



TECHNISCHE
UNIVERSITÄT
WIEN

Vienna University of Technology

DIPLOMARBEIT

Bestimmung von Phosphor und Schwefel in Proteinen mit low Z Totalreflexionsröntgenfluoreszenzanalyse

ausgeführt am

Atominstitut
der Technischen Universität Wien

Stadionallee 2
1020 Wien

unter der Anleitung von

Ao.Univ.Prof. Dipl.-Ing. Dr.techn. Christina Strelt

durch

Mirjam Rauwolf, B.Sc.

Schönburgstraße 30/14
1040 Wien

Wien, 2. Juli 2013

Kurzfassung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Anwendbarkeit der Totalreflexionsröntgenfluoreszenzanalyse (TXRF) auf die Bestimmung des Verhältnisses von P zu S in Proteinen studiert werden. Der Grad der Phosphorylierung hat direkte Auswirkungen auf die Proteinaktivität und kann über das Verhältnis von P zu S in der Probe bestimmt werden.

Die TXRF ist ein Spezialverfahren der EDXRF und zeichnet sich durch einfache Probenvorbereitung, einfache Quantifizierung und sehr gute Nachweisempfindlichkeiten aus. Besonders im Bereich der Analyse von leichten Elementen konnten die Vorteile der TXRF gezeigt werden ([45]). Dabei wurde eine Cr-Röhre (1300W) zur Anregung verwendet, deren K_{α} -Strahlung bei 5,41keV durch einen Multilayer monochromatisiert wurde. Die Messungen werden unter Vakuumbedingungen durchgeführt, um die niederenergetische Fluoreszenzstrahlung möglichst wenig zu schwächen. Der zur ED-Messung verwendete stickstoffgekühlte Si(Li)-Detektor (30mm² aktive Fläche) besitzt ein ultradünnes Fenster (300nm Polymer). Da Proteine eine komplizierte organische Probenmatrix besitzen, gestaltete sich die Probenvorbereitung schwierig. Dies hatte zur Folge, dass einige Proben eine inhomogene Elementverteilung innerhalb der Probe zeigten und die Quantifizierung dieser Proben somit wenig zufriedenstellende Ergebnisse mit großen Abweichungen zu den erwarteten Werten lieferten. Die in dieser komplexen Matrix erzielten Nachweisgrenzen für P (34pg) und S (19pg) waren aber sehr zufriedenstellend.

Zur Verbesserung des Messaufbaus wurde die Messkammer mit einem Anpressmechanismus versehen, der ein reproduzierbares Einsetzen eines runden 30mm-Quarzreflektors erlaubt. Da die verwendete Messkammer ursprünglich für die Oberflächenmessungen von Silizium-Wafern verwendet wurde, stellte dieser Einbau eine wesentliche Verbesserung dar. Weiters wurde ein Siliziumdriftdetektor (20mm²) mit ultradünnem Fenster eingebaut und erfolgreich getestet. Da der Detektor im Vakuum betrieben werden sollte, war es notwendig, die Peltierkühlung mit einer Wasserkühlung zu verbessern. Die damit erzielten Empfindlichkeiten des SDDs waren gegenüber dem Si(Li)-Detektor um etwa eine Größenordnung besser, die Nachweisgrenzen waren vergleichbar.

Abstract

The aim of this thesis was studying the use of the Total Reflection X-Ray Fluorescence Analysis (TXRF) for measuring P and S in proteins. The protein phosphorylation degree has direct effects on protein activity and can be monitored by the P/S ratio.

TXRF is a special method of EDXRF and is characterized by easy sample preparation, simple quantification and good detection sensitivities.

Especially in the area of low Z element analysis the advantages of TXRF have been demonstrated ([45]). Therefore a Cr X-ray tube (1300W) was used for excitation. The K_{α} radiation (5.41keV) was made monochromatic by multilayer. Measurements were conducted under vacuum conditions to weaken low-energy fluorescent radiation as little as possible. The fluorescent X-radiation emitted from the protein sample was analyzed with a Si(Li)-detector (30mm²) with an ultra-thin window (300nm polymer).

As proteins have a complex organic matrix, the sample preparation was complicated. As a consequence, some samples showed a heterogeneous element distribution which resulted in poor quantification for those samples. Nonetheless, low detection limits for P (34pg) and S (19pg) were achieved.

To improve the measuring system a mount was added, which allows reproducible insertion for 30mm reflector plates. This was an improvement as the system was initially constructed to measure 200mm Si Wafers. Furthermore a silicon drift detector (20mm²) with an ultra-thin window was installed and successfully tested. Given that the SDD was to be operated under vacuum conditions, it was necessary to improve the Peltier cooling by a water-cooling system. The obtained sensitivities of the SDD were about a magnitude better than the sensitivities of the Si(Li)-detector. The detection limits of those two detectors were similar.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben:

Frau **Univ. Prof. DI Dr. Christina Streli** für die hervorragende Betreuung während meiner Diplomarbeit und das Vertrauen in meine Fähigkeiten

Herrn **Univ. Prof. DI Dr. Peter Wobrauschek** für die zahlreichen anregenden Gespräche und die großzügige Hilfe

Frau **Dr. Christine Vanhoof** und dem gesamten Vito-Team für die gute Kooperation und Probenvorbereitung

Herrn **Walter Klikovich** für die Anfertigung aller im Rahmen dieser Arbeit benötigten Bauteile

Herrn **Dieter Ingerle** für das Einbinden des neuen Detektors und der Controller in das von ihm geschriebene Messprogramm

Herrn **DI Bernhard Pemmer** für die Hilfe bei der Wasserkühlung

Herrn **ADir. Ing. Manfred Fugger** für die Unterstützung beim Entkoppeln der Messsysteme

Stephan Smolek und **Martin Schiebl, B.Sc.**, sowie der gesamten Arbeitsgruppe für das angenehme Arbeitsklima

und **Katharina Prochazka, B.Sc. M.A.** für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Ein besonderer Dank gilt auch meiner **Familie**, die mich in meinem Studium immer vorbehaltlos unterstützt hat und mir ein Umfeld gaben, das es mir erlaubte mich voll und ganz auf mein Studium zu konzentrieren.

Zuletzt möchte ich noch allen FreundInnen und KollegInnen für die schöne gemeinsame Zeit danken.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Physikalische Grundlagen	3
2.1	Charakteristische Röntgenstrahlung	3
2.1.1	Bohr'sches Atommodell	3
2.1.2	Schalenmodell	4
2.1.3	Entstehung charakteristischer Röntgenstrahlung	6
2.2	Kontinuierliche Strahlung	10
2.3	Erzeugung von Röntgenstrahlung	10
2.4	Wechselwirkung der Röntgenphotonen mit Materie	12
2.4.1	Kohärente Streuung	12
2.4.2	Inkohärente Streuung	13
2.4.3	Photoeffekt	15
2.5	Schwächung der Röntgenstrahlung	16
3	Röntgenfluoreszenzanalyse	18
3.1	Wellenlängendispersive Röntgenfluoreszenzanalyse	18
3.2	Energiedispersive Röntgenfluoreszenzanalyse	19
3.3	Intensität der Fluoreszenzstrahlung	20
3.4	Totalreflexionsröntgenfluoreszenzanalyse	23
3.4.1	Prinzip der Totalreflexion	25
3.4.2	Stehende Wellen und die Winkelabhängigkeit der Fluoreszenzintensität	29
3.4.3	TXRF-Spektrum	30
3.4.4	Anwendungsbereiche der TXRF	31
3.5	TXRF für leichte Elemente	32
4	Halbleiterdetektoren	35
4.1	p-n-Struktur	35
4.2	PIN-Struktur	36
4.2.1	Si(Li)-Detektor	36
4.3	PSN-Struktur	37
4.3.1	Siliziumdriftdetektor	37
4.4	Detektorartefakte	39
4.4.1	Summenpeak	39
4.4.2	Escape-Peak	39
4.4.3	Compton-Kante	39
4.5	Wirkungsgrad	39
4.6	Energieauflösung	40
4.7	Nachweis- und Quantifizierungsgrenze	41

5	Chemische Grundlagen	43
5.1	Proteine	43
5.2	Phosphorylierung	44
6	Messaufbau	47
6.1	Multilayer	49
6.2	Winkelmotor	51
7	Kalibrierung	53
8	Messung der Proteinproben	61
8.1	Erste Messreihe	61
8.2	Zweite Messreihe	63
9	Tausch des Si(Li)-Detektors gegen einen SDD	72
10	Zusammenfassung und Ausblick	82
	Tabellenverzeichnis	84
	Abbildungsverzeichnis	84
	Literaturverzeichnis	87
A	Technische Zeichnungen	91
A.1	Probenhalterung	91
A.2	Detektor	97
A.3	Detektoraufhängung	98
B	Zertifikate	102

1 Einleitung

Die reversible Proteinphosphorylierung ist die verbreitetste Signalübermittlung in Zellen. Die Art, wie ein Protein auf die Phosphorylierung reagiert, hängt dabei sowohl von der Phosphorylierungsstätte als auch vom Phosphorylierungsgrad ab. Deswegen ist es wichtig, Informationen über die Konzentration des an die Aminosäureseitenketten gebundenen Phosphats (und somit über den Phosphorylierungsgrad) zu erhalten.

Um ein Verhältnis zwischen der Menge des vorhandenen Proteins und der an das Protein angehängten Phosphatgruppen angeben zu können, kann der Quotient der Konzentrationen des im Protein enthaltenen Schwefels und des Phosphors der angehängten Phosphatgruppen bestimmt werden.

Die Totalreflexionsröntgenfluoreszenzanalyse (TXRF) eignet sich sehr gut zur Quantifizierung dieser leichten Elemente. Deswegen wurde im Rahmen dieser Arbeit die Bestimmung dieser Elemente in der organischen Probenmatrix untersucht.

Die Messungen wurden am TXRF-Spektrometer für leichte Elemente durchgeführt. Dieser Aufbau ist durch die gute Anregung leichter Elemente mit einer Hochleistungs-Cr-Röntgenröhre (1300W) und durch die Verwendung eines Detektors mit ultradünnem Fenster (300nm Polymer), sowie der Möglichkeit, unter Vakuumbedingungen (keine Absorptionsverluste) zu messen, besonders gut zur Analyse dieser biologischen Proben geeignet.

Da für die TXRF-Analyse dünne Probenfilme verwendet werden, kann die Absorption innerhalb der Probe vernachlässigt werden. Dies erleichtert die Quantifizierung der Probe, da in diesem Fall ein linearer Zusammenhang zwischen Fluoreszenzintensität und Konzentration gilt.

Um die Quantifizierung mittels internen Standards durchführen zu können, wurde eine Kalibrierung für die Elemente von Fluor bis Schwefel mittels ICP-Standards erstellt. Diese Kalibrierung wurde mit organischen Standards (Seronorm Trace Elements Serum L-2 und Bis(4-nitrophenyl)hydrogenphosphat) überprüft und dann zur Auswertung der Proteinproben verwendet.

Die Proben wurden am „Flemish Institute for Technological Research NV“ (VITO) vorbereitet und auf die Quarzglas-Probenträger für TXRF-Spektrometer aufgebracht. Sie wurden dann auf dem Postweg an das Atominstitut geschickt, wo die Proben gemessen wurden.

Um den Aufbau zu verbessern, wurde noch vor der Durchführung der Messungen eine neuere Probenhalterung konstruiert, die den Probenwechsel erleichtert und die Notwendigkeit der Justierung reduziert.

Nach den Messungen wurde außerdem der bis dahin verwendete Si(Li)-Detektor durch einen

Siliziumdriftdetektor ersetzt der eine verbesserte Energieauflösung und Zählratenverarbeitung aufwies. Dafür war es notwendig, eine neue Detektorhalterung zu konstruieren. Diese neue Halterung ermöglicht es die Position des neuen, recht kleinen SD-Detektors sowohl in der Höhe als auch horizontal zu ändern. Dies erlaubt uns bei größeren Proben wie zum Beispiel Siliziumwafer an mehreren Punkten Messungen durchzuführen.

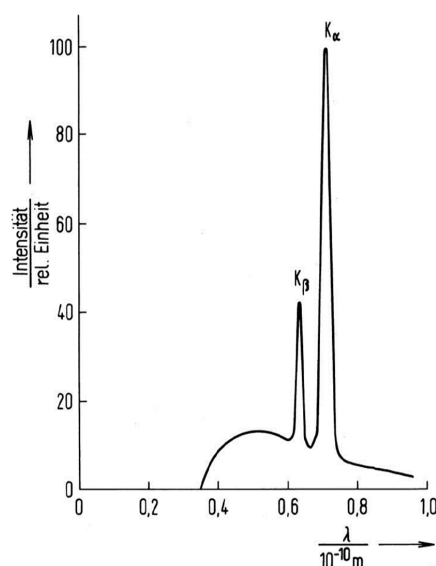
Nach dem Detektortausch wurde das TXRF-Spektrometer mit einem neuen PC ausgestattet auf dem die bisher verwendete Steuersoftware für die Positionierung der Probenträger eingearbeitet und verbessert wurde.

Mit diesem neuen Detektor wurden zu Vergleichszwecken dieselben Kalibrierproben neu analysiert. Das Resultat war eine deutliche Verbesserung der Nachweisgrenzen wie in Kapitel 7 zu sehen ist.

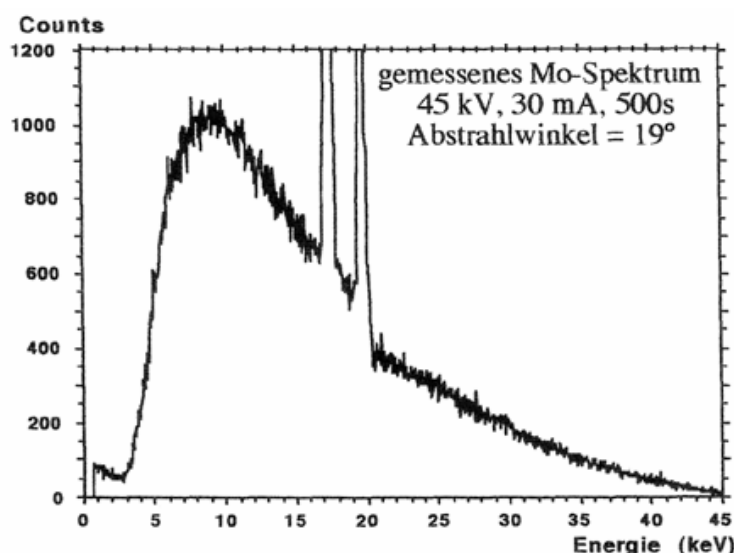
2 Physikalische Grundlagen

Die Einteilung der Strahlungsarten erfolgt sowohl nach dem Entstehungsort der Strahlung als auch nach der Energie (bzw. Wellenlänge λ), wobei die Energiebereiche (und somit natürlich auch die Wellenlängenbereiche) zwischen den einzelnen Strahlungsarten überlappen können. Unter Röntgenstrahlung versteht man im Allgemeinen elektromagnetische Strahlung mit einer Energie von etwa 10eV bis zu einigen 100keV; dies entspricht einer Wellenlänge λ zwischen 10^{-7} und 10^{-12} m.

Im elektromagnetischen Spektrum befindet sich die Röntgenstrahlung zwischen der UV- und der γ -Strahlung. Die Röntgenstrahlung kann weiters in die charakteristische Röntgenstrahlung (diskretes Linienspektrum) und die kontinuierliche Bremsstrahlung unterteilt werden.



(a) Für dieses Spektrum wurde die Intensität über die Wellenlänge aufgetragen [1, S. 563]



(b) Für dieses Spektrum wurde die Intensität über die Energie aufgetragen [2]

Abbildung 2.1: Röntgenspektrum mit kontinuierlichen Anteil und charakteristischen Linien

2.1 Charakteristische Röntgenstrahlung

Um die charakteristische Röntgenstrahlung zu erklären, werden das Bohr'sche Atommodell und das Pauli-Prinzip benötigt.

2.1.1 Bohr'sches Atommodell

Im Rutherford'schen Atommodell kreisen die Elektronen um den Atomkern und werden dabei von der als Zentripetalkraft wirkenden Coulombkraft auf ihren Bahnen gehalten. Da es sich bei den Elektronen um beschleunigte Teilchen handelt, müssten sie gemäß der klassischen Elektrodynamik ständig Energie abstrahlen. Die Elektronen würden dadurch abgebremst

werden und in den Kern stürzen. Somit gäbe es keine stabilen Atome.

Um Atome beschreiben zu können, die trotz der kreisenden Elektronen stabil sind, stellte Bohr folgende Postulate auf [3]:

- Für Elektronen sind nur ganz bestimmte, diskrete Bahnen (Zustände mit den Energien E_n) in Atom erlaubt. Auf diesen Bahnen bewegen sich die Elektronen strahlungslos.
- Unter Aussendung der Energie

$$\Delta E = h\nu = E_n - E_{n'} \quad (1)$$

kann ein Elektron von einem Zustand höherer Energie E_n in einen niedrigeren Zustand $E_{n'}$ übergehen. Dabei ist ν die Frequenz des ausgesendeten Photons und h ¹ das Planck'sche Wirkungsquantum. Durch Absorption der Energie ΔE kann der Übergang auch in die entgegengesetzte Richtung stattfinden.

- Die Umlauffrequenz der Elektronen auf den Bahnen steht mit der Frequenz ν der emittierten Linien in Zusammenhang.

2.1.2 Schalenmodell

Die Vorstellung Bohrs, dass ein kreisendes Elektron auf seiner Bahn exakt lokalisierbar ist, während gleichzeitig die genaue Energie (bzw. Impuls) des Elektrons bekannt ist, verstößt gegen die Heisenberg'sche Unschärferelation ($\Delta p \cdot \Delta x \geq \frac{h}{4\pi}$).

Um die Unschärferelation erfüllen zu können, wurde das quantenmechanische Orbital eingeführt. Unter einem Orbital versteht man eine Wellenfunktion, deren Betragsquadrat die diffuse Aufenthaltswahrscheinlichkeit eines Elektrons mit einer exakten Energie angibt.

Die von Bohr eingeführten Schalen bestimmter Energie werden von innen nach außen mit der **Hauptquantenzahl** $n = 1, 2, 3, \dots$ nummeriert. Auch üblich ist die Bezeichnung der Schalen mit den Großbuchstaben K, L, M, $\dots$, wobei hier K die innerste Schale bezeichnet. Die maximal mögliche Anzahl an Elektronen in einer Schale ist durch $2n^2$ gegeben.

Für Atome mit mehreren Elektronen werden die Schalen in Unterbereiche mit unterschiedlichen Energieniveaus, sogenannte Orbitale, unterteilt. Die unterschiedlichen Orbitalformen werden mit den Buchstaben s, p, d, f, g, h, $\dots$ ² gekennzeichnet. Die möglichen Orbitale in einer Schale werden durch die **Nebenquantenzahl** (auch **Bahndrehimpulsquantenzahl** genannt) l angegeben. Mit $l = 0(s), 1(p), 2(d), \dots, (n-1)$ kann man nun alle möglichen Orbitale für eine Schale n bestimmen.

¹ $h = 6.62606957(29) \cdot 10^{-34} \text{ Js}$ [4, S. 73]

² s...sharp, p...principal, d...diffuse und f...fundamental

Orbitaltyp	Anzahl der Orbitale pro Schale (2l+1)	Anzahl der Elektronen in den Orbitalen	Form
s	1	2	Kugel
p	3	6	Hantel
d	5	10	Doppelhantel
f	7	14	Rosette

Tabelle 2.1: Anzahl und Verteilung der Orbitale

Die Magnetquantenzahl des Drehimpulses

$$m_l = \frac{L_z}{\hbar} = -l, \dots, 0, \dots, l \text{ mit } \hbar = \frac{h}{2\pi} \quad (2)$$

gibt die Orientierung des Orbitals im Raum an. L_z bezeichnet die z-Komponente des Bahndrehimpulses.

Der Spin beschreibt den Eigendrehimpuls eines Teilchens. Für die z-Komponente des Spins gilt:

$$s_z = s \cdot \hbar \quad (3)$$

Für Elektronen hat die **Spinquantenzahl** s den Wert $\frac{1}{2}$.

Somit kann die **magnetische Spinquantenzahl**

$$m_s = \pm \frac{s_z}{\hbar} \quad (4)$$

für Elektronen ausschließlich die Werte $+\frac{1}{2}$ und $-\frac{1}{2}$ annehmen.

Pauli-Prinzip:

Durch diese Quantenzahlen (n , l , m_l , s und m_s) wird der Energiezustand eines Elektrons präzise festgelegt. Das Ausschließungsprinzip von Wolfgang Pauli besagt nun, dass sich Fermionen in mindestens einer Quantenzahl unterscheiden müssen. Daraus ergibt sich direkt, dass ein Orbital mit maximal zwei (gepaarten) Elektronen, die sich in der magnetischen Spinquantenzahl m_s unterscheiden, besetzt sein kann.

Schale	Bahndrehimpuls l/m	maximale Besetzung
1=K	0/0	2
2=L	0/0, 1/(0,±1)	8
3=M	0/0, 1/(0,±1), 2/(0,±1,±2)	18
4=N	0/0, 1/(0,±1), 2/(0,±1,±2), 3/(0,±1,±2,±3)	32
5=O	0/0, 1/(0,±1), 2/(0,±1,±2), 3/(0,±1,±2,±3), 3/(0,±1,±2,±3,±4)	50

Tabelle 2.2: Bezeichnungen der Elektronenschalen und maximale Besetzungszahlen nach dem Pauli'schen Ausschließungsprinzip [5, S. 60]

2.1.3 Entstehung charakteristischer Röntgenstrahlung

Charakteristische Röntgenstrahlung kann entstehen, wenn bei einem (unelastischen) Stoß ein gebundenes inneres Elektron aus der Schale ionisiert wird und ein Elektron aus einer äußeren Schale in das so entstandene Loch nachrückt (s. Abb. 2.2).

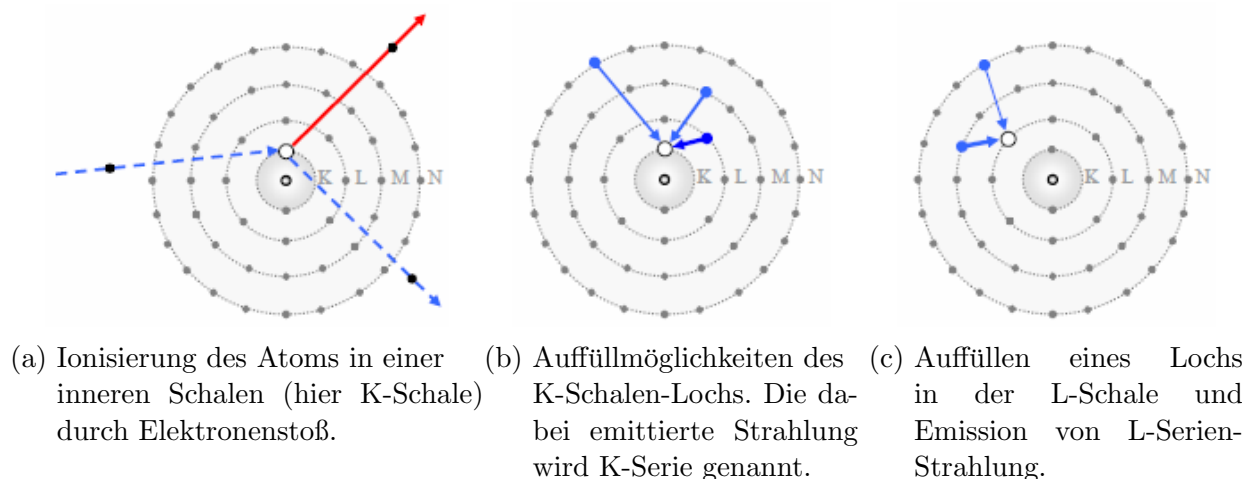


Abbildung 2.2: Entstehung der charakteristischen Röntgenstrahlung am Beispiel eines schweren Atoms. [5, S. 67]

Bei diesem Vorgang (Ionisation) wird dem Elektron eine Energie übertragen, die mindestens seiner Bindungsenergie entspricht. Man spricht von einem Photoeffekt, wenn die benötigte Energie von einem Photon übertragen wird und von der direkten Ionisation wenn ein geladenes Teilchen die Energie überträgt. Bei der Ionisation bleiben Energie und Impuls der wechselwirkenden Partner erhalten.

Das nachrückende Elektron geht nun von einem angeregten, energetisch höheren Zustand in einen stärker gebundenen Zustand über. Die Differenz der Energien der beiden Zustände wird durch ein Röntgenphoton (oder durch die Emission eines Augerelektrons) abgegeben. Das ausgesandte Photon besitzt eine Energie (s. Gleichung 1), die für den Übergang charakteristisch ist.

