

3. Theoretische Grundlagen

Zum Nachweis bzw. zur Bestimmung geringer Analytkonzentrationen ist eine Anreicherung der interessierenden Komponenten unerlässlich. Dabei hat sich die Miniaturisierung von Labormethoden zum dominierenden Trend der vergangenen Jahrzehnte entwickelt. Typische Beispiele bei der Probenvorbereitung sind die Mikro-Flüssig-Flüssig-Extraktion, die statische Headspace sowie die Disk-Cartridge-SPE, die auf den Prinzipien von Adsorption und Absorption beruhen. In Verbindung mit modernsten Analyseverfahren, z. B. GC/MS und LC/MS, führt das zu schnelleren Analysen, höherem Probendurchsatz, niedrigerem Lösungsmittelverbrauch und weniger Arbeitsaufwand für die Probenvorbereitung. Die Nachweisstärke der Analysemethoden dagegen bleibt erhalten oder wird gesteigert [54 – 59].

3.1. Adsorption

Kondensierte Phasen können aus ihrer Umgebung Fremdmoleküle aufnehmen. Dieser Vorgang wird allgemein als Sorption bezeichnet. Der aufzunehmende Stoff (Sorptiv) kann dabei in das Innere der kondensierten Phase (Sorbens) eindringen oder sich an seiner Grenzfläche anreichern. Dringt das Sorptiv in die Volumenphase des Sorbens ein und verteilt es sich dort homogen, spricht man von Absorption. Erfolgt eine Anreicherung des Sorptivs an der Grenzfläche des Sorbens, dann handelt es sich um Adsorption. Der Begriff Sorption ist im engeren Sinne somit ein Oberbegriff für Ab- und Adsorption.

Unter Adsorption versteht man also die Anreicherung von Molekülen einer gasförmigen oder flüssigen Phase (Bulkphase) an der Oberfläche von Festkörpern (Adsorbentien). Der zu adsorbierende Stoff wird als Adsorptiv bezeichnet, bereits adsorbierte Moleküle als Adsorbat. Die beladene Grenzflächenschicht zwischen Adsorbens und Bulkphase heißt Adsorbat.

Es wird unterschieden zwischen physikalischer (Physisorption) und chemischer Adsorption (Chemisorption). Die Physisorption ist charakterisiert durch van-der-Waals-Kräfte, die im Allgemeinen einen reversiblen exothermen Prozess mit einer molaren Adsorptionsenthalpie $\Delta_A H < 50 \text{ kJmol}^{-1}$ darstellen. Bei der Chemisorption findet eine chemische Reaktion zwischen Adsorbens und Adsorptiv statt, bei der in der Regel irreversible Bindungen eingegangen

werden. Die Desorption, das heißt die Ablösung der Analyten vom beladenen Adsorbens, kann entweder mittels Wasserdampf oder Heißgas in eine Gasphase oder mit Lösungsmitteln in eine flüssige Phase erfolgen [60].

Auf Seiten des Adsorbens beeinflussen vor allem die Größe der inneren Oberfläche sowie die Beschaffenheit des Porensystems die Adsorption. Wichtige Parameter des Adsorptivs sind die Molekülgröße, Polarität und funktionelle Gruppen. Des Weiteren hängt der Adsorptionsvorgang von den Eigenschaften der Bulkphase (Temperatur, Zusammensetzung des Adsorptivs, Konzentration und pH-Wert der flüssigen Bulkphase) ab.

Folgende allgemeine Grundsätze sind für die Adsorption charakteristisch [61]:

- Die Adsorption großer Moleküle mit großer Molmasse ist stärker als die kleiner Moleküle.
- Die Adsorption polarer Moleküle ist stärker als die unpolare Moleküle.
- Die Adsorption undissoziierter Moleküle ist stärker als die dissoziierter Moleküle. Durch Einstellung eines geeigneten pH-Wertes in der Adsorptivlösung sollte zuerst das undissoziierte Molekül gebildet werden.
- Bei höherer Temperatur wird der Adsorptionsprozess beschleunigt, die Beladung jedoch verringert.
- Sind mehrere adsorbierbare Komponenten in der Bulkphase, sind Überlagerungs- und Verdrängungseffekte möglich, die zu einer geringeren Beladung führen können als für die Einzelkomponenten möglich wäre.

Adsorptionsgleichgewichte folgen den klassischen thermodynamischen Gesetzmäßigkeiten, nach denen die Adsorption so lange erfolgt, bis die chemischen Potentiale des Adsorptivs in der Bulkphase und im adsorbierten Zustand ausgeglichen sind.

Der Gleichgewichtszustand ist gekennzeichnet durch die Abhängigkeit der Oberflächenkonzentration (Beladung des Adsorbens) von der Temperatur und der Konzentration bzw. dem Druck des Adsorptivs:

$$a_{eq} = f(c_{eq}, T) \quad (3-1)$$

a_{eq} - Gleichgewichtsbeladung des Adsorbens

c_{eq} - Gleichgewichtskonzentration des Adsorptivs

T - Temperatur

Bei konstanter Temperatur ermittelt, lässt sich dieser Zusammenhang als Adsorptionsisotherme darstellen:

$$a_{eq} = f(c_{eq})_{T=const.} \quad (3-2)$$

Es existieren verschiedene Modelle, um die experimentell ermittelten Kurvenverläufe mathematisch zu beschreiben. So beschreibt die HENRY-Isotherme [60] den linearen Zusammenhang zwischen Konzentration und Beladung anhand einer einparametrischen Gleichung, die für geringe Oberflächenkonzentrationen geeignet ist:

$$a = K_H \cdot c \quad (3-3)$$

K_H - Koeffizient der HENRY-Isotherme

c - Konzentration

Die FREUNDLICH-Isotherme [62] beschreibt die Adsorption an heterogenen Oberflächen in einem zweiparametrischen Modell, das besonders den gekrümmten Teil der Adsorptionskurve gut wiedergibt:

$$a = K_F \cdot c^n \quad (3-4)$$

K_F - Koeffizient der FREUNDLICH- Isotherme

n - Isothermenexponent

Die LANGMUIR-Isotherme [63] beschreibt in Abhängigkeit von zwei Parametern die Adsorption an energetisch homogenen Oberflächen mit monomolekularer Bedeckung, d. h. dass jeder Elementarbezirk nur ein Molekül adsorbiert. Wechselwirkungen zwischen den Adsorptmolekülen in der Monoschicht werden vernachlässigt, die Adsorptionsenergien werden als gleichartig und konstant vorausgesetzt:

$$a = a_m \frac{K_L \cdot c}{1 + K_L \cdot c} \quad (3-5)$$

a_m - Beladung bei monomolekularer Bedeckung

K_L - Koeffizient der LANGMUIR-Isotherme

Die LANGMUIR-FREUNDLICH-Isotherme [64] ist eine modifizierte Form von Gl. (3-5). Über den Parameter n wird die energetische Heterogenität der Adsorbensoberfläche einbezogen:

$$a = a_m \frac{K_{LF} \cdot c^n}{1 + K_{LF} \cdot c^n} \quad (3-6)$$

K_{LF} - Koeffizient der LANGMUIR-FREUNDLICH-Isotherme

Um die Anreicherung mittels Adsorption in möglichst kurzer Zeit zu vollziehen, ist es notwendig, dass der Adsorptionsprozess zügig abläuft. Die **Kinetik** beschreibt den zeitlichen Verlauf bis zur Einstellung des Adsorptionsgleichgewichtes [65]. Vor der Bindung des Adsorptivs an die Adsorbenspartikel finden folgende Stofftransportprozesse statt:

- Diffusion und Konvektion in der Bulkphase
- Diffusion durch den hydrodynamischen Grenzfilm der Adsorptionspartikel
- Diffusion im Inneren des Adsorbenskorns (abhängig von der Porenstruktur und den Moleküleigenschaften des Adsorptivs).

