



Substanzspezifische Isotopenanalytik zur Untersuchung des oxidativen Abbaus von Amino(poly-)phosphonaten an Mangandioxid

Philipp R. Martin (philipp.martin@uni-tuebingen.de), Anna Röhnelt (anna.roehnelt@uni-tuebingen.de), Daniel Buchner (daniel.buchner@uni-tuebingen.de), Stefan B. Haderlein (stefan.haderlein@uni-tuebingen.de)

Zentrum für Angewandte Geowissenschaften, Eberhard Karls Universität Tübingen

Kurzfassung

Die substanzspezifische Kohlenstoff-Isotopenanalytik (Kohlenstoff-CSIA) mittels Flüssigchromatographie gekoppelt an Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie (LC-IRMS) ist ein neues, vielversprechendes Werkzeug zur Untersuchung des Umweltverhaltens polarer organischer Schadstoffe. Dieser Artikel gibt eine kurze Einführung in die Analysemethode und zeigt am Beispiel der synthetischen Komplexbildnergruppe der Amino(poly-)phosphonate das Potenzial der Methode. In Laborexperimenten wurde die Veränderung der Kohlenstoff-Isotopenwerte von Iminodimethylenphosphonsäure (IDMP) und Aminotrimethylenphosphonsäure (ATMP) während der Oxidation an Mangandioxid verfolgt. Die Verschiebung der Kohlenstoff-Isotopenwerte mit fortschreitender Reaktion zeigt, dass der Abbau von ATMP und IDMP qualitativ mittels Kohlenstoff-CSIA nachgewiesen werden kann. Da die Abbauprodukte der untersuchten Stoffklasse allesamt unspezifisch sind (z.B. PO_4^{3-}), bietet die Isotopenanalyse somit die Möglichkeit, einen Abbau auch in natürlichen Systemen nachzuweisen. Weitere Forschung hinsichtlich einer Optimierung der Technik (z.B. Matrixeffekte, Nachweisgrenzen) ist jedoch notwendig, um die Analyse von Amino(poly-)phosphonaten in umweltrelevanten Konzentrationen zu ermöglichen.

Einleitung

Substanzspezifische Kohlenstoff-Isotopenanalyse

Die substanzspezifische Isotopenanalyse (engl. compound specific isotope analysis, CSIA) ist ein etabliertes Verfahren zur Untersuchung des Umweltverhaltens organischer Schadstoffe.¹ CSIA erlaubt beispielsweise die Identifizierung von Schadstoffquellen und den qualitativen (und unter gewissen Rahmenbedingungen quantitativen) Nachweis von Schadstoff-Abbau - ohne Analyse der Abbauprodukte.^{1,2} Zudem ermöglicht diese Technik zwischen verschiedenen Prozessen wie zum Beispiel Sorption und Abbau zu unterscheiden und folglich Rückschlüsse hinsichtlich eines Nettoverlustes der Schadstoffmengen zu ziehen.³

Die Grundlage für Isotopen-basierte Untersuchungen beruht auf dem unterschiedlichen Verhalten der Isotopologe (Moleküle gleicher Struktur, aber unterschiedlicher Isotopenzusammensetzung; beispielsweise $^{12}\text{CO}_2$ und $^{13}\text{CO}_2$) einer Substanz bei chemischen und physikalischen Prozessen. Das Verhältnis

der stabilen Kohlenstoffisotope ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) einer Substanz kann vereinfacht als ein Pool bestehend aus ^{13}C und ^{12}C betrachtet werden. Beim Bindungsbruch reagieren Moleküle mit ^{12}C an der reaktiven Stelle etwas schneller als solche mit ^{13}C , wodurch es mit fortschreitender Reaktion zu einer Anreicherung des ^{13}C im verbleibenden Edukt kommt (kinetischer Isotopeneffekt, KIE).^{2,4} In der Folge verschiebt sich das $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis stetig zu positiveren Werten im Vergleich zum Startwert.⁴ Der Nachweis von Transformationsprozessen mittels Isotopenanalyse beruht auf einer messbaren Isotopenfraktionierung.^{5,6} Im Gegensatz zu vielen Transformationsprozessen, treten bei physikalischen Prozessen wie Sorption und Verdünnung organischer Schadstoffe jedoch keine, oder nur eine vernachlässigbar kleine Kohlenstoff-Isotopenfraktionierung auf.

