

С.М. Глушков, В.В. Фадеев, Е.М. Филиппова, В.В. Чубаров

ПРОБЛЕМЫ ЛАЗЕРНОЙ ФЛУОРИМЕТРИИ ОРГАНИЧЕСКИХ ПРИМЕСЕЙ В ПРИРОДНЫХ ВОДАХ

Рассмотрены новые возможности применения метода лазерной флуориметрии для диагностики в природных водах органических примесей (нефтепродуктов, растворенных органических веществ, белковых соединений), определяющих экологическое состояние водных сред. Анализируется применение прямого безэкстрактного флуоресцентного лазерного метода для определения и идентификации этих примесей в природных водах при возбуждении на длине волны 266 нм. Полученные результаты рассматриваются как следующий шаг в решении проблемы дистанционного лазерного мониторинга естественных водных сред.

1. Введение

В данной статье рассмотрены возможности лазерной диагностики двух важнейших для функционирования водных экосистем классов органических соединений – природного растворенного органического вещества (РОВ) и нефтяных углеводородов (НУ) в объеме воды (проблема определения параметров нефтяной пленки на поверхности воды будет рассмотрена отдельно, в других публикациях).

Предлагаемые методы диагностики основаны на флуориметрии с непрерывной калибровкой сигнала флуоресценции по внутреннему реперу – сигналу комбинационного рассеяния (КР) воды или органического растворителя, используемого для экстракции НУ из воды. Флуориметрия позволяет проводить как экспресс-анализ проб воды, так и дистанционное зондирование водной толщи.

Основная проблема, которая решается в данной работе, – проблема раздельного определения РОВ и НУ. В процессе решения этой задачи мы столкнулись с необходимостью определять еще один класс органических соединений – белки.

В большой мере состояние водной экосистемы характеризуется содержанием в воде РОВ – сложного органического комплекса естественного происхождения. Это уникальное во многих отношениях вещество, присутствующее во всех видах почв, донных отложений и всех типах вод, содержит в себе основной запас органического углерода на Земле и является центральным звеном в глобальном цикле органического углерода [1]. Новая волна интереса к изучению этого объекта в водных средах была вызвана в 1974 году сообщением [2] о способности РОВ образовывать вредные для здоровья человека хлорорганические пестициды в процессе хлорирования питьевой воды. С тех пор содержащееся в воде РОВ стало не только важным экологическим и геохимическим показателем, но и объектом исследования в таких областях науки, как медицина и особенно токсикология. РОВ возникает в результате химического и биологического разложения растительных и животных остатков и не относится ни к одному из следующих классов веществ: белки, полисахариды и полинуклеотиды. РОВ является конечным продуктом разложения любой органической материи, однако несмотря на свою всеобщность и вседоступность остается одним из наименее понятых и изученных природных объектов.

Нет полной ясности и с природой полосы флуоресценции РОВ. В последние годы мы приняли попытки разобраться в этом вопросе. Результаты этих исследований доложены на конференции ISPRS'92 [3] в США и будут в ближайшее время опубликованы в отдельной работе.

В рамках данной статьи важно отметить свойства полосы флуоресценции РОВ – постоянство ее формы и положения ($\lambda_{\text{max}}^{\text{фл}} = (421 \pm 5)$ нм, $\Delta\lambda_{\text{фл}} = (98 \pm 3)$ нм) при любой длине волны возбуждения короче $\lambda = 350$ нм и смещение полосы в длинноволновую область с одновременным уменьшением интенсивности и полуширины полосы при увеличении $\lambda_{\text{возб}}$.

Среди многих загрязняющих веществ, поступающих в Мировой океан, наибольшую потенциальную угрозу несут те химические соединения, которые имеют глобальное распространение, перманентный характер поступления и выраженное отрицательное действие на живые организмы. К таким загрязняющим веществам относятся токсичные металлы, долгоживущие искусст-

венные радионуклеиды, пестициды, а возглавляют этот мрачный список сырые нефти и нефтепродукты. Ежегодно в мире публикуются десятки тысяч научных статей и научно-популярных изданий, а также отдельные монографии, посвященные изучению нефтяного загрязнения Мирового океана и восстановлению поврежденных нефтяными разливами морских экосистем. Этот факт – наглядное свидетельство того, как серьезна и актуальна эта проблема в наше время.

Обширная программа наблюдений за содержанием нефтяных углеводородов в различных природных и техногенных объектах требует создания доступных, высокочувствительных, селективных и экспрессных методов анализа. Все современные аналитические методы определения НУ можно разделить на два основных класса:

- методы количественного определения суммарного содержания НУ;
- методы идентификации и количественного определения индивидуальных углеводородов.

Сравнительный анализ методов выполнен в ряде работ [4, 5] и в данной статье не будет проводиться. Наша статья посвящена исследованию новых возможностей флуоресцентной (в том числе и лазерной) спектроскопии для диагностики НУ в природных водах, поэтому кратко остановимся на достоинствах и недостатках именно этого метода.

Флуоресцентную спектроскопию из ряда других методов определения НУ в воде выделяют два очень важных преимущества: высокая чувствительность и экспрессность. Большие возможности метода открываются в связи с развитием лазерной техники, что к уже отмеченным достоинствам добавляет еще одно преимущество – возможность проведения дистанционных измерений. Кроме того, при возбуждении ультра-короткими лазерными импульсами появляется возможность регистрации кинетики флуоресценции. В этом случае регистрируются не только спектры, но и кривая затухания флуоресценции и полученные значения времени жизни t_f используются в качестве дополнительной спектральной информации для идентификации нефтей и нефтепродуктов [6].

Следующей разновидностью флуоресцентной спектроскопии является метод *TLS*-диаграмм (*total luminescence spectra*), основанный на регистрации спектров флуоресценции при возбуждении на различных длинах волн и построении диаграмм равной интенсивности излучения [7]. Добавление третьей координаты в виде интенсивности флуоресценции позволяет строить наглядные трехмерные диаграммы, по которым можно определять концентрацию и идентифицировать нефтяное загрязнение.

