

KfK 3399
September 1982

Elementanalyse in einzelnen Zellen organischer Proben mit protonen-induzierter Röntgenstrahlung

D. Heck
Institut für Angewandte Kernphysik

Kernforschungszentrum Karlsruhe



KERNFORSCHUNGSZENTRUM KARLSRUHE

Institut für Angewandte Kernphysik

KfK 3399

ELEMENTANALYSE IN EINZELNEN ZELLEN ORGANISCHER PROBEN
MIT PROTONEN-INDUZIERTER RÖNTGENSTRAHLUNG

D. Heck

Kernforschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe

Als Manuskript vervielfältigt
Für diesen Bericht behalten wir uns alle Rechte vor

Kernforschungszentrum Karlsruhe GmbH
ISSN 0303-4003

ZUSAMMENFASSUNG

Mit Ionenmikrostrahlanlagen lassen sich Spurenelementanalysen an einzelnen Zellen organischer Proben durchführen. Die Methode benutzt Protonen-induzierte Röntgenstrahlung, deren Prinzipien dargestellt werden; der Aufbau der Karlsruher Mikrostrahlanlage wird beschrieben. Auf die notwendigen Voraussetzungen der Probenpräparation wird eingegangen. Die Masse des bestrahlten Probenvolumens wird durch Rutherford-Rückstreuung bestimmt. Die Kalibrierung der Elementkonzentrationen erfolgt mit einer Referenzprobe bekannter Zusammensetzung. Die Leistungsfähigkeit der beschriebenen Methode wird am Beispiel von Erythrozyten (roten Blutkörperchen) gezeigt.

Elemental Analysis of Single Cells of Organic Matter by Proton Induced X-rays

ABSTRACT

Trace element analyses in single cells of organic matter may be performed with ion microbeams. The method uses proton induced X-ray emission, the principles of which are presented; the Karlsruhe microbeam setup is described. The requirements for sample preparations are discussed in detail. The mass of the irradiated sample volume is determined by Rutherford backscattering. The calibration of the elemental concentrations is performed by comparison with a reference standard of known composition. The efficiency of the described method is demonstrated at the example of erythrocytes (red blood cells).

1. PROTONEN-INDUZIERTE RÖNTGENSTRAHLUNG

Beim Beschuß eines Atoms mit einem geladenen Teilchen (Elektron oder Ion) kann dieses ein Elektron aus einer der inneren Elektronenschalen (Bohr'sche Bahnen) des Atoms herausstoßen. In dem auf diese Weise angeregten Atom "springt" ein äußeres Elektron auf die innere Lücke, wobei Röntgenstrahlung (oder ein Auger-Elektron) emittiert wird. Die Energie dieser Röntgenstrahlung ist für die Ordnungszahl des Atoms charakteristisch (Moseley'sches Gesetz) und gibt damit über die Elementzugehörigkeit des beschossenen Atoms Auskunft. Die Wahrscheinlichkeit, daß ein solcher Stoß stattfindet, hängt von der Geschwindigkeit des geladenen Teilchens zur Geschwindigkeit des gestoßenen Elektrons auf seiner Bohr'schen Bahn ab und wird am größten, wenn beide Geschwindigkeiten etwa gleich sind. Dies ist z.B. der Fall für die inneren Elektronen von Aluminium und Elektronen von 1,5 keV oder Protonen von ca. 3 MeV.

Beim Auftreffen von geladenen Teilchen auf Materie entsteht außerdem Bremsstrahlung als Untergrundstrahlung mit kontinuierlicher Energieverteilung, verursacht durch die Abbremsung der stoßenden Teilchen ebenso wie die der herausgestoßenen Elektronen. In dieser Hinsicht unterscheidet sich der Beschuß mit Elektronen von dem mit Ionen (für analytische Zwecke werden vorwiegend Protonen verwendet, seltener Helium- oder schwerere Ionen). Denn bei der Anregung mit Protonen von einigen MeV, wie sie in den üblichen Van de Graaff-Beschleunigeranlagen kernphysikalischer Labors zur Verfügung stehen, ist das Intensitätsverhältnis der charakteristischen K-Röntgenstrahlung zum Bremsstrahlungsuntergrund für den Elementbereich der mittelschweren Elemente ($15 \leq Z \leq 40$) etwa 100 mal höher als bei der Anregung mit Elektronenmikrosonden mit typischen Beschleunigungsspannungen von 10 bis 50 keV. Ausführliche Rechnungen von Folkmann¹ zeigen, daß unter realistischen experimentellen Voraussetzungen für Protonen-induzierte Röntgen (X-Ray) Emission (PIXE) Nachweisgrenzen für mittelschwere Experimente in organischem Material im ppm-Bereich erreicht werden können.

Um einzelne Zellen in organischem Gewebe analysieren zu können, ist es notwendig, daß der Durchmesser des anregenden Teilchenstrahls kleiner ist als die zu untersuchende Struktur. Für Elektronen-Mikrosonden ist dafür das technische Know-how der Elektronenmikroskopie vorhanden und daher sind solche Geräte schon über ein Jahrzehnt kommerziell verfügbar; erste Versuche mit Protonenmikrosonden haben wegen der Schwierigkeiten mit der Fokussierung der 2000 mal schwereren Protonen und der ca. 100 mal höheren Energie - verbunden mit dem größeren Aufwand eines Beschleunigers - erst während der siebziger Jahre eingesetzt². Die Anwendung von Protonenmikrosonden zur Untersuchung organischer Strukturen wird in Ref. 3 bis 7 beschrieben.

