



### Herausforderung

Bestimmung der Wasserqualität in Oberflächenwasser basierend auf der Chlorophyll a-Konzentration als Indikator für den Phytoplanktongehalt in Frischwasser

### Lösung

Nutzung des SPECORD 50 PLUS UV/Vis-Spektralphotometers als zuverlässiges Analysewerkzeug zur Untersuchung der Chlorophyll a-Konzentration basierend auf der Absorption bei 665 nm nach einer einfachen Probenvorbereitung

## Untersuchung der Chlorophyll a-Konzentration als ein Indikator zur Überwachung von Trophieveränderungen bei Oberflächenwasser mittels UV/Vis-Spektralphotometrie nach DIN 38409-60

### Einführung

UV/Vis-Spektralphotometrie wird weit verbreitet zur Analyse der Wasserqualität eingesetzt. Neben dem Nachweis von Standardwasserparametern (z.B. Phosphor, Ammonium und Nitrat)<sup>[1]</sup> ist sie insbesondere beim Nachweis von Pflanzenpigmenten wie Chlorophyllen, Phycobilinen und Xanthophyllen von Nutzen.<sup>[2]</sup> Die langjährige Erfahrung von Analytik Jena in der UV/Vis-Spektralphotometrie bietet hierfür eine Kombination aus passender Spektralphotometerleistung und Software sowie passender Zubehörpalette, die von der Einzelprobe bis zur automatisierten Lösung reicht. So vereint das SPECORD 50 PLUS Spektralphotometer einen einfachen Betrieb mit herausragender spektroskopischer Leistung sowie Automatisierungsmöglichkeiten.

Die Überwachung des Trophiegrads (Wachstum von Phytoplankton oder Cyanobakterien) durch spektralphotometrische Quantifizierung von Chlorophyll a

ist als Teil der deutschen Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung in DIN 38409-60<sup>[3]</sup> geregelt: „Photometrische Bestimmung der Chlorophyll a-Konzentration in Wasser“. Die Konzentration von Chlorophyll a bietet zusammen mit weiteren Parametern zu Biomasse und Bioaktivität einen Einblick in die metabolische Leistungsfähigkeit von Phytoplankton (Cyanobakterien) in aquatischen Umgebungen. Eine Diskussion dieser Parameter geht jedoch über den Rahmen dieser Applikationsschrift hinaus. Zusätzlich zur Bestimmung von Chlorophyll a wird noch die Phäophytinkonzentration untersucht. Wirksame Überwachungswerkzeuge in der Wasseranalyse erfordern eine vergleichsweise einfache bis vernachlässigbare Probenvorbereitung, einen schnellen Nachweis und Auswertung, sowie ein angemessenes Maß an Genauigkeit hinsichtlich der quantitativen Bestimmung. Die einfache Nachweismethode für Chlorophyll a

ermöglicht die Unterscheidung zwischen Chlorophyll a und weiteren akzessorischen Photosynthesepigmenten wie Phycobilinmolekülen (z. B. Phycocyanobilin), Chlorophyll b und  $\beta$ -Carotinen (siehe Abb. 1) allein auf Basis der

Absorptionseigenschaften. Wie alle Phytopigmente ist Chlorophyll empfindlich gegenüber Licht, Säure und enzymatischem Abbau (z. B. durch Chlorophyllasen).

