



Universität Potsdam

Fritz Hartmann Frimmel, Michael U. Kumke

Optische Parameter zur Stoffcharakterisierung vom Trinkwasser bis zum Abwasser

first published in:

Der spektrale Absorptionskoeffizient zur Bestimmung der organischen
Abwasserbelastung / Hrsg. N. Matsché. - Wien : Techn. Univ., Inst. für
Wassergüte und Abfallwirtschaft, 1999. S. 1 - 24.

(Wiener Mitteilungen ; Bd. 156)

ISBN 3-85234-047-0

Postprint published at the institutional repository of Potsdam University:

In: Postprints der Universität Potsdam :

Mathematisch-Naturwissenschaftliche Reihe ; 25

Postprints der Universität Potsdam

Mathematisch-Naturwissenschaftliche Reihe ; 25

Optische Parameter zur Stoffcharakterisierung vom Trinkwasser bis zum Abwasser

F.H. Frimmel und M.U. Kumke

Engler-Bunte-Institut, Bereich Wasserchemie, TH Karlsruhe

Kurzfassung: Die Anwendung von optischen Parametern zur Stoffcharakterisierung wird diskutiert. Dabei ist der Schwerpunkt der Diskussion auf absorptions- und fluoreszenzspektroskopische Methoden gesetzt. Beide Methoden können schnell und zuverlässig – auch im on-line Betrieb – eingesetzt werden. Der Beitrag soll einen Überblick über die grundlegenden Möglichkeiten der Anwendung beider Methoden geben.

Keywords: Absorptionsspektroskopie, SAK, Fluoreszenzspektroskopie, Summenparameter, Huminstoffe, polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe,

1 Einleitung

Zur Beurteilung der Gewässerqualität und Trinkwasseraufbereitung im Rahmen eines fortlaufenden Optimierungsprozesses werden vielfach summarische Parameter wie z.B. der gelöste organische Kohlenstoff (DOC), der chemische Sauerstoffbedarf (CSB) oder auch die Menge der an Aktivkohle sorbierbaren organischen Halogenide (AOX) herangezogen [1]. Für eine kontinuierliche Messung ohne aufwendige Vorbehandlung der Proben sind besonders die spektralen Eigenschaften von Wasserproben geeignet.

Im Bereich der Abwasserreinigung und der Trinkwasserüberwachung sind Methodenansätze, die eine schnelle aber zuverlässige, ohne aufwendige Probenaufbereitung durchführbare Analytik bereitstellen besonders attraktiv [2]. Die Absorptionsspektroskopie im ultravioletten und sichtbaren Bereich (UV/Vis) in Form eines spektralen Absorptionskoeffizienten SAK, und die

Fluoreszenzspektroskopie erfüllen diese Bedingungen in besonderem Maße. Diese spektroskopischen Techniken können besonders für spezielle Problemstellungen leicht angepaßt und optimiert werden. Unter den Stoffgruppen, für deren Analytik sich UV/Vis- und Fluoreszenzspektroskopie besonders eignen, sind die polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe (PAK) hervorzuheben [3]. Diese Substanzgruppe ist ubiquitär präsent. Sie entsteht bei unvollständigen Verbrennungsprozessen, die in der Neuzeit vorallem auf einen anthropogenen Ursprung zurückgeführt werden können. PAK sind in allen Umweltkompartimenten zu finden und aufgrund ihrer zum Teil extremen Karzinogenität ist ein zuverlässiges Monitoring besonders in Lebensmitteln wie Trinkwasser unerläßlich [4].

2 Grundlagen

Absorption (optischer und sichtbarer Bereich); Lambert-Beersches Gesetz

Im sichtbaren und ultravioletten Spektralbereich können die Elektronensysteme vieler organischer Moleküle durch Wechselwirkung mit der elektromagnetischen Strahlung diese absorbieren. Voraussetzung dafür ist, daß die Moleküle π -Elektronen oder, bei Anwesenheit von Heteroatomen, nicht-bindende Elektronenpaare besitzen. Bei der Lichtabsorption werden dann Elektronen aus dem Grundzustand in einen angeregten Zustand überführt ($\pi-\pi^*$ oder $n-\pi^*$ -Übergänge). Der Spektralbereich, in dem die Übergänge stattfinden, ist stoffspezifisch und kann quantitativ durch das Lambert-Beersche Gesetz beschrieben werden (Gleichung 1) [5]:

$$E_{\lambda} = \log \frac{I_{0,\lambda}}{I_{\lambda}} = \varepsilon_{\lambda} \cdot c \cdot d \quad (1)$$

In Gleichung 1 bedeuten E = Extinktion bei der Wellenlänge λ , I_0 bzw. I die Lichtintensität vor bzw. nach Probendurchgang bei der Wellenlänge λ , ε entspricht dem dekadischen Extinktionskoeffizientem bei λ , c der Konzentration der Probe und d der optischen Weglänge. In Stoffgemischen können mehrere Einzelstoffe zur Absorption der Probe bei einer Wellenlänge beitragen. Die Einzelbeiträge addieren sich zur beobachteten Gesamtabsorption. Durch Messung bei verschiedenen

Wellenlängen, bei denen möglichst nicht alle und im optimalen Fall nur eine Komponente die elektromagnetische Strahlung absorbiert, können auch die Konzentrationen der Einzelstoffe bestimmt werden.

Fluoreszenz (statische und zeitaufgelöste Messung); Stern-Volmer-Gleichung

Nach erfolgter Absorption eines Photons befindet sich ein Molekül in einem elektronisch-angeregten Zustand. Die Desaktivierung kann sowohl strahlungslos als auch strahlend durch Emission eines Lichtquants erfolgen. Hierbei werden strahlende Prozesse, die spin-erlaubt sind, als Fluoreszenz und Prozesse, die spin-verboten sind, als Phosphoreszenz bezeichnet [6].

Grundsätzlich sind stationäre von zeitaufgelösten Fluoreszenzmethoden zu unterscheiden, die jeweils noch durch den Einsatz von Polarisatoren zur Messung der stationären und zeitaufgelösten Fluoreszenzanisotropie erweitert werden können.

Bei stationären Fluoreszenzmessungen wird eine kontinuierliche Lichtquelle (*engl.: continuous wave, cw* Lichtquelle) zur Anregung der Probe verwendet. Standard-Fluoreszenzspektren werden bei konstanter Anregungswellenlänge λ_{ex} , Anregungsspektren bei konstanter Emissionswellenlänge λ_{em} und Variation von λ_{ex} aufgezeichnet. Gewöhnlich wird die Fluoreszenzemission in einem 90°-Winkel zur Achse des Anregungslichts registriert, um den Einfluß von Streulicht zu minimieren. Die Fluoreszenz selbst ist isotrop und damit winkelunabhängig. In einem Fluoreszenzspektrum ist gewöhnlich die Fluoreszenzintensität I_F als Funktion der Emissionswellenlänge dargestellt. I_F ist eine Funktion der Konzentration sowie substanz- und apparatespezifischer Größen:

$$I_F = I_0 \cdot c \cdot \Omega \cdot \Psi \quad (2)$$

In Ω sind substanzspezifische Größen wie die Fluoreszenzquantenausbeute Φ_F und der Extinktionskoeffizient ε_λ enthalten, während Ψ apparatespezifische Parameter wie z.B. die Wellenlängenabhängigkeit des Anregungs- und Emissionstrahlenganges berücksichtigt. Aus Gleichung 2 ist ersichtlich, daß die Fluoreszenzintensität I_F proportional zur Anregungslichtintensität I_0 ist, woraus die

durch den Einsatz von Lasern als Anregungslichtquelle erreichbare Steigerung in der Nachweisempfindlichkeit verständlich wird.

In Gegensatz dazu werden bei zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen gepulste (Verwendung von z.B. Gasblitzlampen, gepulsten Lasern) oder im MHz-Bereich (bis in den GHz-Bereich hinein) modulierte Lichtquellen (z.B. *cw* Laser) zur Anregung verwendet. In den Experimenten werden die Fluoreszenzabklingprozesse entweder direkt oder in Form von phasenmodulierten Daten aufgezeichnet. In Bild 1 ist ein Schema für einen Standardaufbau zur Messung von Fluoreszenzabklingvorgängen mittels zeitkorrelierter Einzelphotonenzählung dargestellt.

