

# Weiterentwicklung der Dünnschicht-Chromatographie für die Auswertung von Aktivkohle-Eluaten in der Tracertechnik

Von  
G. ACKERMANN & H. HÖTZL (Karlsruhe)

## Inhalt

	Seite
Einleitung .....	103
1. Verfahrensprinzip und Arbeitsweise der Dünnschicht-Chromatographie ..	104
2. Weiterentwicklung des DC-Verfahrens .....	106
2.1. Verbesserung der Elutionstechnik .....	106
2.2. Laufmittel .....	108
2.3. DC-Platten .....	108
2.4. Densitometrische Fluoreszenzmessung .....	109
2.5. Getestete Fluoreszenzstoffe .....	111
3. Arbeitsschema für die Probenuntersuchung .....	111
3.1. Geräte und Chemikalien .....	111
3.2. Elution der Aktivkohleproben .....	112
3.3. Ansetzen der DC-Platten und Entwickeln der Chromatogramme ..	112
3.4. Messung und Auswertung der Chromatogramme .....	112
Zusammenfassung .....	113
Literatur .....	113
Summary .....	114
Dank .....	114

## Einleitung

Zur Beobachtung des Durchgangsverlaufes von Fluoreszenztracern bei hydrogeologischen Markierungsversuchen werden Wasserproben direkt entnommen oder Aktivkohleadapter in die betreffenden Beobachtungsstellen eingehängt. Die Aktivkohle, die über längere Zeit eingehängt bleiben kann, adsorbiert aus dem Wasser die dort gegebenenfalls enthaltenen Fluoreszenztracer, die später im Eluat bestimmt werden (F. BAUER, 1967; W. PERLEGA, 1976). Vorteil dieser Methode ist eine durch Fluoreszenzstoffanreicherung bedingte höhere Nachweisempfindlichkeit sowie ein bei großen Einzugsgebieten oder langen Durchflußzeiten deutlich geringerer Beobachtungsaufwand.

Der Nachweis eines bestimmten Fluoreszenztracers im Eluat kann mittels fluorimetrischer Meßmethode erfolgen. Probleme treten allerdings dann auf, wenn mehrere Fluoreszenzstoffe, wie bei kombinierten Markierungsversuchen üblich, eingesetzt werden und zugleich in einer Probe auftreten (F. BAUER, 1972; H. BEHRENS, 1973). Liegen ihre Emissionsspektren zu nahe beieinander, beeinflussen sie sich gegenseitig, so daß der fluorimetrische Nachweis der einzelnen Tracer erschwert oder überhaupt unmöglich gemacht wird.

Diese Schwierigkeiten können unter anderem dadurch umgangen werden, daß man der fluorimetrischen Messung ein chemisches Trennverfahren vorschaltet. Nach ersten Vorversuchen und Anwendungen durch J. ROCHAT et al. (1975) haben F. P. BUB et al. (1979) und F. P. BUB & H. HÖTZL (1980) für die Auswertung von mehreren Fluoreszenzstoffen in Direktproben eine dünnschichtchromatographische Nachweismethode vorgestellt. Die direkte Übertragung dieses Verfahrens auf den Nachweis von Fluoreszenzstoffen in Eluaten der in natürlichen Gewässern eingesetzten Aktivkohle erwies sich jedoch als nicht durchführbar, da keine reproduzierbaren Werte gewonnen werden konnten (H. BEHRENS et al., 1981).

Als Hauptursache für die Schwierigkeiten erwies sich das bisher beim normalen fluorimetrischen Verfahren für die Auswertung von Aktivkohleproben benutzte Eluiermittel Dimethylformamid (DMF). Bei der Elution von Kohleproben werden damit auch andere, vermutlich organische Stoffe erfaßt. Zahl und Umfang solcher nicht erwünschter Fremdstoffe hängen von der Herkunft des Wassers, der jeweiligen Wasserschüttung und -qualität und von der Einhängedauer der Kohle ab. Außerdem wird durch das DMF das Bindemittel der DC-Plattenbeschichtung angelöst. All dies hinterläßt auf der DC-Platte Flecken oder Schleppspuren, die eine Erfassung der eigentlichen Tracer empfindlich stören.

Zur Verbesserung des Nachweises von Fluoreszenzstoffen in Eluaten der Aktivkohle war daher nicht nur eine Verbesserung und Weiterentwicklung des von F. P. BUB et al. (1979) beschriebenen DC-Verfahrens notwendig, sondern es mußte auch das bisher übliche Elutionsverfahren abgeändert werden. Über die Entwicklung einer geeigneten Nachweisteknik wird berichtet.

## 1. Verfahrensprinzip und Arbeitsweise der Dünnschicht-Chromatographie

Wie bereits von F. P. BUB et al. (1979) beschrieben, wird beim Verfahren der Dünnschicht-Chromatographie zwischen einer stationären und einer mobilen Phase unterschieden. Träger der stationären Phase ist in der Regel eine 1,2 mm starke Glasplatte, die mit Kieselgel, Cellulose, Polyamid oder anderen Substanzen beschichtet ist. Die Beschichtungsdicke dieser Platten schwankt je nach Plattentyp zwischen 0,1 und 2,0 mm. Als mobile Phase versteht man die Entwicklerflüssigkeit (Laufmittel) der Platte.

