

## Усовершенствование флуориметрического метода для определения полициклических ароматических углеводородов в объектах окружающей среды

© 2021. О. А. Плотникова, к. х. н., доцент,  
Саратовский государственный технический университет имени Гагарина Ю. А.,  
410054, Россия, г. Саратов ул. Политехническая, д. 77,  
e-mail: plotnikova\_o\_a@mail.ru

Контроль содержания полициклических ароматических углеводородов (ПАУ) в объектах окружающей среды является важной задачей экологического мониторинга, поскольку данные вещества даже в крайне малых концентрациях представляют угрозу для здоровья населения. Перспективными для определения ПАУ являются методы молекулярной спектроскопии: спектрофотометрические и люминесцентные. В работе представлены характерные спектры поглощения и флуоресценции ряда ПАУ, указаны их длины волн возбуждения и флуоресценции. Проведено сравнительное исследование метрологических характеристик определения представителя ПАУ (пирена) методами спектрофотометрии и флуориметрии в растворах, а также твёрдофазной флуориметрии с предварительным мицеллярным и сорбционным концентрированием на твёрдой матрице. Полученные данные подтверждают тот факт, что флуоресцентные методы характеризуются более низкими пределами обнаружения, чем методы, основанные на регистрации поглощения веществ. При этом применение твёрдофазной люминесценции на модифицированной неионогенным поверхностно-активным веществом Тритоном X-100 вискозной матрице позволяет проводить количественное определение пирена в диапазоне концентраций от 1 до 100 нг/мл, приводит к усилению аналитического сигнала и снижению предела обнаружения пирена в растворах до 0,8 нг/мл ( $s_r = 0,05$ ), что особенно важно для разработки методов контроля экотоксикантов, содержащихся в окружающей среде в «следовых» концентрациях.

**Ключевые слова:** полициклические ароматические углеводороды, спектроскопические методы, спектрофотометрия, флуориметрия, сорбционное концентрирование, твёрдофазная флуоресценция.

## Improvement of fluorometric method for polycyclic aromatic hydrocarbons determination in environmental objects

© 2021. O. A. Plotnikova ORCID: 0000-0003-2715-044X  
Yuri Gagarin State Technical University of Saratov,  
77, Politechnicheskaya St., Saratov, Russia, 410054,  
e-mail: plotnikova\_o\_a@mail.ru

The selection of suitable pre-sample preparation and analysis methods for effective monitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the environment is essential. An important task is to control the PAHs content in various media. These substances, even at low concentrations, can pose a threat to public health, can have carcinogenic, mutagenic and teratogenic effects on living organisms. A distinctive feature of PAHs molecules is the ability to absorb energy and luminescence under the influence of UV radiation. In this regard, spectroscopic methods are promising for the PAHs determination.

The paper presents the characteristic absorption and fluorescence spectra of PAHs, and indicates their excitation and fluorescence wavelengths. An experimental study of the metrological characteristics of various spectroscopic methods has been carried out. The PAHs representative pyrene was determined by spectrophotometry and fluorimetry in solutions, as well as solid-phase fluorimetry with preliminary micellar and sorption concentration on a solid matrix. The use of aqueous micellar solutions of the nonionic surfactant Triton X-100 made it possible to enhance the analytical signals for the pyrene determination. The data obtained confirm the fact that the fluorescence method is characterized by a higher sensitivity than the method based on the registration of these substances' absorption. The linear range of concentrations determined by the spectrophotometric method is more significant in comparison with the fluorometric methods and amounts to 14–10000 ng/mL. At the same time, the combination of preliminary micellar and sorption concentration with solid-phase fluorescence on a modified by surfactants viscose matrix made it possible to reduce the detection limit of pyrene to 0.8 ng/mL ( $s_r = 0,05$ ), which is especially important for the development of methods for controlling ecotoxicants contained in the environment in “trace” concentrations. The linear range of the determined concentrations by this method is 1–100 ng/mL.

**Keywords:** polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), spectroscopic methods, absorption spectrophotometry, fluorimetry, sorption concentration, solid-phase fluorescence.

