

## Absorptive Ultramikro-Methode zur Bestimmung des Fluoreszeins im Wasser

VON A. POLLAK, J. PERKOVAC, F. HRIBAR & F. BIDOVEC (Ljubljana)

Bei den Markierungen der unterirdischen Karstflüsse ist die Auswahl des praktisch geeignetsten und genug verlässlichen Markierungsmittels noch immer ein Problem. Zweifellos stellen die radioaktiven Isotope, wie z. B. Tritium, ein ideales Markierungsmittel dar, jedoch sind der hohe Anschaffungspreis, die kostspielige analytische Behandlung, die komplizierten Apparaturen und die Mitarbeiter mit entsprechender Fachausbildung Bedingungen, die die Anwendung dieser Methode für gewöhnliche und übliche Untersuchungen der unterirdischen Karstwässer behindern. Praktisch sind wir so noch immer mehr oder weniger angewiesen auf klassische Markierungsmittel, die den folgenden Anforderungen entsprechen müssen.

Niedriger Anschaffungspreis,

gute Wasserlöslichkeit bzw. Suspensivität,

große Intensität der Befärbung,

Inertität für organische und anorganische Materien,

biologische Unschädlichkeit,

Wellenlänge der Farbe, die in Grenzen von 500 bis 700 m sein soll, daß sie für das Menschaugen geeignet ist,

Möglichkeit der Detektion des Markierungsmittels in Lösungen bis zu einer Verdünnung von  $10^{-9}$  kg.

Von den organischen Farbstoffen entsprechen diesen Anforderungen sehr gut das Fluoreszein, Uranin und Rhodamin B. Bei der Auswahl des Farbstoffes ist nebst der erfolgreichen Detektion auch das Verhalten des Farbstoffes im natürlichen Milieu ein Problem. Bei allen organischen Farbstoffen bemerken wir ein stärkeres oder geringeres Haften an organische und anorganische Materien, wobei sich Uranin und Rhodamin wesentlich unterscheiden. Uranin ist ein saurerer Farbstoff und bewährt sich im Alkaliummedium besser, während Rhodamin ein basischer Farbstoff mit größerer Lösbarkeit im saueren Medium ist, der im alkalischen Medium wegen großer Verluste nicht in Betracht kommt. Da sich bei

unseren Karstwässern der pH-Wert zwischen 7,0 bis 8,5 und noch höher bewegt, bewährt sich bei der Markierung der unterirdischen Wässer Uranin besser und wird schon fast ein ganzes Jahrhundert als derartiger Markierungsstoff verwendet.

Eine schlechte Eigenschaft des Fluoreszeins Uranin ist die unverläßliche Bestimmung in Lösungen bei niedrigeren Konzentrationen, besonders, wenn auf langen unterirdischen Strecken ein bedeutender Teil des Farbstoffes absorbiert oder durch zutretende Wässer oder auftretende Hochwässer zu sehr verdünnt wird. Die Grenze des im Fluoroskop noch sicher feststellbaren Fluoreszeins ist eine Verdünnung von  $10^{-9}$  kg/l. Bei den niedrigen Konzentrationen stören uns besonders noch die kolloidischen Teilchen, die in den Proben durch den Tyndall-Effekt den Eindruck der natürlichen Fluoreszenz verursachen.

Das Bestreben, eine Methode zu finden, die eine sichere Detektion des Fluoreszeins auch bei niedrigen Konzentrationen ermöglicht, ist begreiflich. Bekannt ist die Ätherextraktion, mit welcher das Fluoreszein noch in einer Verdünnung von  $10^{-11}$  kg/l festgestellt werden kann. Für diese Methode sind aber sehr große Mengen von Probewasser und Äther notwendig, weshalb sie für laufende Arbeiten nicht in Betracht kommt. Eine Methode für die praktische Tätigkeit muß folgenden Bedingungen entsprechen:

- Je größer die Empfindlichkeit, desto besser,
- einfaches Verfahren, das auch für nichtfachmännische Mitarbeiter verständlich und ausführbar ist,
- das Verfahren soll nicht kostspielig sein und nicht schwer beziehbare Chemikalien verlangen,
- die Analyse soll schon im Terrain ausführbar sein,
- die Analyse soll nur kurze Zeit erfordern.