Die Diffusion, die auf dem Konzentrationsgefälle des Adsorptivs zwischen Bulkphase und Adsorbensmaterial beruht, gliedert sich in zwei Teilschritte: Film- und Korndiffusion. Beide Diffusionsarten erfolgen im Allgemeinen langsamer als die Konvektion und Adsorption, sie limitieren daher meistens die Adsorptionskinetik.

Die Filmdiffusion, d. h. Diffusion des Adsorptivs durch den hydrodynamischen Grenzfilm um das Adsorbenskorn, lässt sich durch das 1. FICK'sche Diffusionsgesetz beschreiben.

Die Korndiffusion schließt die Poren- und Oberflächendiffusion unter der Annahme ein, dass die Adsorptivmoleküle entweder in die Porenflüssigkeit diffundieren oder sich auf Grund von Anziehungskräften im adsorbierten Zustand an der Porenwand entlang bewegen. Für die Charakterisierung der Korndiffusion werden differentielle Diffusionsgleichungen analog dem 1. FICK'schen Gesetz für den stationären Zustand und analog dem 2. FICK'schen Gesetz für den nichtstationären Zustand angewendet.

Dynamische Adsorptionsprozesse in der Säule werden durch die sich ausbildenden Konzentrationsprofile charakterisiert. Die Adsorptionssäule gliedert sich in drei Bereiche: das unbeladene Adsorbens, die Adsorptionszone, in der die Beladung des Adsorbens erfolgt und die Sättigungszone, in der das Adsorbens bereits vollständig beladen wurde (s. Abb. 3-1).

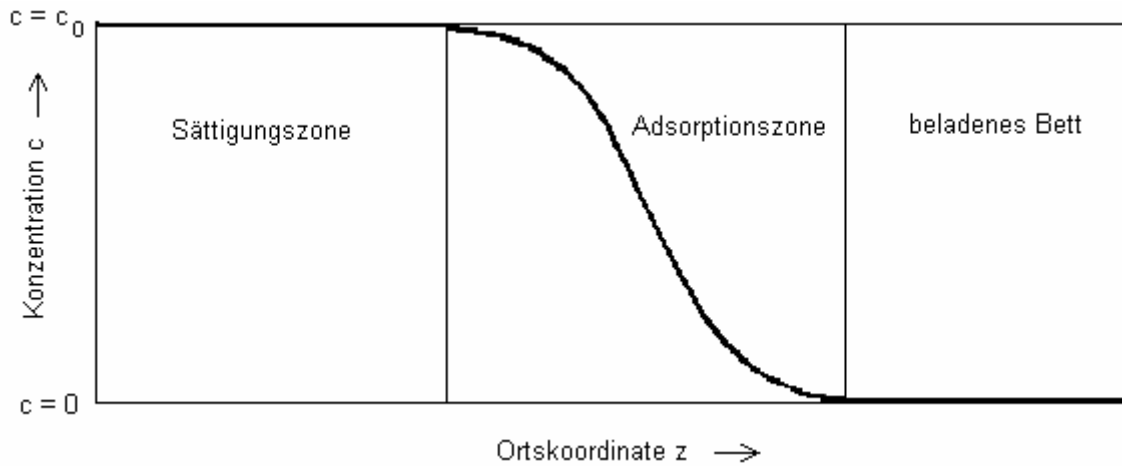


Abb. 3-1: Konzentrationsprofil in einem Adsorber

Erreicht die Adsorptionsfront das Ende der Säule, so bricht das Adsorptiv durch, das heißt, das Adsorbens konnte nicht die gesamte zu adsorbierende Substanzmenge binden. Das Konzentrations-Zeit-Diagramm der Adsorption am Säulenausgang ist in der Durchbruchskurve dargestellt (s. Abb. 3-2)

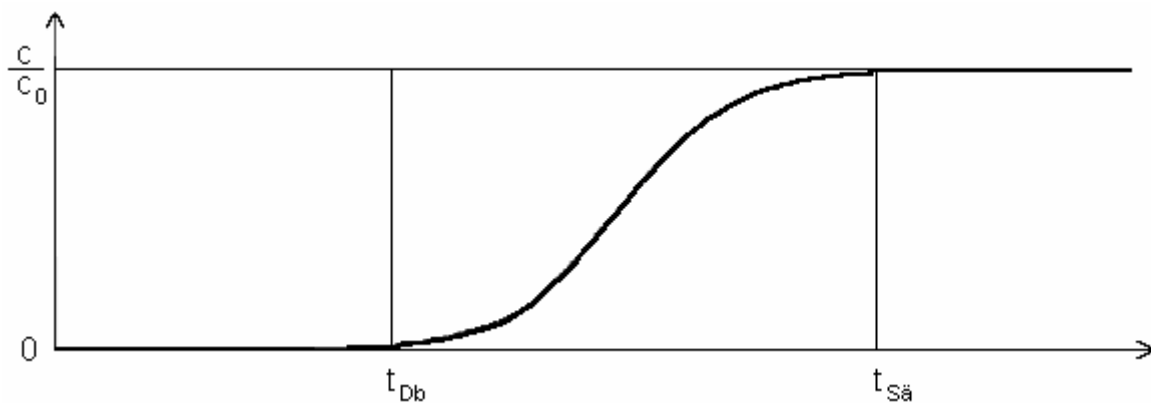


Abb. 3-2: Durchbruchskurve eines Adsorbers

Die Durchbruchzeit t_{Db} und die Sättigungszeit $t_{Sä}$ können zur Berechnung der Durchbruch- bzw. Sättigungskapazität herangezogen werden [60].

3.2. Absorption

Neben der Adsorption als Extraktionsprinzip werden häufig Absorptionsprozesse für die Extraktion von Analyten ausgenutzt. Das solchen Prozessen zugrunde liegende Phänomen ist das Flüssig/Flüssig-Phasengleichgewicht:



Für das chemische Potential in beiden Phasen gilt:

$$\mu_A^i = \mu_A^{i^\circ} + RT \cdot \ln a_A^i \quad (3-8)$$

$$\mu_B^i = \mu_B^{i^\circ} + RT \cdot \ln a_B^i \quad (3-9)$$

μ_A^i - chemisches Potential des Analyten i in der Phase A

$\mu_A^{i^\circ}$ - chemisches Standardpotential des Analyten i in der Phase A

μ_B^i - chemisches Potential des Analyten i in der Phase B

$\mu_B^{i^\circ}$ - chemisches Standardpotential des Analyten i in der Phase B

R - allgemeine Gaskonstante ($R = 8,314510 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$)

T - Temperatur

a_A^i - Aktivität des Analyten i in der Phase A

a_B^i - Aktivität des Analyten i in der Phase B

Im Gleichgewichtszustand gilt $\mu_A^i = \mu_B^i$. Da die chemischen Standardpotentiale deutlich von der Temperatur und nur wenig vom Druck abhängig sind, folgt daraus:

$$\ln \frac{a_A^i}{a_B^i} = \frac{\mu_B^{i^\circ} - \mu_A^{i^\circ}}{RT} \quad (3-10)$$

