

BEITRÄGE ZUR GEOLOGIE DER SCHWEIZ - HYDROLOGIE	Bd. 28 I	S. 39 - 50	Bern, 1982
---	----------	------------	------------

VERFAHREN ZUM QUALITATIVEN UND QUANTITATIVEN NACHWEIS VON NEBENEINANDER VORLIEGENDEN FLUORESZENZTRACERN

Horst Behrens, Neuherberg b. München
GSF-Institut für Radiohydrometrie

Abstract: The selective detection of individual fluorescent dye tracers in mixtures of several dyes is limited by the overlap of the spectra. Therefore additional separation steps must be introduced into the analytic procedure. The idea of these techniques was to leave the tracer of interest in solution in its original concentration, while removing or suppressing interfering tracers. The techniques are based on the different response of the fluorescent dye tracers to pH-changes, on their different adsorption behaviour, and on their different sensitivities to photolysis. With help of these procedures it is possible e.g. to detect uranine qualitatively and quantitatively in the presence of high concentrations of eosine as well as to detect eosine in the presence of amidorhodamine G.

1. Einführung

Gerade die relativ hohe Empfindlichkeit, die Schnelligkeit und die Einfachheit sowie die Eindeutigkeit des instrumentellen Nachweises von Fluoreszenztracern haben eine neue Problematik mit sich gebracht. Sie haben nämlich dazu geführt, daß immer mehr mehrere Fluoreszenztracer in Multitracerexperimenten nebeneinander eingesetzt werden. Damit gilt es nun, aus Tracergemischen, die zunächst immer wässrige Lösungen sind, die einzelnen Komponenten zu ermitteln und zu quantifizieren, auch wenn

sie in sehr unterschiedlichen Konzentrationen vorliegen und gegenseitig bis zur Nichterkennbarkeit überlagert werden. Daher bedingt jede quantitative Bestimmung eines Einzeltracers aus Gemischen aber auch seine qualitative Identifizierung. Nach Möglichkeit wird man bemüht sein, diese Aufgabe weiterhin rein instrumentell zu lösen, d.h. unter Ausnutzung der spektralen Eigenschaften der Fluoreszenztracer mit Hilfe der Spektralfluorimetrie. Da diesem Bemühen aber durch die große spektrale Breite sowohl der Anregungs- wie der Emissionsbereiche der Fluoreszenztracer Grenzen gesetzt sind, mußten Verfahren zur Auftrennung der Gemische entwickelt werden. Diese beruhen hauptsächlich auf in der Analytik erprobten Arbeitstechniken wie der Chromatographie oder der Extraktion (ROCHAT et al. 1975, BUB et al. 1979). Sie können aber auch mit der vorangehenden Abscheidung der Fluoreszenztracer aus dem Probenwasser, z.B. an Aktivkohle, kombiniert werden (BAUER 1967, 1972; PERLEGA 1976).

In diesem Beitrag werden Techniken besprochen, bei denen die zu bestimmenden Tracer in der ursprünglichen Konzentration im Probenwasser zur spektralfluorimetrischen Bestimmung verbleiben. Durch geeignete Maßnahmen sollen die jeweils störenden Tracer unterdrückt bzw. abgetrennt werden. Diese Techniken stützen sich auf bekannte Eigenschaften der Fluoreszenztracer, die im allgemeinen als störend oder nachteilig angesehen werden, nämlich der pH-Abhängigkeit der Fluoreszenz, dem Adsorptionsverhalten und der Lichtempfindlichkeit dieser Substanzen. Die Verfahren sollten im übrigen geeignet sein, große Probenreihen ohne großen zeitlichen Aufwand durch nicht hochspezialisiertes Personal zu untersuchen.

2. Instrumenteller Nachweis von Fluoreszenztracern

Der instrumentelle Nachweis erfolgt zweckmäßig mit einem Spektralfluorimeter. Die Lage der Emissions- oder auch der Anregungsspektren ergibt die erforderlichen qualitativen und die Höhe (Intensität) der Spektren die quantitativen Informationen für den Tracernachweis. Als besonders zweckmäßig hat sich das Synchron-Scan-Verfahren erwiesen, das folgende Vorteile bietet (BEHRENS 1971 und 1973):

- Wasserproben können mit einem einzigen Spektrum z.B. auf die Tracer Uranin, Eosin, Amidorhodamin G und Rhodamin B (bzw. Sulforhodamin B und Rhodamin WT) überprüft werden. Für weitere Tracer wie Pyranin, Amidoflavin u.a. genügen wenige andere Geräteeinstellungen.
- Die Fluoreszenzspektren werden bei diesem Verfahren gegenüber den "echten" Emissionsspektren in der Weise "verfälscht", daß sie etwas schmalbandiger werden (s. Fig. 1). Dies kommt der Forderung nach möglichst guter Trennung einzelner Tracer untereinander entgegen.
- Der den Nachweis von Tracern in niedriger Konzentration störende und begrenzende Streulichtuntergrund ist bei diesem Verfahren besonders niedrig. Außerdem gestatten die erhaltenen Spektren die Beurteilung und die Subtraktion des Streulichtuntergrundes jeder individuellen Probe; dies ist bei normalen (mit fester Anregungswellenlänge aufgenommenen Fluoreszenzspektren) weitaus weniger möglich. Die Raman-Streuung am Lösungsmittel Wasser tritt bei den meisten gebräuchlichen Geräteeinstellungen für das Synchron-Scan-Verfahren überhaupt nicht in Erscheinung und entfällt somit als Störeffekt.

