

Quantitative Bestimmung von Uranin, Eosin und Pyranin in Gemischen mittels Fluoreszenzmessung bei definierten pH-Werten

Determination of Uranine, Eosin, and Pyranine in Mixtures under Control of the pH.

H. BEHRENS¹⁾

Inhalt

	Seite
1. Einführung	117
2. Grundlagen	118
2.1. Spektrale Eigenschaften der Fluoreszenztracer	120
2.1.1. Uranin-Spektren	120
2.1.2. Eosin-Spektren	122
2.1.3. Pyranin-Spektren	122
2.2. Geräte- und Meßtechnik	122
2.2.1. Filterfluorimeter	122
2.2.2. Spektralfluorimeter	122
2.2.3. Scan-Methoden	122
3. Traceranalytik unter gezielter pH-Beeinflussung	124
3.1. Nachweis von Uranin neben Eosin	124
3.2. Nachweis von Eosin neben Uranin	124
3.3. Nachweis von Uranin neben Pyranin	125
3.4. Nachweis von Eosin neben Pyranin	126
3.5. Nachweis von Pyranin neben Uranin oder Eosin	126
3.6. Nachweis von einzelnen Komponenten in Mischungen von Uranin, Eosin und Pyranin	127
4. Die Einstellung von definierten pH-Werten	128
5. Zusammenfassung und Schlußfolgerung	128
Literatur	129
Summary	129
Dank	129

1. Einführung

Uranin, Eosin und neuerdings auch Pyranin sind häufig in der Hydrologie als Markierungsstoffe verwendete Fluoreszenztracer. Diese Substanzen sind saure Farbstoffe und sie liegen im pH-Bereich natürlicher Wässer weitgehend als Anionen vor, die im Vergleich zu basischen bzw. kationischen Markierungsmitteln weitaus gerin-

¹⁾ GSF-Institut für Hydrologie, D-8042 Neuherberg.

gere Neigung zur Adsorption an Mineralien zeigen. Deshalb haben Uranin, Eosin und Pyranin besondere Bedeutung für die Markierung des Wassers in porösen Medien der ungesättigten und gesättigten Zone erlangt, wohin sich die Aktivität der Markierungsanwendungen vom Oberflächen- und Karstwasser her kommend ausgedehnt hat. Mit dieser Entwicklung werden quantitativ immer anspruchsvollere Auswertungen von Markierungsversuchen vorgenommen, wobei die mit Tracern erhaltenen Daten auch in Auswertungen mit mathematischen Modellen eingehen. Daher bestehen hohe Anforderungen an die Genauigkeit und Richtigkeit der Meßwerte von Tracerkonzentrationen. In zunehmendem Maße werden auch bei Traceranwendungen in einzelnen Gebieten gleichzeitig Markierungen an mehreren Stellen mit verschiedenen Tracern vorgenommen, wodurch zwei und mehr Markierungsstoffe nebeneinander in einer Beobachtungsstelle und in daraus entnommenen Wasserproben auftreten können. Hierdurch wird die Ausführung der Traceranalytik deutlich schwieriger. Aufgrund dieser Situation besteht Bedarf an einer sicheren Beherrschung der Traceranalytik sowohl für die einzelnen Tracer als auch für ihre Mischungen.

Anwender der Tracermethoden haben jedoch häufig aufgrund ihrer fachlichen Orientierung nur unvollständige Einblicke in die Tracernachweis-Technik und in die vielfältigen Einflüsse verschiedener Faktoren auf die Analytik. Dies hat immer wieder ungenügende oder falsche Ergebnisse von Tracermessungen zur Folge. Die hier vorgelegte Arbeit setzt sich daher zum Ziel, wichtige Grundlagen der fluorimetrischen Tracermessung von Uranin, Eosin und Pyranin darzustellen und damit Empfehlungen für eine zuverlässige Ausführung der Traceranalytik zu geben. Neben einer optimalen Ausnutzung der instrumentellen Möglichkeiten (spektroskopische Differenzierungen der verschiedenen Tracer) wird bei dieser Analytik insbesondere auch Gebrauch von der Änderung der Fluoreszenz-Anregungsspektren mit pH-Wert-Verschiebungen gemacht (spektrochemische Differenzierung der Tracer).

2. Grundlagen

Alle als Tracer verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe sind organische Verbindungen von relativ komplexem Aufbau (Fig. 1). Sie haben die Eigenschaft, in ihren Lösungen Energie in Form von Licht durch Absorption aufzunehmen und unter Anregung der Moleküle in diesen vorübergehend zu speichern. Die Energie wird von den Molekülen sehr rasch unter weiteren Umwandlungen wieder abgegeben, und zwar wiederum als Licht (Emission). Dieser Vorgang wird Fluoreszenz genannt. Dabei treten Energieverluste auf, sodaß die emittierten Lichtquanten geringere Energie besitzen als die zuvor absorbierten, d.h., das emittierte Fluoreszenzlicht ist längerwellig als das zur Anregung absorbierte Licht (spektrale Verschiebung UV – Blau – Grün – Rot). Diese

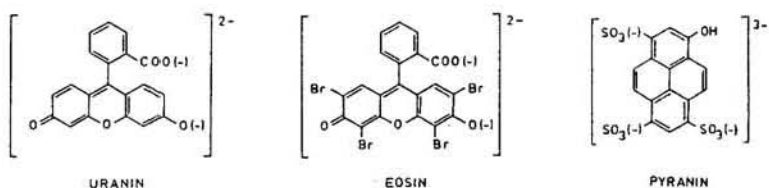


Fig. 1: Struktur (Anionen) der Fluoreszenztracer Uranin, Eosin und Pyranin.

