

# Energiedispersive Röntgenmikroanalyse (EDX) in der Zytologie

Autor(en): **Spycher, Max Albert**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Jahrbuch der Schweizerischen Naturforschenden Gesellschaft. Wissenschaftlicher und administrativer Teil = Annuaire de la Société Helvétique des Sciences Naturelles. Partie scientifique et administrative**

Band (Jahr): **159 (1979)**

PDF erstellt am: **17.07.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-90769>

## **Nutzungsbedingungen**

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

## **Haftungsausschluss**

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

# Energiedispersive Röntgenmikroanalyse (EDX) in der Zytologie

Max Albert Spycher

Die Mehrzahl der heute in der biologischen Routine und Forschung betriebenen Rasterelektronenmikroskope (REM) und Transmissionselektronenmikroskope (TEM) dienen dem Zweck, ein Objekt bezüglich seiner submikroskopischen Struktur und deren Veränderungen unter natürlichen oder experimentellen Bedingungen zu studieren.

Unabhängig von der Wahl des Mikroskoptyps (TEM oder REM) und der Präparationstechnik (Dünnschnitt, Sprühpräparat, Negativkontrast, Gefriertrocknung, Gefrierätzung etc.) wird dabei die ultrastrukturelle Information von Elektronen geliefert, welche entweder vom Kathodenstrahl selbst stammen (TEM) oder aber sekundär aus der Probenoberfläche herausgelöst wurden (REM).

Voraussetzung für die Bildentstehung ist in jedem Fall das Vorhandensein von strukturgebundenen Atomen hoher Ordnungszahl (Schwermetallatome), welche, im Transmissionsbetrieb, die einfallenden Strahlelektronen genügend zu streuen vermögen oder welche – im Rasterbetrieb – die Grundlage für einen ausreichenden Sekundärelektronenertrag bilden.

Da native organische Strukturen nur sehr selten schwere Atome in der erforderlichen hohen Konzentration enthalten, müssen künstlich solche «Markeratome» in die Probe eingebracht werden, wo sie sich in charakteristischer Weise mit bestimmten Stoffgruppen (Lipide, Kohlenhydrate etc.) verbinden. Das Prinzip der obligaten Markierung (= Kontrastierung) hat auch dann Gültigkeit, wenn nicht in erster Linie die Struktur des Objektes interessiert, sondern wenn deren chemische Eigenschaften aufgeklärt werden sollen.

Auch zytochemische oder immunologische Reaktionen können nämlich im TEM nur dann sichtbar gemacht werden, wenn es gelingt, irgendwo im Reaktionsprodukt ein

Schwermetallatom als kontrastgebenden Marker zu verankern und zwar so, dass er das gesamte Objektpräparationsverfahren unbeschadet, d.h. ohne Verlust und ohne Lageveränderung übersteht.

In Anbetracht dieser Tatsache kann es nicht verwundern, dass aus Kreisen der Ultrastrukturforscher seit langem der Wunsch nach einer Möglichkeit laut wurde, den Chemismus der Strukturbausteine direkt erfassen zu können, ohne den Umweg über die wenig spezifische Markierung einschlagen zu müssen.

In den vergangenen Jahren hat die Weiterentwicklung von Mikroanalysetechniken die Wissenschaft diesem Ziel schon ein erhebliches Stück näher gebracht. Eine dieser Methoden, die energiedispersive Röntgenmikroanalyse (EDX) (Castaing und Guinier 1949), soll im folgenden in ihren Grundzügen erläutert, ihre praktische Anwendung an einigen Beispielen aus dem Gebiet der Humanmedizin dargestellt und die sich daraus ergebenden Probleme kurz diskutiert werden.

Die EDX-Analyse ist eine spektroskopische Methode, welche es gestattet, im TEM oder REM (bzw. im Rastertransmissions-Elektronenmikroskop = STEM) eine qualitative und quantitative Analyse der in submikroskopisch kleinen Objektstrukturen enthaltenen chemischen Elemente vorzunehmen. Grundsätzlich können zur Zeit alle Elemente, deren Ordnungszahl grösser ist als 10, erfasst werden. Die Nachweisempfindlichkeit der Methode ist ausserordentlich hoch, sie liegt theoretisch bei  $10^{-19}$  gr.

## Das Prinzip der EDX-Analyse

Im Elektronenmikroskop interagieren die auf ein Präparat auftreffenden, hochbeschleunigten Strahlelektronen in verschiede-