2. DER PROTONEN-MIKROSTRAHL

Die Protonen-Mikrostrahlanlage ist am 3,75 MV Van de Graaff-Beschleuniger im Kernforschungszentrum Karlsruhe aufgebaut. Einfach geladene Ionen (^1H , ^2D , ^3He oder ^4He) werden in einer Hochfrequenzionenquelle erzeugt. Nach der Beschleunigung und 5 m Flugweg wird der Ionenstrahl durch einen Magneten um 30° abgelenkt und passiert nach weiteren 5 m ein Kollimatorsystem, mit dem der Strahlquerschnitt in 2 gekreuzten Schlitzblenden auf ca. $7 \times 60 \mu\text{m}^2$ beschnitten wird; die Breiten der Blendenschlitze können zwischen 0 und ca. $100 \mu\text{m}$ variiert werden. Diese Schlitzblenden werden mit 2 magnetischen Quadrupollinsen ionenoptisch verkleinert auf die zu untersuchende Probenoberflächen abgebildet. Gegenüber der in Ref. 8 beschriebenen Anordnung wurde der Abstand zwischen den beiden Quadrupollinien auf 18 cm verkürzt, wodurch bei einem geringfügigen Verlust an möglichem Strahlstrom ein etwas kleinerer Strahlfleck von $\sim 2,5 \times 2,5 \mu\text{m}^2$ erhalten wurde. Durch ein Mikroskop, dessen Objektiv ($\times 15$) 45° zur Probenoberfläche geneigt ist, läßt sich die Probenoberfläche während der Bestrahlung beobachten. Mit einer Ablenkvorrichtung⁹ wird der Ionenstrahl während einer Messung mehrere Tausendmal in einem Mäandermuster über die Probenoberfläche bewegt. Ist diese Bewegung schnell genug, dann reduziert sich die lokale Erwärmung der Probe, die durch das Auftreffen des Ionenstrahls verursacht wird. Dies ist insbesondere wichtig,

um das Abdampfen leichtflüchtiger Elemente (z.B. Quecksilber) zu vermeiden, da sonst die Elementkonzentration der Probe lokal verändert wird. Tests haben gezeigt, daß bei Strahlströmen von ca. 1 nA, was einer lokalen Leistungsdichte von $0,3 \text{ mW } \mu\text{m}^{-2}$ ($= 30 \text{ kW cm}^{-2}$) entspricht, eine Verweilzeit von 0,2 msec auf einem Analysenpunkt keine merkliche Änderung der Spurenelementkonzentration bewirkt.

Beim Durchtritt des Strahls durch die Probe werden die Ionen abgebremst und verlieren einen Teil ihrer Energie, der die Probe erwärmt. Da die Wahrscheinlichkeit zur Erzeugung der Röntgenstrahlung in mittelschweren Elementen und bei Protonen von einigen MeV mit steigender Energie zunimmt, andererseits der Energieverlust pro Wegelement mit steigender Ionenenergie fällt, ist es günstig, mit höheren Ionenenergien zu arbeiten, um große Röntgenausbeuten bei geringer Erwärmung der Proben zu erhalten. Andererseits nimmt auch der Bremsstrahlungsuntergrund mit steigender Energie zu, so daß für mittelschwere Elemente die Protonenenergie von 3 MeV einen vernünftigen Kompromiß ergibt.

Die entstehenden Röntgenquanten werden in einem Si(Li) Detektor (80 mm^2 , Abstand 26 mm) nachgewiesen. Vor dem Detektorfenster aus $25 \mu\text{m}$ Beryllium kann eine Absorberfolie angebracht werden, um niederenergetische Röntgenquanten der leichten Elemente teilweise zu absorbieren und damit die Gesamtzählrate so zu verringern, daß eine Auflösungsver-schlechterung durch Zählratenüberlastung (sog. Pile up) vermieden wird.

Jedes registrierte Ereignis wird charakterisiert durch die Röntgenenergie und die beiden Koordinaten der momentanen Strahlauslenkung zum Zeitpunkt seiner Entstehung. Diese 3 Werte werden als Digitalinformation in einen Kleinrechner Typ NOVA 2 (Data General Corp.) mit angeschlossenen externen Speicher (256 K Kanäle à 16 bit der Dataram Corp.) gegeben. Wird der externe Speicher in eine 3-dimensionale Matrix (Energie mal X-Position mal Y-Position) aufgeteilt, dann kann jedes Ereignis in diese Matrix eingeordnet werden, und der Inhalt des entsprechenden Kanals wird um 1 erhöht.

Am Ende der Messung wird der Inhalt des externen Speichers auf Magnetband übertragen; die weitere Auswertung erfolgt auf der IBM-Großrechenanlage des KfK.

3. PROBENPRÄPARATION

Um Mikroanalysen an einzelnen organischen Zellen mit der PIXE-Methode durchzuführen, sind bestimmte Anforderungen an die Probe zu stellen (Ref. 7):

- a) Der Durchmesser des Mikrostrahls sollte kleiner als der Durchmesser der Zelle sein. Mit dem in Karlsruhe erreichbaren Strahldurchmesser von $\sim 2,5 \mu\text{m}$ ist dies z.B. für rote Blutkörperchen (Erythrozyten, Durchmesser 7-8 μm) gegeben.
- b) Um eindeutige Aussagen zu erhalten, sollen die Zellen nicht überlappen, d.h., die Dicke eines Mikrotomschnittes soll kleiner oder höchstens gleich der Zellgröße sein; bei eingetrockneten zellhaltigen Flüssigkeiten (Blut) muß die Lösung hinreichend verdünnt werden, um ein "Stapeln" der Zellen zu vermeiden.
- c) Die Probenpräparation darf die Elementkonzentration der Zellen nicht verändern, d.h., es dürfen keine Elemente als Verunreinigungen eingeschleppt werden und es dürfen z.B. durch Zerstoren der Zellwände auch keine Elemente ausgewaschen werden, wodurch die Konzentrationsverteilung über die Probe nivelliert würde.
- d) Da die Analyse im Hochvakuum durchgeführt wird, müssen die Präparate frei von Wasser und leichtflüchtigen Lösungsmitteln sein, die im Vakuum sofort verdampfen.
- e) Um die gute Empfindlichkeit der PIXE-Methode nicht durch einen hohen Bremsstrahlungsuntergrund zu verschlechtern, sollte die durchstrahlte Trägerfolie möglichst dünn und frei von Spurenelementen sein. Dies wird mit Formvar⁺-Folien erreicht, die ähnlich dem in Ref. 10 beschriebenen Verfahren hergestellt und auf Probenträger aus Aluminium mit einer Öffnung von 10 mm \emptyset aufgezogen werden. Die Dicken dieser Folien betragen bei der in Abschnitt 7 beschriebenen Messung zwischen 30 und 40 $\mu\text{g}/\text{cm}^{-2}$ (entspricht etwa 0,3 bis 0,4 μm Dicke). Neuere Versuche ergaben

