

## ROUTINEMÄSSIGE BESTIMMUNG VON ZWEI FLUORESZENZFARBSTOFFEN NEBENEINANDER

Werner Käss, Freiburg/Br.

Geologisches Landesamt Baden-Württemberg/BRD

Abstract: Fluorescent colouring matters are still the most sensitive and the least expensive tracers to observe underground waters. The simultaneous application of various fluorescent colouring matters nearly always causes considerable analytical problems. These difficulties can largely be mastered by spectra registration with the double-scanning-method. Here an arithmetical method has been described which has proved itself excellently with the application of two fluorescence colours.

Die gleichzeitige Verwendung mehrerer Fluoreszenzfarbstoffe bei Markierungsversuchen bringt einen beträchtlichen Gewinn zusätzlicher Informationen. Die Einsparungen bei der Probenahme dürfte der wichtigste Faktor sein. Daneben ist die Feststellung der Abflussverhältnisse der eingefärbten Wässer bei einheitlichen hydro meteorologischen Bedingungen als Gewinn anzusehen. Würde man die Einfärbungen in zeitlichem Abstand hintereinander vornehmen, würden damit kaum voll vergleichbare Ergebnisse erzielt werden können.

Mit der Untersuchung von Wasserproben, die gleichzeitig mehrere Fluoreszenzfarben enthalten, beschäftigten sich seither bereits

mehrere Autoren. Im Jahr 1967 veröffentlichte ich eine Berechnungsmöglichkeit zur Ermittlung der Einzelkonzentrationen von Mischungen zweier Farben an Hand von Extinktionsmessungen (KÄSS W., 1967). Später entwickelte H. BEHRENS das Doppel-Scanning-Verfahren, bei dem in gleichbleibendem Wellenlängenabstand Anregung und Fluoreszenz spektral durchfahren wird. (BEHRENS H., 1973 und BEHRENS H., ZUPAN M. und ZUPAN M., 1976). Damit wird eine höhere spektrale Auflösung der Fluoreszenz verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe erreicht. Dieses Verfahren lässt sich allerdings nur für solche fluoreszierenden Farbstoffe anwenden, die etwa gleiche Wellenlängenabstände zwischen Anregungs- und Fluoreszenzmaximum besitzen (vgl. Tabelle 1). Neuerdings wird versucht, durch Oxidation, pH-Wert-Veränderung und durch Lichteinfluss eine Trennung der einzelnen Farbstoffe zu erreichen (BEHRENS H., 1982). In Aktivkohleauszügen können Farbstoffgemische durch dünnenschichtchromatographische Behandlung getrennt werden (BUB F.B., HÖTZL H. und WISSEK K., 1979).

Alle diese Verfahren sind mehr oder wenig zeitaufwendig, was bei einer grossen Zahl von Proben eine gewisse Schwierigkeit bedeutet. Daher wurde ein rechnerisches Verfahren entwickelt, mit dem ohne grossen Zeitverlust die Komponenten bei der Untersuchung von Mischungen zweier beliebiger Farbstoffe ermittelt werden können. Dieses Verfahren lehnt sich eng an meine bereits 1967 mitgeteilten Formeln an.

Bei der routinemässigen Anwendung mehrerer Fluoreszenzfarbstoffe müssen jedoch einige Bedingungen erfüllt sein, die hier beschrieben werden.

