

Dünnschicht-chromatographischer Nachweis von Fluoreszenztracern bei hydrogeologischen Markierungsversuchen

Von F. P. BUB, H. HÖTZL und K. WISSER (Karlsruhe, BRD)

1. Einleitung

1.1. Problemstellung

Der Einsatz von Fluoreszenz-Farbstoffen bei hydrogeologischen Markierungsversuchen hat in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung gewonnen, vor allem, nachdem mit ständig weiterentwickelter fluorimetrischer Meßtechnik hochempfindliche Nachweisverfahren zur Verfügung stehen. Die gleichzeitige Verwendung mehrerer Fluoreszenztracern, wie dies bei kombinierten Markierungsversuchen der Fall ist, führt häufig zu meßtechnischen Schwierigkeiten. Solche kombinierten Markierungsversuche werden aber immer häufiger durchgeführt, um die unterirdischen Abflußverhältnisse großräumig unter einheitlichen hydrogeologischen Bedingungen zu erfassen.

Die heute in der Hydrogeologie häufig verwendeten Fluoreszenzstoffe sind Uranin, Eosin, Amidorhodamin, Rhodamin und Tinopal. Direkt gewonnene Wasserproben oder Eluate aus Aktivkohle, die die genannten Stoffe in unterschiedlicher Konzentration enthalten, können mit den üblichen fluorimetrischen Verfahren nur schwierig ausgewertet werden. Selbst die gleichmäßige Verschiebung der Anregungs- und Emissionswellenlänge bei der Aufnahme eines Spektrums erlaubt bei bestimmten Kombinationen keine eindeutige Zuordnung (H. BEHRENS, 1973). So liegen z. B. die Fluoreszenzpeaks von Amidorhodamin G und Rhodamin B einander spektral so nahe, daß sie bei gleichzeitiger Anwesenheit in Proben nach dem vorgenannten Verfahren nicht eindeutig zu trennen sind oder die geringer konzentrierte Komponente vollständig unterdrückt wird. Entsprechende Beeinträchtigungen können auch bei der Auswertung von Gemischen von Uranin und Eosin auftreten (W. KÄSS, 1967). Dasselbe gilt für Eosin und Amidorhodamin G (W. PERLEGA, 1976). Bei Markierungsversuchen muß daher gelegentlich auf bestimmte Fluoreszenzstoffe verzichtet werden, weil sich ihre spektralen Eigenschaften mit denen anderer Farbstoffe bzw. mit denen gleichzeitig vorhandener Verunreinigungen überschneiden. So besitzt das Amidorhodamin B fast das gleiche Anregungsmaximum (560 nm) und Emissionsmaximum (580 nm) wie Rhodamin B; andererseits enthält Amidorhodamin B eine Verunreinigung mit den gleichen spektralen Daten wie Amidorhodamin G (H. BEHRENS, M. ZUPAN & M. ZUPAN, 1976).

Kombinierte Markierungsversuche können aber besonders rationell und kostengünstig durchgeführt werden, wenn Markierungsstoffe verwendet werden, die eine einheitliche Probennahme und -auswertung erlauben. Für den uneingeschränkten gleichzeitigen Einsatz möglichst vieler Fluoreszenztracern war daher zu prüfen, ob die vorgeschaltete Anwendung einer relativ einfach durchzuführenden physikalisch-chemischen Vortrennung den Nachweis der einzelnen Farbstoffe ohne gegenseitige

Störung ermöglicht. Dabei sollte die untere Nachweisgrenze in der Größenordnung der bisher eingesetzten Verfahren liegen.¹

1.2. Derzeitiger Forschungsstand

Erste Versuche, neben den spektralen Eigenschaften der Farbstoffe auch chemische zur Unterscheidung zu nutzen, gingen davon aus, daß die Intensität der Fluoreszenz bei einzelnen Farbstoffen vom pH-Wert der Lösung abhängig ist; mit entsprechender Änderung des pH-Wertes kann so die störende Fluoreszenz einzelner Komponenten eines Gemisches unterdrückt werden (F. BAUER, 1972). Besonders geeignet hierfür ist die pH-Abhängigkeit der Emissionen von Uranin und Eosin. Sie erlaubt, durch Ansäuerung die Fluoreszenz dieser Stoffe weitgehend zu dämpfen bzw. zu löschen, wodurch eventuell vorhandene geringe Emissionswerte von Amidorhodamin und Rhodamin erkennbar werden.

H. BEHRENS (in H. BEHRENS, M. ZUPAN & M. ZUPAN 1976) beschrieb die Anwendung von chromatographischen Verfahren, wobei Eosin und Amidorhodamin in Kieselgel-Säulen getrennt wurden. Hiermit vergleichbar ist die Trennung der Farbstoffe mit Hilfe von Ionenaustauschern (W. PERLEGA, 1976). Da die verwendeten Farbstoffe teils kationischer, teils anionischer Natur sind, können sie in einzelne Fraktionen separiert werden. Diese Methode eignet sich besonders zur Unterscheidung des kationoiden Rhodamin B vom anionoiden Amidorhodamin, Eosin und Uranin.

Ein papierchromatographisches Verfahren setzte M. ZUPAN (in H. BEHRENS, M. ZUPAN & M. ZUPAN 1976) zur Trennung von Uranin, Eosin und Amidorhodamin ein. Das Verfahren erlaubt jedoch nur annähernd eine quantitative Auswertung der genannten Stoffe.

Die Anwendung der Dünnschicht-Chromatographie zur Auswertung von Tracerversuchen wurde erstmals von J. ROCHAT et al. (1975) beschrieben. Die Autoren trennten und identifizierten ein Gemisch verschiedener Rhodamin-Derivate. Allerdings konnte damit eine Nachweisempfindlichkeit von nur $1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ erreicht werden, so daß der aufwendigeren Lösungsextraktion mittels eines organischen Solventen der Vorzug gegeben wurde.

2. Zur Arbeitsweise chromatographischer Trennverfahren

Unter den chromatographischen Methoden versteht man eine Gruppe von physikalisch-chemischen Trenn- und Nachweisverfahren, die der qualitativen und quantitativen Analyse von Stoffgemengen dienen. Dabei verteilen sich die zu trennenden Stoffe in einer homogenen Lösung zwischen zwei Phasen – der stationären und der mobilen Phase. Die unterschiedliche Verteilung der Komponenten zwischen mobiler und stationärer Phase bewirkt die Trennung.

