

3. GRUNDLAGEN DER FESTPHASENMIKROEXTRAKTION

3.1. FUNKTIONSPRINZIP

Ziel der Entwicklung einer neuen Methode zur Probenaufarbeitung war es, die einzelnen, teils zeitaufwendigen Schritte bisheriger Probenaufbereitungsmethoden, wie Extraktion, Konzentration, Transfer zum Gaschromatographen und Injektion, zusammenzufassen und zu vereinfachen. Zu diesem Zweck wurde von PAWLISZYN [1, 108] die Festphasenmikroextraktion entwickelt. Die Extraktion erfolgt durch eine Polymerschicht, die auf einer Glasfaser aufgebracht ist. Diese Glasfaser ist in der Kanüle einer modifizierten Spritze untergebracht. Die Wirkungsweise der Festphasenmikroextraktion ist in Abbildung 1 dargestellt:

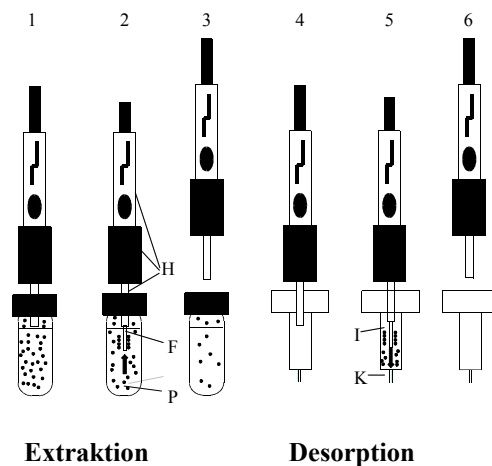


Abb.1 Funktionsprinzip der SPME

- 1) Einführen der **H**alterung in das Probengläschen
- 2) Einführen der **F**aser in die **P**robe oder deren Dampfraum durch Niederdrücken des Stempels; Extraktion des Analyten im Temperaturbereich von 25 °C bis 100 °C, unterstützt durch Rühren, Schütteln oder Ultraschall
- 3) Rückführung der Faser nach erfolgter Extraktion in die Halterung
- 4) Überführung der Faser zum Gaschromatographen
- 5) Injektion durch Niederdrücken des Stempels in den **I**njektor des Gaschromatographen; Thermodesorption der Faser bei Temperaturen von 200 °C bis 300 °C Separation der Analyten auf der **K**apillarsäule
- 6) Rückführung der Faser nach vollständiger Desorption in die Halterung
Möglichkeit zum Einsatz für weitere Extraktionen

3.2. ANWENDUNG

Mit der SPME können Analyten aus einer Flüssigkeit (durch Eintauchen oder über den Dampfraum/Headspace) oder aus Feststoffen (über den Dampfraum) auf eine beschichtete Fused-Silica-Faser extrahieren. Für die GC-Analyse wird die Faser in den GC-Injektor eingeführt, für die HPLC-Analyse in die Desorptionskammer des SPME-HPLC-Interface.

Typische Anwendungen der SPME sind:

- Wasserproben in der Umweltanalytik
- industrielle Applikationen, z.B. Tenside
- Headspace-Analyse von Spuren von Verunreinigungen in Polymeren und festen Proben
- Nahrungsmittelanalytik, z.B. Aromastoffe
- Forensische Analysen
- Toxikologische Analysen: Blutalkohol oder Drogen im Urin/Serum
- Geruchsstoffe im ppt-Bereich