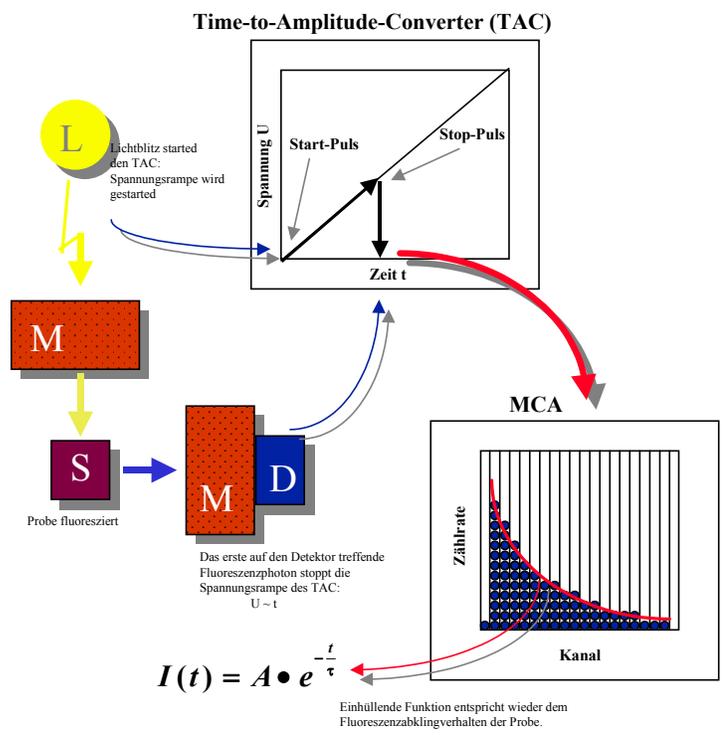


Bild 1: Schema der zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung zur Messung von Fluoreszenzabklingzeiten

Durch den Einsatz von ultra-kurzen Laserpulsen (im fs Bereich) können auf diese Art molekulare Prozesse, die auf einer fs-Zeitskala stattfinden, beobachtet werden.

Im allgemeinen werden Fluoreszenzabklingprozesse durch eine Kinetik 1.Ordnung beschrieben. Nach erfolgter Anregung der Probe befinden sich N^* Moleküle im angeregten Zustand. Die Fluoreszenzintensität I_F ist proportional zu N^* . Damit folgt für die Zeitabhängigkeit von I_F nach erfolgter Deltapulsanregung der in Gleichung 3 beschriebene Zusammenhang mit τ_F der Fluoreszenzlebenszeit der Probenmoleküle.

$$I_F = I_F^{t=0} \cdot e^{-\frac{t}{\tau_F}} \quad (3)$$

Interaktionen mit dem umgebenden Lösemittel bzw. mit anwesenden weiteren Stoffen können sowohl die Fluoreszenzintensität I_F als auch die Fluoreszenzlebenszeit τ_F beeinflussen. Im Falle einer Verringerung von I_F bzw. einer Verkürzung von τ_F wird von einer Fluoreszenzlöschung (engl. *quenching*) gesprochen. Zwei grundsätzlich verschiedene Mechanismen der Fluoreszenzlöschung sind dabei zu unterscheiden: statischer von dynamischer Fluoreszenzlöschung. Bei der statischen Fluoreszenzlöschung handelt es sich im einfachsten Falle um eine Reaktion zwischen Probe und Löscher im elektronischen Grundzustand (z.B. eine definierte Komplexbildung), bei der die Fluoreszenzenquantenausbeute der beteiligten Probenmoleküle verringert wird oder auf Null sinkt. Dies führt insgesamt zu einer Abnahme von I_F . Wichtig hierbei ist, daß das Fluoreszenzabklingverhalten der übrigen Probenmoleküle unbeeinflusst bleibt und somit τ_F nicht verändert wird. Im Gegensatz dazu führt ein dynamischer Löschemechanismus zu einer Abnahme von I_F **und** τ_F . Als Mechanismen sind dabei Kollisionen von Probenmolekül und Löscher oder Energieübertragungsprozesse denkbar.

Die Bestimmung von Wechselwirkungskonstanten zwischen organischen und anorganischen Xenobiotika kann durch Anwendung der Fluoreszenzlöschung mit anschließender Stern-Volmer-Analyse der Daten durchgeführt werden. Unter der Annahme, daß es sich bei der Wechselwirkung um einen Grundzustandskomplex handelt, der nicht fluoreszenzfähig ist oder eine von der unkomplexierten Probe grundverschiedene Fluoreszenz besitzt, können stationäre Fluoreszenzdaten nach Gleichung 4 (Stern-Volmer-Gleichung) berechnet werden [7]:

$$\frac{I_F^0}{I_F} = 1 + K_{SV} \cdot [Q] \quad (4)$$

In Gleichung 4 beschreiben I_F^0 und I_F die Fluoreszenzintensität in Ab- und Anwesenheit des Löschers Q, $[Q]$ die Konzentration des Löschers und K_{SV} die Wechselwirkungskonstante der Reaktion zwischen Q und fluoreszierender Probe.

3 Experimentelle Angaben

Die Isolierung der Huminstoffe erfolgte in Anlehnung an das Standardverfahren der International Humic Substances Society (IHSS). Gewinnung und Ursprung sind von Abbt-Braun et al. ausführlich beschrieben [8]. Die Lösungen der Huminstoffe wurden über 0.45 μm Cellulosenitrat-Filter filtriert. Die Reinheit der polyzyklischen Kohlenwasserstoffe (PAK) war >99%. Das Gemisch der 16 PAK wurde als Referenzmaterial von der Environmental Protection Agency (EPA) bezogen und für die Messung mit Methanol auf 1/100 verdünnt. Die wäßrigen Proben wurden mit MilliQ Wasser hergestellt.

Die Messung der UV/Vis-Spektren erfolgte in 1 cm und bei sehr verdünnten Proben in 5 cm Quarzküvetten. Als Geräte wurden Spektrometer der Firmen Milton-Roy (Spectronic 1201) und Perkin Elmer (Zwei-Strahl-UV/Vis Spektrometer Lambda 5) eingesetzt.

Die Bestimmung des gelösten organischen Kohlenstoffs (*dissolved organic carbon*, DOC) erfolgte mit einem Kohlenstoff-Analysator (*Carbon Analyzer*, Dohrmann) und wurde im einzelnen beschrieben [2].

Die stationären Fluoreszenzmessungen wurden mit einem FS900 Spektrofluorimeter (Edinburgh Analytical Instruments) im Single-Photon-Counting Modus durchgeführt. Die spektrale Bandbreite der Messungen betrug 1.8 nm im Anregungs- und Emissionstrahlengang. Als Anregungslichtquelle diente eine 450 W Xenonhochdrucklampe. Die zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen wurden mit einem FL900CDT Spektrofluorimeter (Edinburgh Analytical Instruments) ebenfalls im Single-Photon-Counting Modus durchgeführt. Zur Anregung wurde

eine N₂/H₂-befüllte Gasblitzlampe verwendet. Der experimentelle Aufbau ist detailliert von Kumke et al. beschrieben [9].

4 Diskussion

UV/Vis-Absorptionsmessung

Natürliche organische Wasserinhaltsstoffe und viele anthropogene Belastungen in Gewässern besitzen π - und n-Elektronen, so daß diese Stoffe durch UV/Vis-Messungen detektiert werden können. Ausnahmen stellen z.B. Alkane oder Zucker dar, die im UV- und sichtbaren Spektralbereich keine Absorption zeigen.