Durch den Übergang entsteht folglich ein Loch in einer höheren Schale, welches wiederum von einem Elektron aus einer noch höheren Schale aufgefüllt wird. Dies hat zur Folge, dass eine ganze Reihe an für das Element charakteristischen Linien ausgesandt werden.

Nicht jeder nach Gleichung 1 mögliche Zustand kann tatsächlich stattfinden. Die erlaubten Übergänge werden durch die Auswahlregeln [6, S. 226–228]:

$$\Delta l = l_i - l_f = \pm 1 \quad (5)$$

$$\Delta J = 0, \pm 1, \text{ aber } J = 0 \not\rightarrow J = 0 \quad (6)$$

gegeben, wobei J die Quantenzahl des Gesamtdrehimpulses $\vec{J} = \vec{L} + \vec{S}$ ist.

The diagram illustrates the energy levels and transitions for the K, L, M, and N series of spectral lines. The energy levels are labeled on the left as $N_{VII}, N_{VI}, N_V, N_{IV}, N_{III}, N_{II}$ (N-series), $M_V, M_{IV}, M_{III}, M_{II}, M_I$ (M-series), L_{III}, L_{II}, L_I (L-series), and K (K-series). Transitions are indicated by vertical arrows between these levels. The K-series transitions are labeled $\alpha_2, \alpha_1, \beta_3, \beta_1, \beta_2$. The L-series transitions are labeled $\beta_4, \beta_3, \gamma_2, \gamma_3, \eta, \beta_1, \gamma_5, \gamma_1, \iota, \alpha_2, \alpha_1, \beta_6, \beta_5, \beta_2$. The M-series transitions are labeled $\gamma_4, \gamma_3, \delta_2, \delta_3, \kappa, \beta_1, \gamma_5, \gamma_1, \iota, \alpha_2, \alpha_1, \beta_6, \beta_5, \beta_2$. The N-series transitions are labeled $\delta_4, \delta_3, \epsilon_2, \epsilon_3, \theta, \beta_1, \gamma_5, \gamma_1, \iota, \alpha_2, \alpha_1, \beta_6, \beta_5, \beta_2$.

j	l	n
$7/2$	3	4
$5/2$	2	4
$5/2$	2	4
$3/2$	1	4
$3/2$	1	4
$1/2$	0	4
$5/2$	2	3
$3/2$	1	3
$3/2$	1	3
$1/2$	0	3
$3/2$	1	2
$1/2$	0	2
$1/2$	0	1

Eine weitere Möglichkeit zur Bezeichnung der charakteristischen Röntgenlinien ist die IUPAC-Notation, die die Linien mit dem End- und Anfangszustand des Übergangs bezeichnet. Eine Gegenüberstellung der beiden Notationen ist in Tabelle 2.3 zu sehen.

$$\begin{aligned} \text{K}_\alpha \text{-Linie:} \quad \frac{1}{\lambda} &= \frac{\hbar\omega}{hc} = \frac{3}{16\pi} \frac{m_e c}{\hbar} \alpha_f^2 (Z - \sigma(K_\alpha))^2 \\ \text{K}_\beta \text{-Linie:} \quad \frac{1}{\lambda} &= \frac{\hbar\omega}{hc} = \frac{2}{9\pi} \frac{m_e c}{\hbar} \alpha_f^2 (Z - \sigma(K_\beta))^2 \\ \text{L}_\alpha \text{-Linie:} \quad \frac{1}{\lambda} &= \frac{\hbar\omega}{hc} = \frac{5}{144\pi} \frac{m_e c}{\hbar} \alpha_f^2 (Z - \sigma(L_\alpha))^2 \end{aligned} \quad (7)$$

7

Siegbahn	IUPAC	Siegbahn	IUPAC	Siegbahn	IUPAC	Siegbahn	IUPAC
$K\alpha_1$	K-L ₃	$L\alpha_1$	L ₃ -M ₅	$L\gamma_1$	L ₂ -N ₄	$M\alpha_1$	M ₅ -N ₇
$K\alpha_2$	K-L ₂	$L\alpha_2$	L ₃ -M ₄	$L\gamma_2$	L ₁ -N ₂	$M\alpha_2$	M ₅ -N ₆
$K\beta_1$	K-M ₃	$L\beta_1$	L ₂ -M ₄	$L\gamma_3$	L ₁ -N ₃	$M\beta$	M ₄ -N ₆
$K^I\beta_2$	K-N ₃	$L\beta_2$	L ₃ -N ₅	$L\gamma_4$	L ₁ -O ₃	$M\gamma$	M ₃ -N ₅
$K^{II}\beta_2$	K-N ₂	$L\beta_3$	L ₁ -M ₃	$L\gamma'_4$	L ₁ -O ₂	$M\zeta$	M _{4,5} -N _{2,3}
$K\beta_3$	K-M ₂	$L\beta_4$	L ₁ -M ₂	$L\gamma_5$	L ₂ -N ₁		
$K^I\beta_4$	K-N ₅	$L\beta_5$	L ₃ -O _{4,5}	$L\gamma_6$	L ₂ -O ₄		
$K^{II}\beta_4$	K-N ₄	$L\beta_6$	L ₃ -N ₁	$L\gamma_8$	L ₂ -O ₁		
$K\beta_{4x}$	K-N ₄	$L\beta_7$	L ₃ -O ₁	$L\gamma'_8$	L ₂ -N ₆₍₇₎		
$K^I\beta_5$	K-M ₅	$L\beta'_7$	L ₃ -N _{6,7}	$L\eta$	L ₂ -M ₁		
$K^{II}\beta_5$	K-M ₄	$L\beta_9$	L ₁ -M ₅	Ll	L ₃ -M ₁		
		$L\beta_{10}$	L ₁ -M ₄	ls	L ₃ -M ₃		
		$L\beta_{15}$	L ₃ -N ₄	lt	L ₃ -M ₂		
		$L\beta_{17}$	L ₂ -M ₃	lu	L ₃ -N _{6,7}		
				lv	L ₂ -N ₆₍₇₎		

Tabelle 2.3: Siegbahn- und IUPAC-Notation für Emissionslinien [8, S. 10]

gegeben. Dabei sind $\sigma(K_\alpha)$, $\sigma(K_\beta)$ und $\sigma(L_\alpha)$ die mittleren Abschirmzahlen für die Elektronen in den am Übergang beteiligten Schalen.

Wie man auch aus Abb. 2.4 sieht, zeigt das Moseley'sche Gesetz, dass $\lambda^{-1/2}$ bzw. die Wurzel der Frequenz $\sqrt{\nu}$ (da $\nu = \frac{c}{\lambda}$) linear mit der Ordnungszahl ansteigt.

Im Mittel gelten für die K- und die L-Serie folgende Intensitätsverhältnisse [10, S. 1]:

$$\begin{aligned}
K\alpha_1 : K\alpha_2 &= 100 : 50 \\
K\alpha : K\beta &= 100 : 20 \\
L\alpha_1 : L\beta_1 : L\beta_2 : L\gamma_1 : L\beta_3 : L\beta_4 : Ll &= 100 : 75 : 30 : 10 : 5 : 3 : 3
\end{aligned}$$

Augerelektronen:

Wie bereits erwähnt gibt es einen Konkurrenzeffekt zur Röntgenfluoreszenz, die sogenannte Augerelektronenemission. Hierbei wird die Energie, die beim Übergang des Elektrons in eine niedrigere Schale frei wird, nicht als Photon emittiert, sondern an ein Hüllenelektron übergeben, welches dann genügend Energie besitzt, um seine Bindungsenergie zu überwinden und das Atom verlässt.

Die kinetische Energie des frei gewordenen Elektrons beträgt somit $E_{Kin} = E_n - E_{n'} - E_{Bind}$. Diese Energie ist ebenfalls charakteristisch für das Element.

Die Wahrscheinlichkeit ω für charakteristische K_α -Strahlung ist in Gleichung 8 gegeben. Bei $Z=30$ sind Wahrscheinlichkeiten für die Fluoreszenz- und die Augeremission etwa gleich groß. Da sich die beiden Wahrscheinlichkeiten zu eins ergänzen, ergibt sich für die relative K-Fluoreszenzausbeute [5, S. 71]:

$$\omega(Z)_K = \frac{Z^4}{Z^4 + 30^4} \quad \text{mit } \omega + \alpha = 1 \quad \text{und } \alpha_K \approx \omega_K(Z = 30) \propto \frac{1}{2} \quad (8)$$

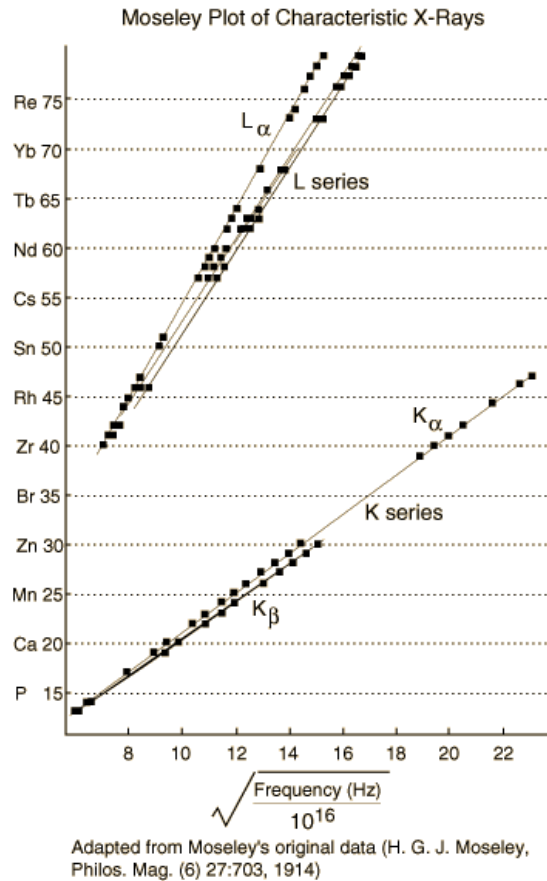


Abbildung 2.4: Moseleys Gesetz [9]

Die Fluoreszenzausbeute für unterschiedliche Emissionslinien als Funktion der Ordnungszahl Z ist in Abb. 2.5 dargestellt.

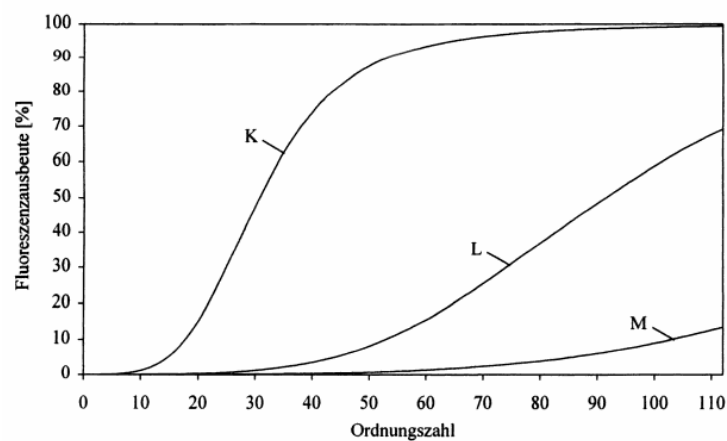


Abbildung 2.5: Fluoreszenzausbeute [11, S. 40]

Die Fluoreszenzausbeuten einiger leichter Elemente sind in Tab. 3.2 gegeben.

2.2 Kontinuierliche Strahlung

Bremsstrahlung entsteht beim Abbremsen eines Elektrons mit der kinetischen Energie E_0 im Coulombfeld eines Atomkerns. Die Energie des vom Elektron ausgesandten Photons ist um so höher, je größer der Ablenkwinkel des Elektrons ist. Die Energie des Photons beträgt $E_{\text{Photon}} = h\nu = E_0 - E$, wobei E die kinetische Energie des Elektrons nach der Abbremsung ist.

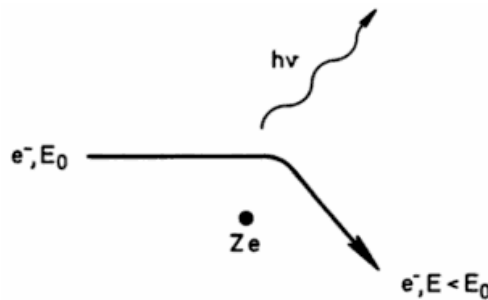


Abbildung 2.6: Entstehung der Bremsstrahlung [12, S. 335]

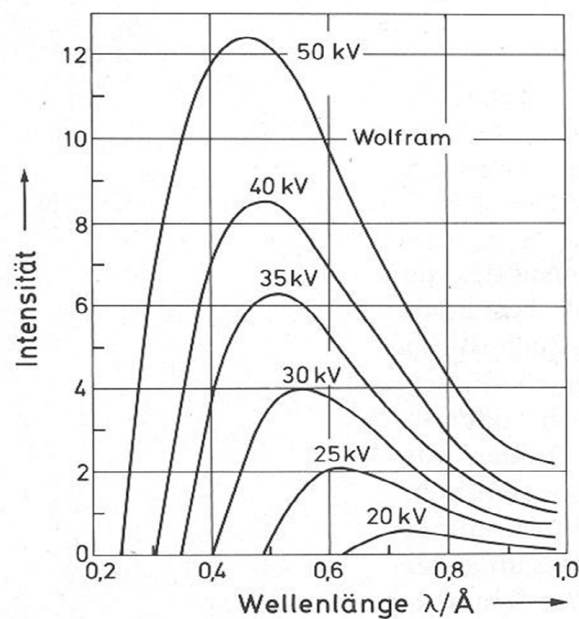


Abbildung 2.7: Bremspektrum einer Wolframanode bei verschiedenen Beschleunigungsspannungen. Die Intensität ist in willkürlichen Einheiten über der Wellenlänge aufgetragen. [12, S. 334]

2.3 Erzeugung von Röntgenstrahlung

Röntgenstrahlung wird meist mit Hilfe einer Röntgenröhre erzeugt. Dabei werden die durch eine Glühkathode erzeugten Elektronen im Hochvakuum mittels zwischen Kathode und Anode angelegter Hochspannung zur Anode hin beschleunigt. Durch Wechselwirkung dieser

Elektronen mit dem Anodenmaterial entsteht charakteristische und kontinuierliche Bremsstrahlung.

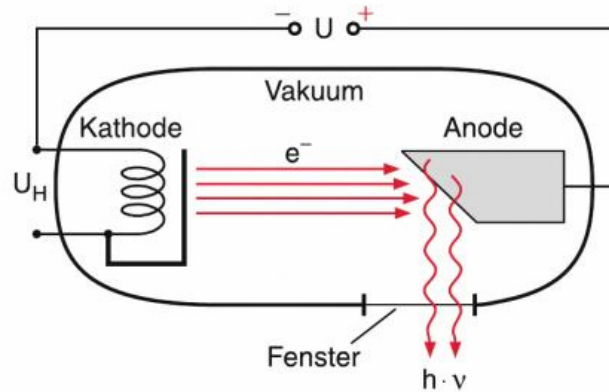


Abbildung 2.8: Schematischer Aufbau einer Röntgenröhre [6, S. 240]

Die Abstrahlung der Bremsstrahlung erfolgt dabei nicht gleichmäßig in alle Richtungen, sondern ist abhängig von der Targetdicke und der Elektronenenergie.

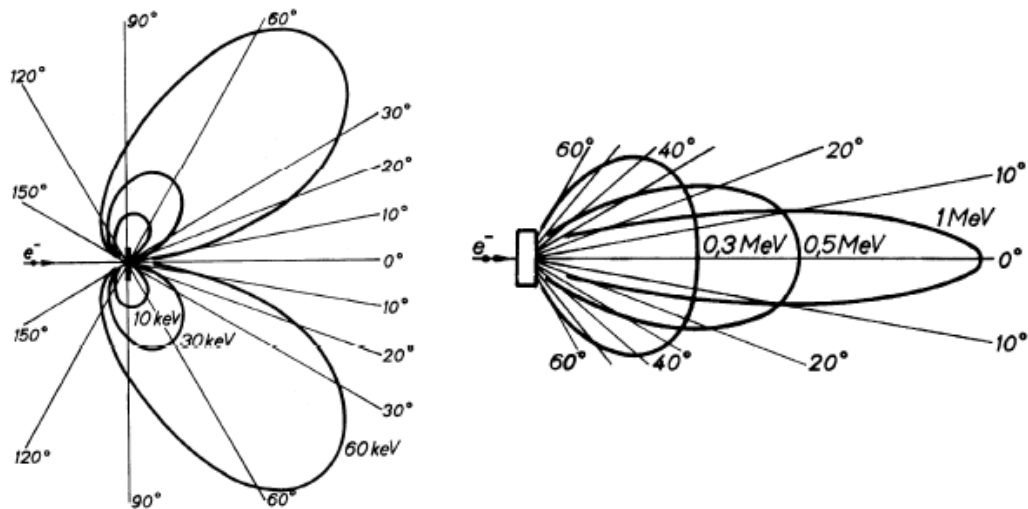


Abbildung 2.9: Energieabhängigkeit der Richtungsverteilung der Bremsstrahlung bei dünnem (links) und dickem (rechts) Wolfram-Target [5, S. 278]

Für die Bremsstrahlungsleistung P_{rad} gilt folgender Zusammenhang [13, S. 63]:

$$P_{rad} \approx 2 \cdot 10^{-6} Z U^2 I \quad (9)$$

Wobei hier U für die Röhrenspannung in kV und I für den Röhrenstrom in mA steht. Mit der elektrischen Leistung $P_{el} = UI$ der Röntgenröhre ergibt sich für die Bremsstrahlungsausbeute η :

$$\eta = \frac{P_{rad}}{P_{el}} \approx 2 \cdot 10^{-6} Z U \quad (10)$$

E_{Kin} (keV)	η -Al (Z=13)	η -Cr (Z=24)	η -Fe (Z=26)
10	0,0002	0,0004	0,0004
30	0,0005	0,0010	0,0015
100	0,0014	0,0028	0,0031

Tabelle 2.4: Wirkungsgrad unterschiedlicher Anodenmaterialien [14]

Wie man aus Tabelle 2.4 sieht, ist der Wirkungsgrad von Röntgenröhren sehr gering. Der überwiegende Teil der Eingangsleistung wird in Wärme umgewandelt. Daher muss die Röntgenröhre wassergekühlt werden.

2.4 Wechselwirkung der Röntgenphotonen mit Materie

Röntgenphotonen können mit den Hüllenelektronen der Materie auf folgende Arten wechselwirken:

- Kohärente Streuung
- Inkohärente Streuung
- Photoeffekt

Weiters können die Röntgenphotonen mit dem Atomkern über Paarbildung und Kernphotoeffekt wechselwirken. Dafür sind jedoch Energien von über 1,022MeV (für die Paarbildung) bzw. Schwellenenergien zwischen 6MeV und 30MeV (für den Kernphotoeffekt) nötig [13, S. 67]. Röntgenphotonen mit so hohen Energien können jedoch nicht mit Röntgenröhren erzeugt werden. Deswegen wird auf diese beiden Effekte in dieser Arbeit auch nicht weiter eingegangen.

2.4.1 Kohärente Streuung

Die kohärente Streuung wird auch als Rayleigh-⁴, Thomson-⁵, elastische oder klassische Streuung bezeichnet. Bei diesem Wechselwirkungsprozess nimmt ein Hüllenelektron kurzfristig den Impuls eines an ihm gestreuten Photons vollständig auf und regt so kurzfristig die gesamte Atomhülle zum Schwingen an. Die schwingenden Elektronen strahlen die vom Photon absorbierte Energie wieder ab. Es wird also keine Energie vom durchstrahlten Medium absorbiert. Aufgrund der Richtungsänderung verliert der Photonenstrahl jedoch Energie in Einstrahlungsrichtung.

Beschreibt man die kohärente Streuung als Streuung der Röntgenstrahlung an einem einzelnen Atom, so kann der differentielle Streuwirkungsquerschnitt durch die folgende Gleichung

⁴ für den Bereich des sichtbaren Lichts

⁵ für den Bereich der niederenergetischen ionisierenden Photonenstrahlung

ausgedrückt werden:

$$\frac{d\sigma}{d\Omega} = r_0^2 \cdot \frac{1 + \cos^2\theta}{2} \quad (11)$$

$\frac{d\sigma}{d\Omega}$	differentieller Streuquerschnitt
r_0	klassischer Elektronenradius
$\frac{1+\cos^2\theta}{2}$	Polarisationsfaktor, gibt den Polarisationsgrad der gestreuten Welle an

Da jedoch die gesamte Atomhülle an der Wechselwirkung teilnimmt, muss Glg. 11 um den sogenannten Atomformfaktor erweitert werden.

$$\frac{d\sigma}{d\Omega} = r_0^2 \cdot \frac{1 + \cos^2\theta}{2} \cdot |F(x,Z)|^2 \quad (12)$$

Der Atomformfaktor $F(x,Z)$ beschreibt das Verhältnis zwischen den Streustrahlungsamplituden eines Atoms (mit Z Elektronen) und der Amplitude des freien Elektrons und kann somit als die Wahrscheinlichkeit, dass die Streuung elastisch erfolgt, verstanden werden.

2.4.2 Inkohärente Streuung

Bei Comptonstreuung (auch als inkohärente oder inelastische Streuung bezeichnet) überträgt das Photon beim Stoß mit einem Hüllenelektron einen Teil seiner Energie $h\nu$ und seines Impulses $\frac{h\nu}{c}$ an das Elektron und ändert seine Richtung. Das Elektron wird dabei aus der Hülle gestoßen.

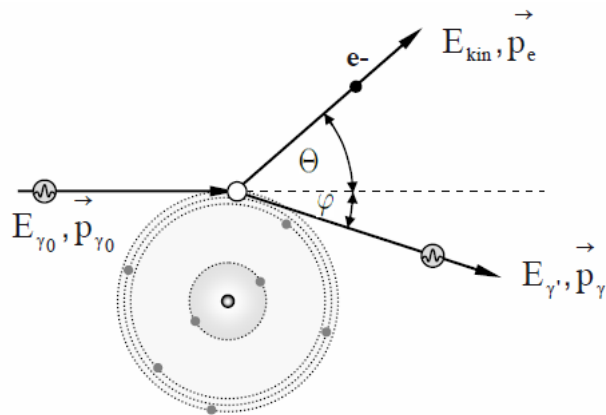


Abbildung 2.10: Comptoneffekt als Stoßprozess [5, S. 174]

Gemäß der Energie- und der Impulserhaltung ergeben sich mit der relativistischen Elektronenmasse $m_e = \frac{m_0}{\sqrt{1 - \frac{v_e^2}{c^2}}}$ die folgenden Gleichungen für Energie und Impuls:

$$\begin{aligned} E_{vor} &= E_{\gamma 0} + m_0 c^2 = E_{\gamma'} + m_e c^2 = E_{nach} \\ p_{vor} &= \frac{E_{\gamma 0}}{c} = \frac{E_{\gamma'}}{c} + m_e \cdot v_e = p_{nach} \end{aligned} \quad (13)$$

Mittels Komponentenzerlegung des Impulses (Glg. 13) und einigen weiteren Umformungsschritten erhält man für die Photonen- und Elektronenenergie nach dem Stoß folgenden Zusammenhang:

$$\begin{aligned} E_{\gamma'} = h\nu' &= \frac{h\nu}{1 + \frac{h\nu}{m_e c^2}(1 - \cos\Theta)} = \frac{h\nu}{1 + \epsilon(1 - \cos\Theta)} \\ E_{kin,e} &= \frac{\frac{h\nu}{m_e c^2}(1 - \cos\Theta)}{1 + \frac{h\nu}{m_e c^2}(1 - \cos\Theta)} = \frac{\epsilon(1 - \cos\Theta)}{1 + \epsilon(1 - \cos\Theta)} \end{aligned} \quad (14)$$

Wie aus Glg. 14 leicht zu sehen ist, wird die maximale kinetische Energie des aus der Hülle geschlagenen Elektrons erreicht, wenn der Streuwinkel Θ 180° beträgt.

$$E_{kin,e}(\Theta = 180^\circ) = \frac{2\epsilon}{1 + 2\epsilon} \quad (15)$$

Diese Energie wird auch als Comptonkante bezeichnet.

Im Detektor führt die Comptonrückstreuung zu einem niederenergetischen Hintergrund im Spektrum, da die Röntgenstrahlung inelastisch aus dem Detektor gestreut wird. Die maximale im Detektor verbleibende Energie ist durch die Comptonkante (Glg. 15) gegeben.

Der inelastische Streuwirkungsquerschnitt für die Wechselwirkung mit einem einzelnen Elektron lässt sich über die Klein-Nishina-Formel berechnen. Um die Atomaren Wirkungsquerschnitte zu betrachten, muss der Klein-Nishina-Wirkungsquerschnitt noch um eine inkohärente Streufunktion $S(x,Z)$ ergänzt werden.