Hinsichtlich der hier vorliegenden Problemstellung, der Trennung von Fluoreszenzstoffen in wässrigen Lösungen, boten sich die Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie (HPLC) und die Dünnschicht-Chromatographie (DC) an. Beide Verfahren haben sich zur Durchführung von Reihenanalysen bewährt, z. B. in der chemischen und biochemischen Spurenanalytik.

Bei der HPLC ist der Träger für die stationäre Phase in einer Säule dicht gepackt und wird unter Druck von der mobilen Phase durchströmt (Fig. 1). Die Trennwirkung

¹ Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für die Gewährung einer Sachbeihilfe (Ma 688/2). Sie ermöglichte uns die Durchführung dieser Untersuchungen.

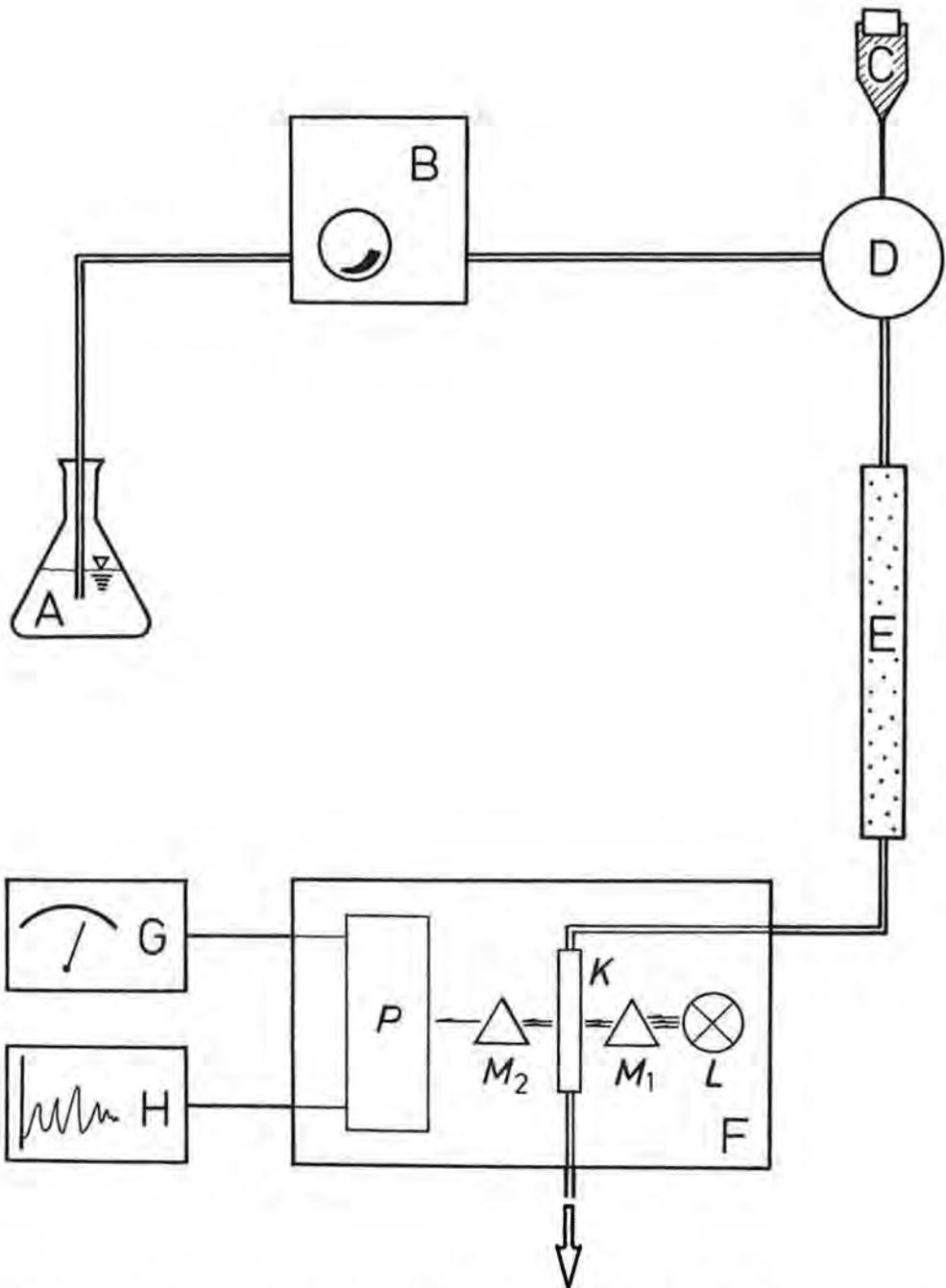


Fig. 1: Funktionsschema der Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie (HPLC)
 A: Fließmittel (Eluens); B: Hochdruckpumpe; C: Probendosierung; D: Injektor oder
 Probenaufgäbeventil; E: Trennsäule; F: Spektralfluorimeter (L: Lichtquelle, m_1 : Anre-
 gungsmonochromator oder -filter, K: Durchflußküvette, M_2 : Emissionsmonochromator
 oder -filter, P: Photodetektor); G: Anzeigegerät; H: Schreiber. Nähere Erläuterungen
 siehe Text.

ist abhängig vom Säulenmaterial und vom eingesetzten Laufmittel. Die unterschiedliche Adsorption oder Verteilung bewirkt verschiedenen Verweilzeiten der Einzelkomponenten beim Durchströmen der Säule. Die am Säulende nacheinander austretenden Fraktionen lassen sich in einem nachgeschalteten Detektor – hier Fluorimeter – getrennt bestimmen (L. R. SNYDER & J. J. KIRKLAND, 1974).

Bei der DC besteht die stationäre Phase z. B. aus einer Kieselgelschicht von 0,1 bis 1 mm Stärke, die auf einer Glas-, Kunststoff- oder Metallplatte aufgetragen ist. Aufgrund der Kapillarwirkung durchströmt das Laufmittel die Beschichtung nach oben. Die einzelnen Komponenten eines Gemisches legen unterschiedliche Wegstrecken zurück, wiederum in Abhängigkeit vom Laufmittel und vom Adsorbens (E. STAHL, 1967). Der Quotient zwischen der Wanderungsstrecke der Einzelkomponenten und der Lösungsmittelfront – „Rf-Wert“ – ist für jede Komponente charakteristisch. Zur Bestimmung werden die getrennten Substanzflecken der einzelnen Fluoreszenzstoffe mit einem entsprechend konstruiertem Fluorimeter (Densitometer) ausgewertet (Fig. 2).