Возможности идентификации, которые открывают для флуоресцентной спектроскопии *TLS*-диаграммы и измерения времен жизни флуоресценции, нивелируются тем, что теряются основные преимущества метода – это экспрессность, так как для получения информации требуется значительно большее время, – простота, так как для проведения исследований требуется специальная и не всегда доступная аппаратура.

Поэтому, при диагностике НУ в воде предпочтение по-прежнему отдается традиционной флуоресцентной спектроскопии, особенно в полевых исследованиях, и предпринимаются все новые попытки расширить ее возможности теми или иными способами. Некоторые из таких способов предложены в данной статье.

Еще одним важнейшим органическим компонентом, определяющим экологическое состояние природных водных сред, являются аминокислоты и производные от них белковые соединения. Во всех водах современных морей и океанов, рек и озер аминокислоты найдены в осадках, взвеси и растворенном состоянии.

Общее содержание растворенных аминокислот в различных природных водах находится в прямой зависимости от общей концентрации органического вещества в воде. Так, в работе [8] найдено, что углерод растворенных аминокислот составляет примерно 5...7% от общего содержания органического углерода, а типичная средняя концентрация растворенных аминокислот для большей части природных вод колеблется в диапазоне от нескольких десятков до сотен мкг/л.

Флуоресцентные свойства белков мы рассмотрим в разделе 6, после того как будет обрисована проблема раздельного определения флуоресцентных вкладов РОВ и НУ в общую полосу флуоресценции органических примесей в воде.

2. Некоторые проблемы определения концентрации НУ в воде методом флуориметрии

Как уже было отмечено ранее, ультрафиолетовая флуоресцентная спектроскопия широко используется для диагностики нефтяных загрязнений. Уступая другим методам (газовая хро-

матография, высокоэффективная жидкостная хроматография, масс-спектрометрия или комбинация этих методов) в селективности, ультрафиолетовая флуориметрия значительно выигрывает в простоте и скорости получения информации. На сравнении спектров флуоресценции растворов различных нефтей и нефтепродуктов в органическом растворителе (циклогексане) основан стандартный метод идентификации НУ, принятый Американским обществом по проверке и тестированию материалов [9]. Кроме того, флуоресцентный метод в его экстрактном варианте принят ЮНЕСКО [10] в качестве стандартного метода определения суммарного количества НУ в природных водах и в традиционной прописи неоднократно был апробирован в натуральных условиях. Результаты такой проверки показали, что стандартная методика является высокочувствительной, обеспечивает хорошую воспроизводимость результатов, высокую скорость получения информации <по горячим следам> и является, безусловно, первым и необходимым этапом мониторинга природных вод, особенно для быстрой диагностики обширных морских пространств. Если же получаемая таким способом информация является недостаточной, то эти же образцы могут быть в дальнейшем изучены с помощью других, перечисленных выше методов для получения более подробной информации о качественном составе пробы.

Ничуть не умаляя достоинств стандартного флуоресцентного метода ЮНЕСКО, следует, однако, всегда помнить о его недостатках, попыткам преодоления которых и посвящена данная работа. Существуют следующие проблемы метода ЮНЕСКО:

1. Флуоресцентная спектроскопия является высокочувствительным методом для детектирования НУ благодаря тому, что в состав этих веществ всегда входят ароматические нефтяные углеводороды, но не дает информации о концентрации других углеводородов, входящих в состав нефтей. Сырые нефти различных месторождений, как и их нефтяные фракции, получаемые при возгонке, содержат разное количество метановых, нафтеновых и ароматических углеводородов. Поэтому возникают проблемы с выбором эталонного образца нефти для калибровки сигнала флуоресценции по концентрации НУ.

2. Концентрация НУ не определяется непосредственно по спектрам их флуоресценции в воде, а сначала НУ, растворенно-эмульгированные в воде, переводятся путем экстрагирования в гексан и при необходимости раствор концентрируется путем выпаривания на роторном испарителе. И лишь после этого по спектрам флуоресценции полученных гексановых экстрактов определяется концентрация НУ в воде. Проведение таких многоступенчатых подготовительных операций и косвенных измерений снижает экспрессность метода и может вносить определенные ошибки, в частности из-за различий в состоянии нефти в воде и в гексане (в воде НУ находятся преимущественно в эмульгированном состоянии, в гексане – преимущественно в растворенной форме [11]).

Кроме того, следует упомянуть, что до сих пор открытым остается вопрос о переходе в гексановый экстракт других соединений, не относящихся к НУ. Природное РОВ не переходит в гексан при экстрагировании, однако анализ, выполненный в работе [11] показал, что помимо НУ гексановые экстракты содержат некоторое количество флуоресцирующих полярных соединений неизвестной природы. Таким образом, эта проблема требует дальнейшего изучения.

3. Наиболее уязвимым моментом флуоресцентной методики ЮНЕСКО является, на наш взгляд, неоптимальный выбор длин волн возбуждения и регистрации флуоресценции ($\lambda_{exc} = 310$ нм, $\lambda_{em} = 360$ нм). Согласно этой методике концентрация НУ определяется с помощью соотношения $C = \alpha I$, где C – концентрация НУ, I – интенсивность флуоресценции, α – коэффициент связи, определяемый из калибровочной зависимости $C(I)$ для эталона, в качестве которого используется хризен или любая сырая нефть.

В работах [12, 13] были исследованы калибровочные зависимости для разных нефтей, нефтепродуктов (НП) и температурных фракций нефтей. Вычисленные значения α при возбуждении на длине волны $\lambda_{exc} = 337$ нм для изученных образцов отличаются на 3–4 порядка, аналогичный результат получен при $\lambda_{exc} = 310$ нм. Такая зависимость α от вида НУ означает, что в качестве эталона для калибровки должен использоваться тот же НУ, что находится в воде и является источником загрязнения.

