

Научная статья

УДК 543.544

DOI: 10.37102/0869-7698_2023_228_02_11

EDN: XKSBYH

Хроматографическое определение флуоресцеина в природных водах и технологических растворах

М.Г. Патрушев, С.В. Суховерхов[✉], П.А. Задорожный

Михаил Григорьевич Патрушев

инженер-технолог

Институт химии ДВО РАН, Владивосток, Россия

patrushev@ich.dvo.ru

<https://orcid.org/0000-0001-6210-8189>

Святослав Валерьевич Суховерхов

кандидат химических наук, заведующий лабораторией

Институт химии ДВО РАН, Владивосток, Россия

svs28@ich.dvo.ru

<https://orcid.org/0009-0003-1485-1682>

Павел Анатольевич Задорожный

кандидат биологических наук, старший научный сотрудник

Институт химии ДВО РАН, Владивосток, Россия

zadorozhny@rambler.ru

<https://orcid.org/0000-0002-1073-4548>

Аннотация. Разработана методика хроматографического определения остаточных концентраций флуоресцеина в природных водах и технологических растворах с пределом обнаружения 1 нг/л. Для выделения флуоресцеина из вод используют твердофазную экстракцию на картриджах Диапак С16, хроматографическое разделение проводят на колонке Shodex Asahipak ODP-50 с использованием ион-парного реагента тетрабутиламмония и флуориметрического детектирования. Методика была опробована при определении остаточной концентрации флуоресцеина в рамках программы промышленного мониторинга на нефтесытобывающем предприятии. Исследована возможность использования флуоресцеина для обнаружения низкоактивных утечек с АЭС. Показано, что флуоресцеин достаточно термически устойчив и может использоваться в качестве индикатора утечки раствора теплоносителя второго контура АЭС с реактором ВВЭР-1000.

Ключевые слова: флуоресцеин, твердофазная экстракция, высокоэффективная жидкостная хроматография

Для цитирования: Патрушев М.Г., Суховерхов С.В., Задорожный П.А. Хроматографическое определение флуоресцеина в природных водах и технологических растворах // Вестн. ДВО РАН. 2023. № 2. С. 135–143. http://dx.doi.org/10.37102/0869-7698_2023_228_02_11.

Благодарности. Работа выполнена на оборудовании ЦКП «Дальневосточный центр структурных исследований» ИХ ДВО РАН.

Финансирование. Работа выполнена по программе фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2021–2023 гг. (поект № FWFN(0205)-2022-0002).

Original article

Chromatographic determination of fluorescein in natural waters and technological solutions

M.G. Patrushev, S.V. Sukhoverkhov, P.A. Zadorozhny

Mikhail G. Patrushev

Technical Engineer

Institute of Chemistry, FEB RAS, Vladivostok, Russia

patrushev@ich.dvo.ru

<https://orcid.org/0000-0001-6210-8189>

Svyatoslav V. Sukhoverkhov

Candidate of Sciences in Chemistry, Head of the laboratory

Institute of Chemistry, FEB RAS, Vladivostok, Russia

svs28@ich.dvo.ru

<https://orcid.org/0009-0003-1485-1682>

Pavel A. Zadorozhny

Candidate of Sciences in Biology, Senior Researcher

Institute of Chemistry, FEB RAS, Vladivostok, Russia

zadorozhny@rambler.ru

<https://orcid.org/0000-0002-1073-4548>

Abstract. A method for the chromatographic determination of residual concentrations of fluorescein in natural waters and technological solutions with a detection limit of 1 ng/l has been developed. To isolate fluorescein from waters, solid-phase extraction on Diapak C16 cartridges is used, chromatographic separation is carried out on a Shodex Asahipak ODP-50 column using tetrabutylammonium ion-pair reagent and fluorimetric detection. The method was tested in determining the residual concentration of fluorescein in the industrial monitoring program at an oil producing facility. The possibility of using fluorescein to detect low-level leaks from nuclear power plants (NPP) has been studied. It has been shown that fluorescein is sufficiently thermally stable and can be used as an indicator of the leakage of the coolant solution of the secondary circuit of a NPP with a VVER-1000 reactor.