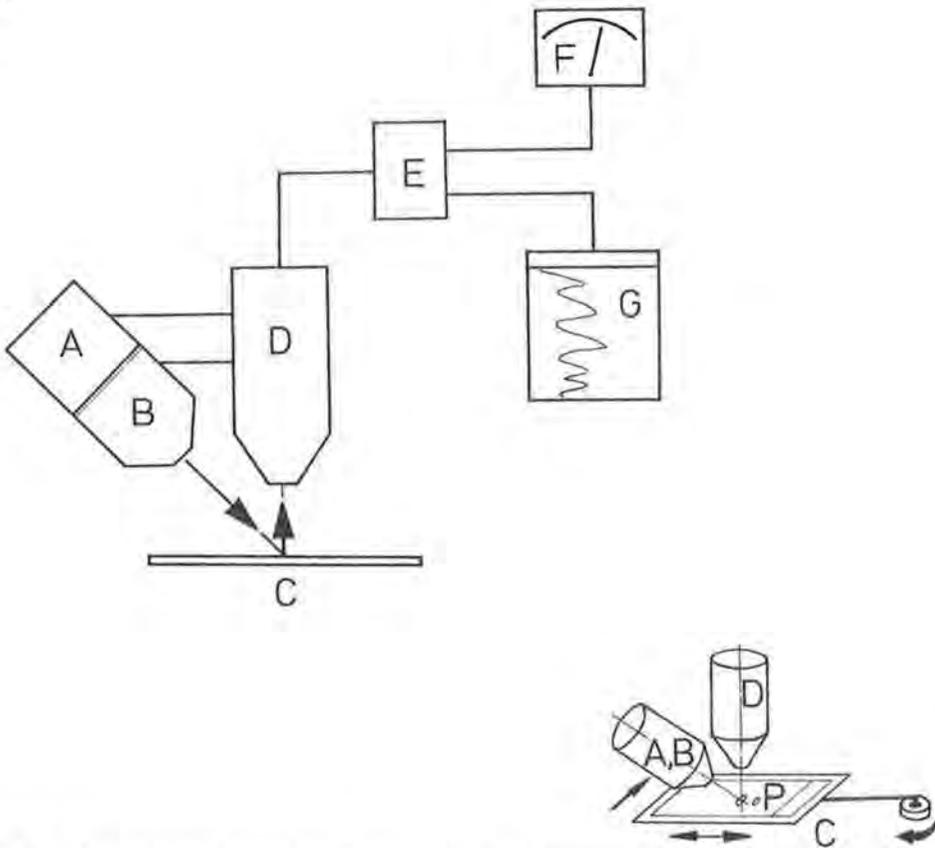


Fig. 2: Blockschema der spektralfluorimetrischen Auswertung von Dünnschicht-Chromatographie-Platten

A: Anregungslampe; B: Anregungsmonochromator oder -filter; C: Dünnschicht-Platte (mit P: Farbstoffflecken); D: Emissionsmonochromator oder -filter; E: Photodetektor und elektronische Verstärkung; F: Anzeigegerät; G: Schreiber.

Beim Abfahren der Dünnschichtplatten in Längs- oder Querrichtung werden die zu messenden Flecken im Kreisspalt abgerastert oder im Strichspalt überfahren.

Im Rahmen unseres Forschungsvorhabens war die Eignung der HPLC und der DC für den Nachweis von fluoreszierenden Markierungsstoffen zu prüfen. Die vergleichenden Untersuchungen wurden mit Uranin AP (MERCK), Eosin GS (SIMON & WERNER), Amidorhodamin G extra (Brauns), Rhodamin FB (BASF) und Tinopal CBS-X (Ciba-Geigy) durchgeführt. Für die HPLC stand ein Gerät der Firma Kontron zur Verfügung.¹ Die Ergebnisse wurden ergänzt durch einzelne Vergleichsmessungen und Mitteilungen der Firma Perkin Elmer.

Zur Auswertung der Dünnschicht-Platten wurden Densitometer verschiedener Hersteller eingesetzt. Es handelte sich um die Geräte „Farrand VIS-UV II“ der Firma Kontron, das Densitometer TLD 100 der Firma Vitatron und das „Chromatogramm-Spektralphotometer“ KM 3 der Firma Zeiss.²

Das Gerät von Kontron gestattet die Wahl der Anregungs- und Emissionswellenlängen durch zwei Monochromatoren; zur Anregung dient eine Xenon-Hochdrucklampe. Beim Vitatron-Gerät erfolgt die Anregung durch eine Hg-Lampe; die Emissionswellenlängen werden mit entsprechenden Monochromat-Filtern ausgesondert. Das Zeiss-Gerät arbeitet mit einem Monochromator und Sperr- bzw. Monochromat-Filtern, wobei diese gegeneinander auswechselbar sind und somit wahlweise für Anregung oder Emission zur Verfügung stehen. Die Anregung erfolgt entweder mittels einer Hg-Lampe oder beim Wechsellampensatz alternativ mittels Quecksilber-, Deuterium- oder Glühlampe.

Aufgrund der ersten Versuchsergebnisse sollte eines der beiden Verfahren ausgewählt und für die weitere Anwendung optimiert werden. Beurteilungskriterien für die Auswahl waren die Eignung für die hydrogeologische Aufgabenstellung, die unteren Nachweisgrenzen für die einzelnen Fluoreszenzstoffe, die Eignung für Serienanalysen – insbesondere die Handhabung im Dauerbetrieb – sowie die Anpassungsmöglichkeiten auf erweiterte Problemstellung, z. B. Einsatz weiterer Tracer oder modifizierter DC-Platten.

3. Vergleichsuntersuchungen mit der Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie (HPLC)

Bei der Technik der HPLC ist die Trennwirkung abhängig vom Säulenmaterial und von eingesetzten Laufmitteln. Im Rahmen der hier beschriebenen Versuche wurde eine Kieselgel-gefüllte Säule von 15 cm Länge eingesetzt. Aufgegeben wurden jeweils Probenmengen von 20 µl. Nach Durchlaufen der Trennsäule wurden die einzelnen Fraktionen in der Durchflußzelle eines Fluorimeters ausgewertet; für jeden Farbstoff wurde dessen optimale Anregungs- und Emissionswellenlänge vorgewählt.