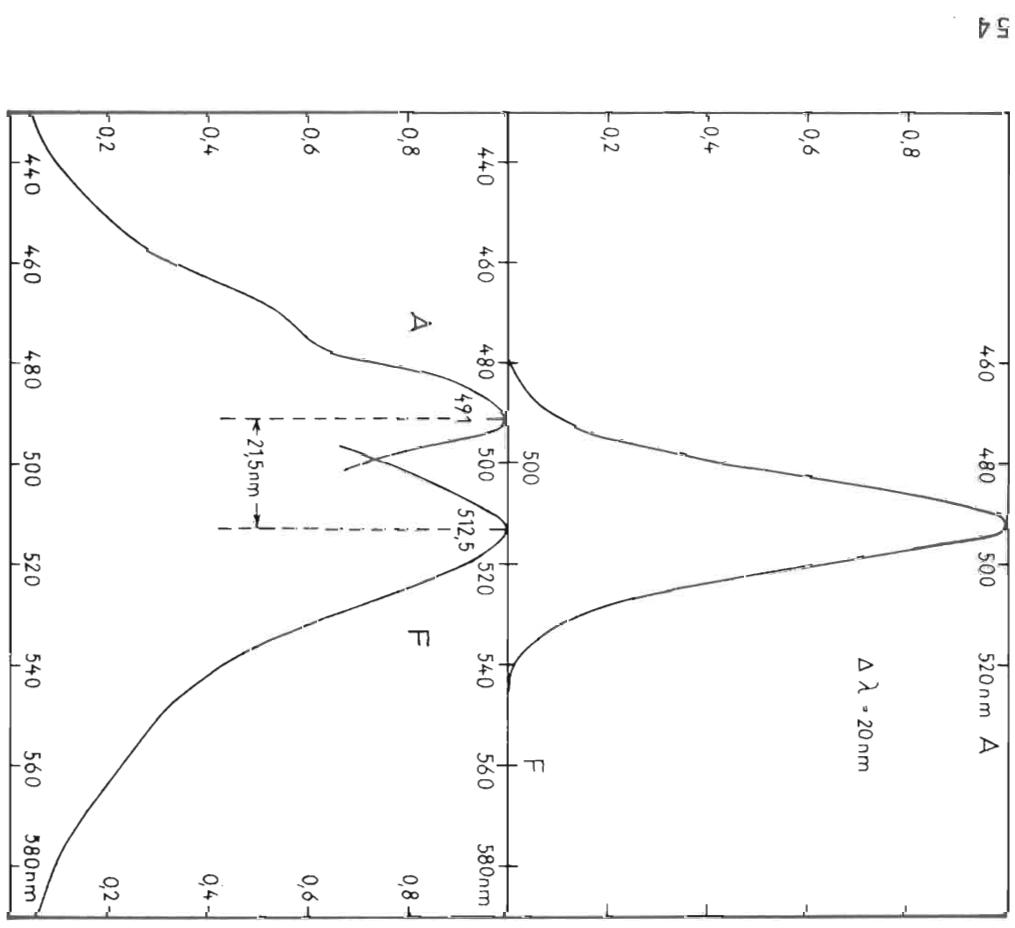
Bei Färbversuchen fallen in der Regel zwischen 50 und 500 Einzelproben an, die in mehreren Transporten im Laboratorium eintreffen. Als wiederverwendbare Flaschenart haben sich 250 ml Meplac-Flaschen aus Braunglas bewährt. Die Untersuchung einer Vielzahl von Proben kann nur noch mit Automaten erfolgen. Eine derartige Einrichtung ist im Geologischen Landesamt Baden-Württemberg in Freiburg aufgebaut worden. Der mechanische Teil wurde in Sonderanfertigung von der Firma Ismatec/Zürich hergestellt. Er regelt die Zufuhr der genormten Probeflaschen in Kassetten mit je zwan-

zig Stück und steuert die Entnahme der Wasserproben aus den Flaschen. Das Untersuchungswasser wird mit etwa 40 ml in der Minute durch eine Fluoreszenz-Durchflussküvette mit 10 ml Inhalt geleitet. In der Praxis hat sich eine Spülzeit von 1 Minute bewährt.

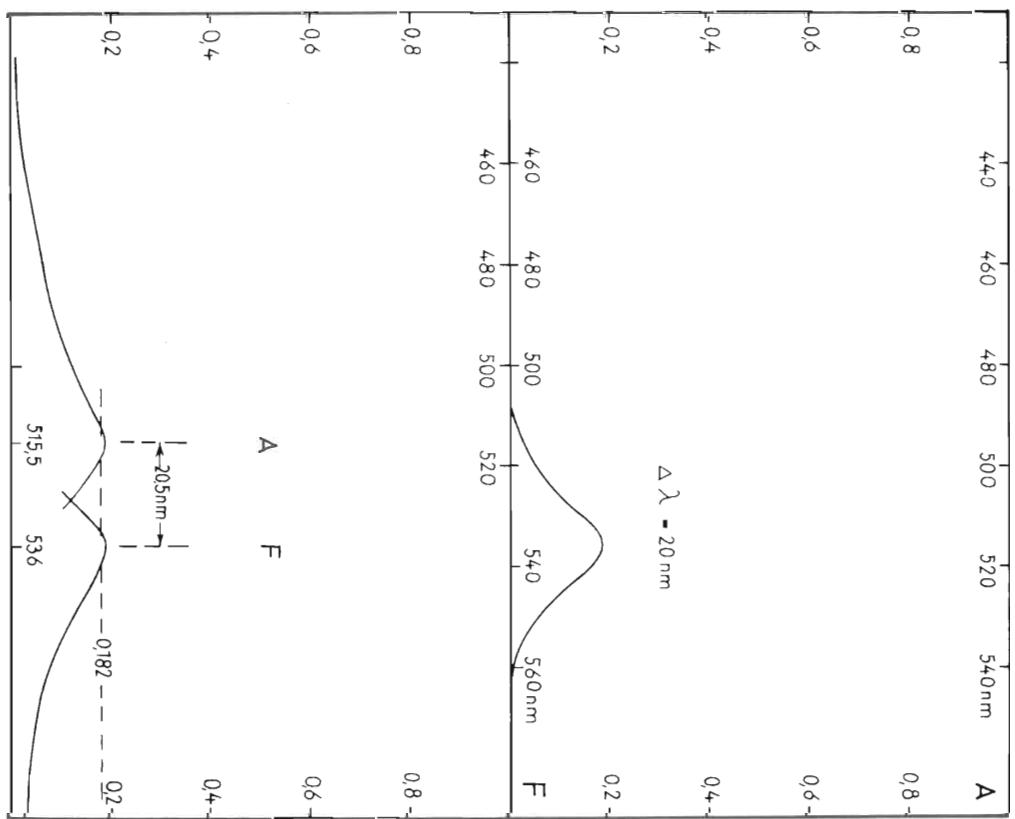
Der optische Geräteteil besteht aus einem - inzwischen nicht mehr lieferbaren - ZEISS Spektralfluorometer mit 2 Gitter-Monochromatoren. Als Lichtquelle kommt eine 450 W Xenonlampe zum Einsatz. Die Wellenlängentriebe der beiden Monochromatoren können einzeln oder getrennt mit Schrittmotoren programmgesteuert werden. Neben der digitalen Messwertanzeige erfolgt eine doppelte Registrierung der Werte mit Schreiber und Drucker. Der Schreibvorschub läuft nur während der Spülzeit mit 1 cm je Minute, d.h. jede Probe nimmt auf dem Schreibstreifen 1 cm Raum ein. Auf diese Weise erhält man während des Untersuchungsvorganges eine qualitative Farbgangskurve. Am Schluss der Spülzeit erhält der Drucker den Befehl zum Ausdrucken des letzten Messwertes. Bei Konzentrationsänderungen bis 1 : 10 reichen die programmierten Spülzeiten von 1 Minute völlig aus. Bei extremen Konzentrationsunterschieden kann jederzeit Handsteuerung übernommen werden.