Keywords: fluorescein, solid-phase extraction, high performance liquid chromatography

For citation: Patrushev M.G., Sukhoverkhov S.V., Zadorozhny P.A. Chromatographic determination of fluorescein in natural waters and technological solutions. *Vestnik of the FEB RAS*. 2022;(2):135–143. (In Russ.). http://dx.doi.org/10.37102/0869-7698_2023_228_02_11.

Acknowledgments. The work was carried out on the equipment of the Common Use Center “Far Eastern Center for Structural Research” of the Institute of Chemistry, Far East Branch, Russian Academy of Sciences.

Funding. The work was carried out under the program of fundamental scientific research of the state academies of sciences for 2021-2023. No. FWFN(0205)-2022-0002.

Флуоресцеин – ксантеновый краситель с химической формулой $C_{10}H_{12}O_5$. Имеет вид оранжево-красных кристаллов, плохо растворимых в воде. В водных растворах существует в виде смеси бензоидной и хиноидной форм, обладает сильной желто-зеленой флуоресценцией. Флуоресцеин и уранин (динатриевая соль флуоресцеина) применяют для изучения путей следования подземных вод и обнаружения утечек промышленных вод, и они являются наиболее предпочтительным вариантом среди различных трейсерных красителей по причине низкой токсичности и дешевизны [1]. Уранин имеет три константы K_a и в зависимости от pH существует в виде катиона (pKa 2,22), моноаниона (pKa 4,34), дианиона (pKa 6,68) или нейтральной молекулы [2]. Выход флуоресценции уранина зависит от различных факторов, таких как температура, pH и ионная сила раствора. Наиболее важным параметром является pH, поскольку выход флуоресценции максимален в щелочной среде [3].

Для количественного определения флуоресцеина в воде используют различные физико-химические методы анализа: фотометрический [4], полярографический [5] или вольтамперометрический (Конарев А.А. Способ количественного определения флуоресцеина натрия в субстанции и лекарственном препарате на ее основе: пат. № 201412994 РФ. Заявл. 22.07.2014; опубл. 10.12.2015, Бюл. № 11. 4 с.). Но наиболее распространен флуориметрический метод определения флуоресцеина, основанный на измерении разницы флуоресценции проб при pH 3 и pH 9 (М01-54-2014. Методика измерений массовой концентрации флуоресцеина в пробах природных и пластовых вод флуориметрическим методом на анализаторе жидкости «Флюорат-02»). Диапазон концентраций, измеряемых флуориметрическим методом, составляет от 1 до 100 мкг/дм³. Хроматографические методики с применением флуориметрического детектирования характеризуются более высокой чувствительностью [6]. Применение спектрофотометрического детектирования при анализе не получило широкого распространения из-за низких пределов обнаружения [7].

При хроматографическом анализе pH элюента оказывает значительное влияние на разделение и чувствительность методики. При основных pH интенсивность аналитического сигнала повышается, однако большинство силикагельных сорбентов для обращенно-фазовой ВЭЖХ при pH более 7,5 непригодны для использования. В литературе описывают использование для хроматографического анализа флуоресцеина как слабокислых элюентов [8], так и щелочных [9]. Кроме этого при использовании обращенно-фазовых колонок резко снижается удерживание ионных форм флуоресцеина. Для решения этой проблемы необходимо применение ион-парных реагентов, позволяющих увеличить время удерживания флуоресцеина и снижающих влияние мешающих компонентов.

Основные мешающие компоненты при хроматографическом анализе – это соединения фульвой и гуминовых кислот, содержащиеся в грунтовых водах и обладающие сходными спектрами флуоресценции [10, 11]. Кроме того, фульвовая и гуминовая кислоты способны оказывать влияние на ионные равновесия в

растворе и сорбироваться на хроматографической колонке. При анализе морской воды мешающее влияние могут иметь и фикобилины со сходными спектрами флуоресценции, присутствующие в некоторых цианобактериях, широко распространенных в Мировом океане [12].

