső folyadékfázis között, egyensúlyi állapotban, a megoszlási kromatográfiában használatos K_d megoszlási hányadosal jellemezhető. Egyetlen kikötés, hogy a gél szemcsék belsejében (az álló fázisban) az anyagkoncentráció nem lehet nagyobb, mint a mozgó fázisban. A géliszűrést tehát a megoszlási kromatográfia speciális határeseteként tárgyalják.

Figyelmen kívül hagyva a molekuláris kölcsönhatásokat, az oszlop teljes térfogatát (V_l) az alábbi térfogatelemek összege adja:

$$V_l = V_0 + V_i + V_g \quad (1)$$

ahol V_0 = a szemcsék között elhelyezkedő folyadék térfogata; *külső térfogat*; V_i = a duzzasztott szemcsék üregeinek térfogata; *belső térfogat* és V_g = a száraz gél térfogata.

Mivel a géliszűrésben a szűrőanyag saját térfogata nem vesz részt, az (1) egyenlet

$$V_l = V_0 + V_i \quad (2)$$

alakra egyszerűsíthető. A $V_0 + V_i$ tehát a gélágy effektív térfogata.

A V_0 és V_i értékeket meg lehet határozni kísérletileg, vagy számítással. A V_0 meghatározására a svéd Pharmacia cég által forgalomba hozott, 2 millió molekulasúlyú, kék színű „blue dextrán 2000” készítményt legcélszerűbb használni. A V_i -t pedig legegyszerűbben glükóz, vagy N-2,4 dinitrofenil aszparaginsav (sárga színű) oldat felhasználásával mérhetjük.

Másrészt a V_0 és V_i kifejezhető, mint

$$V_{01} = V_l - \frac{a}{d} (Sr + 1) \quad (3)$$

illetve

$$V_i = \frac{a \cdot Sr}{d} \quad (4) \text{ így}$$

számszerű értéküket (a szükséges állandók ismeretében) számítással is megközelíthetjük. A képletekben d = a duzzadt gél fajsúlyát: mg/ml, a = oszlop töltetét: g, $Sr = 1$ g száraz gél által reverzibilisen megkötött folyadék mennyiségét: g/g, és d = az eluáló folyadék fajsúlyát: g/ml, jelenti.

Az egyes frakciók eluálásához szükséges elúciós térfogatok (V_e) figyelembevételével kiszámíthatjuk a különböző anyagokra jellemző K_d volumetrikus megoszlási hányadosokat.

A volumetrikus megoszlási koefficiens és az elúciós térfogatok összefüggését a 2. ábra szemlélteti [19, 25]. Az ábrán feltüntetett szaggatott vonalak az elúciós csúcsok elméleti formáit mutatják, amelyek a gél szerkezetének, az ideálistól eltérő viselkedése következtében szimmetrikus görbévé torzulnak. A gyakorlatban vizsgált anyagkeverékek esetén pedig egybefonódó csúcsok, vagy szabálytalan hullámok is előfordulnak.

Látható, hogy a gél által teljesen kizárt anyagok ($K_d = 0$), a gélágy külső térfogatának megfelelő mennyiségű eluens át-bocsátása után megjelennek az eluátumban, azaz $V_e = V_0$; a gél belső térfogatát teljesen igénybevevő komponensek ($K_d = 1$) elúciós térfogata pedig egyenlő $V_0 + V_i$ -vel.

Ha a molekulák a gélzemesek belsejébe különböző mértékben tudnak behatolni (közbeeső K_d értékek), a

$$V_e = V_0 + K_d \cdot V_i \quad (5)$$

ahonnan

$$K_d = \frac{V_e - V_0}{V_i} \quad (6).$$

Amennyiben a $K_d > 1$, molekuláris kölcsönhatásokkal kell számolni.

A K_d tehát a gél és a molekula egymásra hatásának kifejezője, ezért nagy jelentőségű az oszlopról leoldott frakciók jellemzésében. Meg kell említeni, hogy ugyanazon anyag K_d értéke gél típusonként változó.