Die Bestimmung von Absorptionsparametern wie z.B. dem SAK ist apparativ wenig aufwendig. Wie Korrelationen von SAK-Werten und den entsprechenden DOC-Werten zeigten, besteht in vielen Fällen ein direkter Zusammenhang beider Größen, so daß es in Einzelfällen durchaus möglich ist, die aufwendigeren DOC-Messungen durch SAK-Messungen zu ersetzen [2]. Auch für verschiedene Gewässertypen wurde eine Korrelation zwischen SAK und DOC-Konzentration gefunden. In Bild 2 sind SAK-Daten (bei $\lambda = 254$ nm) mit den DOC-Konzentrationen für verschiedene Originalwässer bzw. deren Huminstofffraktionen korreliert.

Wird der SAK auf die DOC-Konzentration normiert, so wird ein spezifischer SAK erhalten, der einen Vergleich verschiedener Gewässertypen ermöglicht. Dieser Vorteil führte auch im internationalen Wasserfach zur Einführung des SUVA-Parameters (*engl.: specific UV absorbance*). Allerdings ist bei der Anwendung des SAK, z.B. für die Charakterisierung unterschiedlicher Gewässertypen der Einfluß weiterer Einflußgrößen (z.B. der Temperatur, der Wasserhärte oder des pH-Wertes) zu berücksichtigen. So zeigt der SAK bei pH-Werterniedrigung < 4 eine Abnahme, die u.a. auf Abnahme der Löslichkeit eines Teils der natürlichen organischen Matrix zurückgeführt werden kann [2].

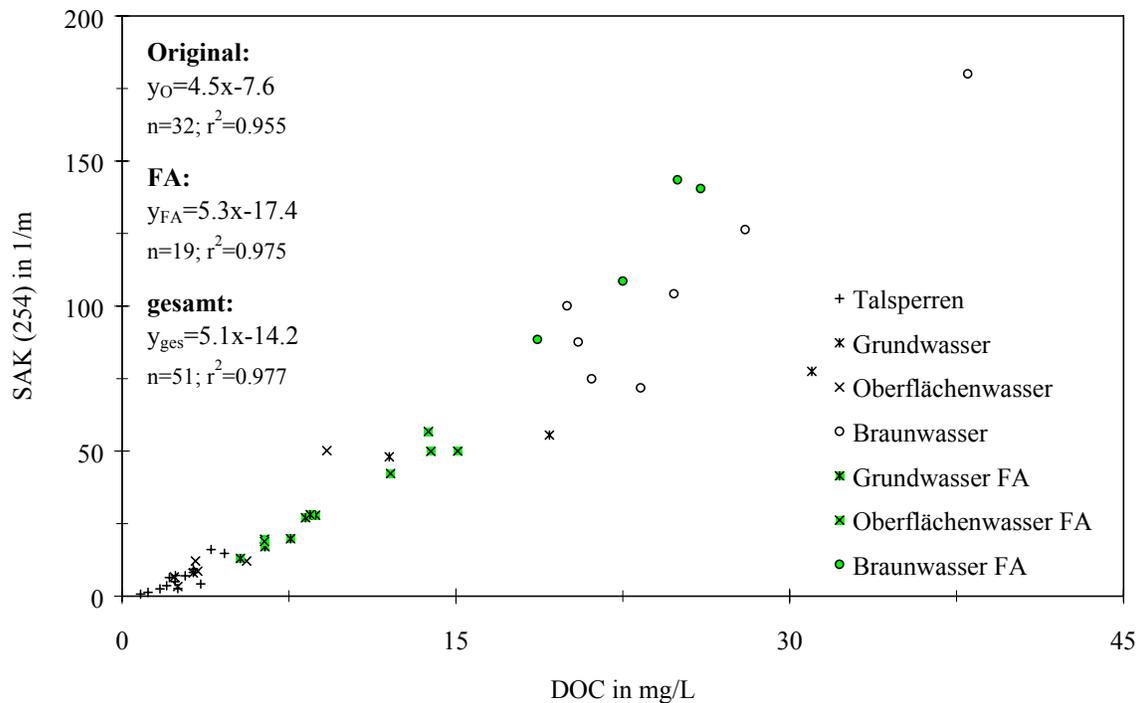


Bild 2: Korrelation zwischen SAK (bei $\lambda = 254 \text{ nm}$) und DOC-Konzentration in Originalwässern und in Lösungen der daraus isolierten Huminstoffe (Fulvinsäure-Fraktion).

Im oberen pH-Wertbereich (> 6) ist gewöhnlich eine leichte Zunahme zu beobachten, was auf die Beteiligung von funktionellen Gruppen am chromophoren System hindeutet. Die Anwesenheit von mehrwertigen Metallionen, wie z.B. Ca^{2+} oder Mg^{2+} , die für die Wasserhärte ausschlaggebend sind, kommt es zur Bildung von Humat-Komplexen. Diese führt zu einer zunehmenden Trübung der Lösung und schließlich zu Fällung.

Auch für die Analyse von Xenobiotika können UV/Vis-Absorptionsmessungen einfach angewendet werden. Bei Bekanntheit der jeweiligen Xenobiotika kann diese Analyse auch quantitativ durchgeführt werden. In Bild 3 ist dies am Beispiel von Propanol-Extrakten einer Gaswerks-Altlast gezeigt. Dargestellt sind die SAK-Werte bei $\lambda = 254 \text{ nm}$ und $\lambda = 340 \text{ nm}$ als Funktion der Gesamtkonzentration PAK (in mg / kg Boden), die mittels GC/MS-Analytik bestimmt wurde [10].

Die gefundene Korrelation zwischen SAK und Gesamtgehalt an PAK im Boden ist für beide Wellenlängen ordentlich, so daß für eine Sanierung vor Ort (z.B. zur Eingrenzung des Kontaminationsbereichs oder auch zur Kontrolle eventueller Gefährdungen des Grundwasserleiters) die schnellere und auch viel kostengünstigere UV/Vis-Absorptionsmessung eingesetzt werden kann [11].

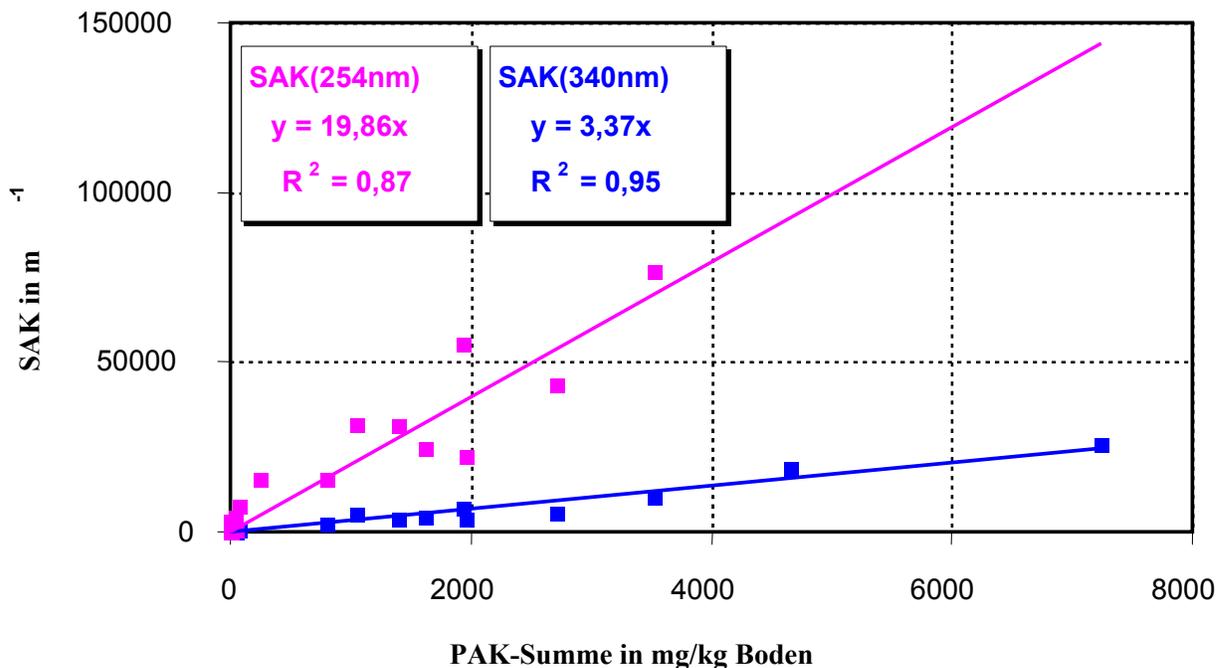


Bild 3: SAK-Messung von Propanol-Extrakten eines Gaswerksbodens. Dargestellt ist die Korrelation zwischen Gesamtgehalt an PAK und SAK bei zwei Absorptionswellenlängen.