Gemische, die lediglich 2 Fluoreszenztracer enthielten, konnten mit relativ kurzen Retentionszeiten getrennt werden, so z. B. Eosin GS und Amidorhodamin G extra, Eosin GS und Uranin, Eosin GS und Rhodamin B sowie alle binären Mischungen mit Tinopal. Auch konnten einzelne Farbstoffe, wie z. B. Eosin GS, in Einzelbestandteile aufgetrennt werden.

Als mobile Phase wurden Gemische von Essigsäureäthylester/Aceton/Wasser oder Methanol/Benzol/Chloroform (z. T. auch mit Aethanol) sowie Propanol-(1)/Essigsäu-

¹ Der Firma Kontron, Stuttgart, danken wir für die leihweise Überlassung einer HPLC-Anlage mit zugehörigem Fluoreszenz-Spektral-Detektor SFM 23.

² Herrn Prof. Dr. Heimann, Institut für Lebensmittelchemie, Universität Karlsruhe, sind wir für die Möglichkeit, am dortigen Densitometer TLD 100 über längere Zeit hindurch Vergleichsmessungen vornehmen zu können, zu Dank verpflichtet.

reäthylester/Wasser untersucht. Je nach Farbstoffkombination wurden die Mischungsverhältnisse variiert und z. T. mit Ammoniaklösung erweitert. Als störend erwies sich bei hohen Empfindlichkeiten, daß ein durch den Wassergehalt der Probe verursachter Peak bei den meisten Laufmittelgemischen die Peaks der Farbstoffe beeinträchtigte. Einschränkend für die Wahl des Fließmittels war, daß der pH-Wert nicht allzusehr vom Neutralen abweichen durfte, da sonst die Fluoreszenz einzelner Farbstoffe unterdrückt und damit die Farbstoffe nicht oder nur schlecht nachweisbar waren.

Ein Fließmittel, das in der zur Verfügung stehenden Säule die genannten 5 Farbstoffe in vertretbarer Zeit auftrennt, konnte in der gegebenen Zeit nicht gefunden werden. Zwar ließ sich mit dem Fließmittelgemisch Essigsäureäthylester/Aceton/Wasser/Ammoniak eine Trennung aller Farbstoffe erreichen; da jedoch nach jedem Durchgang eines Farbstoffes die Anregungs- und Emissionswellenlängen neu einzustellen waren, reichte der Unterschied der Retentionszeiten der einzelnen Farbstoffe – die z. T. sehr dicht aufeinander folgen – kaum aus, um diese Manipulation vorzunehmen.

Bei stark unterschiedlichen Konzentrationsverhältnissen ließen sich die Farbstoffe deshalb nicht zuverlässig identifizieren. Dieser Nachteil entfällt wahrscheinlich bei Verwendung einer längeren Trennsäule, wobei zwischen den einzelnen Farbdurchgängen mehr Zeit zur Einstellung der Monochromatoren zur Verfügung steht. Die Folge ist dann allerdings eine Verlängerung des Zeitaufwandes pro Analyse, die beim eingangs erwähnten Trennmittel bereits in der Größenordnung von 2 Stunden liegt. Möglicherweise erlaubt ein geeigneteres Trennmittel eine raschere Analyse der Proben.

Als wesentlicher Nachteil bei der Durchführung von Serienanalysen bleibt jedoch, daß erst nach dem Durchfluß des Tracers die einzustellende Verstärkung ermittelt werden kann. Die Wiederholung der Messung an einem einzelnen Farbstoff ist nicht möglich, es muß jeweils der gesamte Trennvorgang wiederholt werden. Demgemäß ist zu erwarten, daß bei unbekanntem Konzentrationen wenigstens zwei Trennungen des gleichen Gemisches erforderlich sind. Da bei einer Probe, die z. B. 5 Farbstoffe enthält, insgesamt fünfmal je zwei Wellenlängen während eines Durchlaufes neu gewählt werden müssen, erfordert dieses Verfahren ständige Aufsicht und Konzentration während der Analyse. Nach den bisherigen vorläufigen Versuchen mit der HPLC erscheint der Zeitaufwand zur Bestimmung eines Gemisches mehrerer Farbstoffe zu hoch.

Als weiterer Nachteil ist die Störanfälligkeit des Systems infolge der besonderen Beschaffenheit der im Rahmen hydrogeologischer Markierungsversuche zu untersuchenden Proben. Sie weisen in der Regel einen nicht zu vernachlässigenden Gehalt an Schwebstoffen oder – bei Anwendung der Aktivkohlemethode – Kohlepartikeln auf. Dies kann während Reihenanalysen zur Verstopfung der Säule führen. Die Benutzung einer Vorsäule schafft keine sichere Abhilfe. Eine vorherige Filtration der Proben beinhaltet die Gefahr eines möglichen Verlustes von Fluoreszenzstoffen im Filtermaterial und erhöht wie auch bei einer eventuellen Zentrifugierung den Arbeitsaufwand.

Die mit der HPLC erreichten unteren Nachweisgrenzen für Tinopal, Uranin, Eosin GS, Amidorhodamin G extra und Rhodamin B lagen bei 10 bis 50 mg/m³; die Proben waren hierbei mit demineralisiertem und mit Leitungswasser angesetzt. Proben aus Kohle-Eluaten oder aus Naturversuchen wurden nicht zu Vergleichen herangezogen.

Im Rahmen der durchgeführten Testuntersuchungen konnten nicht alle technischen Möglichkeiten der HPLC-Methode, die zusammen einen erheblichen apparativen und zeitlichen Aufwand erfordern, geprüft werden. Die Erreichbarkeit höherer

Nachweisgrenzen erscheint durchaus möglich. Prinzipiell ist davon auszugehen, daß mit der HPLC die erforderliche Trennung der Fluoreszenztracer zu erreichen ist.

Gegen die Weiterführung von Versuchen sprachen – neben dem Ablauf der Zeit, in der das Gerät zur Verfügung stand – folgende Nachteile: Die lange Laufzeit der einzelnen Proben, die relativ aufwendige Bedienung des Gerätes sowie die fehlende Möglichkeit zu sofortigen Korrekturen bei eventuellen Fehleinstellungen. Damit erscheint dieses Verfahren für einen Einsatz bei großen Reihenuntersuchungen nicht besonders attraktiv. Zusätzlich bleibt die Gefahr der Verstopfung der Säule durch Schwebstoffe bzw. Kohlepartikel aus den Proben. Aus diesem Grunde wurde zunächst der Dünnschicht-Chromatographie der Vorzug gegeben.