| Anwendungsgebiet | Beschichtungsart |
|---|--|
| für Gase und niedermolekulare Verbindungen | 75 µm Carboxen/Polydimethylsiloxan 85 µm Carboxen/Polydimethylsiloxan |
| für flüchtige Verbindungen | 100 µm Polydimethylsiloxan (PDMS) |
| für flüchtige Verbindungen, Amine und Nitroaromaten | 65 µm Polydimethylsiloxan/Divinylbenzen |
| für polare halbflüchtige Verbindungen | 85 µm Polyacrylat (PA) |
| für unpolare hochmolekulare Verbindungen | 7 µm Polydimethylsiloxan |
| für unpolare halbflüchtige Verbindungen | 30 µm Polydimethylsiloxan |
| für Alkohole und polare Verbindungen | 65 µm Carbowax/Divinylbenzen (CW-DVB) 70 µm Carbowax/Divinylbenzen |
| für Aromen (flüchtig und halbflüchtig), Geruchsstoffe | 50 µm Divinylbenzen/Carboxen auf 30 µm Polydimethylsiloxan |
| für Amine und polare Verbindungen (HPLC) | 60 µm Polydimethylsiloxan/Divinylbenzen |
| für oberflächenaktive Stoffe (HPLC) | 50 µm Carbowax/matrizierter Harz |

Tab. 1. Übersicht über Faserbeschichtungen und ihren Einsatz in der Analytik

3.3. THERMODYNAMIK

3.3.1. GLEICHGEWICHTSBETRACHTUNGEN BEI DIREKTER SPME

Aufgrund der physikochemischen Eigenschaften des Polymers (PDMS: Schmelzpunkt = -50 °C; Glasübergangstemperatur = -126 °C) folgt die Extraktion den Gesetzen der klassischen Flüssig-Flüssig-Extraktion [109]. Es stellt sich ein Verteilungsgleichgewicht zwischen zwei Lösungen des Analyten in zwei nicht mischbaren Flüssigkeiten ein:



(K_{fs} = Faser-Lösung-Verteilungskonstante des Analyten)

Für das chemische Potenzial des Analyten in beiden Lösungen gilt:

$$\mu_s = \mu_s^\ominus + RT \cdot \ln a_s \quad \mu_f = \mu_f^\ominus + RT \cdot \ln a_f \quad (2)$$

(μ_s = chemisches Potenzial des Analyten in der Lösung, μ_s^\ominus = chemisches Standardpotenzial des Analyten in der Lösung, R = Gas-konstante = 8.314510 J/(K•mol), T = Temperatur, a_s = Aktivität des Analyten in der Lösung, μ_f = chemisches Potenzial des Analyten in der Faser, μ_f^\ominus = chemisches Standardpotenzial des Analyten in der Faser, a_f = Aktivität des Analyten in der Faser)

Im Gleichgewicht gilt $\mu_s = \mu_f$. Daraus folgt:

$$\ln \frac{a_f}{a_s} = \frac{\mu_s^\theta - \mu_f^\theta}{RT} \quad (3)$$

da die chemischen Standardpotenziale des Analyten von der Temperatur und nur wenig vom Druck abhängig sind. Das NERNST'sche Verteilungsgesetz gilt bei Konstanz beider Variablen und mit $a = f \cdot c$ ($f =$ Aktivitätskoeffizient $= 1$ bei unendlich verdünnten Lösungen, $c =$ Konzentration) ergibt sich:

$$K_{fs} = \frac{c_f^\infty}{c_s^\infty} \quad (4)$$

($c_f^\infty =$ Gleichgewichtskonzentration des Analyten in der Faser ($t = \infty$),
 $c_s^\infty =$ Gleichgewichtskonzentration des Analyten in der Lösung)

und daraus folgt:

$$n_f = K_{fs} V_f c^0 \quad (5)$$

($n_f =$ Stoffmenge des Analyten auf der Faser, $V_f =$ Volumen der Faserbeschichtung, $c^0 =$ Ausgangskonzentration des Analyten)

Gleichung (5) gilt allerdings nur für große Probenvolumina mit der Annahme, dass sich die Ausgangskonzentration aufgrund eines kleinen Verteilungskoeffizienten nur geringfügig ändert.