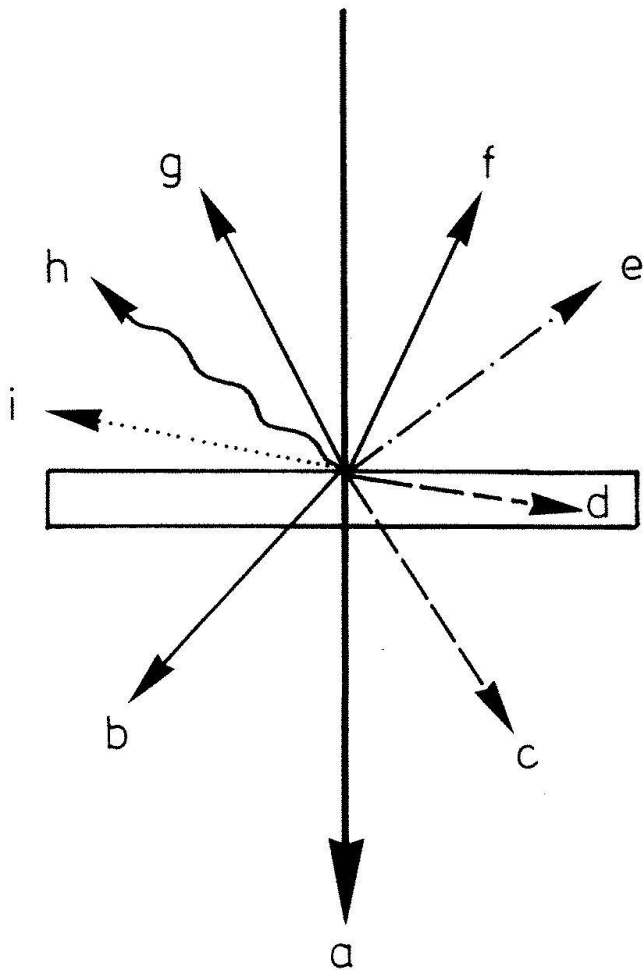


Fig. 1. Bei der Interaktion zwischen Strahlelektronen und Objekt können folgende Effekte auftreten: Die Elektronen durchdringen das Objekt (a) geradlinig, ungestreut; (b) elastisch gestreut, ohne Energieverlust; (c) unelastisch gestreut, unter Energieverlust. Sie können (d) in der Probe absorbiert werden; (e) energieärmere Sekundärelektronen freisetzen; (f) selbst zurückgestreut werden oder (g) sichtbares Licht erzeugen. Schliesslich können sie (h) Röntgenstrahlung anregen oder (i) energiearme Auger-Elektronen erzeugen.

ner Weise mit der Objektmaterie (Fig. 1). Einmal können sie das Präparat geradlinig, d.h. ungestreut durchdringen. Werden sie hingegen gestreut, so kann dies elastisch, ohne Energieverlust oder unelastisch, d.h. unter Abgabe von Energie in Form von Licht, Wärme oder Röntgenstrahlen erfolgen. Ausserdem können die Strahlelektronen auch energieärmere Sekundärelektronen aus der Probenoberfläche freisetzen oder die Bildung von Auger-Elektronen anregen. In jedem Fall führt aber der Elektronenbeschuss zur Emission von Röntgenstrahlen. Wird beim Zusammenstoss eines Strahlelektrons mit einem Objektatom ein Orbitalelek-

tron aus seiner Bahn geworfen, so wird die entstehende Lücke sogleich von einem Elektron einer äusseren, energiereicheren Kreisbahn wieder ausgefüllt. Die hierbei freiwerdende Energiedifferenz verlässt das Atom in Form eines Röntgenphotons (Fig. 2). Der Energieinhalt eines Röntgenphotons ist für jedes chemische Element – und innerhalb eines Elementes für jeden möglichen Niveausprung – exakt definiert (in der Masseneinheit Elektronenvolt, eV). Entsprechend des auslösenden Niveausprungs werden die Röntgenquanten mit einem Index ( $K_{\alpha}$ ,  $K_{\beta}$ ,  $L_{\alpha,\beta}$ ,  $M_{\alpha}$  etc.) versehen. Gelingt es nun, die Röntgenphotonen einzufangen und gemäss ihrem Energieinhalt zu sortieren, so muss es – nach geeigneter Verarbeitung der Signale – möglich sein, Rückschlüsse auf die elementare Zusammensetzung der vom Kathodenstrahl getroffenen Objektstelle zu ziehen. Zur Bewältigung dieser Aufgabe wurden in den vergangenen Jahren Geräte entwickelt, welche Röntgenquanten-Energieanalysen in ausserordentlich kurzer Zeit ausführen und die, als Zusatzgeräte, an die meisten TEM,

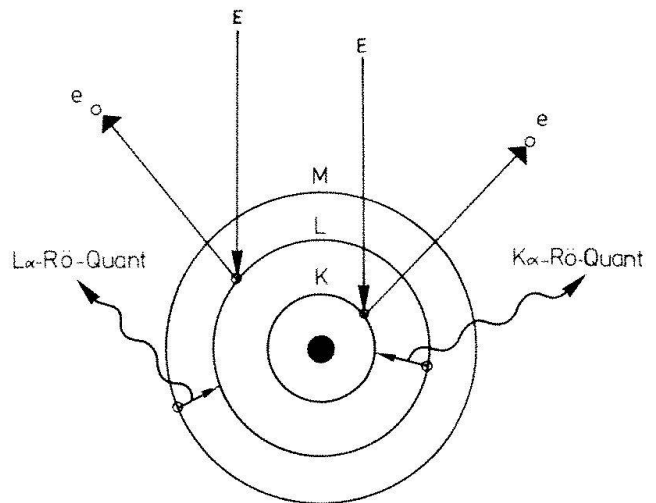


Fig. 2. Schematische Darstellung der Entstehung charakteristischer Röntgenstrahlen beim Beschuss eines Objektatoms mit Strahlelektronen. Wird beim Zusammenstoss eines Strahlelektrons mit einem Objektatom ein Orbitalelektron aus seiner Bahn geworfen, so wird die entstehende Lücke sogleich von einem Elektron einer äusseren, energiereicheren Kreisbahn wieder ausgefüllt. Die hierbei freiwerdende Energiedifferenz verlässt das Atom in Form eines Röntgenphotons. Beim Fall eines Elektrons auf die K-Schale entsteht ein K-Photon, bei einem Niveausprung auf die L-Schale ein L-Photon usw.