Die Messwertanzeige ist so eingestellt, dass für pH = 7,6 Uraninkonzentrationen in der Einheit "mg/cbm" angezeigt werden. Durch verschiedene Massnahmen konnte der Streulichtanteil für sauberes Quellwasser bei der optimalen Uranineinstellung auf 0,002 mg/cbm Uraninäquivalente herabgedrückt werden. Dies ist gleichzeitig die Erfassbarkeitsgrenze. Im fortlaufenden Registrierdiagramm können in günstigen Fällen noch Uraninspuren von 0,001 mg/cbm erkannt werden.

Zur Ermittlung der optimalen Messbedingungen für einen Fluoreszenzfarbstoff werden die Anregungs- und Fluoreszenzmonochromatoren getrennt verstellt und in einem Diagramm aufgezeichnet. Figur 1 zeigt die Messergebnisse für Uranin. Es ist daraus zu ersehen, dass für die angewandte optische Aufstellung Uranin am besten bei 491 nm angeregt wird und eine maximale Fluoreszenzintensität bei 512,5 nm liefert. Figur 2 zeigt die Verhältnisse für Eosin. Der Unterschied zwischen Anregungs- und Fluoreszenzwellenlänge beträgt somit beim Uranin 21,5 nm und beim Eosin



Figur 1: Uranin-Spektren. Unten: Anregungs- und Fluoreszenz-Intensitäten bei 1 festen und 1 variablen Monochromatoreinstellung. Oben: Doppel-Scanning mit 2 variablen Monochromatoren im Abstand 20 nm.



Figur 2: Eosin-Spektren. Bedingungen wie Figur 5. Intensitäten auf der Abszisse in Uranin-Äquivalenten.

20,5 nm. Durch Anwendung einer Doppel-Scanning-Technik nach H. BEHRENS, d.h. der Messung eines Fluoreszenz-Spektrums unter stetiger Beibehaltung eines Abstands beider Monochromatoren von 20 nm kann eine verbesserte Darstellung der Fluoreszenz erreicht werden. Im oberen Teil der Figuren 1 und 2 sind die so aufgenommenen Spektren dargestellt. Die Figur 3 zeigt das Doppel-Scanning-Spektrum mit je 1 mg/cbm Uranin + Eosin. Hier ist sehr gut die Auswirkung der etwa 5 mal schwächeren Fluoreszenzausbeute des Eosins gegenüber dem Uranin zu sehen. In der Figur 4 wird ein Doppel-Scanning-Spektrum mit 3 Farbstoffen und zwar mit Sulforot, Eosin und Uranin dargestellt. Durch Anlegen einer Grundlast-Linie kann man gut die einzelnen Fluoreszenzintensitäten und damit die jeweiligen Konzentrationen ermitteln. Diese Art der Untersuchung ist allerdings auf solche Farbstoffe beschränkt, die etwa gleichen Wellenlängen-Abstand zwischen Anregungs- und Fluoreszenzmaximum aufweisen. Die folgende Tabelle 1 zeigt die dafür in Frage kommenden Daten einer Auswahl von Farbstoffen.