Informationsgehalt der Meßgröße Fluoreszenz

Neben den aus UV/Vis-Absorptionsmessungen gewonnenen Daten kann auch die Fluoreszenz als weiterer optischer Parameter zur spektroskopischen Charakterisierung von Trink- und Abwässern eingesetzt werden. Der Informationsgewinn, der durch Fluoreszenzmessungen erreichbar ist, kann enorm groß sein, da die Methodik mit **fünf** unabhängigen Meßparametern

multidimensionalen Charakter hat, der einzigartig ist und sonst nur durch die Kombination von Separationstechniken und Detektionsmethoden (z.B. spektrale Absorption, Massenspektrometrie oder elektrische Leitfähigkeit) erreicht werden kann. Dies hebt die Fluoreszenzspektroskopie von den meisten anderen analytischen Methoden ab, da diese erst durch Kopplung mit chromatographischen Trennmethode einen vergleichbaren Grad an Selektivität erreichen können. Diese hervorragende Selektivität der Fluoreszenzspektroskopie wird durch die (unabhängigen) experimentellen Parameter Anregungswellenlänge λ_{ex} , Emissionswellenlänge λ_{em} , Fluoreszenzlebenszeit τ_f , Anisotropie (stationär und zeitaufgelöst) und bei synchronen Messungen durch die Wellenlängendifferenz $\Delta\lambda$ zwischen λ_{ex} und λ_{em} erreicht. Aus Fluoreszenzdaten können Informationen über die Konzentration von Verbindungen, Molekülstruktur, molekulare Umgebung (z.B. Polarität) oder die Molekülgröße gewonnen werden. Für organische Moleküle und die Metallkomplexe wird die Fluoreszenzemission gewöhnlich im Wellenlängenbereich zwischen UV und nahem Infra Rot (IR) gefunden. Mit Standardspektrometern können Nachweisgrenzen von ca. 10^{-10} mol/L problemlos erreicht werden. Damit ist die Fluoreszenzmessung z.B. gegenüber Absorptionsmessungen um einen Faktor von ca. 1000 empfindlicher. (Dies liegt u.a. darin begründet, daß bei Absorptionsmessungen immer der Quotient zweier Zahlen gebildet wird, die bei kleinen Konzentrationen sehr ähnlich sind, wodurch die Unsicherheit der Messung starke Auswirkungen hat, während bei der Fluoreszenzmessung eine Intensität direkt gemessen wird; siehe auch Gleichungen 1 und 2). In high-end Geräten wird z.B. durch den Einsatz von Lasern als Anregungslichtquelle und von hochempfindlichen Detektoren für bestimmte Anwendungen, wie z.B. bei der Sequenzierung von DNA, der Nachweis von Einzelmolekülen geschafft.

Schon das einfache Fluoreszenzemissionsspektrum kann Aussagen über die (elektronische) Struktur des untersuchten Moleküls bzw. dessen molekularer Umgebung liefern. Eines der wohl prominentesten Moleküle zur Untersuchung molekularer Umgebungen (z.B. in Micellen oder Membranen) sind Derivate des Pyrens. In Bild 4 sind die Fluoreszenzspektren von Pyren in Ethanol und in Hexan dargestellt. Die relativen Intensitäten der Fluoreszenzbanden hängen offensichtlich stark von der Polarität des umgebenden Mediums ab (sogenannter HAM-Effekt).

Pyren wird daher oft als Fluoreszenzsonde zur Untersuchung von Mikroumgebungen z.B. in micellaren Systemen oder Membranen eingesetzt.

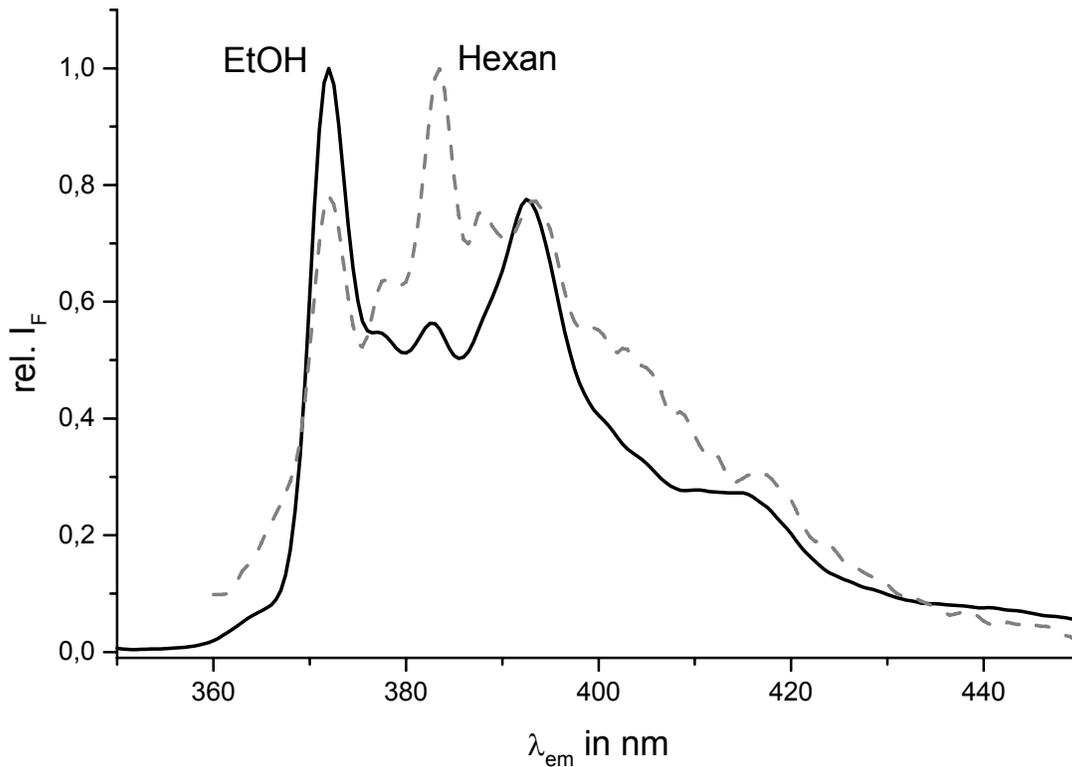


Bild 4: Fluoreszenzspektren von Pyren in Ethanol und in Hexan ($\lambda_{ex} = 335$ nm, $c = 10^{-6}$ mol/L)

Inner-Filter-Effekt und Fluoreszenzlöschung

Einschränkungen erfährt die Anwendung der Fluoreszenzspektroskopie durch eventuelle unerwünschte Fluoreszenzlöschprozesse, in farbigen Matrizen durch das Auftreten von Filtereffekten 1. und 2. Ordnung, durch Photoinstabilität von Proben und nicht zu letzt durch die Tatsache, daß nur *fluoreszierende* Moleküle direkt beobachtet werden können. Diese Einschränkungen können aber durch geeignete Anpassung des Meßsystems an die Fragestellung abgemindert werden oder, wie im Falle der Fluoreszenzlöschung gewinnbringend eingesetzt werden. Im folgenden werden die Effekte im einzelnen genauer diskutiert.