Etwa 1,5 cm über dem unteren Rand der 20 cm breiten DC-Platte werden die zu untersuchenden Substanzen im Abstand von 1,5 cm nebeneinander punktförmig aufgetragen. Um diesen sogenannten Startfleck so klein wie möglich zu gestalten, werden in einem Arbeitsgang Volumina im Mikroliterbereich (2 µl) aufgetragen. Nach dem Verdunsten der fluiden Phase der zu untersuchenden Substanz kann die Aufgabe beliebig oft wiederholt werden. Damit wird eine Konzentrierung der zu

untersuchenden Feststoffe mit dem Faktor der Anzahl der Aufgabewiederholungen erreicht.

Nach dem Auftragen wird die DC-Platte in ein Entwicklerbad getaucht. Die Menge des Laufmittels, dessen chemische Zusammensetzung von den Eigenschaften der zu untersuchenden Substanzen abhängig ist, wird so bemessen, daß nur der unterste Rand der DC-Platte (noch unterhalb der Reihe der Startflecke = Startlinie) befeuchtet wird. Durch Kapillarkräfte bedingt wandert das Laufmittel, mit von der Zusammensetzung der Entwicklerflüssigkeit bedingter Geschwindigkeit, innerhalb der Beschichtung der vertikal stehenden Platte nach oben. Die zu untersuchenden Substanzen (Fluoreszenzstoffe) werden von der Startlinie ab über das Laufmittel mit nach oben geführt. Abhängig von ihrer Molekülgröße werden die einzelnen Fluoreszenzstoffe innerhalb der Beschichtung der DC-Platte mit unterschiedlicher Geschwindigkeit mitgeführt.

Nach erfolgter Entwicklung des Chromatogramms (Laufmittelfront etwa 20% unter dem oberen Rand der DC-Platte) sind bei entsprechendem Laufmittel die zu trennenden Substanzen unterschiedlich weit mitgewandert. Die Lage der einzelnen Farbstoffflecken ist durch den Retentionsfaktor ( $R_f$ -Wert) definiert: Quotient aus Entfernung Startlinie - Flecklage und Startlinie - Laufmittelfront (Fig. 1).

Nach Abschluß der Entwicklung wird die DC-Platte aus dem Entwicklerbad genommen und durch ein Heißluftgebläse getrocknet. Die quantitative Auswertung erfolgt über ein Densitometer. Prinzipiell ähnelt das Auswerteverfahren der Fluori-

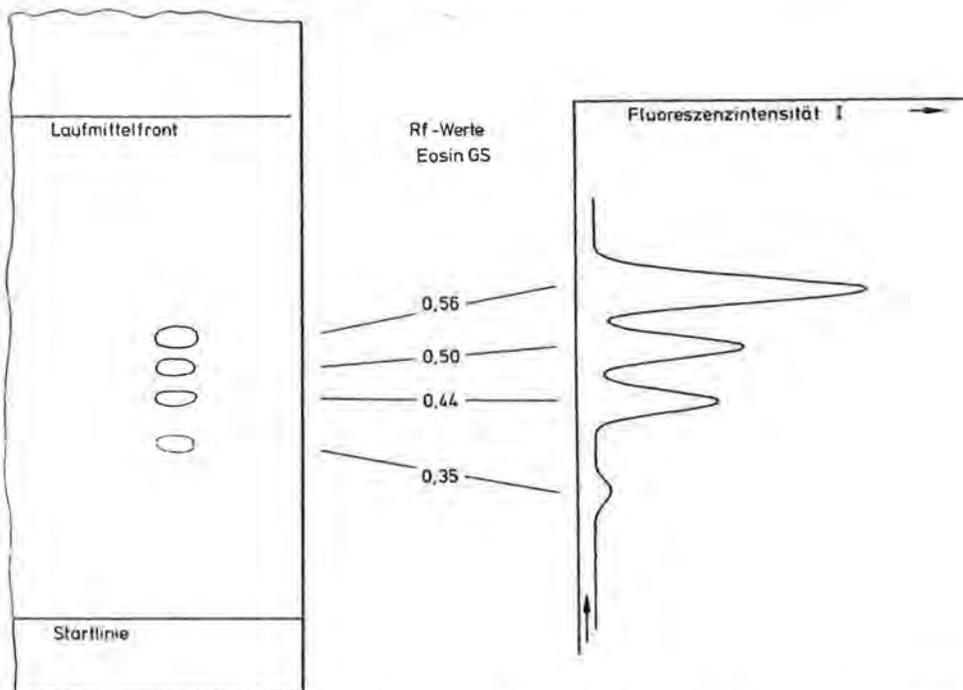


Fig. 1: Chromatogramm einer Eosin-GS-Lösung mit Auftrennung in Haupt- und Nebenfraktionen; Eluens: Propanol-(1)/Essigsäureäthylester/Ammoniaklösung (50/35/30). Densitometer: Vitratron TLD 100 (Anregung: Hg-Breitband 220–350 nm; Emission: Filter 528 nm) (aus F. P. Bub et al., 1979).

metrie: Der zu untersuchende Bereich einer Platte, in dem sich der im oben beschriebenen Arbeitsgang getrennte Fluoreszenzstoff befinden soll, wird über eine Hg-Lampe und entsprechende Filter mit  $\pm$  monochromatischem Licht bestrahlt. Die durch den vermuteten Fluoreszenzstoff erzeugte Emissionswellenlänge wird über einen weiteren Monochromator und elektrische Verstärkungseinrichtungen auf eine Anzeigeeinheit bzw. Schreiber übertragen (Fig. 2).