⁺)Polyvinylformal der Fa. Merck, Darmstadt

Folien von besserer Homogenität bei nur $8-10 \mu\text{g cm}^{-2}$
Dicke (entspricht etwa $0,1 \mu\text{m}$).

Nach den Erfahrungen des Verfassers erfüllen Mikrotomschnitte von ca. $6 \mu\text{m}$ Dicke von kryofixiertem Gewebe mit anschließender Gefriertrocknung die Bedingungen c) und d) ausreichend, daher wurden bisher keine weiteren Methoden zur Gewebepreparation entwickelt. Um ein Zerstoren der Zellwände von Erythrozyten durch osmotischen Überdruck im Zellinnern zu vermeiden, wurden Blutproben mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt und auf der Trägerfolie im Trockenschrank eingetrocknet.

4. MASSENBESTIMMUNG

Beim Durchtritt von Ionen durch Materie treten diese nicht nur in Wechselwirkung mit den Elektronen der Atomhüllen, sondern auch mit den Atomkernen selbst. Die gleiche (positive) elektrische Ladung von Ion und gestoßenem Kern bewirkt eine Abstoßung, wobei wegen der Erhaltungssätze von Energie und Impuls das stoßende Ion aus seiner ursprünglichen Richtung abgelenkt wird und einen Teil seiner Bewegungsenergie an den gestoßenen Atomkern überträgt (sog. Rutherford Back-Scattering = RBS). Registriert man in einem unter 135° zum einfallenden Ionenstrahl montierten Detektor (Sperrschichtzähler von 450 mm^2 mit $300 \mu\text{m}$ Drifftiefe in 40 mm Abstand) die RBS-gestreuten Ionen, so ist ihre Zahl direkt proportional der Zahl der getroffenen Atome und damit der bestrahlten Masse. Dabei wird die Proportionalitätskonstante mit einem Standard bekannter Massenbelegung (Dicke) bestimmt. Diese Proportionalitätskonstante variiert allerdings von Element zu Element (sogar von Isotop zu Isotop). Es finden sich jedoch in der Literatur ^{11,12} hinreichend genaue Daten, um eine Korrektur auszurechnen, die bei Verwendung eines Standards einer ähnlichen Elementzusammensetzung an die Proportionalitätskonstante angebracht werden muß.

Der Vorteil dieser Massenbestimmungsmethode liegt darin, daß gleichzeitig mit den Röntgenquanten genau die Masse des Volumens bestimmt wird, in dem auch die Röntgenstrahlung erzeugt wird. Damit entfällt die schwierige genaue Bestimmung des Ionenstrahldurchmessers und seines Intensitätsprofils.

5. REFERENZSTANDARD UND KONZENTRATIONSBESTIMMUNG

Als Referenzstandard wurde eine hochreine Plastikfolie (Trespaphan der Fa. Kalle, Zusammensetzung $(\text{CH}_2)_n$) von $0,577 \text{ mg cm}^{-2}$ Dicke (ca. $6 \text{ }\mu\text{m}$) verwendet. Auf diese Folie wurde als Referenzmaterial für PIXE eine Schicht von $55 \text{ }\mu\text{g cm}^{-2}$ Nickel (ca. 640 \AA) aufgedampft; dies entspricht einem Gewichtsanteil von 9,5 %. Die Schichtdicken wurden durch Wägen mit einer Genauigkeit von besser 1 % bzw. 5 % bestimmt. Beim Beschuß mit 3 MeV Protonen wurden 418 Röntgenquanten der Ni K_α -Linie pro 1000 im RBS-Detektor nachgewiesenen gestreuten Protonen gezählt.

Beim Übergang zu organischem Material mit einer angenommenen ¹³ mittleren Zusammensetzung von 5,5 % H, 48,25 % C, 5,25 % N, 41 % O, und gleicher Massenbelegung wie der Referenzstandard erniedrigt sich die Zählrate im RBS-Detektor rechnerisch um 8,3 % (Faktor 0,923).

Bei gegebener Ionenenergie ist die Ausbeute der Röntgenquanten elementabhängig. Dazu kommt eine Energieabhängigkeit des Nachweisvermögens des Röntgendetektors. Unter Benutzung von Literaturwerten ¹⁴ ergeben sich die in Tab. 1 angegebenen relativen Elementempfindlichkeiten der PIXE-Methode.

Wegen der endlichen Dicke der Probe, in der der Protonenstrahl abgebremst wird, ist die Produktionsrate der Röntgenstrahlung pro Weglängeneinheit am Eintritt des Ionenstrahls höher als am Austritt. Außerdem müssen die am Austritt erzeugten Röntgenquanten auf dem Weg zum Detektor die Dicke des Probenmaterials durchqueren und werden dabei zu einem größeren Bruchteil in der Probe absorbiert verglichen mit den am Protoneneintritt erzeugten Quanten. Diesen Einfluß der Probendicke kann man rechnerisch korrigieren ¹³. Für nicht zu dicke Proben ($<2 \text{ mg cm}^{-2}$) steigt die Korrektur linear mit der Probendicke an. Die Größe dieser sog. Matrixkorrektur ist in Tab. 1 mit angegeben, wobei die für die Matrixkorrektur notwendige Probendicke aus der RBS-Zählrate gewonnen wird.