Auf Grund dieser Bedingungen haben wir uns für eine Absorptionsmethode entschlossen, nach welcher man ohne energetische Quellen aus mehreren Litern der Probenentnahme den Farbstoff mit aktiver Kohle konzentrieren und dann auf einige Millimeter Eluat auslösen kann. Das Eluat kann man dann mit Leichtigkeit quantitativ im Fluoroskop messen. Dazu möchten wir bemerken, daß die Hydrometeorologische Anstalt in Ljubljana in Zusammenarbeit mit dem Laboratorium für organische Chemie an der Universität Ljubljana im Jahre 1962 die betreffenden Versuche angefangen hat, ohne von ähnlichen Versuchen von A. LALLEMAND und H. PALOC in Frankreich Kenntnis zu haben. Es ist interessant, daß wir im großen und ganzen mit gleichen Methoden zu einem im wesentlichen ähnlichen Verfahren gelangt sind.



## Ausführung der Methode

Um den Transport großer Mengen von Probenwasser ins Laboratorium zu vermeiden, haben wir eine einfache Apparatur für die Absorptionsfiltration des Probenwassers im Feld konstruiert.

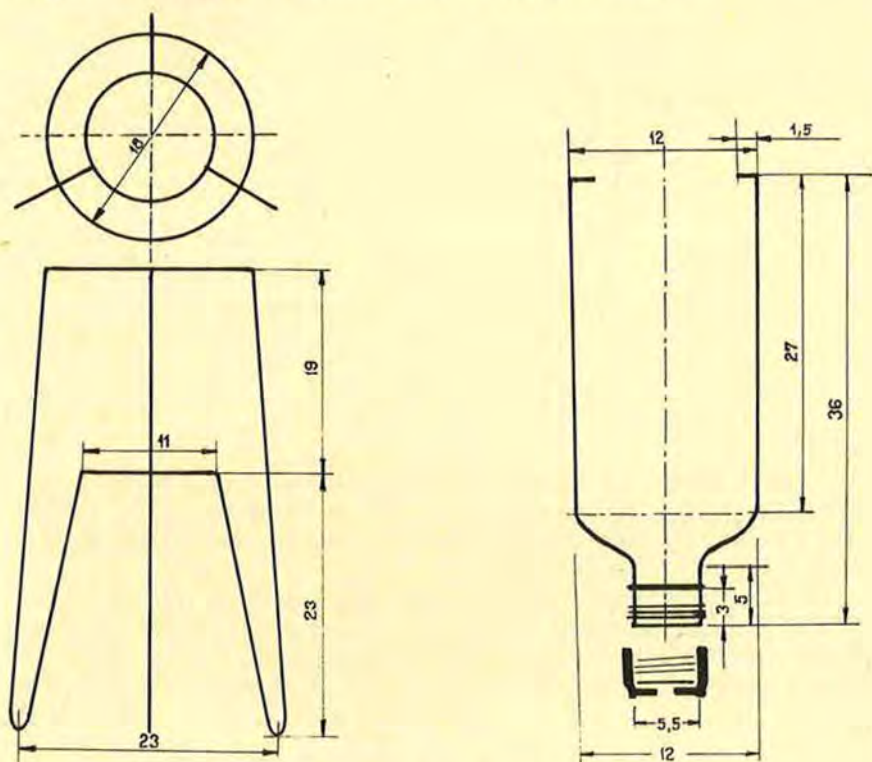


Abb. 1: Filtriergefäß und Ständer

Auf dem Drahtgestell steht umgekehrt eine 5-l-Flasche aus Kunststoff (Abb. 1). Wir haben der Flasche, die mit einem schraubbaren Deckel verschließbar ist, den Boden ausgeschnitten. So haben wir ein Gefäß bekommen, dessen Inhalt für die gesamte Menge der Probe reicht. Die Grundfläche des Gefäßes ist sehr klein, da sie nur aus dem Halsdeckel besteht, in den ein Loch mit einem Durchmesser von 15 mm für den Abfluß der Flüssigkeit gebohrt ist.