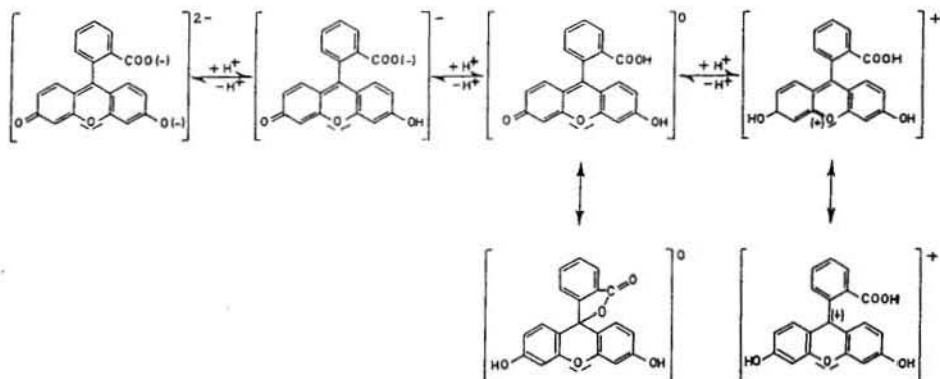


Fig. 2: Änderung der Struktur des Uranins in Lösung beim Ansäuern bzw. Alkalisieren.

Darstellung ist bewußt einfach gehalten, um nur die für ein Verständnis der Analytik wichtigen Phänomene der Fluoreszenz anzudeuten. Detailliert wird darauf in der bezüglichen Literatur (Lehrbücher) eingegangen.

Für die Fluoreszenzeigenschaften sind in den Molekülen strukturelle Details, insbesondere das System der Doppelbindungen ausschlaggebend. Die energetischen Daten dieser Bindungen bestimmen die Quantenenergie bzw. die Wellenlänge sowohl des absorbierten wie des emittierten Lichts. Das bedeutet, daß Fluoreszenzfarbstoffe je nach Molekular charakteristische Verteilungen sowohl des Anregungs- wie des Fluoreszenzlichts (Spektren) aufweisen. Aufgrund dieser Spektren können verschiedene Fluoreszenztracer identifiziert und qualitativ voneinander unterschieden werden. Die Intensität des emittierten Fluoreszenzlichts ist ein Maß für die Konzentration des betreffenden Farbstoffs. Leider weisen die Spektren der gebräuchlichen Fluoreszenztracer sehr breite Peaks auf, die sich weitgehend überlagern können. Dadurch sind einer lediglich auf Spektren basierenden selektiven Tracerbestimmung in Farbstoffmischungen Grenzen gesetzt.

Die Traceranalytik wird außerdem dadurch beeinflusst, daß die Farbstoffmoleküle in Abhängigkeit vom pH-Wert verschiedene Formen ausbilden können, wie es am Beispiel des Uranins in Fig. 2 dargestellt ist. Dieser Vorgang ist reversibel, er kann durch Ansäuern, Neutralisieren oder Alkalisieren in beliebiger Richtung und beliebig oft wiederholt werden. Wesentlich ist, daß sich mit den damit verbundenen Strukturänderungen vor allem die Anregungsspektren ändern. Die Form und Lage der Emissionsspektren ändert sich hingegen bei pH-Änderungen in der Regel nicht; aufgrund der unterschiedlichen Fluoreszenzanregung ändert sich jedoch die Höhe des Fluoreszenzsignals, die für die quantitative Tracerbestimmung ausschlaggebend ist.

Dies bedeutet einmal, daß bei Fluoreszenzmessungen nur dann eindeutige Ergebnisse erhalten werden, wenn definierte pH-Werte eingehalten bzw. eingestellt werden. Andererseits kann aber das auf pH-Änderungen unterschiedliche Ansprechen verschiedener Fluoreszenztracer als wertvolles Hilfsmittel zur optimalen analytischen Auflösung von Tracermischungen herangezogen werden.

Die Beeinflussung von Fluoreszenztracern durch pH-Änderungen wurde bereits vielfach genutzt. Seit langem ist bekannt, daß die grüne Fluoreszenz des Uranins durch Ansäuern zum Verschwinden gebracht werden kann (z.B. W. KÄSS, 1964). Von diesem Vorgang wird jedoch häufig angenommen, daß Uranin durch Säure „zerstört“ wird,

während tatsächlich die Fluoreszenz des Uranins durch anschließende Zugabe von Alkali wieder zurückgeholt werden kann. Die systematische Anwendung des pH-Einflusses zur Analyse von Tracermischungen hat F. BAUER (1972) beschrieben. Durch Säure nicht beeinflusstes Sulforhodamin G bzw. B konnte so neben hohen Konzentrationen an Uranin durch Ansäuern der Proben auf $\text{pH} = 2$ störungsfrei quantifiziert werden.

2.1. Spektrale Eigenschaften der Fluoreszenztracer

Als Grundlage für das Verständnis der in dieser Arbeit vorgestellten Analytik von Fluoreszenztracern werden zunächst die spektralen Daten der einzelnen diskutierten Farbstoffe vorgestellt. Die Spektren wurden mit dem Spektralfluorimeter PERKIN-ELMER LS-5 aufgenommen. In diesem Gerät werden spektrale Verfälschungen infolge der von den Wellenlängen abhängigen Emission der Lichtquelle und infolge der ebenso abhängigen Durchlässigkeit des Anregungsmonochromators durch eine Ratioanordnung korrigiert. Als Einfluß auf die Form der Spektren verbleibt lediglich die sich weniger auswirkende Aufprägung der Empfindlichkeitskurve des Detektorsystems. Voll korrigierte, d.h. absolute Spektren, sind allerdings für die Bestimmung von Fluoreszenztracern auch entbehrlich, da immer durch Vergleich mit Referenzproben analysiert wird, die den gleichen Einflüssen unterliegen.