Mit
$$a_A^i = f_A^i \cdot c_A^i \quad (3-11)$$

und
$$a_B^i = f_B^i \cdot c_B^i \quad (3-12)$$

c_A^i - Konzentration des Analyten i in der Phase A

c_B^i - Konzentration des Analyten i in der Phase B

f_A^i - Aktivitätskoeffizient des Analyten i in der Phase A

f_B^i - Aktivitätskoeffizient des Analyten i in der Phase B

$f_A^i = f_B^i = 1$ (bei unendlich verdünnter Lösung)

ergibt sich bei Konstanthaltung von Temperatur und Druck das NERNST'sche Verteilungsgesetz: Wird ein Stoff in ein System aus zwei nicht mischbaren, nicht miteinander reagierenden Flüssigkeiten gegeben, so erfolgt so lange ein Übergang des in Phase A gelösten Stoffes in die Phase B bis die chemischen Potentiale beider Phasen gleich sind. Hat sich das Gleichgewicht zwischen beiden Phasen eingestellt, nimmt der Verteilungskoeffizient K_{AB}^i einen konstanten Wert an, der umso größer wird, je größer die Differenz der Löslichkeiten von Komponente i in Phase A zu Phase B ist.

$$K_{AB}^i = \frac{c_A^{i\infty}}{c_B^{i\infty}} \quad (3-13)$$

K_{AB}^i - Verteilungskoeffizient

$c_A^{i\infty}$ - Gleichgewichtskonzentration des Stoffes i in der Phase A (organisch)

$c_B^{i\infty}$ - Gleichgewichtskonzentration des Stoffes i in der Phase B (wässrig)

Zur Extraktion von Umweltkontaminanten aus wässrigen Matrices unter Anwendung von Verteilungsgleichgewichten eignen sich die Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE), die Festphasenmikroextraktion und die Stir Bar Sorptive Extraction.

Für die nachfolgende Auftrennung der Analyten im GC-System ist eine saubere Abtrennung von der wässrigen Phase unerlässlich. Auf Grund des sehr hohen Dampfausbreitungsvolumens von Wasser (ca. 1000 x) können schon geringste Mengen im Injektor des Gaschromatographen zur Überladung der Trennkapillare führen. Das Wasser benetzt zwar die herkömmlichen gaschromatographischen Trennphasen nicht, es beeinträchtigt jedoch die Peakformen anderer Analyten. Eine Abtrennung des Wassers kann zum einen durch Trocknen der organischen Lösungsmittelphase geschehen oder zum anderen durch Verwendung eines

Extraktionsmittels, das sich nicht mit Wasser mischt. Eine solche Substanz ist Polydimethylsiloxan (PDMS), das in der SPME sowie der SBSE als Extraktionsmittel Anwendung findet. Durch die Verwendung derartiger Materialien sind sämtliche Interferenzen durch Wasser ausgeschlossen.

Für das System unpolares Lösungsmittel/Wasser wird anstelle des Verteilungskoeffizienten K_{AB}^i häufig der Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizient $K_{O/W}$ bzw. die logarithmierte Form $\log K_{O/W}$ verwendet. Der wesentliche Faktor, der die Sorptionsrate bei Flüssig/Flüssig-Verteilungen beeinträchtigt, ist der Quotient aus $\log K_{O/W}$ und dem Phasenverhältnis β zwischen wässriger und organischer Phase [66]

$$\beta = \frac{V_w}{V_o} \quad (3-14)$$

V_o - Volumen der organischen Phase

V_w - Volumen der wässrigen Phase

β - Volumenverhältnis von wässriger Phase zu PDMS-Phase

Die folgende Abb. demonstriert die Sorptionsrate (= Wiederfindungsrate) als Funktion des Quotienten $\log K_{O/W}/\beta$.

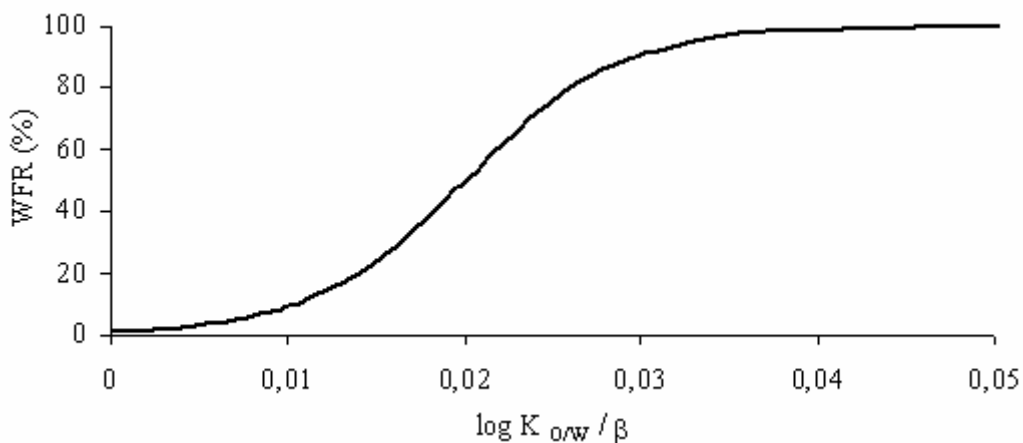


Abb. 3-3: Abhängigkeit der theoretischen Wiederfindungsrate eines Analyten vom Quotienten $\log K_{O/W}/\beta$

Da der Quotient $\log K_{O/W}/\beta$ aus beliebigen Kombinationen von $\log K_{O/W}$ - bzw. β - Werten

gebildet werden kann, ist er universell sowohl für die Flüssig/Flüssig-Extraktion als auch für die SBSE sowie die SPME gültig. Während bei $\log K_{O/W/\beta} = 0,02$ die Wiederfindungsrate 50 % beträgt, verläuft die Extraktion bei $\log K_{O/W/\beta} > 0,035$ annähernd quantitativ. Bei geringen $\log K_{O/W/\beta}$ -Werten verhält sich die Wiederfindung annähernd proportional zum Quotienten $K_{O/W/\beta}$, wodurch die Extraktionsausbeute äußerst gering wird.

3.3. Probenvorbereitungstechniken

3.3.1. Festphasenextraktion

Die Festphasenextraktion ist die geläufigste Extraktionsmethode in der organischen Spurenanalytik, die auf den chromatographischen Prinzipien von Adsorption und Desorption beruht. Je nach Polarität des Festphasen-Materials werden entweder Analyten oder Matrixbestandteile adsorbiert. Es gibt zahlreiche Adsorbentien mit unterschiedlichen Eigenschaften und Selektivitäten bezüglich der Analyten, die nach drei verschiedenen Mechanismen wirken: Umkehrphasen- (reversed phase, RP) SPE, Normalphasen- (normal phase) SPE und Ionenaustausch-SPE.

Um unpolare Analyten aus polaren Matrices, z. B. Wasser, zu extrahieren, werden Umkehrphasen eingesetzt. Das Sorbensmaterial, bestehend aus Siliziumdioxid modifiziert mit hydrophoben Alkylgruppen (z. B. Octadecyl, C18 und Octyl, C8) oder Polymermaterial (z. B. chemisch vernetztes Polystyrol), adsorbiert die unpolaren Analyten hauptsächlich über van-der-Waals-Kräfte.

Normalphasen-SPE wird zur Extraktion von polaren Analyten aus unpolarer Matrix, z. B. aus fetthaltigen Lebensmittelproben, angewandt. Die Adsorbentien, z. B. unmodifiziertes oder mit CN-, NH₂- bzw. OH-Gruppen modifiziertes Kieselgel, Florisil sowie Aluminiumoxid, treten über Dipol/Dipol- und π/π -Wechselwirkungen sowie Wasserstoffbrückenbindungen mit den Analyten in Wechselwirkung und retardieren diese.