Но это условие, как правило, выполнить трудно, чаще всего мы не знаем источника загрязнения. Таким образом, универсальность методики ЮНЕСКО невелика, но ситуация, на наш взгляд, не безнадежна, так как разброс в значениях коэффициента α может быть связан как с разным химическим составом исходных нефтей и НУ, содержащих разное количество

ароматических НУ, так и с неудачным выбором длин волн регистрации и возбуждения флуоресценции. Наименее эффективно излучением с $\lambda_{exc} = 337; 310$ нм возбуждаются НУ легких фракций [12, 13]. Следовательно, малые концентрации этих НУ в воде (по нашим оценкам $C = 10$ мкг/л и ниже) вообще могут быть не зарегистрированы флуоресцентной методикой.

В тех же работах было высказано предположение, что уменьшение длины волны λ_{exc} расширит спектр возбуждаемых НУ и, следовательно, уменьшит разброс в значениях α , придаст флуоресцентной методике большую универсальность. В наших исследованиях эта гипотеза получила количественное подтверждение.

На преимущества использования коротковолнового излучения ($\lambda_{exc} = 250; 254; 290$ нм) для возбуждения НУ указывалось и ранее, и результаты этих исследований легли в основу флуоресцентного метода идентификации НУ [9], однако они не были использованы для количественного определения содержания НУ в воде. Наши исследования в общих чертах подтвердили возможности количественного анализа при $\lambda < 270$ нм и выявили новые детали, которые могут быть использованы для идентификации НУ.

В данной статье предлагается модификация методики ЮНЕСКО, основанная на использовании новых длин волн возбуждения и регистрации флуоресценции. Количественные оценки, приведенные здесь, доказывают целесообразность такого выбора, а новые появившиеся возможности позволяют использовать методику ЮНЕСКО как для определения концентрации, так и для идентификации НУ. Как оказалось, использование этих длин волн позволило продвинуться в прямой диагностике НУ в воде.

3. Экспериментальная техника и приготовление образцов

Корректированные спектры флуоресценции и возбуждения флуоресценции водных проб, а также гексановых экстрактов и гексановых растворов различных нефтей и нефтепродуктов регистрировались на ламповом флуоресцентном спектрофотометре ИТАСНИ-850 с автоматической коррекцией спектров.

Параллельно этим исследованиям корректированные спектры флуоресценции всех образцов снимались на малогабаритном лазерном спектрометре. Излучение четвертой гармоники ИАГ:Nd³⁺-лазера ($\lambda_{exc} = 266$ нм, мощность $P = 50$ кВт в импульсе, длительность $\tau = 10$ нс, частота повторения импульсов $\nu = 10$ Гц) направлялось в кварцевую кювету объемом 4 см³ с исследуемым образцом. Рассеянное под углом 90° излучение попадало на входную щель монохроматора и спектр регистрировался в режиме последовательного детектирования ФЭУ и АЦП интегрального типа заряд-время с последующей обработкой на микроЭВМ. Интенсивность флуоресценции изучаемых проб выражалась в единицах безразмерного параметра $\Phi = I_{fl} / I_{кр}$, где I_{fl} и $I_{кр}$ – интенсивности в максимумах полос флуоресценции и КР воды или гексана. Наименьший надежно детектируемый сигнал флуоресценции соответствовал значению $\Phi = 0,05$.

Нами были изучены спектрально-люминесцентные характеристики гексановых экстрактов и растворов десяти различных нефтей и нефтепродуктов. Экстрагировались образцы бидистиллированной воды с находящимися в ней НУ в растворенно-эмульгированном состоянии. Для приготовления таких проб использовались делительные воронки объемом $V = 0,5$ л, заполненные бидистиллятом. После добавления в воронку нескольких миллиграммов нефтяной пробы воронка энергично встряхивалась (около 50 раз) и затем содержимое воронки отстаивалось в течение трех суток. Первые 5 ч крышка воронки была открыта, а все оставшееся время проба хранилась в закрытом состоянии при комнатной температуре и естественном освещении. Опираясь на известные из литературы сведения, мы считали, что за это время все существенные процессы испарения, растворения, эмульгирования и, возможно, окисления успевали произойти и использовали наши образцы как модельные образцы природной воды для анализа. Оставшееся содержимое воронок хранилось максимально в течение 3-х месяцев в закрытом состоянии и по прошествии этого времени также было проанализировано нами. Форма спектров возбуждения и флуоресценции <свежих> и <выдержанных> образцов были качественно подобны, что говорит о схожем химическом составе проб и о том, что дальнейшая деструкция в нашем образце незначительна. Таким образом, приготовленные в одинаковых условиях образцы давали нам возможность обойти проблему <старения> нефти.

Основная часть нашей работы была посвящена решению проблемы разделения спектральных вкладов различных органических соединений в природной воде и особенно разделения вкладов НУ и РОВ, как одних из наиболее важных ингредиентов.

Для получения разных концентраций НУ в воде средняя порция образца сливалась и разбавлялась различными объемами бидистиллированной воды. Конечная концентрация пробы подбиралась таким образом, чтобы сигнал флуоресценции НУ в растворенно-эмульгированном виде в воде при возбуждении на длине волны 266 нм был сравним с сигналом КР воды ($\Phi = 0,3...1$). Такая ситуация типична для акваторий, подверженных антропогенному воздействию с уровнем нефтяных загрязнений 0,1...10 ПДК (ПДК для НУ составляет 50 мкг/л [14]) и, следовательно, представляет наибольший практический интерес.

Приготовленные водные пробы с окончательной концентрацией растворенно-эмульгированных НУ делились на две части, каждая из которых исследовалась в дальнейшем независимо. Одна часть пробы экстрагировалась гексаном, а вторая служила образцом водной пробы нефти и ее спектрально-люминесцентные характеристики затем изучались. Экстрагирование проб проводилось, в основном, согласно традиционной прописи методики ЮНЕСКО с той лишь разницей, что высокая чувствительность используемого лазерного спектрометра позволяла регистрировать сигнал флуоресценции НУ в гексановом экстракте при небольшом значении коэффициента концентрирования $K = V_b/V_r = 10$ (V_b и V_r – соотношение объемов воды и гексана при экстрагировании).