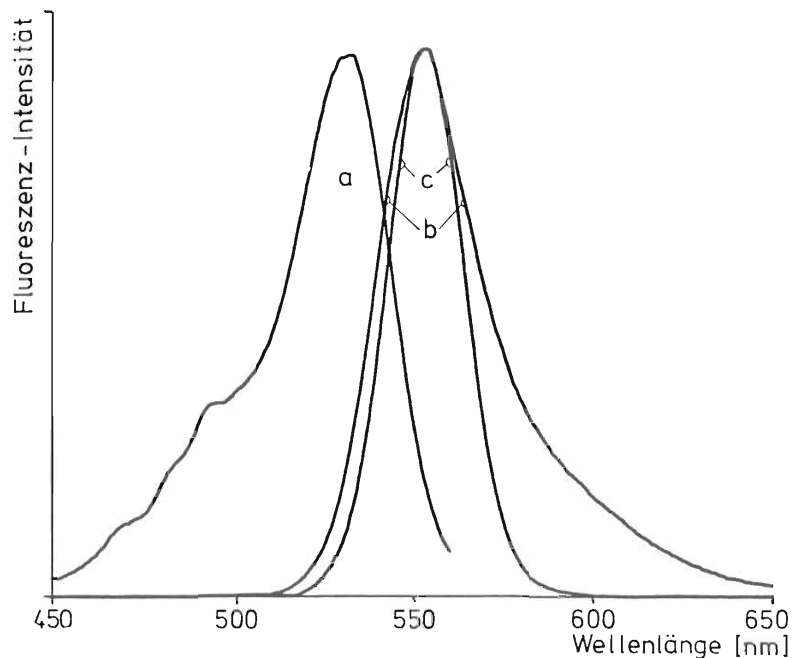


Fig. 1 Vergleich von Anregungsspektrum (a), Emissionsspektrum (b) und Synchron-Scan-Spektrum (c) des Farbtracers Amidorhodamin G.

Ohne jede gegenseitige Störung können auf diese Weise die im Spektrum relativ weit auseinanderliegenden Tracer Uranin und Rhodamin B in nahezu beliebigen Konzentrationsverhältnissen nebeneinander nachgewiesen werden. Bei spektral enger benachbarten Tracergemischen wie Amidorhodamin G/Rhodamin B treten Überlagerungen auf; durch eine Korrekturrechnung, wie sie von KÄSS (1967) für Absorptionsspektren angegeben wurde, können die Anteile der einzelnen Tracer der Mischung ermittelt werden (Fig.2).

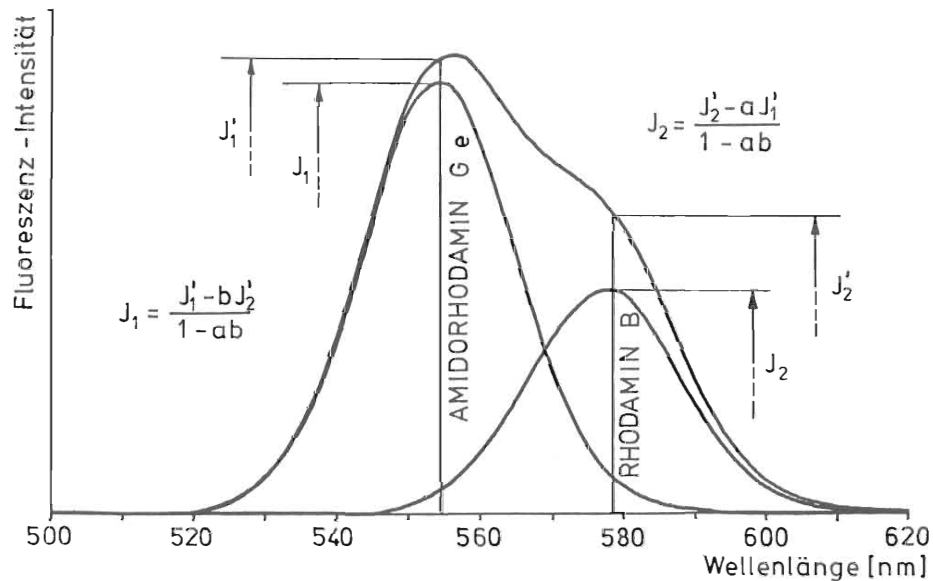


Fig. 2 Korrekturverfahren zur Bestimmung der Konzentrationen der Einzelkomponenten aus dem Fluoreszenzspektrum einer Mischung von Amidorhodamin G und Rhodamin B. Als Meßergebnis wird die äußere Kurve (entspricht der Summenkurve) erhalten. J_1 und J_2 sind die Peakhöhen der einzelnen Farbtracer.