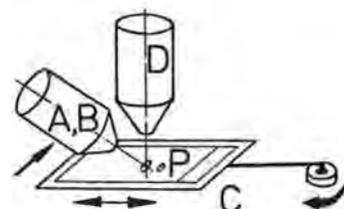
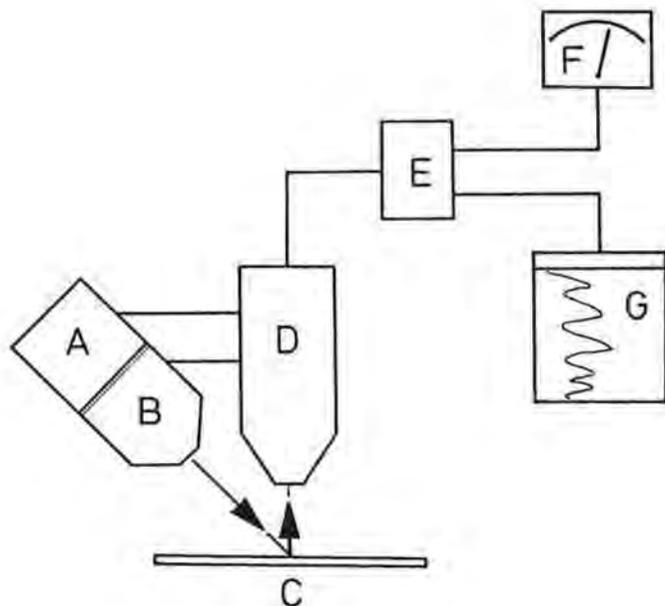


Fig. 2: Blockschema der spektralfluorimetrischen Auswertung von Dünnschicht-Chromatographie-Platten. A: Anregungslampe; B: Anregungsmoichromator oder -filter; C: Dünnschicht-Platte (mit P: Farbstoffflecken); D: Emissionsmonochromator oder -filter; E: Photodetektor und elektronische Verstärkung; F: Anzeigegerät; G: Schreiber. Beim Abfahren der Dünnschichtplatten in Längs- oder Querrichtung werden die zu messenden Flecken im Kreisspalt abgerastert oder im Strichspalt überfahren (aus F. P. BUB et al., 1979).

## 2. Weiterentwicklung des DC-Verfahrens

### 2.1. Verbesserung der Elutionstechnik

Das bislang bei der Aktivkohlemethode verwendete Elutionsmittel Dimethylformamid (DMF) erwies sich für den dünn-schichtchromatographischen Nachweis als relativ ungeeignet, da es einerseits das Bindemittel der Plattenbeschichtung auflöst und

zum anderen fluoreszierende Schleppspuren hinterläßt, die den Nachweis der einzelnen Fluoreszenzstoffe behindern bzw. die Nachweisempfindlichkeit stark reduzieren. Versuche mit Gemischen aus Propanol-2 (Isopropanol) und HCl als Elutionsmittel erbrachten bessere Ergebnisse (G. ACKERMANN et al., 1982). Weitere Untersuchungen zeigten, daß die Berücksichtigung der pH-Abhängigkeit einzelner Fluoreszenzstoffe bei der Elution eine Unterstützung beim späteren Nachweis bringt.

Wie bereits aus der Fluorimetrie bekannt ist, läßt die Fluoreszenzintensität des Uranins bereits im schwach sauren Milieu sehr stark nach, während das in seinem spektralen Verhalten ähnliche Eosin in diesem Bereich noch weitgehend unempfindlich ist. Treten beide Tracer in einer Probe gemeinsam auf, kann – bei bestimmten Konzentrationsverhältnissen – durch Ansäuern der zu messenden Flüssigkeit das Uranin unterdrückt werden.

Fluorimetrisch wurde an unserem Institut bislang wie folgt verfahren: Etwa 0,5 g der zu behandelnden Aktivkohle wurden in einem Polyäthylenröhrchen mit 7 ml Dimethylformamid versetzt. Nach der optimalen Elutionszeit von 30 Minuten wurde das Dimethylformamid in eine Fluoreszenzküvette gegeben und das Spektrogramm im Synchron-Scanning-Verfahren (H. BEHRENS, 1973) über ein Spektralfluorimeter gefahren (Anregung 480–580 nm, Emission 500–600 nm). Anschließend wurde das gleiche Spektrogramm zunächst nach Zugabe eines Tropfens HCl (0,1 mol/l) und weiterhin nach Zugabe eines Tropfens 25% NH<sub>3</sub> zweimal wiederholt. In der Auswertung der Spektrogramme konnten die vier in ihren Emissionsmaxima im Bereich zwischen 500 und 600 nm liegenden Tracer Uranin, Eosin, Amidorhodamin und Rhodamin, unter der Voraussetzung annähernd gleicher Konzentrationsverhältnisse, durch Vergleich zwischen den Peaks im neutralen, sauren und basischen Milieu identifiziert werden.