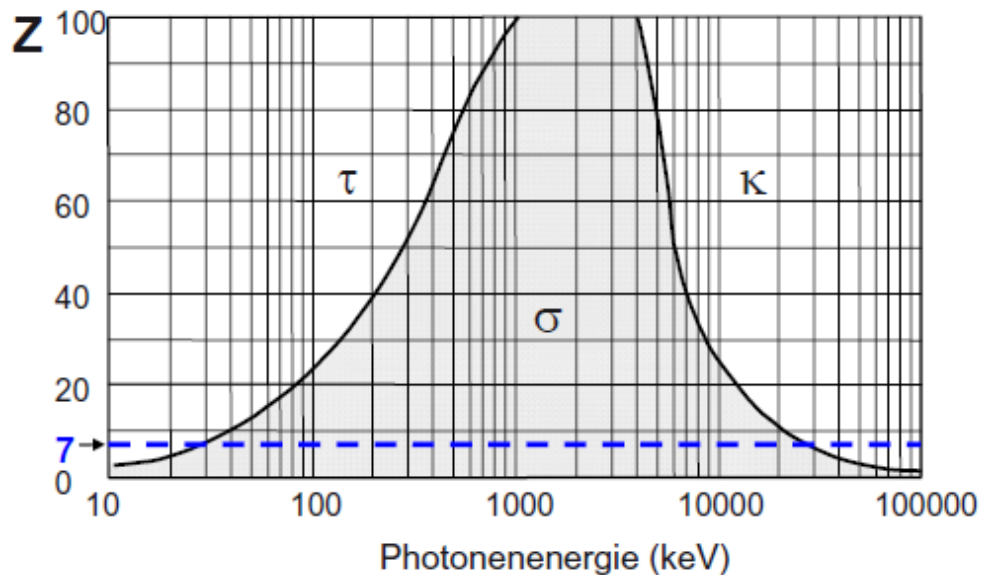


Abbildung 2.11: Wechselwirkungswahrscheinlichkeiten in Abhängigkeit von Energie und Ordnungszahl [5, S. 202]

2.4.3 Photoeffekt

Beim Photoeffekt (Photoionisation) überträgt das einfallende Photon seine gesamte Energie auf ein Hüllenelektron, welches dann genügend Energie besitzt, um die Atomhülle zu verlassen. Die kinetische Energie des nun freien Elektrons ist somit gegeben durch:

$$E_{kin,e} = E_\gamma - E_{Bind}(K, L, M, \dots) > 0 \quad (16)$$

wobei E_{Bind} die Bindungsenergie des Elektrons in der beteiligten Schale ist. Die Photonenwechselwirkungswahrscheinlichkeit wird durch den Photoabsorptionskoeffizienten τ gegeben.

$$\tau \propto \rho \frac{Z^n}{A} \approx \rho \frac{Z^{4-4,5}}{A} \quad (17)$$

Für leichte Elemente hat der Exponent der Ordnungszahl den Wert $n \approx 4,5$ und für schwere Elemente den Wert $n \approx 4$.

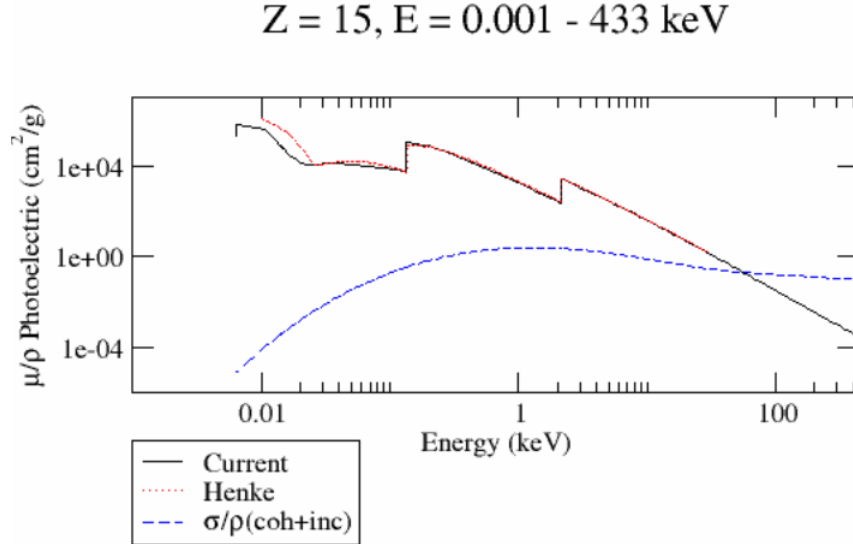


Abbildung 2.12: Energieabhängigkeit des Massen-Photoabsorptionskoeffizient $\frac{\tau}{\rho}$ für Phosphor [26]

Der Photoabsorptionskoeffizient kann auch in der Abhängigkeit von der Photonenenergie $h\nu$ angegeben werden:

$$\begin{aligned} \tau &\propto \rho \frac{Z^n}{A \cdot E_\gamma^3} \approx \rho \frac{Z^{n-1}}{E_\gamma^3} & \text{für } E_\gamma \ll 511 \text{ keV} \\ \tau &\propto \rho \frac{Z^n}{A \cdot E_\gamma} \approx \rho \frac{Z^{n-1}}{E_\gamma} & \text{für } E_\gamma \gg 511 \text{ keV} \end{aligned} \quad (18)$$

Die in Abb. 2.12 zu sehenden Kanten beschreiben das sprunghafte Ansteigen der Photoabsorptionswahrscheinlichkeit beim Erreichen der Energie der einzelnen Elektronenschalen. Wie aus Abb. 2.11 zu erkennen ist, findet der Photoeffekt bevorzugt bei hohen Ordnungs-

zahlen und niedrigen Photoenergien ($<20\text{keV}$) statt.

2.5 Schwächung der Röntgenstrahlung

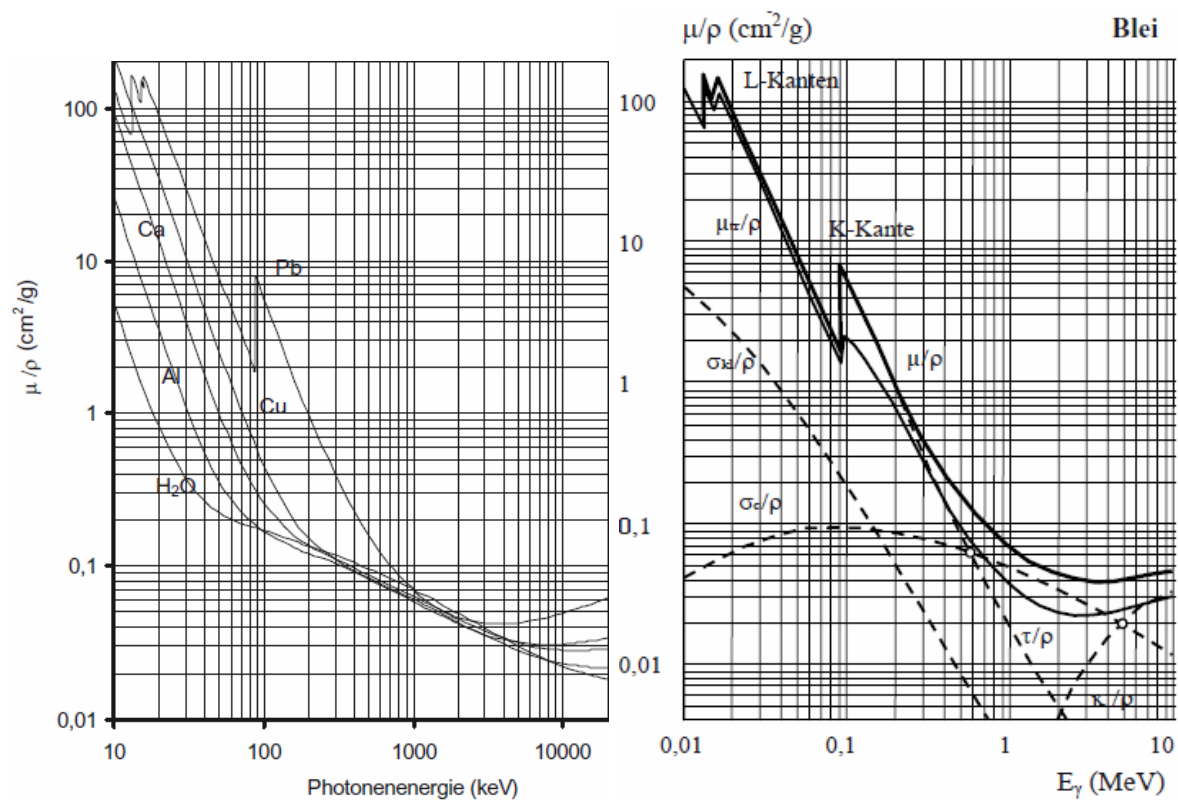
Beim Durchgang von Photonenstrahlung durch Materie wird diese durch die oben beschriebenen Wechselwirkungsprozesse geschwächt. Es kommt zur Aufhärtung der Strahlung und zur Abschwächung ihrer Intensität.

Tritt ein unendlich dünner, paralleler, monoenergetischer Photonenstrahl durch eine Absorberschicht der Dicke dz , so kommt es zur Schwächung dieses Strahls. Für die Intensität I_0 des Strahls gilt:

$$dI = -I_0 \cdot \mu(E, Z, \rho, \dots) \cdot dz \quad (19)$$

Der linearen Schwächungskoeffizient μ ist von der Photonenenergie und den Materialeigenschaften abhängig und wird in m^{-1} angegeben. Er setzt sich aus den einzelnen Schwächungskoeffizienten für Photo-, Comptoneffekt, kohärente Streuung und Paarbildung zusammen.

$$\mu = \tau + \sigma_{\text{gesamt}} + \kappa \quad \text{mit} \quad \sigma_{\text{gesamt}} = \sigma_{\text{el}} + \sigma_{\text{inel}} \quad (20)$$



(a) Massenschwächungskoeffizienten von Blei, Kupfer, Kalzium, Aluminium und Wasser (b) Komponenten des Massenschwächungskoeffizienten von Blei

Abbildung 2.13: Massenschwächungskoeffizienten [5, S. 200f]

Die Integration über die Schichtdicke dz ergibt das lineare Schwächungsgesetz der Photonenstrahlung:

$$I(z) = I_0 \cdot e^{-\mu \cdot z} \quad \text{bzw.} \quad I(z) = I_0 \cdot e^{-(\mu/\rho) \cdot \rho z} \quad (21)$$

Anstelle des linearen Schwächungskoeffizienten wird oft auch der Massenschwächungskoeffizient $\frac{\mu}{\rho}$ in $\frac{\text{cm}^2}{\text{g}}$ angegeben, wobei ρ die Dichte des durchstrahlten Mediums ist.

Die Schwächung der Röntgenstrahlung hängt also von der Dichte ρ , der Dicke z und der Ordnungszahl Z des durchstrahlten Materials, sowie von der Energie der Strahlung ab.

Energieärmere Strahlung wird stärker geschwächt, das heißt die mittlere Energieverteilung verschiebt sich beim Durchgang durch Materie zu höheren Werten. Dieser Prozess wird als Aufhärtung bezeichnet.

3 Röntgenfluoreszenzanalyse

Die Röntgenfluoreszenzanalyse (***X-Ray Fluorescence Analysis, XRF***) ist eine Methode zur quantitativen und qualitativen Bestimmung chemischer Elemente in Proben. Dabei wird die Probe durch einen primären Röntgenstrahl über den Photoeffekt zur Fluoreszenz oder Augeremission angeregt. Die Messung des emittierten Spektrums enthält diese elementspezifischen Fluoreszenzlinien und erlaubt, aufgrund des Zusammenhanges zwischen Energie (bzw. Wellenlänge) und Ordnungszahl (Gleichungen 7), die Bestimmung der Elementzusammensetzung der Probe. Unter der Annahme, dass die Intensität der Fluoreszenzstrahlung direkt proportional zur in der Probe enthaltenen Elementkonzentration ist, lässt sich auch diese bestimmen. Es können sowohl relative als auch Absolutmengen bestimmt werden.

Die XRF gilt im Allgemeinen als zerstörungsfreies Analyseverfahren, wobei es jedoch, wie auch bei der Bestrahlung mit anderen elektromagnetischen Strahlen, zu kurzzeitigen oder dauerhaften Strahlungsschäden kommen kann [16, S. 7].

Die Probenvorbereitung für Röntgenfluoreszenzanalysen ist ein wichtiger Schritt. Eine Homogenisierung der Probe ist für Quantifizierungsmessungen absolut wichtig und notwendig. Die Probenvorbereitung sollte mit ChemikerInnen besprochen werden, um zu verhindern, dass z.B. flüchtige Elemente während der Probenvorbereitung verloren gehen.

Die Messung der Fluoreszenzstrahlung kann über die Wellenlänge (WDXRF) oder über die Energie (EDXRF) geschehen. Die Informationstiefe beträgt abhängig von Element und Matrix nur wenige μm . Flüssigkeitsproben werden auf Probenträger pipettiert und getrocknet (IR, Vakuum, Freezedrying).

3.1 Wellenlängendispersive Röntgenfluoreszenzanalyse

In der WDXRF werden Kristallspektrometer eingesetzt, um die charakteristischen Linien unterschiedlicher Elemente zu separieren. Die von der Probe ausgesendete Röntgenstrahlung wird dabei mit Hilfe eines Kollimators auf einen Analysatorkristall gelenkt, auf welchen sie unter den Winkel θ auftrifft. Ausschließlich die Strahlung der Wellenlänge λ , die die Bragg'schen Gleichung (Glg. 22) erfüllt, wird dabei gebeugt.

$$n\lambda = 2d\sin\theta \quad \text{mit Beugungsordnung } n \text{ und Netzebenenabstand } d \quad (22)$$

Der bei 2θ (Winkel zwischen Probe und Detektor) angebrachte Detektor registriert nun die Intensität der gebeugten Strahlung. Durch Veränderung des Winkels θ (bzw. 2θ) lassen sich verschiedene Wellenlängen und somit unterschiedliche Elemente messen. Eine ausführlichere Beschreibung der WDXRF kann in [18] nachgelesen werden.

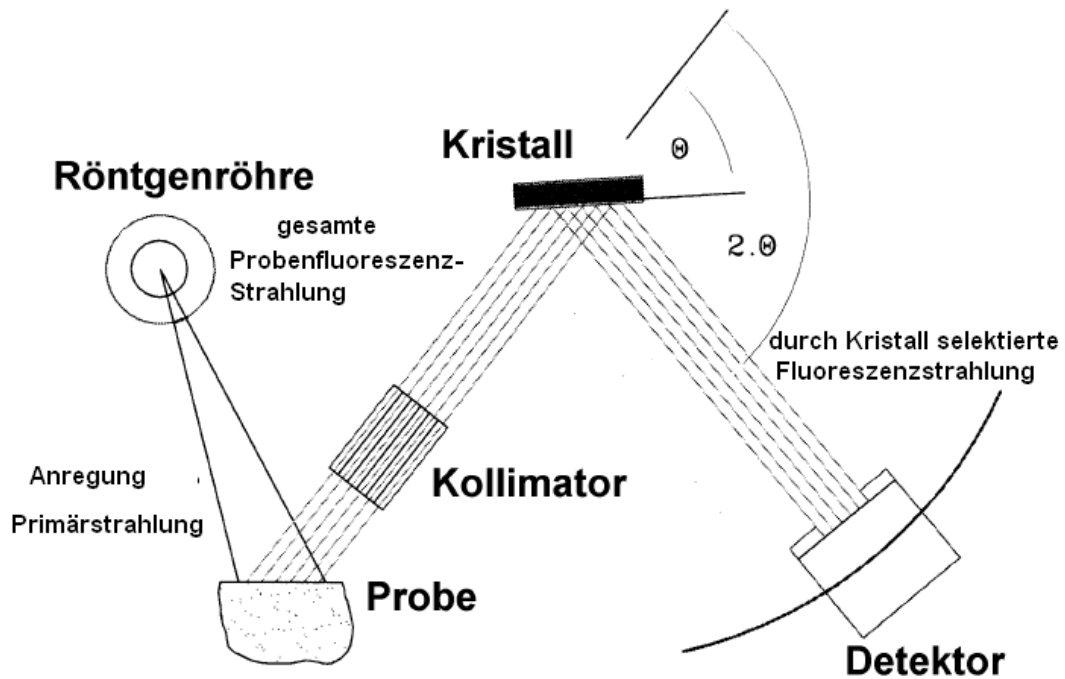


Abbildung 3.1: WDXRF [17, S.23, modifiziert]

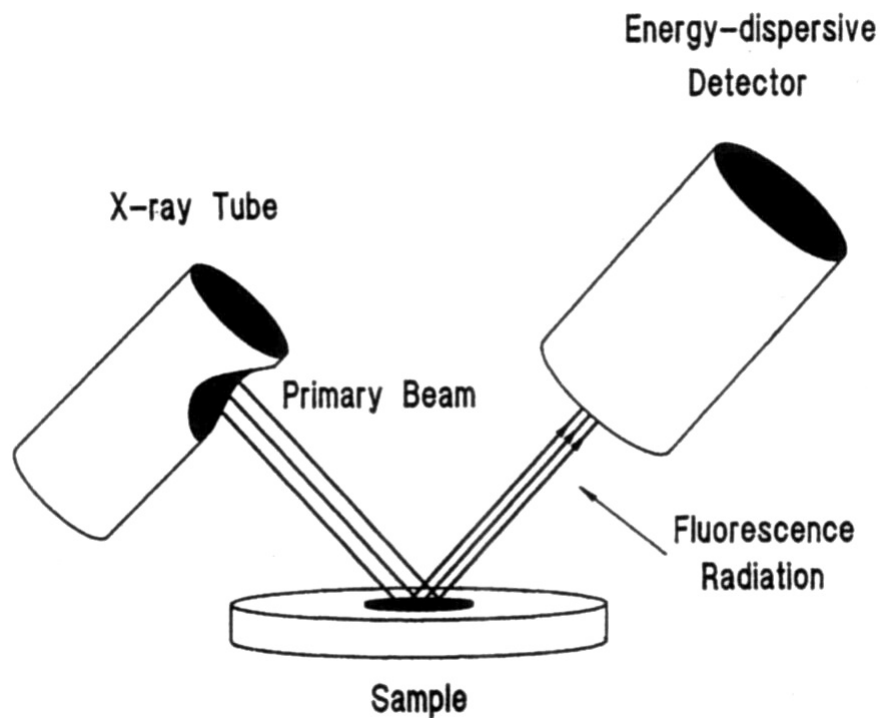


Abbildung 3.2: EDXRF [19, S.3]

3.2 Energiedispersive Röntgenfluoreszenzanalyse

Bei der EDXRF werden die Energien der Fluoreszenzstrahlung mithilfe eines Halbleiterdetektors (s. Kap. 4) gemessen. Da das Signal des Halbleiterdetektors proportional zur Energie des einfallenden Photons ist, können unterschiedliche Energien simultan gemessen werden.

Dadurch wird die Messzeit im Vergleich zur WDXRF deutlich verkürzt. Eine ausführlichere Beschreibung der EDXRF kann in [20] nachgelesen werden.

Ein Überblick über die Vor- und Nachteile der beiden Methoden ist in Tab. 3.1 zu sehen.

WDXRF	EDXRF
+ hohe Zählraten	+ keine oder kaum Probenvorbereitung
+ sehr gute Energieauflösung	+ flexibler Aufbau
+ geringer spektraler Hintergrund	+ Einsatz von Niederleistungsröhren möglich
+ genaue Quantifizierung	+ billiger als WDXRF
	+ simultane Multielementanalyse
	+ größerer Raumwinkel
	+ Peltierkühlung (SDD)
- sequentielle Multielementanalyse	- Linienüberlagerungen
- kleine Raumwinkel	- begrenzte maximale Zählrate
- Hochleistungsröhren nötig	- signifikanter spektraler Hintergrund
- unflexibler Aufbau	- schlechtere Energieauflösung
- Wahl des Analysatorkristalls beeinflusst die Auflösung	- verminderte Detektoreffizienz bei niedrigen Energien
- Überlagerungen durch höhere Ordnungen	- Kühlung mit flüssigen Stickstoff (Si(Li)-Detektor)
- Probenvorbereitung nötig	
- teuer	

Tabelle 3.1: Vergleich von WDXRF und EDXRF [21]

3.3 Intensität der Fluoreszenzstrahlung

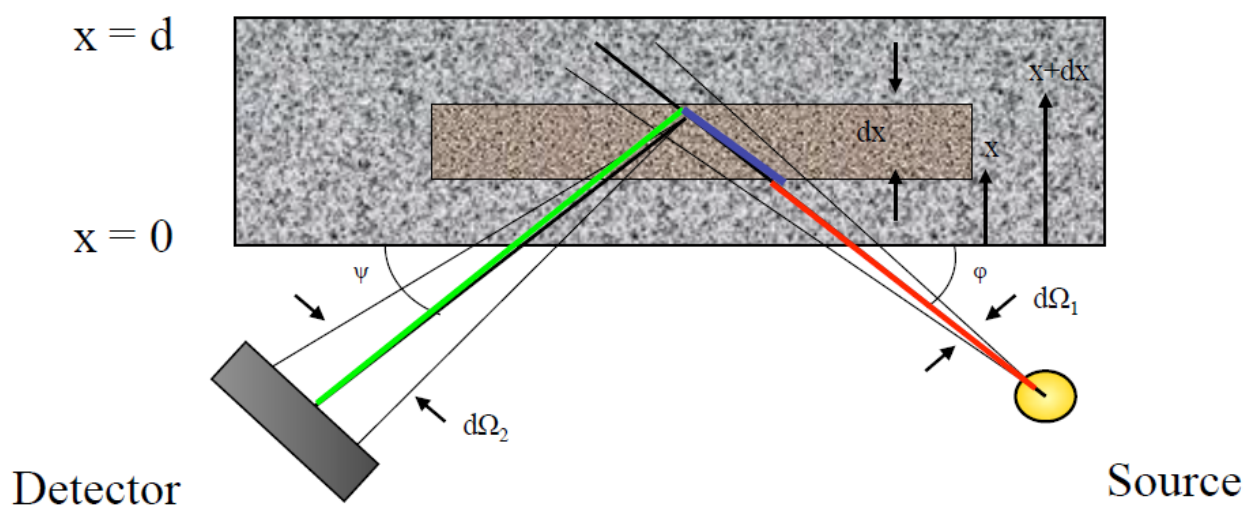


Abbildung 3.3: Geometrieüberlegung zur Fluoreszenzintensität [21]

Zwischen Intensität der Fluoreszenzstrahlung und der Konzentration der Probe besteht eine

eindeutige, jedoch im Allgemeinen nicht lineare Beziehung. Unter Berücksichtigung der Einflüsse der Messgeometrie und Probenmatrix kann dieser Zusammenhang bestimmt werden. Unter der Annahme einer homogenen Probe mit ebener Oberfläche erhält man für die Fluoreszenzintensität folgende Gleichung:

$$I(E_{K\alpha}^i) = \int_{E=E_{abs}^i}^{E_{max}} \int_{x=0}^d I_0(E) \cdot G_1 \frac{\rho}{\sin\varphi} \frac{\tau_K^i(E)}{\rho} \cdot \omega_K^i \cdot p_\alpha^i \cdot c^i \cdot V^i(E) \cdot e^{-\left(\frac{\mu(E)}{\rho \cdot \sin\varphi} + \frac{\mu(E_{K\alpha}^i)}{\rho \cdot \sin\psi}\right) \rho \cdot x} \cdot G_2 \cdot f(E_{K\alpha}^i) \cdot \epsilon(E_{K\alpha}^i) \cdot dx \cdot dE \quad (23)$$

i	Index für die charakteristische Linie des entsprechenden Elements
$E_{K\alpha}$	Energie der K_α -Strahlung
E_{abs}^i	Energie der Absorptionskante
E_{max}	maximale Energie des anregenden Spektrums (z.B. der Röntgenröhre)
d	Probendicke
$I_0(E) \cdot dE$	Spektralverteilung des anregendem Spektrums
G_1	Geometriefaktor, berücksichtigt den Raumwinkel $d\Omega_1$
ρ	Dichte
$\frac{\tau_K}{\rho}$	photoelektrischer Massenabsorptionskoeffizient der K-Schale
ω_K	Fluoreszenzausbeute für die K-Schale
p_α	Emissionswahrscheinlichkeit für K_α
c^i	Konzentration des Elements i
$V(E)$	berücksichtigt die Sekundäranregung
$\frac{\mu}{\rho}$	Massenschwächungskoeffizient der Probe
G_2	berücksichtigt Raumwinkel $d\Omega_2$, Abstand Detektor-Probe und die Detektorgröße
$f(E_{K\alpha})$	berücksichtigt Absorption zwischen Probe und Detektor
$\epsilon(E_{K\alpha})$	Detektoreffizienz für die Energie der K_α -Linie des Elements i
φ, ψ, x	geometrische Parameter (s. Abb. 3.3)

Die Variablen ω_K , p_α und $\frac{\tau_K}{\rho}$ hängen nur von den physikalischen Eigenschaften des betrachteten Elements ab und werden fundamentale Parameter genannt. Das Produkt der fundamentalen Parameter wird als Fluoreszenzwechselwirkungsquerschnitt $\sigma_{K\alpha}(E)$ bezeichnet. Es gilt:

$$\sigma_{K\alpha}^i(E) = \frac{\tau_K^i(E)}{\rho} \cdot \omega_K \cdot p_\alpha \quad (24)$$

Nun wird der x-abhängige Term in Glg. 23 über die Dicke integriert und der Absorptionsfaktor A eingeführt.

$$A(E) = \frac{1 - \exp\left[-\left(\frac{\mu(E)}{\rho \cdot \sin\varphi} + \frac{\mu(E_{K\alpha}^i)}{\rho \cdot \sin\psi}\right) \cdot \rho \cdot d\right]}{\left(\frac{\mu(E)}{\rho \cdot \sin\varphi} + \frac{\mu(E_{K\alpha}^i)}{\rho \cdot \sin\psi}\right) \cdot \rho \cdot d} \quad (25)$$

Unter Vernachlässigung der Sekundäranregung V und durch Einsetzen des Fluoreszenzwir-

kungsquerschnittes und des Absorptionsfaktors lässt sich Glg. 23 verkürzt anschreiben:

$$I(E_{K\alpha}^i) = \int_{E=E_{abs}^i}^{E_{max}} I_0(E) \cdot G_1 \frac{\rho \cdot d}{\sin\varphi} \cdot \sigma_{K\alpha}^i(E) \cdot c^i \cdot A(E) \cdot G_2 \cdot f(E_{K\alpha}^i) \cdot \epsilon(E_{K\alpha}^i) \cdot dE \quad (26)$$

Theoretisch wäre eine quantitative Analyse ohne Standardproben mit Hilfe der fundamentalen Parameter möglich. Probleme bereitet dabei jedoch die mangelnde Kenntnis der genauen Spektralverteilung der anregenden Strahlung.

