

## **Eine neue Verwendung des Elektronenmikroskops in der analytischen Chemie.**

Von

**R. Strebinger und E. Orth.**

Aus dem Institut für anorganische und analytische Chemie der Technischen  
Hochschule Wien.

Mit 4 Abbildungen.

*(Eingelangt am 15. Juli 1949. Vorgelegt in der Sitzung am 13. Okt. 1949.)*

Mit der Entdeckung der Elektronenstrahlen und ihrer Verwendung in der Elektronenmikroskopie zur Erreichung bisher nicht gekannter Auflösungen wurden auf den verschiedenartigsten Forschungsgebieten in den letzten Jahren sehr bedeutende Erfolge erzielt. Es hat das Elektronenmikroskop die Grenzen des Erforschbaren in vielen Gebieten weit hinausgeschoben, neue Perspektiven eröffnet und zu wichtigen Erkenntnissen geführt. Wenn sich hier auch noch vieles in den Anfangsstadien befindet, so kann doch festgestellt werden, daß zuerst die beschreibende Naturwissenschaft Nutzen aus der neuen Erfindung gezogen hat. Morphologische Feinheiten sind der Beobachtung zugänglich gemacht worden, an deren Erforschung man vor kurzem noch nicht einmal denken hätte dürfen. Zoologie, Medizin, Botanik, Mikrobiologie, sie alle haben verschiedentlich mit Hilfe des Elektronenmikroskops Neues finden können und auch zu der begründeten Hoffnung Anlaß gegeben, daß dieses Instrument noch zu vielen Erfolgen führen wird.

Aber nicht nur die rein beschreibenden Disziplinen verdanken dem Elektronenmikroskop Neues. Die „Welt der vernachlässigten Dimensionen“, das wissenschaftlich wie auch praktisch so bedeutsame Gebiet der Kolloide, bietet ein reiches Betätigungsfeld für Forscher, die dieses Hilfsmittel verwenden können. Waren auch kolloide Teilchen im Ultramikroskop sichtbar zu machen, so ist es doch klar, daß an den beobachtbaren Beugungsbildern Details, wenn überhaupt, so nur in ausgesprochen unzureichendem Umfange beobachtet werden konnten. Hier schafft das Elektronenmikroskop wirklich äußerst erfolgversprechende Aussichten.

Man wird Kristallformen schon in ihren primitivsten ersten Anfängen erkennen und beobachten, sowie Zusammenhänge zwischen wichtigen Eigenschaften und Kristallisationsgrad verfolgen können.

Von ganz hervorragender Wichtigkeit dürfte das Elektronenmikroskop auch für das Gebiet der Biochemie werden. Die Prozesse aus dem Gebiet der mikroheterogenen Katalyse, die nirgends wie hier, auch nicht in annähernd ähnlichem Maße durch Strukturfeinheiten des Reaktionsmediums gelenkt und geregelt werden können, lassen die Berechtigung dieser Auffassung klar erkennen. Viele Substrate wie auch Reagenzien bei biologischen Umsetzungen (Proteine, Wirkstoffe) reichen infolge ihrer Molekulargrößen bereits in die Dimensionen von Kolloiden. Man kann sie schwer zur Ausbildung makroskopisch und auch mikroskopisch sichtbarer Kristalle bringen und ist so sicher in vielen Fällen daran interessiert, auch kleinste Kristallisationsanfänge und Keime feststellen zu können. Vielleicht wird sich hier auch die Möglichkeit bieten, durch feinere Strukturbeobachtungen genauere Kenntnis der Umstände zu erlangen, die die biokatalytische Tätigkeit charakterisieren.

Auf dem Gebiete der Virusforschung hat das Elektronenmikroskop bereits zu sichtbaren Resultaten geführt.

Aber auch in der anorganischen Chemie sind bereits Erfolge der neuen Untersuchungsmethodik zu verzeichnen. So haben kolloide Präparate von Metallen vielfach deren Kristallform erkennen lassen.

Es schien nun der Gedanke naheliegend, zu untersuchen, ob sich das Elektronenmikroskop nicht auch dem analytisch arbeitenden Chemiker nützlich erweisen könnte und den Kreis seiner Nachweis- bzw. Bestimmungsmöglichkeiten zu erweitern vermöchte. In erster Linie muß hier wohl daran gedacht werden, den zu bestimmenden Bestandteil in charakteristischer Kristallform in Erscheinung treten zu lassen, wie dies in der Mikroanalyse schon vielfach gehandhabt wird. Aus Zweckmäßigkeitsgründen ist wohl das Sublimationsverfahren dazu berufen, die Herstellung von gut beobachtbaren Präparaten zu ermöglichen.