С учетом существующих проблем была разработана современная методика хроматографического определения остаточного флуоресцеина в воде для программы экологического мониторинга на нефтедобывающем предприятии. Для устранения мешающих эффектов матрицы воды был использован метод твердофазной экстракции (ТФЭ) в динамических условиях, при которых анализируемый раствор пропускается через картридж, заполненный сорбентом. Кроме того, ТФЭ позволяет многократно снизить нижний предел обнаружения флуоресцеина. В литературе [9] описана методика твердофазной экстракции флуоресцеина из морской воды на картриджах С18, а затем его элюирования метанолом с щелочной рН. Поэтому для проведения твердофазной экстракции использовали картриджи Диапак С16. Перед использованием картриджи промывали 2 мл элюента для ТФЭ, продували воздухом и уравнивали, пропуская 10 мл 0,08 М ацетата аммония. Элюент для ТФЭ готовили, добавляя к 50 мл метанола 0,28 мл 0,08 М раствора ацетата аммония с рН 9. В образец воды перед ТФЭ доливали 20–30 мкл 0,08 М раствора ацетата аммония для получения раствора с рН около 3. Воду с помощью шприца пропускали через подготовленный картридж Диапак С16, затем картридж промывали 5 мл деионизированной воды и продували воздухом. Флуоресцеин элюировали 2 мл элюента для ТФЭ, элюат упаривали на роторном испарителе при 40 °С и перерастворяли в 0,5 мл элюента для ВЭЖХ.

Для проведения хроматографического анализа с флуориметрическим детектором необходимо достичь максимального выхода флуоресценции, что возможно только в щелочной среде. Данное условие накладывает существенные ограничения на выбор колонки для проведения анализа, так как в большинстве колонок для обращенно-фазовой хроматографии в качестве сорбента используется силикагель с привитыми алкильными группами, подверженными гидролизу в щелочной среде. В связи с этим была выбрана колонка Shodex Asahipak ODP-50 с полимерным сорбентом на основе поливинилового спирта с пришитыми группами С18, позволяющая проводить разделение в диапазоне рН от 2 до 10. Для увеличения времени удерживания флуоресцеина в элюент для ВЭЖХ в качестве ион-парного реагента был введен гидроксид тетрабутиламмония. ВЭЖХ-анализ проводили на жидкостном хроматографе Shimadzu LC-20А с колонкой Asahipak ODP-50 (250 × 4,6 мм, с предколонкой ODP-50G) и флуориметрическим детектором Shimadzu *RF-10AXS* (длина волны возбуждения флуоресценции 490 нм, длина волны поглощения 520 нм). Состав элюента для ВЭЖХ: 20 %об. 0,05 М раствора ацетата аммония с добавлением 5 мМ гидроксида тетрабутиламмония, рН 8,75 и 80 %об. ацетонитрила. Скорость потока элюента 0,8 мл/мин, температура термостата колонок 30 °С, объем вводимой пробы 20 мкл. Хроматографическую систему калибровали по растворам стандарта флуоресцеина с концентрациями от 5 до 100 нг/дм³.

При данных условиях анализа время удерживания флуоресцеина составляет около 12 мин и практически полностью отсутствует дрейф базовой линии (рис. 1). На хроматограммах присутствуют отрицательные пики, что связано с наличием примесей, флуоресцирующих менее интенсивно, чем элюент для ВЭЖХ.

На модельных растворах исследовали эффективность проведения ТФЭ на картриджах Диапак С16. Концентрация флуоресцеина в растворах рассчитывалась по формуле

$$C = \frac{S \cdot V_{re}}{k \cdot V_{in}}$$

где S – площадь пика образца, k – значение наклона градуировочной прямой, V_{in} – исходный объем образца, взятый для твердофазной экстракции, мл (5 мл), V_{re} – объем, в котором был перерастворен упаренный образец, мл (0,5 мл).