Технический прогресс, развитие промышленности и транспортных систем усугубляет проблему загрязнения окружающей среды (ОС). Особую опасность представляют такие экотоксиканты, как полициклические ароматические углеводороды (ПАУ). Многие из представителей ПАУ способны оказывать канцерогенное, мутагенное и тератогенное воздействие на живые организмы даже при «следовых» концентрациях в ОС [1–4]. Встречаются ПАУ повсеместно: в воздухе, воде, почве, биоте. Различают как естественные, так и антропогенные источники образования ПАУ, причём вклад последних более значителен. Образуются ПАУ при сжигании и переработке органического сырья, нефтепродуктов, угля, древесины, мусора и т. д. [5–7].

Для эффективного контроля содержания ПАУ в ОС важным является выбор эффективных методов их обнаружения. Предпочтительны высокочувствительные методы инструментального анализа с низкими пределами обнаружения. Обычно применяются хроматографические методы с различными (в том числе флуоресцентными) способами детекции, хромато-масс-спектрометрия, капиллярный электрофорез, электрохимический анализ, иммунологические и другие методы [8, 9]. Основные недостатки современных методов – дорогостоящее аппаратное оснащение, большая длительность и сложность пробоподготовки и анализа, недостаточная чувствительность и селективность.

Поскольку ПАУ являются известными люминофорами, так как их молекулы способны к поглощению и эмиссии энергии под действием УФ-излучения, определёнными преимуществами для их анализа обладают методы молекулярной спектроскопии [10]. Достаточно распространённым для мониторинга объектов ОС на содержание различных веществ, в том числе и ПАУ, является спектрофотометрический метод [11–13]. Однако анализ многокомпонентных смесей данным методом без предварительного разделения веществ затруднён. Более чувствительным и селективным, чем УФ-спектрофотометрия, является люминесцентный анализ, широко применяемый для определения ПАУ [14]. При этом качественный и количественный анализ веществ можно проводить по их спектрам флуоресценции и фосфоресценции.

Целью данной работы являлось получение спектральных данных ряда ПАУ посредством регистрации спектров поглощения и флуоресценции, сравнительное исследование

метрологических характеристик определения представителя ПАУ (пирена) методами абсорбционной спектрофотометрии и флуориметрии в растворах, а также твёрдофазной флуориметрии с предварительным мицеллярным и сорбционным концентрированием на твёрдой матрице.

### Объекты и методы исследования

В качестве ПАУ применяли препараты фирмы «Сигма-Алдрич», контроль состава которых проводился по спектрам поглощения и флуоресценции. Растворение препаратов проводили при помощи ультразвуковой ванны «ПСБ-4035-05» объёмом 4 л (ЗАО «ПСБ-Галс», г. Москва).

Для приготовления водно-мицеллярных растворов (ВМР) применялось неионогенное поверхностно-активное вещество (ПАВ) – полиоксиэтилен (10) моно-4-изооктилфенилового эфира – Тритон X-100 (ТХ-100) (фирмы «Сигма»), содержание основного вещества в котором составило  $99 \pm 1\%$ . Молекулярная формула ТХ-100 –  $C_{34}H_{62}O_{11}$ , критическая концентрация мицеллообразования (ККМ) –  $2,4 \cdot 10^{-4}$  моль/л. Концентрация ТХ-100 в рабочих растворах соответствовала ККМ.

Для сорбции и твёрдофазной флуоресценции применялась гидрофобная матрица из нетканого вязкого материала, плотностью –  $70 \text{ г/м}^2$ , толщиной –  $0,39 \text{ мм}$  («Ленфильтр», Санкт-Петербург). Вязкий материал готовится производителем из концентрированного раствора ксантогената целлюлозы в разбавленном растворе NaOH (рис. 1). Выбор вязкой матрицы обусловлен её структурой, сорбционными свойствами и люминесцентными характеристиками, полученными в результате предварительных сравнительных исследований различных матриц [15].