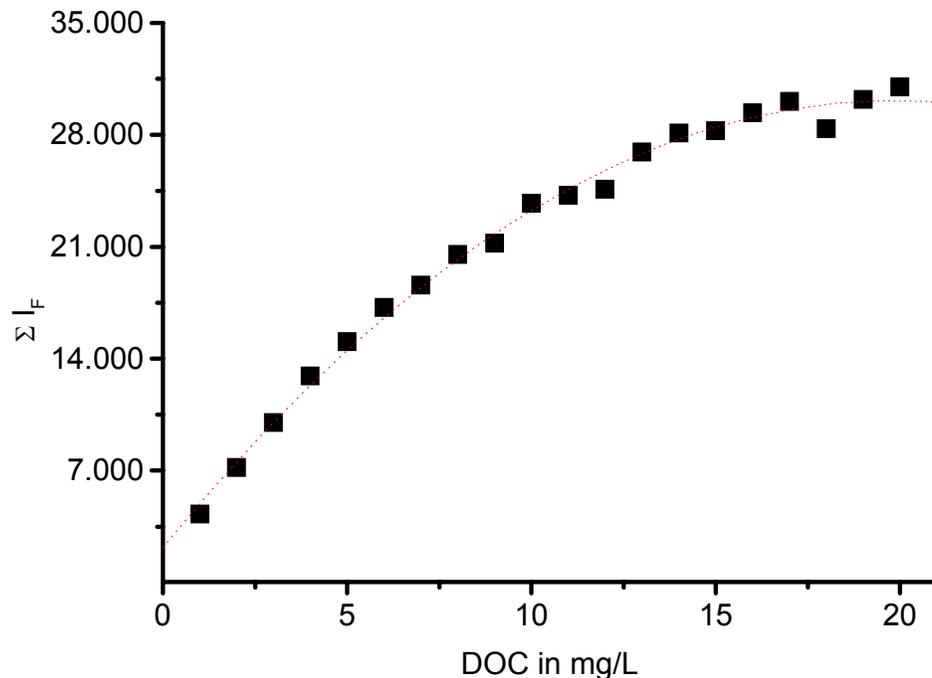


Bild 5: Fluoreszenzintensität von Braunwasser (Hohlohsee im Nordschwarzwald, HO13 Orig, $\lambda_{ex} = 314 \text{ nm}$) als Funktion der DOC Konzentration.

In Bild 5 ist die Abhängigkeit des beobachteten Fluoreszenzsignals von der DOC Konzentration einer Braunwasserprobe gezeigt. Im unteren DOC Konzentrationsbereich besteht ein direkter, linearer Zusammenhang zwischen I_F und der Konzentration, während im Bereich oberhalb von ca. 12 mg/L DOC ein deutliches Abweichen davon zu beobachten ist. Zwei Ursachen sind für diese Abweichung in Betracht zu ziehen: Inner-Filtereffekte und Eigenlöschung der Fluoreszenz. Die Eigenlöschung der Fluoreszenz kann auf Energieübertragungsprozesse zurückgeführt werden. Einen weit größeren Anteil an der beobachteten Abweichung muß allerdings dem Inneren Filter 1. und 2. Ordnung zugeschrieben werden. Unter dem Inneren Filtereffekt 1. Ordnung wird die verstärkte Absorption des Anregungslichts **vor** dem eigentlichen Beobachtungspunkt in der Probe verstanden. Der Filtereffekt 2. Ordnung beschreibt die zunehmende Re-Absorption der emittierten Fluoreszenzstrahlung in der Probe

im Bereich der Überlappung von Absorptions- und Fluoreszenzspektrum. Dabei kann diese Re-Absorption entweder durch die Probe selbst oder durch im beobachteten Spektralbereich absorbierende Chromophore (farbige Matrix) verursacht werden. Im Falle von Huminstoffen sind Filtereffekte 1. und 2. Ordnung in Betracht zu ziehen. Aus Bild 5 wird deutlich, daß die Fluoreszenzmessung zur Konzentrationsbestimmung besonders im unteren DOC Konzentrationsbereich verwendet werden kann – im Bereich also, in dem UV/Vis-Absorptionsmessungen unzuverlässiger werden.

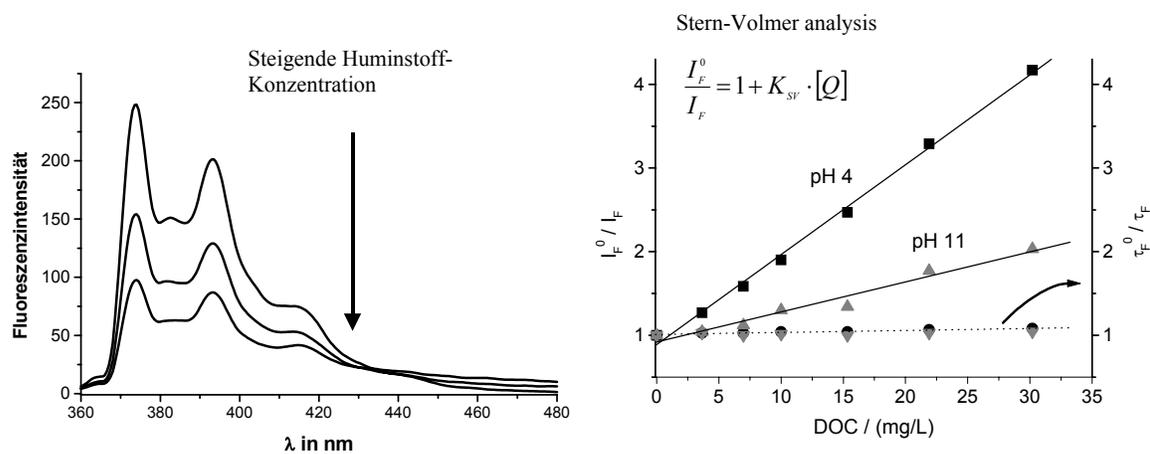


Bild 6: Löscherung der Pyrenfluoreszenz durch Aldrich-Huminstoff. Gezeigt sind die Fluoreszenzspektren in Anwesenheit steigender Huminstoffkonzentration und die in Form einer Stern-Volmer-Auswertung erhaltenen Ergebnisse der stationären und zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen bei unterschiedlichen pH-Werten.

Der Effekt der Fluoreszenzlöscherung kann unter bestimmten Umständen informationsbringend für die Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen

Verbindungen eingesetzt werden, so z.B. für die Untersuchung der Wechselwirkung von Huminstoffen mit Xenobiotika. Dabei kann der Huminstoff sowohl als Löscher wie auch als Fluoreszenzsonde eingesetzt werden. Im Falle von organischen hydrophoben Substanzen wird der Huminstoff als Löscher eingesetzt, während bei der Untersuchung der Komplexierung von Schwermetallen die intrinsische Fluoreszenz der Huminstoffe detektiert wird. Die Kenntnis der Wechselwirkungskonstanten ist wichtig für die Abschätzung von Gefährdungspotentialen, da durch Huminstoffe die Wasserlöslichkeit und damit auch der Transport der Xenobiotika gesteigert werden kann. Der Vorteil der Fluoreszenzlöschmethode liegt in ihrer großen Sensitivität und ihrem nicht-invasiven Charakter, der eine Untersuchung der Reaktion ohne vorgeschalteter Separation erlaubt. Die hohe Empfindlichkeit erlaubt den Einsatz der Fluoreszenzlöschmethode besonders im unteren natürlich vorkommenden DOC-Konzentrationsbereich (1 bis 20 mg/L DOC), in dem die Anwendung von z.B. der Mikrofestphasenextraktion (*solid phase micro extraction*, SPME) nicht möglich ist [12]