Было установлено, что твердофазная экстракция позволяет добиться высокой степени извлечения целевого флуоресцеина и снизить предел обнаружения методики до 1 нг/дм³ (табл. 1).

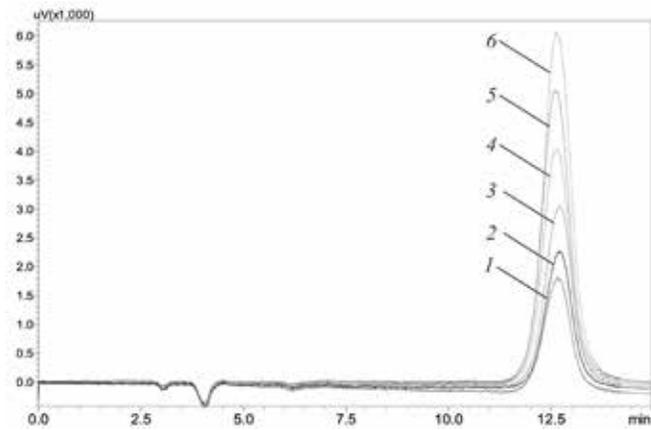


Рис. 1. Хроматограммы стандартных растворов флуоресцеина. 1 – 5 нг/мм³, 2 – 10 нг/мм³, 3 – 30 нг/мм³, 4 – 50 нг/мм³, 5 – 70 нг/мм³, 6 – 100 нг/мм³

Таблица 1

Эффективность ТФЭ флуоресцеина из модельных растворов

Эксперимент, номер	Флуоресцеин		
	введено, нг/дм ³	найдено, нг/дм ³	степень извлечения, %
1	1,00	1,03	103
2	1,00	0,84	84
3	1,00	0,91	91
4	1,00	0,89	89
5	1,00	0,92	92
6	1,00	0,90	90

Разработанная методика была опробована при анализе нескольких десятков образцов пластовых и поверхностных вод в исследованиях по программе промышленного мониторинга на нефтедобывающем предприятии. Во всех исследованных образцах концентрация флуоресцеина была ниже предела обнаружения в 1 нг/дм³, присутствие фульвовой и гуминовых кислот в воде не мешало проведению анализа.

Была исследована возможность использования флуоресцеина и уранина для обнаружения низкоактивных утечек с атомных электростанций (АЭС). Поиск утечек является одной из задач радиационного мониторинга водоемов и грунтовых вод, находящихся рядом с АЭС. Существуют различные методы контроля, относящиеся к дозиметрическим и спектроскопическим исследованиям. Недостатком данных методик является сложность обнаружения низкоактивных протечек, к которым относятся утечки теплоносителя второго контура и сточных вод спецканализации.

Существуют исследования, показывающие, что радиационное разрушение красителей в растворах происходит при окислении органических красителей кислородсодержащими радикалами и ион-радикалами, которые образуются при радиолизе растворителей. В обесцвечивании растворов красителей принимает участие и пероксид водорода, образующийся при радиолизе растворителей. Радиационная стойкость красителей также зависит от физико-химических свойств растворителя. Наименьшей стойкостью обладают водные растворы. Радиационное обесцвечивание растворов красителей подчиняется экспоненциальному закону [13, 14].

На российских АЭС широко используют гидразино-аммиачный водно-химический режим. При таком водно-химическом режиме в теплоноситель для предотвращения коррозии конструкций вводятся гидразин и аммиак. По существующим нормам качества подпиточной воды второго контура АЭС с реактором ВВЭР-1000 общая жесткость должна быть не более 0,5 мкг-экв/кг, рН не более 9,1, содержание кремниевой кислоты в пересчете на SiO_2 не более 25 мкг/кг, железа – не более 20 мкг/кг, меди – не более 10 мкг/кг, избыток гидразина должен составлять от 20 до 60 мкг/кг [15].