Két eltérő molekulaméretű anyag (K_{d1} és K_{d2}) elválasztási térfogata (V_s) nem más, mint az elúciós térfogatok különbsége, azaz

$$V_s = V_{e2} - V_{e1} \quad (7), \text{ vagy}$$

figyelembe véve az (5) egyenletet

$$V_s = (V_0 + K_{d2} \cdot V_i) - (V_0 + K_{d1} \cdot V_i)$$

melyből

$$V_s = (K_{d2} - K_{d1}) \cdot V_i \quad (8).$$

Az anyagok elválasztási lehetőségét tehát a megoszlatási hányadosok különbsége dönti el.

Az elválasztás feltétele, hogy a minta térfogata (V_m) kisebb legyen az elválasztási térfogatnál:

$$V_m \leq V_s.$$

Kedvező esetben a vizsgált minta térfogata a gélágy belső térfogatának 1/3-a legyen, azaz

$$V_m \cong 0,3 \cdot V_i.$$

LAURENT és KILLANDER [20, cit. 29] molekuláris modellje a dextránvázú polimert egyenes, merev pálcikákból álló, szabálytalan térhálós szerkezetű anyagnak tekinti. A merev szálak hosszúságát, s elhelyezkedését statisztikus eloszlás határozza meg. Mivel a V_x térfogatú duzzadt gél fázisban folyadékáramlás gyakorlatilag nincs, az oldott anyag és az eluáló folyadék lefelé mozgása kizárólag a V_0 térfogatú folyadékfázisban történik. Feltételezik, hogy az oszlopra vitt minta molekulái a gél üregeinek csak egy részét (K_{av}) tudják kitölteni. Ez az elképzelés tehát elsősorban abban különbözik FLODIN és GRANATH fent említett modelljétől, hogy a V_i belső térfogat helyett a duzzadt gél teljes (V_x)

térfogatával számol (melynek csak egy hányadát képesek igénybe venni az oldott molekulák).

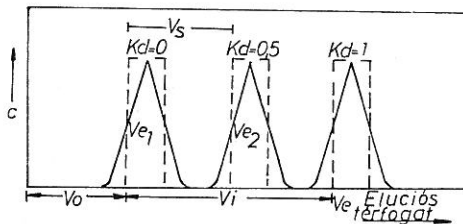
Így az eluátum térfogata

$$V_e = V_0 + K_{av} \cdot V_x \quad (9)$$

ahonnan

$$K_{av} = \frac{K_d \cdot V_i}{V_x} \quad (10).$$

A fentiekén kívül más volumetrikus modellek is ismeretesek, ezek tárgyalásától azonban e helyen eltekintünk.



2. ábra

A volumetrikus hányadosok és az elúciós térfogatok kapcsolata

A kinetikus elméletek számottevő folyadékáramlást szintén csak a külső folyadékfázisban tételeznek fel, s a molekuláris kölcsönhatások és az elválasztandó anyagok diffúziójának figyelembevételével írják le a gél szűrés alatt végbenő jelenségeket [5, 19]. E modellek alkalmazása nehezebb, mint a volumetrikus elképzeléseké, s a legtöbb gyakorlati vizsgálat esetén ez idő szerint különösebb előnyt nem jelentenek. Ezt igazolja ACKERS [cit. 19] sztatikus és dinamikus feltételek között kapott eredményeinek egyezése is.

Humuszanyagok gél szűréses vizsgálata

A gélkromatográfia a nagymértékben polidiszperz humuszösszetevők tanulmányozására is alkalmasnak látszott. Bár a módszert az eddigiekben különféle humuszkomponensek, így pl. a vízben oldható humuszanyagok [9, 15], a talajból preparált fulvósavak [18, 21], illetve az NH_4Cl -ben [17] oldható szerves anyagok vizsgálatára is több ízben felhasználták, a munkák túlnyomó többsége a huminsavak tanulmányozását [1, 3, 7, 10, 13, 16, 27, 28] tűzte ki célul, s részint frakcio-

nálásra, részint pedig molekulásúly meghatározásra szolgált.