Diese Methode läßt sich entsprechend auch auf Mischungen von drei und mehr Farbstofftracern ausdehnen. Sowohl mit größerer Komponentenzahl wie auch mit zunehmenden Unterschieden in den Konzentrationen der Komponenten nehmen die Meßfehler zu. Bei Gemischen von sehr eng im Spektrum benachbarten Fluoreszenztracern wie Uranin/Eosin oder Eosin/Amidorhodamin G läßt sich ohne zusätzliche Probenbeeinflussung bzw. Trennverfahren keine einwandfreie Analyse durchführen.

Auf die Analytik mit Filterfluorimetern soll hier nicht näher eingegangen werden. Ihr wesentlicher Unterschied zur Spektralfluorimetrie ist darin zu sehen, daß die qualitative Information über die Herkunft des Meßsignals nicht gegeben ist; damit

beschränkt sich die Filterfluorimetrie auf die Konzentrationsmessung von einzelnen bekannten Tracern.

3. Selektive Tracernachweise mit chemischer oder physikalischer Probenbehandlung

3.1 Fluoreszenzbeeinflussung durch pH-Wert-Veränderung

Die Fluoreszenzintensität von Fluoreszenztracern ist vom pH-Wert ihrer wässrigen Lösungen abhängig. Besonders augenfällig ist diese Erscheinung bei Uraninlösungen, deren Fluoreszenz durch Ansäuern weitgehend verschwindet (KÄSS 1964). Andere Fluoreszenzfarbstoffe, z.B. die Rhodamine, reagieren sehr viel weniger auf pH-Wertverschiebungen (MOSER und SAGL 1967). Von BAUER (1972) wurde diese Erscheinung erstmals systematisch zur Verbesserung des Nachweises von nebeneinander vorliegendem Uranin und Sulforhodamin G bzw. B durch Messung der Proben sowohl in neutraler (pH=8) sowie in schwefelsaurer Lösung (pH=2) herangezogen.

Die Fluoreszenz des Eosins wird ähnlich der des Uranins durch starkes Ansäuern gelöscht, so daß auf diese Weise Amidorhodamin G (identisch mit Sulforhodamin G) und andere Rhodamine völlig störungsfrei neben höheren Konzentrationen an Eosin nachgewiesen werden können.

Die Fluoreszenz des Eosins wird erst bei stärkerem Ansäuern gelöscht als die des Uranins (s. Fig. 3). Aufgrund dieser Tatsache kann durch definiertes Ansäuern der Proben auf pH-Werte zwischen 5 und 5,2 durch Zusatz eines Azetatpuffers Eosin neben höheren Konzentrationen von Uranin nachgewiesen werden.

Die detaillierte Untersuchung des pH-Werteinflusses auf die Fluoreszenzeigenschaften der Farbtracer zeigt weiter wenig berücksichtigte Details. Es ist erkennbar, daß die Änderungen der Fluoreszenzintensität vor allem auf Veränderungen der Anregungsspektren beruhen, die mit pH-abhängigen Strukturänderungen der Farbstoffmoleküle einhergehen. Die Emissionsspektren werden dagegen durch pH-Änderungen weitaus weniger beeinflußt. So verschwindet beim Uranin mit dem Ansäuern zwar die Lichtabsorption mit dem Maximum bei 495 nm, gleichzeitig tritt aber ein neuer und mit dem Ansäuern zunehmender Absorptionspeak bei 440 nm auf (BEHRENS