## Material und Methoden

### Proben und Reagenzien

Die Oberflächenwasserproben wurden aus einer Talsperre im Saale-Wassersystem genommen. Filtration, pH-Modulation, ethanolische Extraktion und richtige Lagerung wurden in Übereinstimmung mit DIN 38409-60 durchgeführt.<sup>[3]</sup> Die Proben wurden unter Verwendung von Glasfaserfiltern und bei einem Vakuum von 30–50 kPa filtriert. Je nach Trophiegrad variiert das Probenvolumen von 0,10 bis zu 5,00 l. Unmittelbar nach der Filtration erfolgt die ethanolische Extraktion. Heißes Ethanol ( $78 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ ) hemmt sämtliche enzymatische Aktivität, wodurch der Chlorophyllabbau durch Chlorophyllasen gestoppt wird. Gegebenenfalls (z.B. starke Trübung nach einfacher visueller Untersuchung) müssen die Proben homogenisiert werden (z.B. mechanisches Aufbrechen der Partikel durch Scherkräfte). Wenn das Probenvolumen relativ klein ist ( $< 25 \text{ ml}$ ) oder die Trübung sehr stark, ist alternativ eine zusätzliche Klärung mittels Filtration und Zentrifugation zu empfehlen. Die Trübungskorrektur wird durch Messung der Absorption bei 750 nm erreicht. Chlorophyll ist sehr empfindlich gegenüber photochemischer und chemischer Oxidation. Darum sollte die Probenverarbeitung innerhalb der ersten 24 h nach Probennahme erfolgen, wobei eine Exposition gegenüber Licht zu vermeiden ist. Die Proben sollten bei  $5 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$  gelagert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde ein beispielhafter Satz von 8 verschiedenen Proben nach DIN 38409-60 untersucht.

### Geräte- und Softwareeinstellungen

Die gesamte Messreihe wurde mit einem SPECORD 50 PLUS Spektralphotometer durchgeführt, das mit einem Standardküvettenhalter und einer 50 mm Glasküvette ausgestattet war. Die optischen Eigenschaften des SPECORD 50 PLUS bieten eine weit höhere Leistung als die spezifischen Anforderungen der DIN 38209-60 hinsichtlich spektraler Auflösung (1,4 nm), photometrischer Genauigkeit ( $\pm 0,003 \text{ A}$ ) und Wellenlängengenauigkeit ( $\leq \pm 0,5 \text{ nm}$ ). Die Anforderungen von DIN 38209-60 sind hier  $\leq 2 \text{ nm}$ ,  $\leq \pm 0,005 \text{ A}$  bei 1 A bzw.  $\leq \pm 1 \text{ nm}$ . Das Spektralphotometer wurde mit der Software ASpect UV (Version 1.5.0) im Photometrie-Modul betrieben. Dabei wurde ein einfaches Verfahren zur Aufnahme der Extinktionswerte bei 665 nm und 750 nm definiert (siehe Tabelle 1). Blindwerte und Proben wurden in einer vordefinierten Probentabelle eingefügt.