Tabelle 1: Fluoreszenzoptische Daten einiger fluoreszierender Markierungsstoffe

| Stoff          | Anregungsmaximum (nm) | Fluoreszenzmaximum (nm) | Wellenlängenunterschied Fluoreszenz-Anregungsmaximum (nm) | Fluoreszenzausbeute gegenüber Uranin | Adsorption im Grundwasserleiter |
|----------------|-----------------------|-------------------------|---|--------------------------------------|---------------------------------|
| Uranin         | 491                   | 512,5                   | 21,5  | 1                                    | -                               |
| Eosin          | 515,5                 | 536                     | 20,5  | 0,18                                 | +                               |
| Amido-rhodamin | 531                   | 552                     | 21  | 0,61                                 | ++                              |
| Rhodamin       | 553,5                 | 576                     | 22,5  | 0,083                                | ++                              |
| Sulforot       | 564                   | 582,5                   | 18,5  | 0,15                                 | ++                              |
| Pyranin        | 463,5                 | 512,5                   | 49  | 0,18                                 | -                               |
| Tinopal        | 364                   | 434                     | 70  | 0,61                                 | ++                              |

Für die quantitativen Auswertungen von Färbversuchen kommen nur solche Farbstoffe in Frage, die keine Wechselwirkung mit dem durchflossenen Gestein haben. Dies trifft nach allen Erfahrungen

