

## ОПТИКА И СПЕКТРОСКОПИЯ

УДК 535.372

**ФЛУОРЕСЦЕНЦИЯ НАНОЧАСТИЦ РАСТВОРЕННОГО ОРГАНИЧЕСКОГО ВЕЩЕСТВА В ПРИРОДНОЙ ВОДЕ****А. С. Милюков, С. В. Пацаева, В. И. Южаков, О. М. Горшкова<sup>\*)</sup>,  
Е. М. Пращикина<sup>\*)</sup>***(кафедра общей физики)*

E mail: spatsacva@mail.ru

**Проведено исследование флуоресценции наночастиц растворенного органического вещества (РОВ) для различных фракций при следующих длинах волн возбуждения флуоресценции: 270, 310 и 355 нм. Получены значения квантового выхода флуоресценции коллоидной (с размером молекул от 5 до 200 нм) и низкомолекулярной (с размером молекул менее 5 нм) фракций. Показано, что положение максимума спектра испускания зависит от размера молекул РОВ и от длины волны возбуждения.**

Под растворенным органическим веществом (РОВ) понимают смесь высокомолекулярных и низкомолекулярных органических соединений различной химической природы, находящихся в природной воде и участвующих в биогеохимических процессах. В состав РОВ входят белки, полипептиды, нуклеиновые кислоты, углеводы, гуминовые и фульвовые кислоты, низкомолекулярные органические кислоты и их соли, спирты, альдегиды, кетоны и многие другие органические вещества [1]. Все они имеют разное химическое строение, молекулярную массу и размер молекулы (от 5 до 1000 нм).

РОВ природного происхождения флуоресцирует [2–5], поэтому применение флуоресцентного анализа для диагностики природных вод является эффективным методом, отличающимся высокой чувствительностью, дистанционностью и экспрессностью.

Необходимость исследования спектральных характеристик РОВ обусловлена целым рядом современных научных и практических проблем. Экологический мониторинг природных вод, перераспределение и концентрирование загрязняющих веществ на геохимических барьерах (например, при смешении пресных и соленых вод, вод с различной температурой, в придонных слоях на границе раздела поверхностных вод с атмосферой), перенос вещества между океаном, атмосферой и литосферой, эвтрофикация природных вод, проведение оптических измерений в воде, оценка качества воды в процессе водоподготовки и обеззараживания на водопроводных станциях — все эти проблемы требуют изучения флуоресценции РОВ природной воды и его характеристик.

Целью настоящей работы стало применение спектральных методов к изучению наночастиц РОВ

в природной воде, компоненты которого являются неотъемлемыми звеньями природной трофической цепи. Было проведено исследование спектральных особенностей наночастиц РОВ в коллоидной и низкомолекулярной формах. Последовательно были осуществлены микро- и ультрафильтрации отобранных проб — разделение РОВ на фракции в зависимости от молекулярной массы частиц, измерение оптической плотности и спектров испускания флуоресценции фракций РОВ, анализ полученных спектров, расчет величины квантового выхода флуоресценции РОВ и выявление спектральных свойств и закономерностей для выделенных фракций. Разделение РОВ на фракции необходимо для последующего установления групп флуорофоров, определяющих его спектральные свойства, и выяснения характера их физико-химического взаимодействия.

**Материалы и методы исследования молекулярных фракций РОВ**

Пробы воды были отобраны в октябре 2005 г. в р. Москве по ходу ее течения в четырех различных точках, расположенных в следующем порядке:

- проба № 1 (д. Барсуки, верховье р. Москвы, фоновый створ);
- проба № 2 (после прохождения реки через г. Москву и ее окрестности, 0.2 км выше г. Воскресенска);
- проба № 3 (1.0 км ниже г. Воскресенска, после техногенного геохимического барьера);
- проба № 4 (г. Коломна, 0.1 км выше устья р. Москвы).

Фильтрация водных проб была осуществлена в два этапа по схеме, представленной на рис. 1. Сначала из проб была удалена органическая взвесь при помощи лавсанового мембранного фильтра МФ-200

<sup>\*)</sup> Географический факультет МГУ им. М. В. Ломоносова.