Ausgegangen wurde von der Überlegung, daß mit Hilfe des Elektronenmikroskops Abbildungen mit geringsten Mengen eines Präparats erhalten werden und diese Abbildungen für dasselbe Präparat stets die gleichen Grundzüge zeigen. An Hand einer solchen Aufnahme oder auch durch bloßes Betrachten auf dem Leuchtschirm müßte man demnach einen Stoff identifizieren können, vorausgesetzt natürlich, daß dessen Aussehen unter dem Elektronenmikroskop schon bekannt ist.

Dieser Vorgang stellt seinem Wesen nach nichts Neues dar. So wird z. B. in der analytischen Chemie zum Nachweis des Magnesiums die Fällung  $MgNH_4PO_4$  stets im Mikroskop betrachtet. Eine eigene Methodik der Mikroanalyse, die Mikrokristallfällung, ist zum sichersten Nachweisverfahren im Rüstzeug des Analytikers geworden, wobei die

Art, auf welche man die Kristallindividuen erhält, ob durch Fällung oder Sublimation, keine wesentliche Rolle spielt, wenn auch zuweilen die durch Sublimation erhaltenen Kristalle ausgeprägter sind. Im Elektronenmikroskop gelang es uns bisher nur, sublimierte Präparate zu beobachten (in wenigen Fällen Kristallbildungen aus Lösungen), während Kristallfällungen, hervorgerufen durch ein Reagens, bisher mißlingen.

Praktisch spricht man nur dann von der Sublimierbarkeit eines Stoffes, wenn unterhalb seines Schmelzpunktes in absehbarer Zeit die Verflüchtigung wahrnehmbarer Mengen erfolgt. Bei der Makrosublimation werden darunter wägbare, bei der Mikrosublimation mikroskopisch sichtbare Mengen verstanden.

Die Mikrosublimation, deren Begründer *A. Helwig*<sup>1</sup> war, läßt sich mit den einfachsten Mitteln durchführen. Die Substanz wird auf einer Unterlage erhitzt und das Sublimat auf einer Glasplatte, einem Objektträger oder Deckglas, aufgefangen. Die zahlreichen, in der Literatur beschriebenen einfachen Durchführungsverfahren weisen nur geringfügige und meist unwesentliche Unterschiede auf.

Da der Zweck des Sublimierens im wesentlichen in der Reinigung eines Rohproduktes besteht und da für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen nur äußerst geringe Mengen verwendet werden, bewährte sich folgende Methode der Sublimation:

In einem unten zugeschmolzenen, 15 mm langen Röhrchen, dessen lichte Weite 5 mm beträgt, wird eine ganz geringe Menge der zu sublimierenden Substanz gegeben. Das Röhrchen wird in eine Haltevorrichtung gehängt, ein kleiner Kamin mit vier kleinen seitlichen Öffnungen aufgesetzt und mittels des für diese Zwecke besonders gut geeigneten *Strebinger*-Brenners<sup>2</sup> erhitzt. Die Vorteile dieses Brenners liegen darin, daß man in einem Arbeitsgang und mit demselben Röhrchen mühelos und in kürzester Zeit eine zweimalige Sublimation durchführen kann. Dadurch erhält man nicht nur wesentlich reinere Sublimate, was für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen von besonderer Wichtigkeit ist, sondern man spart auch an Untersuchungssubstanz.

Der Vorgang der Sublimation spielt sich folgendermaßen ab: Das mittlere Flämmchen des Brenners erhitzt die Substanz am Boden des Röhrchens und veranlaßt die sublimierbaren Anteile zur Sublimation. In der oberen Hälfte des Röhrchens schlägt sich, weil dieses durch die außerordentlich kleine Flamme kaum oder gar nicht erwärmt wird, das sublimierte Produkt zum Teil noch sehr unrein nieder. Nun wird der Hahn des Brenners umgelegt, wobei das mittlere Flämmchen erlischt und nur noch ein Kranz kleiner seitlicher Flämmchen brennt. Diese bringen unter Zuhilfenahme des kleinen Kaminaufsatzes, um eine zu starke Ausstrahlung der Wärme nach den Seiten hin zu verhindern, die Substanz zum abermaligen Sublimieren. Auf einer

<sup>1</sup> Z. analyt. Chem. **3**, 43 (1864).