4. Vergleichsuntersuchungen mit der Dünnschicht-Chromatographie (DC)

4.1. Analysengang

Bei der Technik der DC können pro Platte (20×20 cm) bis zu 12 Proben aufgegeben werden. Auf einen Startpunkt lassen sich bis zu 20 µl der Probeflüssigkeit in Einzelmengen von 2 µl nach jeweiliger Trocknung aufgeben. Da in der Regel 2 µl ausreichen, läßt sich bei voller Ausnutzung der möglichen Aufgabemenge eine Konzentrierung der Probe um den Faktor 10 erreichen. Nach Auftragen der Probe wird das Lösungsmittel verdunstet, so daß die Herkunft der Probe – sei es eine Direktprobe oder eine Kohle-Eluat – für die weitere Auftrennung keine Rolle spielt.

Für die beschriebenen Versuche wurden Fertigplatten mit Kieselgel-60 (0,25 mm) der Firma Merck verwendet. Die Proben wurden zunächst mit einer Mikroliterspritze aufgegeben; wegen der möglichen Verschleppung von Farbstoffen – wie es Blindproben ergaben – wurde später eine Eppendorf-Pipette (2 µl) mit Einweg-Spitzen verwendet. Die Platten wurden mit unterschiedlichen Fließmittelgemischen in einer entsprechenden Kammer entwickelt. Für die erzielbare Trennung spielt die Zusammensetzung des Fließmittels und das Trägermaterial eine Rolle.

Nach Entwicklung des Chromatogramms läßt sich für jeden Farbstoff der charakteristische Rf-Wert angeben. Da nach der Entwicklung das Fließmittel wiederum verdunstet wird, spielen weder pH-Wert des Entwicklers noch eine eventuelle Mischbarkeit mit Wasser oder Dimethylformamid eine Rolle für die erzielbare Fluoreszenz-Intensität. Trübstoffe oder Kohlepartikel bleiben auf der Startlinie zurück. Die Lage der Flecke der einzelnen Farbstoffe läßt sich bei hinreichender Konzentration mit einer UV-Lampe feststellen. Dies erleichtert die spätere Messung. Die quantitative Auswertung erfolgt im Densitometer.

4.2. Trennung der Fluoreszenzstoffe

Der chromatographische Nachweis einzelner Fluoreszenzstoffe ist in der Regel unproblematisch. Praktisch stehen immer Laufmittel zur Verfügung, die eine geeignete Trennung ergeben. Sofern ein Farbstoff nicht rein vorliegt, kann je nach verwendetem Eluens eine Trennung in die Bestandteile erfolgen. Fig. 3 zeigt das Chromatogramm einer Eosin-GS-Lösung. Man erkennt eine Haupt- und drei Nebenfraktionen; diese haben jedoch trotz verschiedener chemischer Beschaffenheit ähnliche spektrale Eigenschaften. Eine vergleichbare Auftrennung von Rhodamin wurde auch von J. ROCHAT et al. (1975) beschrieben. Solche Nebenfraktionen wirken sich bei

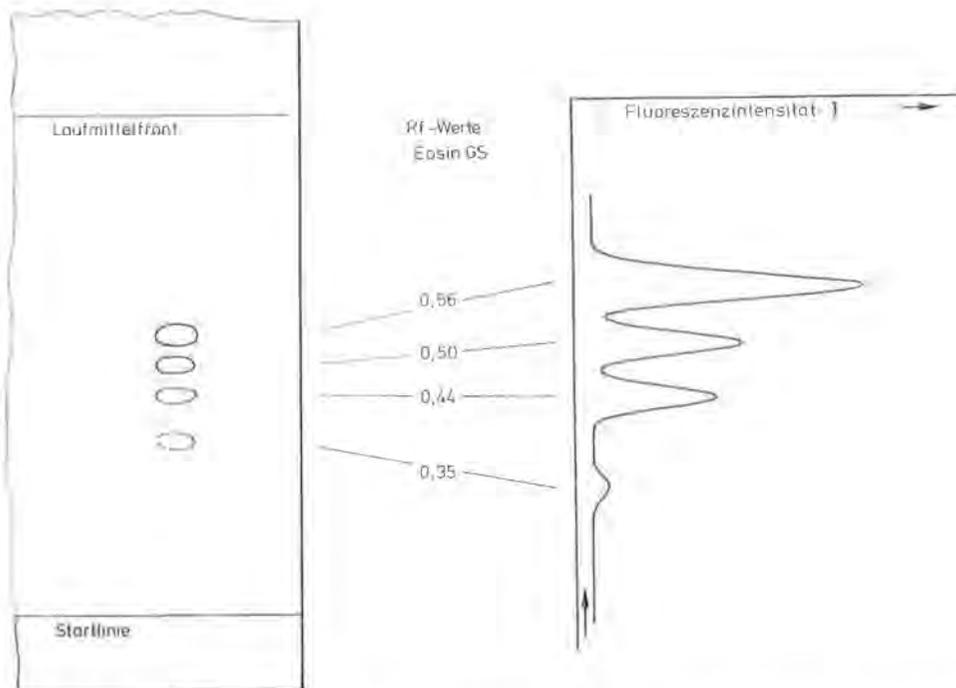


Fig. 3: Chromatogramm einer Eosin-GS-Lösung mit Auftrennung in Haupt- und Nebenfractionen; Eluens: Propanol-(1)/Essigsäureäthylester/Ammoniaklösung (50/35/30). Densitometer: Vitratron TLD 100 (Anregung: Hg-Breitband 220–350 nm; Emission: Filter 528 nm).

der Trennung von Gemischen erschwerend aus, da sich ihre Flecken mit denen anderer Farbstoffe überlagern können.

Für die Trennung von Gemischen, die nur zwei oder drei fluoreszierende Stoffe enthielten, konnte mit mehreren Laufmitteln eine ausreichende Trennung auf der Dünnschichtplatte erzielt werden. Brauchbar zeigten sich z. B. Mischungen von Propanol-(1)/Essigsäureäthylester/Wasser, Essigsäureäthylester/Eisessig/Wasser oder tert.-Butanol/Propionsäure/Wasser. Treten für unterschiedliche Farbstoffe gleiche Rf-Werte auf, lassen sich häufig bereits durch Veränderung der gewählten Mischungsanteile Verbesserungen erzielen.