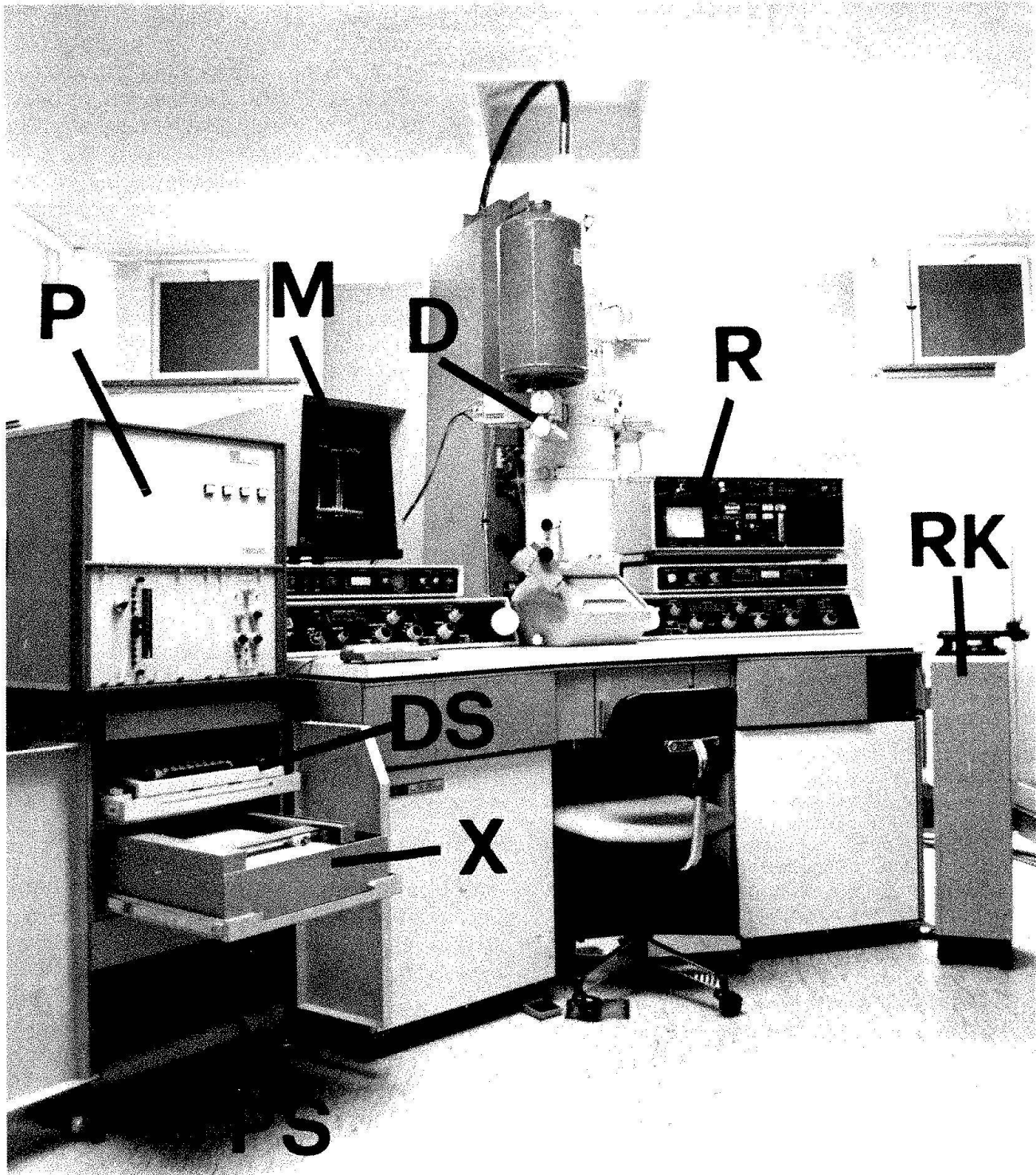


Fig. 3. JEOL 100-CX STEM - Mikroskop mit integrierter EDX-Analyseneinheit. D=Detektor mit Stickstoffspeichergefäß; P=Pulsprocessor; X=X-Y-Schreiber; DS=Digitalschreiber; M=Monitor; PS=Plattenspeicher; R=Rastereinheit; RK=Rasterkamera.

REM und STEM adaptiert werden können (Fig. 3).

Der funktionelle Aufbau einer solchen Analyseeinheit ist in Fig.4 am Beispiel eines energiedispersiven Analysators mit sog. «solid state»-Detektor schematisiert dargestellt:

Die aus dem Objekt austretenden Röntgenquanten treffen im Hochvacuum auf einen mit flüssigem Stickstoff gekühlten lithiumdotierten Siliziumkristall. Durch Ionisation werden im Kristall Ladungsimpulse freigesetzt, deren Zahl proportional zur Energie



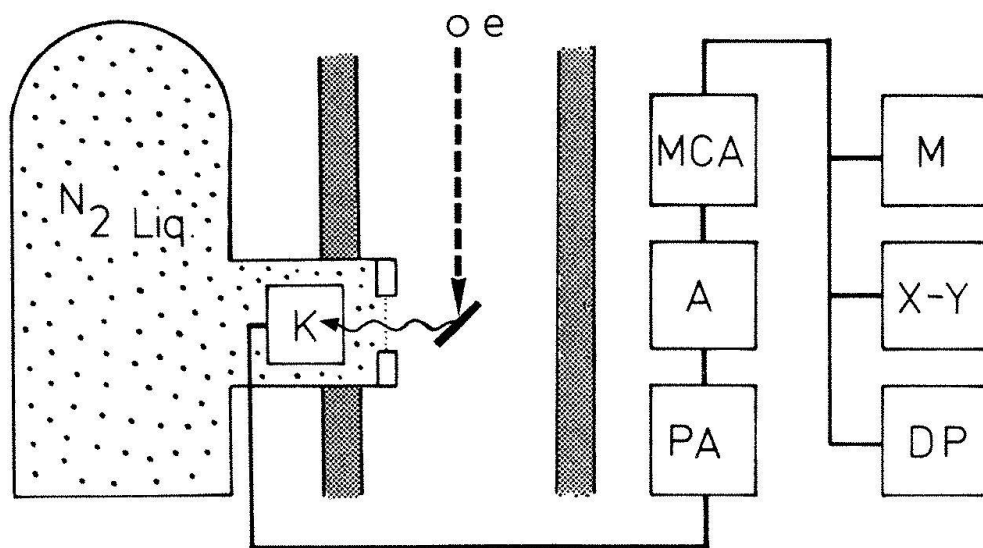


Fig. 4. Schematischer Aufbau einer EDX-Analysereinheit. Der mit flüssigem Stickstoff gekühlte Detektor (K) empfängt die durch das Berylliumfenster (punktierte Linie) einfallende Röntgenstrahlung. Die freigesetzten Ladungsimpulse werden über einen Vorverstärker (PA) einem Verstärker (A) zugeführt. Im Vielkanalanalysator (MCA) werden die Impulse sortiert und aufaddiert. Das resultierende Spektrum kann auf dem Monitor (M) betrachtet oder über einen X-Y-Schreiber (X-Y) bzw. einen Digital-schreiber (DP) ausgedruckt werden.

der ionisierenden Röntgenquanten ist. Nach mehrfacher Verstärkung werden die abgeleiteten Ladungsimpulse einem Vielkanalanalysator, dem Pulsprozessor zugeführt, welcher sie entsprechend ihrer Amplitude in einen mehr als 2000 Kanäle umfassenden Speicher einordnet. Der Füllungsstand der einzelnen Kanäle kann nach Ablauf einer vorbestimmbaren Analysedauer über einen X-Y-Schreiber, einen Digital-schreiber oder einen Fernsehmonitor als Spektrum zur Darstellung gebracht werden. Eine Magnetplatteinheit gestattet es zudem, sämtliche Analysedaten für spätere Verwendungszwecke zu speichern.