2.1.1. Uranin-Spektren

In Fig. 3 sind die Fluoreszenz-Anregungsspektren einer Uraninlösung bei verschiedenen pH-Werten und das an der gleichen Lösung erhaltenen Fluoreszenz-Emissionsspektrum dargestellt. Das maximale Fluoreszenzsignal, von dem bei der quantitativen

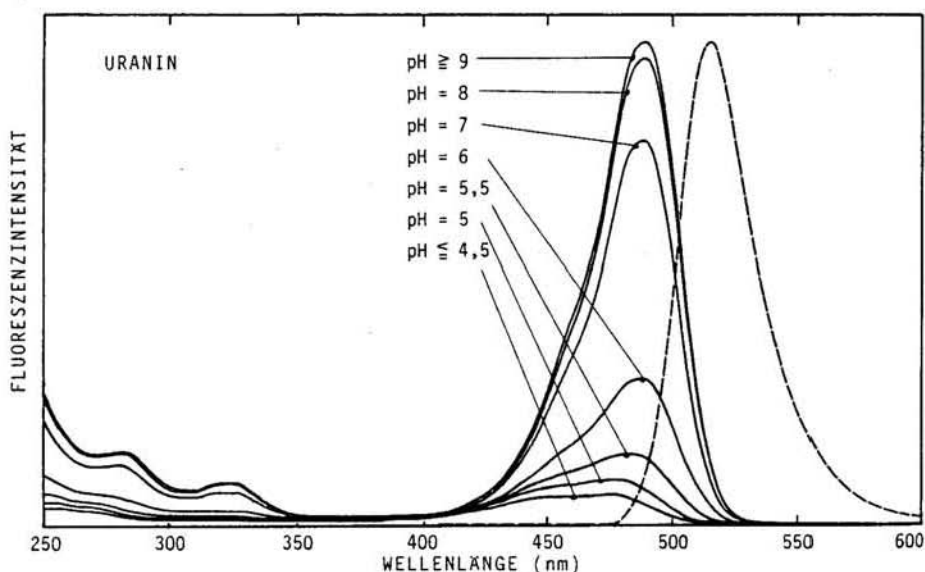


Fig. 3: Uranin: Fluoreszenz-Anregungsspektren (ausgezogene Linien) bei verschiedenen pH-Werten und Fluoreszenz-Emissionsspektren (strichlierte Linie).

Bestimmung von Uranin allgemein ausgegangen wird, liegt nur bei entsprechend alkalischen Lösungen vor. Bei Herabsetzung des pH-Wertes verändert sich das Anregungsspektrum in der in Fig. 3 dargestellten Weise; die mit der Ansäuerung zurückgehende Anregung hat eine entsprechende Abnahme des Fluoreszenzsignals zur Folge.

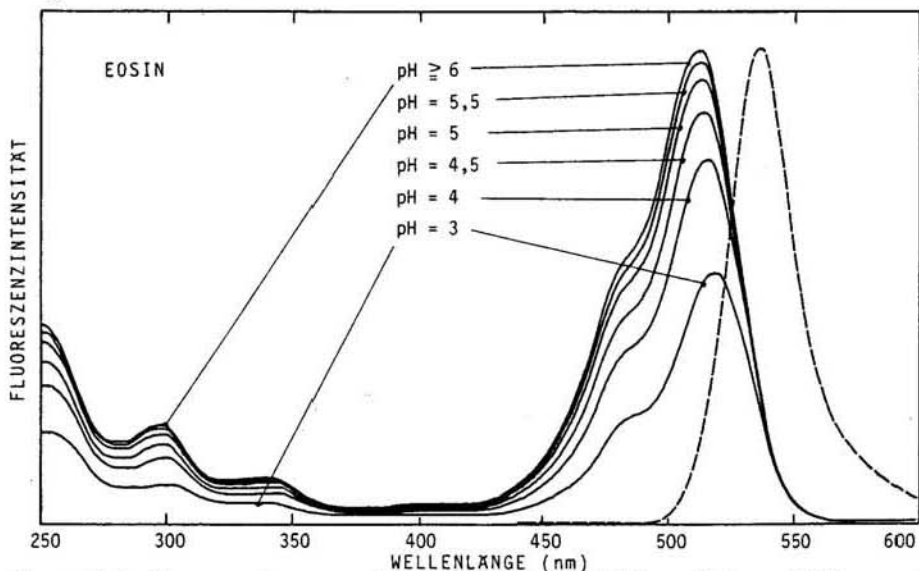


Fig. 4: Eosin: Fluoreszenz-Anregungsspektren (ausgezogene Linien) bei verschiedenen pH-Werten und Fluoreszenz-Emissionsspektrum (strichlierte Linie).

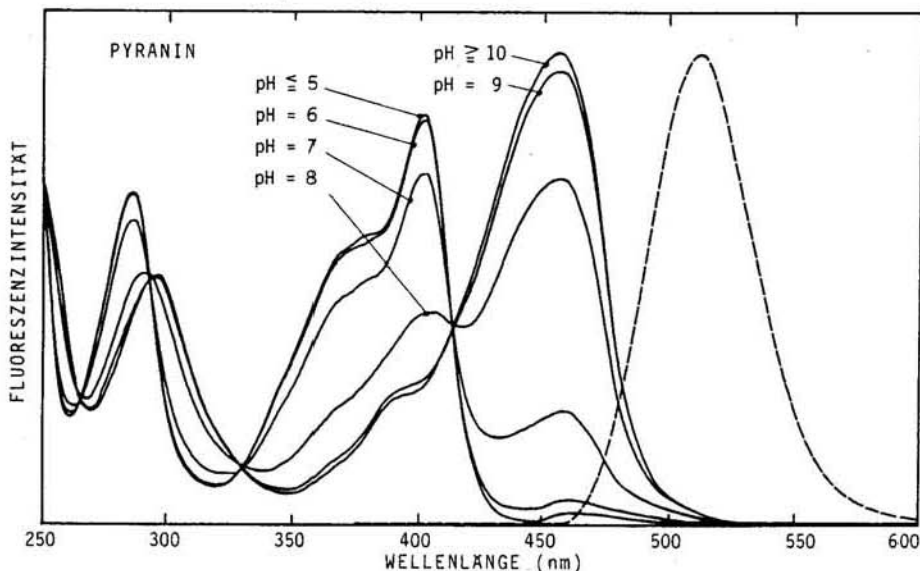


Fig. 5: Pyranin: Fluoreszenz-Anregungsspektren (ausgezogene Linien) bei verschiedenen pH-Werten und Fluoreszenz-Emissionsspektrum (strichlierte Linie).