Da das Elutionsverfahren mit Dimethylformamid nicht problemlos auf die dünn-schichtchromatographische Nachweisteknik übertragbar war, wurden zahlreiche Tests durchgeführt, um ein geeignetes Elutionsmittel zu finden. Bei den zunächst befriedigenden Ergebnissen mit einem Gemisch aus Propanol-2 und HCl zeigt sich, daß trotz des Verdunstens der Elutionsflüssigkeit Uranin auf der DC-Platte nur sehr schwach erscheint. Daraufhin wurden die gleichen Proben mit einem für Uranin günstigeren Gemisch aus Propanol-2 und NaOH (1 mol/l) behandelt. Die dünn-schichtchromatographische Auswertung der Paralleleluat zeigte, daß im sauren Bereich Amidorhodamin und Rhodamin deutlich erscheinen, während Uranin und Eosin mehr oder weniger stark unterdrückt werden. Das basische Eluat zeigt den umgekehrten Effekt: Uranin und Eosin sind deutlich nachweisbar, Amidorhodamin und Rhodamin werden unterdrückt. Das Verfahren hat zwar den Nachteil des doppelten Arbeitsaufwandes (zwei parallel zu untersuchende Proben), vermeidet aber weitgehend die Beeinflussung benachbarter Fluoreszenzstoffflecken während der densitometrischen DC-Plattenauswertung. Versuche zum optimalen Mischungsverhältnis der Elutionsmittel ergaben für den basischen Bereich Propanol-2: NaOH (1 mol/l) = 2 : 1 und für den sauren Bereich Propanol-2: HCl (0,1 mol/l) = 4 : 1. Die maximale Elution wurde durch Zugabe von 2,5 ml der Mischung im sauren und 1,5 ml im basischen Bereich erzielt.

Parallelversuche mit der Fluorimetrie ergaben auch dort eine Nachweisverbesserung durch dieses Elutionsmittel um den Faktor 10 im Vergleich zum Verfahren mit Dimethylformamid.

## 2.2. Laufmittel

Um das dünnschichtchromatographische Verfahren in einem akzeptablen Zeitaufwand für Routineuntersuchungen zu halten, war es erforderlich, eine Laufmittelzusammensetzung zu finden, die zumindest die bislang in der Hydrogeologie eingesetzten Fluoreszenztracer in einem Entwicklungsgang trennt. Das Laufmittel sollte die Eigenschaft besitzen, die fünf Tracer in ausreichendem Abstand ( $R_f$ -Werte) mitzuschleppen und sie, möglichst in einer einzigen Fraktion, auf eine sehr kleine Fläche zu konzentrieren. Ferner schien es aus verfahrenstechnischen Gründen erforderlich, ein Laufmittel zu finden, das sowohl für die Entwicklung von DC-Platten mit aufgetragenen Wasserproben (Direktproben) als auch für aufgetragene Kohleeluate gleichermaßen geeignet ist.

Insgesamt wurden nochmals etwa 50 verschiedene Laufmittelkombinationen getestet, die im wesentlichen aus den organischen Substanzen Methanol, Ethanol, Butanol, Benzol, Essigsäureäthylester, Propanol-1, Propanol-2, Ameisensäure, Tetrachlorkohlenstoff, Chloroform sowie Salzsäure, Natronlauge, Wasser und Kochsalz zusammengesetzt waren. Dabei erwies sich die von H. BEHRENS et al. (1981) veröffentlichte Laufmittelzusammensetzung von Propanol-1/Essigsäureäthylester/Ammoniaklösung als am besten geeignet. Das Mischungsverhältnis wurde allerdings von 6/2/2 auf 30/25/13 geändert. Zusätzlich wurde dem Laufmittel (100 ml) eine Spatelspitze Kochsalz (NaCl) beigegeben.

Bei der erwähnten Laufmittelzusammensetzung ist der Anteil an Ammoniak von entscheidender Bedeutung. Bei zu großer oder zu geringer Ammoniakmenge ist der optimale Abstand einzelner Flecken nicht gegeben oder es treten Schlepsspuren auf. Bei zu hohem Anteil von Ammoniak im Laufmittel (> 20 ml) bleibt ein Teil der Fluoreszenzstoffe an der Startlinie zurück, wodurch eine Verringerung der Nachweisempfindlichkeit verursacht wird. Die als optimal beschriebene Laufmittelzusammensetzung bewirkt, daß die Fluoreszenzstoffe Uranin, Amidorhodamin, Rhodamin und eingeschränkt Tinopal nach der Entwicklung des Chromatogrammes jeweils auf einen eigenen Fleck konzentriert werden. Die Größe des Farbstoffflecks ist allerdings vom Typ der DC-Fertigplatte sehr stark abhängig (s. auch Kap. 2.3.).

Problematisch bleibt der Nachweis von Eosin. Es ist auch mit den unterschiedlichsten Laufmittelkombinationen nie gelungen, nach der Entwicklung des Chromatogrammes das in der Tracertechnik häufig verwendete Eosin FB (Colour-Index Nr. 45.380) auf einen Fleck zu konzentrieren. Eosin spaltet sich in der dünnschichtchromatographischen Entwicklung ständig in mindestens drei Fraktionen auf. Wie densitometrische Untersuchungen zeigten, besitzen die Fraktionen unterschiedliche Emissionsmaxima (bis 10 nm Unterschied). Aus dieser Beobachtung ist zu schließen, daß Eosin FB aus mindestens drei unterschiedlichen Molekülstrukturen mit leicht unterschiedlichen Fluoreszenzeigenschaften besteht. Ähnliche Beobachtungen wurden von J. ROCHAT et al. (1975) bei Rhodamin gemacht. Auch unsere Untersuchungen zeigten, daß Rhodamin bei bestimmten Laufmittelzusammensetzungen in bis zu sieben Fraktionen aufspaltet. Mit dem zuletzt verwendeten Laufmittel konnte jedoch eine Konzentrierung der Rhodaminfraktion auf einen einzigen Fleck der DC-Platte erreicht werden.