Die Trennung von Gemischen verschiedener Farbstoffe mit ähnlichen spektralen Eigenschaften zeigt den Vorteil der DC. Mittels dieser Trennung sind Farbstoffe selbst bei großen Konzentrationsunterschieden nebeneinander nachweisbar, wenn mit der normalen fluorimetrischen Bestimmung selbst bei paralleler Verschiebung von Anregungs- und Emissionswellenlänge keine eindeutige Identifizierung möglich ist (Fig. 4).

Bei Markierungsversuchen mit mehreren Fluoreszenztracern sollte aus Rationalisierungsgründen eine doppelte Probenuntersuchung durch gegebenenfalls erforderliche, verschiedene Laufmittel vermieden werden. Daher wurde ein Eluens angestrebt, das die heute in der Hydrogeologie verwendeten Fluoreszenztracer Uranin, Eosin, Amidorhodamin, Rhodamin und Tinopal in ausreichender Schärfe zu trennen vermag. Bewährt hat sich das Fließmittel Propanol-(1)/Essigsäureäthylester/Am-

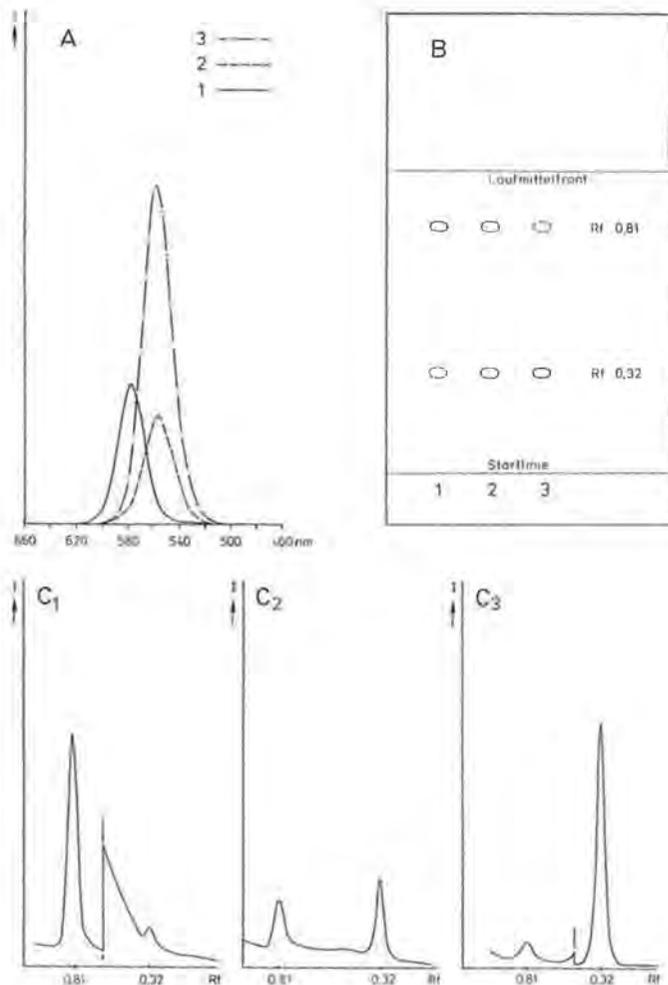


Fig. 4: Auswertung von Rhodamin- und Amidorhodamin-Gemischen

Lösung 1: Rhodamin B	2	$g \cdot m^{-3}$
Amidorhodamin G extra	0,02	$mg \cdot m^{-3}$
Lösung 2: Rhodamin B	2	$mg \cdot m^{-3}$
Amidorhodamin G extra	20	$mg \cdot m^{-3}$
Lösung 3: Rhodamin B	0,02	$mg \cdot m^{-3}$
Amidorhodamin G extra	2	$g \cdot m^{-3}$

A: Fluoreszenzspektren aufgenommen mit dem Baird-Atomic-Fluorimeter; Anregungs- und Emissionswellenlänge parallel mit einer Differenz von 25 nm verändert; Verstärkung: 1 = Faktor 1, 2 und 3 = Faktor 10.

B: Dünnschicht-Chromatogramm der drei Lösungsgemische; Eluens: Propanol-(1)-Essigsäureäthylester/Ammoniaklösung/Wasser (60/10/20/10); Rf-0,81: Rhodamin B; Rf-0,32: Amidorhodamin G extra.

C₁₋₃: Quantitative densitometrische Auswertung der in Chromatogramm B getrennten Gemische 1, 2 und 3.

Bei C₁ und C₃ wurde der Verstärkungsfaktor beim Abfahren geändert.

moniaklösung (25%)/Wasser (6/1/2/1); zur Verbesserung der Fließeigenschaften wurde eine Spatelspitze NaCl zugefügt.

Das mit diesem Eluens entwickelte Chromatogramm einer Probe des Gemisches der genannten fünf Farbstoffe ist in Fig. 5 wiedergegeben. Zugleich sind die mit dem Densitometer gewonnenen Fluoreszenzkurven dargestellt. Durch die unterschiedlichen R_f -Werte ist eine Auswertung mit dem Densitometer möglich. Während des Scannens werden vor dem Erreichen der einzelnen Flecken die jeweiligen spezifischen Anregungs- und Emissionswellenlängen eingestellt.

Bei Reihenanalysen ist es sinnvoll, die Auswertung der Dünnschichtplatte quer zur Laufrichtung vorzunehmen; man kann dann mit dem gleichen Filter (bzw. mit der gleichen Einstellung von Anregungs- und Emissionswellenlänge) sämtliche Proben einer Platte auf einen bestimmten Farbstoff überprüfen. Bei dieser Art der Auswertung lassen sich aufgetretene Fehler – z. B. die Wahl einer ungünstigen Wellenlänge oder Verstärkung – unter Wiederholung des Scans sofort korrigieren.