2.1.2. Eosin-Spektren

Die Anregungs- und Emissionsspektren des Eosins sind in Fig. 4 dargestellt. Es ist ersichtlich, daß oberhalb von pH=5 konstante spektrale Eigenschaften vorliegen, während sie sich unterhalb dieses pH-Wertes mit seiner Variation laufend ändern.

2.1.3. Pyranin-Spektren

Aus den Anregungsspektren (Fig. 5) ergibt sich, daß oberhalb von pH=10 und unterhalb von pH=5 eindeutige Spektren vorliegen, und daß mit weiterem Alkalisieren bzw. Ansäuern keine weiteren spektralen Änderungen eintreten. Die beiden Grenzformen des Anregungsspektrums sind darin begründet, daß Pyranin in zwei verschiedenen Formen vorkommt. Oberhalb pH=10 und unterhalb pH=5 existiert jeweils nur eine von beiden, zwischen diesen pH-Werten liegen Gemische dieser beiden Formen vor. In diesem Bereich ergibt sich das Anregungsspektrum durch Addition der Einzelspektren und es variiert entsprechend vielfältig mit pH-Änderungen.

2.2. Geräte- und Meßtechnik

In Fluorimetern wird zur Erzielung optimaler Meßergebnisse für die jeweils zu analysierenden Farbstoffe Licht geeigneter Wellenlänge durch Filter bzw. Monochromatoren ausgefiltert. Während bei der Messung eines einzelnen Tracers die Filterauswahl bzw. die Monochromatoreinstellung gegebenen Diskriminierung Gebrauch gemacht.

2.2.1. Filterfluorimeter

In Filterfluorimetern dienen unterschiedliche Filterarten zur festen Einstellung der Wellenlängen. Besonders gut hat sich eine Kombination von Interferenz-Bandfiltern als Anregungsfilter und von Glas-Kantenfiltern als Emissionsfilter bewährt (H. BEHRENS, 1971). Mit Filterfluorimetern können keine Spektren erhalten werden; die aus der Spektralfluorimetrie gewonnen Erkenntnisse über den Einfluß des pH-Wertes auf die Spektren sind jedoch eine wichtige Grundlage für eine optimale Ausführung der Filterfluorimetrie.

2.2.2. Spektralfluorimeter

In Spektralfluorimetern dienen Gitter- oder auch Prismenmonochromatoren zur beliebigen Auswahl von Licht geeigneter Wellenlänge zur Anregung der Fluoreszenz bzw. zur Messung der Fluoreszenzsignale. Beim Durchfahren („Scannen“) von bestimmten Wellenlängenbereichen werden die entsprechenden Spektren erhalten.

2.2.3. Scan-Methoden

Beim Scannen des Emissionsmonochromators unter konstanter Beibehaltung einer Anregungswellenlänge werden mit der Änderung des Detektorsignals die Fluoreszenz-Anregungsspektren erhalten. Umgekehrt ergeben sich beim Scannen des Anregungsmonochromators und konstant gehaltener Emissionswellenlänge ebenfalls über das Detektorsignal die Fluoreszenz-Anregungsspektren (Fig. 2-4). Als besonders lei-

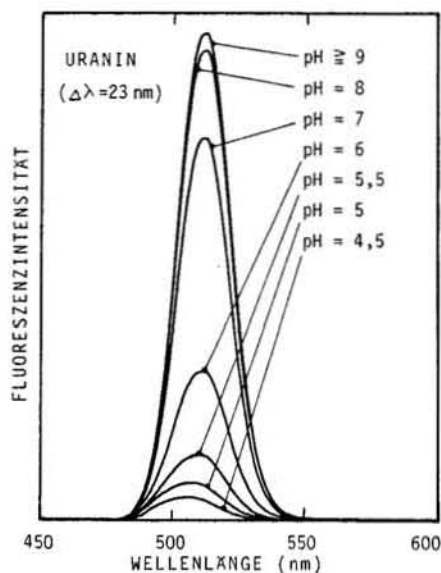


Fig. 6: Uranin: Synchronscan-Fluoreszenzspektren bei verschiedenen pH-Werten; Monochromator-Abstand: 23 nm, Spaltbreiten: 10/5 nm.

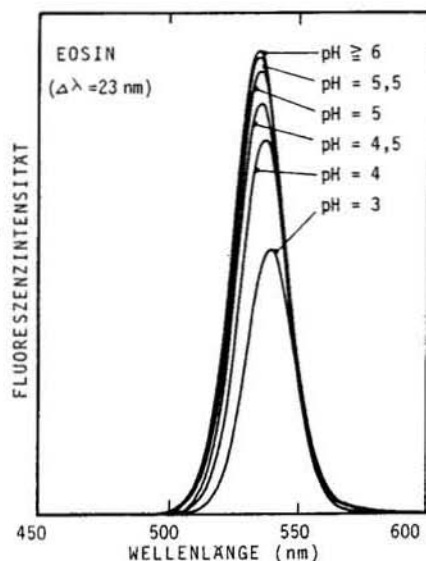


Fig. 7: Eosin: Synchronscan-Fluoreszenzspektren bei verschiedenen pH-Werten; Monochromator-Abstand: 23 nm, Spaltbreiten: 10/5 nm.

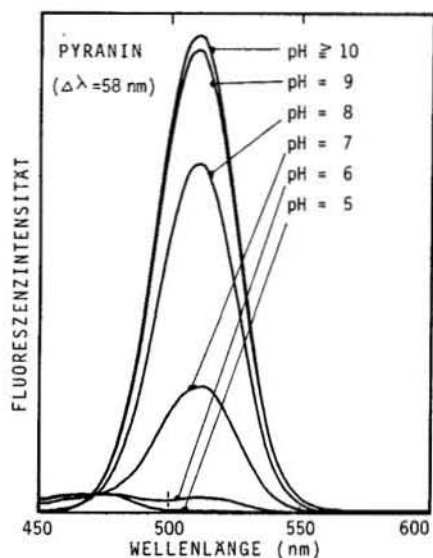


Fig. 8: Pyranin: Synchronscan-Fluoreszenzspektren bei verschiedenen pH-Werten; Monochromator-Abstand: 58 nm, Spaltbreiten: 10/5 nm.