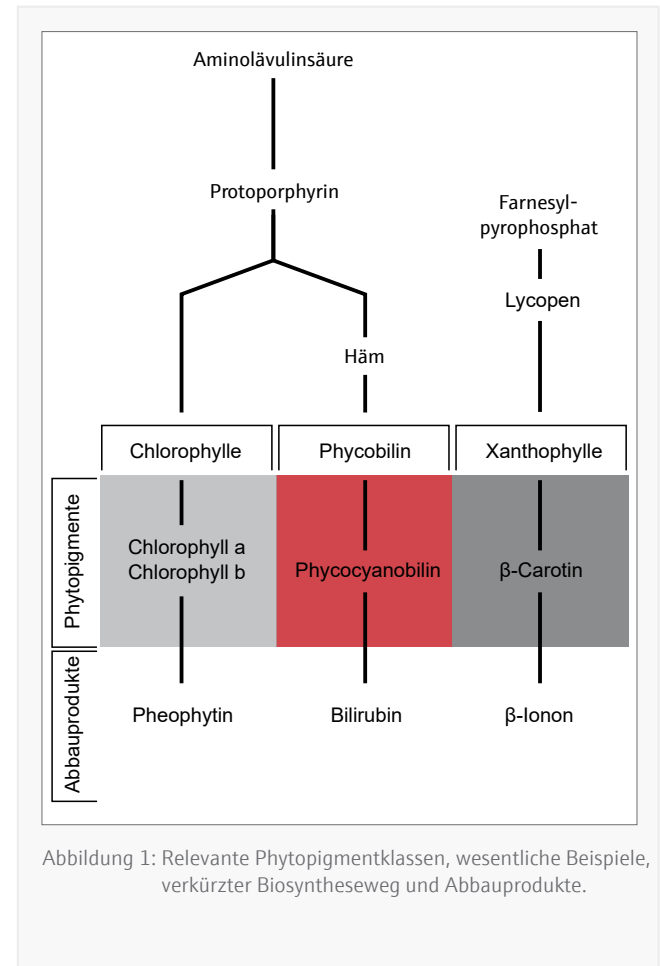


Abbildung 1: Relevante Phytopigmentklassen, wesentliche Beispiele, verkürzter Biosyntheseweg und Abbauprodukte.

Tabelle 1: Einzelheiten zur Messung der Absorptionswerte für die ASpect UV-Softwareeinstellungen

	$A_{665}$	$A_{750}$
Messmodus	Absorption	Absorption
Wellenlänge [nm]	665	750
Integrationszeit [s]	0,1	0,1

## Messungen

Unbekannte Proben erfordern die Messung des Spektrums zwischen 500 und 800 nm. Dies ermöglicht eine Einschätzung der Durchführbarkeit hinsichtlich der Gesamtkonzentration und des Verhältnisses der untersuchten Phytopigmente (z. B. Phycobilinmolekülen und entsprechenden Abbauprodukten). Für Chlorophyll a erfolgten die Absorptionsmessungen bei den gegebenen Wellenlängen (siehe Tabelle 1) von Referenz (destilliertes Wasser), Blindprobe und Proben in dieser Reihenfolge. Als Blindprobe wurde Ethanol (90 %) verwendet. Dessen Beitrag wurde bei jeder nachfolgenden Absorptionsmessung einer Probe automatisch durch die ASpect UV-Software abgezogen. Um den Beitrag von Phäophytinen zu bestimmen und abzuziehen, wurden die Absorptionen vor ( $A_v$ ) und nach ( $A_n$ ) Ansäuerung gemessen (siehe Tabelle 2 im Abschnitt Ergebnisse und Diskussion). Einzelheiten dieses Schritts sind beim photometrischen Verfahren von DIN 38409-60 angegeben. Basierend auf den gemessenen Absorptionswerten werden die Chlorophyll a-Konzentration ( $\rho_c$ ), der Phäophytin-Beitrag ( $\rho_p$ ), die Chlorophyll a-Masse oder Chlorophyll a vor der Säurebehandlung ( $\rho_g$ ) sowie ein Säureverhältnis R berechnet (siehe Ergebnisse und Diskussion).

Für eine optimale Bewertung wird empfohlen, mit Absorptionswerten zwischen 0,02 und 1,00 A zu arbeiten. Deshalb ist die Auswahl von Probenvolumen, Extraktvolumen und Küvettschichtdicke für diesen Zweck entscheidend. Beispielsweise ist im vorliegenden Fall von 2,00 l Probenvolumen und 25 ml Extrakt eine 50 mm Küvette erforderlich. Somit kann die niedrige Chlorophyllkonzentration durch die Nutzung einer Küvette mit größerer Schichtdicke ordnungsgemäß gemessen werden.

Wie in DIN 38409-60 angegeben, muss die Nachweisgrenze für jedes Labor individuell einmal jährlich aktiv berechnet werden. Chlorophyll a ist nicht als stabiles Standard- oder Referenzmaterial verfügbar. Daher sollte die DIN 32645<sup>[4]</sup> für das Blindprobenverfahren eingesetzt werden. Dabei wird eine analytfreie Probe, die aus einer Matrix besteht, die den analysierten Zielproben entspricht (z.B. Oberflächenwasserfiltrat von präparierten Proben, stark verdünnte Probe in einer Trinkwassermatrix oder einfaches Trinkwasser) für eine 10-fach-Bestimmung verwendet. Weitere Einzelheiten hinsichtlich dieses Verfahrens und die anschließende Datenauswertung sind in DIN 38409-60 angegeben. Die wichtigsten Einzelheiten werden nachfolgend diskutiert.

