



## Was schwimmt denn da im Wasser?

### Wasseranalytik der Huminsäure mit Fluoreszenzspektroskopie

Marion Egelkraut-Holtus

Shimadzu Europa GmbH

Wasser ist die Grundlage allen Lebens, aller Natur und Lebensräume. Als Trinkwasser zum Lebensmittel verarbeitet, ist es ein Stoff, der strengstens geprüft wird. Aber auch in der Chemie hat Wasser eine wichtige Aufgabe: Es ist ein gutes Lösungsmittel und nimmt viele Substanzen auf.

Der natürlichste Weg des Wassers in den Naturkreislauf zu gelangen, führt als Regen in den Boden und dann in Gewässer oder tieferdige Brunnen. Dabei nimmt es Bodenbestandteile auf und trägt sie gelöst oder als Schwebeteilchen mit. Es sind sichtbare und unsichtbare Anteile. Sichtbare Teilchen geben dem Wasser zumeist eine erdige Färbung, ein Erscheinungsbild wie es normal ist für Freilandteiche oder Seen. Findet man jedoch eine leichte Tönung in einer Flasche Trinkwasser, dann empfindet man es rein subjektiv als abweichend von Norm und Erfahrung. Trinkwasser wird als farblos und klar erwartet. Der warme Sommer 2018 bescherte eine Lieferung von stillem Mineralwasser mit leichter Tönung. Dies galt es mit der Fluoreszenzspektroskopie zu untersuchen.

Es ist aus der Literatur bekannt, dass sich in Wasser Huminsäure befinden kann, ein natürliches Abbauprodukt von organischen Quellen, wie Blättern und Gräsern. Dies ist bei Freilandwässern natürlicherweise der Fall; Huminsäure füttert das Leben im Wasser. Die Huminsäure ist kein beständiges Molekül. Durch Sauerstoff oxidiert sie und zerfällt chemisch gesehen in Tryptophan und L-Tyrosin. Von dieser Reaktion könnte man ableiten: ist keine Huminsäure mehr anwesend, ist auch das Adäquat an Sauerstoff im Wasser verbraucht [1], [2], [3].

Bei der folgenden Anwendung interessierte, die Änderung des Huminsäure-Gehalts mit Hilfe der Fluoreszenzspektroskopie festzustellen. Huminsäure, Tryptophan sowie Tyrosin weisen unter Anregung im ultravioletten Bereich ein Fluoreszenzspektrum auf. Die komplexen Moleküle sind aufgrund ihrer chemischen Struktur reich an Ringsystemen, und es können einzelne Elektronen in energetisch höhere Zustände angeregt werden. Die so aufgenommene Energie wird unter Leuchten wieder abgegeben, wenn das Elektron in seinen energetischen Grundzustand zurückfällt.

Für diese Fluoreszenz-Analytik wurde ein schnelles Screening eingesetzt, das in einer EEM-Sicht (Excitation-Emission-Matrix) endet. Die Fluoreszenzspektroskopie ist eine sehr empfindliche und selektive Messtechnik. Sie kann Spuren von fluoreszenzaktiven Substanzen in einer Mischung sichtbar machen.

#### Proben

Für diese Untersuchung wurden diverse Proben gesammelt:

- Ein chemisch reines Wasser – bidestilliert
- Brunnenwasser, stehend, aus einem Gartenschlauch
- Brunnenwasser, frisch gepumpt, aus einem Gartenschlauch
- Teichwasser stehend
- Teichwasser mit Frischwasseraustausch und
- Mineralwasser ohne Kohlensäure (stilles).

Als Referenzmaterial dienten Lösungen von Tyrosin (1 mg/l), Tryptophan (1 mg/l) und Huminsäure (20 mg/l, pH 8 bis 9).

Alle eingesetzten Flüssigkeiten wurden in eine Fluoreszenzküvette überführt. In der Standardausführung haben die Küvetten vier polierte Fenster und sind mit einer Schichtdicke von 10 x 10 mm dimensioniert. Der Quarz dieser Küvette ist selber fluoreszenzfrei. Die Fenster in dieser Ausführung werden benötigt, da Fluoreszenz ein Streulicht ist, was in einem Winkel von 90 Grad von der Einstrahlrichtung der Anregungsquelle detektiert wird. Das Referenzmaterial wurde ausgewogen und mit bidestilliertem Wasser verdünnt. Dieses Wasser wurde ebenfalls untersucht, um eventuelle Kontaminationen durch dieses Wasser auszuschließen (Anhang, Abb. 1).