Дальнейшего концентрирования пробы путем выпаривания на роторном испарителе не требовалось, что значительно сокращало время приготовления проб для анализа ($t = 15$ мин). В этом случае минимально детектируемые концентрации НУ в воде составляют 0,5 ... 3 мкг/л для разных НУ. Если этот предел необходимо понизить, то значения K могут быть увеличены, так как согласно стандартной методике коэффициент концентрирования может достигать значения $K = 800$.

Растворы НУ в гексане с концентрацией $C = 10 ... 500$ мкг/л готовились разбавлением в гексане калиброванных с помощью микрошприца объемов нефтепродуктов, что обеспечивало необходимую точность и воспроизводимость экспериментов.

4. Экстрактная методика при коротковолновом лазерном возбуждении флуоресценции НУ

На рис. 1, а, б представлены скорректированные спектры флуоресценции некоторых гексановых экстрактов при возбуждении на длинах волн $\lambda_{exc} = 266$ и 310 нм. Из сравнения рисунков видны явные преимущества более коротковолнового возбуждения: во-первых, спектры флуоресценции при таком возбуждении более информативны, во-вторых, флуоресценция НУ эффективнее возбуждается $\lambda_{exc} = 266$ нм. В большинстве случаев (для 7 изученных образцов нефтей и НП) полоса флуоресценции гексановых экстрактов и растворов при $\lambda_{exc} = 266$ нм имеет два хорошо выделенных максимума на длинах волн $\lambda_{1max} = 308$ нм, $\lambda_{2max} = 360$ нм и плечо в области 385 нм. Для дизельного топлива в спектре наблюдается только одна коротковолновая полоса ($\lambda_{max} = 308$ нм), а в спектрах бензинов – полоса с максимумом на 290 нм и плечо в окрестности 300 ... 310 нм. Такое качественное подобие спектров, на наш взгляд, связано с присутствием во всех нефтях и НП одинаковых флуорофоров – ароматических НУ. За коротковолновую флуоресценцию с $\lambda_{1max} = 290$ и 308 нм ответственны, по-видимому, НУ с одним или двумя ароматическими кольцами, за длинноволновую флуоресценцию – с несколькими (3, 4) кольцами.

Следует отметить, что подобная зависимость спектрально-люминесцентных характеристик от строения молекул НУ замечена давно. На основе исследования электронных спектров поглощения, испускания и возбуждения флуоресценции большого числа полициклических ароматических углеводородов в литературе [15] подробно описаны закономерности поведения спектров ароматических молекул. Известно, что для конденсированных ароматических углеводородов по мере возрастания числа бензольных колец и сопряженных связей в цепи молекулы наблюдается тенденция к длинноволновому смещению полос поглощения и люминесценции.

Аналогичные закономерности в изменении положения максимумов спектров флуоресценции и степени структурированности спектров в зависимости от сложности строения молекул изучены для большинства других групп ароматических НУ. В области длин волн

250 ... 280 нм находится максимум первой полосы поглощения для 1 и 2-х кольцевых структур и максимум второй полосы поглощения для молекул НУ с 3, 4 ароматическими кольцами. Излучение с длиной волны 310 нм почти не возбуждает легкие НУ (1, 2 кольца) и не всегда лучшим образом возбуждает более сложные структуры. Флуоресцентный анализ, выполненный в [15], подтверждает наличие максимума в спектрах возбуждения в области 250 ... 280 нм для большинства ароматических НУ (более 70 из 90 изученных НУ, состоящих из 1, 2, 3, 4, и 5 ароматических колец в различной конфигурации). Так, в спектре возбуждения хризена-стандарта, рекомендуемого методикой ЮНЕСКО для определения концентрации нефти в воде, – наблюдается на длине волны 269 нм интенсивный максимум (при регистрации на $\lambda_{em} = 361$ нм), который для некорректированного спектра в два раза интенсивнее максимума на длине волны 310 нм. Все эти результаты свидетельствуют о том, что более коротковолновое (нежели принято в стандартной методике) излучение из области 260 ... 280 нм имеет явные преимущества. Оно более эффективно возбуждает флуоресценцию большего числа НУ, а структура получаемых спектров позволяет проводить грубую идентификацию НУ на основные классы. Рис. 1 наглядно иллюстрирует эти преимущества.

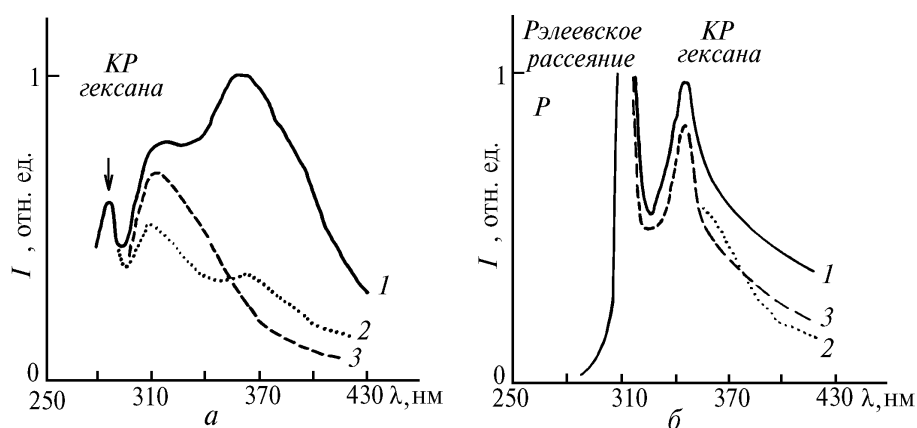


Рис. 1. Корректированные спектры флуоресценции гексановых экстрактов: мазута (1), Саратовской нефти (2), дизельного топлива (3). Длина волны возбуждения 266 нм (а), 310 нм (б)