Die Angabe des Isotopenverhältnisses erfolgt dabei in der Delta-Notation und wird aufgrund der geringen Abweichungen standardmäßig als Promillewert angegeben. Hierbei wird das Isotopenverhältnis der zu untersuchenden Substanz ($R_S = ^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) in Relation zu einer international verwendeten Referenzsubstanz (R_{Ref}) gesetzt:^{2,7}

$$\delta^{13}C_{S,ref} = \frac{R_S - R_{Ref}}{R_{Ref}} \cdot 1000 \text{ ‰}$$

Die Bestimmung des $\delta^{13}\text{C}$ -Werts einer Einzelsubstanz in komplexen Matrices erfordert zunächst eine Trennung der Analyten. Anschließend wird die zu untersuchende Substanz vollständig in CO_2 umgewandelt und die CO_2 -Isotopologe ($^{12}\text{CO}_2$ und $^{13}\text{CO}_2$) in einem Isotopenverhältnis-Massenspektrometers (engl. isotope ratio mass spectrometer, IRMS) detektiert.⁸ Anhand der Signalverhältnisse der CO_2 -Isotopologe werden daraufhin die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte der Substanzen bestimmt.

Bereits routinemäßige Anwendung findet die Online-Kopplung eines Gaschromatographen und eines IRMS bei der Analyse von leichtflüchtigen Schadstoffen wie Perchlorethen (PCE) oder leichtflüchtigen aromatischen Kohlenwasserstoffen (BTEX).⁵ Seit 2004 steht eine Kopplung zwischen IRMS und Flüssigchromatographie (HPLC) kommerziell zur Verfügung (LC-IRMS, schematischer Aufbau siehe Abbildung 1). Diese ermöglicht die Kohlenstoff-Isotopenanalytik polarer, schwerflüchtiger Substanzen wie Glyphosat oder Polyphosphonaten.⁸

Die Umwandlung der Analyten zu CO_2 ist hierbei durch eine nasschemische Oxidation mittels Persulfat realisiert. Das gebildete CO_2 wird anschließend in einem CO_2 -Austauscher aus der Flüssigphase in einen Heliumstrom überführt und nach Trocknung in das IRMS geleitet.

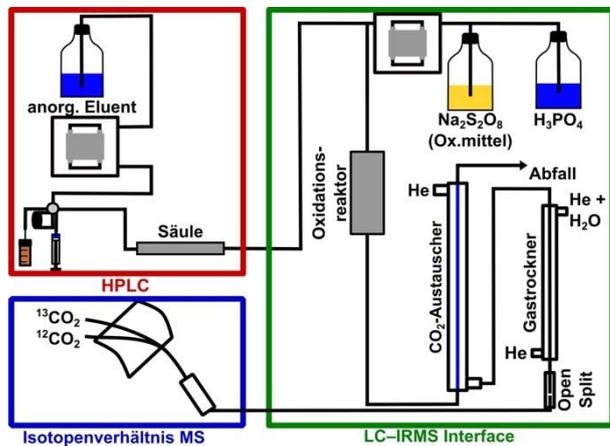


Abb. 1. Schematischer LC-IRMS Aufbau, bestehend aus (i) HPLC zur Substanztrennung (anorganischer/ C-freier Eluent), (ii) Interface zur Oxidation und Überführung des CO_2 in die Gasphase und (iii) Massenspektrometer (IRMS) zur Bestimmung des Isotopenverhältnisses.