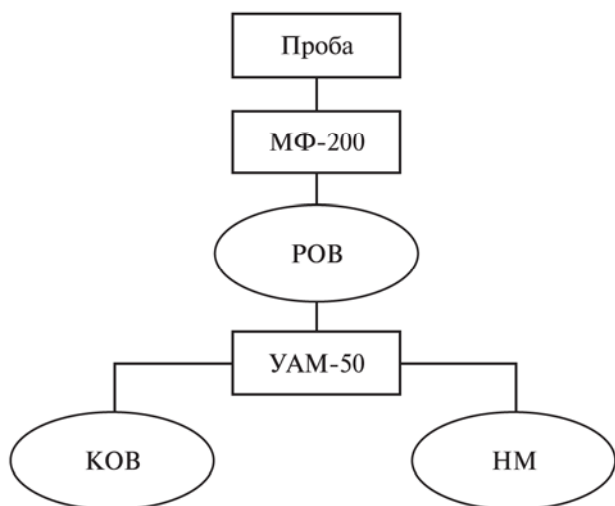


Рис. 1. Схема микро- и ультрафильтрации проб воды р. Москвы

(Дубна, Россия) с диаметром пор 200 нм. После фильтрации на МФ-200 пробы были распределены по трем идентичным системам стаканной ультрафильтрации, представляющими собой второй этап. Для ультрафильтрации использовался ацетилцеллюлозный фильтр УАМ-50 (Владипор, Россия) с номинальным диаметром пор 5 нм. Коэффициент удержания по раствору рафинозы (молекулярный вес около 600 дальтон) в воде составлял в среднем по трем фильтрам  $96.5 \pm 1.0\%$  для трех ультрафильтрационных ячеек.

Молекулярные комплексы РОВ размером менее 5 нм, образующие низкомолекулярную (НМ) фракцию РОВ, проникли через мембрану. Над фильтром были удержаны наночастицы РОВ, которые составили так называемую коллоидную фракцию РОВ (КОВ) с размером молекул от 5 до 200 нм.

### Спектральные измерения

Спектры испускания флуоресценции были измерены с использованием спектрофлуориметра Perkin Elmer LS55 при возбуждении на длинах волн 270, 310 и 355 нм. Выбор длин волн возбуждения учитывает накопленный экспериментальный опыт научных групп, изучающих РОВ [2–7], и во многом определяется длинами волн возбуждения основных компонент РОВ. Спектры поглощения и значения оптической плотности были получены на спектрофотометрах Specord M40 и Perkin Elmer Lambda 35. Все измерения были выполнены при комнатной температуре в стандартных кварцевых кюветах толщиной 1 см.

Были проведены исследования растворов гуминовой кислоты Aldrich в пяти различных концентрациях: 0.495; 0.99; 1.99; 3.96 и 7.92 мг/л — и растворов сульфата хинина в воде с добавлением серной кислоты  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , взятой в концентрации 0.05 моль/л (четыре различные концентрации кра-

сителя порядка  $10^{-7}$  моль/л каждая, а также четыре его эталонных концентрации:  $4 \cdot 10^{-6}$ ,  $8 \cdot 10^{-6}$ ,  $2 \cdot 10^{-5}$  и  $4 \cdot 10^{-4}$  моль/л).

Растворы сульфата хинина использовались для расчета абсолютных значений квантового выхода флуоресценции методом эталонного красителя [8] для фракций РОВ и гуминовой кислоты. Во-первых, выбор в качестве эталонного красителя сульфата хинина обусловлен тем, что его полоса испускания флуоресценции близка по форме, ширине и положению максимума к тем же спектральным характеристикам изучаемых водных проб. Во-вторых, квантовый выход сульфата хинина в водном растворе серной кислоты неоднократно был измерен многими исследователями, известен с хорошей точностью и рекомендован в качестве эталонного [9]. Квантовый выход флуоресценции водных растворов сульфата хинина зависит от типа добавляемой кислоты, ее концентрации и температуры. Он не зависит от длины волны возбуждения в диапазоне 290–360 нм и концентрации красителя при концентрациях меньших  $10^{-6}$  моль/л.