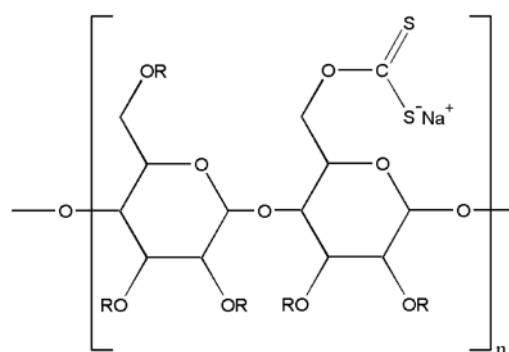


Рис. 1. Химическая формула ксантогената целлюлозы  
Fig. 1. Chemical formula of cellulose xanthate

Сорбцию пирена на матрицу проводили в динамическом режиме в сорбционной колонке. Затем вязкую матрицу извлекали, сушили 5 мин при температуре 60 °С и регистрировали спектры флуоресценции.

Флуоресценция пирена в растворах и на матрице исследовалась на спектрофлуориметре «Флуорат-02-Панорама» (Россия). Фотометрический анализ растворов проводился на двухлучевом сканирующем УФ-ВИД спектрофотометре ПромЭкоЛаб ПЭ-6100УФ (Россия). Спектры поглощения и флуоресценции получены при концентрации ПАУ  $5 \cdot 10^{-6}$  моль/л в водно-этанольных растворах в трёхкратной повторности опыта. Метрологические характеристики количественного определения пирена по спектрам поглощения и флуоресценции получены при повторности опытов, равной 3 для каждой концентрации пирена и 20 – для холостых проб.

### Результаты и обсуждение

Как отмечалось ранее, методы оптической спектроскопии перспективны для определения ПАУ, так как данные соединения содержат хромоформные группы, способные поглощать и излучать энергию с определёнными длинами волн. Спектры поглощения веществ обусловлены электронными переходами частиц вещества из основного состояния в возбуждённое, а спектры их люминесценции – обратным переходом из возбуждённого в основное. Спектры разных веществ достаточно специфичны, их форма зависит от структуры молекул вещества.

Экспериментально были получены спектры поглощения и флуоресценции ряда ПАУ, представленные на рисунке 2 (см. цв. вкладку).

Флуоресценция наблюдается при возбуждении молекул светом определённой длины волны, характерной для каждого соединения (табл. 1).

Далее было проведено сравнительное исследование спектрофотометрического и флуориметрического количественного опре-

деления одного из представителей класса ПАУ – пирена. Для этих целей регистрировались спектры поглощения и флуоресценции пирена в растворах и на вязкой матрице. Для улучшения аналитических характеристик применялось мицеллярное и сорбционное концентрирование.

Известно [17], что солиubilизация гидрофобных веществ в микрофазе мицеллярной системы существенно увеличивает интенсивность аналитического сигнала и, как следствие, растёт чувствительность и улучшается селективность как фотометрического, так и люминесцентного анализа. Ранее было установлено [18], что максимальный сигнал флуоресценции ПАУ наблюдается при концентрациях ПАВ вблизи ККМ. Экспериментально этот факт был подтверждён при регистрации спектров флуоресценции пирена в ВМР неионогенного ПАВ ТХ-100, результаты представлены на рисунке 3а (см. цв. вкладку).