### Anwendungsbeispiele

Anhand von drei Beispielen aus dem Gebiet der Humanmedizin soll, stellvertretend für viele weitere Anwendungsmöglichkeiten, der unmittelbar praktische Nutzen dargelegt werden, welcher die EDX-Mikroanalyse im Routinebetrieb erbringen kann. Die Beispiele gestatten es ausserdem, auf einige Hauptprobleme der speziellen Objektpräparation und der Spektrenauswertung hinzuweisen.

#### 1. Beispiel

Ein älterer Mann stirbt, nachdem er während Jahren an zunehmenden Atembeschwerden gelitten hat. Die Hinterbliebenen erheben bei der zuständigen Versicherung

des verstorbenen Fabrikarbeiters Anspruch auf eine Rente, sind sie doch überzeugt davon, dass der Tod ihres Familienangehörigen direkte Folge einer Berufskrankheit ist. Obwohl der Mann während zweier, längst zurückliegender Jahre in einer Asbest verarbeitenden Fabrik tätig gewesen war, und obwohl der Hausarzt den Patienten bis zum Tode wegen einer diagnostizierten Staublungge behandelt hatte, macht die Versicherungsgesellschaft die Ausbezahlung der geforderten Rente vom Nachweis abhängig, dass es sich in diesem Falle tatsächlich um ein beruflich erworbenes Leiden handelte. Zur Klärung dieser Frage wird daher ein kleines Stück Lungengewebe des Verstorbenen histologisch und elektronenmikroskopisch untersucht. Bereits im Lichtmikroskop fallen in den Alveolarsepten zahlreiche Makrophagen auf, deren offensichtlich mineralische, doppelbrechende Einschlüsse zum Teil eine faserförmige Gestalt aufweisen. Das Elektronenmikroskop bestätigt den lichtoptischen Befund: Im Gewebe lassen sich nadelförmige, meist ganz oder teilweise von einer kontrastreichen granulären Hülle umschlossene Strukturen beobachten (Fig. 5). Die Vermutung, dass es sich bei den Kristallen um die erwarteten Asbestnadeln handelt, liegt zwar auf der Hand, lässt sich aber nur morphologisch nicht beweisen. Hier drängt sich eine EDX-Analyse als Methode der Wahl auf. Um die Röntgenmikroanalyse der in Frage

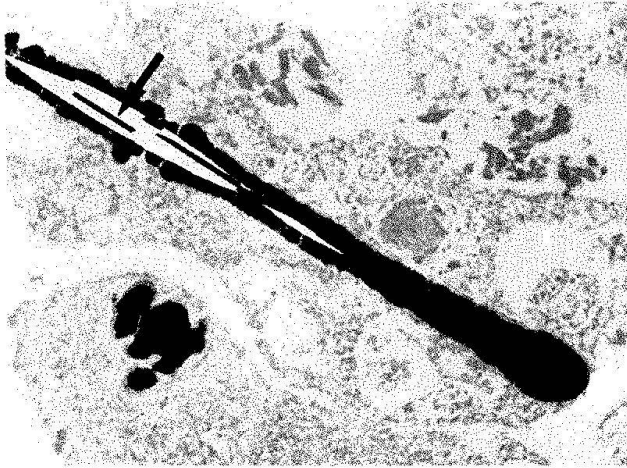


Fig. 5. Elektronenmikroskopische Aufnahme einer grossen Asbestnadel in menschlichem Lungengewebe. Die Kristallnadel (Pfeil) ist von einer elektronendichten, eisenhaltigen, granulären Hülle umgeben (sog. Asbestkörperchen).

stehenden Fasern vorzunehmen, wird das Elektronenmikroskop durch Knopfdruck auf Raster-Transmissionsbetrieb umgeschaltet. Der feinfokussierte Elektronenstrahl rastert nun das Objekt – hier ein Gewebedünnschnitt – Zeile um Zeile ab und erzeugt auf dem Monitor der Rastereinheit ein Fernsehbild, welches mit dem zuvor erhaltenen Transmissionsbild auf dem Mikroskopleuchtschirm identisch ist. Allein im Rasterbetrieb kann der feine Kathodenstrahl an jeder beliebigen Objektstelle angehalten und somit die Vorbedingung für eine Röntgenmikroanalyse geschaffen werden.

Auf einen nadelförmigen Kristall fokussiert, setzen die hochbeschleunigten Strahlelektronen aus diesem die Röntgenstrahlung frei,

welche, in der beschriebenen Art ausgewertet, vom X-Y-Schreiber als Spektrum auf vorgedrucktes Papier übertragen wird. Die Fig. 6 zeigt das repräsentative Spektrum einer Kristallanalyse unseres Beispiels. Auffällige Peaks erscheinen für die Elemente Magnesium ( $K_{\alpha}$ -Strahlung), Silizium ( $K_{\alpha}$ ), Kupfer ( $K_{\alpha}$ ,  $K_{\beta}$ ) sowie für Gold ( $L_{\alpha}$ ,  $M_{\alpha}$ ). Es ist nun Aufgabe des Untersuchers, die Peaks richtig zu interpretieren. Allfällige Artefakte, «Störpeaks», muss er erkennen und von dem charakteristischen Teil des Spektrums subtrahieren können.

Im vorgegebenen Beispiel wird Asbest vermutet. Asbeste sind Magnesium- und/oder Eisensilikate. Gold und Kupfer dagegen enthalten sie nicht. Dies lässt den Schluss zu, dass der analysierte Kristall entweder Magnesium, Silizium, Gold und Kupfer enthält und somit kein Asbest ist, oder aber, dass es sich wirklich um Asbest handelt, dann aber das Kupfer und das Gold als Artefakte von anderswoher stammen müssen. Tatsächlich entspringen die Kupfer- und die Goldstrahlung nicht dem Kristall selbst, sondern stellen Artefakte dar, Streustrahlung, welche durch den Objekthalterstab aus Kupfer und das Objektträgernetz aus reinem Gold hervorgerufen wurde.