Bei ionischen Analyten bieten sich Ionenaustauschphasen an. Zur Extraktion anionischer Analyten werden mit kationischen Gruppen modifizierte Sorbenzien eingesetzt, z. B. mit primären, sekundären, tertiären und quartären Aminen modifizierte Ionenaustauscher. Zur Extraktion kationischer Analyten wird das Sorbens (Kieselgel) z. B. mit Carboxyl- oder Sulfonsäuregruppen modifiziert.

Die genannten Wechselwirkungen treten bei der SPE selten in reiner Form, sondern meist in Kombination auf. Modifizierte Kieselgele weisen neben den gewünschten funktionellen Gruppen noch freie Silanolgruppen auf, die sekundäre Wechselwirkungen eingehen können. Durch Derivatisierung der freien Silanolgruppen mit kurzkettigen Silanen („Endcapping“) können sekundäre Wechselwirkungen ausgeschlossen werden [67 – 69].

Um einen optimalen Oberflächenkontakt zwischen Sorbenspartikeln und zu extrahierender Flüssigkeit zu gewährleisten, wird das Adsorbens benetzt. Zur Extraktion von Wasserproben wird die SPE-Säule zuerst mit einem wassermischbaren Lösungsmittel, z. B. Methanol, und anschließend mit destilliertem Wasser konditioniert. Nach der Konditionierung wird die Probe über das Sorbens geleitet. Das geschieht im Allgemeinen durch Druck oder Anlegen eines Vakuums, wodurch eine konstante Flussrate eingestellt werden kann. Ein Trockenlaufen der Säule ist unbedingt zu vermeiden, da für eine optimale Extraktion die permanente Benetzung der Sorbenspartikel wichtig ist. Die Analyten werden auf dem Trägermaterial sorbiert, während die Matrix eluiert. Dabei werden die Analyten angereichert. (Je nach Problemstellung können aber auch die Matrixpartikel sorbiert und die Analyten eluiert werden.) Durch anschließendes Waschen des Sorbens werden kosorbierte Matrixpartikel von der SPE-Säule entfernt. Die Sorption erfolgt im Allgemeinen aus wässriger Phase, so dass die Sorbenspartikel nach der Probenaufgabe mit Wasser benetzt sind. Da die Desorption der Analyten mit organischen Lösungsmitteln erfolgt, würde das Eluat ein Lösungsmittel-Wasser-Gemisch darstellen oder in Form zweier nicht mischbarer Phasen auftreten. Um diese mögliche Fehlerquelle zu vermeiden, wird das Sorbens vor der Elution unter Vakuum oder im Stickstoffstrom getrocknet. Die Elution erfolgt durch Unterbrechen der Wechselwirkungen zwischen Sorbens und Analyten durch ein geeignetes Lösungsmittel mit ähnlicher Polarität wie die der Analyten. Der Verbrauch an Extraktionsmittel ist gering und liegt im unteren Milliliterbereich.

Bei komplexen Matrixproben ist die Selektivität der SPE zur Analytabtrennung häufig nicht ausreichend. In diesen Fällen ist eine Vorreinigung der Probenlösung (Clean-up), z. B. durch Filtration, erforderlich [70]. Reale Wasserproben enthalten häufig unpolare Substanzen, die schwer wasserlöslich, jedoch an Schweb- oder Sedimentpartikeln gebunden sind. Im Falle einer Filtration besteht die Gefahr der Abtrennung aus der Probelösung, was die Erfassung dieser Stoffe verhindern würde. WOLSKA et al. stellten 1999 eine komplexe Filtereinrichtung zur Abtrennung und Extraktion der Schwebstoffe in einem Zuge mit der SPE-Extraktion vor [71].

Der Hauptanwendungsbereich der SPE liegt in der Extraktion von realen Wasserproben. Weitere Applikationsmöglichkeiten der SPE bestehen für Lebensmittel, biologische sowie pharmazeutische Proben [67, 72].

3.3.2. Festphasenmikroextraktion

Die SPME wurde von PAWLISZYN et al. erstmals 1990 beschrieben [73]. Bei dieser Proben-vorbereitungstechnik werden die Analyten der zu analysierenden Probe an einer beschichteten Faser sorbiert und anschließend direkt im Injektor des Gaschromatographen thermisch desorbiert und auf die Säule überführt. Die Anreicherung der Analyten kann entweder direkt durch Eintauchen der Faser in die intensiv gerührte flüssige Analytlösung oder indirekt durch Exposition der Faser im Dampfraum über der Matrix erfolgen. Die direkte Extraktion ist vor allem für mittel- und schwerflüchtige Verbindungen wie PCB, PAK und Pestizide geeignet. Voraussetzung ist eine matrixarme Lösung, da irreversibel adsorbierte Verunreinigungen die Adsorptionskapazität der Faser beeinflussen und so die Lebensdauer der Faser verringern können. Bei sehr sauberen Matrices ohne Schwebstoffe wie Wasser oder Wein und bei mittel- bis schwerflüchtigen Analyten kann durch die direkte Anreicherung eine höhere Extraktionseffizienz erreicht werden; störende leichtflüchtige Begleitsubstanzen können in die Gasphase übergehen und behindern dadurch nicht die Extraktion an der Faser. Bei Proben mit faser-schädigender Matrix wie Boden- oder Blutproben sowie Klärschlamm sollte die Anreicherung über die Gasphase erfolgen (Headspace-SPME). Auch bei leicht- oder wasserdampf-flüchtigen Stoffen ist die Headspace-SPME vorteilhaft. Für komplexe Proben besteht somit die Möglichkeit, die leichtflüchtigen Verbindungen aus der Gasphase und die schwerflüchtigen Verbindungen direkt aus der Matrix zu extrahieren.

Die Fasern aus hochtemperaturstabilem Quarzglas (fused-silica material) sind entweder mit hochviskosen Polymeren wie Polydimethylsiloxan, Polyacrylat (PA) oder einer Kombination von Adsorbens - und Polymermaterial wie z. B. Carboxen/Polydimethylsiloxan (CAR/PDMS) oder Carbowax/Divinylbenzen (CW/DVB) beschichtet. Die Porosität und die große Oberfläche des Adsorbens ermöglichen es, kleine Analyten besonders gut zurückzuhalten und die Kapazität der Faser zu erhöhen. Je nach Art des Polymers werden entweder verstärkt polare oder unpolare Verbindungen selektiv angereichert [74]. Durch die Variation der Beschichtungsdicken von 7 bis 100 μm können unterschiedliche Anreicherungszeiten und Beladungsmengen realisiert werden.