In Bild 6 ist der Einfluß der steigenden Huminstoffkonzentration auf die Fluoreszenzintensität einer Pyrenlösung (in Wasser) gezeigt. Mit zunehmender Huminstoffkonzentration nimmt die Fluoreszenzintensität weiter ab. Für den Emissionsbereich $\lambda_{em} > 450$ nm ist außerdem ein Aufwachsen einer neuen breiten, unstrukturierten Fluoreszenzbande erkennbar. Diese ist der intrinsischen Huminstofffluoreszenz zuzuordnen. Im rechten Teil der Abbildung sind die Ergebnisse der Stern-Volmer-Analyse der stationären Fluoreszenzmessungen bei zwei unterschiedlichen pH-Werten gegenübergestellt. Außerdem sind auch noch die entsprechenden Resultate der zeitaufgelösten Messungen der Pyrenfluoreszenzlebenszeiten bei Anwesenheit von Huminstoffen gezeigt. Ein Quotient von 1 in den Lebenszeitmessungen besagt, daß es sich bei der beobachteten Wechselwirkung zwischen PAK und Huminstoff um einen rein statischen Mechanismus handelt. Damit beschreibt die in den stationären Fluoreszenzlöschexperimenten gewonnene Stern-Volmer-Konstante K_{SV} die Wechselwirkungskonstante der Reaktion zwischen Pyren und Huminstoff (siehe Bild 6 und Gleichung 4). Bei der Stern-Volmer-Analyse der stationären Fluoreszenzdaten muß allerdings bei der fluorimetrischen Untersuchung von

Reaktionen von Huminstoffen mit z.B. PAK berücksichtigt werden, daß neben der eigentlichen Wechselwirkung (deren Gleichgewichtskonstante die gesuchte Größe darstellt!) auch die oben diskutierten inneren Filtereffekte zu berücksichtigen sind. Diesen kann in der Stern-Volmer-Analyse durch Einführung von Korrekturfaktoren Rechnung getragen werden. Nähere Einzelheiten können in der einschlägigen Spezialliteratur gefunden werden [z.B. 6, 13]. Der Einfluß der pH-Wertänderung auf die beobachtbare Wechselwirkung zwischen Pyren und Huminstoffen ist auf eine Zunahme des hydrophoben Charakters der Huminstoffe (durch konformative Änderungen einhergehend mit der Protonierung der Carbonsäure-Gruppen der Huminstoffe bedingt) zurückzuführen.

Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK)

Eine Vielzahl unterschiedlicher Stoffklassen organischer und anorganischer Verbindungen kann mit Hilfe fluoreszenzspektroskopischer Methoden analytisch erfaßt werden. Dabei sind Farbstoffe, wie Fluorescein oder Rhodamin, die häufig als Fluoreszenzsonden eingesetzt werden und als Stammverbindung einer großen Anzahl verwandter Verbindungen angesehen werden können sowie metallorganische Komplexe ebenso analytisch faßbar wie die große Gruppe der PAK, auf die im folgende näher eingegangen wird.

Die hohe Empfindlichkeit und Selektivität, sowie die Einsatzfähigkeit der Fluoreszenzspektroskopie zur on-line Detektion und Fernerkundung ergänzen sich mit PAK Eigenschaften (z.B. günstige spektrale Eigenschaften, hohe Fluoreszenzquantenausbeuten) und machen die Methode zu einem leistungsfähigen Werkzeug in der Umweltanalytik.

Die amerikanische Umweltbundesbehörde (US Environmental Protection Agency, US EPA) hat 16 PAK als besonders häufig auftretende Kontaminanten eingestuft. In Bild 7 sind die langwelligsten UV/Vis Maxima und das Fluoreszenzmaximum der 16 EPA PAK gegenübergestellt.

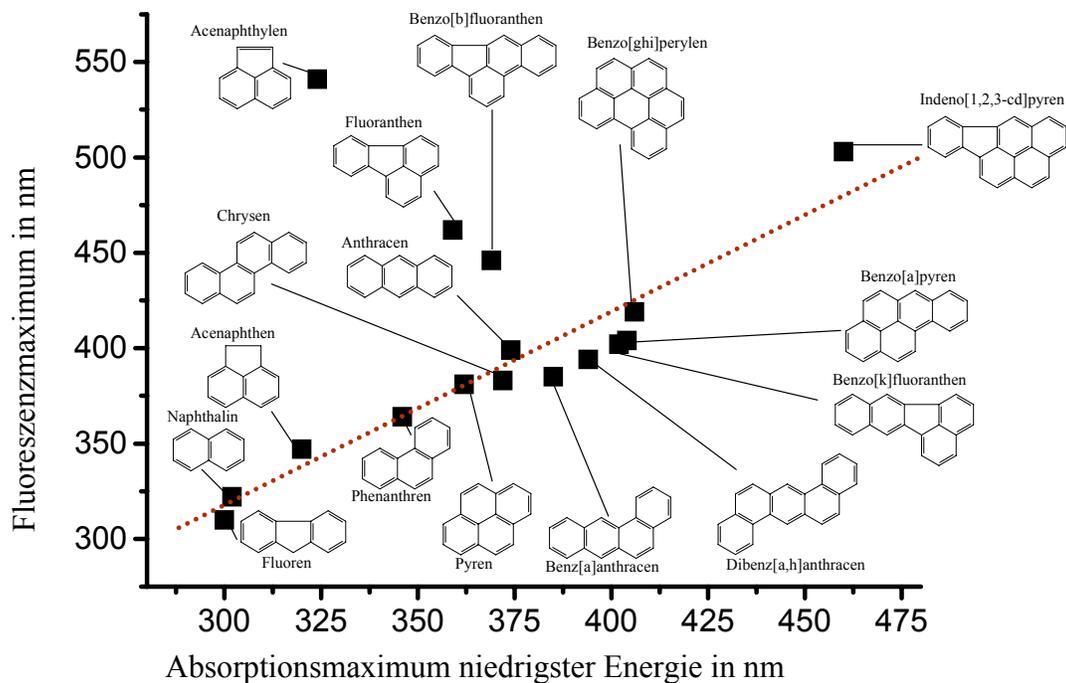


Bild 7: Spektrale Eigenschaften der 16 US EPA PAK. Gezeigt sind die jeweils langwelligsten Absorptions- bzw. Emissionsmaxima der Verbindung nach [3].

Es ist offensichtlich, daß mit zunehmender Ringzahl die Emissionsmaxima in der Regel zu größeren Wellenlängen (Übergänge niedrigerer Energie) verschoben sind. Der Zusammenhang zwischen Struktur der Verbindungen und deren spektralen Eigenschaften ist offensichtlich. Durch Wahl von Anregungs- und Emissionwellenlängenpaar können so einzelne Verbindungen selektiv nachgewiesen werden und zwar unter Umständen auch ohne vorgeschaltete Auftrennung. Der multidimensionale Charakter der Fluoreszenzspektroskopie kommt besonders bei der Analyse von komplexen Vielstoffgemischen zum Tragen. Durch die Erweiterung der Standardfluoreszenzspektren (2-dimensional) auf Totale Lumineszenzspektren (TL, 3-dimensional) wird der Informationsgehalt weiter erhöht. Bei TL-Messungen werden die Fluoreszenzemissionspektren bei verschiedenen Anregungswellenlängen λ_{ex} registriert. Aus den Daten wird dann eine Matrix gewonnen, in der als x- und y-Wert die Emissions- bzw.

Anregungswellenlängen und als z-Wert die Fluoreszenzintensität enthalten sind. Diese Matrix wird im allgemeinen als Anregungs-Emissions-Matrix (*engl.: excitation emission matrix*, EEM) bezeichnet. Aus der EEM kann dann jedes 2-dimensionale Spektrum bestimmt werden – und zwar auch die synchronen Fluoreszenzspektren ($\Delta\lambda = \text{const.}$ **und** $\Delta\nu = \text{const.}$!). Im Bild 8 ist ein Standardfluoreszenzspektrum (links) mit $\lambda_{\text{ex}} = 357 \text{ nm}$ dem Totalen Lumineszenzspektrum des Anthracens (rechts, in Methanol) gegenübergestellt. Das 2-dimensionale Fluoreszenzspektrum kann als Schnitt bei $\lambda_{\text{ex}} = 357 \text{ nm}$ parallel zur Emissionsachse erhalten werden. Im unteren Bereich des TL-Spektrums ist der dem 3-dimensionalen TL-Spektrum entsprechende Kontourplot, in dem die Linien Bereiche gleicher Fluoreszenzintensität verbunden sind, dargestellt.