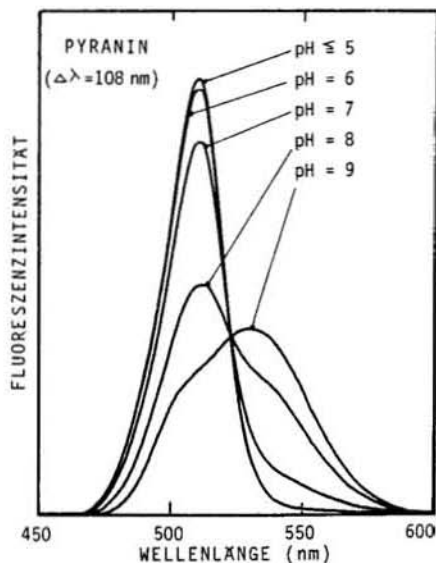


Fig. 9: Pyranin: Synchronscan-Fluoreszenzspektren bei verschiedenen pH-Werten; Monochromator-Abstand: 108 nm, Spaltbreiten: 10/5 nm.

stungsfähiges Nachweisverfahren für Fluoreszenztracer wurde die sog. Synchronscan-Methode entwickelt (H. BEHRENS; 1970, 1971); die Entwicklung erfolgte unabhängig und etwa gleichzeitig mit entsprechenden Arbeiten zur Fluoreszenzanalyse von anderen Stoffgruppen durch J. B. F. LLOYD (1971). Dieses Verfahren, bei dem beide Monochromatoren gleichzeitig in einem konstanten Wellenlängen-Abstand (als $\Delta\lambda = \dots\text{nm}$ angegeben) gescannt werden, liefert verfälschte Fluoreszenzspektren, die im Vergleich zu konventionellen Fluoreszenzspektren vorteilhaft eine erhöhte spektrale Auflösung und einen geringeren Streulichtuntergrund aufweisen. Synchronspektren von Uranin, Eosin und Pyranin sind in ihrer Abhängigkeit vom pH-Wert in Fig. 6–9 dargestellt.

3. Traceranalytik unter gezielter pH-Beeinflussung

Die vorgestellten spektralen Eigenschaften der Fluoreszenztracer Uranin, Eosin und Pyranin erweisen relativ breitbandige Spektren, die sich so stark überlagern können, daß der Nachweis eines jeweils interessierenden Tracers in Anwesenheit eines oder beider anderen Tracer erheblich beeinträchtigt werden kann. Die Variation der Spektren mit dem pH-Wert ermöglicht es jedoch, diese Beeinträchtigungen zu reduzieren und teilweise nahezu vollständig aufzuheben. Auch für den Nachweis einzelner Tracer ist die Berücksichtigung des pH-Wertes von Bedeutung. So sollte Uranin bei pH-Werten von > 9 gemessen werden, da bei kleineren pH-Werten schwer kontrollierbare Abnahmen der Fluoreszenzintensität dieses Farbstoffs auftreten. Ebenso sollte der pH-Wert beim Nachweis des Eosins möglichst > 6 , mindestens aber $> 4,6$ sein. Das Fluoreszenzsignal des Pyranins ist entweder bei pH-Werten > 10 ($\lambda_{\text{Anregung}} = 452\text{ nm}$) oder bei pH-Werten < 5 ($\lambda_{\text{Anregung}} = 402\text{ nm}$) unabhängig von pH-Änderungen. Die nachfolgend vorgestellten Empfehlungen für die Traceranalytik unter pH-Beeinflussung beziehen sich auf spektralfluorimetrische Messungen unter Anwendung des Synchronscan-Verfahrens. Eine entsprechende Anwendung der pH-Einstellung bei der Messung mit Filterfluorimetern wird gesondert behandelt (H. BEHRENS, in Vorbereitung).

3.1. Nachweis von Uranin neben Eosin

Die quantitative Bestimmung des Urans erfordert die Einstellung alkalischer Verhältnisse in der Probenlösung. Da die Fluoreszenz des Eosins bei diesen pH-Werten ebenfalls voll entwickelt ist, besteht keine Möglichkeit zur Unterdrückung störender Eosinfluoreszenz durch pH-Einstellung. Eine Eliminierung des Eosinbeitrages zum Uraninmeßwert kann daher nur rechnerisch erfolgen (W. KÄSS, 1982; H. BEHRENS, 1982). Ein Verfahren zur Eliminierung der Eosinfluoreszenz in Uranin/Eosin-Mischungen steht lediglich mit der selektiven photolytischen Zersetzung des Eosins zur Verfügung (H. BEHRENS, 1982).

3.2. Nachweis von Eosin neben Uranin

Zum Nachweis von Eosin neben Uranin wird von der Tatsache Gebrauch gemacht, daß die Fluoreszenz von Uranin mit dem Ansäuern bereits im Neutralbereich stark zurückgeht, während die des Eosins erst in stärker saurer Lösung beeinflußt wird. Als

günstig für die Messung wird pH=4,6 bei $\Delta\lambda = 23$ nm empfohlen. Durch Kalibrierung mit einem Eosinstandard ebenfalls bei diesem pH wird der geringfügige Rückgang der Eosinfluoreszenz vollkommen eliminiert. Der Einfluß des Uranins in verschiedenen Konzentrationen auf niedrig konzentriertes Eosin unter diesen Meßbedingungen in Fig. 10 dargestellt. Es ist zu erkennen, daß trotz deutlicher Unterdrückung der Uraninfluoreszenz ein störender Uraninpeak bei ca. 505 nm verbleibt. Bei einer etwa 30fachen Uraninkonzentration gegenüber Eosin ist die Grenze der visuellen Erkennbarkeit der Anwesenheit von Eosin erreicht. Mit einer zusätzlichen rechnerischen Auswertung läßt sich Eosin schließlich bei einem noch zehnmal größeren Uraninüberschuß bestimmen.