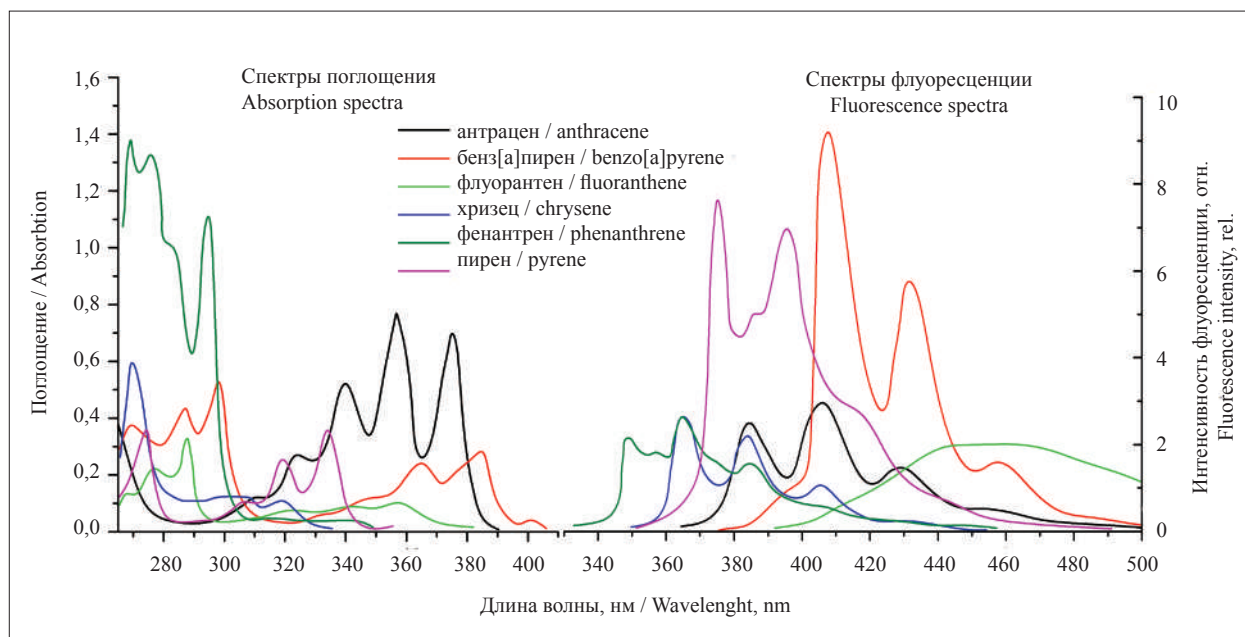
Также известно, что иммобилизация люминофора на твёрдой матрице способствует увеличению интенсивности флуоресценции за счёт снижения вероятности реализации процесса безызлучательной дезактивации энергии электронного возбуждения при более «жестком» закреплении молекулы [19, 20]. В данном случае молекулы сконцентрированы на поверхности, относительно изолированы, их столкновения ограничены, уменьшается вероятность процессов тушения, в связи с чем данный способ позволяет с высокой чувствительностью определять многие органические и неорганические вещества при комнатной температуре.

Предварительные исследования показали, что улучшить аналитические характеристики метода твёрдофазной флуоресценции позволяет сочетание солиubilизации гидрофобных аналитов в микрообъёме мицелл с последующим динамическим сорбционным концентрированием и регистрацией аналитического сигнала непосредственно на твёрдой матрице [21, 22]. Также необходимо отметить, что при регистрации твёрдофазной флуоресценции

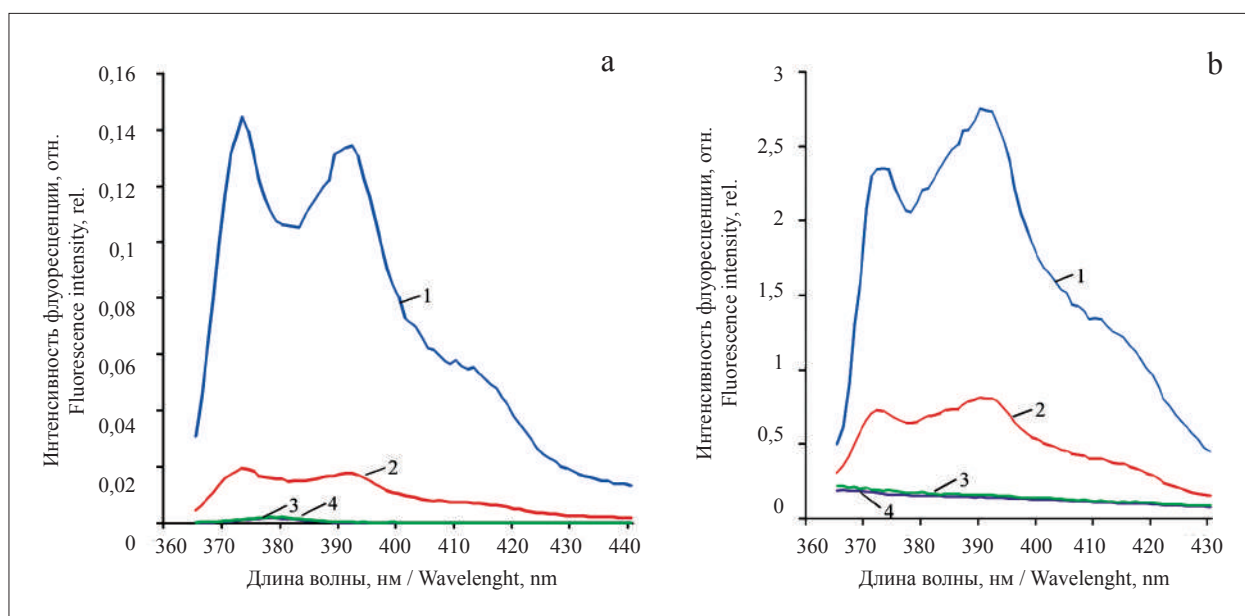
Таблица 1 / Table 1  
Спектральные характеристики ПАУ [16] / Spectral characteristics of PAHs [16]