Mivel a heterociklikus, aromás és fenolos vegyületek erősen adszorbeálódnak Sephadex gélen [2, 4, 14, 26], s a huminsavak is tartalmaznak ilyen jellegű komponenseket, humuszkivonatok frakcionálásakor is számolni kell bizonyos mértékű adszorpcióval. Az eddigi megfigyelések alapján úgy tűnik, hogy az adszorpció természete (reverzibilitása) és mértéke jelentősen függ a huminsav eredetétől (talajtípustól stb.), a Sephadex térhálóságának mértékétől, s az eluálószer milyenségétől.

Az idevonatkozó munkákból ismert, hogy a gél és az oldott anyag közötti kölcsönhatásokat egyrészt *elektrosztatikus* (COULOMB) erők, másrészt *adszorpciós* (VAN DER WAALS) erők okozhatják. GELOTTE [14] szerint a töltéssel rendelkező helyek elektrosztatikus hatása elsősorban akkor figyelhető meg, amikor deszt. vizet használnak eluensként. Ezt a hatást ki lehet küszöbölni az eluálószer pH-jának gondos megválasztásával, vagy a rendszer elektrolit koncentrációjának növelésével. Az adszorpciós folyamatok visszazoritása azonban nem oldható meg ilyen egyszerűen. Aromás és fenolos vegyületek esetén ugyanis elektrolit jelenlétében növekszik az adszorpció [4, 14]. DETERMANN és WALTER [6] rámutattak arra is, hogy a gél térhálósódásával (kemény gélek) fokozódik a fenol megkötődése az oszlopon. Ez a hatás polifenolokat tartalmazó vegyületek esetén is bizonyítható [22, 26]. Ugyanígy növelik az adszorpciót az aromás gyűrűn szubsztituált metoxil csoportok is [2].

Az adszorpciós hatásokat egyesek a Sephadex piridines, vagy híg alkoholos kezelésével [8, 26], mások az eluálószer helyes megválasztásával [27] igyekeznek kiküszöbölni.

SWIFT és POSNER [27] szerint arra kell törekedni, hogy a szétválasztás kizárólag a molekulásúly különbségek alapján történjen. Ezt — mint utaltunk rá — megfelelő eluálószer alkalmazásával tartják elérhetőnek. Deszt. vizes elució esetén ugyanis feltételezhető, hogy a kapott csúcsok nemcsak a molsúly szerinti összetétel, hanem a gél-oldott anyag kölcsönhatásai által módosított változásokat is tükrözik. Így az elució görbe valószínűleg a vizsgálandó anyag molekulásúly eloszlásának, töltéssűrűségének és adszorpciós képességének együttes hatásait mutatja. Semleges sóoldatokkal (NaCl stb.) sem lehet megoldani a problémát. Lúgos pufferek (borát, trisz) alkalmazásakor viszont a molekulásúly eloszlásnak megfelelő

folyamatos frakcionálást értek el, s az anyag jelentős része — a tényleges összetételt tükrözve — egy nagyobb csúcsban jelent meg. Ezt a megoldást lehet választani a molekulásúly meghatározásakor.

A talaj huminsavainak frakcionálásával kapott eddigi eredményeket sok tekintetben nehezen, vagy egyáltalán nem lehet összehasonlítani. Ez alapvetően arra vezethető vissza, hogy nem azonos módon történt a

1. a szerves anyag kinyerése a talajból, s
2. a vizsgálat körülményei is számottevően eltérnek.

Utóbbiak közül elsősorban meg kell említeni az *eluálószer*ek különbözőségét, mely — a fent ismertetett megfigyelések értelmében — más-más eredményekre vezethet. Ezen kívül nehezítik az adatok egységes értelmezését a leoldott *anyag detektálásának* körülményeiben, az *oszlopok méretében*, s a felhasznált *gél típusok* megválasztásában tapasztalható különbségek. Bizonyos eluálószerknél (így pl. deszt. víznél) a felvitt *anyagmennyiség* is szerepet játszhat az elució görbe lefutásában.

A vizsgálati feltételek sokféleségét az alábbi példákkal szemléltetjük.