In die obere Öffnung des Gefäßes wird ein Trichter eingesetzt (Abb. 2), in dem im oberen Teil des Rohres ein schmales Loch für die Entlüftung ausgebohrt ist. Am unteren Teil des Rohres ist eine leicht

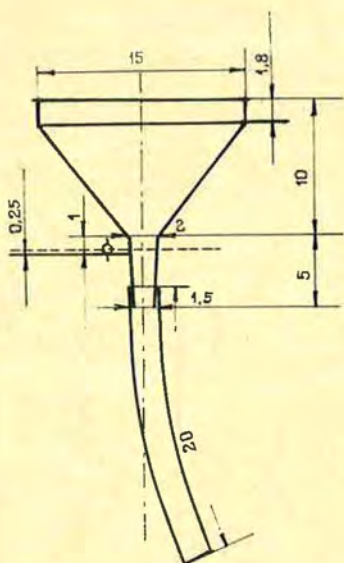


Abb. 2: Trichter

gekrümmte Röhre aus Plastik angesetzt, die den ersten Wasserstrahl nicht unmittelbar auf den Absorptionsfilter anschlagen läßt. In den Trichter setzt man einen gefalteten Filter ein, der die großen mechanischen Teilchen zurückhalten soll.

Im Filterkopf (Abb. 3), wie wir den umgearbeiteten Halsdeckel der Flasche genannt haben, ist zwischen zwei perforierten Dichtungen aus Plastik ein Absorptionsfilter eingesetzt. Nach Bedarf kann man noch einen Vorfilter einsetzen, der die feineren Kolloidteilchen zurückhalten soll.

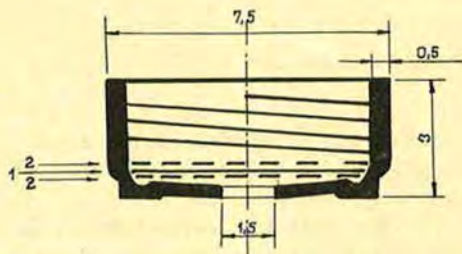


Abb. 3: Filterkopf

- 1 Absorptions-Kohlefilterpapier
- 2 perforierte Plastikdichtungen

Das Verfahren im Terrain ist folgendes: Man gießt 5 Liter (nach Bedarf auch 10 Liter) von der Wasserprobe über den großen gefalteten Filter in das Gefäß. Das mechanisch gereinigte Wasser wird dann durch den Absorptionsfilter aus Aktivkohle filtriert. Die Filtrierung einer 5-l-



Probe dauert bei unseren Absorptionsfiltern ca. 3 Stunden. Nach beendeter Filtration wird der Absorptions-Kohlefilter in einem kleinen bezifferten Fläschchen aufbewahrt.

Das absorbierte Fluoreszein wird nachher aus der Aktivkohle mit 5 bis 10 ml Eluent, d. i. 15% Wasserlösung KOH und Äthanol im Verhältnis 1 : 1, eluiert. Der Absorptionsfilter der Aktivkohle wird im Eluent 5 bis 15 Minuten angefeuchtet, darauf durch Quantitativfilter — weißer Streifen — abfiltriert. Die Proben werden dann im Fluoroskop geprüft und die gewonnene Konzentration des Fluoreszeins auf den Ausgangswert, d. h. auf das Verhältnis der entnommenen Wasserprobe zum Eluat umgerechnet.

Dieses Verfahren der Konzentration mit dem Faktor 500 bis 1000 gibt vorzügliche Resultate. Wir haben es zum erstenmal praktisch bei der Markierung des Ponors Velika Karlovica im Cerknjiško Polje im April 1964 und dann noch bei drei weiteren Markierungen angewendet.

Bei der praktischen Arbeit hat sich gezeigt, daß die Absorptionsfilter der aktiven Kohle, die wir bei der ersten Markierung verwendet haben, nicht praktisch und nicht genug zuverlässig waren, weswegen eine bessere Ausführung gesucht wurde.

## Die Absorptionsfilter

Die Absorptionsfilter wurden in drei Phasen vervollständigt.