## 2.3. DC-Platten

Parallel zu den erwähnten Laufmitteltests wurden verschiedene handelsübliche Platten getestet. Dabei erwiesen sich die bei den vorangegangenen Untersuchungen

am häufigsten verwendeten DC-Fertigplatten Kieselgel 60 (20×20 cm) (mit und ohne Konzentrierungszone, MERCK, Darmstadt) als nicht optimal. Eine höhere Trennschärfe, bessere Konzentrierung sowie größere Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Platten gleichen Typs wurde mit den neu entwickelten HPTLC-Platten (20×10 cm, MERCK) erreicht (HPTLC = High Performance Thin Layer Chromatography). Bei gleicher Porenweite wie die herkömmlichen Kieselgel-60-Platten (Porenweite 6 nm, Werksangabe MERCK) ist die Korngröße der Beschichtung enger klassiert. Auch die Beschichtungsdicke von 0,25 mm (Werksangabe) scheint bei HPTLC-Platten homogener zu sein. Während bei den herkömmlichen Kieselgel-60-Platten unter Umständen ein unregelmäßiges Aufsteigen des Laufmittels durch ungleichmäßige Schichtdicke hervorgerufen wird, bildet die Laufmittelfront bei HPTLC-Platten stets eine gerade Linie.

Relativ gute Trennergebnisse konnten bereits über Kieselgel-60-Platten mit Konzentrierungszone erzielt werden. HPTLC-Platten mit Konzentrierungszone sind allerdings erst seit Mitte des Jahres 1982 erhältlich. Die am unteren Rand der jeweiligen Platte aufgebraute Konzentrierungszone ist etwa 0,15 mm dick und besteht aus synthetisch hergestelltem Siliciumdioxid mit einer Porenweite von ca. 5  $\mu$ . Durch das gleiche Bindemittel wie in der nach oben folgenden Kieselgelschicht erfährt das Laufmittel während des Durchgangs durch die Grenzlinie keinen besonderen Widerstand (Werksangabe MERCK). Die Konzentrierungszone bewirkt, daß die zu untersuchenden Substanzen während der Chromatogrammentwicklung bis zur Grenzlinie rasch aufsteigen und dort auf sehr geringem horizontalem Raum zusammenlaufen (Fig. 3). Von großem Vorteil der Konzentrierungszone ist, daß die Geometrie der einzelnen Flecken während des Auftragungsprozesses von geringerer Bedeutung ist.

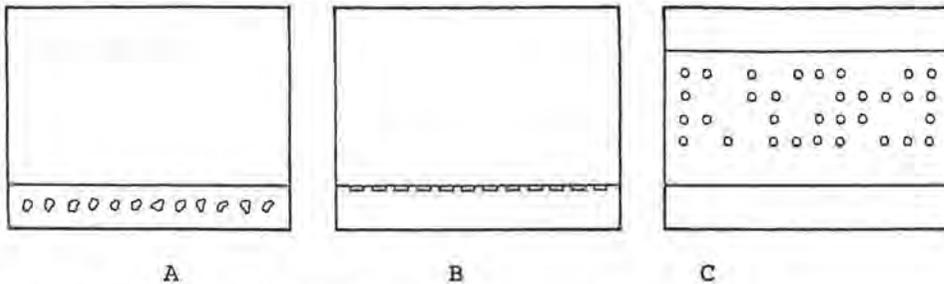


Fig. 3: Entwicklung eines Chromatogrammes.

A: Startflecken nach dem Auftragen der zu untersuchenden Substanzen.

B: Laufmittelfront an oberer Grenze der Konzentrierungszone.

C: Fertig entwickeltes Chromatogramm mit optimaler Trennung in verschiedene Fraktionen.

Im entwickelten Chromatogramm erscheinen die einzelnen Fluoreszenzstoffflecken bei HPTLC-Platten im Vergleich zu den herkömmlichen Kieselgel-60-Platten auf geringerer Fläche konzentriert. Während bei Kieselgel-60-Platten der entwickelte Farbstoffleck auf einer vertikalen Ausdehnung von im Durchschnitt 5 mm erscheint, sind die einzelnen Fraktionen bei HPTLC-Platten auf etwa 1 mm konzentriert. Die Breite der Flecken hängt bei beiden Plattentypen von der Größe des Startflecks ab.

## 2.4. Densitometrische Fluoreszenzmessung

Zur Auswertung der Chromatographie-Platten wurde das Chromatogrammspektralphotometer KM 3 der Firma ZEISS eingesetzt. Das Gerät erlaubt wahlweise

die Anregung über einen Monochromatorfilter mit fixen Wellenlängenbereichen oder über den regelbaren Prismenmonochromator MQ 3. Die Emissionswellenlänge muß je nach Geräteaufbau über Filter oder Prismenmonochromator registriert werden. Es erwies sich als günstiger, den Aufbau Filter-Probe-Monochromator für die Messungen zu wählen (Fig. 2).