Было исследовано поведение флуоресцеина при нагревании в модельных растворах теплоносителя второго контура АЭС с реактором ВВЭР-1000. Модельные растворы готовили в соответствии с нормами качества подпиточной воды второго контура реактора ВВЭР-1000 [15]. Исследовали влияние модельного раствора теплоносителя на степень извлечения флуоресцеина при ТФЭ:

Введено флуоресцеина, нг/дм ³	Найдено флуоресцеина, нг/дм ³	Степень извлечения, %
5	1,14	22,8
10	3,16	31,6
30	11,73	39,1
50	21,83	43,6
70	33,99	48,5

Полученные результаты показывают, что присутствующий в растворе теплоносителя гидразин снижает степень извлечения флуоресцеина в зависимости от исходной концентрации. При повышении концентрации флуоресцеина с 5 до 70 нг/дм³ степень извлечения флуоресцеина повышается с 22,8 до 48,5 %. Это необходимо учитывать при использовании флуоресцеина для обнаружения низкоактивных утечек с АЭС.

Дальнейшие исследования показали, что при концентрациях флуоресцеина выше 50 нг/дм³, степень извлечения флуоресцеина около 50 %. Поэтому при расчетах необходимо вводить поправочный коэффициент 2 и на него умножать определенную при анализе концентрацию флуоресцеина.

Для определения термической устойчивости модельный раствор теплоносителя с концентрацией флуоресцеина 100 нг/дм³ заливали в реактор гидротермального синтеза емкостью 40 мл и помещали в сушильный шкаф на 12 час при температуре 300 °С. После охлаждения модельных растворов проводили ТФЭ на картриджах Диапак С16 и анализ методом ВЭЖХ. Результаты определения термической устойчивости флуоресцеина в модельных растворах теплоносителя приведены в табл. 2.

Проведенные исследования показали, что флуоресцеин достаточно устойчив в растворе теплоносителя при нагревании 300 °С, остается от 42 до 52 % от исходной концентрации, однако на хроматограммах после пика флуоресцеина появляется дополнительный пик (рис. 2).

Термическая устойчивость флуоресцеина в модельных растворах теплоносителя

Эксперимент, номер	Флуоресцеин		
	введено, нг/дм ³	найдено, нг/дм ³	устойчивость после нагревания, %
1	100	26	52
2	100	23	46
3	100	21	42
4	100	26	52
5	100	21	42

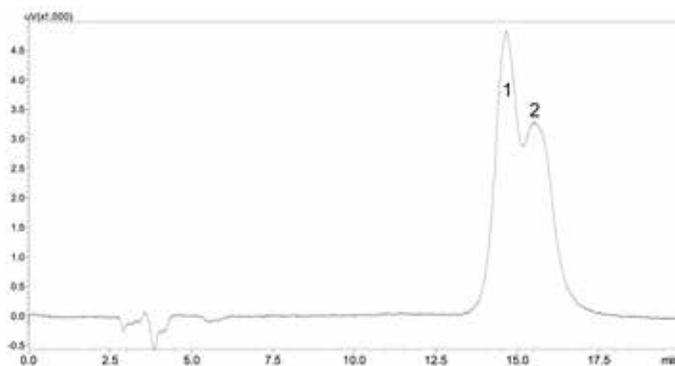
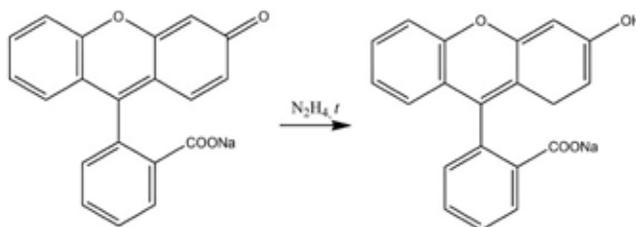


Рис. 2. Хроматограмма раствора флуоресцеина, извлеченного ТФЭ после нагревания модельного раствора теплоносителя. 1 – пик флуоресцеина, 2 – пик продукта реакции флуоресцеина

Вероятнее всего, это является результатом восстановления карбонильной группы при вступлении в реакцию хиноидной формы уранина с гидразином:



Проведенные эксперименты показали, что термическая устойчивость флуоресцеина может считаться достаточной для периодического дозирования его во второй контур АЭС с реактором ВВЭР-1000 в качестве индикатора утечки.