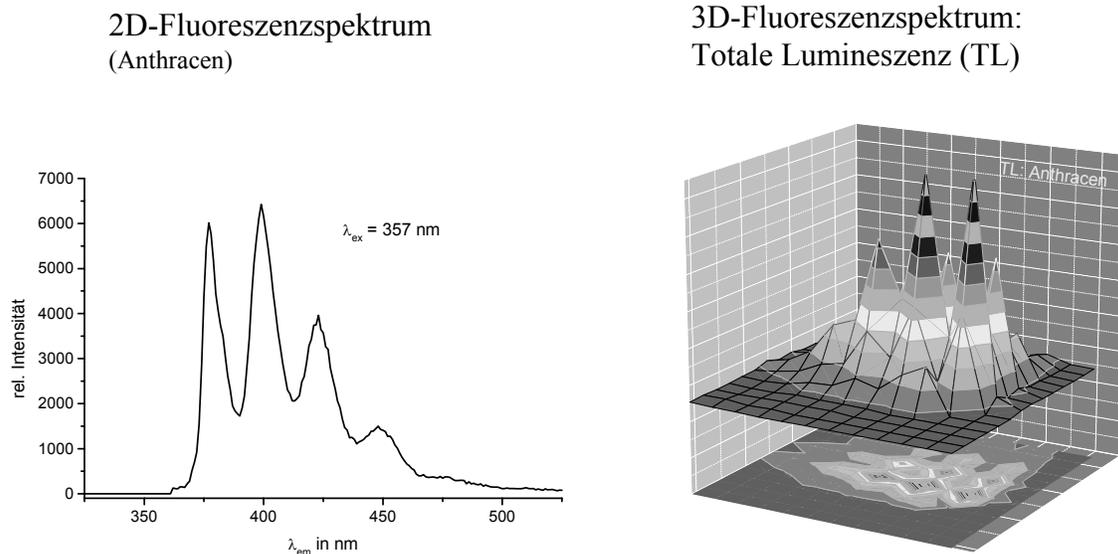


Bild 8: Fluoreszenzspektrum von Anthracen (in Methanol, $\lambda_{\text{ex}} = 357 \text{ nm}$) und Totales Fluoreszenzspektrum von Anthracen (rechts, $\Delta\lambda_{\text{ex}} = 3 \text{ nm}$, $\Delta\lambda_{\text{em}} = 1 \text{ nm}$).

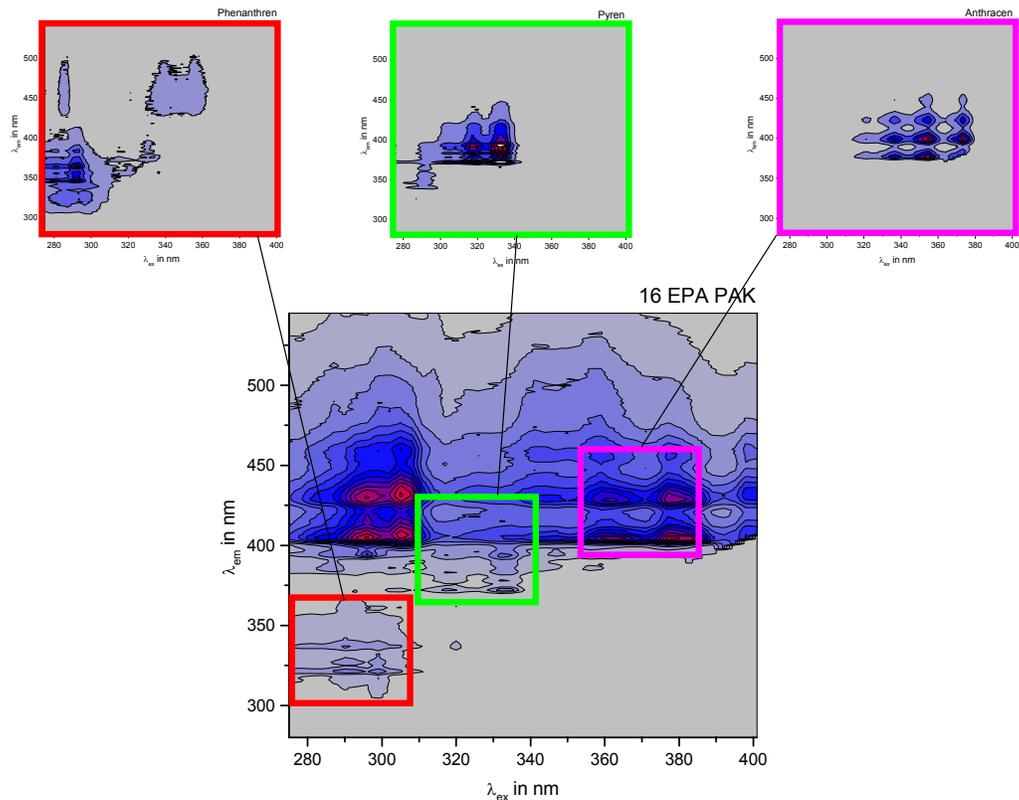


Bild 9: Kontourplots des TL Spektrum der 16 EPA PAK (in Methanol). Die Konzentration der Einzelverbindungen liegt im Bereich zwischen 10^{-8} mol/L bis 10^{-6} mol/L. Zum Vergleich sind auch die Kontourplots der TL Spektren der Einzelverbindungen Phenanthren, Pyren und Anthracen ($c_{PAK} = 10^{-6}$ mol/L, in Methanol) dargestellt.

Bild 9 zeigt die Kontourplots eines Gemisches der 16 EPA PAK in Methanol und der PAK Phenanthren (oben links), Pyren (Mitte) und Anthracen (oben rechts). Durch einen einfachen Mustervergleich wird offensichtlich, daß die Einzelsubstanzen jeweils auch im EPA Gemisch enthalten sind. Im Prinzip können aus den TL Spektren über die rein qualitative Information auch quantitative Aussagen über die Konzentrationen von Einzelstoffen im Gemisch gemacht werden ohne diese vorher aufzutrennen. Dies kann durch die Anwendung spezieller mathematischer Verfahren, wie z.B. der rangvermindernden Faktorenanalyse (*engl.: rank annihilation factor analysis*, RAFA) erreicht werden. Dafür sind allerdings Standardspektren und eine Kalibrierung notwendig. Die Anwendbarkeit dieser Verfahren und die Grenzen sind ausführlich von z.B. Roch diskutiert [14].

Grundsätzlich kann festgestellt werden, daß eine Einzelsubstanz besser identifiziert und quantifiziert werden kann, wenn es in der EEM Bereiche gibt, die allein dieser zu zuordnen sind. Je stärker Einzelsubstanzen spektral überlappen, desto schwieriger wird vorallem deren zuverlässige Quantifizierung im Gemisch. Die Anwendung weiterer hochentwickelter chemometrischer Methoden ist bei der Erweiterung der Aussagekraft von TL Spektren vielversprechend.

Zeitaufgelöste Fluoreszenzmessungen

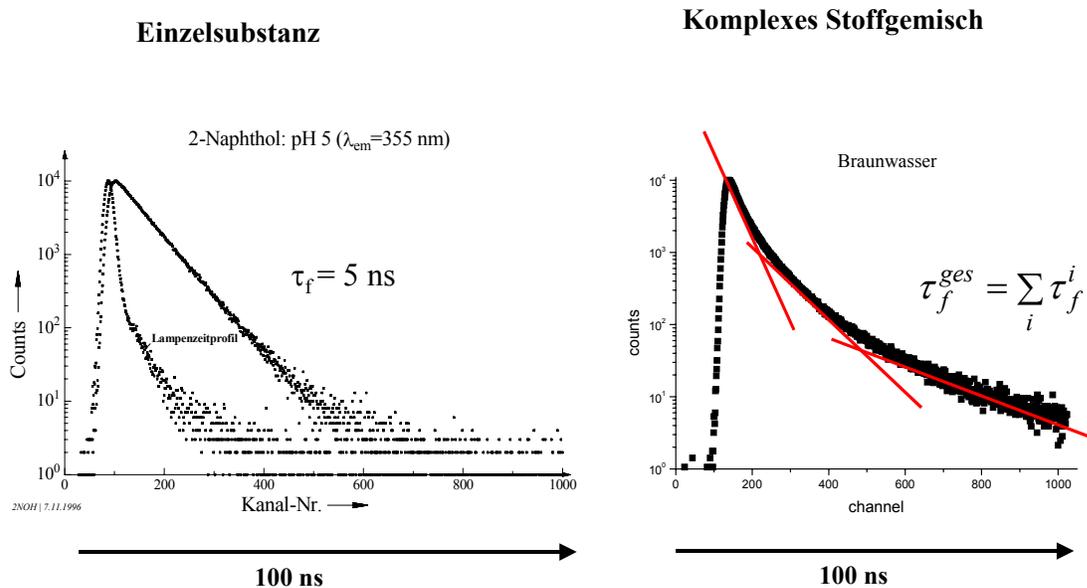


Bild 10: Vergleich der Fluoreszenzabklingverhalten von 2-Naphthol ($\lambda_{ex} = 314$ nm, $\lambda_{em} = 355$ nm) als definierte Einzelsubstanz und eines Braunwassers ($\lambda_{ex} = 314$ nm, $\lambda_{em} = 450$ nm) als Beispiel für ein komplexes Stoffgemisch.