## Analyse der spektralphotometrischen Daten

Für die Ermittlung der wichtigsten Chlorophyllindikatorwerte wurden die folgenden Gleichungen und Variablen verwendet.

(1) Bestimmung der Chlorophyll a-Konzentration nach Ansäuerung

$$\rho_c = \left( (A_{665v} - A_{750v}) - (A_{665n} - A_{750n}) \right) \cdot \frac{R}{R-1} \cdot \frac{V_E}{V_P \cdot d \cdot \alpha}$$

(2) Massenkonzentration von Phäopigmenten

$$\rho_p = \frac{R}{R-1} \cdot \left( R \cdot (A_{665n} - A_{750n}) - (A_{665v} - A_{750v}) \right) \cdot \frac{V_E}{V_P \cdot d \cdot \alpha}$$

(3) Massenkonzentration von Chlorophyll a vor der Säurekorrektur

$$\rho_g = (A_{665v} - A_{750v}) \cdot \frac{V_E}{V_P \cdot d \cdot \alpha}$$

(4) Säureverhältnis R zur Validierung der Erfüllung von DIN 38409-60. Zu diesem Zweck sollte der gegebene Bereich innerhalb von 1,0 und 1,7 liegen.

$$R = \frac{(A_{665v} - A_{750v})}{(A_{665n} - A_{750n})}$$

Mit den folgenden Variablen:

$\rho_c$	Massenkonzentration Chlorophyll a in Mikrogramm pro Liter [ $\mu\text{g/l}$ ]
$A_{665v}$	Absorption Extrakt [A] bei 665 nm vor Ansäuerung
$A_{750v}$	Absorption Extrakt [A] bei 750 nm vor Ansäuerung (Trübungskorrektur)
$A_{665n}$	Absorption Extrakt [A] bei 665 nm nach Ansäuerung
$A_{750n}$	Absorption Extrakt [A] bei 750 nm nach Ansäuerung (Trübungskorrektur)
R	Verhältnis $A_{665v}/A_{665n}$ für reines Chlorophyll a, in diesem Fall R = 1,7
$V_E$	Extraktvolumen in Milliliter [ml]
$V_P$	Volumen der gefilterten Wasserprobe in Liter [l]
d	Küvettschichtdicke in Zentimetern [cm]
$\alpha$	Spezifischer Absorptionskoeffizient für Chlorophyll a, hier 90%ige ethanolische Lösung $\alpha = 82 \cdot 10^{-3}$ [ $\text{ml} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ ]

## Ergebnisse und Diskussion

Zum Verständnis des Nutzens dieser spektralphotometrischen Technik sind einige spektralphotometrische Absorptionswerte und damit strukturelle Details in Bezug auf Chlorophyll a und b hervorzuheben.<sup>[5,6]</sup> Strukturell sind diese Moleküle ähnlich, jedoch enthält Chlorophyll a eine  $\text{CH}_3$ -Gruppe (Methyl) direkt am aromatischen Ring, während die Methylseitenkette in Chlorophyll b durch eine CHO-Gruppe (Acyl) ersetzt ist (siehe Abb. 2A). Insgesamt weist der aromatische Ring von Chlorophyll (a oder b) ein primäres Absorptionsmaximum im Bereich von 600 und 700 nm auf. Aber aufgrund des gegebenen strukturellen Unterschieds sind die charakteristischen Absorptionseigenschaften von Chlorophyll a und Chlorophyll b deutlich unterschiedlich (siehe Abb. 2B). Nach DIN 38409-60 entspricht das Absorptionsmaximum von Chlorophyll a in Ethanol der Absorption bei 665 nm ( $A_{665}$ ), während Chlorophyll b einen breiteren und weniger ausgeprägten Peak zwischen 610 und 630 nm mit einem Maximum bei ca. 620 nm