Bei kleinen Probenvolumina (ca. 2 ml) und einem großen Verteilungskoeffizienten kann die Extraktion jedoch nahezu erschöpfend sein. Aufgrund der Verringerung der Analytkonzentration in der Probe während des Extraktionsvorganges kann Gleichung (5) nicht mehr genutzt werden. Die modifizierte Gleichung lautet:

$$n_f = \frac{K_{fs} V_f n^0}{K_{fs} V_f + V_s} = f(n^0) \quad (6)$$

(n^0 = Ausgangsstoffmenge des Analyten, V_s = Volumen der Lösung)

Entsprechend Gleichung (6) ist ersichtlich, dass die Stoffmenge in der Faser, n_f , linear abhängig von der Ausgangsstoffmenge des Analyten in der Probe, n^0 (der Zielgröße), ist. Damit ist die Grundlage für eine quantitative Methode gegeben.

3.3.2. GLEICHGEWICHTSBETRACHTUNGEN BEI HEADSPACE-SPME

Die Stoffmenge des Analyten, die von der polymeren Beschichtung extrahiert wird, bezieht sich auf das Gesamtgleichgewicht des Analyten in dem Drei-Phasen-System. Nur die Absolutmenge des Analyten bleibt während der gesamten Extraktion konstant, bekannt als die eingesetzte Ausgangsstoffmenge:

$$c^0 V_s = c_f^\infty V_f + c_h^\infty V_h + c_s^\infty V_s \quad (7)$$

(c_h^∞ = Gleichgewichtskonzentration des Analyten im Gasraum, V_h = Volumen des Gasraumes)

Wenn die Faser-Gasraum-Verteilungskonstante mit $K_{fh} = c_f^\infty / c_h^\infty$ und die Faser-Lösungs-Verteilungskonstante mit $K_{fs} = c_f^\infty / c_s^\infty$ definiert ist, kann die auf der Faser extrahierte Stoffmenge des Analyten, $n_f = c_f^\infty \cdot V_f$, als

$$n_f = \frac{K_{fh} K_{hs} V_f c^0 V_s}{K_{fh} K_{hs} V_f + K_{hs} V_h + V_s} \quad (8)$$

(K_{hs} = Gasraum-Lösungs-Verteilungskonstante des Analyten)

beschrieben werden. Die treibende Kraft im Multiphasengleichgewicht ist die Differenz zwischen den chemischen Potenzialen des Analyten in den drei Phasen. In den folgenden Gleichgewichtsbetrachtungen befindet sich ein Analyt in einem Multiphasensystem, das aus einem flüssigen Polymer, einem Headspace- und einer wässrigen Phase besteht.

Die chemischen Potenziale eines Analyten in diesem System können als

$$\mu_h = \mu^0(T) + RT \cdot \ln(p_h/p^0) \quad (9)$$

$$\mu_f = \mu^0(T) + RT \cdot \ln(p_f/p^0) \quad (10)$$

$$\mu_s = \mu^0(T) + RT \cdot \ln(p_s/p^0) \quad (11)$$

(μ_h = chemisches Potenzial des Analyten im Gasraum, μ^0 = chemisches Ausgangspotenzial des Analyten, p_h = Dampfdruck des Analyten im Gasraum, p^0 = Tabellierungsdruck = 101.325 kPa, p_f = Dampfdruck des Analyten in der Faser, p_s = Dampfdruck des Analyten in der Lösung)

ausgedrückt werden [109]. Wenn das Drei-Phasen-System im Gleichgewicht ist, müssen die chemischen Potenziale der Analyten in allen drei Phasen gleich sein

$$\mu_f = \mu_h = \mu_s \quad (12)$$

Aus Gleichungen (9) bis (12) kann geschlussfolgert werden:

$$p_f = p_h = p_s \quad (13)$$

Die Dampfdrücke in der Faserbeschichtung und der wässrigen Phase können mit dem HENRY'schen Gesetz als

$$p_f = K_f c_f^\infty \quad (14)$$

$$p_s = K_s c_s^\infty \quad (15)$$

(K_f = HENRY-Konstante des Analyten in der Faser, K_s = HENRY-Konstante des Analyten in der Lösung)

beschrieben werden. Unter der Voraussetzung, dass das Gesetz des idealen Gases $p_h V_h = n_h RT$ (n_h = Stoffmenge des Analyten im Gasraum) für den Analytendampf im Headspace gilt, ergibt sich für den Dampfdruck im Dampfraum