Der Verteilungskoeffizient K_{AB}^i ist abhängig von den chemischen Eigenschaften des Stoffes i und spezifisch für das jeweilige System aus wässriger (B) und Polymerphase (A) im Gleichgewicht. Wird in Gl. (3-13) die Konzentration des Analyten in der Faserbeschichtung durch

$$c_A^i = \frac{n_A}{V_A} \quad (3-15)$$

ersetzt, so folgt:

$$n_A = K_{AB}^i \cdot V_A \cdot c_B^i \quad (3-16)$$

n_A - Stoffmenge des Analyten in der Faser

V_A - Volumen der Faserbeschichtung

Mit Hilfe von Gl. (3-16) lässt sich die absolute Stoffmenge eines Analyten bestimmen, die durch die Faserbeschichtung aufgenommen werden kann. Die Anzahl der in das Sorbens übergehenden Analytmoleküle ist somit direkt proportional dem Verteilungskoeffizienten, dem Volumen der stationären Phase sowie der Konzentration des jeweiligen Analyten in der Wasserprobe. Voraussetzung für die Gültigkeit von Gleichung (3-16) ist eine nur geringe Änderung der Konzentration des Analyten in der wässrigen Phase. Dies ist der Fall, wenn die Extraktion durch die Faser nicht mehr als 1 % der Ausgangsstoffmenge beträgt. Werden höhere Extraktionsraten erreicht, verändert sich der Verteilungskoeffizient. Die in die organische Phase aufgenommene Analytmenge wird dann nach folgender Gleichung berechnet [75]:

$$n_A = \frac{K_{AB}^i \cdot V_A \cdot V_B \cdot c_B^i}{V_B + K_{AB}^i \cdot V_A} \quad (3-17)$$

V_B - Volumen der wässrigen Phase

Gl. (3-17) ist dann gültig, wenn sich kein Dampfraum über der Probe befindet. Somit besteht ein direkt proportionaler Zusammenhang zwischen der Konzentration des Analyten in der Probe und der extrahierten Analytmenge in der Faserbeschichtung. Durch diese Beziehung ist eine Quantifizierung der extrahierten Analyten möglich.

Befindet sich die Faser in der wässrigen Probe mit darüber liegendem Dampfraum (D), und definiert man einen Verteilungskoeffizienten K_{AD}^i (Polymerphase/Dampfraum) mit

$$K_{AD}^i = \frac{c_A^i}{c_D^i} \quad (3-18)$$

sowie einen Verteilungskoeffizienten K_{DB}^i (Dampfraum/wässrige Phase) mit

$$K_{DB}^i = \frac{c_D^i}{c_B^i} \quad (3-19)$$

so gilt:

$$n_A = \frac{K_{AD} \cdot K_{DB} \cdot V_A \cdot V_B \cdot c_{B_0}^i}{K_{AD} \cdot K_{DB} \cdot V_A + K_{DB} \cdot V_D + V_B} \quad (3-20)$$

$c_{B_0}^i$ - Anfangskonzentration des Stoffes i in der wässrigen Probe

Bei Konstanzhaltung aller Extraktionsparameter kann dieses Verteilungsgleichgewicht zur Quantifizierung der Analyten herangezogen werden. Auf Grund der unterschiedlichen Verteilungskoeffizienten der Analyten müssen die Wiederfindungsraten in Abhängigkeit von den gewählten SPME-Parametern gesondert bestimmt werden.

Die Geschwindigkeit der SPME ist durch die Kinetik des Extraktionsprozesses limitiert, bei der die Diffusion der Analyten durch die Matrix hin zur Faserbeschichtung den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellt. Der Massentransport durch Diffusion lässt sich mit dem 2. FICK'schen Gesetz beschreiben, das für eindimensionale, nichtstationäre Systeme lautet:

$$\left(\frac{\partial c}{\partial t}\right)_x = D \left(\frac{\partial^2 c}{\partial x^2}\right)_t \quad (3-21)$$

x - Koordinate des eindimensionalen Raumes
 D - Diffusionskoeffizient

Für den dreidimensionalen Raum gilt dementsprechend:

$$\left(\frac{\partial c}{\partial t}\right) = D \left(\frac{\partial^2 c}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 c}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 c}{\partial z^2}\right) \quad (3-22)$$

x, y, z - Koordinaten des dreidimensionalen Raumes.

Unter Berücksichtigung der zylindrischen Geometrie der Faser gilt unter der Voraussetzung, dass es keine Wechselwirkungen zwischen den Analyten und dem Faserkern bzw. der Gefäßoberfläche gibt:

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \left(\frac{\partial^2 c}{\partial r^2} + \frac{1}{r} \frac{\partial c}{\partial r}\right) \quad (3-23)$$

r - Radius der Faser

Faktoren wie thermische Ausdehnung oder Schwellung der Faser sowie Analyt-Analyt-Wechselwirkungen werden vernachlässigt [76].

Die Lösung von Gl. (3-23) beschreibt das Konzentrationsprofil des Analyten in Abhängigkeit vom Radius. An der Grenzfläche Polymer/wässrige Phase verarmt die Lösung an den Analyten. Mit fortschreitender Zeit bildet sich ein Konzentrations-Abstands-Profil, welches in Abb. 3-4 schematisiert ist.

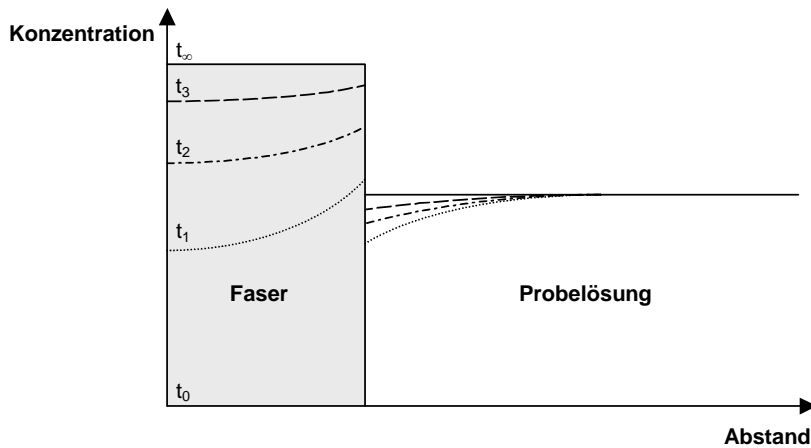


Abb. 3-4: Konzentrations-Abstands-Profil einer statischen Lösung [77]

Im Inneren der Faserbeschichtung entsteht in Abhängigkeit von der Extraktionsdauer ein komplementäres Profil mit ansteigender Analytkonzentration.

Die Konzentration einer Verbindung zu einer bestimmten Zeit in einem definierten Abstand zur Faser kann berechnet werden nach:

$$c_{x,t} = \frac{c_0}{\sqrt{(4\pi Dt)}} \cdot e^{\frac{-x^2}{4Dt}} \quad (3-24)$$

$c_{x,t}$ - Konzentration im Abstand x zur Zeit t

c_0 - Anfangskonzentration des Analyten

Um die Anreicherungszeit der Analyten in einer Probe zu verkürzen, lässt sich der Massentransport durch Konvektion beschleunigen. Die Agitation kann durch Rühren, Schütteln, Ultraschall oder Bewegung der Faser erfolgen. Mit zunehmender Stärke der Probenagitation verringert sich die Diffusionsgrenzschicht, welche die Faser umgibt [76]. Die Dicke dieser Schicht, in der Größenordnung von einigen Mikrometern, ist abhängig von den Agitationsbedingungen und der Viskosität der Flüssigkeit. Mit größer werdendem Abstand zur Faser nimmt die Fließgeschwindigkeit in der Grenzschicht zu. Unmittelbar nach Eintauchen der Faser in die Lösung werden nahezu alle Analyten aus der angrenzenden statischen Schicht in die Faserbeschichtung aufgenommen. Dadurch verarmt die statische Schicht, die Konzentration der Analyten verringert sich und die weitere Diffusion wird verlangsamt. Bei Einstellung des Gleichgewichts hat sich eine konstante Konzentration der Analyten in der Faserbeschichtung, der statischen Schicht und der Volumenphase eingestellt.

Die Extraktionsausbeute lässt sich durch Variation der Extraktionsdauer und -temperatur sowie durch Zugabe von Salz optimieren [77].