Расчет величины квантового выхода флуоресценции изучаемых растворов производился по следующей схеме:

- рассчитывались значения интегральной интенсивности испускания флуоресценции для каждого раствора (с вычитанием сигнала комбинационного рассеяния воды в тех случаях, где это было необходимо);
- определялись значения оптической плотности  $D_\lambda$  на длине волны возбуждения спектров флуоресценции (для растворов хинина, имеющих относительно высокий квантовый выход, задача усложнялась малыми величинами оптической плотности); значения оптической плотности на 310 и 355 нм для растворов сульфата хинина рассчитывались путем экстраполяции значений оптической плотности на этих длинах волн для эталонных концентраций в область меньших концентраций (концентрации разведенных растворов (порядка  $10^{-7}$  моль/л) рассчитывались по значениям оптической плотности в максимуме спектра поглощения на 250 нм, при этом для растворов сульфата хинина форма спектра поглощения считалась неизменной во всем исследованном диапазоне);
- значения оптической плотности на длине волны возбуждения флуоресценции и интегральной интенсивности испускания флуоресценции для каждой из полученных концентраций раствора хинина сульфата использовались для построения зависимостей  $I_{\text{fluor}}(D_\lambda)$  эталонного красителя (рис. 2), а линейная аппроксимация полученных зависимостей  $I_{\text{fluor}}(D_\lambda)$  для растворов различной концентрации использовалась для определения тангенса угла наклона  $K_{\text{stand}}$  соответствующих прямых;
- для водных проб РОВ в качестве соответствующей величины тангенса угла наклона  $K$  исполь-

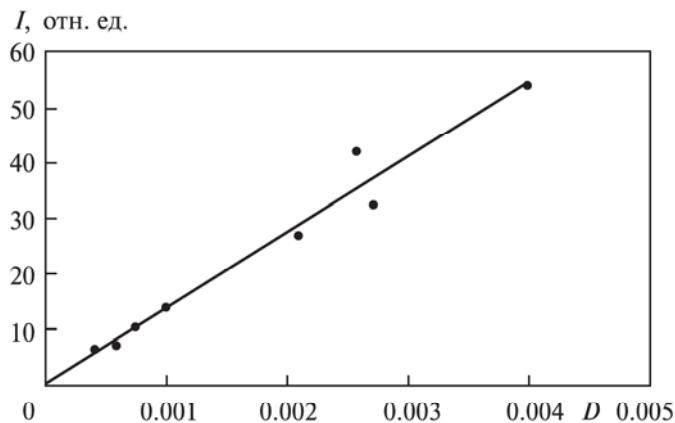


Рис. 2. Зависимость интегральной интенсивности флуоресценции от оптической плотности  $I_{\text{флюо}}(D_{\lambda})$  для растворов сульфата хинина

зовали отношение интегральной интенсивности флуоресценции к оптической плотности на длине волны возбуждения (310 или 355 нм);

- значение квантового выхода изучаемого раствора  $\Phi$  рассчитывалось по формуле  $\Phi = \Phi_{\text{stand}}(K/K_{\text{stand}})$ , где  $\Phi_{\text{stand}}$  — значение квантового выхода флуоресценции эталонного красителя. При расчетах для сульфата хинина в водном растворе серной кислоты концентрации 0.05 моль/л за известное значение квантового выхода принималось  $\Phi = 0.508$  [9].

### Испускание флуоресценции фракций РОВ

Типичный спектр люминесценции фракций РОВ при возбуждении УФ-светом имеет широкую полосу испускания с максимумом в районе 410–440 нм. Длина волны максимума спектра испускания зависит от длины волны возбуждения и от типа фракции РОВ.

У коллоидной фракции (КОВ) положение максимума спектра флуоресценции сдвинуто в длинно-

волновую область относительно максимума спектра флуоресценции исходной пробы РОВ. Максимум испускания НМ фракции, наоборот, сдвинут в направлении малых длин волн относительно максимума испускания исходной пробы РОВ (рис. 3). Это явление может быть объяснено тем, что, как правило, более крупные молекулярные агрегаты имеют спектр испускания, сдвинутый в длинноволновую область по сравнению со спектрами мономеров и меньших молекулярных комплексов [10].