$$p_h = c_h^\infty \cdot RT \quad (16)$$

Aus Gleichungen (13) bis (16) können die Verteilungskonstanten mit der HENRY-Konstante verbunden werden

$$K_{fh} = c_f^\infty / c_h^\infty = RT / K_f \quad (17)$$

$$K_{hs} = c_h^\infty / c_s^\infty = K_s / RT \quad (18)$$

Wenn Gl. (13) bis (15) gelten, kann im Gleichgewicht die Verteilungskonstante des Analyten als $K_{fs} = c_f^\infty / c_s^\infty = K_s / K_f$ beschrieben werden. Daraus und aus Gleichungen (17) und (18) folgt ein einfacher Zusammenhang der drei Verteilungskoeffizienten:

$$K_{fs} = K_s / K_f = K_{fh} K_{hs} \quad (19)$$

Gleichung (8) kann deshalb auch geschrieben werden als

$$n_f = \frac{K_{fs} V_f c^0 V_s}{K_{fs} V_f + K_{hs} V_h + V_s} \quad (20)$$

Mit der Thermodynamik können die Auswirkungen von Änderungen bestimmter Extraktionsbedingungen auf die Verteilung vorhergesagt werden. Parameter, die die Verteilungskonstante möglicherweise beeinflussen, sind die Temperatur, der Salzgehalt, der pH-Wert und organische Lösungsmittel, die in der Matrix enthalten sein können.

3.3.3. TEMPERATUREINFLUSS

Wenn sich die Temperatur in der Lösung und Faser von T_0 nach T ändert, ändert sich die Verteilungskonstante nach

$$K_{fs} = K_0 e^{-\frac{\Delta H}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0} \right)} \quad (21)$$

(K_0 = Faser-Lösung-Verteilungskonstante des Analyten bei T_0 , ΔH = Änderung der molaren Enthalpie, T_0 = beim Experiment festgelegte Ausgangstemperatur)

Die Enthalpieänderung bleibt, typisch für SPME-Experimente, bei Temperaturänderungen konstant. Sie kann durch die Bestimmung von K_{fs} bei zwei verschiedene Temperaturen berechnet werden. Die möglichen Temperatureffekte müssen bei der Variation Extraktionstemperatur berücksichtigt werden, z.B. externe Probenahme, beabsichtigte Beschleunigung der Extraktion durch Heizen oder beabsichtigte Erhöhung des Dampfdruckes bei Headspace-SPME.

Gleichung (21) bezieht sich nur auf die Verteilung zwischen zwei homogenen Phasen. Die Gleichung darf nicht für die Verteilung zwischen der Faser und einer Multikomponentenprobe angewendet werden. Sie kann jedoch für die Abschätzung eines Temperatureffektes genutzt werden.

3.3.4. AUSSALZEFFEKT

Durch die Änderung des Salzgehaltes der Matrix kann die Extraktion von Analyten durch SPME beeinflusst werden. Eine Erhöhung des Salzgehaltes verbessert die Extraktion unpolarer Analyte, allerdings nur im Bereich von 0 bis 10 % Salzgehalt. Es empfiehlt sich für praktische Anwendungen, den Aussalzeffekt für die jeweilige Methode experimentell zu untersuchen.

3.3.5. EFFEKT DES pH-WERTES DER PROBE

Bei Änderung des pH-Wertes einer wässrigen Lösung ändert sich K_{fs} für dissoziationsfähige Analyten, vorausgesetzt, dass nur die undissoziierte Form der Säure oder Base durch die Faserbeschichtung extrahiert werden kann.