Следующий этап наших исследований – изучение концентрационных зависимостей гексановых растворов разных НУ и определение коэффициентов $\alpha_1 = \alpha(\lambda_{1\ max})$, $\alpha_2 = \alpha(\lambda_{2\ max})$ в соотношении $C = \alpha \Phi$ для двух полос флуоресценции с $\lambda_{1\ max} = 308$ нм и $\lambda_{2\ max} = 360$ нм, т.е. изучение возможности калибровки сигналов флуоресценции двух полос Φ_1 и Φ_2 по концентрациям НУ. Полученные значения коэффициентов связи представлены в табл. 1 (для лампового спектрофлуориметра сделана коррекция α_1 , α_2 на конечную ширину линии возбуждения). На наш взгляд, наиболее разумно искать связь между концентрацией НУ в гексане и значением флуоресцентного параметра Φ_1 для полосы с $\lambda_{1\ max} = 308$ нм. Такой выбор обоснован тем, что коротковолновая флуоресценция в отличие от полосы с $\lambda_{2\ max} = 360$ нм наблюдается в спектрах всех без исключения нефтепродуктов. Как следствие этого обстоятельства, в значениях $\alpha_{1\ max}$ наблюдается меньший разброс: он сократился с величины $10^2 \dots 10^3$, характерной для стандартного варианта методики, до 3 ... 5 раз. Таким образом, при определении концентрации НУ следует использовать соотношение $C = \alpha_1 \Phi_1$.

Данная методика апробирована в августе 1991 г. в экспедиции вдоль побережья Черного моря и полностью оправдала все ожидания по чувствительности и экспрессности. Концентрация НУ в воде (минимальное значение 0,5 мкг/л) определялась не более чем через 15 минут после отбора пробы. Типичные спектры гексановых экстрактов морской воды представлены на рис. 2. Результаты экологического обследования прибрежных вод показали, что средняя концентрация НУ в поверхностном слое воды толщиной 0,5 м колеблется в диапазоне 1 ... 14 мкг/л. Наибольшее содержание НУ зарегистрировано в районе г. Адлер. Для определения концентрации использовалось среднее значение коэффициента $\alpha_1 = 280$ мкг/л.

Значения коэффициентов α_1 ($\lambda_{1max} = 308$ нм) и α_2 ($\lambda_{2max} = 360$ нм) для гексановых растворов различных типов нефтепродуктов, мкг/л

Тип нефтепродукта	α_1	α_2
Нефть сырая:		
Западно-сибирская	163	116
Саратовская	373	183
Шаимская	126	31
Ливийская	337	183
Масло топливное тяжелое	128	98
МАПЕД	100	100
Масло для реактивных двигателей	352	438
Топливо дизельное	166	10^3
Бензин А-70	568	$> 10^4$
Бензин А-93	555	$> 10^4$

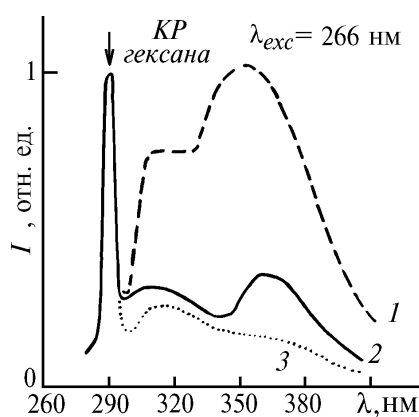


Рис. 2. Типичные скорректированные спектры флуоресценции гексановых экстрактов проб воды различных районов побережья Черного моря. Концентрации нефтепродуктов: 13,5 мкг/л (1); 5,5 мкг/л (2); 4,0 мкг/л (3)

Таким образом, предложенная нами модификация стандартной флуоресцентной методики ЮНЕСКО значительно повышает:

- чувствительность методики, благодаря более эффективному возбуждению флуоресценции;
- экспрессность, благодаря упрощенному способу приготовления образцов для анализа;
- информативность, благодаря появившейся возможности идентификации НП на основные классы;
- универсальность, благодаря расширению диапазона возбуждаемых НУ.

5. Прямая флуоресцентная диагностика НУ в растворенно-эмульгированном состоянии в воде

Методика ЮНЕСКО, модификация которой предложена в предыдущем параграфе, является удобным и чувствительным методом определения концентрации НУ в природных водах. Однако это контактная методика, требующая предварительной подготовки образцов для анализа. Вот почему по-прежнему актуальной и привлекательной остается идея прямого определения НУ в объеме воды непосредственно по спектрам флуоресценции водных проб. Как показали результаты предыдущих исследований [4], задача эта очень сложна. Проблемы прямого определения НУ в воде методом флуоресцентной спектроскопии связаны: а) с существованием нефти в воде в различных состояниях – растворенном, эмульгированном, в виде пленки; б) со «старением» нефти – изменением ее химического состава, а значит, и спектральных характеристик в процессе воздействия целого ряда внешних факторов; в) с переналожением спектральных полос флуоресценции НУ и других растворенных органических веществ в воде.

Известно лишь несколько работ, в которых уделяется внимание спектрально-люминесцентным характеристикам НУ в их различном состоянии в воде. Это объясняется, во-первых, трудностями приготовления истинных растворов НУ в воде ввиду их очень низкой растворимости [16]. Во-вторых, отсутствует практический стимул для выполнения этой кропотливой работы, ибо для природных условий ситуация, когда существуют только растворенные или только эмульгированные НУ малореальна. На практике мы всегда имеем дело с растворенно-эмульгированными НУ в объеме воды и для решения задач диагностики актуальнее знать характеристики именно этих образцов.

Детальное изучение механизма <старения> нефти на различных стадиях процесса в данной статье не проводилось. Решение этой трудной задачи требует моделирования природных условий на специальных стендах, которыми мы не располагали. Возможно, в будущем мы вернемся к изучению этой проблемы, а в данной статье мы исследовали образцы, приготовленные в одних и тех же условиях, как это было описано и обосновано в разделе 3.