Die notwendige Optimierung der Bedingungen zur quantitativen Oxidation der Analyten, die geringe Sensitivität des IRMS (Quantifizierungslimit im mg/L -Bereich), sowie die Beschränkung auf Kohlenstoff-freie Eluenten erschweren eine Routineanwendung der Kohlenstoff-Isotopenanalyse mittels LC-IRMS.^{7,9} Dennoch zeigen bereits publizierte Untersuchungen das große Potential dieser Technik, um zum Beispiel Prozesse wie Abbau und Sorption zu unterscheiden.³

Aminopolyphosphonate – Eigenschaften und Umweltverhalten

Polyphosphonate (PP) umfassen eine Gruppe von organischen Substanzen, welche mindestens drei Phosphonatgruppen ($\text{R}-\text{C}-\text{PO}_3^{2-}$) aufweisen. Sie sind (i) starke Chelatbildner für zwei- und dreiwertige Kationen (z. B. Fe(III) oder Ca(II)), (ii) stabil gegenüber Hydrolyse sowie thermischer Zersetzung und (iii) sehr gut wasserlöslich.^{10–13} Aufgrund dieser Eigenschaften werden PPs seit einigen Jahren vermehrt als Komplexbildner, Kesselsteinhemmer und Bleichmittelstabilisatoren in verschiedensten Industrie- und Haushaltsanwendungen eingesetzt. In Waschmitteln, Kosmetika oder Bleichmitteln ersetzen sie zunehmende die kontrovers diskutierten Aminopolycarboxylate (z.B. EDTA) und Polyphosphate.¹¹ Drei der fünf mengenmäßig meist verwendeten PPs sind Aminopolyphosphonate (APP), sprich PPs mit tertiäre(n) Aminogruppe(n) (siehe Abbildung 2).¹³

Studien lassen vermuten, dass APPs primär durch Adsorptionsprozesse (z.B. an Klärschlamm, Eisen(hydr)oxide) aus der wässrigen Phase entfernt werden. In Kläranlagen wurden Eliminierungsraten zwischen 50 % und nahezu 100 % ermit-

telt.¹⁴ Adsorption an Partikel in der Schwebfracht und die Bildung von wasserlöslichen Komplexen führen jedoch zu einem Austrag von APPs aus den Kläranlagen und folglich zu Anreicherung in Gewässern und Sedimenten.^{13,14} Dort tragen sie zur Erhöhung des Gesamtphosphorgehalts bei.

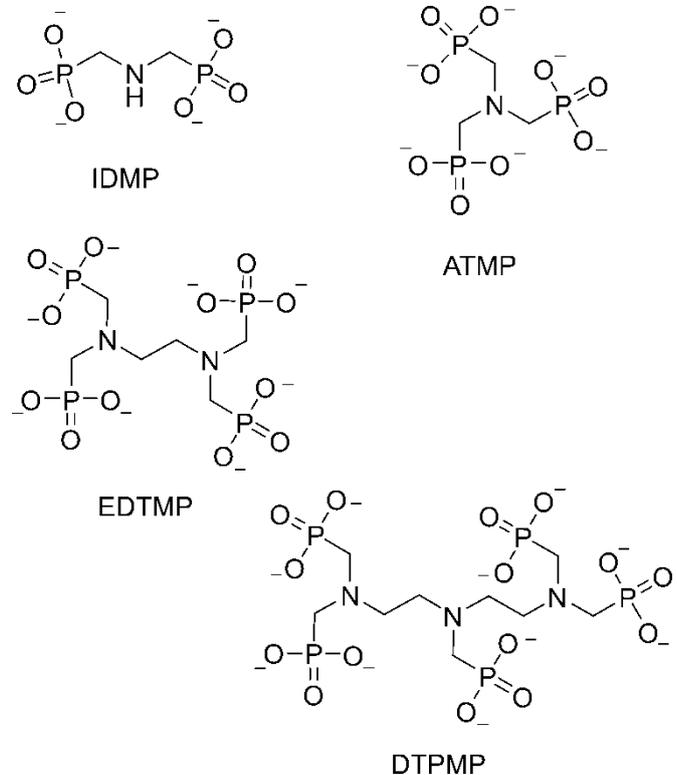


Abb. 2. Iminodimethylenphosphonsäure (IDMP), Aminotris(methylen)phosphonsäure (ATMP), Ethylendiamintetramethylenphosphonsäure (EDTMP) und Diethylentriaminpenta(methylen)phosphonsäure (DTPMP) jeweils in vollständig deprotonierter Form.