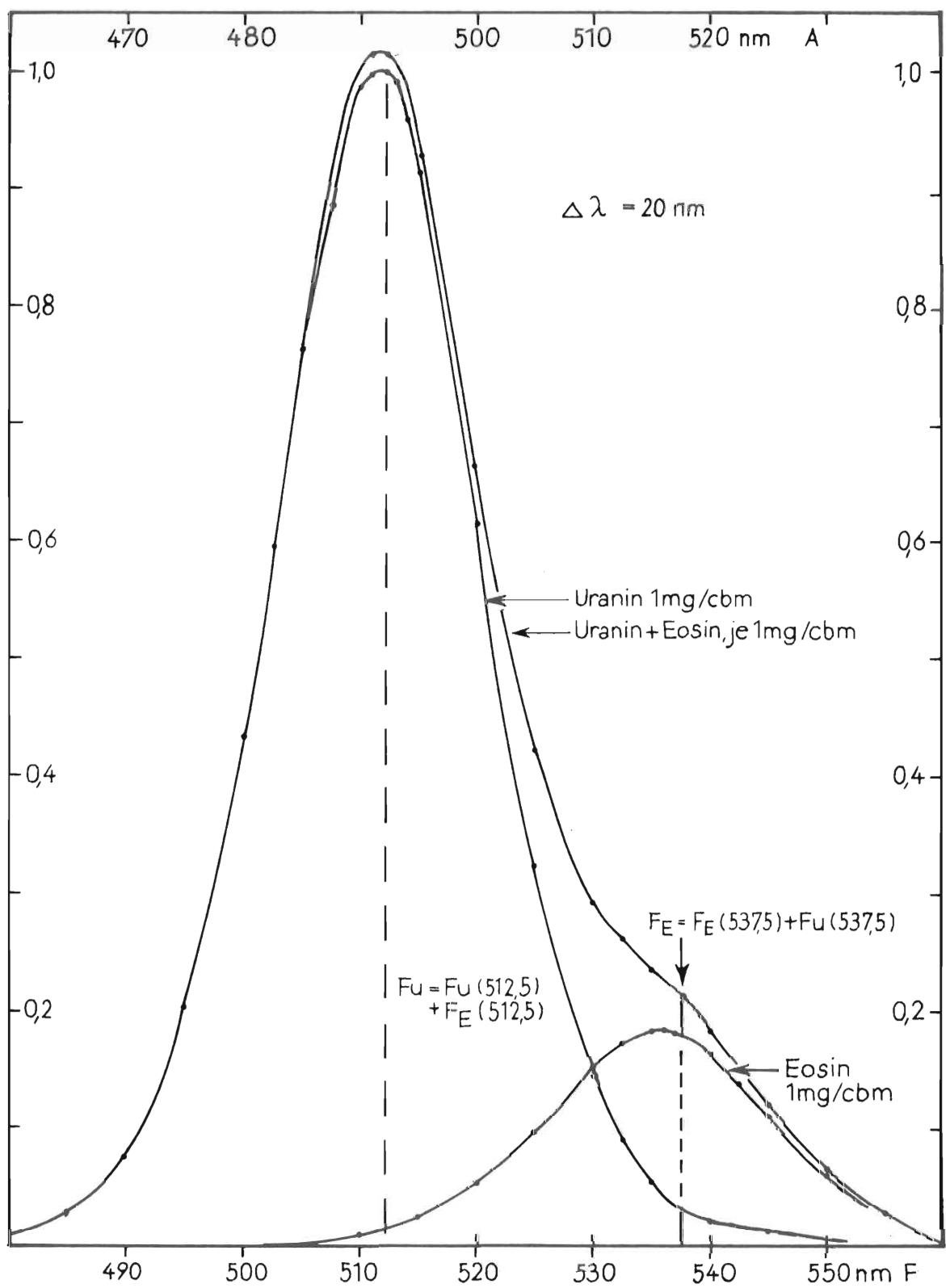
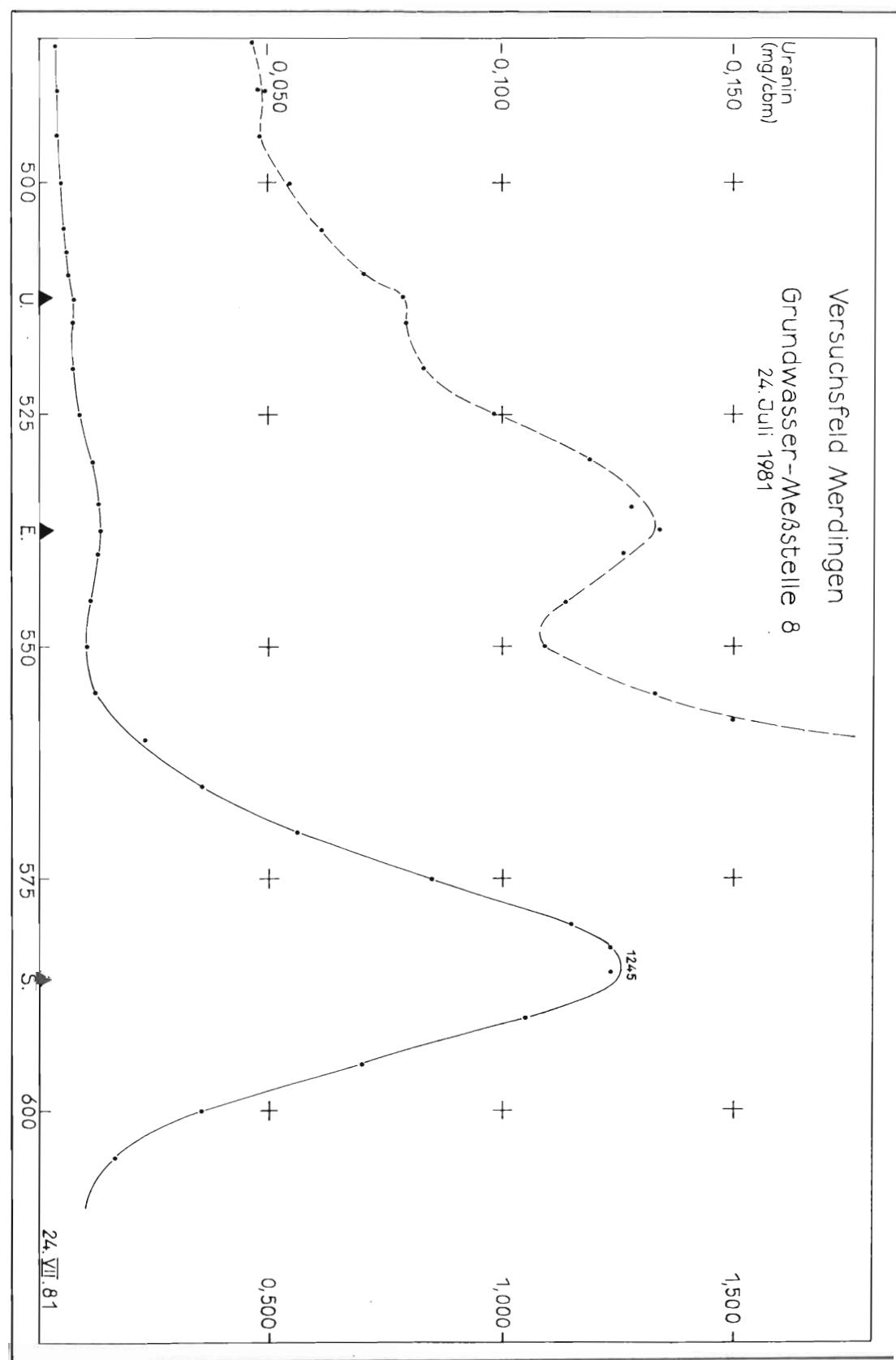


Fig. 3: Doppel-Scanning-Spektrum mit gleichen Massenkonzentrationen Uranin und Eosin

Fig. 4: Doppel-Scanning-Spektrum mit Sulfurot, Eosin und Uranin



unter normalen pH-Bedingungen für Uranin zu. Für Eosin kann bei Versuchen im Karst für starke Verdünnungen dasselbe gesagt werden. Für Pyranin zeigen die wenigen Erfahrungen bis jetzt ähnliches Verhalten wie Uranin.

Seit einigen Jahren werden vom Geologischen Landesamt Baden-Württemberg, wenn es die Umstände erfordern, routinemässige Doppelversuche mit Uranin und Eosin durchgeführt.

Wegen der teilweisen gegenseitigen Beeinflussung bei der fluoreszenzoptischen Untersuchung wurden Verfahren erarbeitet, die eine einwandfreie routinemässige Erfassung der Farbstoffkonzentrationen erlauben.