<sup>2</sup> D. R. G. M. 1525152; Z. analyt. Chem. **126**, 133 (1943); Praktikum für quantitative Analyse, 4. Aufl. 1943.

mit einer Pinzette über das Röhrchen gehaltenen Blende, die mit einem Zaponlackfilm überzogen ist, wird in wenigen Sekunden genügend Substanz zur elektronenmikroskopischen Betrachtung vorhanden sein.

Mit dieser Vorrichtung wurde zwecks Orientierung über die Kristallform der arsenigen Säure in der ersten Versuchsreihe eine unwägbare Menge derselben sublimiert und die Abb. 1 erhalten.

Es war naheliegend, die erhaltenen Arseniksäurekristalle auch röntgenographisch zu untersuchen. Doch ergaben diesbezügliche Versuche,



Abb. 1 (Vergr. 1: 40 000).

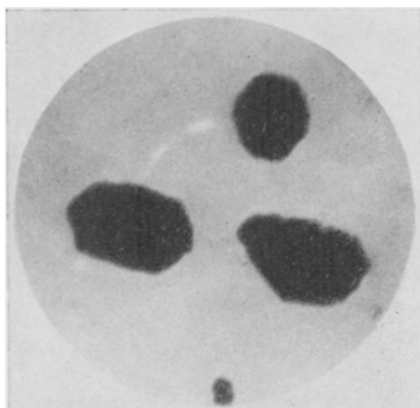


Abb. 2 (Vergr. 1: 40 000).

die von einem von uns durchgeführt wurden, bisher keine für uns auswertbaren Ergebnisse<sup>3</sup>.

Die folgende Versuchsreihe sollte über die geringste, für den elektronenmikroskopischen Nachweis erforderliche Menge Aufschluß geben. Es wurden daher eine Reihe Lösungen von verschiedener Konzentration bereitet und mit Hilfe einer Platinöse ein kleiner Tropfen arseniger Säure auf die Blenden aufgetragen und eintrocknen gelassen. Ohne viel Mühe wurde noch bei einer Konzentration der Lösung von  $3 \cdot 10^{-9}$  mg As/ccm die Abb. 2 erhalten.

Es ist in beiden Fällen nicht nur die Kristallform die gleiche, sondern auch die Menge, die notwendig ist, um Arsen durch Abbildung nachzuweisen, erreichte ein bisher nicht gekanntes Minimum. Mikroanalytisch konnten nach *Billeter* und *Marfurt*<sup>4</sup> auf beschwerlichem und langwierigem Wege  $2,5 \cdot 10^{-7}$  mg Arsen nachgewiesen werden. Geringere

<sup>3</sup> Die Untersuchungen wurden im Institut für physikalische Chemie an der Technischen Hochschule Wien im Verein mit Frau Dr. *L. Castellitz* durchgeführt, der für ihre Mühe auch an dieser Stelle der Dank ausgesprochen sei.

<sup>4</sup> *Helv. chim. Acta* **6**, 771 (1923).

Mengen lassen sich, so weit bis jetzt bekannt ist, nur mit dem Spektralapparat nachweisen. Daß jedoch auch die Leistungsfähigkeit des Elektronenmikroskops nicht oder nur wenig hinter diesem Apparat zurücksteht, bestätigte folgender Versuch einer weiteren Versuchsreihe:

Einer Maus, deren Gewicht ungefähr 15 g betrug, wurden in die Bauchhöhle 0,1 mg arsenige Säure injiziert. Nach 12 Std. wurde ein stecknadelkopfgroßes Stückchen der Lungenspitze sublimiert (die Maus war inzwischen verendet) und beim Betrachten des Sublimats unter

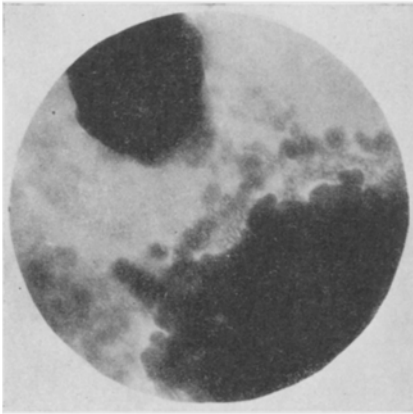


Abb. 3 (Vergr. 1: 40 000).