Таким образом, разработана методика хроматографического определения остаточных концентраций флуоресцеина в природных водах и технологических растворах с пределом обнаружения 1 нг/л. Методика проверена при определении остаточной концентрации флуоресцеина в рамках программы промышленного мониторинга на нефтедобывающем предприятии. Исследована возможность использования флуоресцеина для обнаружения низкоактивных утечек с АЭС. Показано, что флуоресцеин достаточно термически устойчив и при периодическом дозировании в раствор теплоносителя второго контура АЭС с реактором ВВЭР-1000 может использоваться в качестве индикатора утечки.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Smart P.L., Laidlaw M.S. An evaluation of some fluorescent dyes for water tracing // *Water Resources Res.* 1977. Vol. 13. P. 15–33.
2. Pouliquen H., Algoet M., Buchet V. Acute toxicity of fluorescein to turbot (*Scophthalmus maximus*) // *Vet. Hum. Toxicol.* 1995. Vol. 37. P. 527–529.
3. Liu M., Jia M., Pan H. Instrument response standard in time-resolved fluorescence spectroscopy at visible wavelength: quenched fluorescein sodium // *Appl. Spectrosc.* 2014. Vol. 68. P. 577–583.
4. Mota M.C., Carvalho P., Ramalho J. Spectrophotometric analysis of sodium fluorescein aqueous solutions // *Int. Ophthalmol.* 1991. Vol. 15. P. 321–326.
5. Безуглый В.Д. Титриметрические методы анализа неводных растворов. М.: Химия. 1986. 383 с.
6. Muramoto K., Kamiya H., Kawauchi H. High performance liquid chromatography of fluorescein isothiocyanate isomers and intermediate products // *Anal. Sci.* 1985. Vol. 1. P. 447–450.
7. Wu S., Dovichi N.J. High-sensitivity fluorescence detector for fluorescein isothiocyanate derivatives of amino acids separated by capillary zone electrophoresis // *J. Chromatogr. A.* 1989. Vol. 480. P. 141–155.
8. Da Silva M.M.C., Dezani T.M., Dezani A.B. Development and validation of HPLC-FL method for fluorescein quantification in buccal permeability studies // *J. Bioequiv. Bioavailab.* 2015. Vol. 7, N 5. P. 69.
9. Ikeya T., Horimoto N., Kashino Y. A practical method for sensitive determination of the fluorescent water-tracer uranine by reversed phase HPLC under alkaline conditions // *Talanta.* 2009. Vol. 79. P. 818–823.
10. Sierra M.M.D., Giovanella M., Parlanti E., Soriano-Sierra E.J. Fluorescence fingerprint of fulvic and humic acids from varied origins as viewed by single-scan and excitation/emission matrix techniques // *Chemosphere.* 2005. Vol. 58, N 6. P. 715–733.
11. Susic M., Boto K.G. High-performance liquid chromatographic determination of humic acid in environmental samples at the nanogram level using fluorescence detection // *J. Chromatogr.* 1989. Vol. 482, N 1. P. 175–187.
12. Murphy L.S., Haugen E.M. The distribution and abundance of phototrophic ultraplankton in the North Atlantic // *Limnol. Oceanogr.* 1985. Vol. 30. P. 47–58.
13. Попечиц В.И. Влияние гамма-облучения на спектры поглощения кислотных красителей // *Журн. прикл. спектроскопии.* 2003. Т. 70, № 1. С. 34–37.
14. Попечиц В.И. Радиационные эффекты в твердых и жидких растворах ксантеновых красителей // *Материалы VI Междунар. конф. «Взаимодействие излучений с твердым телом».* Минск: Изд-во. Белорус. гос. ун-та, 2003. С. 19.
15. Копылов А.С., Верховский Е.И. Спецводоочистка на атомных электростанциях: учеб. пособие. М.: Высш. шк., 1988. 208 с.

