

Abschlussbericht

Anschubprojekt:

„Shifted excitation Raman difference spectroscopy testing for analysis of inorganic phosphorus, inositol phosphates (InsP_x) and myo-inositol in environmental and animal samples - SERAIP “

Zuwendungsempfänger: Prof. Dr. K. Wimmers, Leibniz-Institut für Nutztierbiologie (FBN)
Prof. Dr. G. Tränkle, Ferdinand-Braun-Institut, Leibniz-Institut für
Höchstfrequenztechnik (FBH)

Kooperationspartner: PD Dr. B. Sumpf, Dr. M. Maiwald, Ferdinand-Braun-Institut,
Leibniz-Institut für Höchstfrequenztechnik (FBH)
Prof. Dr. P. Leinweber, Professur Bodenkunde, Universität
Rostock
PD Dr. R. Schumann, Biologische Station Zingst, Universität
Rostock

Vorhabensbezeichnung: SERAIP

Laufzeit des Vorhabens: 01.04.-30.06.2019

Autoren: Michael Oster, Martin Maiwald, Bernd Sumpf, Kai Sowoidnich

Inhaltsverzeichnis

Kapitel	Seite
1 Zusammenfassung und Schlussfolgerung	1
2 Einleitung und Ziele des Projektes	1
3 Material und Methoden	2
4 Ergebnisse und Diskussion	2
5 weitere Leistungen und Ziele aus dem Projekt	2
Anhang	3

1. Zusammenfassung und Schlussfolgerung

Der Nachweis von P-haltigen Verbindungen in komplexen Matrices wie Futter, Kot und Boden/Sedimenten ist via Raman-Spektroskopie bzw. SERDS möglich und stellt demnach eine Alternative zur aufwendigen und zeitintensiven chemischen Analyse dar. Im Anschubprojekt SERAIP wurde die Verfahrensweise für folgende Analyten erfolgreich etabliert:

- Calciumphosphate ($\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$; CaHPO_4 ; $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$; $\text{Ca}_2\text{O}_7\text{P}_2$)
- DL- α -Glycerol 6-phosphate magnesium salt hydrate
- β -Glycerophosphate disodium salt hydrate
- Adenosinmonophosphat (AMP) disodium salt
- DNA sodium salt
- Phytat (InsP_6 sodium salt)
- myo-Inositolphosphate (InsP_5 ; InsP_3 trisodium salt)
- myo-Inositol

Die erzielten Ergebnisse im Anschubprojekt tragen dazu bei, den Verbleib von P entlang des landwirtschaftlichen Kreislaufs in Futtermitteln, Tieren, Wirtschaftsdünger, Boden und Wasser nachzuvollziehen. Die Analyse komplexer Probenmatrices wird die laufenden Bemühungen um die Weiterentwicklung des P-Analytik-Handbuchs innerhalb des Leibniz Wissenschaftscampus Phosphorforschung Rostock ergänzen.

2. Einleitung und Ziele des Projektes

In der Ernährung von Hühnern und Schweinen wird der größte Teil des täglichen Bedarfs an P aus Pflanzen in Form von Inositolphosphaten (InsP_x) gewonnen, der jedoch aufgrund fehlender oder mangelnder endogener Phytase-Aktivität nicht effizient eingesetzt werden kann. Analytische Messungen zur Verbesserung des Einsatzes von InsP_x sind daher unerlässlich, um die Umweltbelastung durch die Tierhaltung zu reduzieren und wertvolle mineralische P-Ressourcen zu erhalten.

Die intestinale P-Absorption wird durch die P-Supplementierung aus anorganischen P-Quellen, wie z.B. Mononatriumphosphat, erleichtert und quantitativ verbessert. Im Gegensatz dazu stammt das pflanzlich gebundene P hauptsächlich aus Phytinsäure (Inositolhexakisphosphat; InsP_6) und dessen Salz Phytat. Der schrittweise enzymatische Abbau des InsP_6 durch Phytasen ermöglicht die intestinale Aufnahme von P und myo-Inositol. Die Fähigkeit von Monogastriern, InsP_6 und seine Abbauprodukte (InsP_x) entlang des Magen-Darm-Traktes zu hydrolysieren, ist beträchtlich und wird u.a. von der Darmmikrobiota, der Zusammensetzung des Futters und dem Mineralstoffgehalt der Nahrung beeinflusst. Umfangreiche Untersuchungen an Hühnern und Schweinen wiesen

entsprechend polyphosphorylierte Inositole (z.B. InsP_6 , InsP_5 , InsP_4) in distalen Magen-Darm-Abschnitten nach.