4.3. Störungen der Analyse

Wie entsprechende Versuche ergaben, werden die Fluoreszenztracer durch das energiereiche Anregungslicht langsam zerstört. Demnach ist es sinnvoll, die licht-

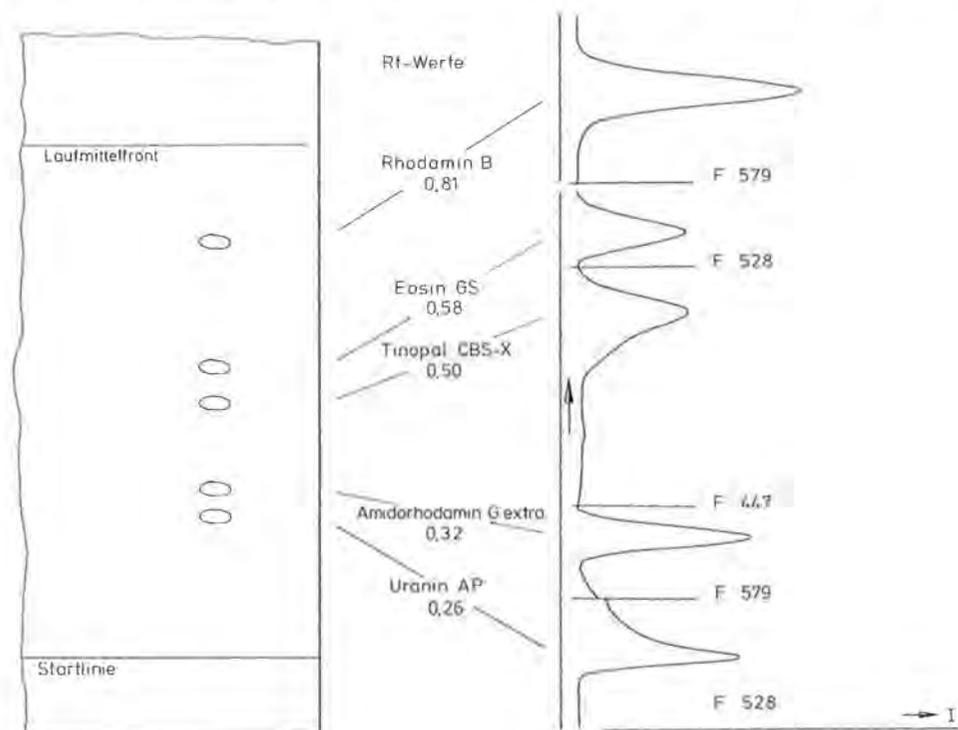


Fig. 5: Dünnschicht-Chromatogramm eines Gemisches von Uranin AP, Eosin GS, Amidorhodamin G extra, Rhodamin B und Tinopal CBS-X (Konzentration jeweils $1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$); Eluens: Propanol-(1)/Essigsäureäthylester/Ammoniaklösung/Wasser (60/10/20/10). Fluoreszenzkurve aufgenommen mit Vitatron TLD 100 (Anregung: Hg-Breitband 220–350 nm; Emissionsfilter F, wie auf Abbildung angegeben).

empfindlicheren Farbstoffe zuerst zu bestimmen. Die Zerstörung der Farbstoffe erfolgt allerdings so langsam, daß bei Routine-Untersuchungen diese Fehlerquelle zu vernachlässigen ist. Wichtig ist jedoch, daß entwickelte Platten möglichst bald ausgewertet und bis zur Messung im Dunkeln gelagert werden.

Eine Störung der Messung kann durch allgegenwärtige Fasern von Kleidungsstücken oder Papiertüchern erfolgen: Sie enthalten optische Aufheller und beeinträchtigen vor allem die Auswertung des Tinopals. Man kann diese Fasern bei vorheriger Betrachtung mit der UV-Lampe erkennen und sie von der Platte entfernen. Sollten sie auf der Platte verbleiben und mitgemessen werden, erkennt man die von ihnen verursachten Peaks an ihrer scharfen Form.

Ein weiterer Fehler kann durch eine ungleichmäßige Laufmittelfront auftreten. Die Auswertung quer zur Laufrichtung führt dann zu unrichtigen Werten, da einzelne Flecken einer Farbstoffreihe zum Teil nur randlich erfaßt werden. In diesem Fall muß in Laufrichtung gemessen werden.

Ein Vorteil der DC ist die Möglichkeit der raschen Korrektur von aufgetretenen Fehlmessungen, ohne daß – wie bei der HPLC – die gesamte Trennung wiederholt werden muß. Die Entwicklungszeit von bis zu zwei Stunden erscheint lang, doch lassen sich je Entwicklungsdauer gleichzeitig sechs Platten bzw. 72 Proben (inkl. Eichwerte) entwickeln. In dieser Zeit können neue Platten vorbereitet bzw. entwickelt werden. Wie Vergleiche ergaben, liegt der Zeitaufwand bei der DC in der Größenordnung der Direktfluorimetrie.

4.4 Nachweisgrenzen

Die erreichbaren unteren Nachweisgrenzen sind bei der DC von den verwendeten Platten, vom Fließmittel und vom Auswertgerät abhängig. Platten mit Konzentrierzone ergeben z. B. für Tinopal eine Verbesserung der Nachweisgrenze gegenüber normalen Platten um den Faktor 5. Eine Erhöhung des Anteils an Essigester beim genannten Fließmittel führt zu einer Verkleinerung und damit Konzentrierung der Flecke und verbessert so ebenfalls die Nachweispfindlichkeit. Bisher konnten mit dem jeweils optimalen Fließmittel auf normalen DC-Platten mit Kieselgel-60-Beschichtung die folgenden unteren Nachweisgrenzen erreicht werden, wobei für Uranin und Eosin allerdings nicht die optimalen Anregungs- und Emissionsfilter zur Verfügung standen:

Fluoreszenzstoff	Nachweisgrenze	
	in pg pro DC-Fleck	in $\text{mg} \cdot \text{m}^{-3}$
Eosin GS	20	1,0
Uranin AP	2,5	0,12
Rhodamin B	0,4	0,02
Amidorhodamin G extra	1,0	0,05
Tinopal CBS-X	50	2,5

Die in pg angegebenen Werte sind Absolutmengen, d. i. jeweils die Farbstoffmasse pro DC-Fleck. Bezogen auf die Aufgabenmenge von 20 μl ergibt sich daraus die Stoffkonzentration in $\text{mg} \cdot \text{m}^{-3}$.

Zusätzlich kann noch eine vorherige Einengung der Probelösung erfolgen, was nach Literaturangaben ohne Schaden für die Farbstoffe möglich ist (W. KASS, 1976); damit kann nochmals ein Faktor 10 gewonnen werden. Die Einengung wird am besten im Rotationsverdampfer durchgeführt und ist gleichermaßen für wäßrige Proben wie Kohle-Eluate geeignet.

Damit liegen die mit Hilfe der DC-Technik erreichbaren unteren Nachweisgrenzen in der Größenordnung der mit der Fluorimetrie in Direktmessung erreichbaren Werte. Die hier für die Chromatographie angegebenen Grenzwerte gelten vor allem auch für Einzelkomponenten aus Gemischen von Fluoreszenztracern und nicht nur für eine einzeln in der Lösung vorkommende Substanz.