6. DEMONSTRATIONSMESSUNG: ERYTHROZYTEN (ROTE BLUTKÖRPERCHEN)

Abb. 1 zeigt eine Mikroskopaufnahme der analysierten Blutprobe.

Wegen der im Trägermaterial erzeugten Strahlenschäden hebt sich der vom Protonenstrahl überstrichene, nahezu quadratische Bereich ($73 \mu\text{m} \times 80 \mu\text{m}$) in der Mitte des Bildes hell ab; die Zeilenstruktur (32 Zeilen) der Strahl-
ablenkung ist zu erkennen. Die vom Protonenstrahl getroffenen 16 Erythrozyten (Durchmesser je $\sim 7 \mu\text{m}$) sind im unteren Bildteil numeriert.

Am unteren Rand der Bestrahlungszone und ebenso am rechten Rand in der Nähe der oberen Ecke befinden sich Kristallisationen der physiologischen Kochsalzlösung, mit der das Blut verdünnt wurde.

Abb. 2 zeigt in perspektivischer Darstellung die Zählrate des RBS-Detektors in Abhängigkeit der beiden Ortskoordinaten der Strahlablenkung. Diese Zählrate ist, wie in Abschnitt 5 beschrieben, ein Maß für die lokale Massenbelegung der Probe. Die Lage der einzelnen Erythrozyten läßt sich durch Vergleich mit Abb. 1 ermitteln; die Verwaschung der Struktur kommt von den für diese Messung ermittelten Strahlabmessungen von $2,5 \times 5 \mu\text{m}^2$. Während die Lage der isolierten Erythrozyten 3, 9 und 12 klar zu erkennen ist, sind z.B. die Erythrozyten 5 und 6 nicht mehr eindeutig zu trennen. Die Verteilung der Eisenkonzentration ist in Abb. 3 gezeigt. Hier wurde für jeden Punkt der Verteilung die Zählrate der Fe K_{α} -Strahlung durch die zugehörige RBS-Zählrate dividiert und die Matrixkorrektur angebracht, so daß die "Höhe" des Gebirges direkt die Eisenkonzentration angibt. Die Häufung des Eisens an den Stellen der Erythrozyten ist zu erkennen. In absoluten Mengen sind dies $0,04 \text{ pg Eisen pro Meßpunkt}$ in der Mitte der Erythrozyten und $\sim 0,0007 \text{ pg Eisen}$ bei den Punkten mit leerer Trägerfolie.

Analog zu Abb. 3 lassen sich auch die Konzentrationen der anderen Elemente darstellen. Bei den seltenen Spurenelementen sind wegen der statistischen Zählratenfluktuationen von Punkt zu Punkt diese "Gebirgslandschaften" ziemlich "zerklüftet" und unübersichtlich. Durch Zusammenfassen von ca. 10 benachbarten Punkten innerhalb des Bereichs eines Erythrozyten wurden Röntgenspektren erhalten; als Beispiel ist in Abb. 4 das Röntgen-

spektrum des Erythrozyten 2 dargestellt. Aus diesen Spektren wurden die Konzentrationen der Tabelle 2 ermittelt. Mit eingezeichnet in Abb. 3 ist die Höhe des Bremsstrahlungsuntergrundes. Für die dem Brom im Periodensystem benachbarten Elemente wird die mögliche Nachweisgrenze nicht erreicht, weil die Meßzeit zu kurz war und daher zu wenig Ereignisse registriert wurden. Im vorliegenden Beispiel wurde der Strahl etwa 350 000 mal über jeden Punkt gelenkt, was einer gesamten Meßzeit von 70 sec je Punkt entspricht. Für die 32 mal 32 Punkte der Verteilung ergibt dies eine Meßzeit von etwa 20 Stunden.

7. DISKUSSION DER ERGEBNISSE

Im folgenden Punkten kann die Analyse einzelner Zellen verbessert werden:

a) Ortsauflösung:

Die sichtbare Zeilenstruktur in Abb. 1 bestätigt die Ortsauflösung in x-Richtung sowie die Langzeitstabilität der Strahlage in dieser Richtung. Eine Strahlprofilanalyse ergibt eine Halbwertsbreite in x-Richtung von ca. 2,5 μm . Für die Y-Richtung ergibt sich eine Halbwertsbreite von ca. 5 μm , was deutlich schlechter ist als die in früheren Experimenten¹⁵ erreichte Auflösung von 2,5 μm . Die Ursache dafür ist das zur Probenoberfläche um 45° geneigte Objektiv des Beobachtungsmikroskops, was bewirkt, daß die Leuchtspur des Strahls, der zum exakten Fokussieren auf einen 5 μm dicken Szintillator gebracht wird, immer als Strich der Länge $0,71 \cdot (d+5)$ μm beobachtet wird. Hierbei ist d die Strahlausdehnung in y-Richtung. Dies erschwert die Strahleinstellung beträchtlich. Es muß daher geprüft werden, ob die gegenwärtige geometrische Anordnung in der Vakuumkammer den Einbau eines weiteren Mikroskops, das senkrecht von der Rückseite her beobachtet, möglich ist.

b) Nachweisgrenze:

Ein Vergleich mit den rechnerischen Abschätzungen von Folkmann¹ zeigt, daß im vorliegenden Experiment die der Methode inhärente Nachweisgrenze nicht

erreicht wurde, da der Untergrund etwa doppelt so hoch ist wie der rechnerische Bremsstrahlungsuntergrund. Eine mögliche Ursache dafür wäre eine elektrostatistische Aufladung der Probenträgerfolie oder der vor dem Röntgendetektor montierten Absorberfolie; die Verwendung von leitenden Materialien (z.B. durch Aufdampfen einer dünnen Kohlenstoffschicht) sollte getestet werden. Eine weitere mögliche Ursache ist ein ungenaues Fluchten des Si(Li)-Detektorkollimators auf den Strahlauftreffpunkt (das zwischenzeitlich festgestellt (Abweichung ca. 0,5 mm) und behoben wurde). Durch Verwendung von dünneren Trägerfolien (siehe Kapitel 4) wird der Bremsstrahlungsuntergrund weiter abgesenkt. Die Reinheit der Trägerfolie sollte jeweils in einer Leermessung überprüft werden.

c) Untergrund von Kupfer:

In dem Meßbeispiel waren über der Trägerfolie 2 dünne Kupferdrähte gespannt, die zum leichteren Auffinden einer bestimmten Probenstelle als Orientierungshilfen dienten. Durch den sog. Strahlungshalo - unvollständige Fokussierung des Protonenstrahls, wobei 0,04 % der Strahlintensität ¹⁵ bis zu einem Umkreis von 1 mm Durchmesser neben der Analysenstelle auftritt - wird in den Drähten die charakteristische Cu-Röntgenstrahlung angeregt. Durch Weglassen solcher Drähte wird dieser Untergrund vermieden.

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. E. Rokita von der Jagellonischen Universität Krakau für die Anfertigung von Trägerfolien und Blutproben und für viele hilfreiche Diskussionen. Frll. D. Ewert hat durch das Anfertigen der Mikrophotos und die Betriebsmannschaft des Van de Graaff-Beschleunigers durch ihr stetes Bemühen um einen Protonenstrahl guter Qualität zu dieser Arbeit beigetragen.

LITERATUR

1. F. Folkmann, Journ. Phys. E: Sci. Instr. 8 (1975) 429.
2. J.A. Cookson et al., J. Radioanal. Chem. 12 (1972) 39.
3. J.A. Cookson und F.D. Pilling, Phys. Med. Biol. 21 (1976) 965.
4. U. Lindh, Thesis, University of Uppsala, Schweden (1978)
5. F. Bosch et al., Microscopica Acta Suppl. II (Hirzel, Stuttgart, 1978) p . 331.
6. F. Watt et al., Nucl. Instr. Meth. 197 (1982) 65.
7. F. Legge et al., Nucl. Instr. Meth. 197 (1982) 191.
8. D. Heck, Beitr. elektronenmikroskop. Direkttabb. Oberfl. 12 (1979) 259.
9. D. Heck, KfK-Bericht 2734 (1978).
10. T.B. Johansson et al., Analytical Chem. 47 (1975) 855.
11. R.A. Jarjis, Nuclear Cross Section Data for Surface Analysis, University of Manchester, 1979.
12. J.W. Mayer und E. Rimini, Ion Beam Handbook for Material Analysis (Academic Press, New York, 1977).
13. E. Rokita, persönliche Mitteilung (1982).
14. S.A.E. Johansson und T.B. Johansson, Nucl. Instr. Meth. 137 (1976) 473.
15. D. Heck, KfK-Bericht 2686 (1978) 115.