3.3.3. Stir Bar Sorptive Extraction

Zur Extraktion der Wasserprobe wird die flüssige Probe mit einem speziell beschichteten Magnetrührstäbchen (Twister) gerührt. Die Glasummantelung dieses Magnetrührstäbchens ist mit einer 500 µm bzw. 1 mm dicken Polydimethylsiloxanschicht belegt. Nach der Extraktion der Analysenlösung wird der Twister in die eigens dafür entwickelte Thermodesorptions-einheit des GC-Systems eingeführt, wo die Analyten thermisch desorbiert und nach der Fokussierung direkt in die Trennsäule überführt werden. Alternativ können die Analyten vom Twister auch mit Lösungsmitteln desorbiert und der Extrakt in ein HPLC- oder GC-System injiziert werden.

Die Theorie der SBSE basiert auf den gleichen Grundlagen wie bei der SPME. Geht man näherungsweise davon aus, dass der Verteilungskoeffizient zwischen Wasser und PDMS proportional zum Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten $\log K_{O/W}$ ist [66], lässt sich der Gleichgewichtszustand durch folgende Gleichung beschreiben:

$$K_{O/W} = K_{PDMS/W} = \frac{c_{PDMS}}{c_W} = \frac{\frac{m_{PDMS}}{V_{PDMS} \cdot M}}{\frac{m_W}{V_W \cdot M}} = \frac{m_{PDMS}}{m_W} \cdot \frac{V_W}{V_{PDMS}} = \frac{m_{PDMS}}{m_W} \cdot \beta \quad (3-25)$$

- $K_{O/W}$ - Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizient
- $K_{PDMS/W}$ - Verteilungskoeffizient zwischen Wasser und PDMS
- c_{PDMS} - Konzentration des Analyten in der PDMS-Phase
- c_W - Konzentration des Analyten in der wässrigen Phase
- m_{PDMS} - Masse des Analyten in der PDMS-Phase
- m_W - Masse des Analyten in der wässrigen Phase
- V_{PDMS} - Volumen der PDMS-Phase
- M - Molare Masse des Analyten
- β - Volumenverhältnis von wässriger Phase zu PDMS-Phase

Durch folgende Umstellung der Gl. (3-25)

$$\frac{K_{O/W}}{\beta} = \frac{m_{PDMS}}{m_W} = \frac{m_{PDMS}}{m_0 - m_{PDMS}} \quad (3-26)$$

m_0 - eingesetzte Analytmasse

ergibt sich die theoretische Sorptionsrate der Analyten aus folgendem Zusammenhang:

$$R = \frac{m_{PDMS}}{m_0} = \frac{\left(\frac{K_{O/W}}{\beta}\right)}{1 + \left(\frac{K_{O/W}}{\beta}\right)} \quad (3-27)$$

R - Wiederfindungsrate (Recovery)

Abb. 3-5 zeigt den Zusammenhang zwischen der theoretischen Wiederfindung und dem Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten. Bei einem $\log K_{O/W}$ -Wert größer als 3 verläuft die Extraktion theoretisch quantitativ. Bei kleineren $\log K_{O/W}$ -Werten stellt sich ein Verteilungsgleichgewicht wie bei der Festphasenmikroextraktion ein. Die theoretischen WFR sind demzufolge geringer.

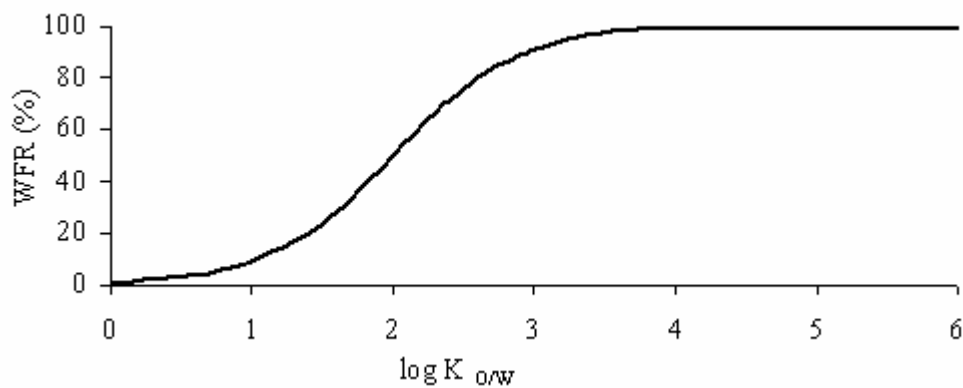


Abb. 3-5: Theoretische Wiederfindungsrate in Abhängigkeit vom $\log K_{O/W}$ -Wert (SBSE: 10 mL Wasserprobe, 0,5 μ L PDMS)

3.4. Messmethoden

3.4.1. Chromatographische Auftrennung

Um Wasserproben analysieren zu können, müssen die als komplexe Gemische vorliegenden Extrakte in die einzelnen Komponenten aufgetrennt werden. Die Methode der Wahl ist hierbei die Gaschromatographie.

Allgemein werden unter dem Begriff „Chromatographie“ physikalische Methoden zusammengefasst, die durch unterschiedliche Wechselwirkungen der Komponenten zwischen einer mobilen und einer stationären Phase zur Auftrennung des Gemisches führen. In Abhängigkeit von der stationären Phase beruhen die Trennmechanismen entweder auf den Prinzipien der Adsorption und Desorption (s. Kap. 3.1.) oder der Absorption (s. Kap. 3.2.). Bei der Gaschromatographie wird als mobile Phase ein Gas eingesetzt, das zum Transport der Analyten durch die stationäre Phase dient. Voraussetzung für die Analyse mittels GC ist die unzeretzte Überführung der Analyten in die Gasphase [78 – 80]. Ursprünglich arbeitete die Gaschromatographie mit gepackten Säulen, deren stationäre Phase aus Adsorbensmaterial bestand. Die moderne GC dagegen arbeitet mit flüssigen stationären Phasen (Polymerphasen), die mit der Wandung einer Quarzglas Kapillare (fused-silica) vernetzt sind. Die zu trennenden Stoffe passieren die Säule in Abhängigkeit von ihrer Affinität zur stationären Phase, ausgedrückt durch den Verteilungskoeffizienten K_{ms}^i , mit verschiedenen Geschwindigkeiten, so dass die Analyten separiert werden:

$$K_{ms}^i = \frac{c_m^i}{c_s^i} \quad (3-28)$$

K_{ms}^i - Verteilungskoeffizient des Analyten zwischen der mobilen und der stationären Phase

c_m^i - Konzentration des Analyten in der mobilen Phase

c_s^i - Konzentration des Analyten in der stationären Phase

Dabei stellt der Selektivitätskoeffizient α den Grad der Separierung zweier Komponenten dar:

$$\alpha = \frac{K_{ms}^j}{K_{ms}^i} = \frac{k^j}{k^i} \quad (3-29)$$

Das Verhältnis der Stoffmengen des Stoffes i in der mobilen und der stationären Phase wird dabei durch den Kapazitätsfaktor k^i ausgedrückt:

$$k^i = \frac{n_m^i}{n_s^i} \quad (3-30)$$

n_m^i - Stoffmenge des Analyten i in der mobilen Phase

n_s^i - Stoffmenge des Analyten i in der stationären Phase

Die Anzahl der Gleichgewichtseinstellungen einer Komponente während der Verweilzeit im chromatographischen System heißt Trennstufenzahl N und ist ein Maß für die Trennleistung der chromatographischen Trennstrecke, die sich in schmalen Peakformen äußert [78, 80].

$$N = 5,54 \cdot \left(\frac{t_r}{b_{1/2}} \right) \quad (3-31)$$

N - Trennstufenzahl

t_r - Retentionszeit

$b_{1/2}$ - Peakbreite in halber Peakhöhe.