3.3.6. EFFEKT DES GEHALTES AN ORGANISCHEN LÖSUNGSMITTELN IN DER PROBE

Die Anwesenheit eines organischen Lösungsmittels in Wasser ändert K_{fs} . Es besteht die Möglichkeit, die Änderung der Verteilungskonstante vorherzusagen. Es ist aus der Literatur [108] bekannt, dass die Lösungsmittelkonzentration größer als 1 % sein muss, um die Eigenschaften der wässrigen Lösung und der Verteilungskonstante maßgeblich zu verändern. Störungen der quantitativen Bestimmung durch die Veränderung der organischen Zusammensetzung der Matrix können durch eine Kalibrierung mittels internen Standard kompensiert werden.

3.4. KINETIK

Die Kinetik des Extraktionsprozesses bestimmt die Geschwindigkeit der Extraktion. Die meisten der Theorien des Massentransportes basieren auf dem zweiten FICK'schen Diffusionsgesetz, das die Massenbalance in einem dynamischen und eindimensionalen System als

$$\left(\frac{\delta c}{\delta t}\right)_x = D \left(\frac{\delta^2 c}{\delta x^2}\right)_t \quad (22)$$

(t = Zeit, x = Koordinate eines eindimensionalen Raumes, D = Diffusionskoeffizient)

beschreibt. Für den dreidimensionalen Raum gilt demzufolge:

$$\frac{\delta c}{\delta t} = D \left(\frac{\delta^2 c}{\delta x^2} + \frac{\delta^2 c}{\delta y^2} + \frac{\delta^2 c}{\delta z^2} \right) \quad (23)$$

(x, y, z = Koordinaten eines dreidimensionalen Raumes)

Wird die zylindrische Geometrie der Faser und des Probensystems berücksichtigt, wandelt sich Gleichung (23) in

$$\frac{\delta c}{\delta t} = D \left(\frac{1}{r} \frac{\delta}{\delta r} r \frac{\delta c}{\delta r} + \frac{1}{r^2} \frac{\delta^2 c}{\delta \theta^2} + \frac{\delta^2 c}{\delta z^2} \right) \quad (24)$$

(r, θ , z = Koordinaten eines dreidimensionalen und zylindrischen Raumes)

um.

Unter Berücksichtigung der zylindrischen Geometrie der Faser und des Diffusionsprozesses ändert sich das Konzentrationsprofil in dem Polymer nicht entlang der Achse der Faser (Variable z) und es hängt nicht vom Radialwinkel vom Faserzentrum ab (Variable θ). Somit gehen die Terme, die diese Differentialquotienten enthalten, gegen Null und können vernachlässigt werden:

$$\frac{\delta c}{\delta t} = D \left(\frac{\delta^2 c}{\delta r^2} + \frac{1}{r} \frac{\delta c}{\delta r} \right) \quad (25)$$

Die Lösung der Gleichung (25) beschreibt das Konzentrationsprofil des Analyten im System als eine Funktion des Radius. Somit kann die Stoffmenge, die durch die Beschichtung extrahiert wird, als eine Funktion der Zeit durch Integration des Konzentrationsprofils entlang dem Radius berechnet werden:

$$n_f = 2\pi L_f \int_{r_a}^{r_i} c_1(r, t) r \cdot dr \quad (26)$$

(L_f = Länge der Faser, r_a = äußerer Radius, r_i = innerer Radius)

Anhand kinetischer Betrachtungen können Möglichkeiten zur Erhöhung der Extraktionsgeschwindigkeit aufgezeigt werden. Entsprechend der Vereinfachungen des FICK'schen Gesetzes sind folgende Annahmen zu berücksichtigen: Es werden keine Wechselwirkungen zwischen den Analyten und der Gefäßoberfläche oder dem Faserkern angenommen. Faktoren, wie thermische Ausdehnung, Schwellung, und Analyt-Analyt-Wechselwirkungen, werden vernachlässigt.

3.4.1. DIREKTE EXTRAKTION

Der Extraktionsprozess in der SPME wurde detailliert unter Verwendung zweier Grenzmodelle mathematisch beschrieben, die unter verschiedenen Randbedingungen (Geometrie der Probe, Probengröße und Zugang der Analytmoleküle zu der Faser) entwickelt wurden [108, 110]. Das erste Modell beschreibt die Diffusion des Analyten aus einer optimal gerührten Lösung von unendlichem Volumen in die Faserbeschichtung. Als zweites Modell wird die Extraktion einer ungerührten Lösung von endlichem Volumen betrachtet.