APPs gelten nicht als akut oder chronisch toxisch und basierend auf ihrer hohen Wasserlöslichkeit wird eine Bioakkumulation ausgeschlossen.¹⁶ Aufgrund des begrenzten Wissens über potenziell indirekte Umweltauswirkungen, wie z.B. Gewässereutrophierung oder Remobilisierung von Schwermetallen, ist eine genauere Untersuchung des Umweltverhaltens von APPs und ihren Eliminierungsprozessen notwendig.^{13,15,17}

Ein potentiell bedeutsamer Transformationsprozess ist die Oxidation durch Mangan, welcher in Laborversuchen bereits in wässriger Lösung (Mn(II/III) -katalysiert), als auch an Manganhydroxiden beobachtet wurde.^{3,18–20} Der Abbau an Mangandioxid (MnO_2) wurde bisher lediglich für die Monophosphonate Glyphosat und dessen Transformationsprodukt Aminomethylphosphonsäure (AMPA) in Laborsystemen untersucht.²¹ Die Anwendung von CSIA kann hierbei wertvolle Einblicke in das Umweltverhalten von APPs liefern und zudem helfen verschiedene Transformationsprozesse zu unterscheiden. Diese Einblicke sind basierend auf Konzentrationsbestimmungen nicht möglich, da die Transformationsprodukte unspezifisch und teilweise sehr kurzlebig sind.

Für die vorliegende Studie wurde die Oxidation von ATMP, sowie Iminodimethylenphosphonsäure (IDMP, siehe Abb. 2) an MnO_2 untersucht. IDMP ist sowohl (i) ein Transformationsprodukt von APPs, als auch (ii) eine Vorläuferverbindung von AMPA und daher von hoher Umweltrelevanz.^{18,19,22}

Material und Methoden

Die Oxidation von 1 mM IDMP und ATMP an MnO_2 wurde in Batchversuchen bei Raumtemperatur ($22 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$) und pH 6.5 ± 0.5 unter oxidischen Bedingungen untersucht. Für IDMP wurde kommerzielles Mn(IV)O_2 ($\geq 98 \%$, Carl Roth) verwendet. Aufgrund der hohen Reaktivität von ATMP musste bei diesem Versuch auf das kristallinere Mineral Pyrolusit ($\beta\text{-MnO}_2$) zurückgegriffen werden, welches durch Komproportionierung von KMnO_4 und MnCl_2 bei 180 °C für 60 min synthetisiert wurde.²³ Nach der Probenahme wurde für 15 min bei 20 000 g zentrifugiert und dann filtriert ($0.22 \mu\text{m}$). Durch Entfernung des in den Proben gelösten Mangans, welches durch die reduktive Auflösung des MnO_2 entsteht, mittels Kationenaustauscher (DOWEX® 50 W X 8, 100-200 mesh, H^+ Form), wurden die Phosphonsäuren in ihre freie, protonierte Form überführt. Dieser Schritt ist für eine reibungsfreie Quantifizierung der Analyten mittels Ionenchromatographie nötig. Die Quantifizierung erfolgte durch externe Standards auf einem Brechungsindex-(ATMP), beziehungsweise Leitfähigkeitsdetektor (IDMP). Das Kohlenstoff-Isotopenverhältnis von IDMP und ATMP wurde gemäß der von uns in einer früheren Arbeit publizierten LC-IRMS Methode bestimmt.³

Ergebnisse und Diskussion

In Anwesenheit von MnO_2 wurde eine Transformation von ATMP und IDMP beobachtet (**Abbildung 3(a)**). Der Nachweis des Abbauproduktes ortho-Phosphat in beiden Ansätzen schließt Sorption als Grund der Konzentrationsabnahme aus. Die Oxidation läuft folglich über einen C–P Bindungsbruch ab, wie bereits für verwandte Amino(poly)phosphonate postuliert.^{20,24}

Die fortschreitende Konzentrationsabnahme von ATMP und IDMP war mit einer Anreicherung von ^{13}C und folglich mit zunehmend positiveren $\delta^{13}\text{C}$ -Werten assoziiert (siehe **Abbildung 3(b)**). Somit ist ein Nachweis der Transformation von ATMP und IDMP durch Kohlenstoff-CSIA möglich. Die für einen Abbau indikative Anreicherung von $\geq 2 \text{ ‰}$ wurde nach einer Transformation von 40 % des IDMP bzw. 60 % des ATMP erreicht.⁶ Eine Elimination durch Sorption kann ausgeschlossen werden, da für diesen Prozess keine signifikante ^{13}C -Anreicherung zu erwarten ist, wie in **Abbildung 4** schematisch dargestellt.