DELL'AGNOLA és FERRARI [3] a sósavval kezelt talajból 0,1 M NaF-al kioldott anyagokat, Sephadex G-50-es oszlopon vizsgálták. A későbbiekben pedig [10] a 0,1 M $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ (nátrium-pirofoszfát)-ban oldható szerves anyagokat G-50 és G-100-as géleken választották szét. Az eluálószer $\text{Na}_4\text{B}_2\text{O}_7$ (nátrium-tetraborát) volt. Az eluátum optikai sűrűségét 472 nm-en mérve, két jól elkülönülő frakciót nyertek.

MEHTA et al. [21] különböző oldószerekkel néhány fulvósav és egy huminsavfrakciót kaptak a talajból, a kivonatok azonban nem sikerült további jellemző komponensekre bontaniuk. A módszert viszont megfelelőnek tartják a szerves anyagok molsúlyának közelítő meghatározására.

BAILLY és MARGULIS [1] sósavas előkezelés után 0,1 N NaOH-val oldották ki a huminsavakat, s a mintákat G-25, G-75, G-200 gélágyon végzett egymásutáni deszt. vizes elucióval frakcionálták. A minta G-25 által kizárt nagymolekulájú komponenseit G-75-ös oszlopon ismét eluálták, majd a szétválasztást G-200-on fejezték be. A leoldást az eluátum 254 nm-en mutatott fényabszorpciójának mérésével igyekeztek követni. Végül következtetni próbáltak a huminsavkomponensek molekulásúlyára.

DUBIN és FILKOV [7] 5 féle géloszlopon (G-25-től G-150-ig) eluálták a 0,1 N NaOH-val, dekalcinálás után nyert kivonatokot. Mindegyik oszlopra a kiindulási anyag-

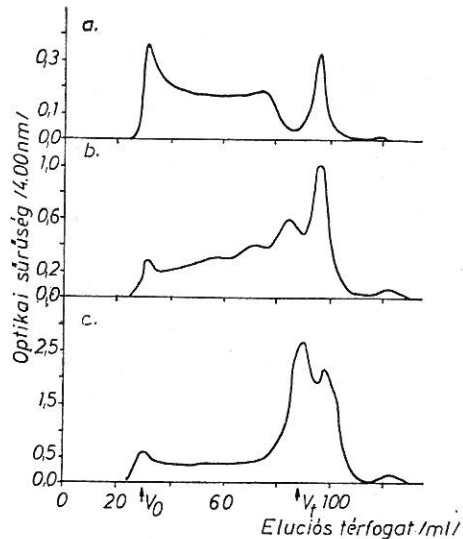
keveréket vitték fel, majd 10 pH-jú glicin pufferrel történt a leoldás. Az optikai sűrűséget 465 nm-nél határozták meg. A molekulásúly szerinti megoszlásnak legjobban megfelelő frakcionálást (2 különálló csúcs), adott körülmények között, G-75-ös Sephadexen érték el.

GANZSARA [13] a talajból 3 féle kivonószerezrel kapott szerves anyagokat eluált G-25 oszlopokon. A kivonatok nagy mértékben bekoncentrálva vitte fel. A 435 nm-en mért optikai sűrűség alapján szerkesztett görbékben külön csúcsként jelentkeztek a huminsavak (első csúcs), s a fulvósavak (második és harmadik csúcs).

SWIFT és POSNER [27] 0,1 N nátrium-pirofoszfát, majd hideg 0,5 N NaOH alkalmazásával szerzett huminsav kivonatok vizsgáltak különböző gyártmányú és típusú géleken. A leoldott anyag detektálását a 400 nm-en mért optikai sűrűség mérésével oldották meg. Bébizonyították, hogy az oldat deszt. vizes eluciója esetén az eluciódiagramok ugyanazon mintánál is változnak az oszlopra vitt minta koncentrációjától függően (3. ábra). Ha az oszlopra kerülő minta kis koncentrációjú (3. ábra. a.), az anyag jelentős részét a gél kizárja, nagy koncentráció (20 mg) esetén viszont a molekulák nagy része bejut a gélszemcsékbe, s a V_t -t megközelítő térfogatú eluenssel leoldható csúcsként jelenik meg. Lúgos pufferek alkalmazásakor viszont a minta koncentrációjának változása nem okoz lényeges eltérést az eluciódiagramokban.