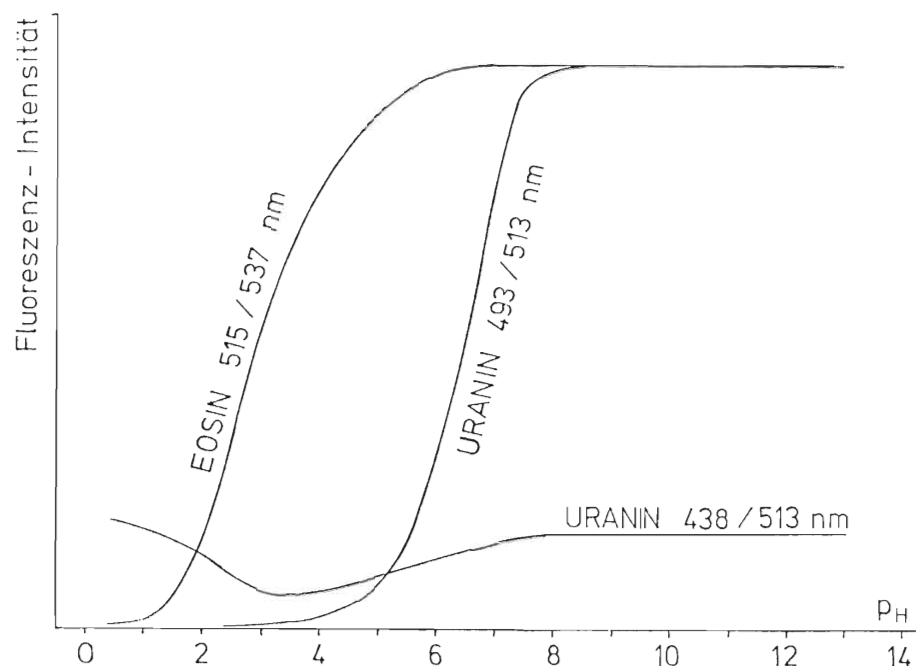


Fig. 3 Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität des Uranins und des Eosins vom pH-Wert; für Uranin bei zwei verschiedenen Anregungswellenlängen (438 und 493 nm).

1971). Somit kann Uranin in stark saurer Lösung durch Anregung bei 440 nm wieder zum Fluoreszieren gebracht werden (s. Fig. 3), wenn auch mit einer etwas geringeren Intensität als in neutraler bis alkalischer Lösung mit Anregung bei 495 nm. Da in stark saurer Lösung die Fluoreszenz des Eosins unterdrückt bleibt, kann auf dieser Basis auch Uranin neben höheren Konzentrationen an Eosin nachgewiesen werden, was bisher als ungelöstes Problem galt.

3.2 Probenbehandlung durch Adsorption

Als organische Substanzen, die in ihren Molekülen verschiedene polare funktionelle Gruppen tragen, neigen die verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe unterschiedlich stark zur Adsorption aus den wässrigen Lösungen an verschiedenen Materialien, so auch an Mineralien. Diese Adsorption hat weitgehend den Charakter eines reversiblen Ionenaustauschs, der an Mineralien vor allem als Kationenaustausch auftritt. Daher wird das anionische Uranin nur geringfügig an Mineralien adsorbiert, während das stark basische Rhodamin B extrem stark fixiert wird. Amidorhodamin G und Sulforhodamin B, in denen der basische Charakter durch

Sulfonsäuregruppen z.T. neutralisiert wird, nehmen eine Mittelstellung ein; jedoch werden sie an Mineralien durch reversible Adsorption so stark zurückgehalten, daß sie ebenso wie Rhodamin B als ideale Wassertracer in Lockergesteinen nicht in Frage kommen. Eosin liegt als Anion vor und wird generell wenig, aber doch etwas stärker als Uranin an Mineralien fixiert.

Die Unterschiede im Adsorptionsverhalten der Farbtracer, das bei den Markierungsverfahren allgemein als unerwünschte Störung gilt, können in der Analytik zum selektiven Tracernachweis ausgenutzt werden. Verschiedene Materialien, u.a. auch synthetische Kationenaustauscher, wurden auf ihre Trenneigenschaften für Farbtracer gemische untersucht. Als besonders günstig für diesen Zweck erwies sich ein tertiärer Glimmersand, der nördlich von München vorkommt. Es wurde das im folgenden beschriebene Routineverfahren für Tracertrennung entwickelt.

Um für längere Zeit ein einheitliches Austauschermaterial vorrätig zu haben, werden einige kg Glimmersand gewaschen und von Überkorn sowie von Feinanteilen befreit. Als sehr geeignet hat sich eine Siebfraktion zwischen 0,1 und 0,5 mm erwiesen. Zur Farbtracer trennung werden in einer einfachen Anordnung (s. Fig. 4) kleine Säulen mit ca. 2 ml Sand als Wassersuspension gefüllt und das Wasser ablaufen lassen. Die Kapillarkräfte verhindern ein Trockenlaufen der Säulen. Dann wird die Wasserprobe in den Trichter gegeben und das Perkolat nach Verwerfen eines Vorlaufs aufgefangen, ggfs. direkt in der Meßküvette. Die Durchlaufgeschwindigkeit (ca. 0,5 bis 1 ml/min) kann durch Schwenken der Apparatur (Heben bzw. Senken des Ablaufs) eingestellt werden.

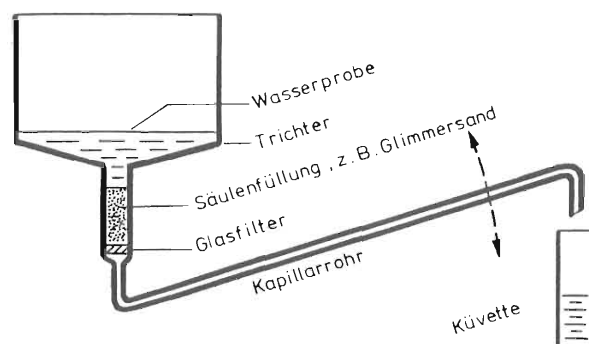


Fig. 4 Säulenordnung zur Abtrennung von adsorbierenden Farbtracern (z.B. Rhodamine) aus Mischungen mit nicht adsorbierbaren Farbtracern (z.B. Uranin, Eosin).