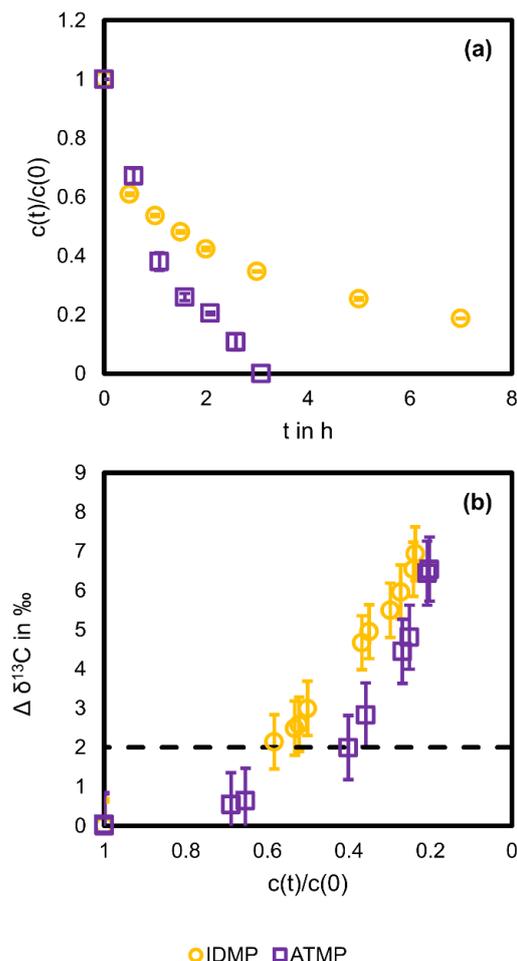


Abb. 3. (a) Normierte Konzentration ($c_0 = 1 \text{ mM}$) als Funktion der Zeit und (b) Verschiebung des $\delta^{13}\text{C}$ -Isotopenwerts ($\Delta \delta^{13}\text{C}$) als Funktion der normierten Konzentration für die Oxidation von IDMP und ATMP an Mangandioxid. Fehlerbalken entsprechen (a) der Abweichung der experimentellen Duplikate und (b) dem Standardfehler für $\delta^{13}\text{C}$ -CSIA von 0,5 ‰. Die gestrichelte Linie in (b) gibt die Grenze für einen qualitativen Nachweis des Abbaus ($\geq 2 \text{ ‰}$) an.

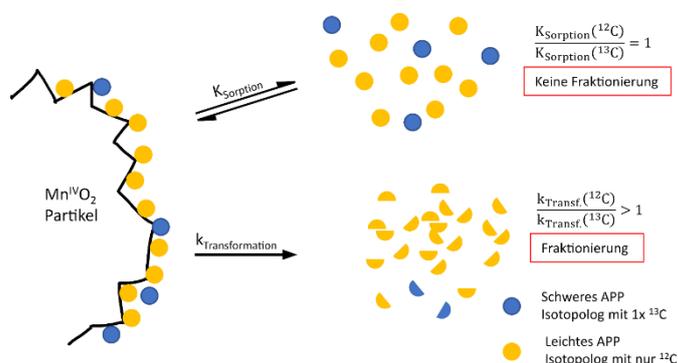


Abb 4. Schematische Darstellung der zu erwartenden Isotopenfraktionierung während der Gleichgewichts-Sorption (oben, mit der Gleichgewichtskonstante K_{Sorption}), beziehungsweise des oxidativen Abbaus (unten, mit der Reaktionsratenkonstante $k_{\text{Transformation}}$) der APPs IDMP und ATMP an MnO_2 .