Нами была изучена возможность прямой диагностики НУ в воде. Первым и необходимым этапом на пути решения этой проблемы должен быть, на наш взгляд, поиск оптимального диапазона длин волн возбуждения флуоресценции НУ в воде.

С этой целью мы изучили спектрально-люминесцентные характеристики (корректированные спектры флуоресценции (СФ) и возбуждения флуоресценции (СВФ)) десяти различных нефтепродуктов в воде в растворенно-эмульгированном состоянии. СФ водных проб, полученные при различных длинах волн возбуждения ($\lambda_{exc} = 250, 266, 280, 308, 337$) сильно отличаются друг от друга по форме и положению максимумов, причем с увеличением λ_{exc} структура спектров упрощается.

Такое поведение СФ свидетельствует о сложном и многокомпонентном составе водных проб нефтей, содержащих разное количество различных ароматических НУ. Эти флуорофоры, каждый по-своему поглощая УФ-свет, флуоресцируют и формируют суммарный спектр НУ в воде. По аналогии со СФ нефтей в гексане можно предположить, что в коротковолновой области спектра 270 ... 310 нм скорее всего интенсивно флуоресцируют легкие моно- и бициклические НУ (бензол, толуол, нафталин и т.д.), которыми обогащена водорастворимая фракция нефти ввиду их хорошей растворимости в воде. В более длинноволновой области 310 ... 380 нм, вероятно, вклад в полосу флуоресценции вносят 3–4-х кольцевые ароматические структуры.

Более точную идентификацию НУ в настоящее время трудно провести, так как детальный химический анализ содержащихся в пробах углеводородов нами не был сделан. Это требовало специальных экспериментов и в общем-то не было целью нашей работы. Мы изучили спектральные характеристики водных проб нефтей и можем согласиться с отмеченными в [4, 9, 12, 13] особенностями, состоящими в том, что форма и структура СФ (независимо от длины волны возбуждения) коррелирует с их фракционным составом. Используя такую спектральную информацию, можно идентифицировать НУ по основным классам.

Рассмотрим структуру спектров подробнее. Нами была замечена одна особенность: в СФ водных проб при разных значениях λ_{exc} ($\lambda_{exc} = 220; 250; 266; 280$ нм) всегда присутствует полоса с максимумом $\lambda_{max} = 320$ нм. Такое удивительное постоянство в положении максимума определило интерес к изучению СВФ с регистрацией на $\lambda_{em} = 320$ нм.

Из рис. 3, а видно, что все СВФ в области 260...280 нм содержат локальный максимум (полоса с $\lambda_{max} = 296$ нм соответствует КР воды). СФ, полученные при различном возбуждении ($\lambda_{exc} = 220; 250; 266; 280; 308$ нм), подтверждают наличие максимума в СВФ: сигнал флуоресценции наибольший для $\lambda_{exc} = 266$ нм (табл. 2). Следовательно, диапазон 260 ... 280 нм является оптимальным диапазоном возбуждения флуоресценции НУ в воде. Длина волны возбуждения четвертой гармоники ИАГ:Nd³⁺-лазера лежит в этой области, что определяет высокую эффективность применения этого лазера для диагностики НУ.

СФ различных проб, снятые при таком оптимальном возбуждении на лазерном флуориметре, представлены на рис. 3, б. Спектры имеют неоднородную структуру и, как было сказано выше, максимум на длине волны 320 нм. В спектре тяжелого мазута наблюдается интенсивная длинноволновая полоса ($\lambda_{max} = 360$ нм), а в спектрах легких нефтепродуктов наиболее

выражены коротковолновые полосы с $\lambda_{max} = 308$ и 320 нм. В СФ сырых нефтей обычно отчетливо заметны все три полосы (рис. 3, б).

Таблица 2

Сравнение значений флуоресцентного параметра Φ для различных типов нефтепродуктов в воде

Тип нефтепродукта	$\Phi(\lambda_{exc} = 266 \text{ нм})$	$\Phi(\lambda_{exc} = 266 \text{ нм})$	$\Phi(\lambda_{exc} = 266 \text{ нм})$
	$\Phi(\lambda_{exc} = 250 \text{ нм})$	$\Phi(\lambda_{exc} = 310 \text{ нм})$	$\Phi(\lambda_{exc} = 337 \text{ нм})$
Мазут	1,5	1,6	2,2
Топливо реактивных двигателей	2,1	7,8	8,0
Нефть Саратовская	–	1,6	1,7
МАПЕД	2,0	5,1	8,3

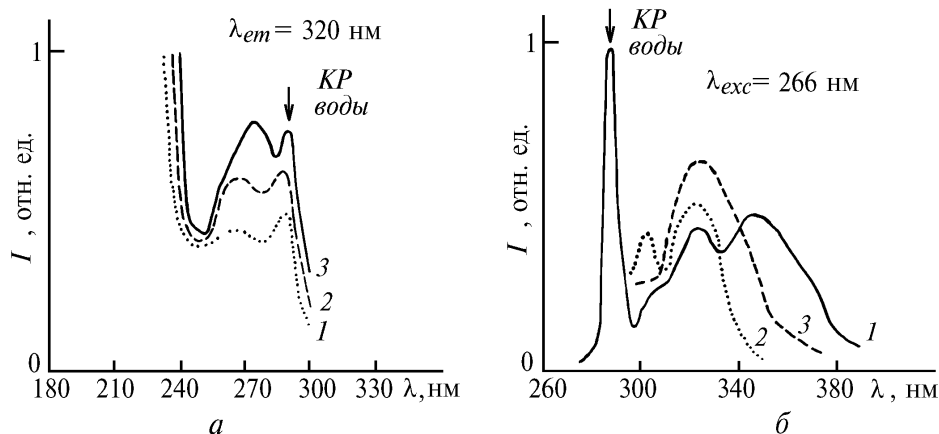


Рис. 3. Корректированные спектры возбуждения (а) и флуоресценции (б) растворенно-эмульгированных нефтепродуктов в воде: 1 – мазут (15 мкг/л); 2 – топливо для реактивных двигателей (50 мкг/л); 3 – нефть Шаимская (25 мкг/л)

Таким образом, между структурой спектров, полученных при $\lambda_{exc} = 266$ нм и химическим (фракционным) составом НУ наблюдается хорошее соответствие, т.е. возможна грубая идентификация загрязнений по основным классам. Минимально детектируемый сигнал флуоресценции соответствовал концентрациям 5 ... 10 мкг/л для различных образцов нефтепродуктов. Эти предельные значения определены с помощью гексановой методики ЮНЕСКО в нашей модификации.