Es gilt:

$$H = \frac{L}{N} \quad (3-32)$$

H - theoretische Trennstufenhöhe

L - Länge der Säule.

Die für einen Analyten in einer Säule bestimmte Trennstufenzahl ist abhängig von der Temperatur, der Säulenlänge, der Art der verwendeten Phase und der Geschwindigkeit des Massetransportes in der Trennsäule. Die Qualität der chromatographischen Auftrennung zweier benachbarter Analyten i und j in einem chromatographischen System lässt sich zusammenfassend mit dem Begriff der Auflösung R ausdrücken [81]:

$$R = \frac{1}{4} \cdot \frac{(\alpha - 1)}{\alpha} \cdot \frac{k'^j}{k'^i + 1} \cdot \sqrt{N} \quad (3-33)$$

R - Auflösung

Als einen weiteren wichtigen Zusammenhang beschrieb van Deemter die Abhängigkeit der Trennleistung von der Strömungsgeschwindigkeit u (s. Abb. 3-6) [82]:

$$H = A + \frac{B}{u} + C \cdot u \quad (3-34)$$

A - Eddy-Diffusion (Streudiffusion)

B - Longitudinaldiffusion (Molekulardiffusion)

C - Massenübergangsterm

Bei der Verwendung von Kapillarsäulen ist der A -Term in die Betrachtung nicht mit einzu-
beziehen, da er nur für gepackte Säulen gilt. Die Longitudinaldiffusion B ist eine Funktion des
Diffusionskoeffizienten der Komponenten im Trägergas und proportional zur Gasdichte. Im
Massenübergangsterm C sind die Geschwindigkeit der Gleichgewichtseinstellung sowie
Störungen im Gleichgewicht zwischen Analyt und stationärer Phase berücksichtigt.

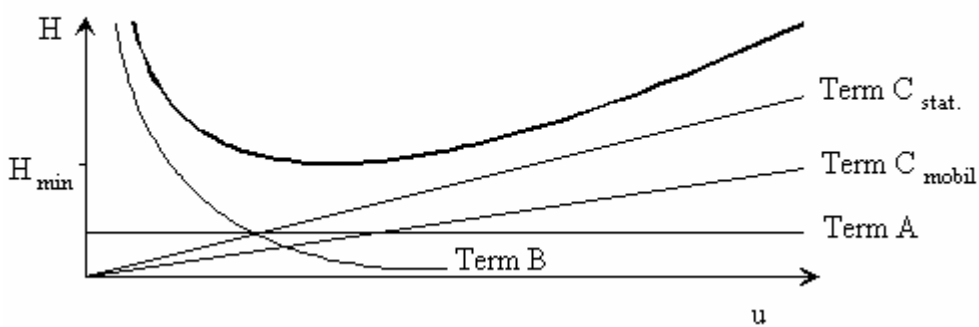


Abb. 3-6: Van-Deemter-Kurve

Nach der Auftrennung werden die Komponenten von der GC-Säule eluiert und in den Detek-
tor überführt, wo sie auf Grund ihrer physikalisch-chemischen Eigenschaften (z. B. Wärme-
leitfähigkeit, Ionisierbarkeit) registriert werden. Aus der Größe der dabei aufgezeichneten
Signale sind Rückschlüsse über die Quantität der gemessenen Komponenten möglich.

3.4.2. MS- und MS/MS-Detektion

Universell einsetzbar zur Detektion der gaschromatographisch aufgetrennten Komponenten ist die Massenspektrometrie. Zum einen ermöglicht diese Technik die Bestimmung der relativen Molekülmasse und der Elementarzusammensetzung auch von äußerst geringen Substanzmengen, zum anderen sind aus dem charakteristischen Fragmentierungsmuster nach der Ionisierung der Untersuchungssubstanz Rückschlüsse auf die Struktur der Verbindung möglich. Da in der vorliegenden Arbeit ausschließlich die Ion-Trap-Technik angewandt wurde, soll auf diese hier näher eingegangen werden.

Über eine Transferline werden die eluierten Komponenten direkt aus der Trennkapillare des Gaschromatographen ins Innere der Ionenfalle, die aus zwei Endkappen- sowie einer mittleren Ringelektrode besteht, überführt (s. Abb. 3-7).

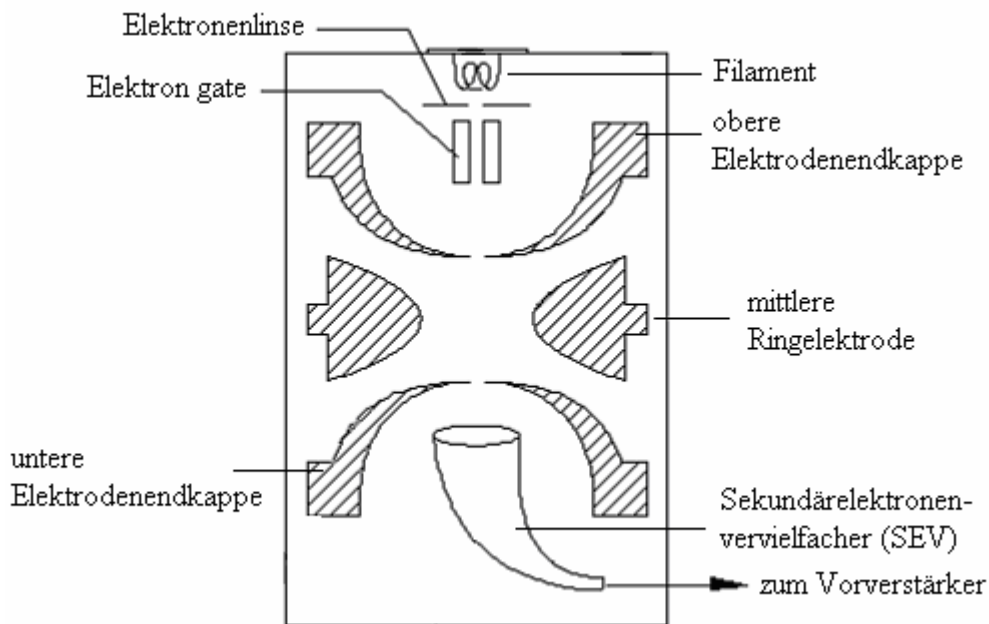


Abb. 3-7: Schematischer Aufbau einer Ionenfalle

Von einer Glühkathode (Filament) werden Elektronen emittiert, mittels einer Elektronenlinse fokussiert und durch eine zylindrische Elektrode (Electron gate) geleitet. Im Electron gate wird der Elektronenstrom gepolt, um den Eintritt der Elektronen in die Ionisationskammer zu steuern. Der senkrechte Beschuss des aus der Transferline austretenden Molekülstrahles mit 70 eV führt zur Aufspaltung der Moleküle. In Abhängigkeit von der ursprünglichen Struktur

und der Höhe der Destabilisierungsenergie der Analyten werden die ionisierten Komponenten in Fragmentionen und neutrale Fragmente zerlegt. Nach erfolgter Ionisierungsphase wird der Elektronenstrom umgepolt, so dass keine Elektronen mehr in die Trap gelangen. An den Endkappen der Ion Trap wird eine konstante hochfrequente Spannung angelegt, die die Ionen in stabile Schwingungen versetzt und im Feld auf zyklischen Bahnen festhält. Nicht ionisierte Teilchen werden aus der Ion Trap ausgeschleust, die Ionen dagegen beschleunigt. Zur Fokussierung der Ionen auf stabilen Bahnen befindet sich in der Ion Trap Heliumgas. Unter den in der Ionenfalle vorliegenden Bedingungen hat Helium kein Ionisierungspotential. Durch Zusammenstöße bremst es die Ionen und senkt somit deren Energie. Die Zahl der eingefangenen Ionen steigt. Des Weiteren werden die Ionenbahnen stärker in das Zentrum der Ionenfalle verlagert, so dass eine größere Anzahl an Ionen auf den Detektor gelangt, sobald diese die Trap verlassen.