Die hier präsentierten Ergebnisse zeigen, dass durch Kohlenstoff-CSIA mittels LC-IRMS der Abbau von IDMP und ATMP an MnO₂ nachgewiesen werden kann, ohne dass hierzu Informationen über Transformationsprodukte nötig sind. Dies ist im Fall der untersuchten Substanzklasse ein entscheidender Vorteil, da die Transformationsprodukte allesamt unspezifisch sind. So ist Phosphat, das in dieser Laborstudie als eindeutiger Indikator für die Transformation genutzt wurde, ubiquitär in der Umwelt anzutreffen und kann folglich nicht zum Nachweis des Umsatzes von IDMP und ATMP in Umweltsystemen herangezogen werden. Des Weiteren stellt IDMP ein potenzielles Transformationsprodukt von ATMP, jedoch auch von anderen APPs dar.^{19,25} Die weitere Oxidation von IDMP führt zu der Bildung von AMPA, welches ebenfalls ein Transformationsprodukt von Glyphosat ist und sich somit als Indikator-Substanz für APP-Abbau nicht eignet.²⁶

Folglich liefert der Nachweis einer Anreicherung an ¹³C mittels CSIA ein Werkzeug, um den Abbau von APPs in Umweltsystemen nachzuweisen. Für die Möglichkeit einer quantitativen Aussage über den Fortschritt des Abbaus basierend auf Isotopendaten ist weitere Forschung mit Hinblick auf (i) die Variabilität der zu beobachtende Isotopenfraktionierung, und (ii) eine Verbesserung der analytischen Limitationen des LC-IRMS nötig.

Literatur

- (1) Aelion, C. M.; Höhener, P.; Hunkeler, D.; Aravena, R. *Environmental Isotopes in Biodegradation and Bioremediation*; CRC Press, 2009.
- (2) Elsner, M. Stable Isotope Fractionation to Investigate Natural Transformation Mechanisms of Organic Contaminants: Principles, Prospects and Limitations. *Journal of Environmental Monitoring* **2010**, 12 (11), 2005–2031.
- (3) Martin, P. R.; Buchner, D.; Jochmann, M. A.; Haderlein, S. B. Stable Carbon Isotope Analysis of Polyphosphonate Complexing Agents by Anion Chromatography Coupled to Isotope Ratio Mass Spectrometry: Method Development and Application. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2020**, 412 (20), 4827–4835.
- (4) Jochmann, M. A.; Schmidt, T. C. *Compound-Specific Stable Isotope Analysis*; The Royal Society of Chemistry, 2012.
- (5) Thullner, M.; Centler, F.; Richnow, H.-H.; Fischer, A. Quantification of Organic Pollutant Degradation in Contaminated Aquifers Using Compound Specific Stable Isotope Analysis – Review of Recent Developments. *Organic Geochemistry* **2012**, 42 (12), 1140–1460.
- (6) Hunkeler, D.; Merckenstock, R. U.; Sherwood Lollar, B.; Schmidt, T. C.; Wilson, J. T. Guide for Assessing *Biodegradation and Source Identification of Organic Ground Water Contaminants Using Compound Specific Isotope Analysis (CSIA)*; US EPA, 2008.
- (7) Elsner, M.; Jochmann, M. A.; Hofstetter, T. B.; Hunkeler, D.; Bernstein, A.; Schmidt, T. C.; Schimmelmann, A. Current Challenges in Compound-Specific Stable Isotope Analysis of Environmental Organic Contaminants. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2012**, 403 (9), 2471–2491.
- (8) Krummen, M.; Hilker, A. W.; Juchelka, D.; Duhr, A.; Schlüter, H. J.; Pesch, R. A. New Concept for Isotope Ratio Monitoring Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2004**, 18 (19), 2260–2266.
- (9) Köster, D.; Sanchez Villalobos, I. M.; Jochmann, M. A.; Brand, W. A.; Schmidt, T. C. New Concepts for the Determination of Oxidation Efficiencies in Liquid Chromatography-Isotope Ratio Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* **2019**, 91 (8), 5067–5073.
- (10) Rott, E.; Steinmetz, H.; Metzger, J. W. Organophosphonates: A Review on Environmental Relevance, Biodegradability and Removal in Wastewater Treatment Plants. *Science of The Total Environment* **2018**, 615, 1176–1191.
- (11) Studnik, H.; Liebsch, S.; Forlani, G.; Wieczorek, D.; Kafarski, P.; Lipok, J. Amino Polyphosphonates - Chemical Features and Practical Uses, Environmental Durability and Biodegradation. *New Biotechnology* **2015**, 32 (1), 1–6.
- (12) Nowack, B. Environmental Chemistry of Phosphonates. *Water Research* **2003**, 37 (11), 2533–2546.
- (13) Popov, K.; Rönkkömäki, H.; J Lajunen, L. H. Critical Evaluation of Stability Constants of Phosphonic Acids (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry* **2001**, 73 (10), 1641–1677.
- (14) Nowack, B. Aminopolyphosphonate Removal during Wastewater Treatment. *Water Research* **2002**, 36 (18), 4636–4642.
- (15) Nowack, B.; Stone, A. T. The Influence of Metal Ions on the Adsorption of Phosphonates onto Goethite. *Environmental Science and Technology* **1999**, 33 (20), 3627–3633.
- (16) Knepper, T. P. Synthetic Chelating Agents and Compounds Exhibiting Complexing Properties in the Aquatic Environment. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* **2003**, 22 (10), 708–724.
- (17) Nowack, B.; Vanbriesen, J. M. Chelating Agents in the Environment. In Nowack, B.; Vanbriesen, J. M. (Ed.) *Biogeochemistry of Chelating agents* (1-18). American Chemical Society, 2005.
- (18) Nowack, B.; Stone, A. T. Homogeneous and Heterogeneous Oxidation of Nitritotris(methylene)phosphonic Acid (NTMP) in the Presence of Manganese(II, III) and Molecular Oxygen. *Journal of Physical Chemistry B* **2002**, 106 (24), 6227–6233.
- (19) Nowack, B.; Stone, A. T. Manganese-Catalyzed Degradation of Phosphonic Acids. *Environmental Chemistry Letters* **2003**, 1 (1), 24–31.
- (20) Nowack, B.; Stone, A. T. Degradation of Nitritotris(Methylenephosphonic Acid) and Related (Amino)Phosphonate Chelating Agents in the Presence