Als charakteristisch können also lediglich der Magnesium- und der Silizium-Peak gelten. Beim analysierten Kristall handelt es sich demnach um ein Magnesiumsilikat. Chrysotilasbest ist ein Magnesiumsilikat. Er ist der einzige, weltweit industriell verwendete Asbest, welcher Magnesium in beträchtlicher Menge, jedoch kein Eisen enthält.

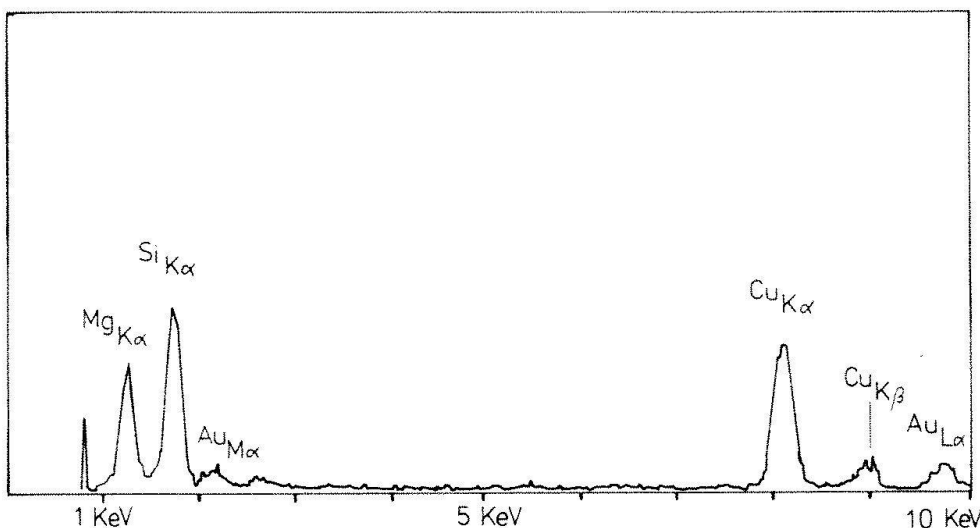


Fig. 6. Röntgenspektrogramm einer Chrysotilasbestnadel.

Die Peaks für Silizium und Magnesium sind objektspezifisch. Kupfer und Gold stellen Streustrahlung dar, hervorgerufen durch Mikroskopteile einerseits und das Objektträgernetz andererseits.

Im untersuchten Lungengewebe erwiesen sich sämtliche analysierten Fasern als Magnesiumsilikat, als Chrysotilasbest und tatsächlich wird in der Firma, bei welcher der Patient vor Jahren beschäftigt war, ausschliesslich Chrysotilasbest verarbeitet. Gestützt auf diesen Analysenbefund konnte die Diagnose einer Asbestose bestätigt werden. Da die Asbestose zudem als beruflich erworben anerkannt wurde, stand der Auszahlung einer Rente nichts mehr im Wege.

## 2. Beispiel

Ein Photoreprograph im mittleren Lebensalter sucht den Arzt wegen sich verschlimmernden Atembeschwerden auf. Die klinische Untersuchung und die Röntgenbefunde führen zur Diagnose einer diffusen Lungenfibrose unbekannter Ursache. Zur weiteren Abklärung entschliesst man sich, eine Lungenbiopsie durchzuführen. Vom excidierten Gewebe wird ein kleines Stückchen auch für die elektronenmikroskopische Untersuchung sowie die EDX-Analyse aufbereitet.

Im transmissionselektronenoptischen Bild sind in den Alveolarsepten zahlreiche Makrophagen zu erkennen, welche mit grossen, elektronendichten Einschlüssen beladen sind. Bei starker Vergrösserung erweisen sich die Einschlüsse als Anhäufungen kleinster, nur 8-10 nm breiter Kriställchen, die sich morphologisch nicht identifizieren lassen (Fig. 7). Das Analysespektrum eines solchen Einschlusses deckt hingegen eine erstaunliche elementare Zusammensetzung der Kristalle auf (Fig. 8).

Neben den beiden höchsten Peaks für Cu

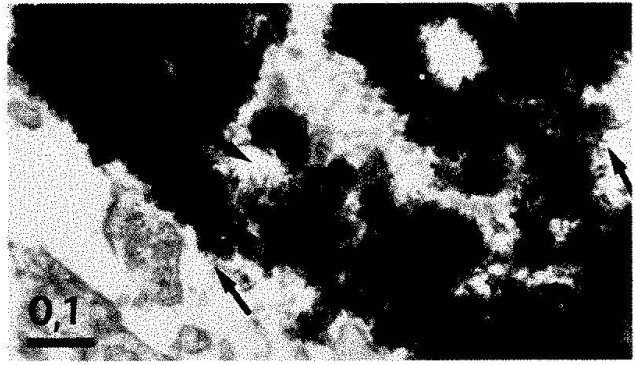


Fig. 7. Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Teils eines Rhabdophaneinschlusses aus der menschlichen Lunge.

Am Rande des Einschlusses sind die äusserst feinen Einzelkristalle deutlich zu erkennen (Pfeile).