Положение максимума полосы испускания флуоресценции различных фракций РОВ зависит от длины волны возбуждения, что видно на рис. 4. При возбуждении на 270 и 355 нм положение максимума приходится на 430–440 нм. При возбуждении на 310 нм происходит так называемый «синий сдвиг» максимума в сторону более коротких волн. Положение максимума испускания при этой длине волны возбуждения приходится на диапазон 417–427 нм в зависимости от типа пробы. Такой «синий сдвиг» впервые был зафиксирован при изучении морских и эстуарных водных проб. Этот сдвиг обусловлен возбуждением на 310 нм дополнительных групп флуорофоров и хромофоров [5, 6].

Значения оптической плотности и абсолютные значения квантового выхода фракций РОВ приведены в таблице. (Каждая из исследуемых проб РОВ распределялась по трем независимым идентичным фильтрационным системам в целях повышения статистической значимости полученных экспериментальных значений для выделенных фракций.)

Усреднение по четырем пробам РОВ, трем коллоидным и трем низкомолекулярным фракциям дало следующие значения квантового выхода при возбуждении на 355 нм:

- образцы РОВ:  $\Phi = (1.75 \pm 0.25) \cdot 10^{-2}$ ;
- НМ-фракция:  $\Phi = (2.07 \pm 0.40) \cdot 10^{-2}$  (приблизительно на 20% больше, чем у фракции РОВ);

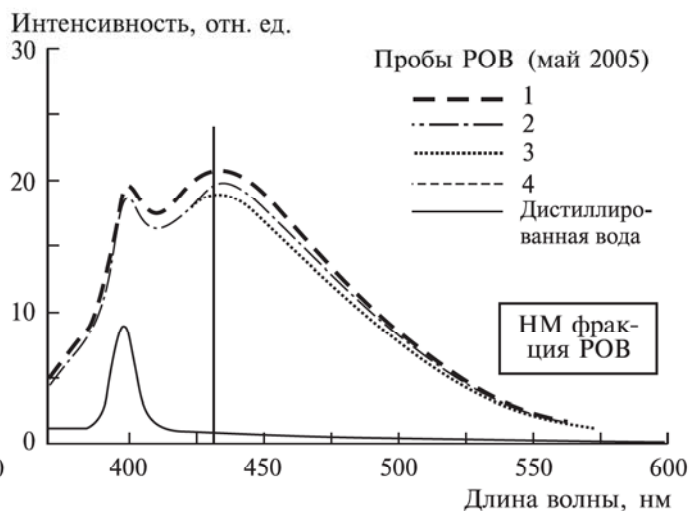
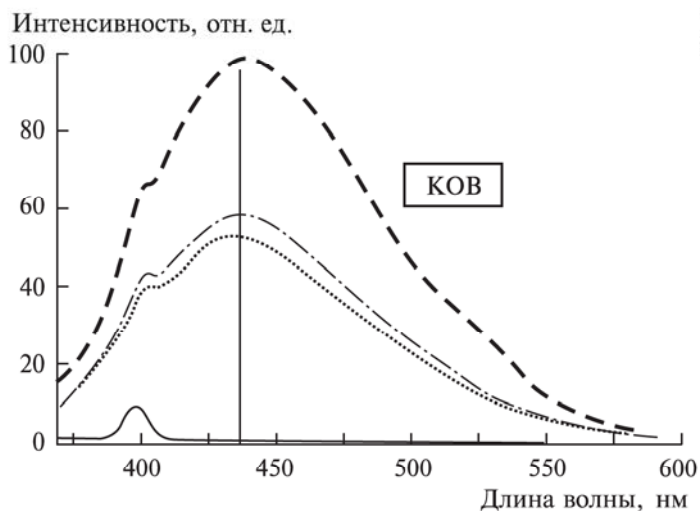


Рис. 3. Спектры флуоресценции фракций РОВ с различным размером частиц при возбуждении на 355 нм