Erste weitere Versuche zeigten, daß sich mit Hilfe konzentrierender DC-Platten bzw. fortgeschrittener DC-Techniken, wie HPDC, in Kombination mit entsprechend ausgerüsteten Auswertgeräten die untere Nachweisgrenze offensichtlich weiter verbessern läßt (U. HEZEL, 1977; R. KAISER, 1976). Ebenso beeinflussen bei hohen Empfindlichkeiten Streulicht aus Plattenuntergrund, Remission und Eigenfluoreszenz der Platte das Signal Rausch-Verhältnis negativ. Es zeigt sich, daß eine Anregung nicht unbedingt beim Absorptionsmaximum erfolgen muß, sondern im Bereich energiereicher Quecksilberlinien oft bessere Ergebnisse erzielt werden. Quantitative Aussagen hierzu müssen jedoch im weiteren Verlauf des Forschungsvorhabens noch abgesichert werden.

5. Schlußfolgerungen und Zusammenfassung

Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse sind HPLC und DC geeignet, die erforderliche Trennung der bei hydrogeologischen Markierungsversuchen eingesetzten üblichen Fluoreszenztracer zu erzielen.

Die DC erweist sich bei Naturversuchen mit Proben mit Trübstoffen oder feinsten Kohlepartikeln als das weniger störanfällige Verfahren. Sie eignet sich für Reihenanalysen besser als die HPLC, weil die Versuchsdurchführung einfacher ist und mögliche Fehler leichter korrigiert werden können.

Insgesamt erreicht die DC in Kombination mit der Densitometrie untere Nachweisgrenzen, die in der Größenordnung der direktfluorimetrischen Verfahren liegen.

Die Anwendung der DC erlaubt den Einsatz weiterer Fluoreszenztracer, die z. Zt. aufgrund der Ähnlichkeit spektraler Daten bei ausschließlich fluorimetrischer Auswertung nicht einsetzbar sind.

Für Markierungsversuche, bei denen nur Fluoreszenztracer mit hinreichend unterschiedlichen spektralen Eigenschaften Verwendung finden, dürfte die Direktfluorimetrie das gängige Auswertverfahren bleiben. Bei Einsatz von Fluoreszenzstoffen mit nahe beieinanderliegenden Excitations- und Emissionsmaxima hat die fluorimetrische DC/Densitometrie eindeutige Vorteile; der Analysenaufwand ist hierbei nur unbedeutend größer als bei der Fluorimetrie.

Literatur

- BAUER, F.: Untersuchungen über die Verwendbarkeit von zwei Fluoreszenzfarbstoffen im Rahmen eines Färbeversuchs. – Geol. Jb., C2, 61–73, Hannover 1972.
- BEHRENS, H.: Untersuchungen zum quantitativen Nachweis von Fluoreszenzfarbstoffen bei ihrer Anwendung als hydrogeologische Markierungsstoffe. – Geologica Bavarica, 64, 120–131, München 1971.
- BEHRENS, H.: Eine verbesserte Nachweismethode für Fluoreszenzindikatoren und ihre Anwendung zur Feststellung von Fließwegen im Grundwasser – Z. Deutsch. Geol. Ges., 124, 535–544, Hannover 1973.
- BEHRENS, H., ZUPAN, M., ZUPAN, M.: Methodik und Ergebnisse der Direktmessung von Fluoreszenztracern. – In GOSPODARIC, R., ZÖTL, J. G. (Eds.): Markierung unterirdischer Wässer. Untersuchungen in Slowenien 1972–1975. Steir. Beitr. z. Hydrogeologie, 28, 7–257, Graz 1976.
- HEZEL, U.: Quantitative Photometrie an Dünnschicht-Chromatogrammen für Routine und For-

- schung. – G-I-T-Fachzeitschrift für das Laboratorium, 1977, 8, 694–704, Darmstadt 1977.
- KAISER, R.: Einführung in die Hochleistungs-Dünnschicht-Chromatographie. – 120 S., (IFG-Verlag) Bad Dürkheim 1976.
- KASS, W.: Erfahrungen mit Uranin bei Färbversuchen. – Steir. Beitr. z. Hydrogeologie, 18/19, 123–132, Graz 1967.
- KASS, W.: 100 Jahre Uranin! – Papers 3. SUWT, 113–123, Ljubljana 1976.
- PERLEGA, W.: Der Nachweis von Fluoreszenzstoffen mittels Aktivkohle. – Papers 3. SUWT, 195–201, Ljubljana 1976.
- ROCHAT, J., ALARY, J., MOLINARI, J., CHARRIERE, R.: Séparations physicochimiques de colorants xanthéniques utilisés comme traceurs en hydrologie. – J. Hydrology, 26, 277–293, Amsterdam 1975.
- SNYDER, L. R., KIRKLAND, J. J.: Introduction to Modern Liquid Chromatography. – 534 S., (John Wiley & Sons) New York 1974.
- STAHL, E. (Ed.): Dünnschicht-Chromatographie. Ein Laboratoriumshandbuch. – 2. Aufl., 979 S., (Springer-Verlag) Berlin-Heidelberg 1967.

Summary

For investigation of ground-water fluorescent tracers have got an increasing importance in last years. To have the same hydrogeologic conditions, often the tracers Uranine, Eosin, Rhodamine B, Sulforhodamine and Tinopal are injected at the same time in different ponors. The fluourometric determination of samples contenting a mixture of these tracers in different concentration may be difficult or impossible. Therefore a preliminary separation of these tracers by the techniques of High Pressure Liquid Chromatography or Thin Layer Chromatography, being applied in analytical chemistry, was tested in its applicability for hydrogeologic investigations.

Both techniques – HPLC and TLC – are applicable, but TLC is more efficient. Using TLC similar spectral characteristics of fluorescent tracers, impurities of dyes, particles from charcoal or sediment have no relevance for the analyses. The sensitivity was tested on samples from water and eluated charcoal, the detection limits are similar, independent of the nature of the sample and comparable to those of direct fluourometry.

The technique of TLC will allow the application of several fluorescent tracers even with the same spectral data.

Anschrift der Autoren: Dr. F. P. BUB und Prof. Dr. H. HÖTZL, Lehrstuhl für Angewandte Geologie, Universität Karlsruhe, Kaiserstraße 12, D-7500 Karlsruhe, BRD
 Dr. K. WISSER, Institut für Lebensmittelchemie, Universität Karlsruhe, Kaiserstraße 12, D-7500 Karlsruhe, BRD