3.3. Nachweis von Uranin neben Pyranin

Der Nachweis muß wiederum in alkalischer Lösung ($\text{pH} \geq 10$) erfolgen, es wird Synchronscan mit $\Delta\lambda = 23$ nm angewandt. Der Uraninnachweis wird unter den vorliegenden Meßbedingungen durch einen Fluoreszenzpeak des Pyranins mit Maximum bei 493 nm gestört, dessen Einfluß wie bereits früher beschrieben (H. BEHRENS et al., 1986) rechnerisch weitgehend eliminiert werden kann. Ein Korrekturwert dazu wird durch eine bei $\text{pH} \leq 5$ vorgenommene Pyraninmessung, die durch Uranin weniger gestört wird (s. 3.5.), erhalten:

$$\text{Sktl}_{u_n} - \text{Sktl}_{u_b} - \text{Sktl}_{p_r}$$

$$F = \frac{V_u \text{ Sktl}_{p_r}}{V_{p_r} \text{ Sktl}_{p_r}}$$

Sktl_{u_n} Uranin-Nettosignal (Peakhöhe) bei 512 nm

Sktl_{u_b} Uranin-Bruttosignal bei 512 nm $\Delta\lambda = 23$ nm, $\text{pH} \geq 10$)

Sktl_{p_r} Pyraninsignal bei 510 nm ($\Delta\lambda = 108$ nm, $\text{pH} \leq 5$)

V_u Verstärkung bei der Messung von Sktl_{u_b}

V_{p_r} Verstärkung bei der Messung von Sktl_{p_r}

Sktl_{p_r} Signal eines Pyraninstandards bei 512 nm ($\Delta\lambda = 58$ nm, $\text{pH} \geq 10$)

Sktl_{p_r} Signal des gleichen Pyraninstandards bei 510 nm ($\Delta\lambda = 108$ nm, $\text{pH} \leq 5$)

Bei Verwendung von Quarzküvetten ist unter den angegebenen Meßbedingungen im Bereich der Uraninfluoreszenz ein relativ starkes, vom Pyranin stammendes und außerordentlich störendes Signal zu beobachten. Es ist dies ein Fluoreszenzspektrum zweiter Ordnung, dessen Anregungsmaximum bei 240 nm liegt (in Fig. 5 am linken Bildrand noch erkennbar). Dieses Signal läßt sich durch ein UV-Sperrfilter (z. B. SCHOTT WG 320) vollkommen unterdrücken. Bei der Verwendung von Küvetten aus optischem Glas tritt eine solche Filterwirkung auch bereits aufgrund der UV-Undurchlässigkeit dieses Materials ein. Es sollte trotzdem auch in diesem Fall, so wie es in den in dieser Arbeit beschriebenen Messungen geschah, grundsätzlich ein UV-Sperrfilter eingesetzt werden. Nachteile können dadurch nicht eintreten, da alle benutzten Anregungs- und Emissionswellenlängen im sichtbaren Spektralbereich liegen.

3.4. Nachweis von Eosin neben Pyranin

Für diese Meßaufgabe wird die Messung des Eosins in leicht saurer Lösung bei $\text{pH}=4,6$ mit $\Delta\lambda = 23 \text{ nm}$ empfohlen. Unter dieser Bedingung ist der Einfluß des Pyranins so weit unterdrückt, daß Eosin noch in Anwesenheit der 1.000-fachen Konzentration an Pyranin eindeutig bestimmt werden kann (s. Fig. 11). Die Kalibrierung ist wiederum mit einem Eosinstandard des gleichen pH -Wertes vorzunehmen.

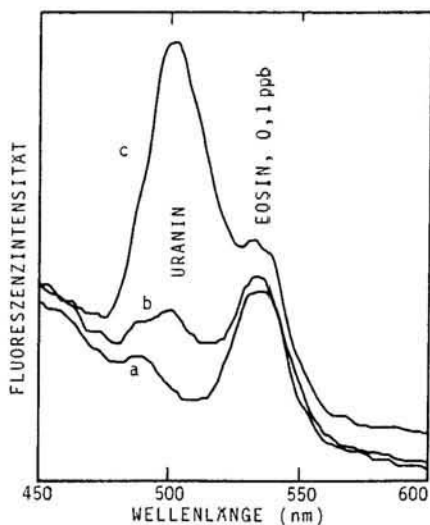


Fig. 10: Synchronscan-Fluoreszenzspektren von Mischungen von Eosin (0,1 ppb) mit Uranin in den Konzentrationen 0 ppb (a), 0,1 ppb (b) und 0,5 ppb (c) bei $\text{pH}=4,6$; Monochromator-Abstand: 23 nm, Spaltbreiten: 10/5 nm.

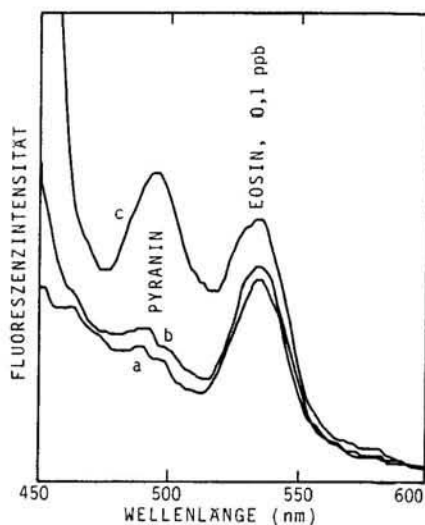


Fig. 11: Synchronscan-Fluoreszenzspektren von Mischungen von Eosin (0,1 ppb) mit Pyranin in den Konzentrationen 0 ppb (a), 10 ppb (b) und 100 ppb (c) bei $\text{pH}=4,6$; Monochromator-Abstand: 23 nm, Spaltbreiten: 10/5 nm.