Da der Massenabsorptionskoeffizient der Probe durch die Zusammensetzung der Probe bestimmt wird, muss über alle Elemente summiert werden. Die Lösung dieser Gleichung ist also nur iterativ möglich.

Für drei Spezialfälle lässt sich diese Gleichung noch weiter vereinfachen.

1. Monoenergetische Anregung

Bei Anregung mit monochromatischer Strahlung der Energie E_0 fällt die Integration über dE weg und Gleichung 27 vereinfacht sich zu:

$$I(E_{K\alpha}^i) = I_0(E_0) \cdot G_1 \frac{\rho \cdot d}{\sin\varphi} \cdot \sigma_{K\alpha}^i(E_0) \cdot c^i \cdot A(E_0) \cdot G_2 \cdot f(E_{K\alpha}^i) \cdot \epsilon(E_{K\alpha}^i) \cdot dE \quad (27)$$

2. unendlich dicke Probe

Für unendlich dicke Proben wird das Integral über x von $x = 0$ bis $x = \infty$ integriert. Dabei vereinfacht sich der Absorptionsfaktor zu:

$$A(E) = \frac{1}{\left(\frac{\mu(E)}{\rho \cdot \sin\varphi} + \frac{\mu(E_{K\alpha}^i)}{\rho \cdot \sin\psi} \right) \cdot \rho} \quad (28)$$

Diese Näherung ist nur zulässig, wenn mit der Dicke nicht auch die Intensität der Fluoreszenzstrahlung zunimmt, d.h. eine Sättigung erreicht ist. Die Sättigung wird je nach Probenmatrix und Energie nach 2–3mm erreicht. Für den Schwächungskoeffizienten der Probe gilt: $\mu = \sum c_i \mu_i$. Da die Konzentrationen c_i bestimmt werden sollen ist eine iterative Lösung nötig.

3. Dünnschichtnäherung

Für unendlich dünne Proben ($x \rightarrow 0$) gilt gemäß der Regel von L'Hospital:

$$\lim_{d \rightarrow 0} \frac{1 - \exp \left[- \left(\frac{\mu(E)}{\rho \cdot \sin\varphi} + \frac{\mu(E_{K\alpha}^i)}{\rho \cdot \sin\psi} \right) \cdot \rho \cdot d \right]}{\left(\frac{\mu(E)}{\rho \cdot \sin\varphi} + \frac{\mu(E_{K\alpha}^i)}{\rho \cdot \sin\psi} \right) \cdot \rho \cdot d} = 1 \quad (29)$$

Dadurch kann neben der Sekundäranregung auch die Absorption vernachlässigt wer-

den. Somit vereinfacht sich Glg. 23 zu

$$I(E_{K\alpha}^i) = \int_{E=E_{abs}^i}^{E_{max}} I_0(E) \cdot G_1 \frac{\rho \cdot d}{\sin\varphi} \cdot \sigma_{K\alpha}^i(E) \cdot c^i \cdot G_2 \cdot f(E_{K\alpha}^i) \cdot \epsilon(E_{K\alpha}^i) \cdot dE \quad (30)$$

Wird nun auch noch monochromatische Anregung angenommen (s. Glg. 31), so erhält man einen direkten proportionalen Zusammenhang zwischen der Fluoreszenzstrahlungsintensität und der Konzentration.

$$I(E_{K\alpha}^i) = I_0(E_0) \cdot G_1 \frac{\rho \cdot d}{\sin\varphi} \cdot \sigma_{K\alpha}^i(E_0) \cdot c^i \cdot G_2 \cdot f(E_{K\alpha}^i) \cdot \epsilon(E_{K\alpha}^i) \quad (31)$$

Die Intensität der Fluoreszenzstrahlung lässt sich auch über die Empfindlichkeit (engl. *sensitivity*) S , die Masse m und die Konzentration c des jeweiligen Elements i ausdrücken.

$$I^i = S^i \cdot c^i \cdot m \quad (32)$$

Die Empfindlichkeiten hängen nur von den fundamentalen Parametern und der Messanordnung an. Unter der Annahme, dass die Messbedingungen konstant sind, können relative Empfindlichkeiten bezogen auf ein Standardelement eingeführt werden.

$$S_{rel}^i = \frac{I^i}{I^s} = \frac{\int_{E=E_{abs}^i}^{E_{max}} I_0(E) \cdot \sigma_{K\alpha}^i(E) \cdot f(E_{K\alpha}^i) \cdot \epsilon(E_{K\alpha}^i) \cdot dE}{\int_{E=E_{abs}^s}^{E_{max}} I_0(E) \sigma_{K\alpha}^s(E) \cdot f(E_{K\alpha}^s) \cdot \epsilon(E_{K\alpha}^s) \cdot dE} \quad (33)$$

Ist die Konzentration des internen Standards bekannt, so kann die Konzentration des Elements i mittels Glg. 34 bestimmt werden.

$$c^i = \frac{I^i}{I^s} \cdot \frac{1}{S_{rel}^i} \cdot c^s \quad (34)$$

3.4 Totalreflexionsröntgenfluoreszenzanalyse

Die TXRF ist eine Variation der energiedispersiven Röntgenfluoreszenzanalyse. Sie nützt das 1923 von Compton entdeckte Phänomen aus, dass sich die Reflektivität von Röntgenstrahlung an glatten Oberflächen bei sehr kleinen Einfallswinkeln ($< 0,1^\circ$) erhöht. Im Gegensatz zu dem bei der herkömmlichen XRF üblichen Winkel von etwa 45° trifft hier der primäre Röntgenstrahl mit geringer Divergenz unter einem Winkel, der kleiner als der Grenzwinkel der Totalreflexion ist, auf die glatte Probenoberfläche [19, S. 2].

Diese Geometrie erlaubt einen geringen Abstand (wenige mm) zwischen Detektor und Probe, wodurch ein größerer Raumwinkel des Detektors erhalten werden kann.

Durch die hohe Reflektivität (von 90–95%) dringt der Röntgenstrahl nur wenige nm in den Probeträger ein. Dies führt zu einer starken Reduktion des Hintergrundes.

Die Probe wird sowohl vom primären als auch vom reflektierten Strahl angeregt. Dadurch wird die Intensität der Fluoreszenzstrahlung $((1 + R)I_0)$ praktisch um einen Faktor 2 erhöht (siehe Kap. 3.4.2).

Im Bereich zwischen dem reflektierten und dem primären Strahl kommt es im ideal Fall des ungestörten Reflektors (d.h. ohne Probe) zur Ausbildung stehender Wellen. Das heißt, die Probe wird mit einer Intensitätsverteilung angeregt. Dieser Effekt kann zur Charakterisierung von dünnen Schichten und nm-Schichten auf reflektierendem Materialien verwendet werden [11, S. 46].

Weitere Vorteile der TXRF sind die geringe benötigte Probenmenge (ng-Bereich) und die kleinen Nachweisgrenzen, die für die meisten Elemente bei Röhrenanregung im pg-Bereich liegen. Bei Anregung mittels Synchrotronstrahlung können Nachweisgrenzen im fg-Bereich erreicht werden.

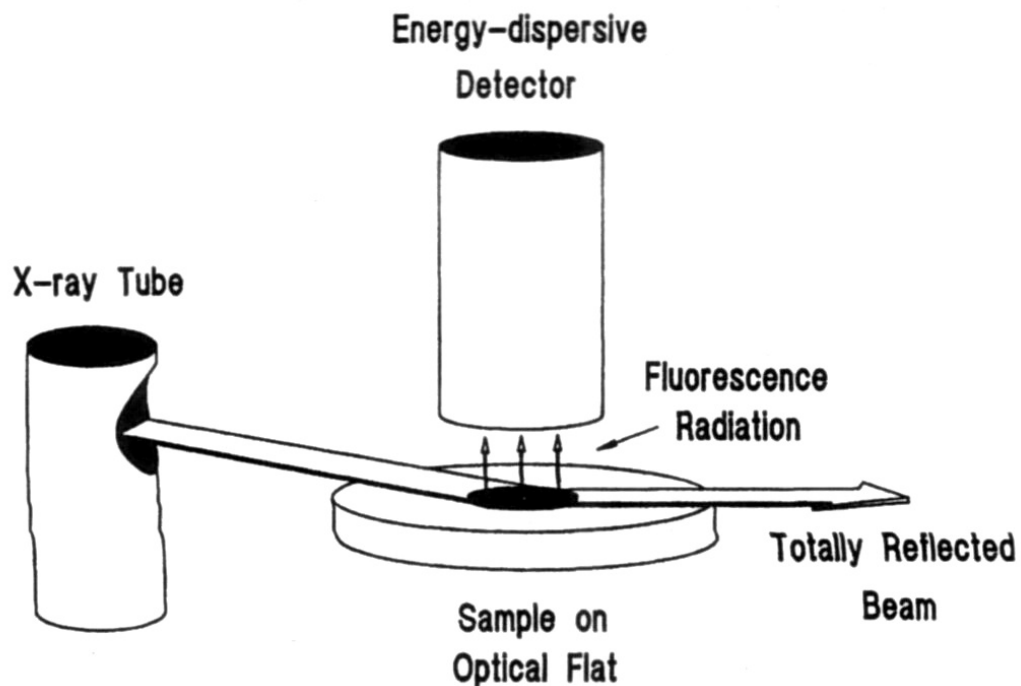


Abbildung 3.4: TXRF [19, S. 3]

Da für die TXRF Proben sehr dünn auf Probeträger aufgebracht werden können, gilt die Dünnschichtnäherung. Dadurch ist die Quantifizierung mittels internem Standard (s. Glg. 34) sehr einfach.

3.4.1 Prinzip der Totalreflexion

Die Phasengeschwindigkeit $v_{Ph} = \frac{c}{n}$ elektromagnetischer Strahlung ändert sich beim Übergang zweier Medien mit unterschiedlichen Brechungszahlen n_1 und n_2 . Trifft die Strahlung unter einem Winkel α auf (der nicht senkrecht auf die Grenzschicht steht), so ändert sich auch die Richtung der Strahlung. Als Beziehung zwischen Einfallswinkel α und Brechungswinkel β gilt das Snellius'sche Brechungsgesetz (Glg. 35).

$$\frac{\sin\alpha}{\sin\beta} = \frac{n_2}{n_1} \quad (35)$$

Geht der Röntgenstrahl aus einem optisch dichteren Medium 1 ins optisch dünnere Medium 2 (d.h. $n_1 > n_2$) über, so gilt:

$$\sin\alpha = \frac{n_2}{n_1} \cdot \sin\beta \quad (36)$$

Da $\sin\beta < 1$ gilt, muss $\sin\alpha \leq \frac{n_2}{n_1}$ erfüllt sein, damit die Welle ins Medium 2 übergehen kann.

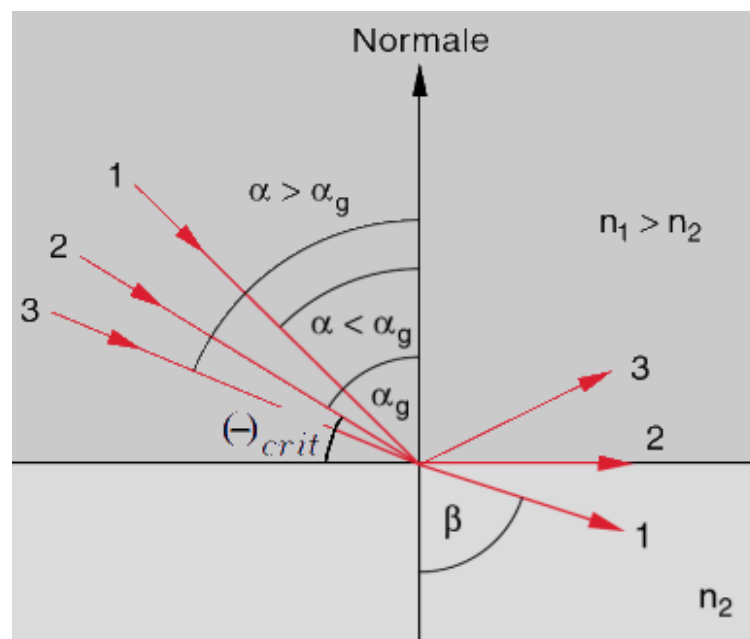


Abbildung 3.5: Totalreflexion von Wellen [22, S. 237, modifiziert]

Für Winkel α mit $\sin\alpha > \frac{n_2}{n_1}$ wird also die gesamte Strahlung reflektiert. Man nennt den Winkel $\sin\alpha_g = \frac{n_2}{n_1}$ den Grenzwinkel der Totalreflexion und den Winkel Θ_{crit} , für den

$$\Theta_{crit} = \frac{\pi}{2} - \alpha_g = \arccos \frac{n_2}{n_1} \quad (37)$$

ist, den kritischen Winkel.

Da selbst bei Totalreflexion ein kleiner Teil der Röntgenstrahlung noch absorbiert wird, muss

ein komplexer Brechungsindex eingeführt werden, der dies berücksichtigt.

$$n = n_{vac} - \delta - i\beta = 1 - \delta - i\beta \quad (38)$$

Die Dispersion δ liefert einen Ausdruck für die Phasengeschwindigkeit, mit der sich eine Welle in einem Medium ausbreitet, und liegt für Röntgenstrahlung in der Größenordnung von 10^{-6} [23, S. 170f].

$$\delta = \frac{N_A}{2\pi} \cdot r_e \rho \frac{1}{A} [f_0 + f_\lambda] \lambda^2 \quad (39)$$

N_A	Avogadrokonstante, $6,022 \cdot 10^{23} \frac{\text{Atome}}{\text{Mol}}$
r_e	Elektronenradius $r_e = 2,818 \cdot 10^{-13} \text{ cm}$
ρ	Dichte in $\frac{\text{g}}{\text{cm}^3}$
A	Atommasse in $\frac{\text{g}}{\text{Mol}}$
λ	Wellenlänge des primären Strahls
f_0	entspricht für Röntgenstrahlung der Ordnungszahl Z
f_λ	negativer Korrekturterm, nur an und unterhalb der Absorptionskante wesentlich

Für primäre Röntgenstrahlen mit Wellenlängen, die kürzer sind als die der Absorptionskante, vereinfacht sich die Glg. 39 zu

$$\delta = \frac{N_A}{2\pi} \cdot r_e \rho \frac{Z}{A} \cdot \lambda^2 \quad (40)$$

Wie aus Glg. 40 zu sehen ist, hängt die Dispersion hauptsächlich von der Dichte des reflektierenden Mediums ab.

Der Imaginärteil β gibt die Absorption im Medium an und wird durch den Massenschwächungskoeffizienten $\frac{\mu}{\rho}$ bestimmt. Für Röntgenstrahlung liegt er in der Größenordnung von 10^{-8} [19, S. 29].

$$\beta = \frac{\lambda}{4\pi} \cdot \frac{\mu}{\rho} \cdot \rho \quad (41)$$

Trifft ein das Vakuum ($n_{vac} = 1$) bzw. die Luft ($n_{Air} \approx 1$) durchquerender Röntgenstrahl auf die Probe, so gilt nach Glg. 37

$$\cos \Theta_{crit} = n_2 \quad (42)$$

Setzt man für den Kosinus die Kleinwinkelnäherung ein und vernachlässigt man den Imaginärteil des Brechungsindex, so erhält man nach der Reihenentwicklung

$$1 - \frac{\Theta_{crit}^2}{2} + \dots \approx 1 - \delta \quad (43)$$

Für den kritischen Winkel gilt also näherungsweise

$$\Theta_{crit} \approx \sqrt{2\delta} \quad (44)$$

Durch Einsetzen der Dispersion δ (Glg. 40) und $\lambda(\text{nm}) = \frac{1,239}{E(\text{keV})}$ erhält man für den kritischen Winkel:

$$\Theta_{crit}(^{\circ}) \approx \frac{1,65}{E} \sqrt{\frac{Z}{A}} \rho \quad \text{bzw.} \quad \Theta_{crit}(\text{mrad}) \approx \frac{28,8}{E} \sqrt{\frac{Z}{A}} \rho \quad (45)$$

Unter Annahme, dass $\frac{Z}{A} \approx \frac{1}{2}$ gilt, lässt sich diese Formel noch weiter vereinfachen.

$$\Theta_{crit}(\text{mrad}) \approx \frac{20,4}{E} \sqrt{\rho} \quad (46)$$

Wobei die Energie in keV und die Dichte in $\frac{\text{g}}{\text{cm}^3}$ einzusetzen ist.

Für die in dieser Arbeit verwendeten Quarzglasreflektoren (Dichte: $2,201 \frac{\text{g}}{\text{cm}^3}$) ergibt sich bei einer Anregung mit der Cr- K_{α} -Linie (5,4keV) ein kritischer Winkel von etwa 5,6mrad.

Aus den Fresnelgleichungen (die die Amplitudenverhältnisse für reflektierte und gebrochene Welle angeben) lassen sich zwei weitere wichtige Parameter der Totalreflexion ableiten, die Reflektivität R und die Eindringtiefe z_p .

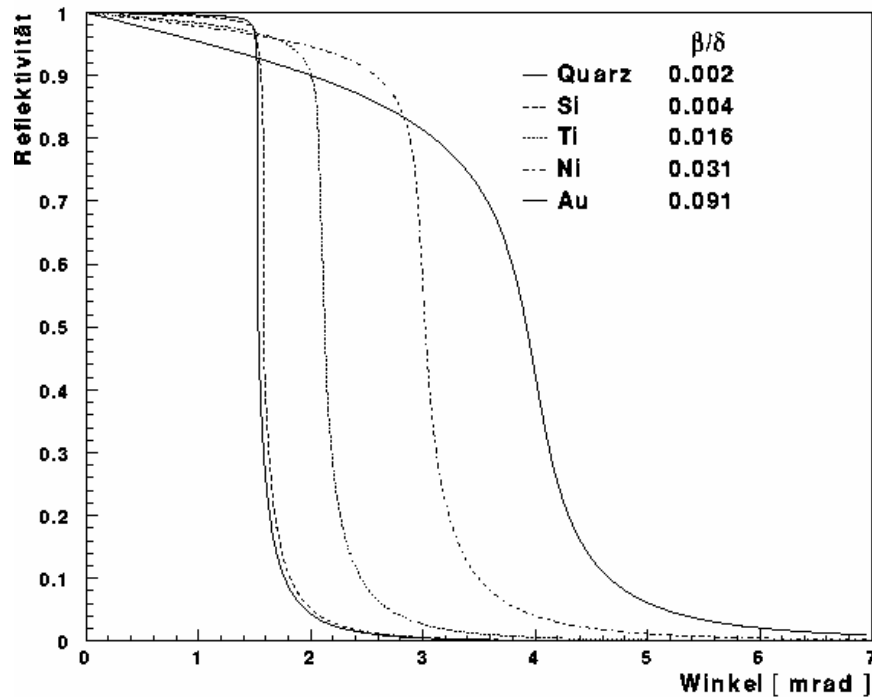


Abbildung 3.6: Die Reflektivität ist für verschiedene Materialien gegen den Einfallswinkel bei einer Energie von 20keV aufgetragen. Der Kurvenverlauf hängt vom Verhältnis $\frac{\beta}{\delta}$ ab. Die Kurve wird umso flacher, je größer die Absorption im Reflektormaterial ist. [24]

Für die Reflektivität gelten die folgenden Näherungen [19, S. 33]:

$$\begin{aligned}
\Theta &<< \Theta_{crit} : R \approx 1 - \sqrt{\frac{\delta}{2}} \frac{\delta}{\beta} \Theta \\
\Theta &= \Theta_{crit} : R \approx \frac{\delta + \beta - \sqrt{2\delta\beta}}{\delta + \beta + \sqrt{2\delta\beta}} \\
\Theta &>> \Theta_{crit} : R \approx \frac{\delta^2}{4\Theta^4}
\end{aligned} \tag{47}$$

Als Eindringtiefe wird die Distanz normal zur Probenoberfläche bezeichnet, bei der die Intensität des gebrochenen Strahls auf $\frac{1}{e}$ ihres ursprünglichen Wertes abgesunken ist.

Auch für die Eindringtiefe gibt es praktische Näherungen [19, S. 35].

$$\begin{aligned}
\Theta &<< \Theta_{crit} : z_p \approx \frac{\lambda}{4\pi} \frac{1}{\sqrt{2\delta}} \\
\Theta &= \Theta_{crit} : z_p \approx \frac{\lambda}{4\pi} \frac{1}{\sqrt{\beta}} \\
\Theta &>> \Theta_{crit} : z_p \approx \frac{\lambda}{4\pi} \frac{\Theta}{\beta}
\end{aligned} \tag{48}$$

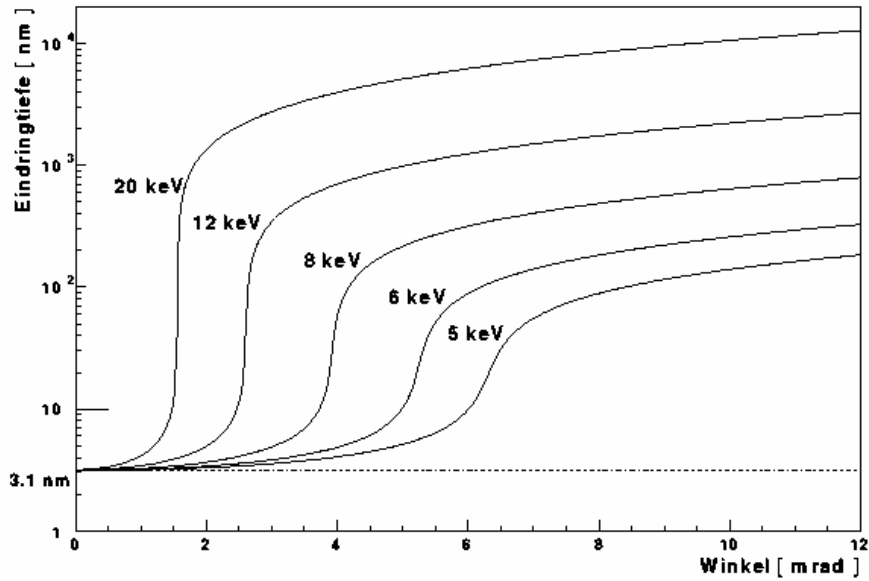


Abbildung 3.7: Die Eindringtiefen in eine Siliziumschicht sind gegen den Einfallswinkel für unterschiedliche Energien aufgetragen. Für kleine Winkel gehen alle Kurven nahezu energieunabhängig gegen einen Grenzwert von 3,1nm. [24]

Wie man in Abb. 3.8 erkennen kann, dringt der Strahl unterhalb des kritischen Winkels nur wenige nm in die Probe ein. Oberhalb des kritischen Winkels steigt die Eindringtiefe sprunghaft um mehrere Größenordnungen an.