Использование УФ-излучения 260...280 нм для возбуждения НУ в воде обладает еще одним явным преимуществом: автоматически решается проблема разделения спектральных полос НУ и РОВ в воде. Как отмечено выше, изменение длины волны возбуждения в диапазоне 250...310 нм не приводит к сдвигу максимума полосы флуоресценции РОВ и заметному изменению формы контура. Из спектра модельной пробы (рис. 4) видно, что полосы флуоресценции НУ и РОВ при $\lambda_{exc} = 266$ нм разрешаются, максимум флуоресценции находится для НУ на длине волны 320 нм, для РОВ – 420 нм.

Определение оптимальной длины волны возбуждения флуоресценции и возможность спектрального разделения полос НУ и РОВ в воде при таком возбуждении позволили нам надеяться на успешное решение проблемы диагностики НУ по спектрам флуоресценции водных проб. Однако натурные исследования показали, что круг возникающих здесь проблем намного шире, чем нам казалось. Вместе с НУ и РОВ коротковолновым УФ-излучением возбуждаются и неизбежно присутствующие в природной воде белковые соединения.

Таким образом, флуоресцентные спектры природных вод при возбуждении на длине волны 266 нм содержат информацию по крайней мере о трех важнейших компонентах, определяющих экологическое состояние водной среды, и задача состоит в извлечении этой информации из регистрируемых спектров.

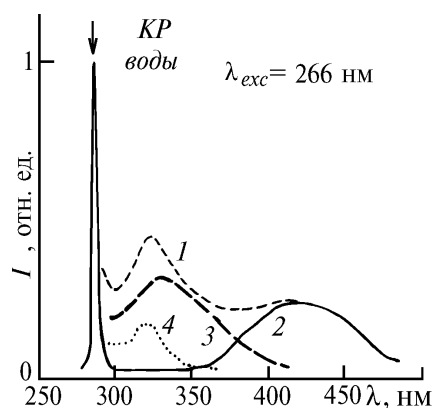


Рис. 4. Спектры флуоресценции модельной пробы воды (1) с различными органическими примесями. Полосы флуоресценции РОВ (2), растворенного белка (3), растворенно-эмульгированной нефти (4)

6. Флуоресценция белковых соединений в воде

Все существующие в природных водах белковые соединения состоят из аминокислот, причем обычно в состав белков входит один и тот же основной набор из 20 ... 22 аминокислот. В зависимости от химического строения аминокислоты разделяются на семь групп. Одна из этих групп, ответственная за флуоресценцию белков, называется группой ароматических и гетероциклических аминокислот и содержит три флуоресцирующие аминокислоты: фенилаланин, тирозин и триптофан.

Флуоресцентные свойства этих ароматических аминокислот известны давно [17]. При включении аминокислот в белок их спектральные характеристики изменяются, что приводит к значительным отличиям СФ свободных аминокислот от СФ белков. Отметим, что вклад трех указанных выше аминокислот в суммарную флуоресценцию белков различен. На основании большого экспериментального материала можно сделать следующие выводы о характере флуоресценции белков и свободных аминокислот [18]:

- ввиду низкого квантового выхода (~4%) флуоресценция фенилаланина практически не наблюдается в белках. Более того, в большинстве экспериментов флуоресценция белков возбуждается в максимуме полос поглощения тирозина и триптофана (280 нм), что еще больше снижает флуоресцентный вклад фенилаланина;

- СФ белков, содержащих тирозин и фенилаланин и не содержащих триптофан, близки к спектру свободного тирозина с $\lambda_{max} = 303$ нм;

- СФ белков, содержащих все три аминокислоты, обладают характерной для триптофана полосой флуоресценции с $\lambda_{max} = 330$ нм, но с небольшим сдвигом положения максимума в область меньших длин волн (~20 нм) в результате экранирования триптофановых остатков от воды белковой матрицей;

- положение флуоресценции различных белков сильно меняется, поскольку индольные кольца триптофановых остатков очень чувствительны к полярности, *pH* и температуре растворителя, реакциям ассоциации и денатурации.

Результаты наших экспериментов по изучению спектральных характеристик ароматических аминокислот и некоторых белков полностью согласуются с указанными выше результатами. Проведенные прямые измерения на малогабаритном лазерном спектрометре при $\lambda_{exc} = 266$ нм показали, что минимально детектируемые концентрации составляют для триптофана – 15 мкг/л, для изученных белков – 100...200 мкг/л. Эти значения соответствуют средним концентрациям аминокислот в природных водах Мирового океана.

Все существующие флуоресцентные методы определения аминокислот в природных водах основаны на добавлении специальных дериватизаторов и сенсibilизаторов и дают суммарное содержание аминокислот. Однако для проведения анализов требуется специальная многочасовая подготовка проб, в течение которой меняется состав проб и протекают некоторые побочные реакции.

Прямой лазерный метод определения белковых соединений был бы лишен этих недостатков. Однако в условиях существования огромного количества различных белковых соединений в природных водах проблема выбора белка или одной свободной аминокислоты в качестве стандарта требует специальных исследований.