3.5. Nachweis von Pyranin neben Uranin oder Eosin

Der Nachweis von Pyranin neben Uranin erfolgt zweckmäßig in saurer Lösung bei $\text{pH}=4,6$ und Synchronscan mit $\Delta\lambda = 108 \text{ nm}$ (Fig. 12). Die hierbei noch zu beobachtende Überlagerung des Pyraninpeaks durch ein vom Uranin stammendes Signal läßt sich weitgehend rechnerisch eliminieren. Dazu wird unter den gleichen Meßbedingungen an einer reinen Uraninlösung das Verhältnis des Fluoreszenzsignals bei 510 nm zu dem bei 545 nm gebildet. Mit dem so ermittelten Faktor wird das in Pyranin/Uranin-Mischungen bei 545 nm erhaltenen Signal multipliziert und der resultierende Betrag vom Fluoreszenzsignal bei 510 nm abgezogen. Es verbleibt das Netto-Pyraninsignal. Pyranin kann so noch bei einem mehr als 50-fachen Überschuß von Uranin quantifiziert werden. Neben Eosin wird Pyranin in gleicher Weise, jedoch bei einem pH -Wert von ca. 2 nachgewiesen. Im Gegensatz zur Beeinflussung durch Uranin wird auch bei einem mehr als 200-fachen Überschuß an Eosin die Höhe des Pyraninpeaks noch nicht merklich beeinflusst (Fig. 13); es tritt allerdings auf der längerwelligen Seite des Pyraninpeaks eine Erhöhung des Untergrundes ein.

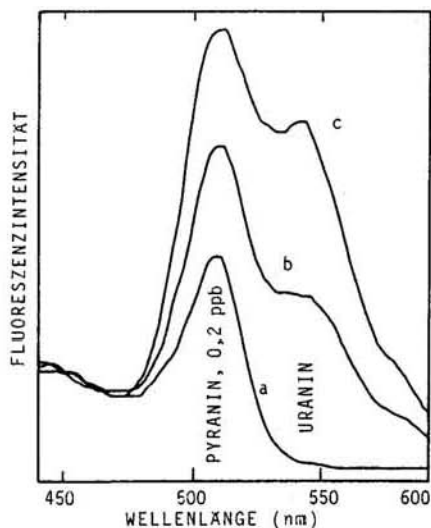


Fig. 12: Synchronscan-Fluoreszenzspektren von Mischungen von Pyranin (0,2 ppb) mit Uranin in den Konzentrationen 0 ppb (a), 1 ppb (b) und 2 ppb (c) bei $pH=4,6$; Monochromator-Abstand: 108 nm, Spaltbreiten: 10/5 nm,

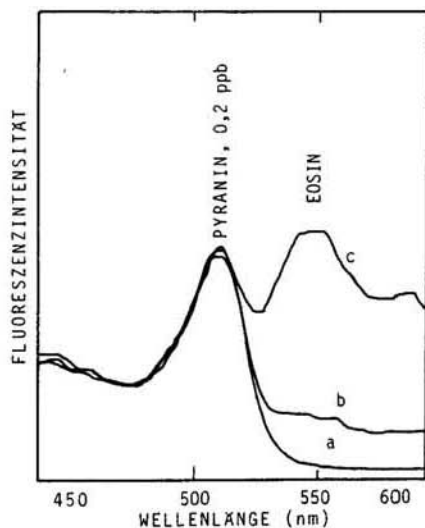


Fig. 13: Synchronscan-Fluoreszenzspektren von Mischungen von Pyranin (0,2 ppb) mit Eosin in den Konzentrationen 0 ppb (a), 10 ppb (b) und 50 ppb (c) bei $pH=2$; Monochromator-Abstand: 108 nm, Spaltbreiten: 10/5 nm.

3.6. Nachweis von einzelnen Komponenten in Mischungen von Uranin, Eosin und Pyranin

Für Uranin, das nur in alkalischer Lösung bestimmt werden kann, besteht keine Möglichkeit der Verbesserung seiner Erkennbarkeit neben den beiden anderen Farbstoffen, wenn diese in wesentlich mehr als eine Größenordnung höheren Konzentration vorliegen. Darunter kann die Überlagerung des Uranins durch Eosin- und Pyraninfluoreszenz weitgehend rechnerisch in der bereits beschriebenen Weise korrigiert werden, wenn die beiden anderen Farbstoffe zuvor unter Zuhilfenahme der beschriebenen Methoden quantifiziert wurden. Eosin (Messung mit Synchronscan bei $\Delta\lambda = 23$ nm) wird von den beiden anderen Farbstoffen nur durch Uranin störend überlagert, während von Pyranin noch vielfache Konzentrationen ohne Wirkung bleiben (s. 3.4.). Für einen Eosinnachweis in den ternären Tracermischungen kann daher zumeist wie unter 3.2. beschrieben verfahren werden.

Während Pyranin in saurer Lösung bei gleichzeitiger Anwesenheit von Uranin und Eosin in bis zu 100-fach höheren Konzentrationen noch qualitativ erkannt werden kann, gestaltet sich seine quantitative Bestimmung in diesem Fall schwieriger. Bei nicht zu hohem Überschuß an den beiden störenden Farbstoffen kann sie jedoch ebenfalls in Anlehnung an die unter 3.5. gegebenen Empfehlungen vorgenommen werden.

4. Die Einstellung von definierten pH-Werten

Bei der gezielten pH-Einstellung zur Optimierung des Tracernachweises in Gemischen werden die pH-Werte >9 bzw. >10 , 4,6 und ca. 2 bevorzugt benötigt. Es wurde angestrebt, diese pH-Werte unter minimaler Probenverdünnung einzustellen. Es sollten diese pH-Werte auch vorzugsweise direkt in der Meßküvette eingestellt werden, um ein besonders rationelles Arbeiten zu ermöglichen.

Die vor allem in der Biochemie verwendeten Pufferlösungen, für die vielfach Rezepte angegeben werden, und die auch "gebrauchsfertig" im Handel erhältlich sind, erwiesen sich als wenig geeignet, da zu große Volumina zur Erzielung eindeutiger pH-Werte zu den Proben zugesetzt werden müssen. Eine gute Arbeitsgrundlage wurde statt dessen mit der Herstellung und Verwendung von Pufferkonzentraten gefunden.