Bei der Auswertung wird die DC-Platte beim ZEISS-Gerät auf einem in x-Richtung elektrisch angetriebenen Schlitten unter der feststehenden optischen Einheit bewegt. Die Größe der auf der Platte bestrahlten Meßfläche beträgt etwa  $3 \times 14$  mm. Durch das Format der in y-Richtung liegenden Meßfläche bedingt, muß beim Auftragen und Entwickeln von DC-Platten darauf geachtet werden, daß der Abstand einzelner Farbstoffflecken größer als 14 mm ist.

Während bei den herkömmlichen Kieselgel-60-Platten mit dem Format  $20 \times 20$  cm, unter der Voraussetzung eines ausreichenden Fleckabstandes, ein Abfahren in Querrichtung der Platte möglich ist (Erfassung der Flecke eines Tracers für sämtliche aufgetragene Proben einer Platte), ist dieses Verfahren aufgrund der geringeren Laufhöhe und damit geringerem Trennabstand bei HPTLC-Platten ( $20 \times 10$  cm) nicht anwendbar. Um den Arbeitsaufwand dennoch so gering wie möglich zu halten, wurde der Eichfleck des jeweils nachzuweisenden Fluoreszenzstoffes in x-Abfahrrichtung in den Bereich der Meßfläche gebracht. Die Begrenzungsanschlüsse des Schlittens wurden etwa 1–1,5 cm vor und hinter diesem Bereich fixiert. Nach Einschub des Anregungsfilters, Einstellen der farbstoffspezifischen Emissionswellenlänge und Wahl der entsprechenden Verstärkung konnten die Bereiche eines Tracers nacheinander für jeden Probenfleck abgefahren werden. Auf dem Schreiberpapier zeigt sich bei Vorhandensein des entsprechenden Tracers in der Mitte des Spektrogrammes der der Konzentration entsprechende Peak (Fig. 4).

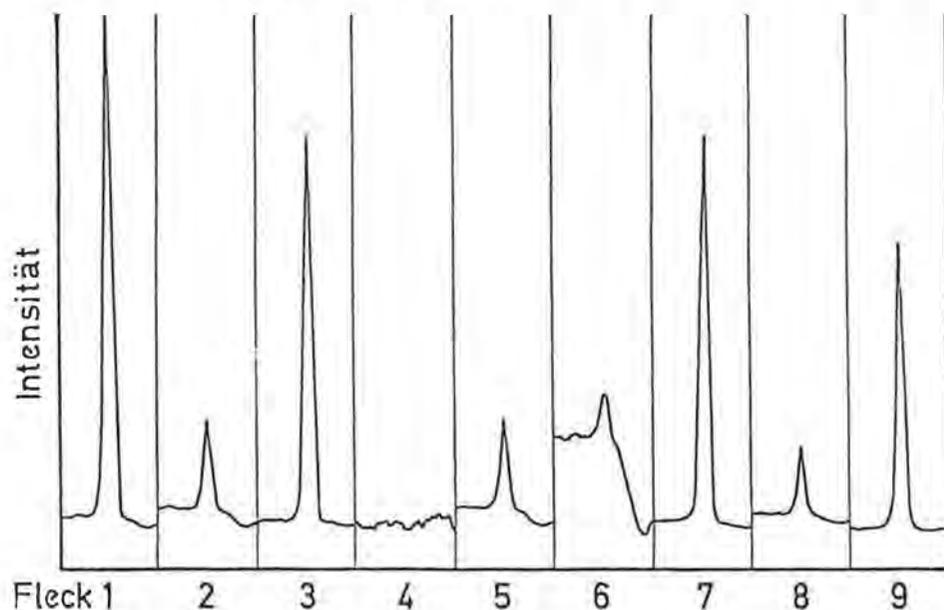


Fig. 4: Densitometrische Auswertung eines Chromatogrammes. Der nachzuweisende Fluoreszenzstoff erscheint, falls vorhanden, als Peak in der Mitte des jeweils abgefahrenen Bereichs.

Nach Beendigung der Meßreihe wurden die Begrenzungsanschlüsse gelöst und im Bereich des nächsten nachzuweisenden Farbstoffes fixiert. Die entsprechenden Geräteeinstellungen wurden für den nun zu untersuchenden Farbstoff geändert und das Verfahren wie beschrieben wiederholt.

Leider war die Beschaffung einer speziell auf HPTLC-Platten abgestimmten Mikrooptik für das KM 3 aus finanziellen Gründen nicht möglich. Die Mikrooptik erlaubt bei gleicher Lichtintensität die Auswertung der kleineren und damit konzentrierteren Flecken. Unter anderem könnte damit die Nachweisempfindlichkeit erhöht und der Auftragsabstand der Startflecke verringert werden. Letzteres erlaubt, die Zahl der mit einer Platte zu untersuchenden Proben deutlich zu erhöhen.

## 2.5. Getestete Fluoreszenzstoffe

Neben den bereits seit längerem zur Markierung unterirdischer Wässer eingesetzten Fluoreszenztracern Uranin, Eosin, Amidorhodamin, Rhodamin und Tinopal wurde im Rahmen der dünn-schichtchromatographischen Untersuchungsreihen versucht, weitere Fluoreszenz- bzw. Farbstoffe auf ihre mögliche Eignung als zusätzliche Markierungsstoffe zu testen, darunter:

Erythrosin	MERCK	C. I. Nr. 45.430
Eosin Methylen	violett	ICN Pharmaceuticals
Methylgrün	SERVA	C. I. Nr. 42.585
Acridinorange	SERVA	C. I. Nr. 46.005

Bei der verwendeten Laufmittelzusammensetzung ist lediglich das Erythrosin als alternativer Tracer zum Nachweis mit der DC-Methode geeignet. Sämtliche anderen getesteten Farbstoffe konnten nicht auf einen oder wenige Flecke nach Entwicklung der Chromatogramme konzentriert werden. Bei gleichzeitiger Anwesenheit von Rhodamin konnte Erythrosin dünn-schichtchromatographisch nicht getrennt werden, da beide Stoffe gleiche  $R_f$ -Werte aufweisen.