aufweist.<sup>[7]</sup> Die Absorption von Chlorophyll a überlappt auch mit weiteren Phytopigmenten (z. B. Phycocyanobilin), insbesondere unterhalb von 650 nm. Diese spektrale Störung ist schwach und wird, wie in DIN 38409-60 beschrieben, durch Ansäuern quantitativ unterdrückt. Dies bezieht sich auf die Absorptionsmessung bei 665 nm vor ( $A_{665v}$ ) und nach ( $A_{665n}$ ) Ansäuerung. Um den möglichen Hintergrundbeitrag von anderen Phytopigmenten zu kompensieren, wird dann die effektive Absorption aus der Differenz zwischen der Absorption  $A_{665}$  und  $A_{750}$  abgeschätzt. Letztere entspricht der Probenabsorption bei 750 nm, die vergleichsweise gering sein sollte. Hier ist der Beitrag der rot absorbierenden Phycobilinpigmente am größten, aber da sie in Ethanol weniger löslich sind als Chlorophyll a, stören sie nur wenig. Der korrigierte Wert wird anschließend für die quantitative Bestimmung genutzt (siehe Ansäuerungsverfahren).

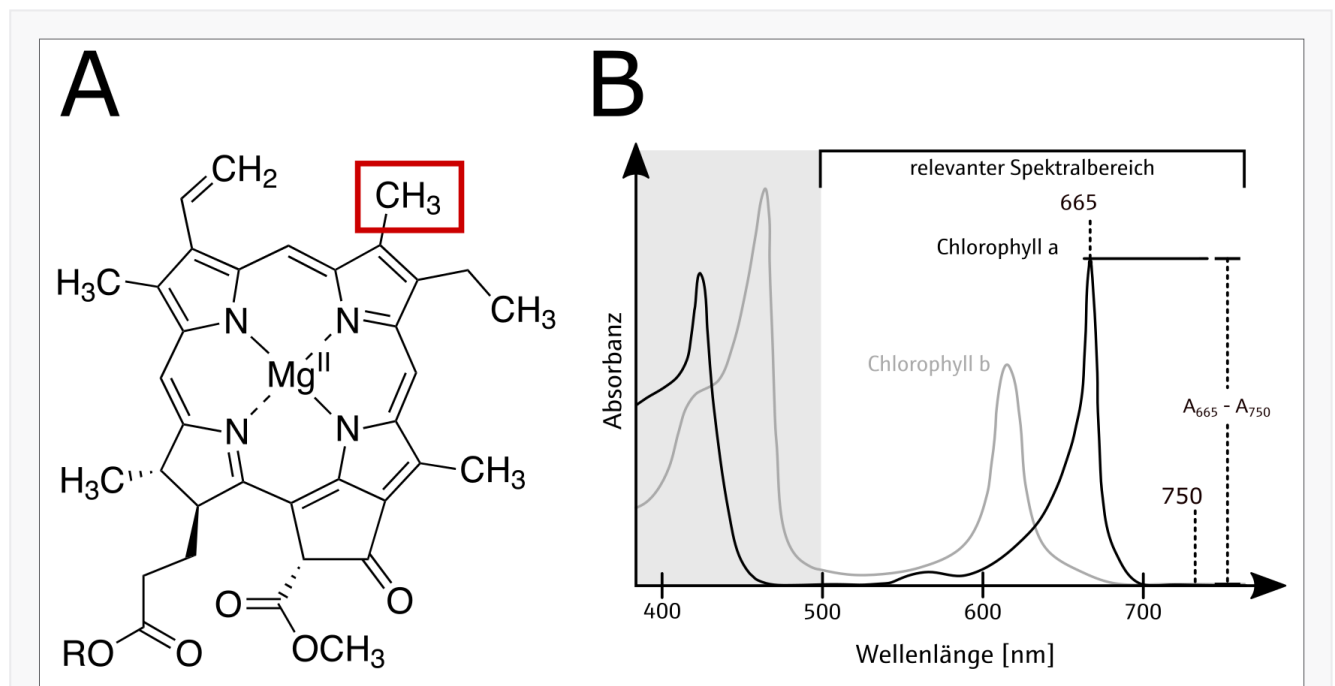


Abbildung 2: (A) Chemische Struktur von Chlorophyll a, Methylgruppe hervorgehoben ( $\text{CH}_3$ , roter Kasten). Chlorophyll b enthält stattdessen eine Acylgruppe (CHO).