Mit Hilfe der Fluoreszenzintensitäten bei den beiden optimalen Einstellungen für die zwei Farbstoffe können auch ihre Konzentrationen bestimmt werden. Der eine Lösungsweg besteht in der Möglichkeit des Ablesen auf einem Nomogramm (Figur 5): Man legt auf die gemessenen Fluoreszenzintensitäten ein Lineal und liest an den Konzentrationssäulen die entsprechenden Farbstoffkonzentrationen ab.

Der andere Lösungsweg geschieht rechnerisch. Dabei werden die Fluoreszenzen durch folgende Parameter bestimmt:

Tabelle 2 Fluoreszenzen von Farbstoffgemischen aus Uranin und Eosin, wenn das Meßgerät auf Uranin geeicht ist.

$$F_U = C_U + (C_E \times k_E \times z_{E,512,5})$$

$$F_E = (C_E \times k_E) + (C_U \times z_{U,537,5})$$

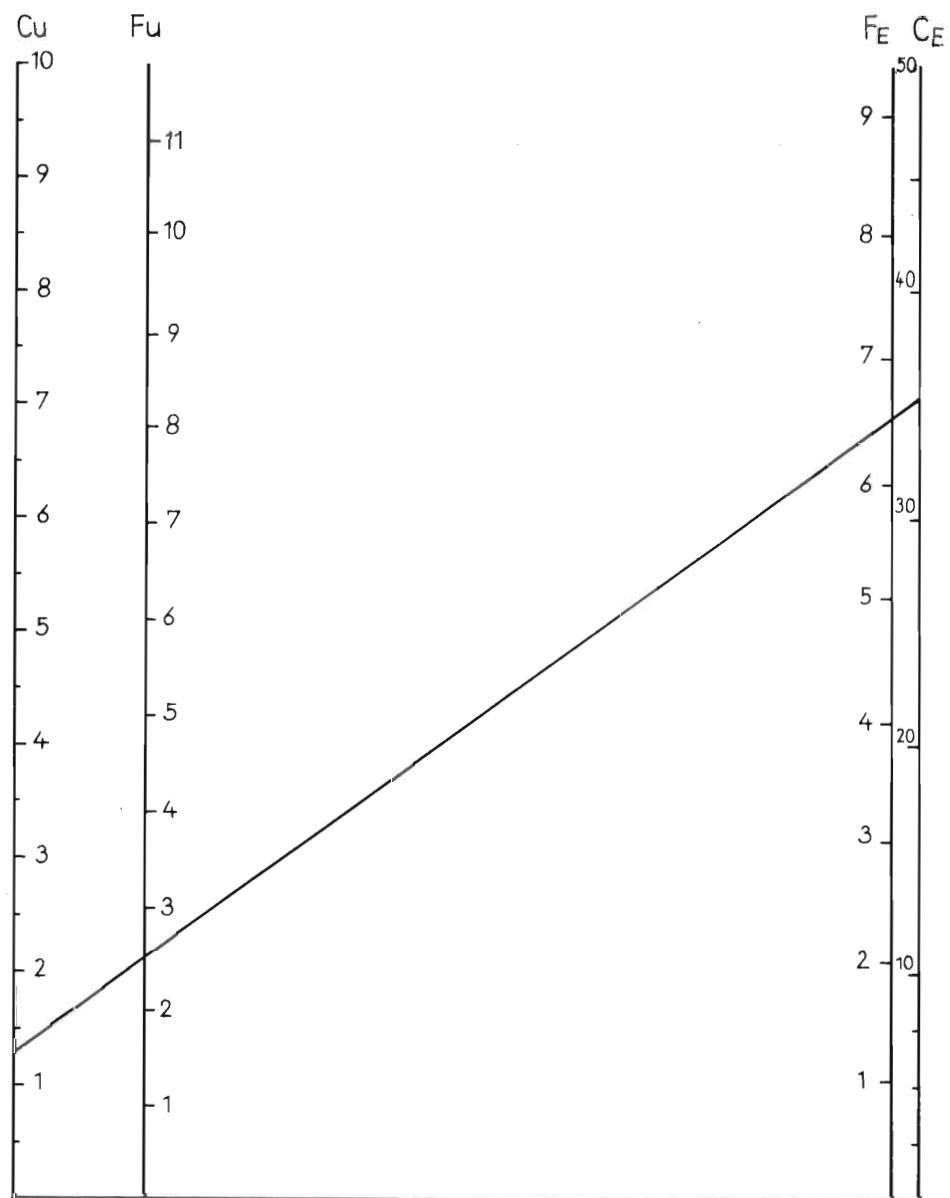
$F_{U,E}$  : Fluoreszenzintensität bei den optimalen Einstellungen für Uranin, Eosin

$C_{U,E}$  : Konzentrationen von Uranin, Eosin

$k_E$  : Fluoreszenzausbeute für Eosin im Vergleich zu Uranin = 0,182

$z_{E,512,5}$  : Anteil der Eosinfluoreszenz bei der Uranineinstellung zur Eosineinstellung = 0,092