#### Analyse der DOM in natürlichem Wasser

„Dissolved Organic Matter“ (gelöster organischer Kohlenstoff) wurden mit dem Shimadzu Fluoreszenzspektrophotometer RF-6000 untersucht. In einem schnellen Screening wurden die EEM-Matrices der Proben und Referenzen erstellt. Die EEMMatrix entsteht, wenn die Anregungswellenlängen in kleinen Schritten langsam erhöht und das jeweilige Fluoreszenzspektrum dagegen aufgetragen wird. Je nach Aufnahme-geschwindigkeit kann es ca. 2 Minuten (60.000 nm/s) oder ca. 13 Minuten (2.000 nm/s) dauern, die Matrix zu erstellen. Aus der Messung der Referenzen war es möglich, die analytischen Wellenlängen zur Identifikation der beteiligten Proteine zu gewinnen. Destilliertes Wasser zeigt kein Vorhandensein eines Fluorophors, wie es zu erwarten war. Es wurde für Tryptophan die Anregungswellenlänge (EX) bei 275 nm und der Emissionswellenlängenbereich (EM) bei 340 – 381 nm gefunden. Für L-Tyrosin

liegen die EX bei 275 nm und EM bei 310 - 320 nm. Die Huminsäure weist zwei aktive Flächen in der EEM auf: bei EX 300 - 370 nm und EM 400 - 500 nm, sowie EX 240 - 260 nm und ein EM von 450 - 500 nm.

Auf gleiche Weise wurden nun die 5 Proben aus unterschiedlichsten Quellen untersucht. Alle Proben wiesen geringere Konzentrationen als das Referenzmaterial auf. Es zeigte sich (Anhang, Abb. 2 und 3), dass das Mineralwasser eine geringe Konzentration einer Huminsäure-Verwandten enthielt. In den stehenden Wassern hat die Signalgruppe der Huminsäure stark abgenommen. Es

überwiegen Tryptophan und L-Tyrosin ähnliche Stoffe. Beide frischen Wasser enthalten dagegen mehrheitlich huminsäure-ähnliche Proteine. In Tab. 1 sind die gefundenen Intensitäten aller beteiligten Proben und Referenzen wiedergegeben, um auch den quantitativen Aspekt sichtbar zu machen.

### Fazit

Die Anregungs(Excitation)-Emission-Matrix (EEM) der Fluoreszenzspektroskopie ist eine sehr schnelle Technik, um einen Überblick über gelöste organische Bestandteile (DOM) in Wasser zu erhalten. Mit dieser Möglichkeit lässt sich die Wasserqualität zum Beispiel im Ab-

wasserreinigungsprozess und auch die Verschmutzung des natürlichen Wassers überwachen.

### Literatur

[1] Hudson, N., Baker, A. and Reynolds, D. (2007). *Fluorescence analysis of dissolved organic matter in natural, waste and polluted waters – a review. River Research and Applications* 23: 631-649.

[2] Yan, Y., Li, H. and Myrick, M. L. (2000). *Fluorescence fingerprint of waters: excitation-emission matrix spectroscopy as a tracking tool. Applied Spectroscopy* 54(10): 1539-1542.