(B) Graphische Darstellung der Absorptionsspektren von Chlorophyll a (schwarz) und Chlorophyll b (grau). Angegeben sind die wichtigsten spektroskopischen Merkmale zur Bestimmung der Chlorophyll a-Konzentration ( $A_{665}$ ), der Hintergrundabsorption ( $A_{750}$ ) und der hintergrundkorrigierten Absorption ( $A_{665} - A_{750}$ ). Der relevante Bereich gemäß DIN 38409-60 ist angegeben (interessanter Spektralbereich: 500 bis 800 nm).

### Absorptionsmessung von Süßwasserproben

Alle erfassten Werte sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Die Absorptionswerte bei 665 nm vor ( $A_{665v}$ ) und nach ( $A_{665n}$ ) der Ansäuerung schwanken zwischen ca. 0,350 A und 0,040 A. Beim Ansäuern nimmt die Absorption erheblich ab; die Verringerung schwankt zwischen 12 und 32 %. Also deutet ein höherer  $A_{665n}$ -Wert auf eine höhere Chlorophyll a-Konzentration und somit auf einen stärkeren Beitrag von Phäophytin hin. Letzterer hängt stark von der Absorption  $A_{750}$  ab. Wie erwartet, korrelieren diese Werte (sowohl  $A_{750v}$  als auch  $A_{750n}$ ) nicht mit der Gesamtabsorption bei 665 nm. Hier schwankt der Wert zwischen

0,005 und 0,095 A. Der  $A_{750}$ -Wert ist auch ein Indikator für die untere Nachweisgrenze, da hier keine Absorption für Chlorophyll a und weitere Pigmente zu erwarten ist. Wie erwartet, ist die korrigierte Chlorophyll a-Konzentration  $\rho_c$  erheblich niedriger als die Chlorophyllkonzentration  $\rho_g$  vor der Korrektur. Außerdem ist der Wert für  $\rho_p$  (abgeleitet aus den Absorptionsmessungen) natürlich höher, da er eine größere Menge und Vielfalt von Phytomolekülen umfasst. Das ermittelte Säureverhältnis R zeigt, dass die gemessenen Werte innerhalb der von DIN 38409-60 vorgegebenen Grenzen liegen.

Tabelle 2: Probenvolumen ( $V_p$ ), Probenextraktvolumen ( $V_E$ ), Absorption vor ( $A_{665v}$  und  $A_{750v}$ ) und Absorption nach der Ansäuerung ( $A_{665n}$  und  $A_{750n}$ ), Chlorophyll a-Konzentration ( $\rho_c$ ), Massenkonzentration der Phäopigmente ( $\rho_p$ ), Massenkonzentration von Chlorophyll a vor der Säurekorrektur ( $\rho_g$ ) und Säureverhältnis R für jede Probe.