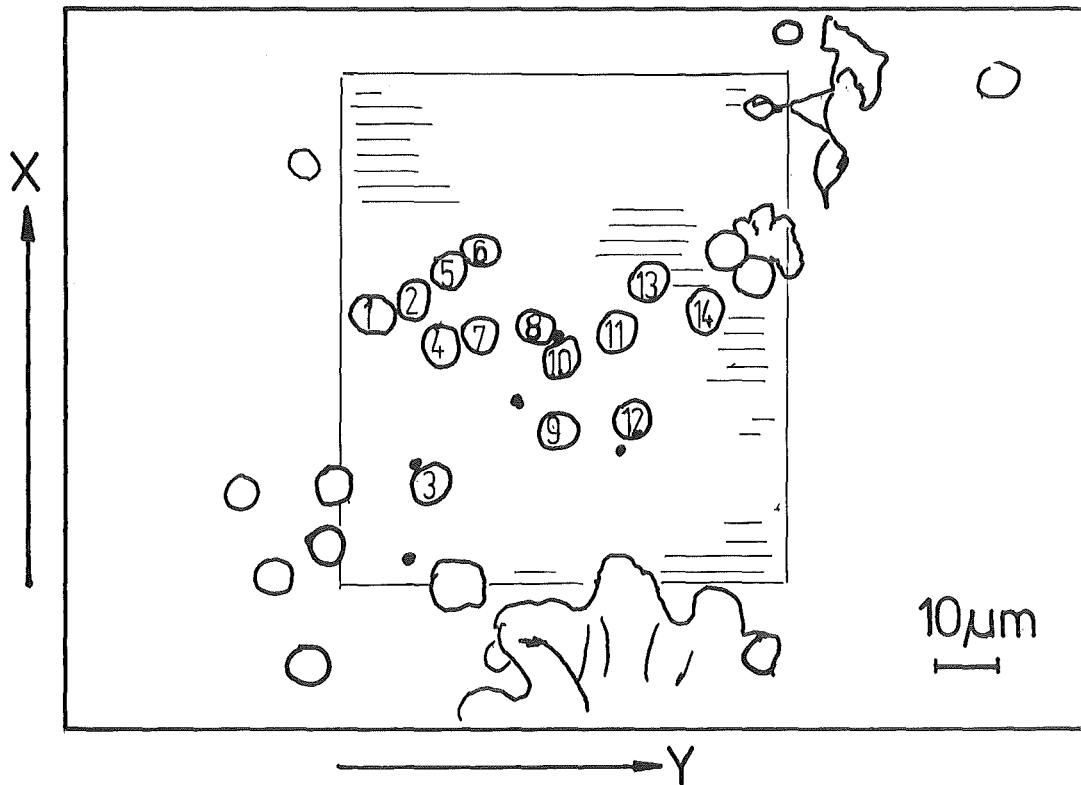
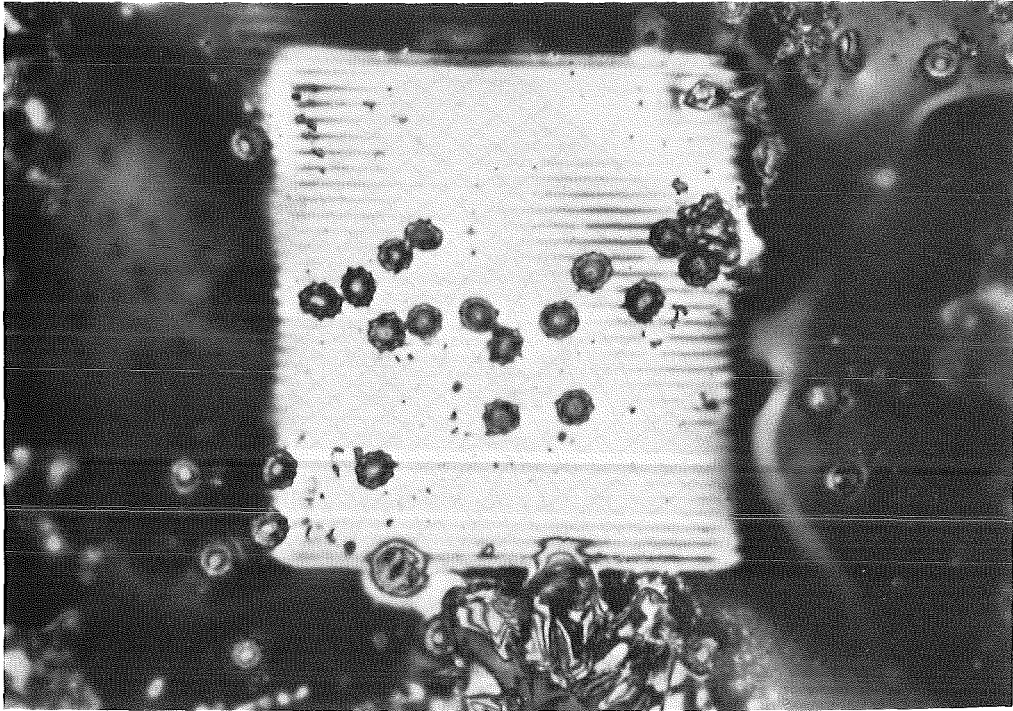


Abb. 1 Mikroaufnahme der analysierten Blutprobe. Die bestrahlte Fläche, die sich in Bildmitte hell gegen die Umgebung abhebt, hat eine Ausdehnung von $73 \mu\text{m} \times 80 \mu\text{m}$. Die im Strahlbereich liegenden Erythrozyten sind im unteren Bildteil numeriert.