( $K_{\alpha}$  und  $K_{\beta}$ ) - hier Störstrahlung, hervorgerufen durch das Kupfer-Objektträgernetz - finden sich charakteristische Peaks für Thorium, Cerium, Lanthan, Neodym und Phosphor. Das Ergebnis der Elementaranalyse lautet demzufolge: Bei den vorliegenden Kristalleinschlüssen handelt es sich mit grösster Wahrscheinlichkeit um Seltene-Erden-Phosphate. Seltene-Erden-Phosphate in menschlichen Lungen sind jedoch unseres Wissens noch nie zuvor beschrieben und also noch kaum je beobachtet worden. Anamnestische Nachforschungen haben aber ergeben, dass der Patient während einiger Jahre mit den damals noch gebräuchlichen Lichtbogenprojektoren gearbeitet hatte. Diese Lampen verbrannten sogenannte Docht-Kohlestäbe. Um den Lichtbogen aufzuhalten, wurden die Kohlestäbe mit einem zentralen «Docht» aus Cerium- und Thorium-

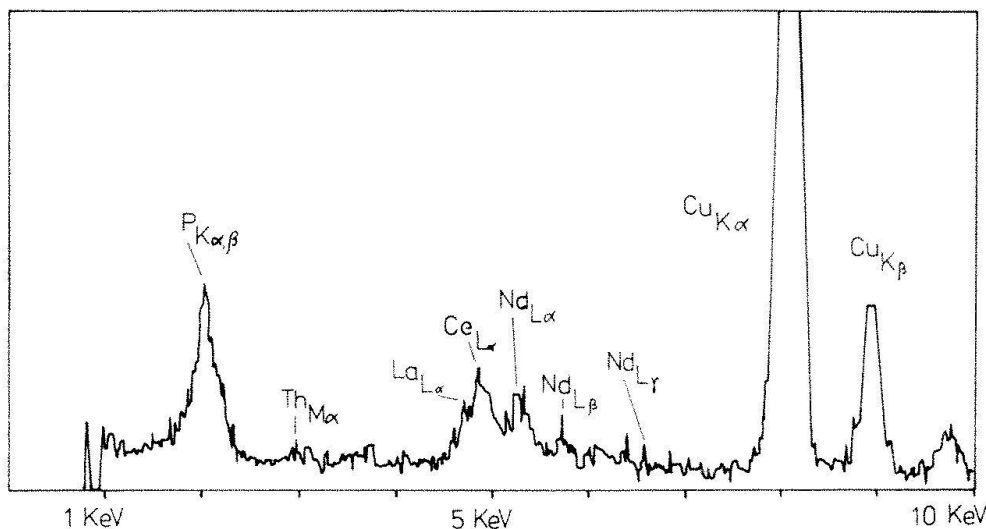


Fig. 8. Röntgenspektrogramm von Rhabdophan. Die charakteristischen Peaks für die Seltenen Erden Cerium, Thorium, Lanthan und Neodym sind ebenso wie der Phosphorpeak deutlich zu erkennen.

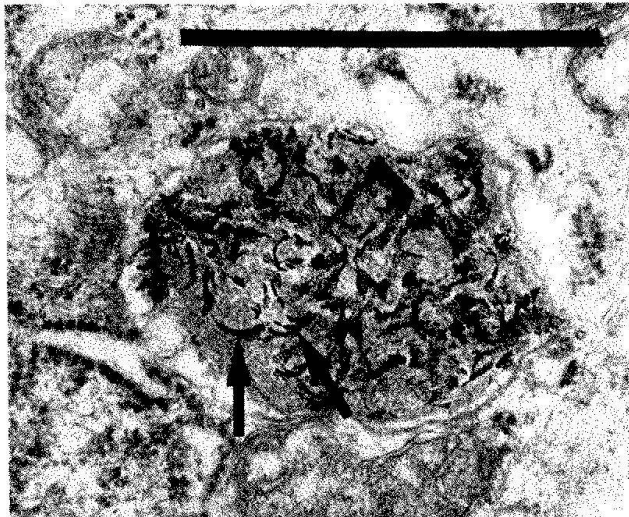


Fig. 9. Elektronenmikroskopische Aufnahme eines goldhaltigen Einschlusses (Aurosoms) aus der menschlichen Niere. In einer granulären Matrix liegen federförmige, elektronendichte, kristallähnliche Strukturen, in welchen das Gold nachgewiesen werden kann.

oxid versehen. Bei der sehr hohen Lichtbogen-temperatur verdampften diese Beimengungen, um anschliessend in der Raumluft wieder zu feinsten Kriställchen zu kondensieren. Mit der Atemluft gelangte das Kondensat in die Lungen des Repphotographen, wo die Mineralien im Verlaufe der Jahre zu Phosphaten und zu Carbonaten umgewandelt wurden (Sticher et al. 1973). Auch in diesem Fall ist es also gelungen, dank der EDX-Analyse den Zusammenhang zwischen beruflicher Tätigkeit und organischem Leiden zweifelsfrei nachzuweisen.

### 3. Beispiel

Eine 65jährige, an chronischer Polyarthrit

leidende Frau wird während mehrerer Wochen mit Antirheumatica und einem Goldpräparat behandelt. Komplikationen in Form eines plötzlich auftretenden Nierenversagens zwingen zum Unterbruch der Therapie und machen eine Nierenbiopsie erforderlich. Eine routinemässig für die Elektronenmikroskopie aufgearbeitete Gewebeprobe wird auch der EDX-Analyse zugeführt. Aufgrund der klinischen und der histopathologischen Befunde ist der Defekt im primären Ausscheidungsapparat, den Glomerula zu suchen. Die transmissionselektronenoptische Untersuchung der Gefässkapillaren zeigt, dass die Epithelzellen bisweilen kleine, meist unscheinbare, elektronendichte Einschlüsse enthalten, welche sich bei stärkerer Vergrösserung als federförmige Strukturen, eingebettet in einer granulären Matrix, erweisen (Fig. 9).

Das EDX-Analysespektrum solcher Einschlusskörper lässt eine Vielzahl von Elementpeaks erkennen (Fig. 10).