$z_{U,537,5}$  : Anteil der Uraninfluoreszenz bei der Eosineinstellung zur Uranineinstellung = 0,0328



Figur 5: Nomogramm zur Ermittlung der Uranin- und Eosinkonzentration in Farbstoffgemischen aus den Fluoreszenzintensitäten für die optimalen Einstellungsbedingungen für Uranin und Eosin (ZEISS Gitter-Monochromator, Hamamatsu-Vervielfacher R 446, spektrale Bandbreite: 7,5 nm). Eingezeichnetes Beispiel:  $F_U = 2,5$  Skalenteile,  $F_E = 6,5$  Skalenteile. Daraus ist eine Uräninkonzentration  $C_U$  von 1,5 mg/cbm und eine Eosinkonzentration  $C_E$  von 35 mg/cbm ablesbar.

In der Tabelle sind zwei Gleichungen für 2 Unbekannte aufgestellt. Durch Umstellung erhält man die Konzentrationen:

Tabelle 3 Konzentrationen an Uranin ( $C_U$ ) und Eosin ( $C_E$ )

$$C_U = 1,0001 F_U - 0,00304 F_E$$

$$C_E = 5,52 F_E - 0,18 F_U$$

Moderne Kleinrechner mit auswechselbarem Magnetprogramm benötigen zum Ausdrucken der Konzentrationswerte nur wenige Sekunden, so dass ohne grosse Mühen auch grössere Probenserien bewältigt werden können.

Als allgemeine Formel zur Berechnung von Konzentrationen zweier Fluoreszenzfarbstoffe in Mischungen gilt Tabelle 4:

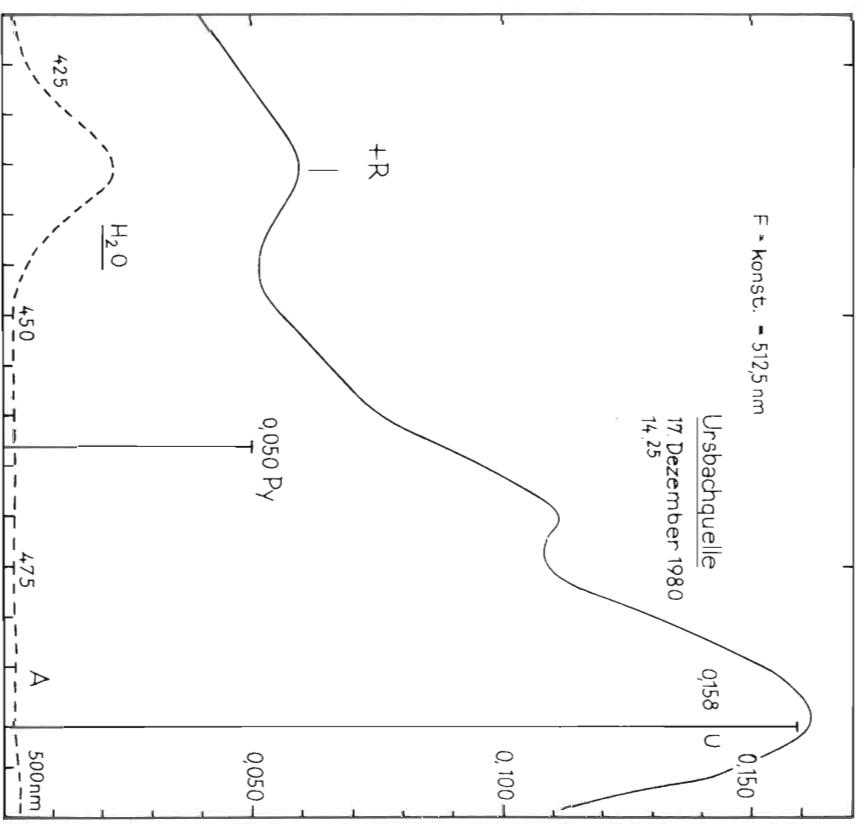
Tabelle 4 Konzentrationsberechnung in Lösungsgemischen mit 2 fluoreszierenden Komponenten A und B

$$C_A = \frac{F_A - F_B}{(1 - z_A z_B)} \frac{k_B}{k_A} \quad F_{A,B}: \text{Fluoreszenzintensität bei der optimalen Geräteeinstellung für den Stoff A oder B}$$