SZIMAKOV és ALJABINA [28] a talaj mésztelenítése után 0,1 N NaOH-val kivont anyagokat bidesztillált vízzel eluálták Sephadex G-100-on. Egyes talajoknál 4, másoknál 3, vagy 2 frakciót kaptak. A jellemzőnek talált 1. és 3. frakció átlagos COOH + OH értékeit is megadták.

Humuszanyagok molekulásúlyának Sephadex segítségével történő meghatározását MEHTA et al. [21], valamint POSNER [24] kísérelték meg először, majd többek között BAILLY és MARGULIS [1], illetve DUBIN és FILKOV [7] ismertettek ezzel kapcsolatos közelítő adatokat. Az eredmények értékelésénél azonban, itt is szem előtt kell tartani egyrészt azt, hogy a minták kinyerését és eluálását a szerzők nem azonos feltételek között végezték, másrészt a huminsavak molekulásúlyának becslése kvalitatív módon, s többnyire szubjektíven történt. Így BAILLY és MARGULIS [1] – mint említettük – a 0,1 N NaOH-os kivonat desztillált vizes eluciójával kapott görbéket, DUBIN és FILKOV [7] pedig az oldat glicin pufferrel nyert diagramjait vették figyelembe, s egyedül a Sephadex gélek fehérjékre megadott kizárási határait használták a mo-



3. ábra

Az eluciódiagram változása az oszlopra vitt anyagmennyiségtől függően [27], (desztillált vizes leoldás Sephadex-G-100-on). a) 4 mg, b) 10 mg, c) 20 mg huminsav/2 ml; oszlopméret: 2×30 cm, $V_t =$ az oszlop hatásos térfogata

lekulasúly megállapításához. A megadott értékeket ezért csak hozzávetőleges tájékoztatásként kezelhetjük.

A fenti, korántsem teljes, tájékoztatással kívántunk rámutatni arra, hogy a gélkromatográfia – a jelenlegi mutatózó módszertani bizonytalanságok ellenére – biztató lehetőségekkel rendelkező egyszerű eljárás a talajban előforduló szerves vegyületek frakcionálása, a frakciók preparatív előállítása, tisztítása, s molekulásúlyuk meghatározása tekintetében. Alkalmazása olyan problémák tanulmányozásához nyújthat segítséget, melyeket ilyen mértékben polidiszperz anyagoknál más úton, ez idő szerint nem, vagy csak nagyon körülményesen lehet megközelíteni.

Irodalom

- [1] BAILLY, J. R. & MARGULIS, H.: Études de quelques acides humiques sur gel de dextrane. *Plant and Soil*. 29. 343–361. 1968.
- [2] BROOK, A. J. W. & HOUSLEY, S.: The interaction of phenols with Sephadex gels. *J. Chromatogr.* 41. 200–204. 1969.
- [3] DELL'AGNOLA, G. & FERRARI, G.: Molecular sizes and functional groups of humic acid substances extracted by 0,1 M pyrophosphate from soil aggregates of different stability. *J. Soil Sci.* 22. 342–349. 1971.