Probe	$V_p$ [l]	$V_E$ [ml]	$A_{665v}$	$A_{665n}$	$A_{750v}$	$A_{750n}$	$\rho_c$ [ $\mu\text{g/l}$ ]	$\rho_p$ [ $\mu\text{g/l}$ ]	$\rho_g$ [ $\mu\text{g/l}$ ]	Säureverhältnis R
1	2	25	0,0922	0,0807	0,0067	0,0076	0,92	2,87	2,61	1,17
2	2	25	0,1008	0,0939	0,0088	0,0092	0,54	3,85	2,80	1,09
3	2	25	0,2697	0,2363	0,0085	0,0088	2,50	9,30	7,96	1,15
4	2	25	0,2333	0,2033	0,0062	0,0065	2,24	7,96	6,92	1,15
5	2	25	0,3033	0,2068	0,0064	0,0064	7,15	3,24	9,05	1,48
6	2	25	0,3241	0,2550	0,0063	0,0059	5,09	7,82	9,69	1,28
7	2	25	0,0735	0,0576	0,0053	0,0055	1,19	1,51	2,08	1,31
8	2	25	0,0611	0,0488	0,0048	0,0050	0,93	1,34	1,72	1,29

## Zusammenfassung

Die hier beschriebene spektralphotometrische Methode ermöglicht wichtige Einblicke in die Entwicklung von Phytoplankton in Oberflächenwasser. Der Wasserqualitätsparameter Chlorophyll a ist eine labile Verbindung, die ein enges Fenster für eine zuverlässige Quantifizierung bietet. Jedoch ermöglicht die in DIN 38409-60 beschriebene Methode eine schnelle und genaue Bestimmung mit relativ einfacher Probenvorbereitung. Außerdem eröffnet die einfache spektralphotometrische Bestimmung einen Zugang zu verschiedensten Komponenten (z. B. anderen Chlorophyllen und Carotinoiden, Phycobilinmolekülen). So bietet das SPECORD 50 PLUS (siehe Abb. 3) eine starke spektroskopische Leistung, sowie geeignetes Zubehör zur Erfüllung der Anforderungen der Norm hinsichtlich Küvetten-schichtdicke (50 mm) und einen Küvettenwechsler für einen höheren Durchsatz (6-fach Küvettenwechsler, sowohl für 10 als auch für 50 mm Schichtdicke). Schließlich



Abbildung 3: SPECORD 50 PLUS

erlaubt die ASpect UV-Software die vorherige Definition von Methoden, Blindproben und Proben tabellen. Ein höherer Probendurchsatz (bis zu 116 Proben) bei der Chlorophyll a-Bestimmung kann zudem mit dem APG-Autosampler mit Sipper-System erreicht werden.

## Referenzen

- [1] Analytik Jena Applikationsschrift: Spektrophotometrische Bestimmung von Standardparametern in Abwasser nach Normverfahren
- [2] Analytik Jena Applikationsschrift: Palmöl-Qualitätsprüfung entlang der Wertschöpfungskette anhand der UV/Vis-spektralphotometrischen Bestimmung des Bleichindex (DOBI - Deterioration of Bleachability Index) und des Carotingehalts nach ISO 17932:2011
- [3] DIN 38409-60: Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung - Summarische Wirkungs- und Stoffkenngrößen (Gruppe H) - Teil 60: Photometrische Bestimmung der Chlorophyll a-Konzentration in Wasser (H 60)
- [4] DIN 32645: Chemische Analytik - Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze unter Wiederholbedingungen - Begriffe, Verfahren, Auswertung
- [5] Sanchini, A., und Grosjean, M.: Quantification of chlorophyll a, chlorophyll b and pheopigments a in lake sediments through deconvolution of bulk UV-VIS absorption spectra; J. of Paleolimn. 2020, 64, Seiten 243–256
- [6] Shipman, L. L.; Oscillator and Dipole Strengths for Chlorophyll and related Molecules; Photochem. and Photobiol. 1977, 26, Seiten 287–292
- [7] Mölleken, H.; Untersuchung zur Praxistauglichkeit der Bestimmungsmethoden von Photosynthesepigmenten mittels HPLC und Spektralphotometrie, Ruhrverband, 2000

Dieses Dokument ist zum Zeitpunkt der Veröffentlichung wahr und korrekt; die darin enthaltenen Informationen können sich ändern. Dieses Dokument kann durch andere Dokumente ersetzt werden, einschließlich technischer Änderungen und Korrekturen.