3.4.2 Stehende Wellen und die Winkelabhängigkeit der Fluoreszenzintensität

Wie in Abb. 3.8 zu sehen ist, kommt es bei der Reflexion der Röntgenstrahlung an einer glatten Oberfläche zur Interferenz zwischen einfallendem und reflektierten Strahl. Es bildet sich also eine stehende Welle oberhalb der reflektierenden Fläche.

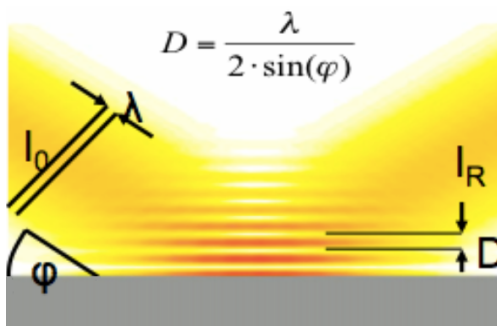


Abbildung 3.8: Stehendes Wellenfeld zwischen einfallender und reflektierter Röntgenstrahlung [21]

Der Abstand D zwischen zwei Maxima ist durch

$$D(\varphi) = \frac{\lambda}{2 \sin \varphi} \quad (49)$$

gegeben.

Je größer der Einfallswinkel φ (bei gleich bleibender Energie) wird, umso kleiner wird der Abstand $D(\varphi)$.

Aus Abb. 3.9 ist zu erkennen, dass die Intensität beim kritischen Winkel ($0,1^\circ$ bei Mo- K_α -Anregung) an der Grenzschicht etwa den 3,6-fachen Wert der einfallenden Intensität annehmen kann. Unterhalb des kritischen Winkels bewegt sich das Maximum von der Grenzfläche weg und die Distanz zwischen den Maxima wird größer. Oberhalb des kritischen Winkels werden die Minima und Maxima nahe der Grenzfläche unterdrückt und die Intensität nähert sich an 1 an.

Für die Periode der stehenden Welle gilt beim kritischen Winkel der folgende Zusammenhang:

$$\Theta = \Theta_{crit} : D_{crit} \approx \frac{\lambda}{2} \frac{1}{\sqrt{2\delta}} \quad (50)$$

Aus dem Vergleich mit den Gleichungen 48 ist zu sehen, dass sich die Größe nur um einen Faktor $\frac{1}{2\pi}$ von der minimalen Eindringtiefe (oberste Gleichung) unterscheidet.

Auch ist aus Abb. 3.9 zu sehen, dass aufgrund der Anschlussbedingungen die Intensität knapp oberhalb und knapp unter der Grenzschicht gleich ist. Dies führt dazu, dass Infor-

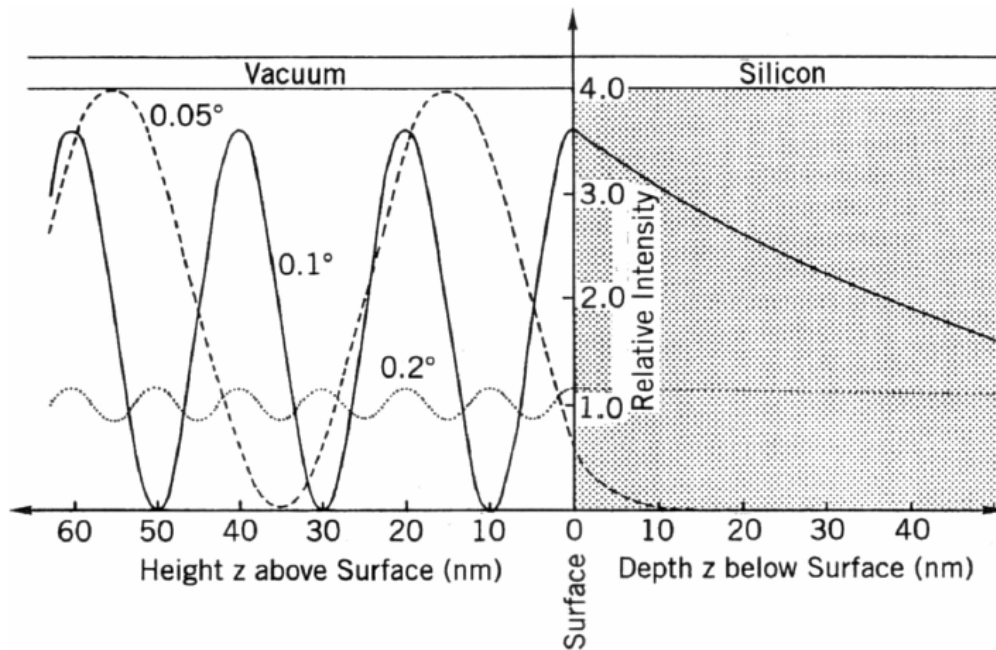


Abbildung 3.9: Intensität bei verschiedenen Einfallswinkeln in und oberhalb einer Si-Schicht unendlicher Dicke bei Mo- K_α -Anregung (17,4keV) [19, S. 55]

mationen von etwa 1nm unterhalb der Grenzsicht und 1nm oberhalb nicht voneinander unterscheidbar sind.

Um festzustellen, wo sich die zur Fluoreszenz angeregten Atome befinden, kann ein sogenannter Winkelscan (s. Abb. 3.10) durchgeführt werden. Dabei wird die Intensität des Fluoreszenzsignals in Abhängigkeit vom Einfallswinkel gemessen.

Es kann zwischen den drei folgenden Positionen unterschieden werden:

- Probenträger bzw. unendlich dicke Probe (in der Abb. als „bulk“ bezeichnet)
- Oberflächenschichten (Probenfilm oder Implantate; hier als „surface layer“ bezeichnet)
- Rückstände auf der Oberfläche (engl. „residue on surface“)

3.4.3 TXRF-Spektrum

Neben den charakteristischen Fluoreszenzlinien der einzelnen Elemente sind im TXRF-Spektrum noch folgende, durch weitere Effekte entstandene Peaks zu berücksichtigen:

- Der elastische (für Cr- K_α bei 5,41keV) und inelastische Streupeak (knapp unterhalb des elastischen Streupeaks) des an Probe und Reflektor gestreuten Primärstrahls, die aufgrund des geringen Energieunterschieds bei der Anregung mit Cr- K_α nicht optisch nicht unterscheidbar sind.
- Detektorartefakte (s. Kap. 4.4)

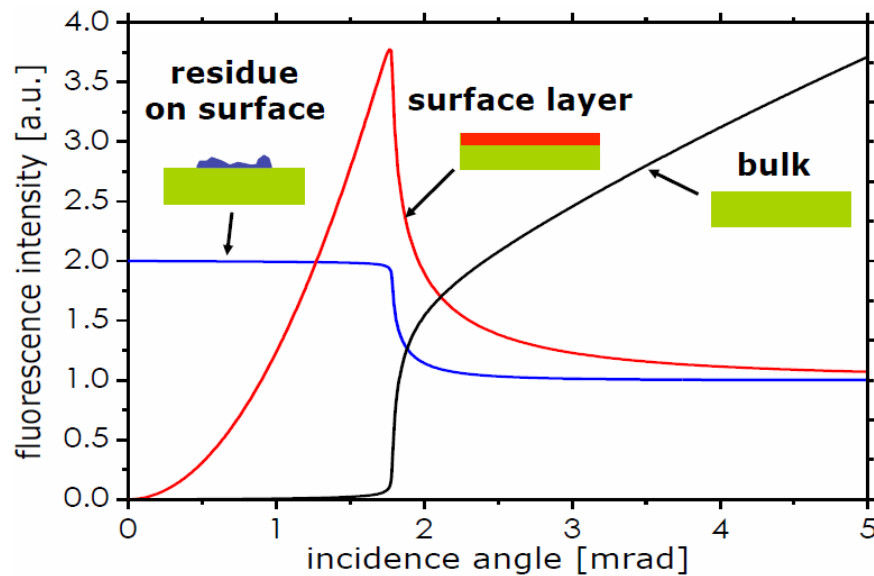


Abbildung 3.10: Winkelabhängigkeiten des Fluoreszenzsignals [21]

- Streuung am Probenträger:

Da der gebrochene Strahl die Quarzglasreflektoren (SiO_2) zur Fluoreszenzstrahlung anregt, sind im Spektrum immer ein Si-Peak und bei Messungen im Vakuum auch ein O-Peak zu sehen.

- Streuung an Luft:

Findet die Messung nicht im Vakuum statt, so ist bei 2,96keV auch ein Ar-Peak zu sehen.

Ein typisches Low Z TXRF-Spektrum ist in Abb. 3.11 dargestellt.

3.4.4 Anwendungsbereiche der TXRF

Mittels TXRF-Analyse können sowohl Feststoffe wie auch Flüssigkeiten untersucht werden. Diese Auflistung soll einen kurzen Überblick über die Anwendungsmöglichkeiten geben.

- **Medizin und Biologie:**

Enzyme, Proteine, Polysaccharide, Biofilme, Gewebe, Körperflüssigkeiten

- **Mineralien:**

Gesteine, Seltene Erden

- **Umwelt:**

Wasser, Luft (Aerosole, Staub, Flugasche), Bodenproben, Lebensmittel, Pflanzen, Kohle

- **Kunst, Archäologie und Forensik:**

Bilder, Pigmentierung, Lacke, Textilfasern, Glas, Banknoten, Schmauchspuren, Fingerabdrücke

- **Industrielle und technische Anwendungen:**

Oberflächenanalyse (Wafer), Öle, Chemikalien (Säuren, Basen, destilliertes Wasser), Transmutationselemente

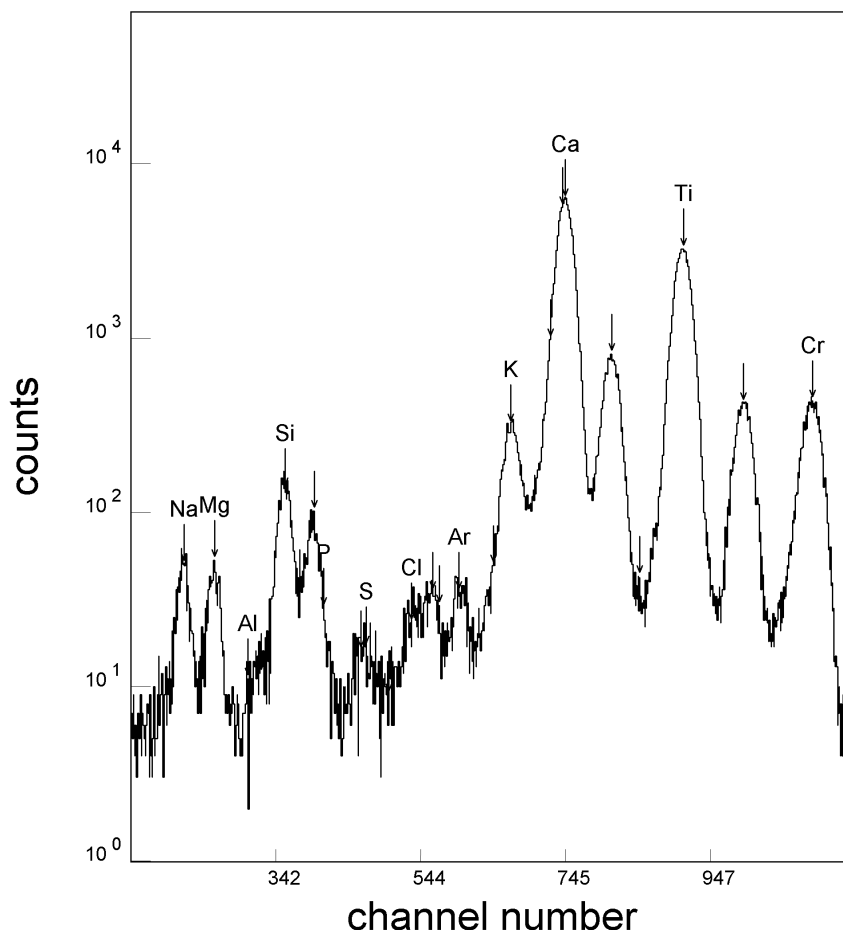


Abbildung 3.11: Spektrum von NIST 1643e mit $10,9 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ Ti als internem Standard (Vergl. Anhang B). Der Ar-Peak zeigt, dass sich noch Restluft in der Vakuumkammer befindet. Es liegt also nur ein schlechtes Vakuum vor.

3.5 TXRF für leichte Elemente

Aufgrund der geringen Energien der Fluoreszenzstrahlung leichter Elemente müssen zur Messung dieser Elemente die Absorptionseffekte verringert werden. Um Absorption in Luft auf dem Weg von Probe zum Detektor zu vermeiden, wird im Vakuum gemessen. Die Selbstabsorption der Probe wird durch das Auftragen der Probe als dünnen Film verhindert. Dadurch kann zur Quantifizierung der Low Z TXRF auch die Dünnschichtnäherung angenommen werden.

Wie bereits gezeigt wurde (s. Glg. 23), ist die Intensität der Fluoreszenzstrahlung zu den

folgenden Parametern proportional:

$$I_{K\alpha}^i \propto I_0 \cdot \tau_K^i \cdot \omega_K^i \cdot p_\alpha^i \cdot c^i \cdot \epsilon \quad (51)$$

Sowohl der photoelektrische Massenabsorptionskoeffizient τ sowie die Fluoreszenzausbeute ω nehmen mit kleiner werdender Ordnungszahl Z stark ab. Die ausgesendeten Fluoreszenzintensitäten leichter Elemente sind deshalb um 3 bis 4 Größenordnungen kleiner als die der mittelschweren Elemente [19, S. 224]. Die kleinen Werte für τ , ω und ϵ erschweren somit Fluoreszenzanalyse leichter Elemente.

Die Fluoreszenzausbeuten für einige leichte Elemente sind in Tab. 3.2 gegeben.

Element	Fluoreszenzausbeute ω
C	0,0028
N	0,0052
O	0,0083
F	0,013
Na	0,023
Mg	0,030
Al	0,039
P	0,063
S	0,078

Tabelle 3.2: Fluoreszenzausbeuten leichter Elemente [25]

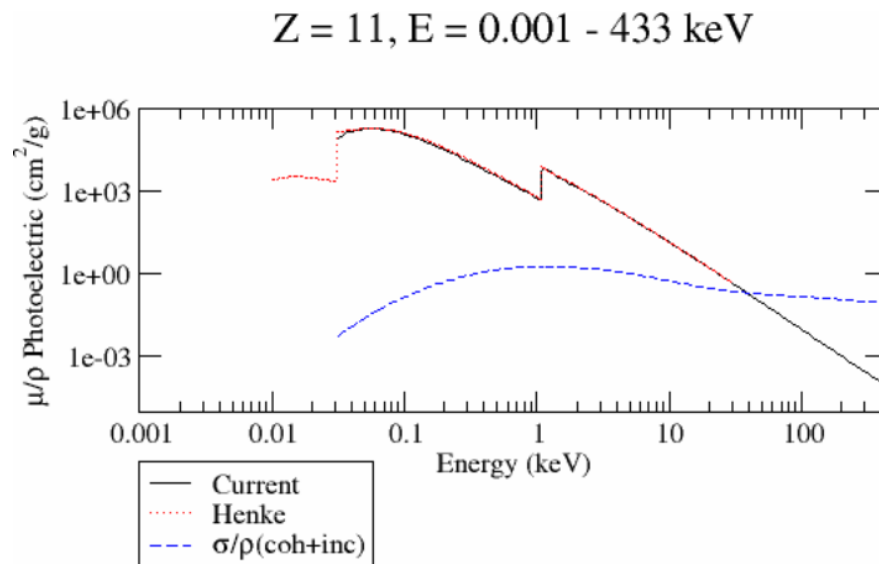


Abbildung 3.12: Photoelektrischer Absorptionskoeffizient für Na [26]

Den maximalen photoelektrischen Massenabsorptionskoeffizienten für ein Element erhält man für Anregungen knapp über der Kante. Wie aus Abb. 3.12 zu sehen ist, würde eine Anregung mit einer Al-Röhre (K_α :1,49keV) anstelle einer Cr-Röhre (K_α :5,41keV) zu einem

$Z = 16, E = 0.001 - 433 \text{ keV}$

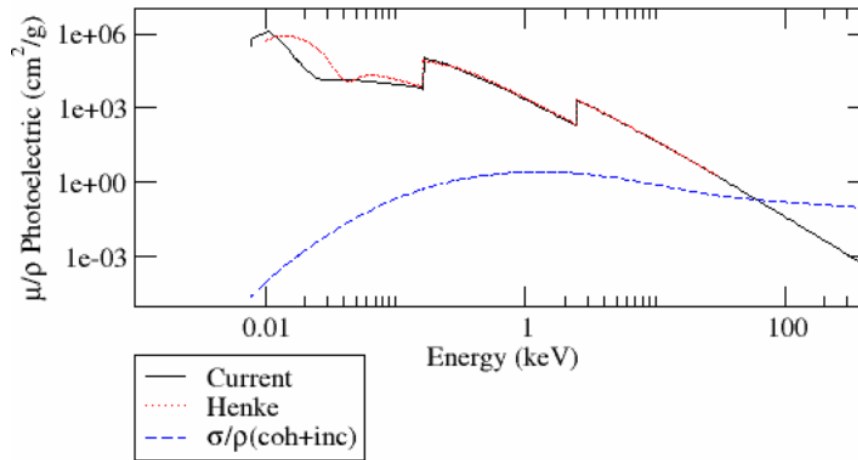


Abbildung 3.13: Photoelektrischer Absorptionskoeffizient für S [26]

höherem Massenabsorptionskoeffizienten und somit zu einer höheren Intensität (vergleiche Glg. 51) der Fluoreszenzstrahlung für Na (K-Kante: 1,07keV)führen. Da wir jedoch P und S in unseren Proben messen wollten, müssten die Messungen mit der Cr-Röhre durchgeführt werden.

Da die Fluoreszenzstrahlung leichter Elemente von herkömmlichem Detektorfenster und Detektortotschicht stark absorbiert werden, müssen zur Messung der Strahlung leichter Elemente Detektoren mit ultradünnen Fenstern (300nm) und dünner Totschicht verwendet werden. Ein ultradünnes Fenster besteht im Allgemeinen aus einem 300nm dickem Polymer. Dieses ist, um dem Luftdruck standzuhalten zu können auf einem Siliziumstützgitter befestigt. Durch den Einsatz des ultradünnen Fensters und der dünnen Totschicht wird also die Detektoreffizienz ϵ für die leichten Elemente verbessert.

4 Halbleiterdetektoren

Halbleiter sind nicht-metallische, kristalline Festkörper. Ihre Leitfähigkeit nimmt mit der Temperatur zu, da die ansteigende Temperatur es immer mehr Elektronen ermöglicht, die Bandlücke zwischen Valenz- und Leitungsband zu überwinden. Im Rahmen dieser Arbeit sind ein Si(Li)-Detektor und ein SD-Detektor verwendet worden, diese sollen im Weiteren beschrieben werden.

Zur Herstellung dieser beiden Detektortypen müssen Verunreinigungen in das hochreine Si eingebracht werden. Dieser Vorgang wird als Dotierung bezeichnet.

- Bei der **n-Dotierung** werden Elemente der fünften Hauptgruppe eingebaut. Dadurch erhält man pro eingebautem Donatoratom ein Elektron im Leitungsband, ohne dafür ein Loch im Valenzband erzeugen zu müssen.
- Elemente aus der dritten Hauptgruppe werden bei der **p-Dotierung** eingebaut. Pro eingebautem Akzeptoratom entsteht ein Loch im Valenzband.

4.1 p-n-Struktur

Werden ein n- und ein p-dotierter Halbleiter des selben Grundgitters in Kontakt gebracht, so beginnen die Elektronen aufgrund der unterschiedlichen Ladungsdichten in den beiden Bereichen von p nach n zu wandern. Die Löcher bewegen sich in die entgegengesetzte Richtung. Die Ladungsträger an der Grenzschicht rekombinieren und es entsteht eine nichtleitende Sperrzone und somit auch eine Potentialdifferenz zwischen dem p- und dem n-Bereich.

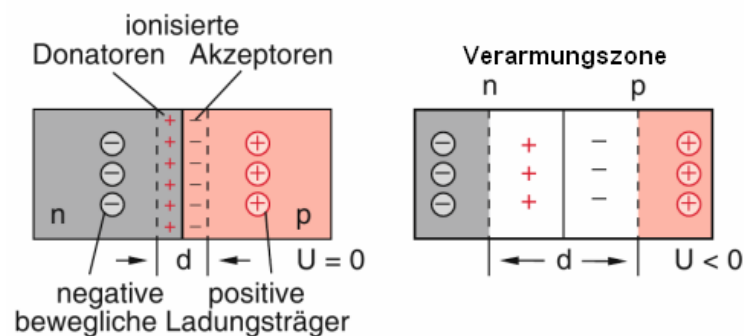


Abbildung 4.1: Ladungsträgerverarmungszone ohne und mit angelegter äußerer Gegenspannung [27, S. 102, modifiziert]

Legt man nun eine äußere Spannung an, so spricht man von einer Halbleiterdiode. Je nach angelegter Spannung erhöht oder erniedrigt sich die Potentialschwelle. Man spricht von einer Diode in Sperr- (positive Spannung liegt an p-Bereich, $U < 0$) bzw. Durchlassrichtung (negative Spannung an p-Zone).

Bei Erwärmung oder bei zu hoher angelegter Spannung in Sperrrichtung kommt es zum

Durchbruch, die Diode ist dann zerstört.

Da die strahlungsempfindliche Sperrschicht bei der Halbleiterdiode sehr klein ist, wird diese im Allgemeinen nicht zur Detektion verwendet.

4.2 PIN-Struktur

Bei der PIN-Diode wird zwischen dem p- und dem n-dotierten Bereich eine undotierte, eigenleitende Schicht („intrinsic region“) erzeugt. Diese Schicht ist der strahlungsempfindliche Teil der Diode. Um die PIN-Struktur herzustellen, werden in einen p-dotierten Siliziumkristall geeignete Fremdatome (meist Li) eindiffundiert. Durch Anlegung der Hochspannung bildet sich dann eine über einen großen Bereich intrinsische Schicht. An der Rückseite dieser Schicht ist die Li-Konzentration erhöht, so dass sich ein n-leitender Bereich bildet. Die p-leitende Schicht ist der verbleibende nicht kompensierte p-dotierte Bereich.

4.2.1 Si(Li)-Detektor

Beim Lithium-gedrifteten Siliziumdetektor wird die n-Seite der PIN-Diode mit etwa 20nm Gold beschichtet. Die auf der p-Seite aufgebraachte Metallschicht (meist auch Gold) bildet mit dem p-dotierten Bereich den sogenannten Schottky-Kontakt. Zwischen den Kontakten liegt Hochspannung in Sperrrichtung an.