1. Den ersten praktischen Versuch im Frühjahr 1964 haben wir so ausgeführt, daß die Absorptionsfilter im Terrain von den Beobachtern selbst vorbereitet worden waren. In den Filterkopf setzten wir auf ein perforiertes rundes Polyethylen-Plättchen ein Filterpapier S & S 1117; darauf wurde eine 1 mm dicke Schicht der aktiven Kohle angeschüttet, die mit gleichem Filterpapier und mit einem zweiten perforierten Polyethylen-Plättchen bedeckt wurde. Nachher wurden der Filterkopf fest an das Gefäß angeschraubt. Dieses Verfahren hatte folgende Nachteile:

- a) den Beobachtern (Nichtfachleuten) hat die Vorbereitung solcher Filter große Schwierigkeiten gemacht;
- b) im Falle, daß die Schicht der aktiven Kohle zu dick aufgetragen war, hat die Filtrierung zu lange gedauert. Im Falle, daß sie zu dünn war oder daß gar Lücken in der Schicht waren, verlief die Filtrierung zu schnell und auch unvollständig (im Laboratorium waren die besten Absorptionen bei einer Filtrierungs-Geschwindigkeit von 5 Liter in 3 Stunden erreicht worden).

2. Für die nachfolgenden Markierungen haben wir die Absorptionsfilter im Laboratorium vorbereitet. Zwischen zwei runde Filterpapiere S & S 1117 haben wir eine 1 mm dicke Schicht der aktiven Kohle ein-

getragen. Die Filterpapiere haben wir am Rande mit wasserunlöslichem Klebstoff (UHU) zugeklebt und die Filter in einer Presse zwischen zwei feine Netzen gespannt, so daß sie eine satinierte Oberfläche bekommen haben. Bei diesen Filtern haben sich folgende Nachteile gezeigt:

- a) beim Transport bestand die Möglichkeit, daß sich die Aktivkohle trotz der Pressung und der Faltung an der Oberfläche bewegte und die Absorptionsschicht nicht mehr homogen war;
- b) allzusehr geklebte Filter filtrieren langsam;
- c) bei der Pressung entstanden oft mechanische Verletzungen auf der Oberfläche der Filter, so daß sie nicht gebrauchsfähig waren;
- d) Lösungsmittel im Klebstoff deaktivierten teilweise die Aktivkohle.

3. In dem Bestreben, möglichst homogene Absorptionsfilter zu bekommen, an denen die früher angeführten Nachteile behoben waren, wurde unter Mitarbeit des Instituts für Zellulose und Papier in Ljubljana das Absorptionsfilterpapier, das die aktive Kohle trägt, vorbereitet. (Für die Bemühungen bei der Ausarbeitung der Versuchsmuster des Absorptionsfilterpapiers sind wir den Herren Dipl.-Ing. Dj. MAČIROVIČ und Dipl.-Ing. Z. GAŠPERIČ vom Institut für Zellulose und Papier in Ljubljana zu Dank verpflichtet.) Dieses Absorptionsfilterpapier ist aus Zellulose von abgerindeten Fichten, die auf 48° SR gemahlen ist, angefertigt. Das Verhältnis von Zellulose und Aktivkohle (in der Masse vor der Erzeugung) war 1 : 1. Die Grammatur des erzeugten Papiers ist 90 g/m<sup>2</sup>. Die Vorzüge dieses Absorptionsfilterpapiers sind folgende:

- a) die erreichte maximal mögliche Homogenität des Absorptionsfilters und in Verbindung damit die vollkommene Zuverlässigkeit der erhobenen Resultate,
- b) die Geschwindigkeit der Filtrierung, die von der Grammatur des Papiers abhängig ist, können wir beliebig ändern,
- c) die Absorption des Fluoreszeins beträgt bei der Grammatur 90 g/m<sup>2</sup> 95 ± 5%,
- d) das bedeutend teurere Filterpapier S & S 1117 ist nicht mehr notwendig,
- e) die Manipulation bereitet den Beobachtern keine Schwierigkeiten mehr,
- f) der Transport der Filter ist kein Problem mehr,
- g) die in Polyethylen-Säckchen emballierten Filter können praktisch keine Aktivität verlieren.