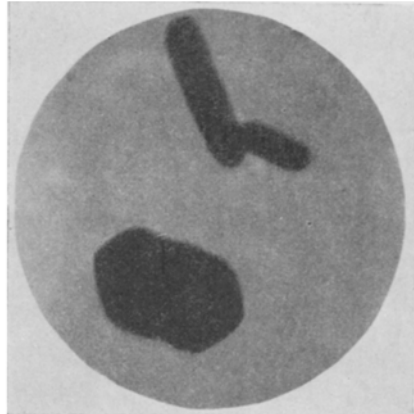


Abb. 4 (Vergr. 1: 40 000).

dem Elektronenmikroskop die Abb. 3 erhalten. Dieses Präparat ist noch reichlich verunreinigt, da nur eine einmalige Sublimation durchgeführt wurde wegen der Befürchtung, doch zuviel Substanz zu verlieren. Ohne jede Schwierigkeit ist jedoch auch hier ein Teil eines Kristalls erkennbar. Bei der folgenden Abb. 4 wurde nach der vorher beschriebenen Weise vorgegangen und eine zweimalige Sublimation, vereinigt in einem Arbeitsgang, durchgeführt. Wieder tritt die gleiche Kristallform in Erscheinung wie bei der Sublimation reiner arseniger Säure. Es kann daher kaum einem Zweifel unterliegen, daß Mengen wie  $3 \cdot 10^{-9}$  mg Arsen, wobei in letzterem Versuch dahingestellt bleiben muß, ob sich die arsenige Säure auch gleichmäßig im Körper der Maus verteilt hat, elektronenmikroskopisch nachgewiesen werden können.

Wegen der verhältnismäßig großen Leichtigkeit, mit der sowohl im Falle der Lösung als auch in dem der Maus die arsenige Säure durch ihre charakteristische Kristallform erkannt werden konnte, lag die Vermutung nahe, daß die unterste Grenze der Nachweisbarkeit, sofern von einer solchen überhaupt gesprochen werden kann, auch mit dem

Elektronenmikroskop noch lange nicht erreicht ist. Der folgende Versuch sollte diese Vermutung bestätigen.

Es wurden 3 Haare der mit Arsen vergifteten Maus ausgezupft und sublimiert. Das Sublimat wurde, wie oben beschrieben, auf einer Blende aufgefangen und elektronenmikroskopisch untersucht. Ein Teil der Blenden war, bis auf wenige undefinierbare Teilchen, leer. Auf einigen Blenden war jedoch wieder die gleiche Kristallform erkennbar. Wenn man nun das Gewicht dieser 3 Härchen, deren Länge etwa 4 bis 6 mm betrug, mit 0,006 mg annimmt, dann ist es hier gelungen, eine Menge von  $2 \cdot 10^{-10}$  mg Arsen nachzuweisen. Dieser Wert wurde errechnet auf Grund der Annahme, daß sich die arsenige Säure gleichmäßig im Körper der Maus (einschließlich der Haare) verteilt hat. Es ist jedoch kaum anzunehmen, daß in den Haaren, vor allem aber in den Haarspitzen, ebensoviel arsenige Säure sein sollte wie im Blutkreislauf.

Um möglichst jeden Irrtum auszuschließen, wurde mit einer größeren Anzahl Haare einer nicht mit arseniger Säure behandelten Maus ein Blindversuch durchgeführt. Die Haare wurden sublimiert und trotz der elektronenmikroskopischen Untersuchung vieler Blenden keine Kristalle beobachtet.

Die analytische Chemie hat demnach im Elektronenmikroskop ein neues Hilfsmittel erhalten, um geringere Substanzmengen als mit den bisherigen Mikromethoden sicher identifizieren zu können und gleichzeitig durch Herstellung eines Photos einen dauernden Beweis für den positiven Ausfall der Nachweismethode erbringen zu können.

In Zukunft muß jedoch sowohl das Problem der Herstellung dünnster Objektschichten (Versuche liegen bereits vor) gelöst werden, als auch die Entwicklung im Mikroskop dahingehen, durch Anwendung immer höherer Beschleunigungsspannungen der Elektronen günstigere Durchstrahlungsbedingungen zu erreichen.

Die Verwendung des Elektronenmikroskops in der analytischen Chemie aber wird aller Voraussicht nach im wesentlichen darin bestehen, geringste Substanzmengen auf Grund ihrer Kristallform zu erkennen bzw. zu bestimmen, welche Größenordnungen den Kristallen zukommen.