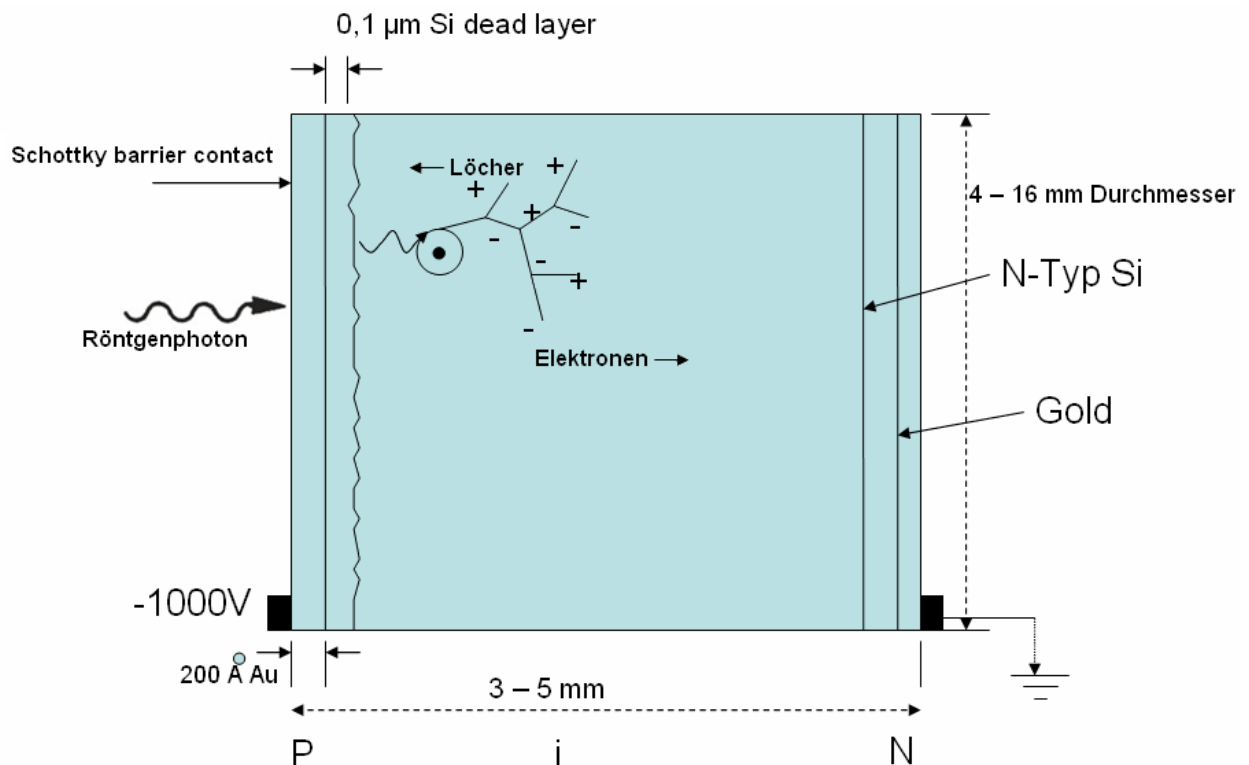


Abbildung 4.2: Schema eines Si(Li)-Detektors [21, modifiziert]

Gelangt ein Röntgenquant in den strahlungssensitiven Teil des Detektors, so werden n

Elektronen-Loch-Paare erzeugt. Die Anzahl dieser Paare ist proportional zur Energie des Photons, wobei zur Erzeugung eines e^- -Loch-Paares eine Energie ϵ von 3,6eV notwendig ist.

$$n = \frac{E_{Ph}}{\epsilon} \quad (52)$$

Durch die angelegte Hochspannung driften die Ladungen durch den Detektor zu den Elektroden und gelangen von dort zum Vorverstärker.

Wird die Strahlung bereits in der durch den unkompensierten p-Bereich gebildete „Tot-schicht“ absorbiert, so wird aufgrund des Überschusses an Löchern in diesem Bereich ein Teil der hier durch Absorption der Röntgenstrahlung erzeugten Ladung im Kristall gefangen. Dadurch ist das ausgelesene Puls kleiner als die tatsächlich erzeugten Ladungen. Da die Fluoreszenzlinien zur niederenergetischen Seite verzerrt sind, wird dieses Phänomen als „Low Energy Tailing“ bezeichnet.

Photonen niedriger Energie haben eine höhere Wahrscheinlichkeit, in der Totschicht absorbiert zu werden, deshalb müssen zur Verminderung der Linienverzerrungen der leichten Elemente Detektoren mit besonders dünner Totschicht verwendet werden.

Die PIN-Diode und der Vorverstärker werden mit flüssigen Stickstoff (77K) gekühlt, dadurch werden der Dunkelstrom und das Rauschen des Vorverstärkers vermindert. Durch die Kühlung wird auch die Beweglichkeit der eindiffundierten Li-Atome reduziert.

Infolge der Stickstoffkühlung kann es zu Vereisungen am Detektorkristall kommen. Gerade für die Analyse leichter Elemente ist dies fatal, da die Fluoreszenzstrahlung dieser Elemente dann kaum mehr in den strahlungssensitiven Bereich vordringen kann. Vereisungen können durch „Conditioning“ (Aufheizen) des Detektors entfernt werden.

4.3 PSN-Struktur

Bei der PSN-Diode wird zwischen p- und n-dotierter Schicht ein schwach n-dotierter Bereich (s-Schicht) erzeugt. Die Dotierung ist so gewählt, dass n-Leitung gerade noch auftritt. Wird eine äußere Spannung in Sperrrichtung angelegt, so verarmt der s-Bereich, d.h. die Elektronen werden verdrängt und die Raumladungszone verbreitert sich.

4.3.1 Siliziumdrift-detektor

Der Aufbau des SD-Detektors beruht auf einer in Sperrrichtung gepolten PSN-Diode. Er wird aus einem zylindrischen Si-Wafer hergestellt, an dessen Oberfläche ringförmige Elektroden angebracht sind (s. Abb. 4.3). Die an den Elektroden angelegte negative Spannung nimmt

von außen nach innen hin ab. Wegen der geringen Dicke ist beim SDD im Gegensatz zum Si(Li)-Detektor nur eine geringe Hochspannung nötig [28, S. 3].

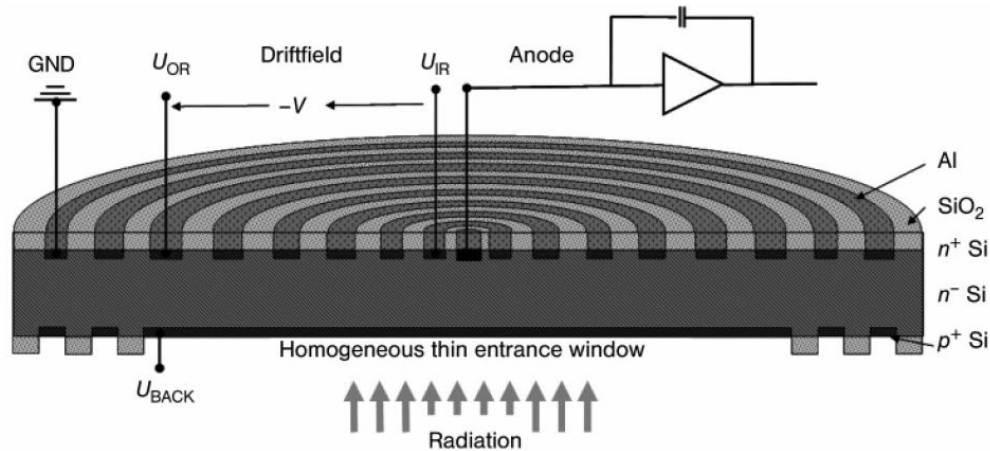


Abbildung 4.3: Schema eines Siliziumdriftdetektors [29, S. 273]

Direkt oberhalb der kleinen sich im Zentrum befindenden Anode ist der Vorverstärker angebracht. An der Kathode ist eine homogene negative Spannung angebracht. Dadurch entsteht ein kegelförmiges elektrisches Feld, welches das Driften der Elektronen, die durch die Absorption der Fluoreszenzstrahlung im Detektorvolumen erzeugt werden, zur Anode verursacht. Die Spitze des Kegels befindet sich an der Anode (s. Abb. 4.4).

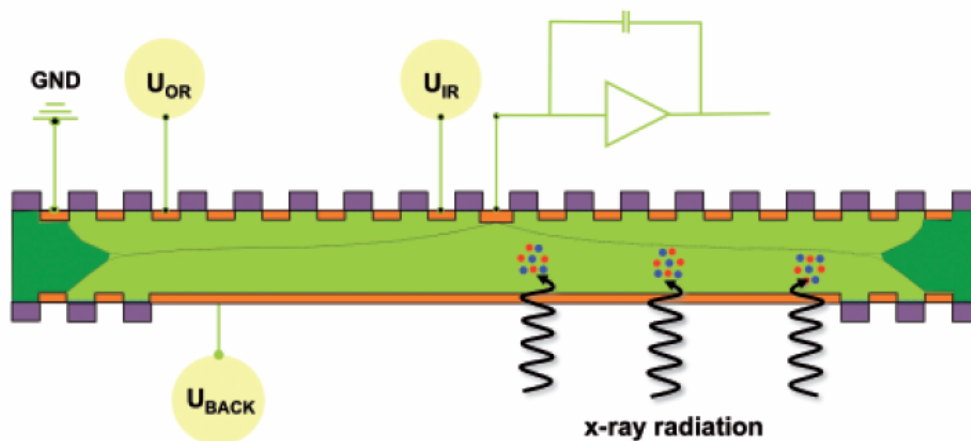


Abbildung 4.4: [30, S. 3]

Die Vorteile des SD-Detektors gegenüber des Si(Li)-Detektors:

- kleineres Design
- leichter
- billigerer Betrieb, da ein Peltierelement anstelle des flüssigen Stickstoffs zur Kühlung verwendet wird

- Durch das Driften sind höhere Zählraten als beim Si(Li)-Detektor möglich.
- Da der Vorverstärker sehr nahe an der Anode angebracht ist, wird die Kapazität zwischen Anode und Vorverstärker reduziert und somit das elektronische Rauschen vermindert und die Energieauflösung stark verbessert.

4.4 Detektorartefakte

Unter Detektorartefakten versteht man Peaks, die nicht der Fluoreszenzstrahlung der Probe zuzuordnen sind, sondern durch physikalische Effekte im Halbleiterdetektor entstehen. Sie müssen bei der Auswertung der Spektren berücksichtigt werden, da es sonst zu Fehlinterpretationen kommen kann.

4.4.1 Summenpeak

Bei sehr hohen Zählraten kann es vorkommen, dass der Detektor zwei unterschiedliche, zeitlich knapp aufeinander folgende Signale als eines registriert. Der resultierende Peak liegt dann bei der Summenenergie der beiden Signale.

4.4.2 Escape-Peak

Ein Röntgenquant mit einer Energie oberhalb der Si-Kante kann Atome im Detektor anregen. Infolge dieser Anregung wird ein Si- K_α -Photon mit einer Energie von 1,74keV ausgesandt. Solange dieses Photon wieder vom strahlungsempfindlichen Bereich des Detektors absorbiert wird, bleibt das gemessene Signal proportional zur Energie des eingefallenen Röntgenquants. Entsteht das Si- K_α -Photon jedoch nahe der Detektoroberfläche, so kann es den Detektor mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit verlassen. Das gemessene Signal ist dann um 1,74keV kleiner als die Energie des ursprünglichen Röntgenquants.

4.4.3 Compton-Kante

Wird ein hochenergetischer Röntgenstrahl an der Detektorvorderseite inkohärent unter 180° gestreut, so entsteht ein Elektron, das in den Detektorkristall eindringt und dort seine Energie abgibt. Dadurch entsteht im niederenergetischen Bereich des Spektrums die sogenannte Comptonkante.

Werden die Röntgenphotonen unter einem anderen Winkel inkohärent gestreut, so entsteht der Comptonhintergrund.

4.5 Wirkungsgrad

Die Detektoreffizienz ist das Verhältnis der erzeugten zu den gezählten Photonen. Der Gesamtwirkungsgrad des Detektors hängt von seiner aktiven Fläche, der Distanz zwischen Probe und Detektor, sowie der photoelektrischen Absorptionseffizienz ab und lässt sich mit

Glg. 53 berechnen.

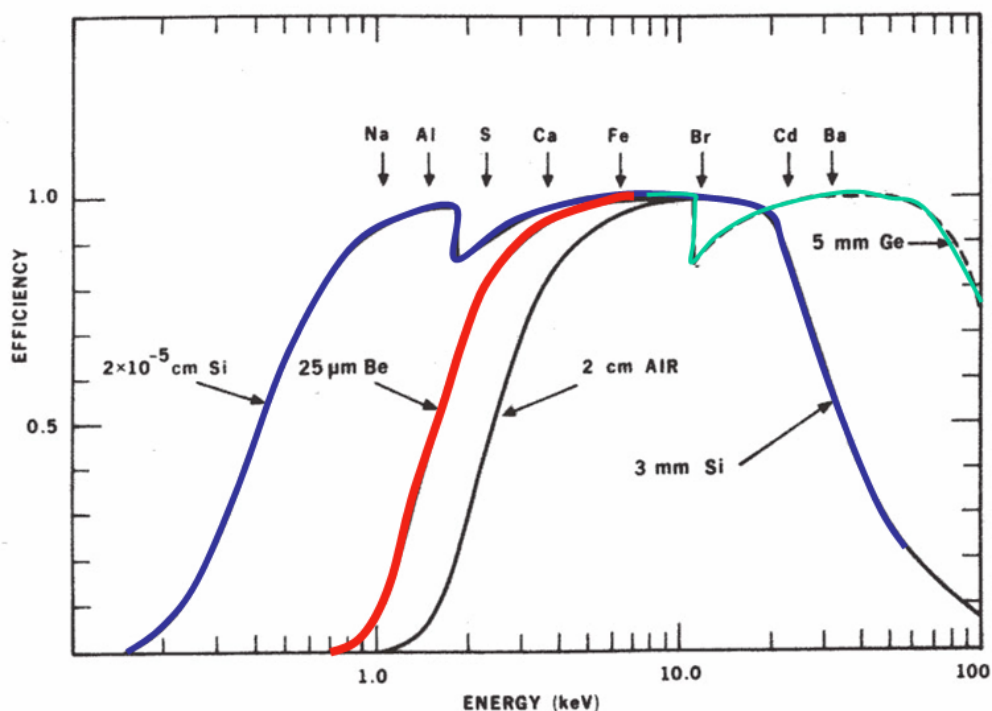


Abbildung 4.5: Theoretischer Wirkungsgrad eines Si(Li)- und eines Ge-Detektors bei unterschiedlichen Kristall- und Fensterdicken [21]

$$\epsilon_{tot} = \frac{\Omega}{4\pi} \cdot \epsilon(E) = \frac{\Omega}{4\pi} \cdot e^{-\mu_{abs} \cdot t} \cdot (1 - e^{-\mu_{Si} \cdot d}) \quad (53)$$

Ω	Raumwinkel, durch Detektorfläche und Abstand Detektor-Probe bestimmt
$\epsilon(E)$	energieabhängiger, intrinsischer Wirkungsgrad der Diode
t	Dicke der Absorptionsschicht zwischen Probe und sensitivem Detektorvolumen
μ_{abs}	der dazugehörige photoelektrische Massenabsorptionskoeffizient
d	Dicke des Detektors
μ_{Si}	photoelektrischer Massenabsorptionskoeffizient des Detektormaterials

Wie Abb. 4.5 zu entnehmen ist, sind die leichten Elemente Na, Mg und Al mit einem Detektor mit Be-Fenster an Luft nicht messbar.

Die Transmission für das in dieser Arbeit verwendete ultradünne Fenster (AP3.3) ist in Abb. 4.6 zu sehen.

4.6 Energieauflösung

Die Energieauflösung bestimmt die Fähigkeit eines gegebenen Detektorsystems, die charakteristischen Linien einer Multielementprobe aufzulösen. Um unterschiedliche Systeme miteinander vergleichen zu können, wurde die Halbwertsbreite (**F**ull **W**idth at **H**alf **M**aximum)

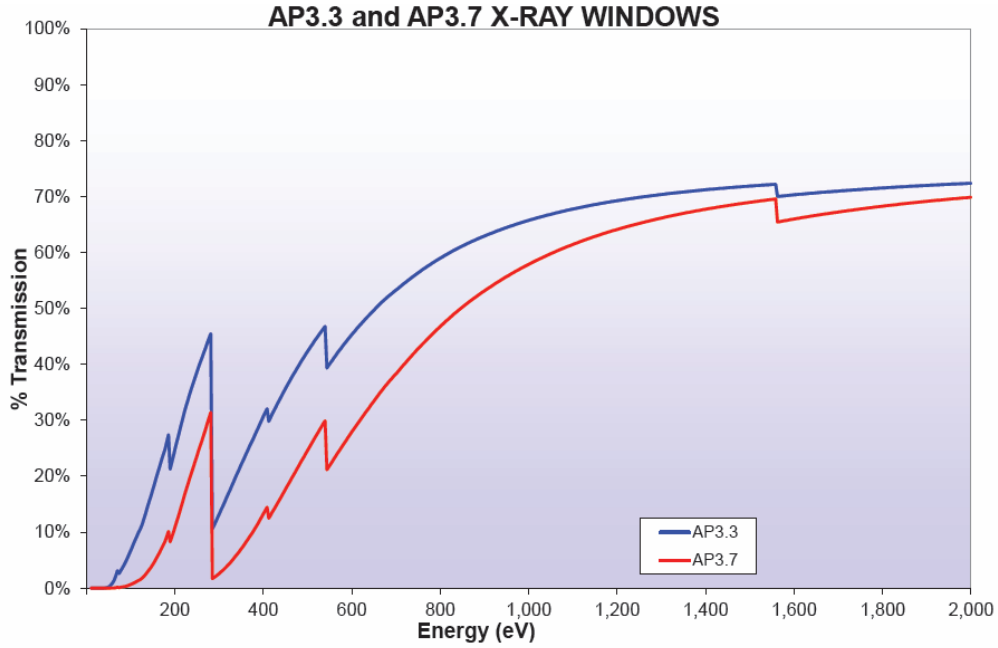


Abbildung 4.6: Transmission durch das AP3.3 ultradünne Fenster der Firma Moxtek [31]

der Pulshöhenverteilung eingeführt. Meist wird die Halbwertsbreite für die Mn-K $_{\alpha}$ -Linie (5,9keV) angegeben. Diese wird beim Zerfall von Fe-55 ausgesendet.

Wie man aus Glg. 54 sieht, hängt die Halbwertsbreite einer Röntgenlinie ΔE_{total} von einem Detektorbeitrag ΔE_{det} und einem Beitrag der elektronischen Signalverarbeitung ΔE_{elec} ab.

$$(\Delta E_{total})^2 = (\Delta E_{det})^2 + (\Delta E_{elec})^2 \quad (54)$$

Der Detektorbeitrag hängt wiederum von der Photonenenergie E , der mittleren notwendigen Energie zur Erzeugung eines Elektron-Loch-Paars sowie vom Fano-Faktor ab.

$$(\Delta E_{det})^2 = 2,35^2 \cdot E \cdot \epsilon \cdot F \quad (55)$$

Der Fano-Faktor gibt das Verhältnis der beobachteten Varianz der Ladungsträgerverteilung zur Varianz einer Poisson-Verteilung an. Er wird eingeführt, da die Prozesse, die zur Erzeugung der freien Ladungsträger führen, nicht – wie bei der Poisson-Statistik angenommen – statistisch unabhängig sind.

Der Faktor 2,35 wandelt die Standardabweichung einer Gauss-Verteilung in die Halbwertsbreite um.

4.7 Nachweis- und Quantifizierungsgrenze

Die Nachweisgrenze (*Limit of detection*, LOD) ist der Konzentrationswert bei dem man entscheiden kann, ob ein Element in der Probe enthalten ist. Das LOD ist also der Punkt, an dem man das Signal des Elements vom Hintergrund unterscheiden kann. Ist x_L die kleinste

noch messbare Größe, so gilt:

$$x_L = x_{bl} + k \cdot s_{bl} \quad (56)$$

Wobei x_{bl} der Mittelwert der Blankmessungen ist, s_{bl} die Standardabweichung der Blankmessungen und k ist ein numerischer Faktor, der nach der gewünschten statistischen Sicherheit gewählt wird. Auf Empfehlung der IUPAC wird $k = 3$ verwendet.

Eine Möglichkeit, die Nachweisgrenze aus einer einzigen Messung abzuschätzen, ist durch das „Lower Limit of Detection“ (LLD) gegeben. Dabei wird von der Poisson-Statistik ausgehend, für ein Fluoreszenzsignal mit Zählrate N , der Fehler σ_n als

$$\sigma_n = \sqrt{N} \quad (57)$$

angegeben. Dieser Fehler besteht aus den Standardabweichungen für Peak (σ_P) und Hintergrund (σ_B), die als gleich groß angenommen werden. Für einen Vertrauensbereich von 95% ($2\sigma_n$) erhält man deswegen

$$2 \cdot \sigma_n = 2\sqrt{\sigma_P^2 + \sigma_B^2} = 2\sqrt{2\sigma_B^2} \approx 3\sqrt{\sigma_B^2} \approx \sqrt{N_B} \quad (58)$$

Daraus folgt für das LLD:

$$LLD = \frac{3\sqrt{N_B} \cdot m}{N_N} = \frac{3\sqrt{I_B \cdot t} \cdot m}{I_N \cdot t} = \frac{3}{S} \sqrt{\frac{I_B}{t}} \quad (59)$$

N_B	Zählrate des Hintergrundes
N_P	Zählrate des Nettopeaks
m	Probenmasse
I_B	Intensität des Hintergrundes
I_N	Intensität des Nettopeaks
t	Messdauer („Live-Time“)
$S = \frac{I_N}{m}$	Empfindlichkeit

Die Quantifizierung ist im Allgemeinen ab Konzentrationen, die 10 Standardabweichungen des Blanks entsprechen, möglich. Das Quantifizierungslimit (LOQ) ist also

$$LOQ = 3,3 \cdot LLD = \frac{10\sqrt{N_B} \cdot m}{N_N} = \frac{10}{S} \sqrt{\frac{I_B}{t}} \quad (60)$$

5 Chemische Grundlagen

5.1 Proteine

Proteine sind aus α -Aminosäuren aufgebaut. Alpha bedeutet hier, dass die Aminogruppe (NH_3^+) am ersten Kohlenstoffatom (dem α -C) nach der Carbonsäuregruppe (COO^-) gebunden ist. Die Grundstruktur von Aminosäuren ist in Abb. 5.1 abgebildet. R steht hierbei für den Säurerest. Zu Proteinen verbinden sich Aminosäuren über die sogenannte Peptidbildung.

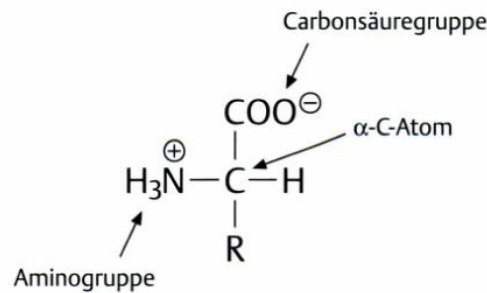


Abbildung 5.1: Allgemeine Form der α -L-Aminosäuren [32, S. 10]

Dabei werden die Aminosäuren unter Wasserabspaltung zwischen der Carboxylgruppe der einen Aminosäure und der Aminogruppe der anderen verknüpft.

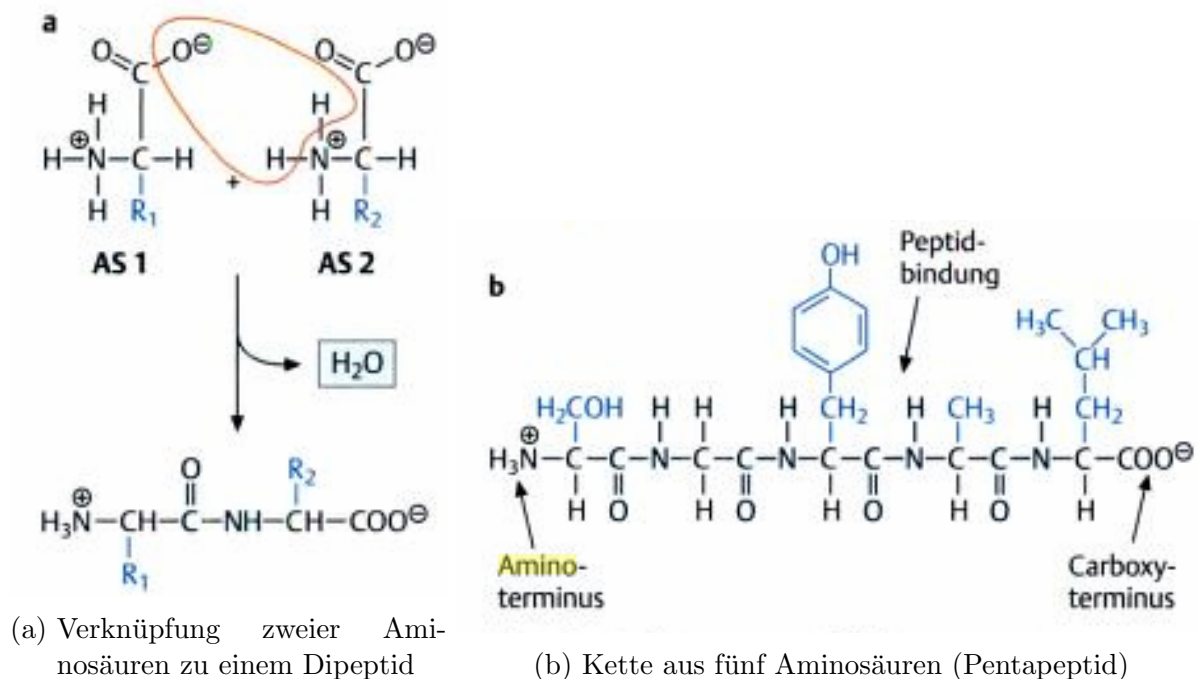


Abbildung 5.2: Polypeptide [32, S. 11]

Im menschlichen Körper können Proteine aus 21 unterschiedlichen proteinogenen Aminosäuren kodiert werden. Bis auf das sehr seltene Selenocystein sind alle im menschlichen Körper vorkommenden Aminosäuren in Abb. 5.3 abgebildet.