Zur Einstellung des pH=4,6 in einem Kalkschotterwasser wird zum Küvetteninhalt von 3,5 ml ein Acetatpuffer (5,5 M Essigsäure, 4,5 M Kaliumacetat) in einer Menge von 20 μ l hinzugegeben. Bei Messungen an ausgesprochen sauren oder alkalischen Wässern kann eine Variation des Essigsäure/Kaliumacetat-Verhältnisses angezeigt sein. Die Einstellung des gewünschten pH-Wertes sollte von Zeit zu Zeit an größeren Probenvolumina mit dem äquivalenten Pufferzusatz überprüft werden.

Die zur Küvette zugesetzte Puffermenge ist so klein, daß die dadurch hervorgerufene Verdünnung meist vernachlässigt werden kann. Wird die Verdünnung aber rechnerisch berücksichtigt, so scheidet sie als Fehlerquelle vollkommen aus.

Zur Einstellung stark alkalischer Verhältnisse wurde eine optimale Lösung mit dem Zusatz des Tetra-natriumsalzes der Ethylen-diamin-tetraessigsäure (EDTE) zu den Wasserproben gefunden. EDTE hat außer der pH-Veränderung keinen Einfluß auf die Fluoreszenz von Farbtacern und es fluoresziert auch selbst nicht. Im Gegensatz zur Verwendung von NaOH, Ammoniak u.ä. zur Einstellung erhöhter pH-Werte bleiben die Probenlösungen mit EDTE-Salz vollkommen klar, da EDTE komplexierend auf sonst ausfallende Hydroxide, Karbonate, u.ä. wirkt. Dadurch wird eine sonst eintretende Erhöhung des Untergrundsignals durch Lichtstreuung vermieden. Es wird eine Lösung von 10 g des EDTE-tetra-natriumsalzes in 10 ml Wasser verwendet. In einem Kalkschotter-Wasser wird durch den Zusatz von 20 μ l zu 3,5 ml Probe der pH-Wert auf >10 erhöht.

Die Einstellung stark saurer Verhältnisse, z.B. pH ca. 2, kann schließlich in bewährter Weise durch Zusatz von kleinen Mengen an konzentrierter Schwefelsäure erfolgen.

5. Zusammenfassung und Schlußfolgerung

Durch Fluoreszenzmessungen bei gezielt eingestellten pH-Werten kann die gegenseitige Störung des Nachweises von Uranin, Eosin und Pyranin gegenüber Messungen ohne diese Maßnahme deutlich vermindert werden. Der Erfolg ist jedoch bei den einzelnen Farbstoffen unterschiedlich. Am wenigsten befriedigend ist die Verbesserung der Selektivität des Uraninnachweises, so daß hier noch Bedarf an anderen zu diesem Ziel führenden Techniken besteht.

Literatur

- BAUER, F. (1972): Untersuchungen über die Verwendbarkeit von zwei Fluoreszenzfarbstoffen im Rahmen eines Färbeversuchs.- Geol. Jb., C2, 61-73, Hannover.
- BEHRENS, H. (1970): Zur Messung von Fluoreszenzfarbstoffen.- Jahresber. 1969 des GSF-Instituts für Radiohydrometrie, 92-95, München-Neuherberg.
- BEHRENS, H. (1971): Untersuchungen zum quantitativen Nachweis von Fluoreszenzfarbstoffen bei ihrer Anwendung als hydrologische Markierungsstoffe.- Geologica Bavarica, 64, 120-131, München.
- BEHRENS, H. (1982): Verfahren zum qualitativen und quantitativen Nachweis von nebeneinander vorliegenden Fluoreszenztracern.- Beitr. z. Geologie der Schweiz, 28, 39-50, Bern.
- BEHRENS, H., CH. LEIBUNDGUT, P. THEODORATOS & A. VITORIOU-GEORGIOU (1986): Tracer Experiments and results of the experiment: Tracing with fluorescent tracers. In: Karst Hydrogeology of the Eastern and Central Peloponnesus.- Steir. Beitr. z. Hydrogeologie, 37/38, Graz.
- KASS, W. (1964): Die unmittelbare Bestimmung von Uranin-Spuren bei Färbeversuchen.- Steir. Beitr. z. Hydrogeologie, 15/16, Graz.
- KASS, W. (1982): Routinemäßige Bestimmung von zwei Fluoreszenzfarbstoffen nebeneinander.- Beitr. z. Geologie d. Schweiz, 28, 51-62, Bern.
- LLOYD, J. B. F. (1971): Synchronized Excitation of Fluorescence Emission Spectra.- Nature, Phys. Sci., 231, 64 S., London.

Summary

Fluorescence excitation of the frequently used fluorescent water tracers Uranine, Eosine and Pyranine is strongly influenced by variations of the pH of tracer solutions. This effect which brings about variations of the shape of excitation spectra (fig. 3-5) as well as of intensity of fluorescence emission, can be used to improve the selective detection of individual dye tracers in their mixtures. Measurements are performed using a spectrofluorometer in the synchronous scanning mode, at pH values of > 10, 4.6 and 2. Adjustment of pH is made by addition of small amounts of buffer concentrates directly to the cuvettes. An acetate buffer is used for pH 4.6, while the pH of about 2 is obtained by addition of sulfuric acid. To effect a pH of > 10, a solution of EDTA-tetrasodium-salt is added to the samples. This reagent avoids precipitation of hydroxides, carbonates, etc. which would strongly scatter light, and therefore affect the sensitivity of dye-detection.

Using these techniques, Eosin can be quantified in the presence of 100-fold concentration of Uranine (fig. 10) or more than 1000-fold concentration of Pyranine (fig. 11). Pyranine can be analysed in the presence of a 50-fold concentration of Uranine (fig. 12) and 200-fold concentration of Eosin respectively (fig. 13). The technique is less effective for detection of Uranine in the presence of the other two dyes. This restriction is based on the fact that Uranine can be measured accurately only in alkaline solutions which limits the applicability of pH manipulation techniques.

Dank

Der Verfasser dankt den Mitarbeitern des Tracerlabors im GSF-Institut für Hydrologie, insbesondere Herrn G. TEICHMANN, für die wertvolle Unterstützung bei den Untersuchungen.