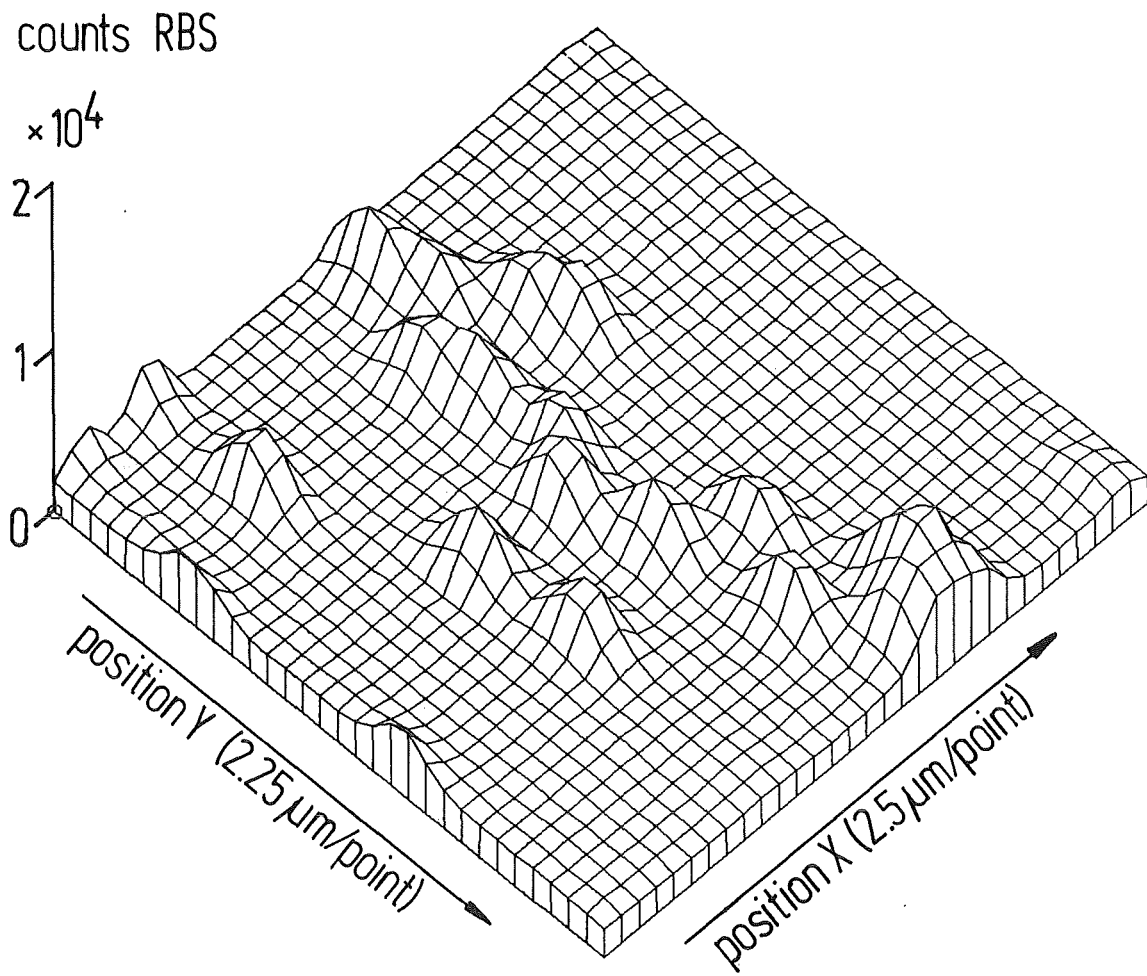


Abb. 2 Perspektivische Darstellung der RBS-Zählrate als Funktion der beiden Ortskoordinaten der Strahlauslenkung.

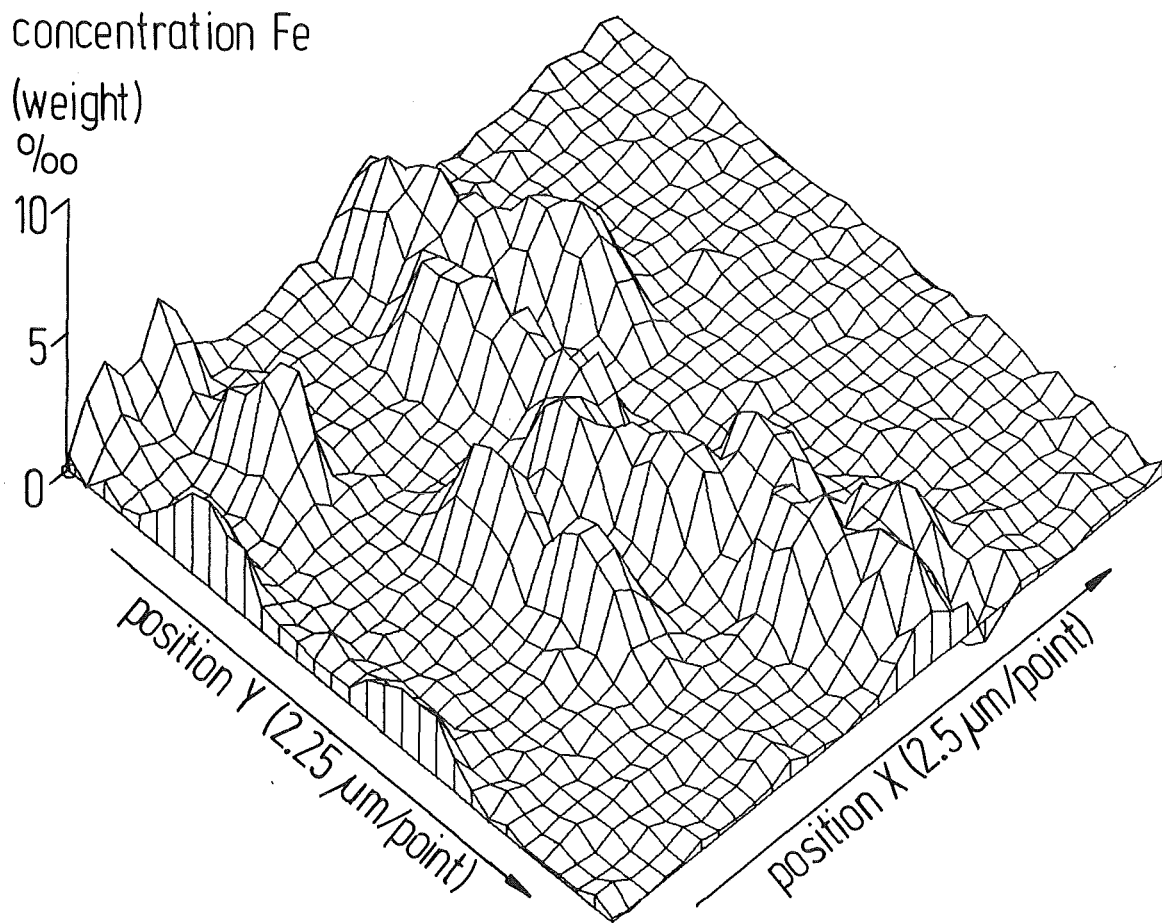


Abb. 3 Perspektivische Darstellung der Eisenkonzentration als Funktion der beiden Ortskoordinaten der Strahlauslenkung.