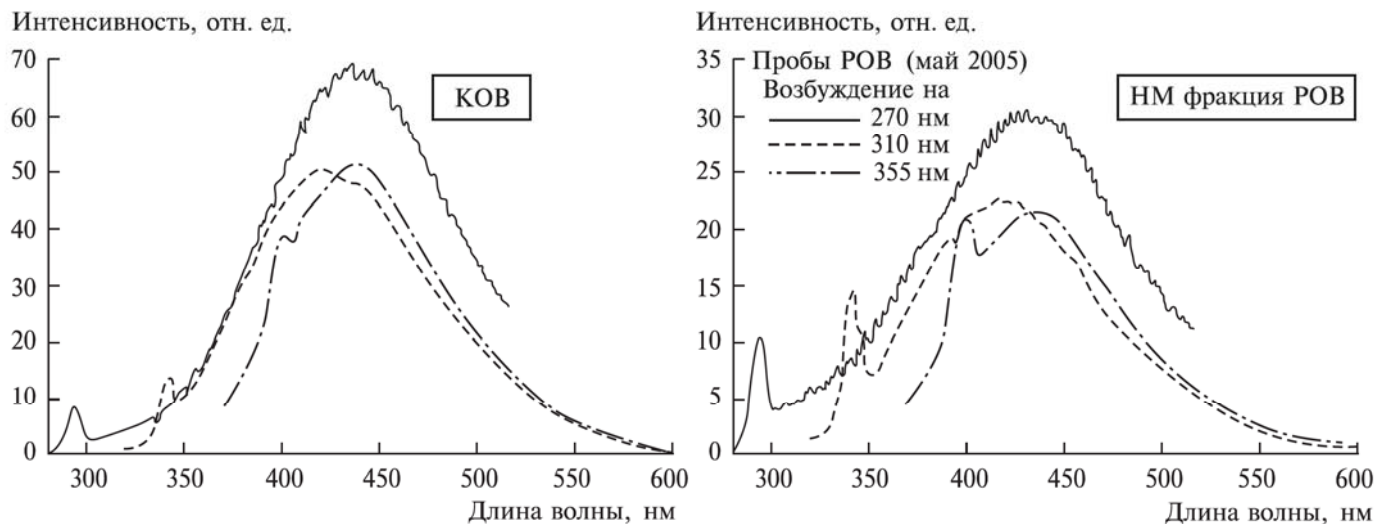


Рис. 4. Спектры флуоресценции фракций РОВ с различным размером частиц при возбуждении на 270, 310 и 355 нм

**Значения оптической плотности и квантового выхода флуоресценции фракций РОВ**

Место забора пробы	№ фильтра	$D_{355}$	$\Phi_{355}$
Фракция РОВ			
д. Барсуки		0.018	$1.64 \cdot 10^{-2}$
г. Воскресенск (верх)		0.028	$2.00 \cdot 10^{-2}$
г. Воскресенск (низ)		0.039	$1.34 \cdot 10^{-2}$
г. Коломна		0.013	$2.00 \cdot 10^{-2}$
Фракция НМ			
д. Барсуки	1	0.012	$1.98 \cdot 10^{-2}$
	2	0.011	$2.05 \cdot 10^{-2}$
	3	0.008	$2.18 \cdot 10^{-2}$
г. Воскресенск (верх)	1	0.028	$1.62 \cdot 10^{-2}$
	2	0.026	$1.72 \cdot 10^{-2}$
	3	0.015	$1.71 \cdot 10^{-2}$
г. Воскресенск (низ)	1	0.030	$1.60 \cdot 10^{-2}$
	2	0.024	$1.80 \cdot 10^{-2}$
	3	0.019	$2.00 \cdot 10^{-2}$
г. Коломна	1	0.010	$2.20 \cdot 10^{-2}$
	2	0.007	$2.85 \cdot 10^{-2}$
	3	0.006	$3.10 \cdot 10^{-2}$
Фракция КОВ			
д. Барсуки	1	0.028	$1.43 \cdot 10^{-2}$
	2	0.030	$1.36 \cdot 10^{-2}$
	3	0.037	$1.13 \cdot 10^{-2}$
г. Воскресенск (верх)	1	0.040	$1.37 \cdot 10^{-2}$
	2	0.042	$1.32 \cdot 10^{-2}$
	3	0.040	$1.37 \cdot 10^{-2}$
г. Воскресенск (низ)	1	0.054	$1.16 \cdot 10^{-2}$
	2	0.046	$1.36 \cdot 10^{-2}$
	3	0.049	$1.23 \cdot 10^{-2}$
г. Коломна	1	0.016	$2.00 \cdot 10^{-2}$
	2	0.020	$1.83 \cdot 10^{-2}$
	3	0.020	$1.55 \cdot 10^{-2}$

• фракция КОВ:  $\Phi = (1.43 \pm 0.25) \cdot 10^{-2}$  (приблизительно на 20% меньше, чем у фракции РОВ).