[3] AD-0133, Shimadzu Asia Pacific, 2016

### Anhang:

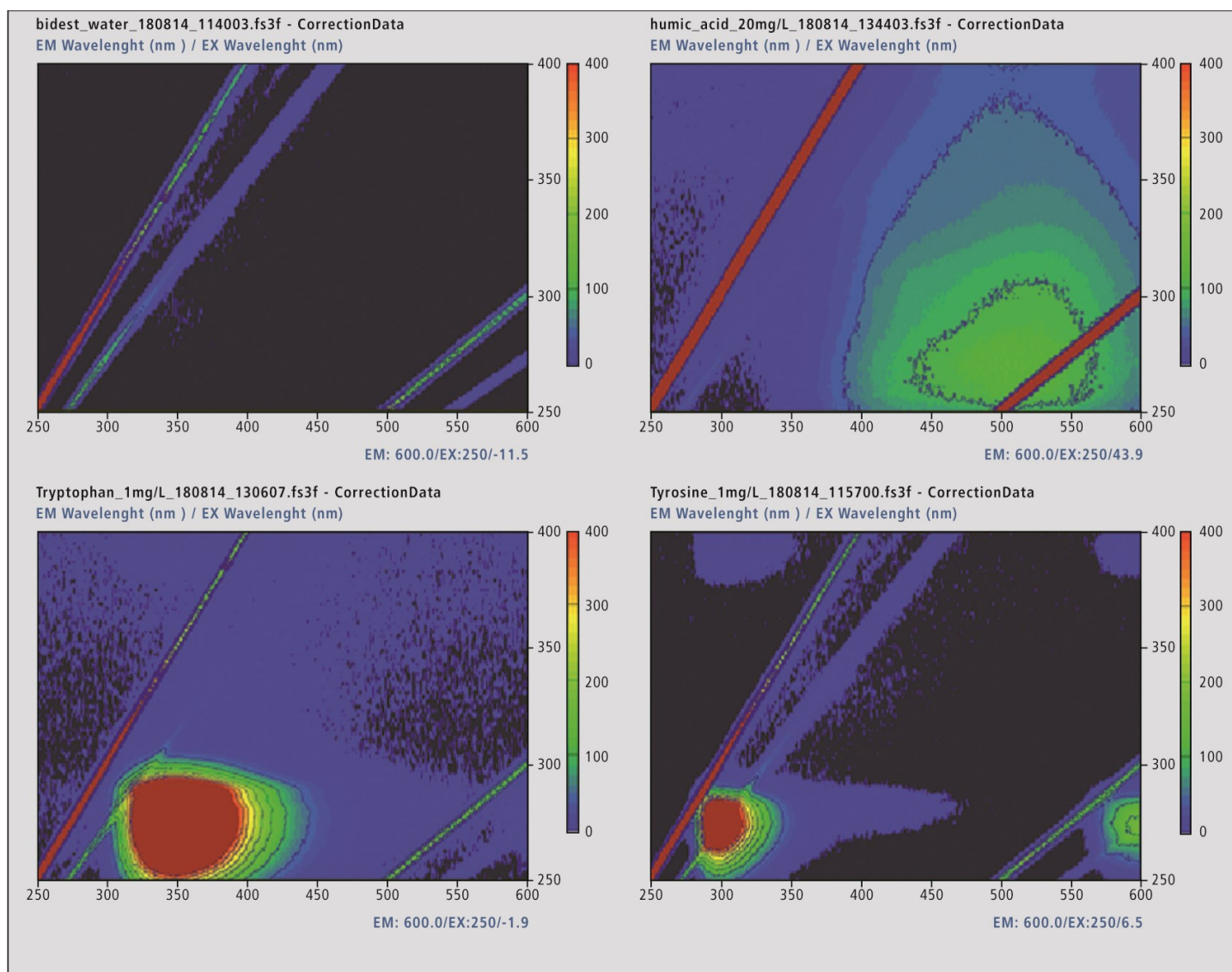


Abbildung 1: Darstellung der EEM-Matrix von bidestilliertem Wasser (oben links), Huminsäure (oben rechts), Tryptophan (unten links) und L-Tyrosin (unten rechts), die Skalierung der Darstellung wurde mit 0 - 400 Intensitäten eingestellt (rot entspricht sehr intensiv, schwarz bis zu keine Intensität)