REFERENCES

1. Smart P.L., Laidlaw M.S. An evaluation of some fluorescent dyes for water tracing. *Water Resources Research.* 1977;13:15-33.
2. Pouliquen H., Algoet M., Buchet V. Acute toxicity of fluorescein to turbot (*Scophthalmus maximus*). *Veterinary and Human Toxicology.* 1995;37:527-529.
3. Liu M., Jia M., Pan H. Instrument response standard in time-resolved fluorescence spectroscopy at visible wavelength: quenched fluorescein sodium. *Applied Spectroscopy.* 2014;68:577-583.
4. Mota M.C., Carvalho P., Ramalho J. Spectrophotometric analysis of sodium fluorescein aqueous solutions. *International Ophthalmology.* 1991;15:321-326.
5. Bezugly V.D. Titrimetricheskie metody analiza nevodnyh rastvorov = [Titrimetric methods of analysis of non-aqueous solutions]. М.: Himiya; 1986. 383 p. (In Russ.).
6. Muramoto K., Kamiya H., Kawauchi H. High performance liquid chromatography of fluorescein isothiocyanate isomers and intermediate products. *Analytical Science.* 1985;1:447-450.
7. Wu S., Dovichi N.J. High-sensitivity fluorescence detector for fluorescein isothiocyanate derivatives of amino acids separated by capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography A.* 1989;480:141-155.
8. Da Silva M.M.C., Dezani T.M., Dezani A.B. Development and validation of HPLC-FL method for fluorescein quantification in buccal permeability studies. *Journal of Bioequivalence and Bioavailability.* 2015;7(5):69.

9. Ikeya T., Horimoto N., Kashino Y. A practical method for sensitive determination of the fluorescent water-tracer uranine by reversed phase HPLC under alkaline conditions. *Talanta*. 2009;79:818-823.
10. Sierra M.M.D., Giovanella M., Parlanti E., Soriano-Sierra E.J. Fluorescence fingerprint of fulvic and humic acids from varied origins as viewed by single-scan and excitation/emission matrix techniques. *Chemosphere*. 2005;58(6):715-733.
11. Susic M., Boto K.G. High-performance liquid chromatographic determination of humic acid in environmental samples at the nanogram level using fluorescence detection. *Journal of Chromatography*. 1989;482(1):175-187.
12. Murphy L.S., Haugen E.M. The distribution and abundance of phototrophic ultraplankton in the North Atlantic. *Limnology and Oceanography*. 1985;30:47-58.
13. Popechits V.I. Vliyanie gamma-oblucheniya na spektry pogloshcheniya kislotnyh krasitelei = [Influence of gamma irradiation on the absorption spectra of acid dyes]. *Zhurnal prikladnoi spektroskopii*. 2003;70(1):34-37. (In Russ.).
14. Popechits V.I. Radiacionnye ehffekty v tverdyh i zhidkih rastvorah ksantenykh krasitelei = [Radiation effects in solid and liquid solutions of xanthene dyes]. *Proceedings of the VI International Conference "Interaction of radiation with a solid body*. Minsk: Izd-vo Belorusskogo gosudarstvennogo universiteta; 2003. P. 19. (In Russ.).
15. Kopylov A.S., Verkhovsky E.I. Specvodoochistka na atomnykh ehlektrostantsiyah = [Special water treatment at nuclear power plants: educational]. M.: Vysshaya shkola; 1988. 208 p. (In Russ.).