Im optimal gerührten Prozess haben alle Analytmoleküle Zugang zu der Beschichtung, und die Zeit zur Einstellung des Gleichgewichts t_e kann durch

$$t_e = \frac{(r_a - r_i)^2}{2D_f} = t_{95\%} \quad (27)$$

(t_e = Gleichgewichtszeit, D_f = Diffusionskoeffizient in der Faser, $t_{95\%}$ = Zeit nach Extraktion von 95 % der möglichen Maximalmenge)

beschrieben werden. Da in der analytischen Statistik meist mit einem experimentellen Fehler von 5 % gerechnet wird [111], kann t_e der Zeit gleichgesetzt werden, die zur Extraktion von 95 % der möglichen Maximalmenge benötigt wird ($t_{95\%}$). Die Einstellung des Gleichgewichts wäre sonst aufgrund der Vereinfachung des Modells ein unendlich langer Prozess.

Im realen Extraktionsprozess haben nicht alle Analytmoleküle gleichzeitig Zugang zur Faser. Deshalb wird in einem Modell eine PRANDTL-Grenzschicht mit einem Radius α definiert, eine dünne Schicht um die Faser ohne Vermischung, angenommen. Die Größe des Radius ist von der Rührgeschwindigkeit und der Viskosität der Lösung abhängig. Die Zeit, die für eine maximale Extraktion benötigt wird, kann nun mit Hilfe von Gleichung (28) berechnet werden, wenn die Extraktion durch die Diffusion in der Grenzschicht kontrolliert wird:

$$t_e = t_{95\%} = 3 \frac{\alpha K_{fs} (r_a - r_i)^2}{D_s} \quad (28)$$

(D_s = Diffusionskoeffizient in der Lösung)

Aus Gleichung (28) ist ersichtlich, dass die Zeit zur Einstellung des Gleichgewichts nun von den K_{fs} -Werten, von der Schichtdicke, von dem Diffusionskoeffizienten in der Lösung und von der Dicke der statischen Grenzschicht abhängig ist. Im Fall der perfekt gerührten Probenlösung ist die minimale Zeit zur Einstellung des Gleichgewichts erreicht, und t_e hängt nur von der Geometrie der Faser und den Diffusionskoeffizienten der Analyten in der Faser ab (Gl. (27)). Im Fall des Modells der ungerührten Lösung kann zur Berechnung von t_e der Innenradius des Proben-Vials dem Radius α der Grenzschicht in Gleichung (28) gleichgesetzt werden.

Von LOUCH [110] wurde eine lineare Proportionalität zwischen extrahierter und Ausgangsstoffmenge und unabhängig vom Erreichen von t_e gefunden. Dies wurde auch von AI [112] für die praktische Anwendung der SPME formuliert. Dieses Ergebnis vereinfacht die Anwendung der SPME entscheidend. Es muss für eine quantitative Analyse nicht bis zum Gleichgewicht extrahiert werden, sondern die Extraktionszeit kann den individuellen Anforderungen der jeweiligen Analyse angepasst werden.

3.4.2. HEADSPACE EXTRAKTION

Unter der Voraussetzung, dass sowohl die wässrige Phase als auch der Headspace perfekt gerührt werden, kann Gleichung (27) auch für die Headspace-SPME angewendet werden. Von PAWLISZYN [108] wurden ein einfaches, eindimensionales Diffusionsmodell für den Fall der praktischen Anwendung entwickelt. Unter der Voraussetzung, dass $V_h > 10K_{fh}V_f$ ist, gilt für t_e :

$$t_e = t_{95\%} = 100 \frac{(K_{fh} V_f)^2}{D_h} \quad (29)$$

(D_h = Diffusionskoeffizient im Gasraum)

Gleichung (29) kann für alle statischen Headspace-Extraktionen, die perfekt gerührte Probenlösung eingeschlossen, angewandt werden, vorausgesetzt, dass die Extraktion nur aus dem Headspace stattfindet.