Uranin und Eosin treten bereits nach Durchlauf von wenigen ml in der Originalkonzentration der Probe im Ablauf auf. Amidorhodamin G bricht erst nach einigen hundert ml durch und Rhodamin B noch wesentlich später. Daher können Säulenfüllungen nach Auswaschen mit reinem Wasser auch mehrfach verwendet werden.

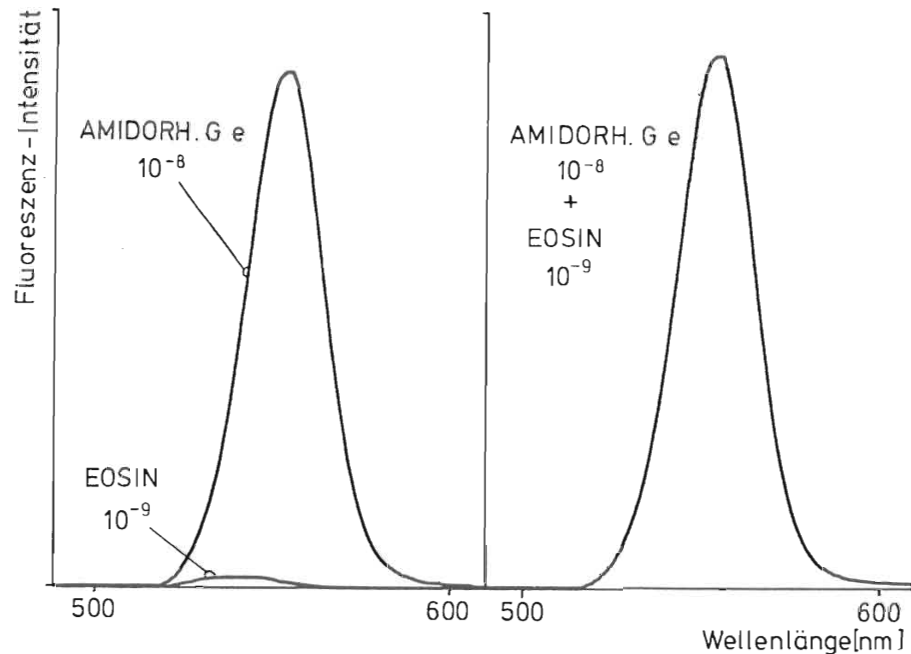


Fig. 5 Synchron-Scan-Spektren der Farbtracer Eosin und Amidorhodamin (links) sowie ihre Mischung; im Spektrum der Mischung ist die Anwesenheit von Eosin nicht zu erkennen (s.a. Fig. 6).

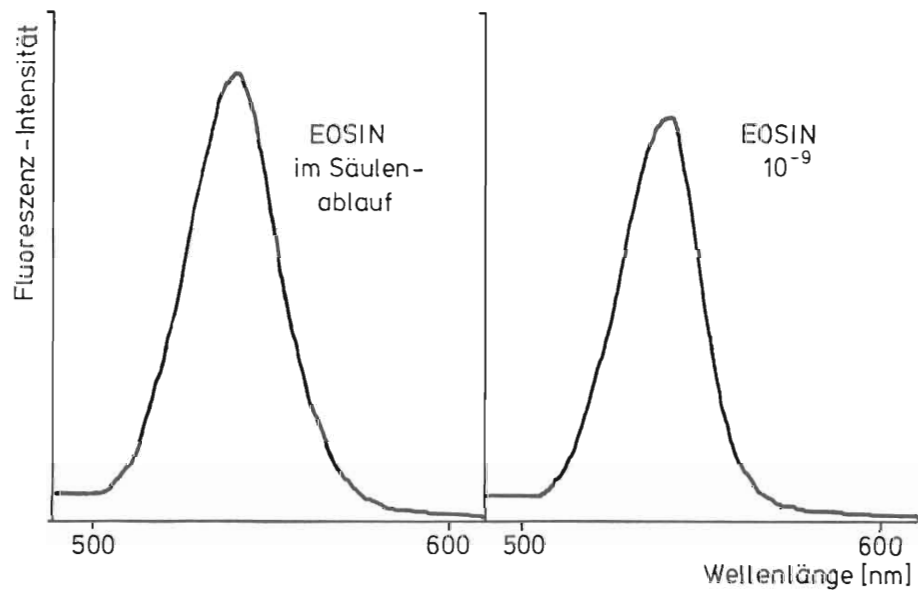


Fig. 6 Synchron-Scan-Spektren eines Säulenperkolats (Spektrum der Ausgangslösung in Fig. 5) und einer reinen Eosin-Lösung. Verstärkung in Fig. 6 30-fach gegenüber Fig. 5.