1. Hydrophobe Seitenkette						
L-Alanin (Ala) [A]	L-Valin (Val) [V]	L-Leucin (Leu) [L]	L-Isoleucin (Ile) [I]	L-Phenylalanin (Phe) [F]	L-Prolin (Pro) [P]	L-Methionin (Met) [M]
2. Polare Seitenkette						
L-Serin (Ser) [S]	L-Threonin (Thr) [T]	L-Cystein (Cys) [C]	L-Tryptophan (Trp) [W]	L-Tyrosin (Tyr) [Y]	L-Asparagin (Asn) [N]	L-Glutamin (Gln) [Q]
3. Saure Aminosäuren		4. Basische Aminosäuren			5.	
L-Asparaginsäure (Asp) [D]	L-Glutaminsäure (Glu) [E]	L-Lysin (Lys) [K]	L-Arginin (Arg) [R]	L-Histidin (His) [H]	Glycin (Gly) [G]	

Abbildung 5.3: Die wichtigsten proteinogenen Aminosäuren. Unter den Namen ist in runden Klammern die Abkürzung und in eckigen Klammern der Ein-Buchstaben-Code angegeben. Die beiden sauren Aminosäuren sind auch unter den Namen Aspartat und Glutamat bekannt. [33, S. 27]

Proteine erfüllen als Enzyme, Hormone, Regulationsstoffe, Stütz- und Gerüstsubstanz, biologische Motoren, Signalstoffe und Transporter eine Vielzahl an wichtigen Funktionen [32, 33]. Ihre Molekülmassen betragen zwischen 10 000 und einigen Millionen Dalton⁶.

Jedes Protein wird aus den Aminosäuren in einer bestimmten Reihenfolge aufgebaut, der sogenannten Aminosequenz. Die Hauptkette ist, abgesehen von der Länge, für jedes Protein gleich. Die speziellen Eigenschaften eines Proteins ergeben sich somit aus den Aminosäureseitenketten.

5.2 Phosphorylierung

Unter Phosphorylierung versteht man das kovalente Anbinden eines Phosphats (PO_4^{3-}) an eine Aminosäureseitenkette im Protein. Phosphate sind negativ geladen. Das Anhängen der

⁶ $1\text{Da} = 1\text{u} = \frac{m(^{12}\text{C})}{12} = 1,660538921 \cdot 10^{-27}\text{kg}$

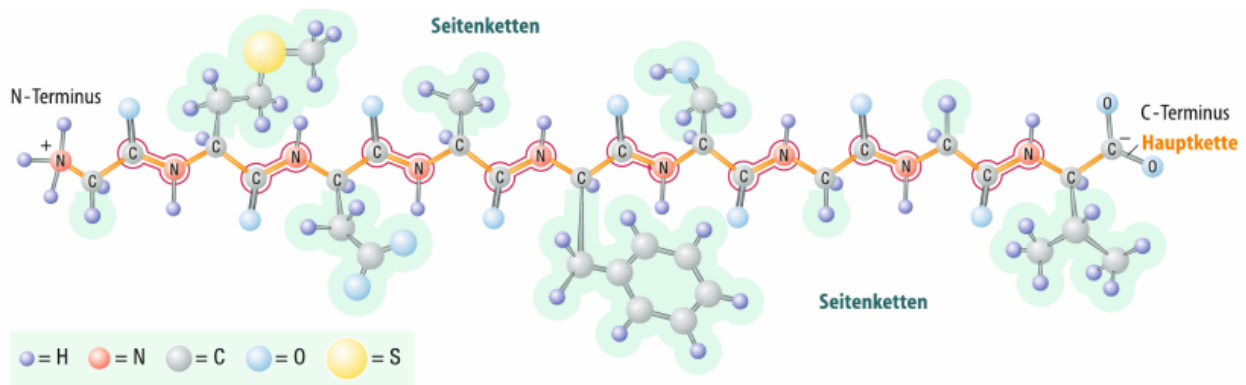


Abbildung 5.4: Polypeptidkette mit der Sequenz Gly-Met-Asp-Ala-Phe-Ser-Gly-Gly-Val. Die Hauptkette ist orange, die Seitenketten sind blau eingezeichnet. Die Peptidbindungen sind rot umrandet. [34, S. 57]

Phosphatgruppe bewirkt eine Verhaltensänderung des Proteins, die meist mit einer Konformationsänderung des Proteins einhergeht [35].

Die reversible Phosphorylierung kontrolliert die Enzymaktivität und dient sozusagen als Schaltermechanismus. Wobei je nach Protein sowohl die phosphorylierte als auch die dephosphorylierte Form des Proteins die aktivierende Form sein kann.

Es wird angenommen, dass etwa ein Drittel aller Proteine in eukaryotischen Zellen⁷ zu einem gegebenen Zeitpunkt phosphoryliert sind [36, S. 483]. Die Proteinphosphorylation gilt somit als die weitverbreiteste Art der posttranslationalen Modifikation⁸, die zur Signalübermittlung verwendet wird [37, S. 530]. Sie beeinflusst Zellprozesse wie Stoffwechsel, Differenzierung, Zellbeweglichkeit und den programmierten Zelltod (Apoptose) und spielt eine entscheidende Rolle in der Funktionsfähigkeit des Nerven- und des Immunsystems [38, S. 1912f].

Um zu verstehen, wie Proteinphosphorylierung einen bestimmten Zellprozess reguliert, muss folgendes bekannt sein:

- Identität des Phosphorproteins und seine möglichen Phosphorylierungsstätten
- die Effekte der Phosphorylierung dieser Phosphorylierungsstätten
- die Art der beteiligten Proteinkinase⁹ und Proteinphosphatase¹⁰
- und die Mechanismen, die bestimmen, ob diese Enzyme aktive oder inaktive sind [36, S. 483].

⁷ Eukaryotische Zellen sind Zellen höherer Lebewesen. Sie enthalten einen Zellkern, in dem die DNA organisiert ist.

⁸ Unter posttranslationalen Modifikationen versteht man Veränderungen an Proteinen, die nach der Proteinsynthese stattfinden.

⁹ Mit Proteinkinase wird das Enzym, welches die Phosphatgruppe von einem energiereichen Spendermolekül (oft ATP) an das Protein überträgt, bezeichnet.

¹⁰ Das Enzym, das die Phosphatgruppe von der Aminosäure entfernt, wird Proteinphosphatase genannt. Es bewirkt also die Dephosphorylierung.

In eukaryotischen Zellen findet die Phosphorylierung im Allgemeinen an folgenden vier Aminosäurenresten statt: Serin, Theronin, Tyrosin und Histidin [39, S. 137].

Abnormale Phosphorylierung gilt als Ursache für Krankheiten wie Krebs, Diabetes und Gelenkrheumatismus [40, S. 5002].

6 Messaufbau



Abbildung 6.1: Außenansicht der ATI Low Z TXRF Kammer

Alle Messungen in dieser Arbeit wurden mit dem Low Z TXRF Aufbau und einer Cr-Röhre durchgeführt. Das Innere der Messkammer ist in Abb. 6.7 und Abb. 6.8 zu sehen.

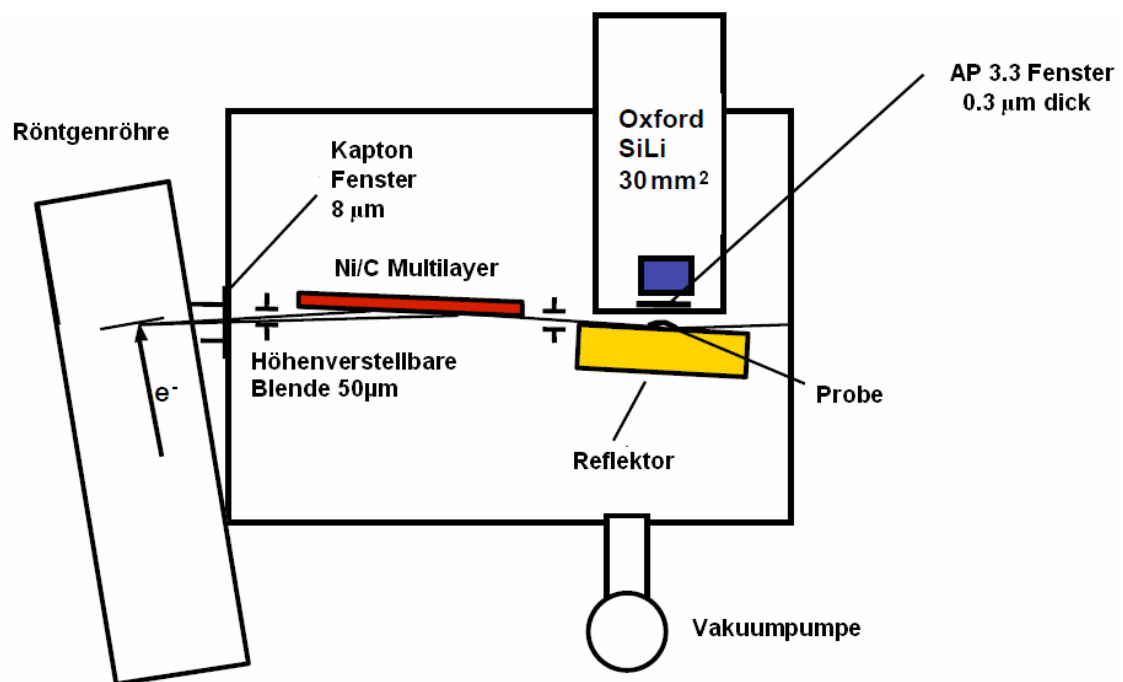


Abbildung 6.2: Schema des Low Z Spektrometers [21, modifiziert]

Die im Messaufbau verwendeten Komponenten sind in Tab. 6.1 aufgelistet.

Messaufbau	
Röntgenröhre Multilayer	Siemens FK 60-04 Cr 1300W, long fine focus AXO Ni/C 2d=12nm, N=70
Detektor	
Modell	Oxford Premiumgrade B35
Kristallgröße	30mm ²
FWHM bei 5,9keV	134eV
Eintrittsfenster	Moxtek AP3.3, 300nm dicker Polymer auf einem Si-Stützgitter (s. Abb. 4.6)
Amplifier	XP3

Tabelle 6.1: Die im Aufbau verwendeten Komponenten

Der verwendete Pulsprozessor war ein DXP Saturn von XIA. Der Detektor wurde mit einer Elektronenfalle, bestehend aus einem zylindrischen Kollimator (Mittellochdurchmesser: 6mm) aus Eisen auf dem zwei starke Permanentmagneten ($6 \times 4 \times 1\text{mm}^3$) aufgebracht worden waren, ausgestattet [41, S. 302]. Die Elektronenfalle wird benötigt, da Photo-, Compton- und Augerelektronen im Vakuum in die Richtung des Detektors gestreut werden und das ultradünne Fenster¹¹ durchdringen können. Durch das Magnetfeld werden die Elektronen abgelenkt und somit vom Detektor ferngehalten.

Um die Messungen zu vereinfachen, wurde eine neue Probenhalterung konstruiert. In die alte Halterung wurden die Probenträger von oben eingelegt. Da die Probenträger unterschiedlich dick sind, musste diese Halterung regelmäßig nachjustiert werden.

In die neue Halterung (Abb. 6.4) werden die Probenträger nun seitlich mit Hilfe der orangen Führung (Abb. 6.5) in die Halterung eingelegt und über einen Exzenterantrieb nach oben gehoben. Dies hat den Vorteil, dass die Oberfläche der Probenträger immer in der selben Höhe fixiert wird und somit nicht mehr nach jedem Probenwechsel die Höhe der Halterung mittels z-Motor neu justiert werden muss.

Die Baupläne für die neue Halterung sind in Anhang A.1 zu sehen.

Wie aus Abb. 6.7 ist zu erkennen ist, gelangt der Röntgenstrahl aus der Cr-Röhre über ein Kaptonfenster in die Vakuumkammer. Dort trifft er auf den Multilayer, der den Strahl nach der Wellenlänge aufspaltet. Wegen der 50 μm -Blende gelangt dann nur noch monochromatische Cr-K $_{\alpha}$ -Strahlung auf die Probe.

¹¹ Ein 8 μm dickes Be-Fenster wäre bereits genug um die Elektronen abzuhalten.

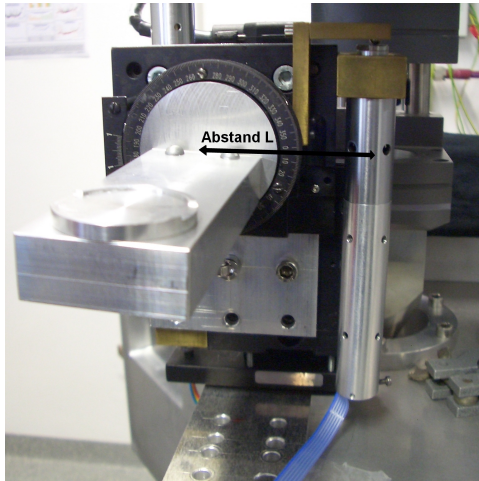


Abbildung 6.3: Alte Probenhalterung

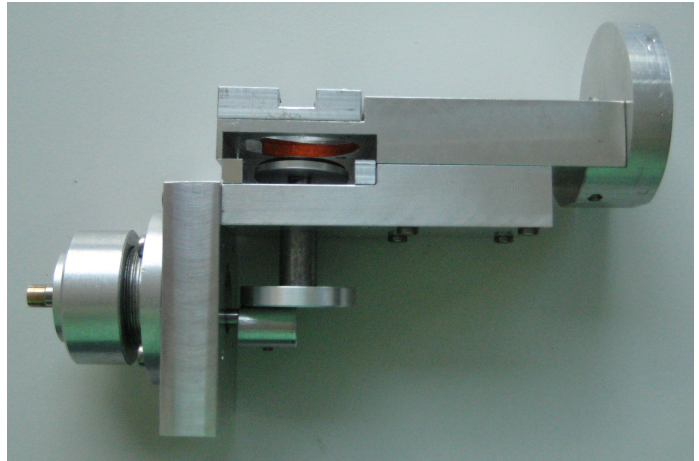


Abbildung 6.4: Seitenansicht der neue Probenhalterung



Abbildung 6.5: Probenführung

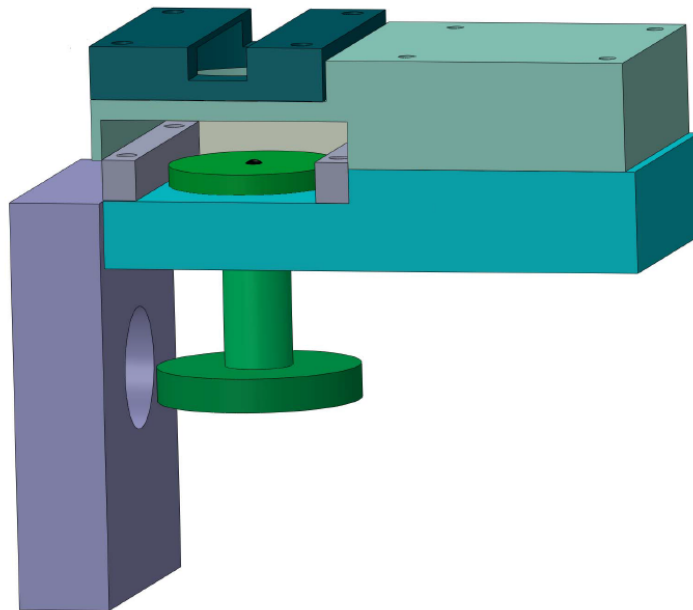


Abbildung 6.6: Dreidimensionales Schema der Probenhalterung

6.1 Multilayer

Wird monochromatische Röntgenstrahlung zur Probenanregung verwendet, so kann der Hintergrund der durch gestreute Photonen entsteht deutlich reduziert werden. Zur Monochromatisierung können Kristalle oder Multilayer eingesetzt werden. Der große Vorteil des Multilayers gegenüber des Kristalls ist die hohe Reflektivität von etwa 80%. Im Gegensatz dazu beträgt die Reflektivität von Kristallen nur etwa 20%. Durch das größere Reflexionsvermögen

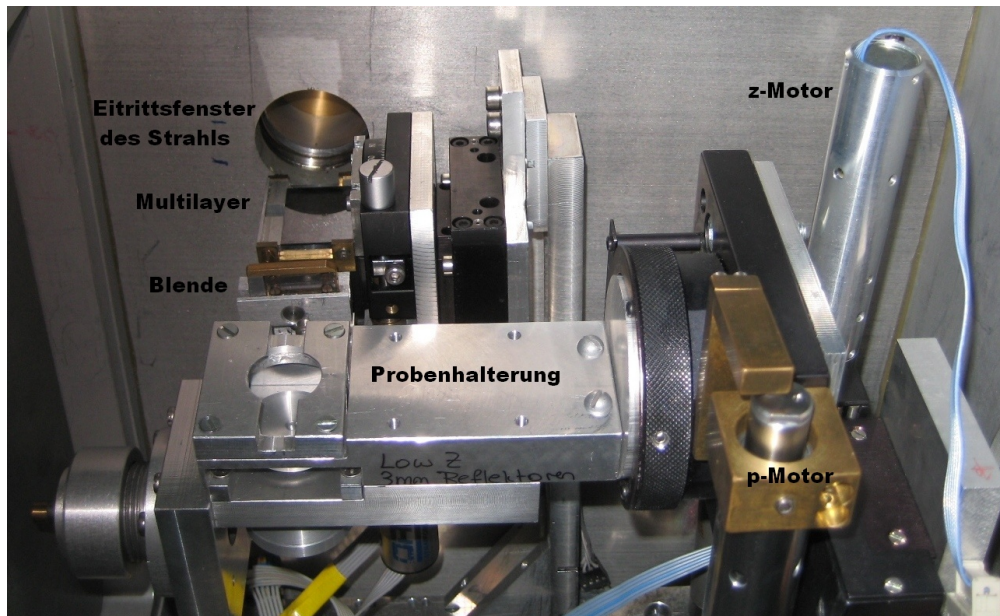


Abbildung 6.7: Strahlengang

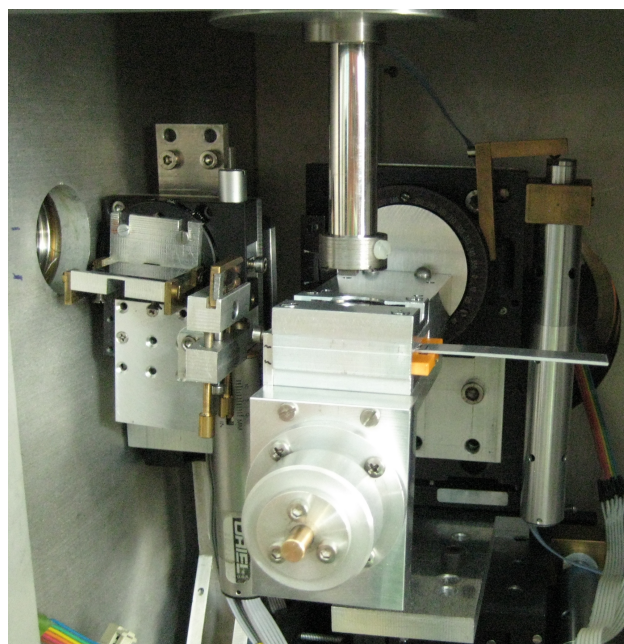


Abbildung 6.8: Messaufbau

gelangt somit eine höhere Intensität auf die Probe.

Ein Multilayer besteht aus sich abwechselnden Schichten eines schweren Materials (wie z.B. Nickel) und eines leichten Materials mit unterschiedlichen Brechungsindizes. An den schweren Materialien wird der Röntgenstrahl reflektiert, während die leichten Schichten als Abstandhalter (spacer) dienen und eine hohe Transmission für Röntgenstrahlung aufweisen. Die Dicke zweier Schichten ist konstant und wird als $2d$ angegeben. Die Periodizität wird mit N bezeichnet.

Da zu Beginn dieser Arbeit nicht klar war, welcher Multilayer bereits in der Anlage eingebaut war, wurde $2d$ für diesen Messaufbau abgeschätzt. Dafür wurden der Abstand zwischen primären und am Multilayer reflektierten Röntgenstrahl an einem 23cm vom Multilayer entfernten Schirm gemessen. Der Abstand betrug etwa 9mm. Für den Winkel zwischen einfallendem und reflektiertem Strahl gilt deshalb:

$$\tan(2\Theta) = \frac{9}{230} \quad (61)$$

Wird Θ nun in die Bragg'sche Gleichung (Glg. 22) eingesetzt, so ergibt sich die Dicke zweier Schichten mit der Wellenlänge von Cr-K $_{\alpha}$ (2,2891Å) zu

$$2d \approx 11,7\text{nm} \quad (62)$$

Damit war klar, dass es sich bei dem eingebauten Multilayer um Ni/C mit $2d=12\text{nm}$ handeln musste.

6.2 Winkelmotor

Während die Veränderung der Position des z-Motors (s. Abb. 6.7) zu einer genau so großen Positionsveränderung der Probenhöhe führt, ist der Zusammenhang beim ϕ -Motor (in Abb. 6.8 als p-Motor gekennzeichnet) etwas komplizierter.

Der Abstand L zwischen Drehpunkt der Probenhalterung und Motor ist 58mm.

$$\frac{10^{-6}}{L} = \frac{1}{58} \cdot 10^{-3} = 0,0172 \cdot 10^{-3}\text{rad} \approx 17\mu\text{rad} \quad (63)$$

Wie aus Glg. 63 zu sehen ist, entspricht eine Positionsänderung des ϕ -Motors um $1\mu\text{m}$ einer Winkeländerung um $17\mu\text{rad}$ (bzw. $9,74 \cdot 10^{-4}^\circ$).

Der kritische Winkel von Si ($E=5,4\text{keV}$ und $\rho=2,336\frac{\text{g}}{\text{cm}^3}$ in Glg. 46 eingesetzt) beträgt $5,8\text{mrad}$.

$$a = \frac{5,8}{0,017} = 341\mu\text{m} \quad (64)$$

Betrachtet man nun einen Winkelscan eines Probenträgers, so sollte der Abstand a zwischen dem Nullpunkt- und dem Wendepunktsignal für Si etwa $341\mu\text{m}$ betragen.

Der Winkelscan einer Kalibrierprobe (Abb. 6.9) bestätigt diese Abschätzung.

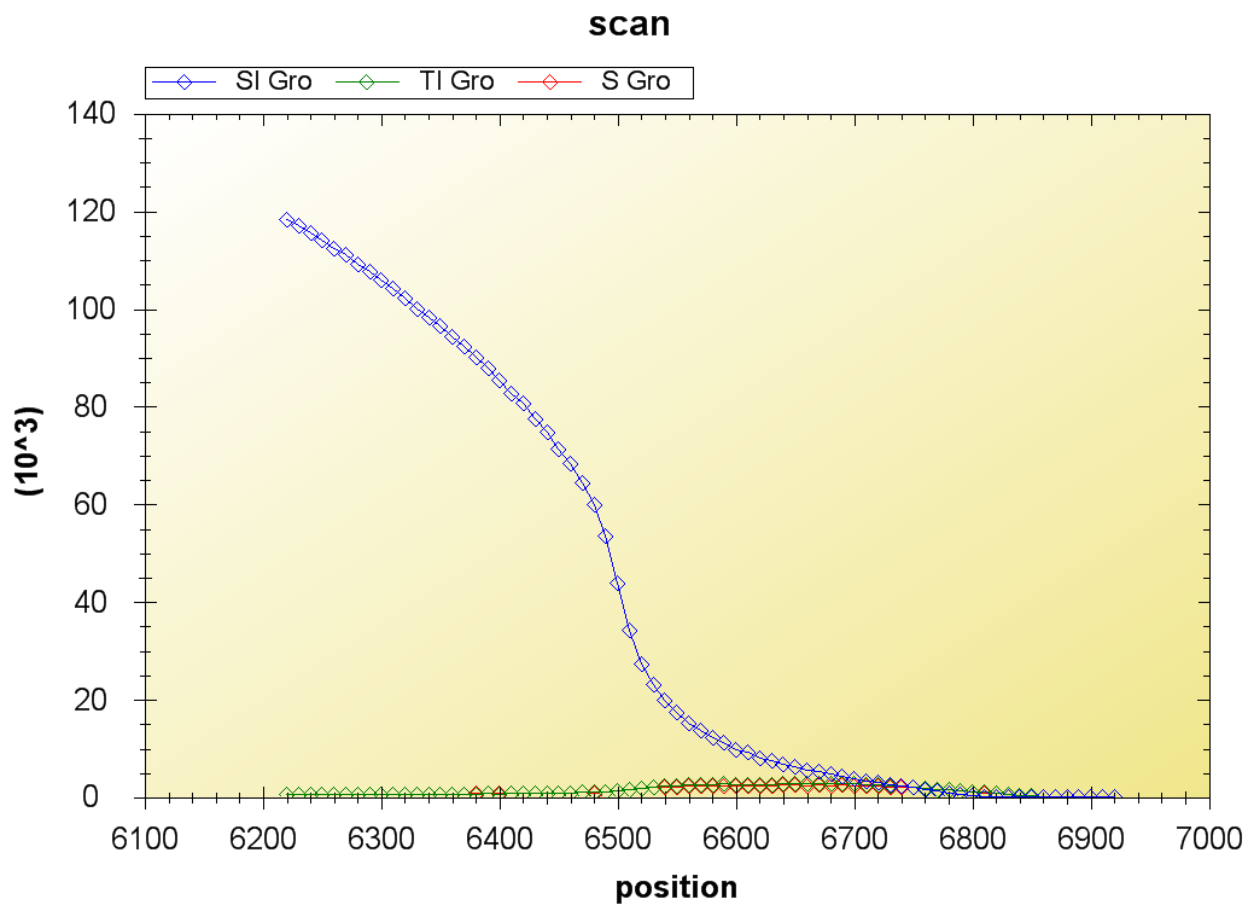


Abbildung 6.9: Winkelscan einer 51ppm S Kalibrierprobe mit 11ppm Ti (interner Standard): Motorpositionen sind in μm Intensitäten in Counts angegeben. Es gilt: je größer die angegebene Motorposition, desto kleiner der Winkel.