3.5. MATRIX SERUM UND PLASMA

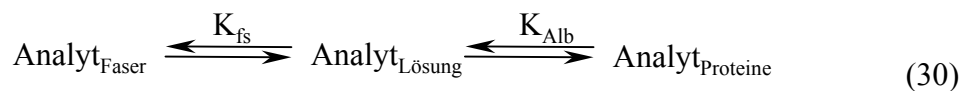
Die Analyse von Arzneistoffen in Serum und Plasma erweist sich aufgrund der Zusammensetzung der Matrix und deren möglichen Schwankungen als problematisch, da die Arzneistoffe in Wechselwirkung mit den Bestandteilen der Matrix stehen.

Serum ist der flüssige, nach erfolgter Blutgerinnung verbleibende Teil des Blutes (enthält kein Fibrinogen). Plasma ist der flüssige, nach Entfernen der Blutkörperchen verbleibende Anteil des ungerinnbar gemachten Blutes (enthält Fibrinogen). Der Anteil der Proteine im Serum und im Plasma beträgt ca. 7.5 %. Davon entfallen auf das Albumin 55 %, auf die Immunoglobuline 20 %, auf die Lipoproteine 11 % und auf das Fibrinogen 3.5 %. Weitere wichtige Bestandteile der Matrix im Bezug auf die SPME sind Fette (Triglyceride, Cholesterin, Lipoproteine, Phospholipide) mit einem physiologischen Gehalt zwischen 0.36 % und 0.82 % und Elektrolyte (z.B. Ca^{2+} , K^+ , Mg^{2+} , Na^+ , Cl^- , HCO_3^-) mit einem Gesamtgehalt von ca. 300 mmol/l. In der Zusammensetzung des Plasmas kann sich

z.B. der Albumingehalt im Fall von Lebererkrankungen oder der Fettgehalt in Abhängigkeit vom Ernährungszustand ändern. Im Vergleich zu einigen Bereichen der Umweltanalytik besitzt diese Matrix jedoch aufgrund der physiologischen Grenzen eine relativ konstante und gut analysierte chemische Zusammensetzung.

Die verschiedenen Bindungsverhältnisse von Arzneistoffen an die Plasmaproteine wurden von LINDUP [113] und GUTHRIE [77] ausführlich diskutiert. Der Einfluss der Plasmaproteine auf die Analytik durch SPME wurde von ULRICH [63, 64] beschrieben. Während der Extraktion kommt es in der Probe zur Einstellung zweier Gleichgewichte:

- 1) das chemische Reaktionsgleichgewicht zwischen dem an die Proteine gebundenen und dem freien, in der Lösung vorliegenden Arzneistoff sowie
- 2) das Verteilungsgleichgewicht zwischen dem freien, in der Lösung vorliegenden Arzneistoff und dem bereits durch die Faser extrahierten Arzneistoff (Gl. (30)):



(K_{Alb} = Gleichgewichtskonstante)

In der Literatur wird die Möglichkeit zur Bestimmung des freien Anteils von Phenolen und polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen in Wasser, das reich an gelösten polymeren organischen Stoffen (DOM) ist, mittels SPME und einer externen Kalibrierung beschrieben [114, 115]. Daraus folgend sollte untersucht werden, ob dies auch für die Bestimmung des freien Anteils an Arzneistoffen (wirksamer Anteil des Arzneistoffes) im Serum möglich ist. Da es sich beim Serum um eine sehr komplexe Matrix handelt (siehe oben), wurden diese Untersuchungen an Humanalbumin-Lösung als Modellsubstanz durchgeführt. Diese Modellmatrix erweist sich als sinnvoll, da die meisten Arzneistoffe im Körper zu einem großen Teil am Albumin gebunden sind [113].