Das Verfahren eignet sich besonders zum Nachweis von Uranin und Eosin neben den Rhodaminfarbstoffen, womit das als besonders schwierig geltende Problem des Nachweises von Eosin neben Amidorhodamin G gelöst ist (s. Fig. 5 und 6). Unter Verwendung anderer Adsorptionsmittel, z.B. dem weniger stark adsorbierenden Kieselgel, können weitere Trennaufgaben, wie die Abtrennung von Rhodamin B aus Amidorhodamin G/Rhodamin B-Mischungen bewältigt werden.

3.3 Photolytische Behandlung von Wasserproben

Alle Fluoreszenztracer unterliegen bekanntlich einer Zersetzung durch Tageslicht. Die Lichtempfindlichkeit der einzelnen Farbstoffe ist sehr unterschiedlich, wobei Uranin und noch mehr Eosin die am stärksten lichtempfindlichen Fluoreszenztracer sind. Es wurde nun ein Verfahren entwickelt, bei dem die Lichteinwirkung ausgenutzt wird, um durch selektive Photolyse des Eosins einen störungsfreien Nachweis des Uranins in Mischungen beider Tracer zu ermöglichen. Allerdings sind die Unterschiede in der Lichtempfindlichkeit von Eosin und Uranin bei der Belichtung von normalen wässrigen Lösungen mit Tageslicht zu klein, um eine Eliminierung von Eosin ohne gleichzeitige große Verluste von Uranin zu ermöglichen. Da aber davon ausgegangen werden kann, daß für die Photolyse Licht derjenigen Wellenlängen wirksam ist, bei denen die Farbstoffe Licht absorbieren, lassen sich die Unterschiede in der Lichtempfindlichkeit durch gezielte Beeinflussung von Lichtzusammensetzung bzw. Lage der Absorptionsspektren stark verändern. So kann die Belichtung einer Uranin/Eosin-Lösung über ein Farbglas OG 515 (SCHOTT-Glaswerke, Mainz) vorgenommen werden, das lediglich auf Eosin wirksames Licht durchläßt, aber das auf Uranin wirksame Licht weitgehend zurückhält (s. Fig. 7). Unabhängig davon kann die Lichtempfindlichkeit von Uranin im Vergleich zu Eosin auch durch Ansäuern auf pH-Werte um 5 herabgesetzt werden; durch die Veränderung des Absorptionsspektrums rückt die Absorption des Uranins dadurch gewissermaßen etwas aus dem intensiveren Teil des Tageslichtspektrums heraus, während das Absorptionsspektrum des Eosins nahezu unverändert bleibt (s. Fig. 8). Durch eine Kombination beider Möglichkeiten können Bedingungen hergestellt werden, un-

ter denen Eosin weiterhin stark photolytisch zersetzt wird, Uranin aber stabil gegenüber der Lichteinwirkung ist (s. Fig. 9).