## Aktive Kohle

Für die Absorption des Fluoreszeins aus dem Wasser ist die Qualität der aktiven Kohle sehr wesentlich. Sie muß folgenden Bedingungen entsprechen:

- a) Die entsprechende Granulation soll homogen sein. Sehr feine Teilchen der Kohle fallen bei der Erzeugung des Absorptionspapiers aus, die größeren aber fallen aus dem schon fertigen Papier. Der durchschnittliche Verlust der Kohle bei der Erzeugung beträgt ca. 4—5%.
- b) Die Kohle muß ein großes Absorptionsvermögen besitzen.
- c) Bei der Behandlung der Kohle mit alkalischem Eluent darf sich keine braune Farbe zeigen, da diese ein Zeichen dafür ist, daß die Kohle chemisch zuwenig gereinigt ist.

Bei den Versuchen wurden Kohlen aller größeren europäischen Produzenten erprobt, doch haben wir in den meisten Fällen nicht das erwünschte Resultat erreicht. Nur die Kohle der Firma BD. H. in England mit der Bezeichnung: „Activated Charcoal powder for decolourising purposes washed with acid“, entspricht allen Anforderungen, und wir haben sie bei allen bisherigen praktischen Versuchen verwendet. Mit dieser aktiven Kohle vorbereitete Absorptionsfilter mit der Grammaturn 90 g/m<sup>2</sup> absorbieren 95 ± 5% Fluoreszein in Konzentrationsbereich 10<sup>-6</sup> kg/l bis 10<sup>-11</sup> kg/l bei der Filtrierung in der früher beschriebenen Apparatur.

### Die laboratorische Prüfung des Absorptionsfilterpapiers und Begutachtung der Resultate

Das Menschenauge bemerkt das Fluoreszein im Wasser noch gut bei einer Konzentration von 10<sup>-8</sup> kg/l, mit Hilfe eines Fluoroskopes mit UV-Lampe oder im Sonnenlichte auch noch bei einer Konzentration von 10<sup>-9</sup> kg/l. Darum haben wir bei allen laboratorischen Testen des Absorptionsfilterpapiers die Ausgangskonzentration von 10<sup>-9</sup> kg/l gewählt, da stärkere konzentrierte Lösungen wegen starker Intensität schwieriger zu vergleichen sind. Für die Lösungen unter 10<sup>-11</sup> kg/l müßte man mehr als 5 Liter Probenwasser konzentrieren. Die Absorptionskraft des Filterpapiers haben wir so gemessen, daß wir je 5 Liter Fluoreszeinlösung der verschiedenen Konzentrationen von 10<sup>-9</sup> kg/l bis 10<sup>-11</sup> kg/l durch mehrere Probenarten der Absorptions-Filterpapiere (mit verschiedenen Grammaturnen) filtrierte haben. Die Absorptionsfilter eluierten wir nachher in 10 ml Eluent. Parallel haben wir in 10 ml



Eluent zum Vergleich die gleiche Menge von Fluoreszein dosiert, wie sie in 5 l der Ausgangs-Fluoreszeinlösung war. Beide Eluate wurden dann im Fluoroskop verglichen. Die Absorption betrug bei 90 g/m<sup>2</sup> Grammatur des Absorptionspapiers  $95 \pm 5\%$ . Aus diesem Resultate sieht man, daß das Verfahren der Konzentrierung der Fluoreszeinlösungen ebenso für die Quantitätsmessungen geeignet ist, wie die klassischen Methoden mit den nichtkonzentrierten Proben. Die Verluste des Fluoreszeins auf dem unterirdischen Wege sind viel größer als die Verluste bei der Konzentrierung, so daß diese für die Resultate im wesentlichen ohne Einfluß sind. Von großer Bedeutung ist aber die Möglichkeit der Detektion des Fluoreszeins bei sehr niedrigen Konzentrationen. Die theoretische und praktische Grenzkonzentration, bei der man die Quantität des Fluoreszeins noch messen kann, liegt bei der Filtrierung von 5 l Probe bei  $10^{-11}$  kg/l. Mit der Vergrößerung der Menge des Probenwassers bzw. mit der Verkleinerung des Quantums des Eluents können wir die Grenzen der niedrigsten Ausgangskonzentration noch bedeutend erniedrigen.