Trotz Verbesserung der dünn-schichtchromatographischen Nachweistchnik konnte für die Eluatproben die Nachweisempfindlichkeit der Fluorimetrie nicht immer erreicht werden. Bedingt durch das Aufspalten in drei Fraktionen besitzt das Eosin die schlechteste Nachweisempfindlichkeit. Mit HPTLC-Platten mit Konzentrierungszone wurden folgende Ergebnisse erzielt:

Uranin	$10^{-11}$
Eosin	$10^{-7}$
Amidorhodamin	$10^{-9}$
Rhodamin	$10^{-13}$
Tinopal CBS-X	$10^{-11}$
Erythrosin	$10^{-9}$

Sämtliche getesteten Farbstoffe wurden 10fach konzentriert auf den Startfleck der Platte aufgegeben ( $10 \times 2 \mu\text{l}$ ).

## 3. Arbeitsschema für die Probenuntersuchung

### 3.1. Geräte und Chemikalien

DC- oder HPTLC-Fertigplatten (Beschichtung Kieselgel 60 mit Konzentrierungszone); Mikroliterpipette 2  $\mu\text{l}$ , Meßpipette 5 ml und 10 ml mit Unterteilung; Reagenzröhrchen ( $\varnothing$  16 mm, Länge 100 mm) mit Griffbandstopfen.

DC-Trennkammer, Trockengestell für DC-Platten, Warmluftgebläse, Densitometer (Chromatogramm-Spektralphotometer) mit Kompensationsschreiber.

2-Propanol, Salzsäure 0,1 mol/l, Natronlauge 1 mol/l, Propanol-(1), Essigsäureäthylester, Ammoniaklösung min 25%, Natriumchlorid krist.

### 3.2. Elution der Aktivkohleproben

- Reagenzgläser in Gestellen vorbereiten, jeweils 11 Proben und 1 Eichprobe pro Platte;
- Abfüllen der getrockneten und im Dunkeln aufbewahrten Probe auf je ein Reagenzglas der beiden Probensätze „basisch“ und „sauer“ (getrennte Reagenzglasgestelle); einheitliche Probenmenge, z. B. 1 g ( $\sim$  1 cm Füllhöhe im Reagenzglas), Beschriftung;
- Abfüllen der Eichprobe (= Aktivkohle, die in definierte Fluoreszenzgemische eingesetzt war);
- Basische Elution: Zugabe von je 1 ml 2-Propanol und 0,5 ml NaOH (1 mol/l) (nur Reagenzgläser des basischen Probensatzes), verschließen und gut schütteln, nach 15 Minuten nochmals schütteln;
- Saure Elution: Zugabe von je 2 ml 2-Propanol und 0,5 ml HCl (0,1 mol/l) (nur saurer Probensatz), verschließen und gut schütteln, nach 15 Minuten nochmals schütteln.

### 3.3. Ansetzen der DC-Platten und Entwickeln der Chromatogramme

- Vorbereitung der Trägerplatte: Platten- und Probenkennzeichnung, Startpunktmarkierung;
- Vorbereitung der Proben: Reagenzglasgestell mit Probensatz (11+1) neben der Platte aufstellen;
- Vorbereitung der Trennkammer: Ansetzen des Laufmittels (30 ml Propanol-(1), 25 ml Essigsäureäthylester, 13 ml Ammoniaklösung 25%, 1 Spatelspitze Natriumchlorid krist.), zur Durchmischung gut umschwenken und abdecken;
- Auftragen von 2  $\mu$ l Eluat je Probe auf markierte Startpunkte der DC-Platte, für jede Probe eigene Pipette bzw. Pipettenspitze verwenden; nach Trocknen der Flecken kann Aufgabe bis zu 10mal (Gesamtaufgabemenge je Probe 20  $\mu$ l) je nach zu erwartender Konzentration wiederholt werden;
- vorbereitete Trägerplatte senkrecht in Trennkammer stellen, so daß ca. 0,5 cm der Höhe der Konzentrierungszone einheitlich benetzt wird; nach 20–30 Minuten, wenn Laufmittelfront ca. 2 cm unterhalb des oberen Randes der Trägerplatte ist, Platten aus Trennkammer entnehmen;
- Platten ohne Berührung der benetzten Fläche mit Warmluftgebläse (unter Abzug) trocknen; falls Auswertung der Chromatogramme nicht unmittelbar im Anschluß erfolgt, Platten im Dunkeln aufbewahren.