Mehrheitlich stellen die zur Darstellung gebrachten Peaks Artefakte dar, stammen sie doch nicht aus der Probe selbst, sondern sind das Resultat der Fixation mit Osmiumtetroxid, der Schnittkontrastierung mit Bleihydroxid und Uranylacetat oder des nun schon bekannten Trägernetzes. Von ausschlaggebender Bedeutung sind hingegen die Peaks für Gold  $L_{\alpha}$  und  $M_{\alpha}$ . Sie erbringen den Beweis dafür, dass es sich bei den untersuchten federförmigen Strukturen um goldhaltige Einschlüsse handelt. Gold enthaltende Inclusionen in Epithelien der Glomerula werden als «Aurosomen» bezeichnet. Sie stellen zwei-

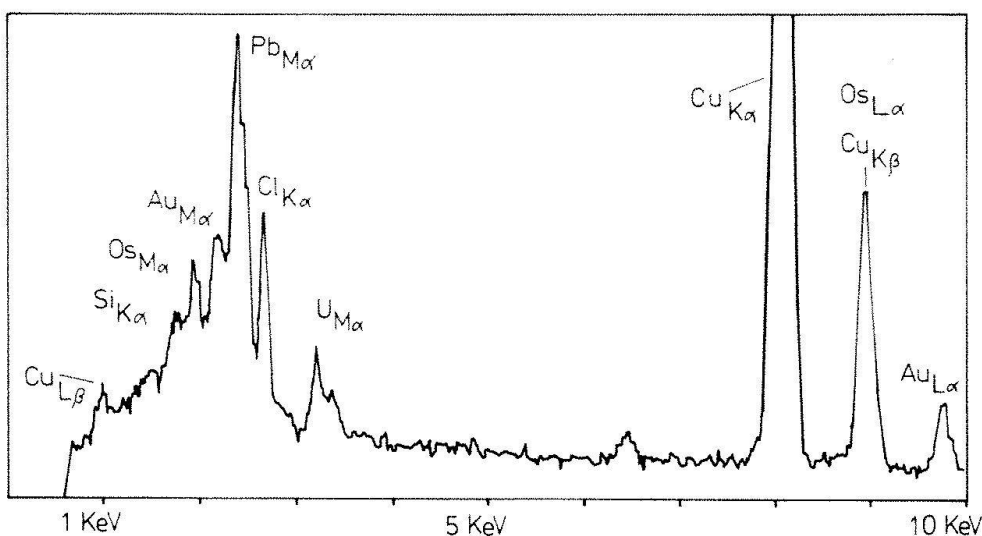


Fig. 10. Röntgenspektrogramm eines Aurosoms. Neben den charakteristischen Peaks für Gold ( $L_{\alpha}$  und  $M_{\alpha}$ ) treten noch die präparationsbedingten Peaks für Osmium, Blei und Uran auf. Der Silizium- und der Chlorpeak werden durch das Einbettungsmittel hervorgerufen.



fellös Ausscheidungsprodukte des in der Therapie verwendeten Goldpräparates dar, und es kann nicht ausgeschlossen werden, dass sie als Ausdruck einer durch Gold verursachten Nierenerkrankung zu gelten haben.

### Probleme der Objektpräparation

Das Spektrum des letzten Beispiels, mit seiner Vielzahl von unspezifischen Peaks macht deutlich, wie stark offensichtlich objektfremde Faktoren das Resultat einer Analyse beeinträchtigen können. Im Vordergrund stehen dabei die durch Fixation und Schnittkontrastierung eingeführten Artefakte. Die in der Routinepräparation verbreitete Glutaraldehyd-Osmiumtetroxyd-Doppelfixation eignet sich nur bedingt für die EDX-Analyse, weil die im Spektrum auftretenden unvermeidbaren Os-Peaks mit benachbarten Peaks anderer Elemente interferieren. So überlappen sich z. B. der Osmium-M-Peak mit dem  $K_{\beta}$ -Peak von Silizium und dem  $K_{\alpha}$ -Peak von Phosphor, da sie sich in ihren Energiebeträgen nur wenig unterscheiden. Als reine Kohlewasserstoffe, die keinerlei Peaks ergeben, können Glutaraldehyd und Formaldehyd dagegen bedenkenlos zur Fixation verwendet werden. Eine dem Detektorkristall vorgesetzte Folie aus Beryllium (s. Fig. 4), deren Aufgabe darin besteht, das Detektorsystem vom Hochvacuumsystem des Mikroskopes abzuschliessen, hat zur Folge, dass die energiearme charakteristische Röntgenstrahlung (weniger als 1 keV) der Elemente mit Ordnungszahlen von 1-10, also der biologisch bedeutungsvollen Atome wie Wasserstoff, Kohlestoff, Stickstoff und Sauerstoff, schon vor dem Erreichen des Detektorkristalls absorbiert wird.

Auch die für eine einwandfreie Strukturhaltung unerlässlichen Einbettungsmittel, die Epoxyde (Araldit, Epon, Spurr etc.) erzeugen bei der EDX-Analyse Störpeaks. So treten z. B. bei der Analyse von Epon-Dünnschnitten regelmässig kleine Peaks für Silizium und Chlor auf (vgl. Fig. 10). Seit kurzem sind aber Epoxyde im Handel, welche diesen Nachteil nicht mehr aufweisen sollen. Die Kenntnis des räumlichen Auflösungsvermögens der energiedispersiven Röntgenspektralanalyse ist für jeden EDX-Untersu-

cher von grundlegender Bedeutung. Das räumliche Auflösungsvermögen besagt, wie nahe zwei benachbarte Objektstellen beieinander liegen dürfen, um noch getrennt, ohne störende gegenseitige Beeinflussung, analysiert werden zu können.

Der erste, das Auflösungsvermögen begrenzende Faktor ist der Kathodenstrahl selbst. Je feiner der Strahl, desto höher grundsätzlich die Auflösung. Es wäre indessen falsch zu glauben, der heute erreichbare Strahldurchmesser von 2 nm erlaube eine Auflösung in derselben Grössenordnung. Durch die Streuung der Elektronen im Objekt, welche von der Beschleunigungsspannung einerseits (=Energie der Strahlelektronen) und von der Objektdicke andererseits abhängig ist, wird die praktisch erreichbare Auflösung zusätzlich beeinträchtigt. Ideal für die Analyse wären ultradünne Schnitte (dünner als 100 nm). Zumal aber in tierischen und pflanzlichen Geweben die Dichte analysierbarer Elemente erheblich geringer ist als beispielsweise in mineralogischen Proben, muss man, um trotzdem genügend Atome anzuregen, dem Elektronenstrahl mehr Masse exponieren. Mehr Masse ist aber gleichbedeutend mit einem dickeren Schnitt, und da werden wiederum Phänomene wirksam, welche die Messresultate verschlechtern anstatt sie zu verbessern:

Mit zunehmender Eindringtiefe werden die Strahlelektronen im Objekt zunehmend gestreut. Der Interaktionsraum weicht von der Zylinderform ab und erhält Tropfenform. Dadurch geraten jetzt auch Strukturen in den Einflussbereich der Elektronen, die vom Untersucher gar nicht anvisiert wurden. Das Resultat ist die erwähnte Verschlechterung der räumlichen Auflösung. Grundsätzlich böte sich die Möglichkeit, durch Anheben der Beschleunigungsspannung den Interaktionsraum - die «Birne» - bei gleichbleibender Schnittdicke zu verschmälern. Der Nachteil eines zusätzlich verminderten Bildkontrastes (unkontrastierte, oft auch unosmifizierte Schnitte!) muss aber in Kauf genommen werden.