ПАУ / PAHs	$\lambda_{\text{возб.}}$ , нм / $\lambda_{\text{ex.}}$ , nm	$\lambda_{\text{фл.}}$ , нм / $\lambda_{\text{fl.}}$ , nm
Фенантрен / Phenanthrene	252	360
Антрацен / Anthracene	350	398
Флуорантен / Fluoranthene	354	464
Пирен / Pyrene	335	380
Хризен / Chrysene	264	380
Бенз[а]пирен / Benzo[a]pyrene	381	403

**О. А. Плотникова «Усовершенствование флуориметрического метода для определения полициклических ароматических углеводородов в объектах окружающей среды ». С. 44.**



**Рис. 2.** Спектры поглощения и флуоресценции ПАУ  
**Fig. 2.** Absorption and fluorescence spectra of PAHs



**Рис. 3.** Спектры флуоресценции в растворе (а) и на вязкой матрице (б):  
 1 – пирен в ТХ-100; 2 – пирен в воде; 3 – ТХ-100; 4 – вода.  $C_{\text{пирена}} = 2 \cdot 10^{-7}$  моль/л  
**Fig. 3.** Fluorescence spectra in solution (a) and on a viscose matrix (b): 1 – pyrene in TX-100;  
 2 – pyrene in water; 3 – TX-100; 4 – water.  $C_{\text{pyrene}} = 2 \cdot 10^{-7}$  mol/L

Таблица 2 / Table 2

Характеристики определения пирена по спектрам поглощения и флуоресценции в водно-мицеллярном растворе TX-100 и на вязкой матрице / Characteristics of pyrene determination by absorption and fluorescence spectra in an aqueous micellar solution of TX-100 and on a viscose matrix

Способ определения Method of determination	Диапазон, нг/мл Range, ng/mL	ПО, нг/мл LOD, ng/mL	$s_r$
По спектрам поглощения в ВМР TX-100 Based on absorption spectra in aqueous micellar solutions of TX-100	14–10000	10	0,05
По спектрам флуоресценции в ВМР TX-100 / Based on fluorescence spectra in aqueous micellar solutions of TX-100	2–200	1,8	0,04
По спектрам твёрдофазной флуоресценции на вязкой матрице / Based on solid-phase fluorescence spectra on a viscose matrix	1–100	0,8	0,05

ПАУ необходимо учитывать вклад фонового сигнала модифицированной ПАВ матрицы в общий сигнал флуоресценции, который может достигать нескольких процентов в зависимости от модифицирующего агента.

На рисунке 3b представлены полученные экспериментально спектры флуоресценции пирена на вязкой матрице, при этом наблюдается значительное увеличение интенсивности аналитического сигнала при использовании предварительного концентрирования в мицеллах TX-100.

Были получены зависимости оптической плотности и интенсивности флуоресценции пирена в растворе и на вязкой матрице от его содержания в исходном растворе. В определённых диапазонах концентраций зависимости имеют линейный характер, что делает возможным применение данных методов для количественного определения пирена. В таблицу 2 сведены метрологические характеристики указанных методов: диапазон определяемых содержаний, предел обнаружения (ПО), относительное стандартное отклонение ( $s_r$ ).

Экспериментальные данные показывают, что линейный диапазон концентраций пирена, определяемых спектрофотометрическим методом, более значителен по сравнению с флуориметрическими методами, но пределы обнаружения данным методом сравнительно невысоки. Применение сорбционного концентрирования на модифицированной ПАВ матрице совместно с регистрацией аналитического флуоресцентного сигнала непосредственно в фазе вязкого сорбента позволило значительно снизить предел обнаружения пирена.