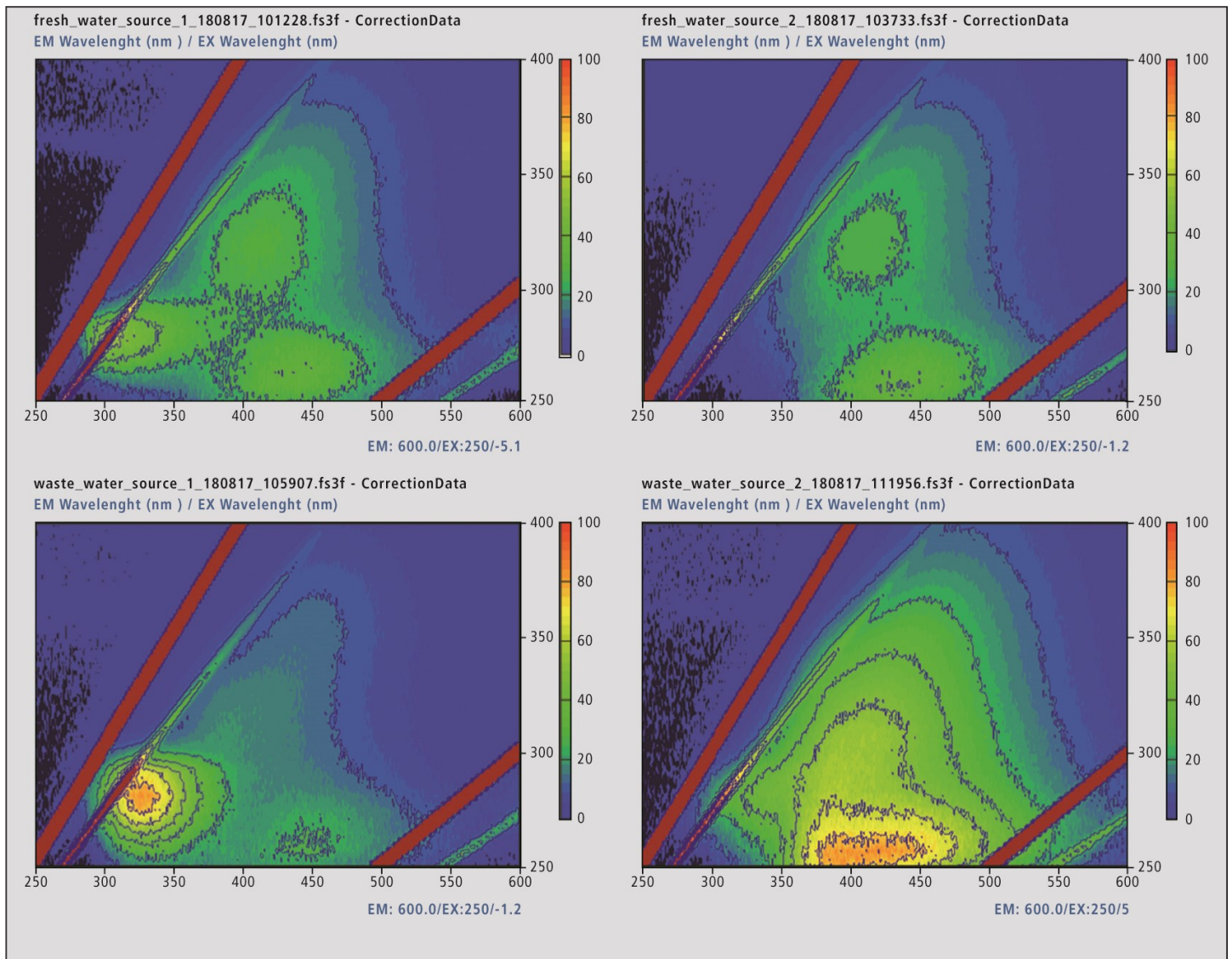


Abbildung 2: Darstellung der EEM-Matrices von stehendem Brunnenwasser im Schlauch (oben links), fließendem Brunnenwasser aus einem Schlauch (oben rechts), stehendem Teichwasser (unten links) und fließendem Teichwasser (unten rechts)