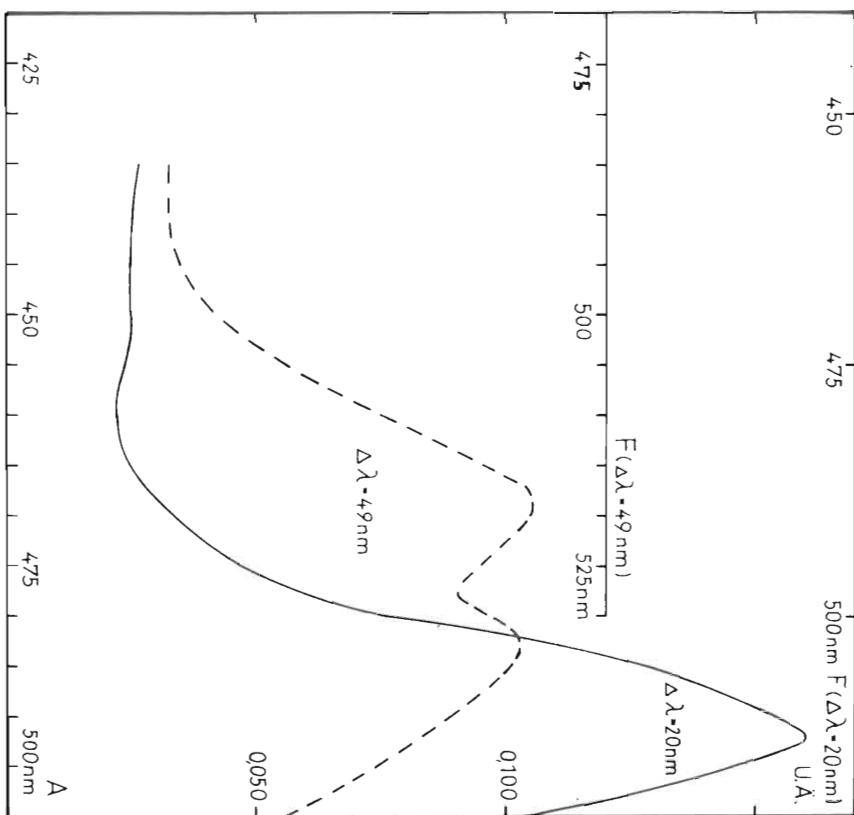
$$C_B = \frac{F_B - F_A}{(1 - z_A z_B)} \frac{k_A}{k_B} \quad k_{A,B}: \text{Fluoreszenzausbeute bei der optimalen Geräteeinstellung für den Stoff A oder B}$$

$$z_{A,B}: \text{Fluoreszenzanteil des Stoffes A oder B bei der optimalen Geräteeinstellung für den Stoff B oder A}$$

Mit Pyranin und Uranin bei gemeinsamem Einsatz liegen nur wenige Erfahrungen vor. Die Schwierigkeiten liegen vor allem im hohen Messuntergrund bei der optimalen Pyranineinstellung. Ausserdem kann wegen der unterschiedlichen Wellenlängenabstände zwischen Anregung und Fluoreszenz für Uranin und Pyranin das Doppel-Scanning-Verfahren zur Identifikation nicht herangezogen werden. Da beide Farbstoffe bei 512,5 nm ihr Fluoreszenzmaximum aufweisen, kann man lediglich ein Anregungsspektrum aufzeichnen, das jedoch bei geringen Pyraninkonzentrationen keine eindeutige Auskunft mehr gibt (Figur 6). Einige kräftige Xenon-Linien um



Figur 6: Fluoreszenzintensitäten für eine Uranin- und Pyranin-haltige Wasserprobe bei variabler Anregung. Ursbachquelle bei Bobstadt im Main-Tauber-Kreis vom 17. Dez. 1980, 14.25 Uhr



Figur 7: Doppel-Scanning-Spektren für Uranin (ausgezogen) und Pyranin (gestrichelt) für die Wasserproben aus Figur 6

470 nm geben dem Spektrum deutliche Strukturen. Bessere Identifikationen geben Doppelscann-Spektren für beide Farbstoffe optimal getrennt (Figur 7). Bei Reihenversuchen wird auch hier das Rechenprogramm angewandt werden können, das für Uranin-Eosin-Mischungen angegeben wurde.

#### Literaturverzeichnis

BEHRENS H. (1973): Eine verbesserte Nachweismethode für Fluoreszenzindikatoren und ihre Anwendung zur Feststellung von Fliesswegen im Grundwasser - Z. deutsch. geol. Ges.; 124, S. 535 - 44, Hannover

BEHRENS M., ZUPAN M. und ZUPAN M. (1976): Methodik und Ergebnisse der Direktmessung der Fluoreszenztracer - Steir. Beitr. Hydrogeologie; 1976, S. 125 - 149, Graz

BEHRENS H. (1982): Verfahren zum quantitativen Nachweis von nebeneinander vorliegenden Fluoreszenztracern - Beiträge zur Hydrologie der Schweiz - Hydrologie Bd. 28 I, Bern

BUB F.P., HÖTZL H. und WISSEK K. (1979): Dünnschicht-chromatographischer Nachweis von Fluoreszenztracern bei hydrogeologischen Markierungsversuchen - Steir. Beitr. Hydrogeologie; 1979, S. 129 - 141, Graz

KÄSS W. (1967): Erfahrungen mit Uranin bei Färbversuchen - Steir. Beitr. Hydrogeologie; 1966/1967, S. 123 - 139, Graz