Der Massenbereich der festzuhaltenden Ionen wird durch die angelegte Speicherspannung nach unten begrenzt. Nach oben ist der Massenbereich von der Geometrie der Ionenfalle sowie der Dauer stabiler Schwingungen schwerer Ionen abhängig. Die Stabilität der Ionenschwingung im Inneren der Falle ist nur von der eingestellten Spannung abhängig. Während der Analysatorphase werden die Schwingungen der Ionen durch kontinuierliche Erhöhung der Speicherspannung instabil und die Ionen weichen von ihren Bahnen ab. Durch eine Öffnung der unteren Endkappenelektrode verlassen die Ionen die Trap und treffen in Abhängigkeit von ihrem Masse/Ladungsverhältnis auf den Detektor. Die Sequenz der Ionisierungs- und Analysatorphasen läuft alternierend ab. Unter optimalen Bedingungen können bis zu 16 Massenspektren (Mikroscans, μ -Scans) pro Sekunde aufgenommen werden, für einen Massenbereich von 45 bis 650 m/z sind es im Allgemeinen 3 μ -Scans/s. Diese Mikroscans werden zu einem Scan gemittelt und bestimmen das Signal/Rausch-Verhältnis. Jeder einzelne Massenscan setzt sich aus vier variablen Segmenten zwischen 35 und 650 m/z zusammen. Diesen Segmenten ist jeweils ein Vorscan (Prescan) vorgeschaltet, durch den die Anzahl der zu diesem Zeitpunkt vorliegenden Ionen bestimmt wird. Die Zahl der gebildeten Ionen steigt mit zunehmender Ionisierungszeit und ist der Anzahl der Mikroscans indirekt proportional. Um eine optimale Zahl an Ionen in der Ion Trap zu gewährleisten, erfolgt durch die elektronische Steuerung AGC (Automatic Gain Control) die Regulierung der Ionisierungszeit zwischen 73 und 25000 μ s.

Als Detektor wird ein Sekundärelektronenvervielfacher (Multiplier) bestehend aus einer Kathode, einer Anode und einem Widerstand eingesetzt. Die Kathodenspannung ist etwa von - 1000 V bis - 3000 V steigerbar und bestimmt die Elektronenausbeute. Treffen die Elektronen auf die Kathodeninnenwand, werden Sekundärelektronen emittiert und anschließend durch kaskadenartige Fortsetzung auf etwa 10^5 V verstärkt. Der daraus resultierende Strom wird registriert und mit Hilfe der gerätespezifischen Software ein Massenspektrum erzeugt, das die Masse/Ladungsverhältnisse aller Ionen in Abhängigkeit von ihrer Intensität zeigt. Durch Vergleich der registrierten Ionen mit bekannten Spektren kann dann der eigentliche Nachweis erfolgen.

Die diskontinuierliche Arbeitsweise der Ionenfalle ermöglicht durch eine Verlängerung der Ionisierungs- und Sammelphase die Anreicherung der Ionen von Spurenkomponenten. Durch die anschließende Datenverarbeitung wird diese rechnerische Aufwertung der tatsächlichen Ionenmengen berücksichtigt.

Die Detektion mittels Massenspektrometer kann in zwei verschiedenen Modi erfolgen. Im (Full-)Scan-Modus werden alle Ionen fragmentiert und in Abhängigkeit von Ihrer Masse detektiert. Die so erzeugten Spektren können mit vorhandenen Spektrenbibliotheken verglichen und zur Aufklärung der Substanzidentität genutzt werden. Im SIM-Modus (Selected Ion Monitoring) werden nur ausgewählte Molekül- oder Fragmentionen bestimmter Masse/Ladungsverhältnisse in vorgegebenen Zeitfenstern erfasst. Die dadurch herbeigeführte höhere Scanrate erhöht die Empfindlichkeit des Detektors gegenüber einer Aufnahme im Scan-Modus um ein Vielfaches.

Eine weitere Möglichkeit, die Mitquantifizierung störkomponentenbedingter Fragmente identischer Massen zu vermeiden, ist die Erzeugung von Massenspektren der zweiten und dritten Generation [83 – 85]. Ähnlich wie beim SIM-Modus werden in der Ionenfalle nur Fragmentionen einer ganz bestimmten Massenzahl, so genannte Mutterionen (parent ions), festgehalten. Dazu werden alle Ionen mit Massen unterhalb bzw. oberhalb der Masse des Mutterions aus der Trap geschleust. Die verbliebenen Ionen unterliegen in der Ionenfalle ständigen Kollisionen mit dem Heliumgas. Durch Anregung der Ionen steigt deren innere Vibrationsenergie und die Zusammenstöße mit den Heliummolekülen führen zur weiteren Fragmentierung (collision-induced dissociation). Es entstehen so genannte Tochterionen (product ions) (s. Abb. 3-8), die in Form eines MS/MS-Spektrums aufgezeichnet werden, das

zusätzliche Informationen zur qualitativen und quantitativen Auswertung liefert. Voraussetzung dafür ist, dass Mutterionen gleicher Masse/Ladungs-Verhältnisse verschiedenen Fragmentierungsmechanismen unterliegen.

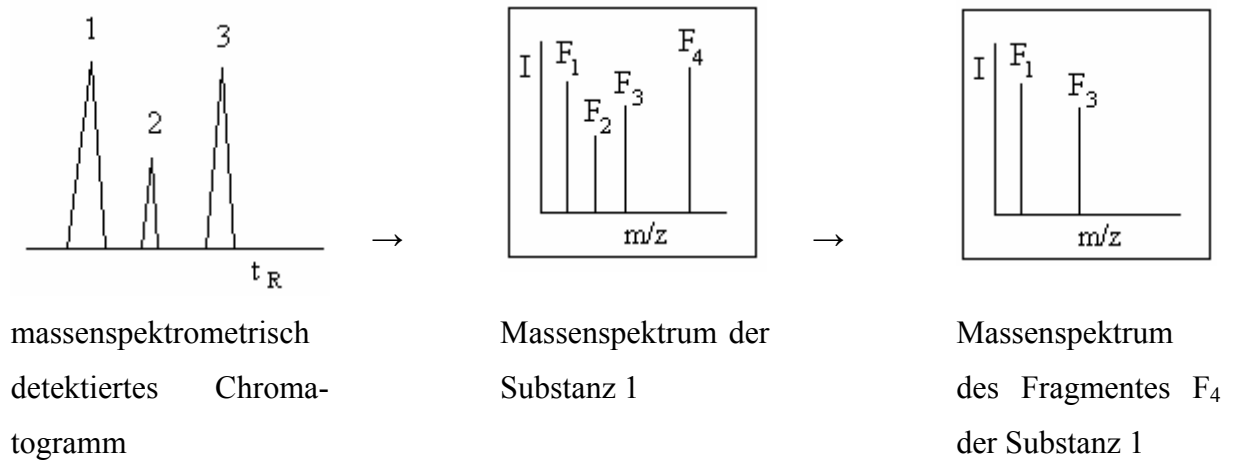


Abb. 3-8: Erzeugung von MS/MS-Spektren in der Ionenfalle (schematisch)