- of Manganese and Molecular Oxygen. *Environmental Science and Technology* **2000**, 34 (22), 4759–4765.
- (21) Barrett, K. A.; McBride, M. B. Oxidative Degradation of Glyphosate and Aminomethylphosphonate by Manganese Oxide. *Environmental Science and Technology* **2005**, 39 (23), 9223–9228.
- (22) Lesueur, C.; Pfeffer, M.; Fuerhacker, M. Photodegradation of Phosphonates in Water. *Chemosphere* **2005**, 59 (5), 685–691.
- (23) Chen, K.; Dong Noh, Y.; Li, K.; Komarneni, S.; Xue, D. Microwave–Hydrothermal Crystallization of Polymorphic MnO₂ for Electrochemical Energy Storage. *The Journal of Physical Chemistry C* **2013**, 117 (20), 10770–10779.
- (24) Li, H.; Joshi, S. R.; Jaisi, D. P. Degradation and Isotope Source Tracking of Glyphosate and Aminomethylphosphonic Acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2016**, 64 (3), 529–538.
- (25) Kuhn, R.; Jensch, R.; Bryant, I. M.; Fischer, T.; Liebsch, S.; Martienssen, M. The Influence of Selected Bivalent Metal Ions on the Photolysis of Diethylenetriamine Penta(Methylenephosphonic Acid). *Chemosphere* **2018**, 210, 726–733.
- (26) Grandcoin, A.; Piel, S.; Baurès, E. Aminomethylphosphonic Acid (AMPA) in Natural Waters: Its Sources, Behavior and Environmental Fate. *Water Research* **2017**, 117, 187–197.

Korrespondenzadresse

Dr. Daniel Buchner
Zentrum für Angewandte Geowissenschaften
Eberhard Karls Universität Tübingen
Schnarrenbergstr. 94-96
72076 Tübingen
Tel: +49-(0)7071-29-73167
E-Mail: daniel.buchner@uni-tuebingen.de