Neben der spektralen Information aus stationären Fluoreszenzmessungen kann als weiterer substanzspezifischer Parameter die Fluoreszenzlebenszeit aus zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen bestimmt werden. Organische Moleküle

besitzen Fluoreszenzlebenszeiten im Bereich zwischen wenigen Pikosekunden bis hin zu hunderten von Nanosekunden. Für Organo-Metallkomplexe reichen die Lumineszenzlebensdauern gar bis in den Bereich von Millisekunden. Für Einzelsubstanzen werden gewöhnlich monoexponentielle Abklingkinetiken gefunden. Im Bild 10 (links) sind die Fluoreszenzabklingkurve von 2-Naphthol und das dazugehörige Zeitprofil des Lampen-Anregungspulses gezeigt. Zum Vergleich dazu ist auch das Fluoreszenzabklingverhalten eines Braunwassers enthalten. Im Falle der definierten Einzelsubstanz 2-Naphthol wird eine monoexponentielle Kinetik für das Fluoreszenzabklingen gefunden, während das Stoffgemisch im Braunwasser eine hochkomplexe Kinetik zeigt, die eine Summe von exponentiellen Abklingvorgängen enthält.

5 Ausblick

Analysenverfahren, die geeignet sind, Wasserproben direkt ohne aufwendige Vorbehandlung zu vermessen, erfreuen sich in der Praxis der Gewässeruntersuchung und der Wasserbehandlung großer Beliebtheit. Die Eignung für kontinuierlich messende Konzepte sind ein weiteres wünschenswertes Kriterium. Die Spektroskopie im sichtbaren und ultravioletten Spektralbereich entspricht beiden Forderungen. Allerdings leiden die erreichbaren Aussagen bei den meisten Messungen unter dem eingeschränkten Informationsgehalt, der den summarischen Parametern eigen ist. Diese Schwäche ist im technischen Anwendungsbereich häufig akzeptabel und wird durch gute Korrelationen mit anderen bilanzierbaren Stoffeigenschaften teilweise kompensiert. Nachdem die klassische Absorptionsspektroskopie ihren Platz in der on-line Analytik von Wässern und ihrer Aufbereitungsprodukte gefestigt hat, lassen die instrumentellen Entwicklungen auf dem Gebiet der Lumineszenzspektroskopie einen vielversprechenden Einsatz erwarten. Lasertechnik, Lichtleiter und elektronische Datenverarbeitungssysteme ermöglichen eine breite Nutzung des leistungsfähigen Meßprinzips auch im Wasserfach. Durch mehrdimensionale spektroskopische und zeitliche Auflösung lassen sich Lumophore selbst im niederen Konzentrationen zuverlässig bestimmen. Wie die Musterbeispiele einiger polyzyklischer Aromaten und ihrer Metaboliten zeigen, erschließt sich mit den Lumineszenzmessungen ein

Bereich der praxisgerechten Wasseruntersuchung, der Substanzspezifität und niedere Nachweisgrenzen aufweist. Mehrere, der in komplexen Matrices auftretenden Störungen lassen sich zur Gewinnung weiterer stoffspezifischer Informationen verwenden. Damit steht ein Untersuchungsprinzip zur Verfügung, dessen Weiterentwicklung in informationsselektiver, bedienerfreundlicher und wirtschaftlicher Richtung on-line Meßsysteme erwarten läßt, die für aquatische Systeme hohe Auflösung und Einsatzbreite bringen.

6 Literatur

- [1] Reichert J.K. (1999) Wasseranalytik, in: *Wasser und Gewässer*, Frimmel F.H. (Hrsg.), Spektrum Akademischer Verlag, Berlin, Kap. 3, S. 69 – 101.
- [2] Frimmel F.H. (1995) Interpretierbarkeit des SAK(254 nm) bei Gewässeruntersuchungen und Trinkwasseraufbereitung. *Wiener Mitteilungen* **127**, G1 – G18.
- [3] Kumke M.U., Löhmannsröben H.-G. und Roch Th. (1995) Fluorescence spectroscopy in environmental monitoring. *J. Fluorescence* **5**, 139 – 153.
- [4] Borneff J. und Kunte H. (1991) Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe: Vorkommen, Bedeutung und Analytik, in: *Die Trinkwasserverordnung*, Aurand K., Hässelbarth U., Lange-Asschenfeldt H. und Steuer W. (Hrsg.), 3. Auflage, Erich Schmidt Verlag, Berlin, S. 275 – 284.
- [5] Gauglitz G. (1983) Praktische Spektroskopie. Attempto Verlag, Tübingen.
- [6] a) Zander M. (1981) Fluorimetrie. Springer Verlag, Berlin. b) Klessinger M. und Michl J. (1989) Lichtabsorption und Photochemie organischer Moleküle. VCH, Weinheim.
- [7] Lakowicz J.R. (1983) Principles of Fluorescence Spectroscopy. Plenum Press, New York.
- [8] Frimmel F.H. und Abbt-Braun G. (1999) Basic Characterization of Reference NOM from Central Europe – Similarities and Differences. *Environment International* **25**, 191 – 207.
- [9] Kumke M.U., Abbt-Braun G. und Frimmel F.H. (1998) Time-resolved fluorescence measurements of aquatic natural organic matter. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* **26**, 73 – 81.
- [10] Maurer A. und Frimmel F.H.: (1997) On the Way: Field Analytical Methods for Water, Waste and Soil Examination. *GIT Labor-Fachzeitschrift* Special Edition April 1997.
- [11] Gottlieb J., Huck K. und Maurer A. (1997) Field Screening – neue Methoden und Strategien bei der Umweltanalytik vor Ort. *GIT Labor-Fachzeitschrift* **41**, 48 – 50.
- [12] Doll T.E., Frimmel F.H., Kumke M.U. und Ohlenbusch G. (1999) Interaction between natural organic matter (NOM) and polycyclic aromatic compounds (PAC) – comparison of fluorescence quenching and solid phase micro extraction (SPME). *Fresenius J. Anal. Chem.*, im Druck.

- [13] Kumke M.U., Löhmannsröben H.-G. und Roch Th. (1994) Fluorescence quenching of polynuclear aromatic compounds by humic acid. *Analyst* **119**, 997 – 1001.
- [14] Roch Th (1998) Evaluation of total luminescence data with chemometrical methods: a tool for environmental monitoring. *Anal. Chim. Acta* **356**, 61 – 74.

7 Danksagung

Die Arbeiten wurden finanziell vom Ministerium für Wissenschaft, Forschung und Kunst Baden-Württemberg unterstützt.

Professor Dr. F.H. Frimmel
Engler-Bunte-Institut, Bereich Wasserchemie
TH Karlsruhe
Engler-Bunte-Ring 1
76131 Karlsruhe
Tel.: ++49 721 608 2580
Fax: ++49 721 608 7051
fritz.frimmel@ciw.uni-karlsruhe.de