### Das Problem der kolloiden Teilchen und des Tyndall-Effektes

Einige Karstwässer sind sehr reich an feinen organischen und anorganischen Schwebstoffen, die der große gefaltete Filter im Trichter nicht zurückhält. Darum sind einige Eluate oft braun oder sogar blaugrün gefärbt. In seltenen Beispielen überdeckt die braune Farbe die grüne Fluoreszenz des Fluoreszeins. Nach unseren bisherigen Erfahrungen verursachen diese braune Farbe die Huminsäuren. Die leicht blaugrüne Farbe der sonst nicht gefärbten Musterproben, die sogenannte natürliche Fluoreszenz, wird wahrscheinlich von kolloidischen Teilchen nach dem Tyndall-Effekt verursacht. Zur Beseitigung solcher Effekte wäre noch ein zusätzlicher Absorptionsfilter notwendig, der vor dem Absorptions-Kohlefilter einzusetzen wäre. Er müßte die Eigenschaft haben, die Kolloidstoffe zu binden, das Fluoreszein aber nicht zu absorbieren. Diesbezügliche Versuche sind bei uns im Gange, jedoch sind wir noch nicht zu praktisch brauchbaren Resultaten gelangt. Zur Probe wurde silikagelliges Filterpapier genommen, das auf dieselbe Art wie das Absorptionskohlefilterpapier vorbereitet war. Diesen Vorfilter haben wir im Filterkopf über den Kohle-Filter gespannt. Im allgemeinen haben sich die Versuche gut bewährt, doch haben sich diese Filter bei stark schmutzigen Naturwässern zu schnell verstopft und die weitere Filtration behindert. Teilweise wurden die Kolloid-Stoffe schon dadurch abgefangen, daß als Vorfilter der Einsatz von S & S-1117-Filterpapier gebraucht wurde. Es ist noch die Möglichkeit der Beseitigung der Kolloide bei der letzten Filtrierung des Eluates auf verschiedene Absorbenten zu eruieren. Diese Untersuchungen sind noch im Gange.



## Ständig hängende Filter

Wir wollen noch kurz die ständig hängenden Filter erwähnen, die wir in weniger wichtigen Quellen außerhalb des Bereiches der regulären Beobachtungsstellen einsetzen, um nicht vorauszusehende Überraschungen im gesamten zu untersuchenden Gebiet zu vermeiden.

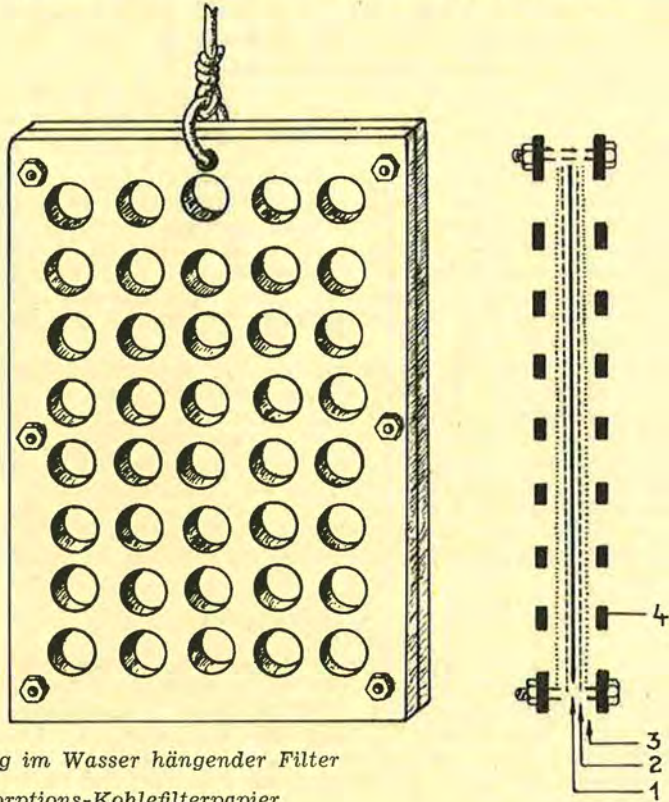


Abb. 4: Ständig im Wasser hängender Filter

- 1 Absorptions-Kohlefilterpapier
- 2 Gewebe
- 3 Messingnetzchen
- 4 Plastikplatten