- [4] DEMETRIOU, J. A. et al.: Gel filtration chromatography of fluorescent phenolic and heterocyclic compounds. *J. Chromatogr.* **34**, 342–350, 1968.
- [5] DETERMANN, H.: Gel chromatography. Springer, New York, 1968.
- [6] DETERMANN, H. & WALTER, I.: Source of aromatic affinity to Sephadex dextran gels. *Nature*. **219**, 604–605, 1968.
- [7] DUBIN, V. N. & FILKOV, V. A.: Frakcionovanie guminovüh kiszlot nekotörüh počsv. Moldavii fil'traciej cserez szeradekszü. *Počsvovedenie*. (5) 85–102, 1968.
- [8] EAKER, D. & PORATH, J.: Sorption effects in gel filtration. *Separation Sci.* **2**, 507–550, 1967.
- [9] EVSZEVA, R. P. et al.: Primenenie gelevoj fil'tracii szefadekszov dlja razdelenija vodorasztvorimüh organicseszkih vcseszstv počsvü. *Izv. TSzHA*. (3) 124–131, 1968.
- [10] FERRARI, G. & DELL'AGNOLA, G.: Fractionation of the organic matter of soil by gel filtration through Sephadex. *Soil Sci.* **96**, 418–421, 1963.
- [11] FLODIN, P.: Dextran gels and their application in gel filtration. *Pharmacia*, Uppsala, 1962.
- [12] FLODIN, P. & GRANATH, K.: Symposium über Makromoleküle. Wiesbaden, 1950. *Verl. Chem. Weinheim*, 1959/60.
- [13] GANZSARA, N. F.: Frakcionovanie guminovüh vcseszstv počsvü metodom gelevoj fil'tracii. *Dokl. TSzHA*. **149**, 95–96, 1969.
- [14] GELOTTE, B.: Studies on gel filtration. *J. Chromatogr.* **3**, 303–342, 1960.
- [15] GJESSING, E. T.: Use of Sephadex gel for estimation of molecular weight of humic substances in natural water. *Nature*. **208**, 1091–1092, 1965.
- [16] HAYES, M. H. B.; STACEY, M. & STANDLEY, J.: Studies on the fractionation of humification products of ryegrass in sand columns. *Geoderma*. **7**, 105–111, 1972.
- [17] HOLTY, J. G. & HELLMAN, P. E.: Molecular sieve fractionation of organic matter in a podzol from southeastern Alaska. *Soil Sci.* **112**, 351–356, 1971.
- [18] KAHN, S. K. & SCHNITZER, M.: Sephadex gel filtration of fulvic acid: the identification of major components in two low-molecular weight fractions. *Soil Sci.* **112**, 231–238, 1971.
- [19] KREMMER, T.: Gélszűrés. A biokémia modern módszerei. Magyar Kém. Egyesület. Biokémiai Szakoszt. Budapest, 1968.
- [20] LAURENT, T. C. & KILLANDER, J.: A theory of gel filtration and its experimental verification. *J. Chromatogr.* **14**, 317–330, 1964.
- [21] MEHTA, N. C., DUBACH, P. & DEUEL, H.: Untersuchungen über die Molekulargewichtsverteilung von Huminstoffen durch Gelfiltration on Sephadex. *Z. Pfl. Ernähr. Düng. Bodenk.* **102**, 128–137, 1963.
- [22] NORDSTROM, C. G.: Separation of polyphenolic glycosides by gel chromatography. *Acta Chem. Scand.* **21**, 2885–2912, 1967.
- [23] PORATH, J. & FLODIN, P.: Gel filtration. A method for desalting and group separation. *Nature*. **183**, 1657–1659, 1959.
- [24] POSNER, A. M.: Importance of electrolyte in the determination of molecular weights by Sephadex gel filtration with special reference to humic acid. *Nature*. **198**, 1161–1163, 1963.
- [25] Sephadex-gel filtration in theory and practice. *Pharmacia*, Uppsala, 1967.
- [26] SOMERS, T. C.: Wine tannins. — Isolation of condensed flavonoid pigments by gel filtration. *Nature*. **209**, 368–370, 1966.
- [27] SWIFT, R. S. & POSNER, A. M.: Gel chromatography of humic acid. *J. Soil Sci.* **22**, 237–249, 1971.
- [28] SZIMAKOV, V. N. & ALJABINA, G. A.: Izucsenie frakcionnogo szosztava guminovüh kiszlot nekotörüh tipov počsvü metodom gel'filtracii. *Počsvovedenie* (7) 63–66, 1972.
- [29] ÜDVARHELYI, K.: Gélszűréses kromatográfia fenol-rezitol matrixokon. *MTA Kém. Tud. Oszt. Közl.* **32**, 41–68, 1969.

FILEP GYÖRGY

Érkezett: 1973. április 10.