Im Anschubprojekt sollten ausgewählte P-haltige Verbindungen mit alternativen physikalischen Techniken nachgewiesen werden, um in nachfolgenden Untersuchungen zu Boden/Sedimenten bzw. in Fütterungsstudien die effektive Ausnutzung pflanzlicher P-Quellen zu überwachen und damit zur Ressourcenschonung und verminderter P-Exkretion beizutragen.

3. Material und Methoden

Die Raman-Spektroskopie ist eine berührungslose, zerstörungsfreie und etablierte Analysetechnik für organische und anorganische Materialien, die chemische Informationen über die zu untersuchenden Substanzen, insbesondere im Fingerabdruck-Spektralbereich, liefert. Allerdings können Raman-Spektren durch Hintergrundsignale, wie z.B. die durch organische und biologische Komponenten erzeugte Fluoreszenz, überlagert werden. Die SERDS-Technik (engl. *shifted excitation Raman difference spectroscopy*) hat sich als ein leistungsfähiges und einfach zu handhabendes Werkzeug erwiesen. SERDS hat das Potential, Hintergrundinterferenzen durch laserinduzierte Fluoreszenz zu überwinden und ermöglicht die Raman-Spektroskopie für reale Proben- und *in-situ*-Untersuchungen auch unter Umgebungslichtbedingungen. Die Messungen mittels Raman-Spektroskopie und SERDS wurden am Leibniz-FBH durchgeführt.

4. Ergebnisse und Diskussion

Siehe Anhang


5. Weitere Leistungen und Ziele aus dem Projekt

Ergebnisse des Anschubprojektes wurden auf dem Symposiums des Leibniz Wissenschaftscampus Phosphorforschung Rostock (12.-13.11.2019) im Rahmen eines Posters (siehe Anhang) und eines Vortrags vorgestellt („*Shifted excitation Raman difference spectroscopy – Pilot investigations on phosphorus components and selected real-world samples*“). Es ist beabsichtigt, die Ergebnisse in einem entsprechenden Manuskript zu veröffentlichen.

Unter Federführung des Leibniz-FBH wurde im Wettbewerb *Leibniz-Competition* 2019 ein Antrag eingereicht („*Spectrometer free multi-wavelength diode laser Raman spectroscopy for the detection of phosphates in the environment*“; MultiRaP). Dessen Förderung wurde dem Senat der Leibniz-Gemeinschaft allerdings nicht empfohlen. Es wird angestrebt, Fördermöglichkeiten für ein Projekt zur Quantifizierung der InsP_x in Exkreta von Huhn und Schwein auszuloten.

Anhang

Vorgestelltes Poster auf dem Symposium des Leibniz WissenschaftsCampus Phosphorforschung Rostock (12.-13.11.2019).



**LEIBNIZ SCIENCE CAMPUS
PHOSPHORUS RESEARCH
ROSTOCK**

Shifted excitation Raman difference spectroscopy

Pilot investigations on phosphorus components and selected real-world samples

Kay Sowoidnich¹, Martin Maiwald¹, Bernd Sumpf¹, Michael Oster², Peter Leinweber³

¹ Ferdinand-Braun-Institut, Leibniz-Institut für Höchstfrequenztechnik ² Leibniz-Institut für Nutztierbiologie ³ Universität Rostock

1. Seed project SERAIP

Shifted Excitation Raman Difference Spectroscopy (SERDS) testing for analysis of inorganic phosphorus, inositol phosphates (InsPx) and myo-inositol in environmental and animal samples

- Phosphorous (P) is essential element for all living organisms → Sustainable P management required for efficient P usage

Aims of present study:

- Use of **SERDS as powerful analytical technique** (chemically specific, non-destructive, contactless) for sample identification
- Pilot study on selected samples relevant to environmental P-flow