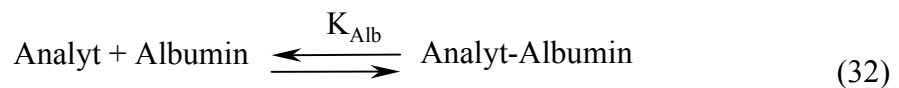
In einer heterogenen Matrix mit verschiedenen Phasen kann die Stoffmenge eines Analyten (m) in einer Phase (i) als

$$n_{i,m} = \frac{n_m^0 V_i}{V_i + \sum_{j \neq i} V_j K_{i,j,m}} \quad (31)$$

($n_{i,m}$ = Stoffmenge des Analyten (m) in der Phase (i), n_m^0 = Ausgangsstoffmenge des Analyten m, V_i = Volumen der Phase i, V_j = Volumen weiterer von i verschiedener Phasen, $K_{i,j,m}$ = Gleichgewichtskonstante des Analyten zwischen den Phasen)

beschrieben werden.

In Albuminlösung stellt sich für den Arzneistoff folgendes Gleichgewicht ein:



das durch die Gleichgewichtskonstante K_{Alb} bestimmt wird (Gl. (33)):

$$K_{\text{Alb}} = \frac{c_{\text{geb}}}{c_{\text{frei}} c_{\text{Alb}}} \quad (33)$$

(c_{geb} = Konzentration des an Albumin gebundenen Analyten, c_{frei} = Konzentration des freien Analyten (freier Anteil), c_{Alb} = Konzentration der Bindungsstellen des Albumins)

Mit $c_{\text{Alb}} = c_{\text{Alb}}^0 - c_{\text{geb}}$ (c_{Alb}^0 = Konzentration der Bindungsstellen des Albumins vor dem Gleichgewicht) und der Annahme $c_{\text{geb}} \ll c_{\text{Alb}}^0$, die für Spurenanalytik gültig ist, folgt $c_{\text{Alb}} \cong c_{\text{Alb}}^0$ und man erhält durch Substitution der Konzentrationen und durch Umformen von Gleichung (33):

$$K_{\text{Alb}} = \frac{n_{\text{geb}} V_s}{n_{\text{frei}} n_{\text{Alb}}^0} \quad (34)$$

(n_{geb} = Stoffmenge des an Albumin gebundenen Analyten, n_{frei} = Stoffmenge des freien Analyten (freier Anteil), n_{Alb}^0 = Stoffmenge der Bindungsstellen des Albumins)

Somit erhält man für die freien Anteil des Analyten vor der Extraktion mit $n^0 = n_{\text{geb}} + n_{\text{frei}}$:

$$n_{\text{frei}} = \frac{n^0 V_s}{V_s + n_{\text{Alb}}^0 K_{\text{Alb}}} \quad (35)$$

Für die Gleichgewichtseinstellung nach der Extraktion wird Gleichung (35) mit $n^0 = n_{\text{geb}} + n_{\text{frei}} + n_f$ um den Term für die Faser erweitert:

$$n'_{\text{frei}} = \frac{n^0 V_s}{V_s + n_{\text{Alb}}^0 K_{\text{Alb}} + V_f K_{\text{fs}}} \quad (36)$$

(n'_{frei} = Stoffmenge des freien Analyten (freier Anteil) nach Gleichgewichtseinstellung)

Das Verhältnis des freien Anteils des Analyten vor und nach der Extraktion wird somit durch Gleichung (37) bestimmt:

$$\frac{n_{\text{frei}}}{n'_{\text{frei}}} = 1 + \frac{V_f K_{fs}}{V_s + n_{\text{Alb}}^0 K_{\text{Alb}}} \quad (37)$$

Wird der freie Anteil des Analyten um weniger als 10 % durch die Extraktion verändert, gilt:

$$\frac{V_f K_{fs}}{V_s + n_{\text{Alb}}^0 K_{\text{Alb}}} < 0.111 \quad (38)$$

Ist Gleichung (38) für den zu untersuchenden Analyten erfüllt, kann der freie Anteil des Analyten direkt durch eine externe Kalibrierung bestimmt werden [115].