### Заключение

В заключении можно сделать вывод о том, что спектрофотометрические и люминес-

центные методы обладают определёнными преимуществами для анализа ПАУ, что подтверждается их широким использованием, как в самостоятельном исполнении, так и в составе различных детекторов, применяемых в экологическом мониторинге объектов ОС.

Анализируя полученные экспериментальные результаты, можно отметить, что флуоресцентный метод определения ПАУ характеризуется большей селективностью, чем спектрофотометрический, так как индивидуальные спектры флуоресценции ПАУ регистрируются при определённых длинах возбуждения, характерных для индивидуальных соединений. Однако в ряде случаев наблюдается перекрытие спектров как флуоресценции, так и поглощения отдельных ПАУ, что затрудняет их идентификацию. Повысить селективность люминесцентного метода определения ПАУ можно при совместном использовании, наряду с флуоресцентными, и фосфоресцентных спектров, а также применив метод резонансного переноса энергии и синхронную флуоресцентную спектроскопию.

Полученные метрологические характеристики определения пирена показывают перспективность метода анализа ПАУ, основанного на сочетании предварительного мицеллярного и сорбционного концентрирования с получением люминесцентного сигнала непосредственно в фазе сорбента. Данный способ позволяет проводить количественное определение пирена в диапазоне концентраций от 1 до 100 нг/мл, приводит к усилению аналитического сигнала и снижению предела обнаружения пирена в растворах до 0,8 нг/мл ( $s_r = 0,05$ ), что особенно актуально в случае проведения экологического контроля содержания ПАУ при их следовом содержании в объектах ОС. Линейный диапазон определяемых концентраций данным методом составляет 1–100 нг/мл.

Анализ тенденций развития экологического анализа позволяет заключить, что по мере возрастания требований к информации при организации мониторинга ОС данных, получаемых одним методом, становится недостаточно. В связи с этим в последние годы начали развиваться подходы, основанные на совместном использовании разных методов оптической спектроскопии. Дальнейшие разработки видятся в направлении устранения мешающих воздействий компонентов и улучшения селективности и чувствительности методов для анализа многокомпонентных смесей в реальных объектах.