2. From Raman spectroscopy to SERDS

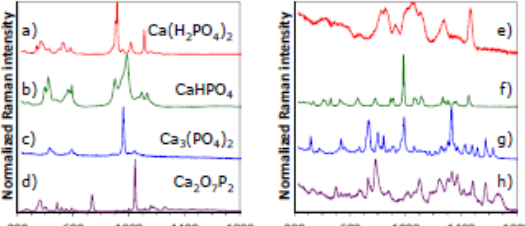
- Raman spectroscopy provides unique molecular fingerprint
- Challenge:** Interference, e.g. from fluorescence or ambient light
- Solution:** SERDS for efficient removal of disturbing contributions

How SERDS works:

- Instrumental approach using two shifted excitation wavelengths → Raman signals shifted along with shift in laser wavelength
- Fluorescence and other interferences essentially unaffected
- Subtraction of the two shifted spectra **separates Raman signals from background components**

3. Raman spectra of selected P compounds

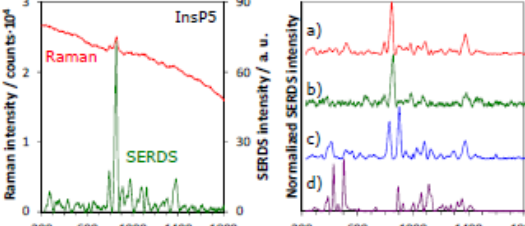
- Conventional Raman well-suited for identification of P species
- Requirement: No significant fluorescence interference occurs



Raman spectra of calcium phosphates (a-d), DL-α-Glycerol 6-phosphate magnesium salt hydrate (e), β-Glycerophosphate disodium salt hydrate (f), AMP disodium salt (g) and DNA sodium salt (h) (t = 10 × 0.1 s), spectra are vertically offset for clarity

4. SERDS spectra of inositol phosphates

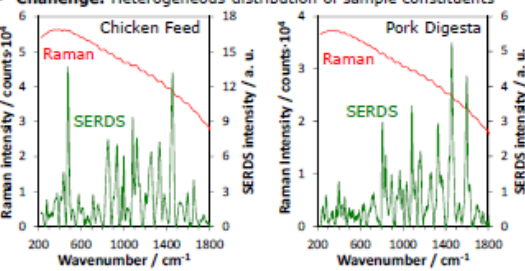
- Pronounced fluorescence interference from organic phosphates
- Only SERDS allows clear discrimination between selected InsPx



Separation between Raman signal and fluorescence interference in the case of InsP5 (t = 10 × 1 s; left) and SERDS spectra of InsP6 sodium salt hydrate (a), InsP5 (b), InsP3 trisodium salt (c) and myo-Inositol (d) (t = 10 × 0.1 s; right), spectra are vertically offset for clarity

5. SERDS spectra of real-world samples

- SERDS enables **recovery of previously masked Raman bands**
- Challenge:** Heterogeneous distribution of sample constituents









Efficient separation of characteristic Raman signals from fluorescence interference demonstrated for chicken feed (t = 100 × 0.1 s; left) and digesta from porcine colon (t = 100 × 0.05 s; right), average of five measurement positions each

6. Conclusion and outlook

- Raman spectroscopy provides **unique fingerprint of sample** → **Identification of different P species** (e. g. along P-flow) possible for undisturbed spectra
- SERDS** is essential requirement for analysis of real-world samples → Efficient **separation of Raman signals from fluorescence**
- Compact and rugged design of customized SERDS setup
- 785 nm microsystem diode laser with low power consumption → **Potential for field studies** of relevant specimens (e. g. from animal to ocean) with future miniaturized SERDS device
- Challenge:** Sensor concept permitting reliable investigation of heterogeneous solids needed

Contact

Priv.-Doz. Dr. Bernd Sumpf – Head of Laser Sensors Lab
Ferdinand-Braun-Institut, Leibniz-Institut für Höchstfrequenztechnik
Gustav-Kirchhoff-Str. 4, 12489 Berlin, Germany
E-Mail: bernd.sumpf@fbh-berlin.de

www.sciencecampus-rostock.de

3