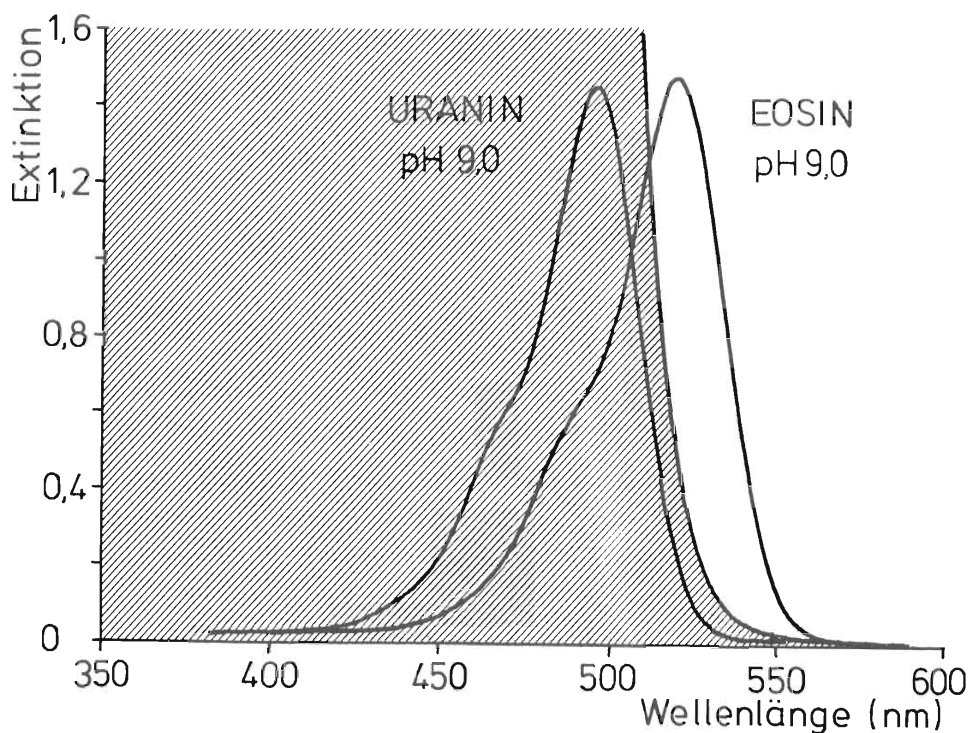


Fig. 7 Absorptionsspektren von Uranin und Eosin in schwach alkalischer Lösung sowie eines Farbglases OG 515/3 mm (lichtundurchlässiger Bereich des Farbglases schraffiert).

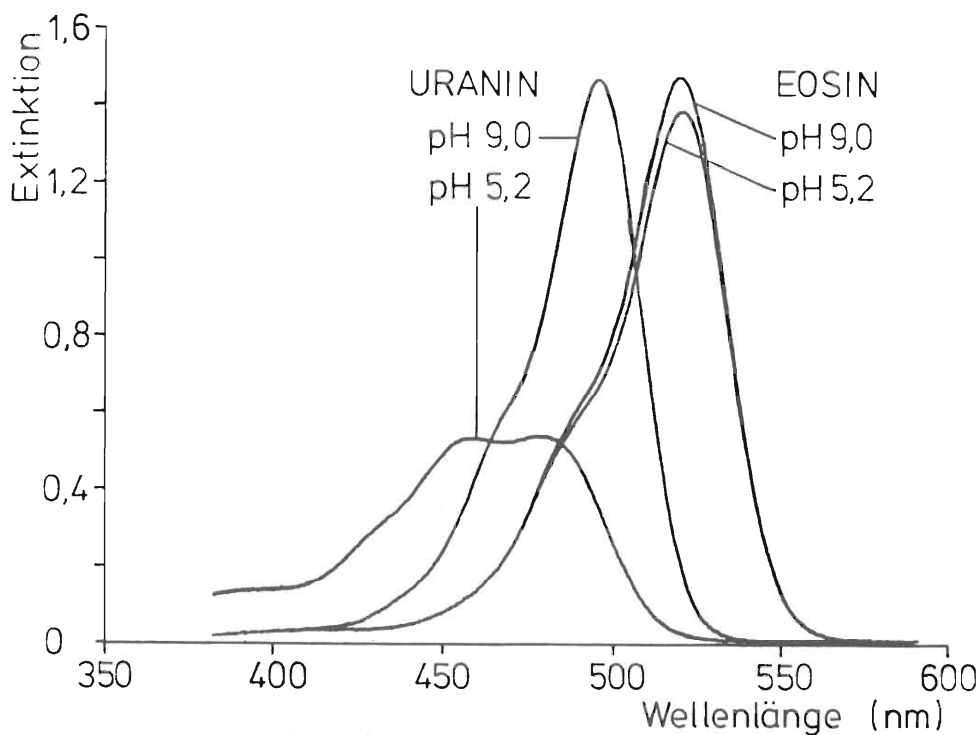


Fig. 8 Absorptionsspektren von Uranin und Eosin bei pH = 5,2 und pH = 9,0.