7. Заключение

Как видно из приведенных в данной статье результатов, проблема раздельного определения основных классов органических соединений, присутствующих в воде, чрезвычайно сложна и пока не решена окончательно. Авторы надеются, что им удалось сделать очередной шаг на этом пути. Есть определенные основания полагать, что удастся разделить полосы флуоресценции белков и НУ и этот этап работы будет завершен (без учета влияния других флуоресцирующих соединений, например, фенолов).

Далее предстоит решать не менее сложную проблему перехода от флуоресцентных характеристик, в частности параметра $\Phi = I_{\text{фл}}/I_{\text{кр}}$, к качественным и количественным параметрам контролируемых органических комплексов и соединений. Как было показано выше, грубая идентификация РОВ, НУ и белков может быть выполнена уже по спектрам флуоресценции при возбуждении на $\lambda = 266$ нм. После работы [19] определенные надежды возлагались на нелинейную флуориметрию (флуориметрию насыщения), поскольку параметры насыщения оказались различными для разных НУ. Мы продолжили эти исследования с использованием более совершенной техники и методики, позволяющих исключить влияние фотохимических процессов при мощном лазерном возбуждении [3]. Таким образом, поиски путей тонкой идентификации НУ и других органических соединений в воде продолжаются.

Количественная диагностика РОВ также сталкивается с рядом трудностей. При определении концентрации РОВ основным показателем в настоящее время является концентрация органического углерода $C_{\text{орг}}$, техника и методы определения которого составляют отдельную непростую задачу [20]. Далеко не всегда наблюдается высокая корреляция между интенсивностью флуоресценции РОВ и $C_{\text{орг}}$. Причины такой ситуации пока не ясны, и необходимость разобраться с этим вопросом стимулирует наши исследования природы полосы флуоресценции РОВ. В экспедиции на теплоходе <Илья Репин> в июле 1993 г. было проведено сравнение параметров Φ и $C_{\text{орг}}$ на этот раз для сильно загрязненных речных вод [21].

При переходе от параметра Φ для НУ в воде к их концентрациям возникает проблема выбора калибровочного эталонного раствора, который бы наилучшим образом имитировал НУ, реально содержащиеся в воде (хотя бы их флуоресцирующую фракцию). Совпадение спектров флуоресценции НУ, растворенных в гексане и экстрагированных гексаном из воды (см. раздел 4), указывает на правомочность использования одного и того же коэффициента связи α_1 для обоих объектов. Однако и здесь необходимо проявлять осторожность, учитывая многообразие природных ситуаций, в которых происходит формирование растворенно-эмульгированных в воде НУ.

Таковы некоторые из проблем, которые необходимо решить на пути разработки научно-обоснованных методов лазерной диагностики органических соединений в воде.

1. I k e n G. R. et al. edc. Humic substance in soil sediments and water. New York: 1985. 156 p.
2. R o o k J. J. // Water treatment exam. 1974. V. 23 P. 234–243.
3. F i l i p p o v a E. M. // Proc. of XVII Congress ISPRS'92. Washington. USA. 2–14 Aug. 1992 in: IAPRS. XXIX. Part B7. Commision VII. P. 631–634.
4. A d l a r d E. R. // Journal of Institute of Petroleum. 1972. №63. P. 58.
5. M o r e l G. et al. // Fresenius Journal of Anal. Chem. 1991. V. 339. №10. P. 699–715.
6. К л и м к и н В. М. и др. // Оптика атмосферы и океана. 1993. Т. 6. №2. С. 189–204.
7. D u d e l z a k A. E. et al. // Appl. Opt. 1991. V. 30. № 4. P. 453–457.
8. Д р о з д о в а Т. В. Геохимия аминокислот. М.: Наука, 1977. 200 с.
9. A m e r i c a n Society for Testing and Materials. ASTM Book of Standarts. D3650–78. 1978. P.720.
10. I n t e r n a t i o n a l Oceanographic Commission. IOC/UNESCO. Manual and Guides. №13. Paris, 1984. P. 35.
11. T h e o b a l d N. // Marine Pollution Bulletin. 1989. №20. P. 134.
12. А б р о с к и н А. Г. и др. // Доклады АН СССР. 1988. Т. 229. С. 351.
13. А б р о с к и н А. Г., Н о л ь д е С. Е., Ф а д е е в В. В. // Оптика атмосферы. 1988. Т. 1. №11. С. 99.
14. С и м о н о в А. И. и др. // Труды ГОИН. 1979. Вып. 149. С. 5–16.
15. А л е к с е е в а Т. А. и др. Спектрофлуориметрические методы анализа ароматических углеводородов в природных и техногенных средах. Л.: Гидрометеоздат, 1981. 215 с.

16. Horning A. W. // Marine Pollution Monitoring NBS Special Publication. 1974. №409. P. 135–144.
17. Владимиров Ю. А. Фотохимия и люминесценция белков. М.: Наука, 1965. 233 с.
18. Лакович Дж. Основы флуоресцентной спектроскопии. М.: Мир, 1986. 496 с.
19. Филиппова Е. М. // 38th Canadian Spectroscopy Conference. 9–12 Aug. 1992. P. 70.
20. Люцарев С. В., Чубаров В. В. // Оптика атмосферы и океана. 1994. Т. 7. №4. С. 479 – 491.
21. Глушков С. М., Фадеев В. В., Чубаров В. В. // Оптика атмосферы и океана. 1994. Т. 7. №4. С. 464 – 473.

Московский государственный университет
им. М.В. Ломоносова

Поступила в редакцию
17 января 1994 г.

S. M. Glushkov, V. V. Fadeev, E. M. Filippova, V. V. Chubarov. **Problems of Laser Fluorometry of Organic Admixtures in Natural Water.**

In this paper we analyse some new possibilities of applying laser fluorescence spectroscopy to diagnostics of organic matter in natural waters like, for example, oil products, dissolved organic matter, and albumins which mainly determine the ecological conditions in natural waters. In particular we analyse a direct (without sampling) laser fluorescence technique for identification of such admixtures at excitation with radiation at 266 μm wavelength. The results obtained in this study are the next step in solving the problem on remote laser monitoring of natural waters.