Diese Filter (Abb. 4) sind aus zwei Kunststoff-Plättchen der Größe  $10 \times 15$  cm zusammengesetzt. Diese Plättchen sind mit einem Netz von Löchern ( $\phi$  10 mm) perforiert und mit Messingschrauben verbunden. Zwischen diese Plättchen wird ein Absorptions-Kohlefilterpapier, das im Gewebe zugenäht ist, eingelegt. Nach Bedarf wird der Filter wegen der Möglichkeit einer mechanischen Verletzung auf beiden Seiten noch mit einem feinen Messing-Netzchen geschützt.

Diese hängenden Filter wurden in weniger wichtige Quellen und schwer zugängliche Wasserhöhlen eingehängt, wo sie bis zum Ende der Markierung im Wasser bleiben. Es ist verständlich, daß sie nur zum Nachweis der Anwesenheit des Fluoreszeins im Wasser dienen. Die Eluierung wird in der früher beschriebenen Weise durchgeführt. Die Vorrichtung ist zwar verschiedenem Schmutz und den kolloidischen Stoffen, die sich im Laufe längerer Zeit am Filter ansammeln, ausgesetzt, doch erfüllen diese Filter ihre Aufgabe, d. h. den Nachweis der vorhandenen Fluoreszeinelösung, durchaus.

### Summary

The greatest difficulty in investigating karst waters with the help of fluorescein as tracer lies in the determination of fluorescein solutions in degrees of concentration lower than  $10^{-9}$  Kg/L. To obtain the best possible results even within this low range of concentration, we have worked out a concentration of fluorescein solutions by means of adsorption on activated charcoal. Thereby it is possible, jointly with measurements in the fluoroscope, to determine the fluorescein simply and quickly down to a concentration of  $10^{-11}$  Kg/L.

The concentration is accomplished in an apparatus made of a plastic mass. It has in its bottom a silikagel front-filter and an adsorption filter of activated charcoal ("acid washed", from "British Drug Houses"). Through this adsorption filter 5 l of the sample are filtered and the adsorbed fluorescein is eluated with an alkaline eluent. This eluent is a mixture of ethanol and 15% potassium hydroxide solution in the proportion of 1 to 1. By this method we achieve a concentration of the fluorescein in the eluate 500—1000 times higher than in the collected sample of the fluorescein solution. To increase the sensitivity of detection we examine the eluates in the fluoroscope.

### Résumé

La difficulté la plus grande qui s'oppose à l'examen des eaux du karst par la fluorescéine comme moyen de marquage, c'est de déterminer les solutions de fluorescéine dans le domaine de concentration au-dessous de  $10^{-9}$  kg/L. Pour obtenir les meilleurs résultats dans ce domaine de concentration nous avons mis au point un procédé de concentration de solutions de fluorescéine au moyen d'adsorption sur charbon actif. De cette façon et tout en combinant les mesures faites avec le Fluoroscope, il est possible de déterminer de façon simple et rapide la fluorescéine jusqu'à une concentration de  $10^{-11}$  kg/L.

La concentration se fait dans un dispositif en matière plastique, constitué d'un profiltre-Silikagel au fond, et d'un filtre d'adsorption en charbon actif ("acid washed") de la firme British Drug Houses. 5 L de l'échantillon sont filtrés par ce filtre d'adsorption et grâce à un éluant alcalin, la fluorescéine adsorbée est éluée. On utilise comme éluant un mélange de relation 1:1 composé d'Ethanol et d'une solution KOH de 15%. Grâce à cette méthode nous obtenons dans l'eluat une concentration de la fluorescéine 500 à 1000 fois plus élevée par rapport à l'échantillon prélevé de la solution de fluorescéine.

Pour renforcer la sensibilité de la détection nous examinons au Fluoroscope les eluats ainsi obtenus.