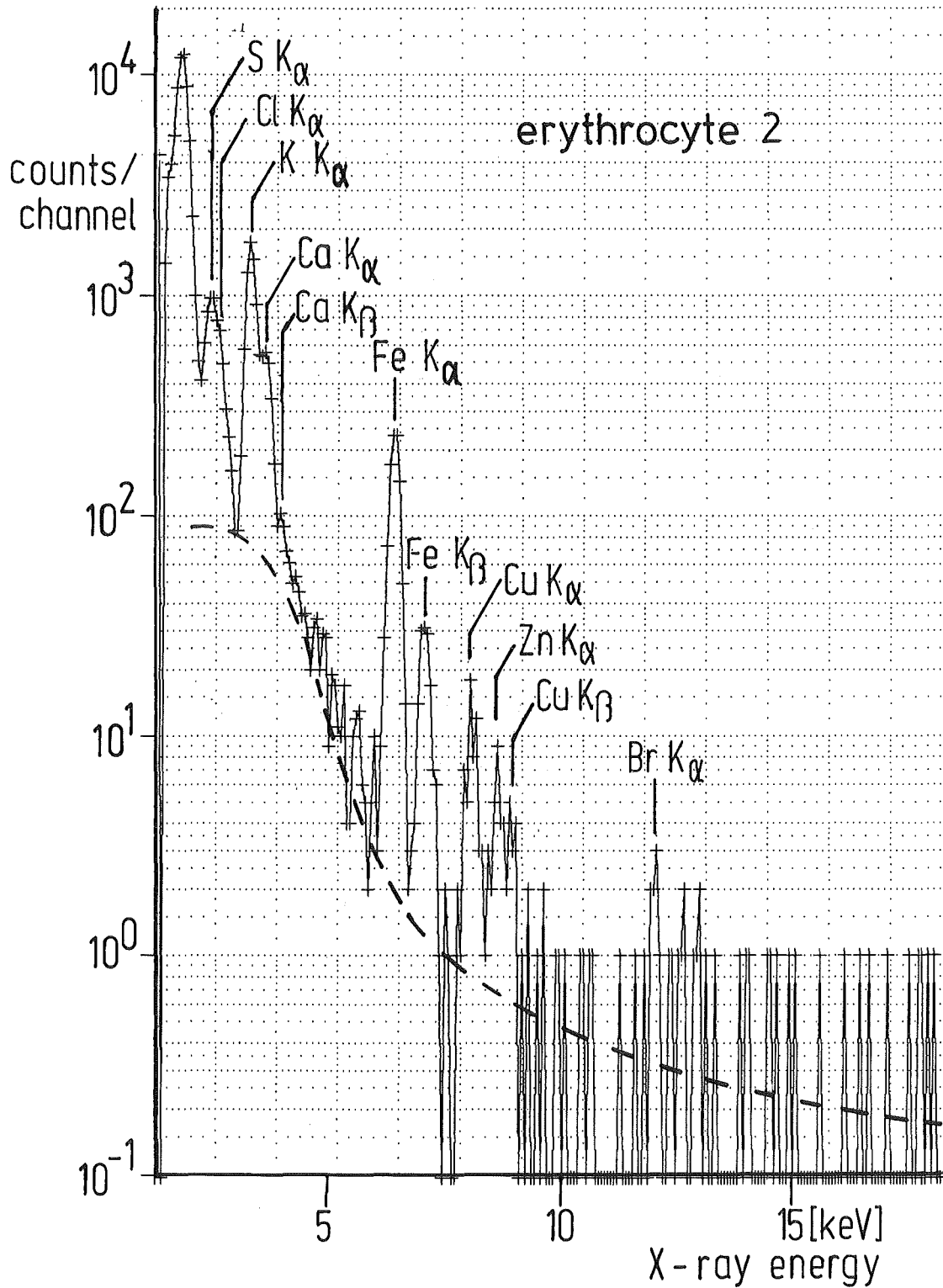


Abb. 4 Röntgenenergiespektrum des Erythrozyten 2. Die Elementzuordnung der Linien ist angegeben. Der ungefähre Verlauf des experimentellen Untergrundes ist gestrichelt eingezeichnet.

Tabelle 1 Relative Intensität der Röntgen K_{α} -Linie verschiedener chemischer Elemente für gleiche Gewichtskonzentrationen bei Anregung mit 3 MeV Protonen; Größe der Matrixkorrektur bei organischem Gewebe von 1 mg cm^{-2} Dicke.

Element	Z	rel. Intensität ⁺⁾ normiert auf $\text{NiK}_{\alpha}=1$	Matrix-Korrektur %
P	15	10,15	35,9
S	16	10,75	24,3
Cl	17	9,08	17,4
K	19	7,02	10,2
Ca	20	6,09	8,4
Sc	21	4,63	7,2
Ti	22	3,78	6,4
V	23	2,98	5,9
Cr	24	2,48	5,5
Mn	25	1,95	5,3
Fe	26	1,56	5,1
Co	27	1,22	5,0
Ni	28	1,000	5,0
Cu	29	0,741	5,0
Zn	30	0,594	5,1
As	33	0,267	5,2
Se	34	0,199	5,3
Br	35	0,161	5,3
Rb	37	0,0945	5,5
Sr	38	0,0756	5,6
Y	39	0,0589	5,6
Zr	40	0,0460	5,7

⁺⁾ einschließlich Absorberfolie von 26 μm Dicke

Tabelle 2 Elementkonzentrationen in einzelnen Erythrozyten

Erythrozyten Nr.	Gewicht (pg) a)	Elementkonzentrationen in % ^{b)}			
		K	Fe	Zn	Br
1	60	10,4	5,3	0,29	0,20
2	77	9,3	5,5	0,35	0,31
3	64	9,2	5,9	0,49	0,58
4	73	8,9	5,6	0,37	0
7	61	9,2	5,1	0,35	0,29
8	66	8,1	4,9	0,45	0,16
9	70	8,3	5,6	0,40	0,17
10	76	8,4	5,3	0,43	0,25
11	75	8,0	5,5	0,27	0,22
12	67	8,4	5,4	0,31	0,47
13	70	11,1	5,8	0,23	0
14	69	13,2	6,4	0,51	0,61
Typischer Fehler		0,30	0,20	0,13	0,21
Trägerfolie	1,9 ^{c)}	0,65 ^{d)}	0,18 ^{d)}	0,06 ^{d)}	0,24 ^{d)}
		+0,06	+0,03	+0,05	+0,04

a) Unter der Annahme eines Durchmessers von 7 μm

b) Gewichtskonzentrationen

c) pro Meßpunkt

d) gemittelt über 50 Meßpunkte