Für die Schnittkontrastierung biologischer Dünnschnitte gelten dieselben Regeln wie für die Fixation und die Einbettung: Die starke charakteristische Strahlung der Elemente mit hoher Ordnungszahl führt zu Peaks, welche andere, objektspezifische



Peaks leicht überdecken können. Es empfiehlt sich in jedem Falle, vorgängig der Analyse zu prüfen, ob ein kontrastgebendes Element – gewöhnlich Uran, Blei, Wolfram oder Mangan – nicht mit dem Peak eines gesuchten Elementes interferieren könnte.

Schliesslich darf auch die Wahl des Objektträgers nicht dem Zufall überlassen werden. Reinmetallnetze geben selbst dann starke Röntgensignale, wenn der Primärstrahl in einiger Entfernung an den Metallstegen vorbeiführt. Die durch gestreute Elektronen hervorgerufenen Röntgenstrahlen genügen immer noch zur Erzeugung hoher Peaks. Objektträger aus Nylongewebe haben sich als sehr nützlich erwiesen, da sie praktisch keine charakteristischen Röntgenstrahlung emittieren. Gewisse minimale Verunreinigungen von Titan im Kunststoff können sich aber gelegentlich auch hier noch störend auswirken. Vom spektroskopischen Standpunkt aus gesehen «rein» und unbedenklich sind die Objektträgersetze aus Beryllium oder die reinen Kohlefolien. Wegen des hohen Preises und der Toxizität im einen und der extremen mechanischen Fragilität im anderen Fall eignen sich beide Objektträger nur beschränkt für Routinearbeiten.

Alle bisher erwähnten Parameter sind durch den Präparator beeinflussbar. Ein erheblicher Teil der in Spektren auftretenden Störstrahlung kann aber vom Mikroskop selbst beigesteuert sein und ist dann vom Untersucher nur mit grösserem Aufwand zu mindern. Sämtliche, dem Strahlengang exponierte Mikroskopoberflächen werden in unterschiedlichem Masse zur Emission von Röntgenstrahlung angeregt. Störend für die Analyse wirken sich indessen nur die strahlennächsten Metallteile wie Polschuhe (Eisen), Blenden (Platin, Gold etc.) und Objekthalter (z. B. Kupfer) aus. Durch Einsetzen geeigneter Blenden kann die harte Röntgenstrahlung aus dem oberen Säulenbereich weitestgehend eliminiert werden, und durch Ausstreichen der objektnahen Mikroskopteile mit Graphit gelingt es, deren störenden Einfluss auf ein Minimum zu reduzieren.

Bei der noch verbleibenden mikroskopbedingten Störstrahlung handelt es sich um eine relativ konstante Strahlung mit sehr geringer Intensität. Sie wird an jeder Objektstelle in ähnlichen Verhältniswerten wirksam und es besteht die Möglichkeit, diese im

Bedarfsfalle elektronisch von den objektspezifischen Peaks zu subtrahieren.

Die EDX-Analyse ist aber nicht – wie das bisher dargestellt wurde – nur eine Methode zum qualitativen Nachweis von chemischen Elementen. Wie eingangs erwähnt, lassen sich mit ihrer Hilfe auch Angaben über die relative Konzentration und die absolute Menge der einzelnen Elemente in der gewählten Probenstelle gewinnen. Dies erfordert allerdings einen erheblich höheren zeitlichen und materiellen Aufwand. So müssen unter anderem zur Ermittlung der absoluten Werte Standarde verwendet werden, d. h. Vergleichspräparate mit genau bekannter Konzentration des zu messenden Elementes. Darüber hinaus ist die Beachtung einer Reihe von zusätzlichen präparatorischen und instrumentellen Faktoren erforderlich, auf deren Darlegung hier nicht näher eingegangen werden kann. Der interessierte Leser sei an dieser Stelle auf die ausgezeichnete einführende Fachliteratur von Hren et al. (1979) oder von Chandler (1977) verwiesen.

Wenn auch die Präsentation der Methode auf so eng bemessenem Raum der äusserst komplexen EDX-Analysentechnik in keiner Weise gerecht werden konnte, so haben die vorgestellten Beispiele doch gezeigt, dass in der biologischen Diagnostik und Forschung die energiedispersive Röntgenmikroanalyse überall dort routinemässig und mit Erfolg eingesetzt werden kann, wo es gilt, kleinste Elementspuren in kleinsten Proben in situ nachzuweisen.

## Literatur

- Castaing R. und Guinier A. 1949: Sur l'exploration et l'analyse élémentaire d'un échantillon par une sonde électronique, Proc. 1st Int. Congr. Electron Microscopy, Delft. 60.
- Sticher H., Spacher M.A. und Rüttner J.R. 1973: Crystallization in vivo of Rhabdophane in Human Lungs. Nature 241, No. 5384. 49.
- Hren J.J., Goldstein J.I. und Joy D.C. 1979: Introduction to Analytical Electron Microscopy; Press, New York and London.
- Chandler J.A. 1977: X-ray Microanalysis in the Electron Microscope. North-Holland Publishing Company, Amsterdam, New York, Oxford.

## Anschrift des Verfassers:

Dr. Max Albert Spycher  
Institut für Pathologie der Universität Zürich  
Schmelzbergstrasse 12  
CH-8091 Zürich