### References

1. Ifegwu O.C., Anyakora C. Polycyclic aromatic hydrocarbons: Part I. Exposure // *Advances in Clinical Chemistry*. 2015. V. 72. P. 277–304. doi: 10.1016/bs.acc.2015.08.001
2. Abdel-Shafy H.I., Mansour M.S.M. A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation // *Egyptian Journal of Petroleum*. 2016. V. 25. No. 1. P. 107–123. doi: 10.1016/j.ejpe.2015.03.011
3. Lawal A.T. Polycyclic aromatic hydrocarbons. A review // *Cogent Environmental Science*. 2017. V. 3. No. 1. Article No. 1339841. doi: 10.1080/23311843.2017.1339841
4. Slezakova K., Castro D., Delerue-Matos C., Alvim-Ferraz M.D., Morais S., Pereira M.D. Impact of vehicular traffic emissions on particulate-bound PAHs: Levels and associated health risks // *Atmospheric Research*. 2013. V. 127. No. 7. P. 141–147. doi: 10.1016/j.atmosres.2012.06.009
5. Srogi K. Monitoring of environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: a review // *Environmental Chemistry Letters*. 2007. V. 5 No. 4. P. 169–195. doi: 10.1007/s10311-007-0095-0
6. Tsibart A.S., Gennadiev A.N. Polycyclic aromatic hydrocarbons in soils: Sources, behavior, and indication significance (a review) // *Eurasian Soil Science*. 2013. V. 46. No. 7. P. 728–741. doi: 10.1134/S1064229313070090
7. Alegbeleye O.O., Opeolu B.O., Jackson V.A. Polycyclic aromatic hydrocarbons: A critical review of environmental occurrence and bioremediation // *Environmental Management*. 2017. V. 60. No. 4. P. 758–783. doi:10.1007/s00267-017-0896-2
8. Maystrenko V.N., Klyuev N.A. Environmental and analytical monitoring of persistent organic pollutants. Moskva: BINOM. Laboratoriya znaniy, 2013. 328 p. (in Russian).
9. Zhang Q., Liu P., Li S., Zhang X., Chen M. Progress in the analytical research methods of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) // *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 2020. V. 43. No. 13–14. P. 425–444. doi: 10.1080/10826076.2020.1746668
10. Wang L., Pang S., Zhou G. Recent advances in spectroscopy technology for trace analysis of persistent organic pollutants // *Applied Sciences*. 2019. V. 9. No. 17. Article No. 3439. doi: 10.3390/app9173439
11. Bosch Ojeda C., Sanchez Rojas F. Recent applications in derivative ultraviolet/visible absorption spectrophotometry: 2009–2011: A review // *Microchemical Journal*. 2013. V. 106. P. 1–16. doi: 10.1016/j.microc.2012.05.012
12. Rivera-Figueroa A.M., Ramazan K.A., Finlayson-Pitts B.J. Fluorescence, absorption, and excitation spectra of polycyclic aromatic hydrocarbons as a tool for quantitative analysis // *Journal of Chemical Education*. 2004. V. 81. No. 2. P. 242–245. doi: 10.1021/ed081p242
13. Abdel-Aziz O., El Kosasy A.M., El-Sayed Okeil S.M. Comparative study for determination of some polycyclic aromatic hydrocarbons 'PAHs' by a new spectrophotometric method and multivariate calibration coupled with dispersive liquid-liquid extraction // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2014. V. 133. P. 119–129. doi: 10.1016/j.saa.2014.05.059
14. Morales T.V., Esponda S.M., Rodriguez J.J.S., Aaron S.F., Aaron J.J. Luminescence methods for study and determination of pollutants in the environment // *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*. 2010. V. 29. No. 1. P. 1–42. doi: 10.20450/mjccce.2010.170
15. Plotnikova O.A., Mel'nikov A.G., Tikhomirova E.I., Adylova A.Zh. Matrix type effect on sorption concentration process and luminescent determination of pyrene // *Russian Journal of Physical Chemistry B*. 2020. V. 14. P. 145–151. doi: 10.1134/S1990793120010261
16. Wandruszka R. Luminescence of micellar solutions // *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. 1992. V. 23. No. 3. P. 187–215. doi: 10.1080/10408349208050854
17. Santana Rodriguez J.J., Halko R., Betancort Rodriguez J.R., Aaron J.J. Environmental analysis based on luminescence in organized supramolecular systems // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2006. V. 385. No. 3. P. 525–545. doi: 10.1007/s00216-006-0342-4
18. D'achuck O.A. Ecological-analytical luminescent pyrene determination on a modified cellulose matrix // *Izvestiya vysshikh uchebnykh zavedeniy. Seriya: Khimiya i khimicheskaya tekhnologiya*. 2010. V. 53. No. 12. P. 14–17 (in Russian).
19. Fernandez-Sanchez J.F., Carretero A.S., Cruces-Blanco C., Fernández-Gutiérrez A. The development of solid-surface fluorescence characterization of polycyclic aromatic hydrocarbons for potential screening tests in environmental samples // *Talanta*. 2003. V. 60. No. 2–3. P. 287–293. doi: 10.1016/S0039-9140(03)00100-0
20. Bortolato S.A., Arancibia J.A., Escandar G.M. A novel application of nylon membranes to the luminescent determination of benzo[a]pyrene at ultra-trace levels in water // *Analytica Chimica Acta*. 2008. V. 613. No. 2. P. 218–227. doi: 10.1016/j.aca.2008.03.004
21. D'achuck O.A., Mel'nikov G.V., Gubina T.I., Tikhomirova E.I. Cellulose matrix modification for ecotoxicants luminescence analysis // *Khimicheskaya fizika*. 2012. V. 31. No. 10. P. 21–24 (in Russian).
22. D'achuck O.A. Fluorescent sensor for polycyclic aromatic hydrocarbons toxicants // *Theoretical and Applied Ecology*. 2011. No. 3. P. 27–30 (in Russian). doi: 10.25750/1995-4301-2011-3-027-030