НМ фракция РОВ имеет большие значения квантового выхода по сравнению с коллоидной фракцией, что коррелирует с соответствующими результатами, полученными при изучении флуоресценции фракций фульвовых кислот [11]. По данным работы [11], у фульвовых кислот, входящих в состав РОВ, при возбуждении на длине волны 337 нм низкомолекулярные компоненты обладают в два раза более высокими квантовыми выходами флуоресценции по сравнению с высокомолекулярными.

Рассчитанные нами значения квантового выхода по порядку величины находятся в хорошем согласии с подобными значениями для фракций РОВ, полученных в работе [12] методом тангенциальной ультрафильтрации, при возбуждении на длине волны 313 нм. Сопоставление данных для всех представленных проб и невысокая погрешность (менее 20%) рассчитанных средних значений позволяет сделать вывод о высокой чувствительности используемого метода и его приемлемости для дальнейших более детальных исследований наночастиц РОВ.

**Заключение**

При возбуждении светом с длиной волны  $\lambda = 310$  нм для всех фракций РОВ наблюдается «синий» сдвиг максимума флуоресценции относительно соответствующих максимумов при возбуждении на  $\lambda = 270$  нм и  $\lambda = 355$  нм. Наблюдается сдвиг максимума флуоресценции КОВ в более длинноволновую область спектра на 5–12 нм относительно максимума флуоресценции низкомолекулярных фракций.

Проведен расчет абсолютных значений квантового выхода флуоресценции  $\Phi$  (под которым мы понимаем квантовый выход флуоресценции суммы компонентов РОВ или его фракции). Для фракций

РОВ значение  $\Phi$  лежит в диапазоне от  $1.1 \cdot 10^{-2}$  до  $3.1 \cdot 10^{-2}$  при возбуждении на 355 нм. У гуминовых кислот значение  $\Phi$  составило  $2.5 \cdot 10^{-3}$ . Наночастицы РОВ большего размера имеют меньший квантовый выход флуоресценции. При возбуждении на  $\lambda = 355$  нм квантовый выход флуоресценции КОВ уменьшается на 20% в сравнении с квантовым выходом исходного РОВ, в то время как соответствующее значение квантового выхода для низкомолекулярных фракций увеличивается на 20%.

Авторы выражают благодарность сотруднику химического факультета МГУ В. И. Бекетову за предоставленные растворы сульфата хинина.

#### Литература

1. *Leenher J., Croué J.* // Environmental Science & Technology. 2003. January. P. 19.
2. *Пацаева С.В., Фадеев В.В., Южаков В.И.* и др. // Вестн. Моск. ун-та. Физ. Астрон. 1992. № 5. С. 38.
3. *Пацаева С.В., Фадеев Е.М., Южаков В.И.* и др. // Вестн. Моск. ун-та. Физ. Астрон. 1991. № 6. С. 71.
4. *Пацаева С.В., Филиппова Е.М., Южаков В.И.* и др. // Вестн. Моск. ун-та. Физ. Астрон. 1991. № 4. С. 76.
5. *Милюков А.С., Горшкова О.М., Пацаева С.В., Южаков В.И.* // Всеросс. научн. конф. студентов-физиков и молодых ученых ВНКСФ-12. Секция «Биофизика». Новосибирск, 2006. С. 534.
6. *Parlanti E., Worz K., Geoffroy L., Lamotte M.* // Org. Geochem. 2000. P. 1765.
7. *De Souza Sierra M.M., Donard O.F.X., Lamotte M.* et al. // Marine Chemistry. 1994. P. 127.
8. *Лакович Дж.* Основы флуоресцентной спектроскопии. М., 1986.
9. *Velapoldi R.A., Mielenz K.D.* Standard Reference Materials: a fluorescence standard reference material: quinine sulfate dehydrate. National Bureau of Standards, January 1980.
10. *Южаков В.И.* // Успехи химии. 1979. **48**, № 11. С. 2007.
11. *Першина И.В., Вермул В.М., Аброскин А.Г.* и др. // Вестн. Моск. ун-та. Химия. 1989. № 4. С. 368.
12. *Belin C., Quéllec C., Lamotte M.* et al. // Environmental Technology. 1993. **14**. P. 1131.

Поступила в редакцию  
22.11.06