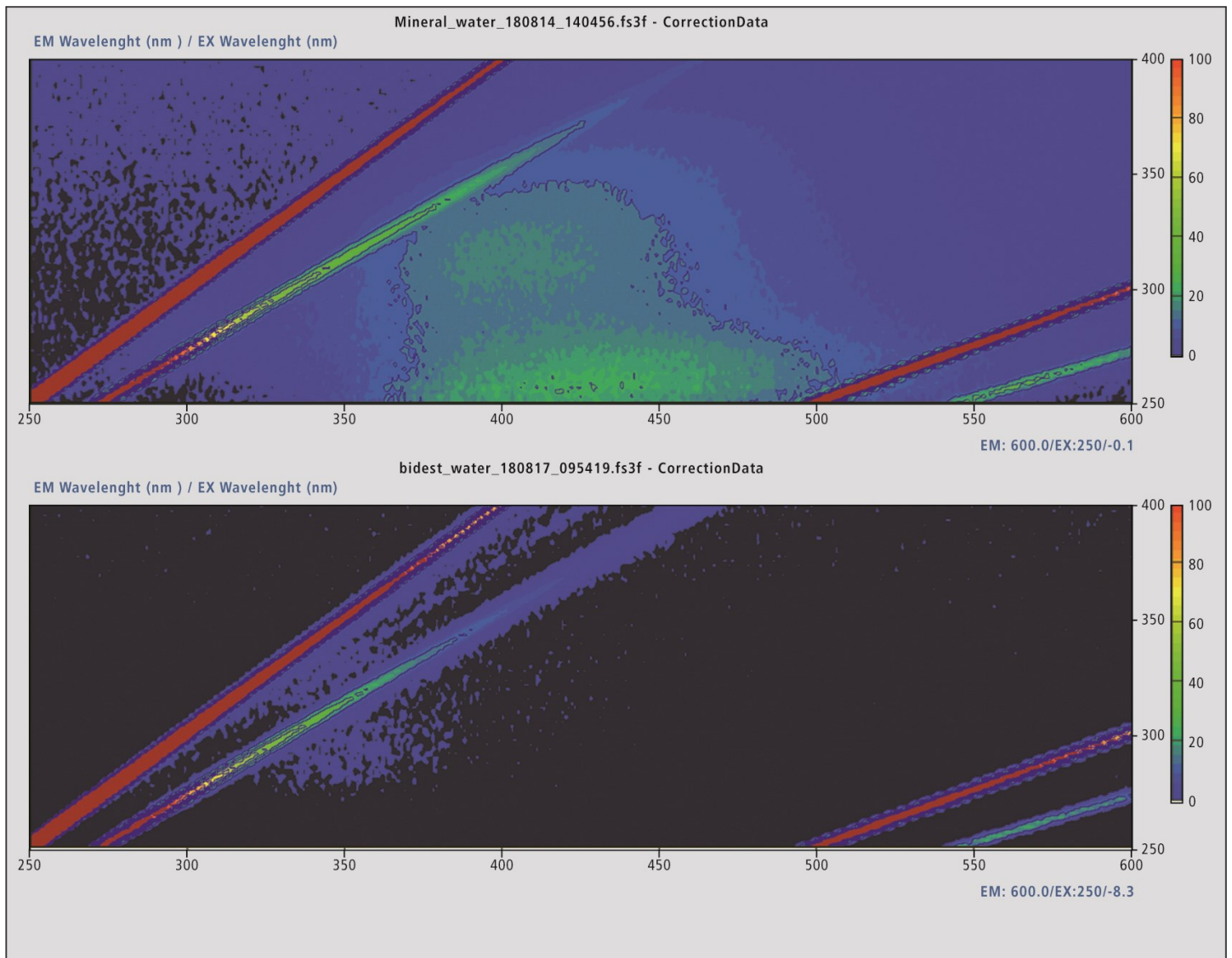


Abbildung 3: Vergleich der EEM-Matrices von stillem Mineralwasser aus der Flasche (Sommer 2018) und bidestilliertem Wasser aus dem Labor. Das Mineralwasser weist Fluoreszenzaktivität im Bereich der huminsäure-ähnlichen Proteine auf.

Tabelle 1: Intensitäten der Fluorophoren in den Proben und Referenzen

Fluorophore	Proben und Referenzen								
	Huminsäure 20 mg/l	Tyrosin 1 mg/l	Tryptophan 1 mg/l	Bi-distilliert	Mineralwasser	Brunnen stehend Schlauch	Brunnen frisch gepumpt	Teich ruhend	Teich fließend
A	0	0	976	0	0	34	0	86,1	38,6
B	0	583	0	0	0	44,5	0	45,7	32
C1	100	0	0	0	27	34,9	36,6	24,9	82,6
C2	51	0	0	0	17	30	26,5	17,3	40