### 3.4. Messung und Auswertung der Chromatogramme

- Aufbau und Einstellung des Densitometers (gerätespezifisch, jeweilige Gebrauchsanweisungen beachten, einheitliches Meßablaufschaema erarbeiten);
- Spektralfluorimetrische Aufnahme des Chromatogrammes: getrennt nach einzelnen Fluoreszenzstoffen, ausgehend von Lage des betreffenden Eichfleckes; für die einzelnen Fluoreszenzstoffe jeweilige optimale Geräteeinstellungen benutzen;

- Auswertung der Fluoreszenzintensitäten über Peakhöhen, Peakflächenintegration und Vergleich mit Eichlösungen; Auswertungen der einzelnen Fluoreszenzstoffe je nach pH-Charakteristik aus sauren oder basischen Eluaten.

## Zusammenfassung

Die dünn-schicht-chromatographische Methode in Zusammenhang mit der densitometrischen Fluoreszenzbestimmung konnte mit Erfolg auch für den Nachweis von Fluoreszenztracern in Eluaten aus Aktivkohleproben ausgebaut werden. Gegenüber dem bisherigen Verfahrensgang waren verschiedene Änderungen und Verbesserungen sowohl hinsichtlich der Dünn-schicht-Chromatographie als auch bei der Elution der Aktivkohle erforderlich. Es konnte ein neues Elutionsverfahren entwickelt werden, das selbst bei der rein fluorimetrischen Messung eine um den Faktor 10 höhere Nachweismempfindlichkeit mit sich bringt.

Die dünn-schicht-chromatographische Nachweismethode ist zwar gegenüber der Fluorimetrie etwas zeit- und arbeitsaufwendiger, wird aber mit Vorteil dort eingesetzt, wo es gilt, verschiedene Fluoreszenzstoffe, insbesondere Gemische von Uranin/Eosin und Eosin/Amidorhodamin, in einer Probe nachzuweisen.

## Literatur

- ACKERMANN, G., F. P. BUB & H. HÖTZL (1982): Erfahrungen mit der Dünn-schicht-Chromatographie beim Nachweis von Fluoreszenztracern. - In: LEIBUNDGUT, Ch. & R. WEINGARTNER (Red.): Tracermethoden in der Hydrologie. Tagungsbericht des 4. SUWT. Beiträge zur Geologie der Schweiz - Hydrologie, 28, 1, 63-68, Bern.
- BAUER, F. (1967): Erfahrungen beim Uraninnachweis mit Aktivkohle. - Steir. Beitr. z. Hydrogeologie, 18/19, 169-178, Graz.
- BAUER, F. (1972): Weitere Erfahrungen beim Uraninnachweis mit Aktivkohle. - Geolog. Jb., C 2, 19-27, Hannover.
- BEHRENS, H. (1973): Eine verbesserte Nachweismethode für Fluoreszenzindikatoren und ihre Anwendung zur Feststellung von Fließwegen im Grundwasser. - Z. Deutsch. Geolog. Ges., 124, 535-544, Hannover.
- BEHRENS, H., H. HÖTZL & V. MAURIN (1981): Die Markierung mit Fluoreszenztracern, Nachweismethoden und Ergebnisse. - In: BÖGLI, A. & T. HARUM (Schriftl.): Hydrogeologische Untersuchungen im Karst des hinteren Muotatales (Schweiz). Steir. Beitr. z. Hydrogeologie, 33, 198-220, Graz.
- BUB, F. P., H. HÖTZL & K. WISSER (1979): Dünn-schicht-chromatographischer Nachweis von Fluoreszenztracern bei hydrogeologischen Markierungsversuchen. - Steir. Beitr. z. Hydrogeologie, 31, 129-141, Graz.
- BUB, F. P. & H. HÖTZL (1980): Ergebnisse der dünn-schicht-chromatographischen Auswertung von Direktproben. - In: MÜLLER, I. & J. G. ZÖTL (Schriftl.): Karsthydrologische Untersuchungen mit natürlichen und künstlichen Tracern im Neuenburger Jura (Schweiz). Steir. Beitr. z. Hydrogeologie, 32, 65-70, Graz.
- PERLEGA, W. (1976): Der Nachweis von Fluoreszenzfarbstoffen mittels Aktivkohle. - Papers 3. SUWT, 195-201, Ljubljana.
- ROCHAT, J., J. ALARY, J. MOLINARI & R. CUARRIERRE (1975): Séparations physico-chimiques de colorants xanténiques utilisés comme traceurs. - J. Hydrology, 26, 277-293, Amsterdam.

## Summary

Thinlayer chromatography together with densitometric fluorescence determination was successfully developed as a new method for analysis of fluorescence tracers in eluates of charcoal samples. The proceeding used till now proved to be unreliable in getting unequivocal results. In comparison with the old technique the new procedure includes several changes and improvements as to thinlayer chromatography as well as to elution procedure. There could be found a new elution technique, which shows even in the normal fluorimetric analysis a ten times higher detectibility.

The thinlayer chromatographic analysis needs more time and expenses than the fluorimetric method but it can be used with advantage where different fluorescence tracers with similar spectroscopic properties, especially mixtures of uranin and eosin as well as eosin and amidorhodamin, are present in one sample.

## Dank

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für die Gewährung einer Sachbeihilfe (Ma 688/4-2), in deren Rahmen diese Untersuchungen durchgeführt werden konnten. Fräulein cand. geol. B. Reichert sind wir für die Mitarbeit bei den Laboruntersuchungen zu Dank verpflichtet.

Anschrift der Autoren: Dipl.-Geol. G. ACKERMANN und Prof. Dr. H. HÖTZL, Lehrstuhl für Angewandte Geologie der Universität, Kaiserstraße 12, D-7500 Karlsruhe.