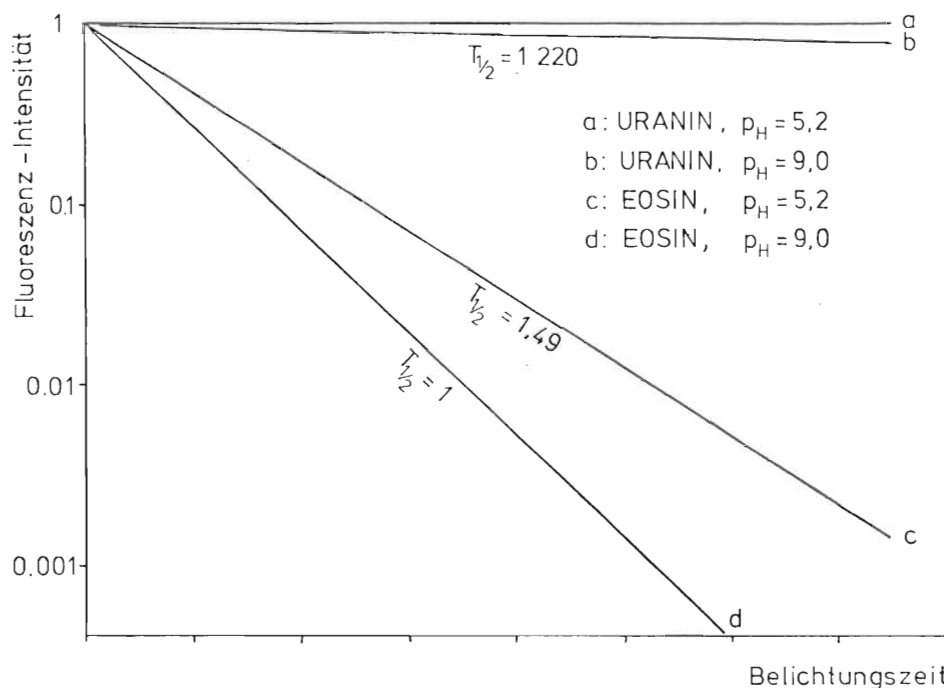


Fig. 9 Abnahme der Fluoreszenzintensität von Uranin- und Eosinlösungen bei Belichtung mit Tageslicht durch ein Farbglass OG 515/3 mm bei verschiedenen pH-Werten; $T_{1/2}$ sind die auf Eosinlösung mit $p_H = 9,0$ bezogenen relativen Halbwertszeiten der Fluoreszenzintensität. Für a ist $T_{1/2}$ so groß, daß es experimentell nicht gemessen werden konnte.

Auch allein durch die Belichtung von auf $p_H=5$ angesäuerten Proben (ohne zusätzliche Lichtfilterung) kann bereits eine ausreichende Zersetzung des Eosins zum selektiven Nachweis des Uranins erzielt werden. Die dabei eintretende, aber geringere Fluoreszenzabnahme des Uranins kann auf der Basis von als Standard mitbestrahlten reinen Uraninlösungen korrigiert werden. Es wurde festgestellt, daß die prozentuale Abnahme der Fluoreszenzintensität sowohl bei Uranin wie bei Eosin in verdünnten Lösungen ($<ca. 10^{-7}$ g/ml) unabhängig von der Konzentration ist. Somit steht für das Problem des qualitativen bzw. quantitativen Nachweises von Uranin neben Eosin ein weiteres Verfahren zur Verfügung.

4. Schlußbetrachtung

Durch eine gezielte Anwendung von pH-Veränderung, Adsorptionsmitteln und Lichteinwirkung auf Fluoreszenztracerlösungen konnten neue Wege zum selektiven Nachweis von einzelnen Tracern aus

Gemischen aufgezeigt werden. Die Beschreibung wurde im Interesse der Übersichtlichkeit auf die bekanntesten Tracer Uranin, Eosin, Amidorhodamin G und Rhodamin B beschränkt. Sinngemäß lassen sich in diese Verfahren aber auch weitere Tracer wie Pyranin oder Amidoflavin einbeziehen. Durch eine geeignete Kombination dieser Methoden lassen sich aus praktisch allen denkbaren Mischungen der üblichen Fluoreszenztracer die Einzelkomponenten qualitativ und quantitativ ermitteln.

Literatur

BAUER, F. (1967): Erfahrungen beim Uraninnachweis mit Aktivkohle - Steir. Beitr. zur Hydrogeologie, Jg. 1966/67, 169-178, Graz

BAUER, F. (1972): Weitere Erfahrungen beim Uraninnachweis mit Aktivkohle - Geol. Jb., C2, 19-27, Hannover

BEHRENS, H. (1971): Untersuchungen zum quantitativen Nachweis von Fluoreszenzfarbstoffen bei ihrer Anwendung als hydrologische Markierungsstoffe - Geologica Bavarica, 64, 120-131, München

BEHRENS, H. (1973): Eine verbesserte Nachweismethode für Fluoreszenzindikatoren und ihre Anwendung zur Feststellung von Fließwegen im Grundwasser - Deutsch. Geol. Ges., Bd. 124, 535-545, Hannover

BUB, F.P., HÖTZL, H. und WISSER, K. (1979): Dünnschicht-chromatographischer Nachweis von Fluoreszenztracern bei hydrologischen Markierungsversuchen - Steir. Beitr. zur Hydrogeologie, 31, 129-141, Graz

KÄSS, W. (1974): Die unmittelbare Bestimmung von Uranin-Spuren bei Färbversuchen - Steir. Beitr. zur Hydrogeologie, Jg. 1963/64, 37-65, Graz

KÄSS, W. (1967): Erfahrungen mit Uranin bei Färbeversuchen - Steir. Beitr. zur Hydrogeologie, Jg. 1966/67, 123-135, Graz

MOSER, H. und SAGL, H. (1967): Die Direktmessung hydrologischer Farbtracer im Gelände - Steir. Beitr. zur Hydrogeologie, Jg. 1966/67, 179-183, Graz

PERLEGA, W. (1976): Der Nachweis von Fluoreszenzfarbstoffen mittels Aktivkohle - Papers 3. SUWT, 195-201, Ljubljana

ROCHAT, J., ALARY, J., MOLINARI, J. und CHARRIERE, R. (1975): Separations physicochimiques de colorants xantheniques utilisées comme traceurs en hydrologie - J. of Hydrology, 26, 277-293