7 Kalibrierung

Die Intensität der Fluoreszenzstrahlung eines Elements, steht im linearem Zusammenhang mit der Konzentration dieses Elements in der Probe.

Da die Proben für diesen Aufbau immer als dünner Film auf Quarzglas-Probenträger aufgebracht wurden, können Proben durch Beigabe einer definierten Menge eines internen Standards über die Dünnschichtnäherung (s. Kap. 3.3) quantifiziert werden.

Durch Messung der Intensitäten bekannter Konzentrationen der zu untersuchenden Elemente im Verhältnis zur Intensität einer bekannten Konzentration des internen Standards können die relativen Empfindlichkeiten bestimmt werden.

Die Kalibrierung wurde für Fluor, Natrium, Magnesium, Aluminium, Phosphor und Schwefel mit ICP-Flüssigstandards erstellt. Da in den organischen Proben Kalzium erwartet wurde und durch den Ca-K β -Peak¹² die Verwendung von Scandium als interner Standard erschwert worden wäre, wurde Titan als interner Standard gewählt.

	Element		interner Standard Ti		Wasser
	eingewogen	Konzentration	eingewogen	Konzentration	eingewogen
F	0,0606 g NaF	60,2027 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$	0,0106 g	10,5305 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$	0,9354 g
	0,0503 g NaF	49,6104 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$	0,0107 g	10,5533 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$	0,9529 g
	0,0203 g NaF	20,1970 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$	0,0108 g	10,7452 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$	0,9740 g
Na	0,0606 g NaF	72,8452 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$	0,0106 g	10,5305 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$	0,9354 g
	0,0503 g NaF	60,0286 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$	0,0107 g	10,5533 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$	0,9529 g
	0,0203 g NaF	24,4384 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$	0,0108 g	10,7452 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$	0,9740 g
Mg	0,0609 g	60,6997 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$	0,0108 g	10,7645 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$	0,9316 g
	0,0509 g	50,5964 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$	0,0107 g	10,6362 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$	0,9444 g
	0,0206 g	20,4842 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$	0,0120 g	11,9320 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$	0,9731 g
Al	0,0613 g	60,4894 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$	0,0124 g	12,2360 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$	0,9397 g
	0,0509 g	50,5412 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$	0,0129 g	12,8091 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$	0,9433 g
	0,0204 g	20,3268 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$	0,0111 g	11,0602 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$	0,9721 g
P	0,0511 g	50,0735 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$	0,0110 g	10,7790 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$	0,9584 g
	0,0212 g	20,7396 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$	0,0096 g	9,3915 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$	0,9914 g
	0,0108 g	10,5109 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$	0,0103 g	10,0243 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$	1,0064 g
S	0,0518 g	51,3736 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$	0,0111 g	11,0086 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$	0,9454 g
	0,0198 g	19,9235 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$	0,0109 g	10,9680 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$	0,9631 g
	0,0107 g	10,5721 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$	0,0111 g	10,9673 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$	0,9903 g

Tabelle 7.1: Eingewogene Kalibrierproben

Die aus den Messungen dieser Proben (s. Tab. 7.1) erhaltenen Kalibrierkurven sind in Abb. 7.1–7.6 zu sehen. Aus den Steigungen dieser Kurven können die relativen Empfindlichkeiten für die einzelnen Elemente abgelesen werden.

¹²Die Energie des K β -Peaks von Ca liegt bei 4,012keV, die des Sc-K α -Peaks bei 4,088keV.

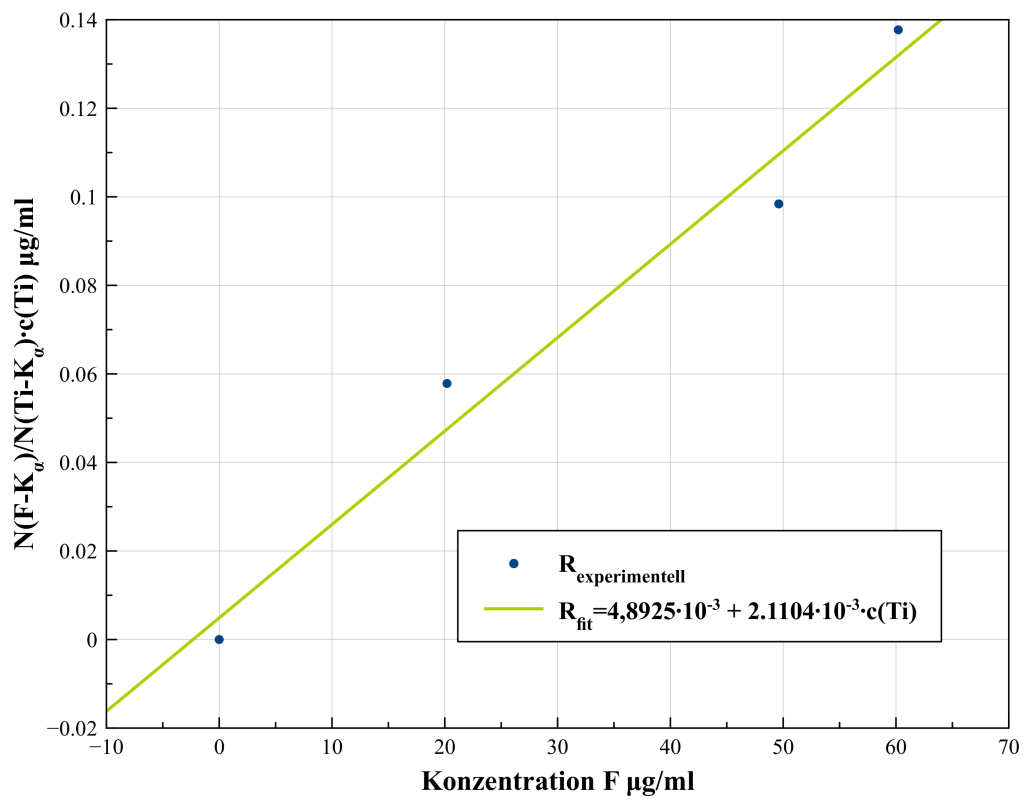


Abbildung 7.1: Kalibrierkurve für Fluor

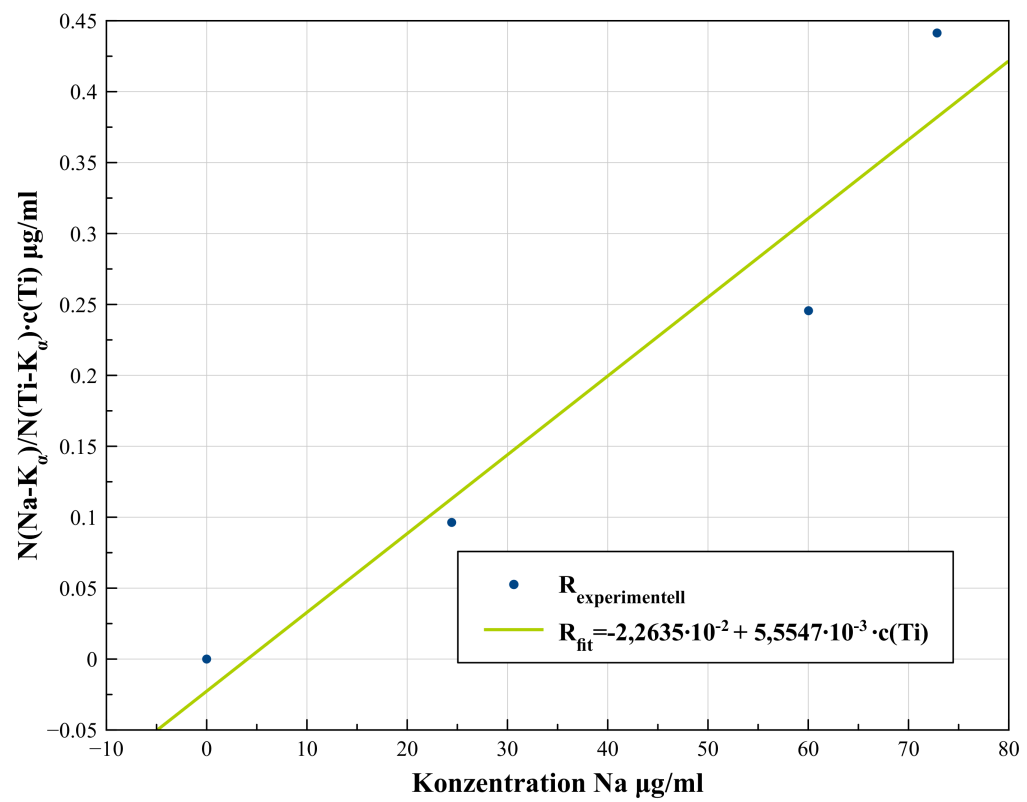


Abbildung 7.2: Kalibrierkurve für Natrium

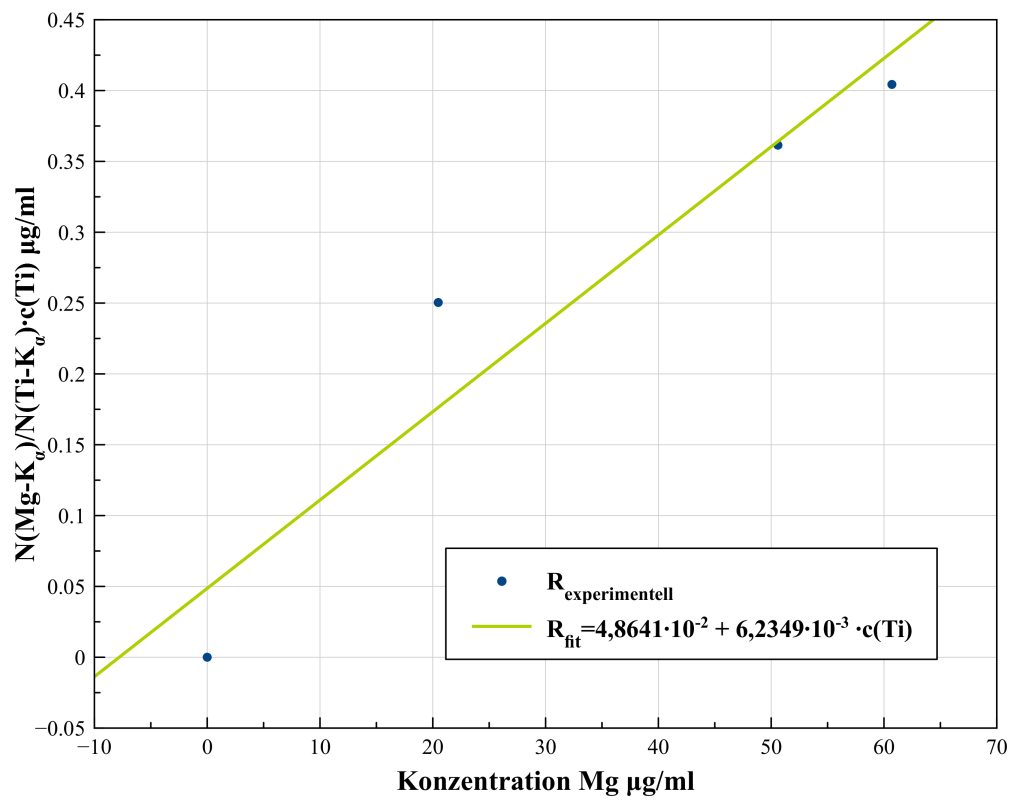


Abbildung 7.3: Kalibrierkurve für Magnesium

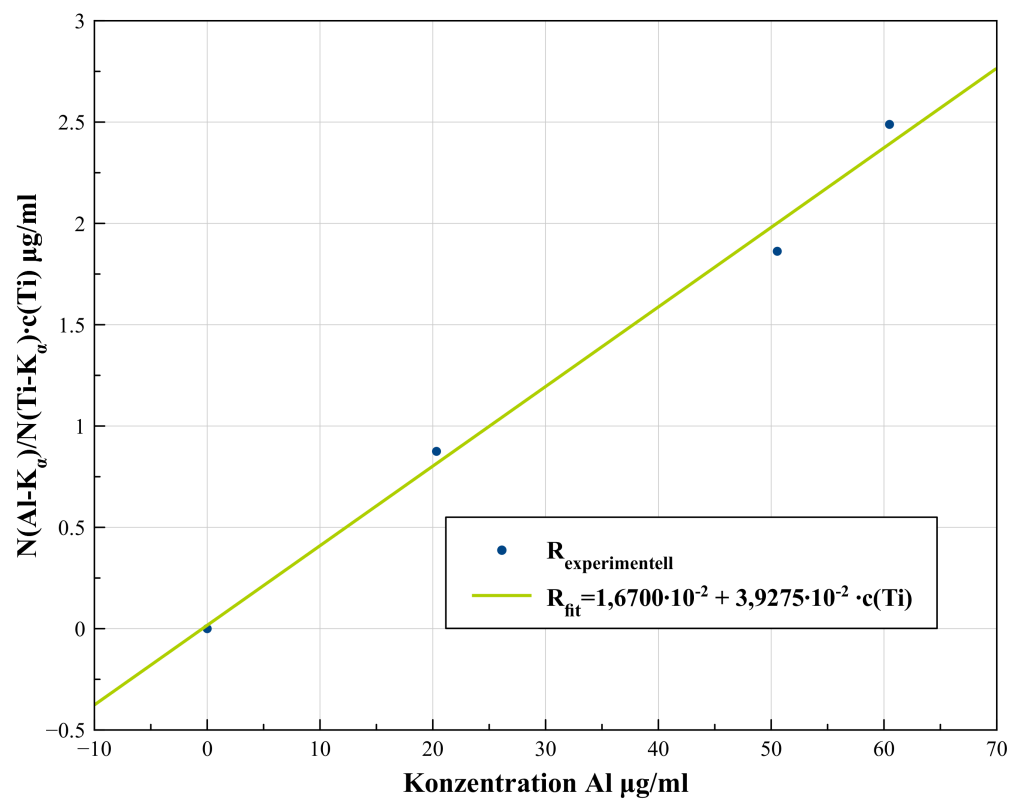


Abbildung 7.4: Kalibrierkurve für Aluminium

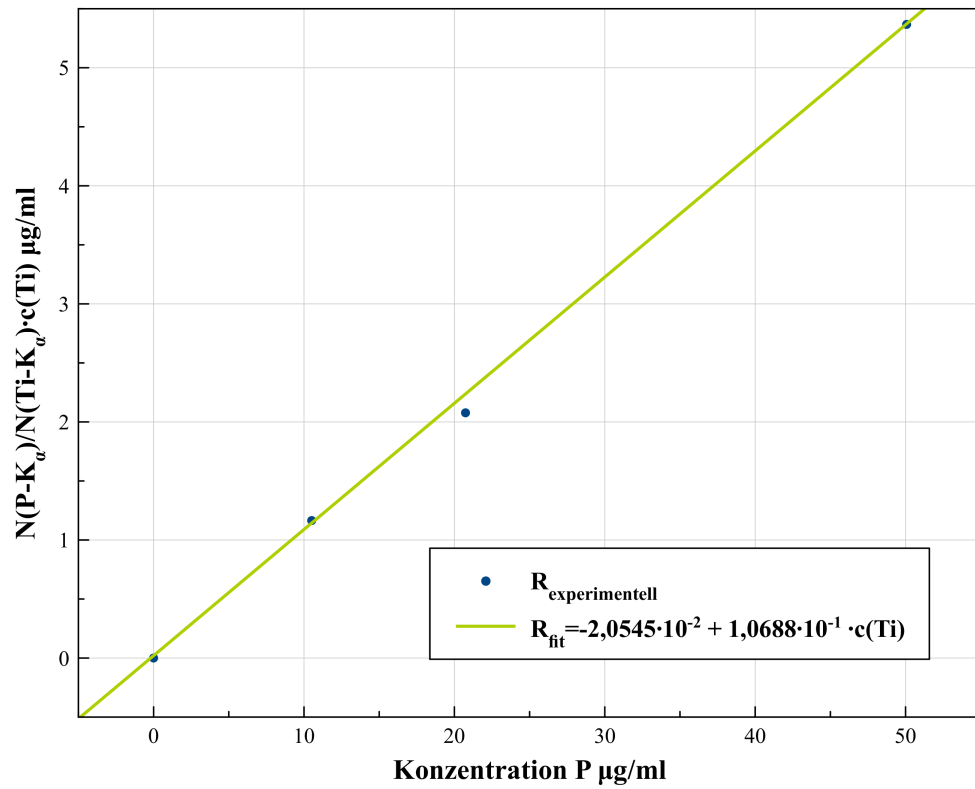


Abbildung 7.5: Kalibrierkurve für Phosphor

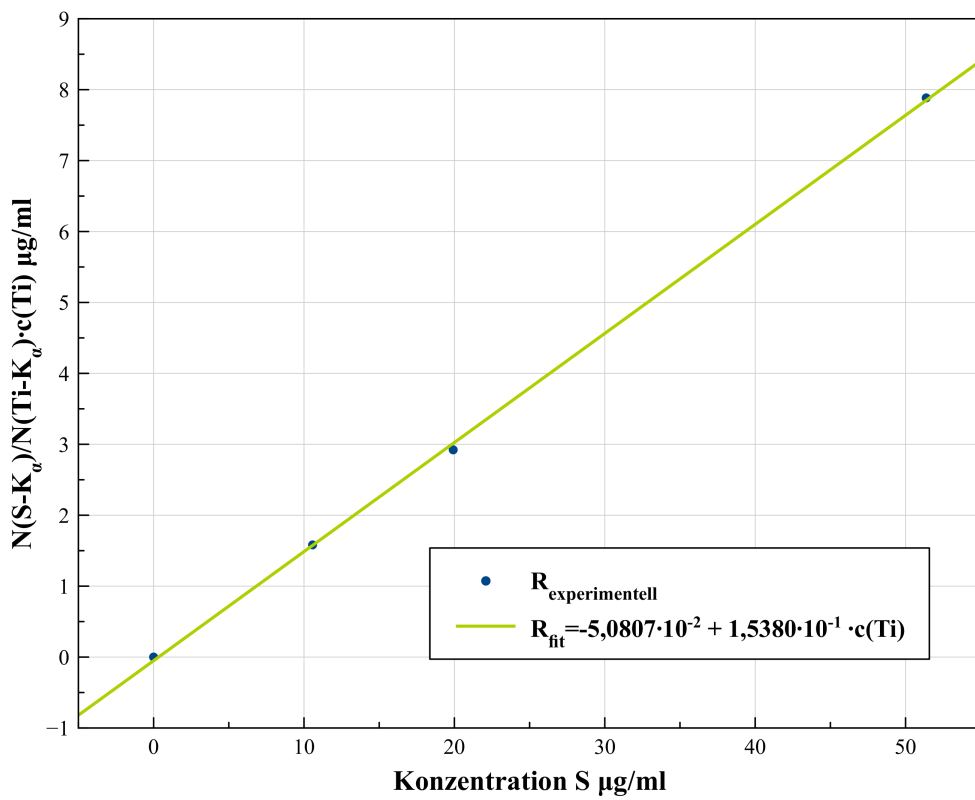


Abbildung 7.6: Kalibrierkurve für Schwefel

Ein Vergleich der relativen Empfindlichkeiten ist in Abb. 7.7 zu sehen.

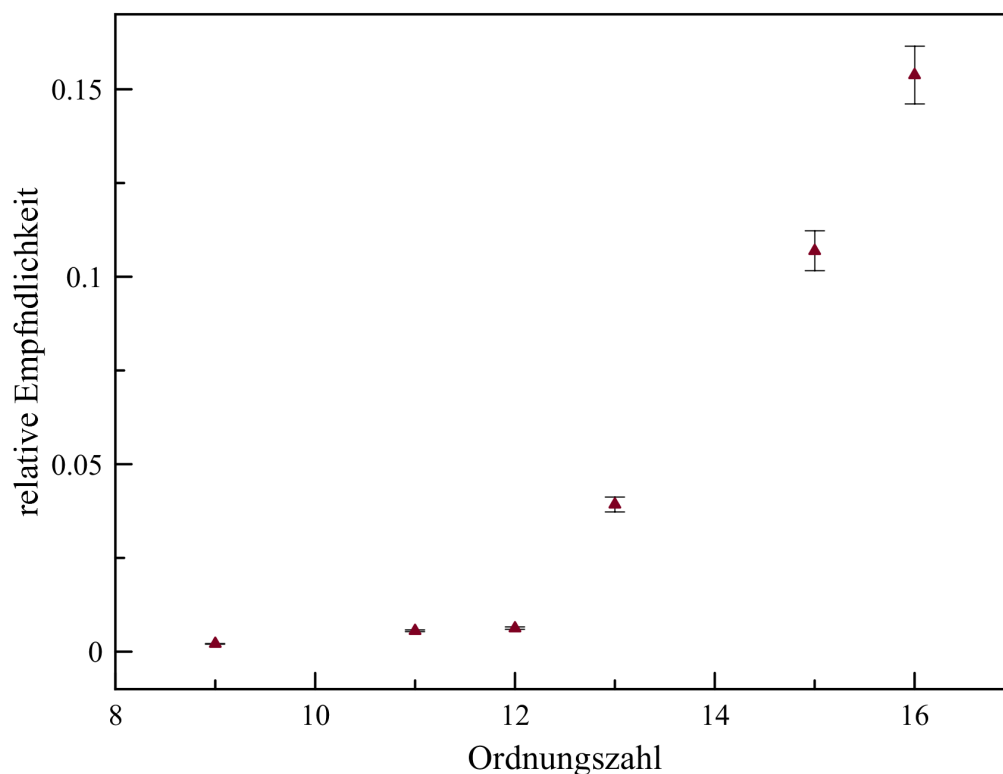


Abbildung 7.7: Relative Empfindlichkeit der kalibrierten Elemente

Mit Hilfe dieser relativen Empfindlichkeiten lassen sich nun aus dem Verhältnis der Intensitäten des gefragten Elements und des internen Standards, bei bekannter Konzentration des Standards, die Konzentration des Elements bestimmen.

Die Kalibrierung wurde für P und S durch Messungen unterschiedlicher Konzentrationen der folgenden Referenzproben überprüft: „Seronorm Trace Elements Serum L-2“ (s. Anhang B) und BNPP¹³.

Wie aus Tab. 7.2 und 7.3 zu sehen ist, stimmen die durch die Kalibrierung erhaltenen Konzentrationen für P und S gut mit den erwarteten Konzentrationen überein.

Da Na, Mg und Al für die weitere Auswertung nicht von Interesse waren, wurde die Kalibrierung dieser Elemente nur mit der ersten Serumprobe (Reflektornummer 242) überprüft. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7.4 zu sehen.

¹³ Bis(4-nitrophenyl)hydrogenphosphat: $C_{12}H_9N_2O_8P$

Seronorm Trace Elements Serum L-2				
Messdatum (Reflektornr.)	Element	erwartete Konzentration ($\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$)	gemessene Konzentration ($\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$)	Abweichung (%)
9/24/12 (242)	P	8,1–10,2	10,79	+5,78
	S	129,74	136,72	+5,38
10/17/12 (246)	P	8,1–10,2	9,95	0
	S	129,74	123,39	–4,9
10/25/12 (225)	P	3,0–3,8	3,86	+1,58
	S	48,53	53,86	+10,98
10/25/12 (16)	P	3,0–3,8	3,88	+2,11
	S	48,53	51,71	+6,55

Tabelle 7.2: Vergleich der erwarteten und erhaltenen Konzentrationen der „Seronorm Trace Elements Serum L-2“-Messungen

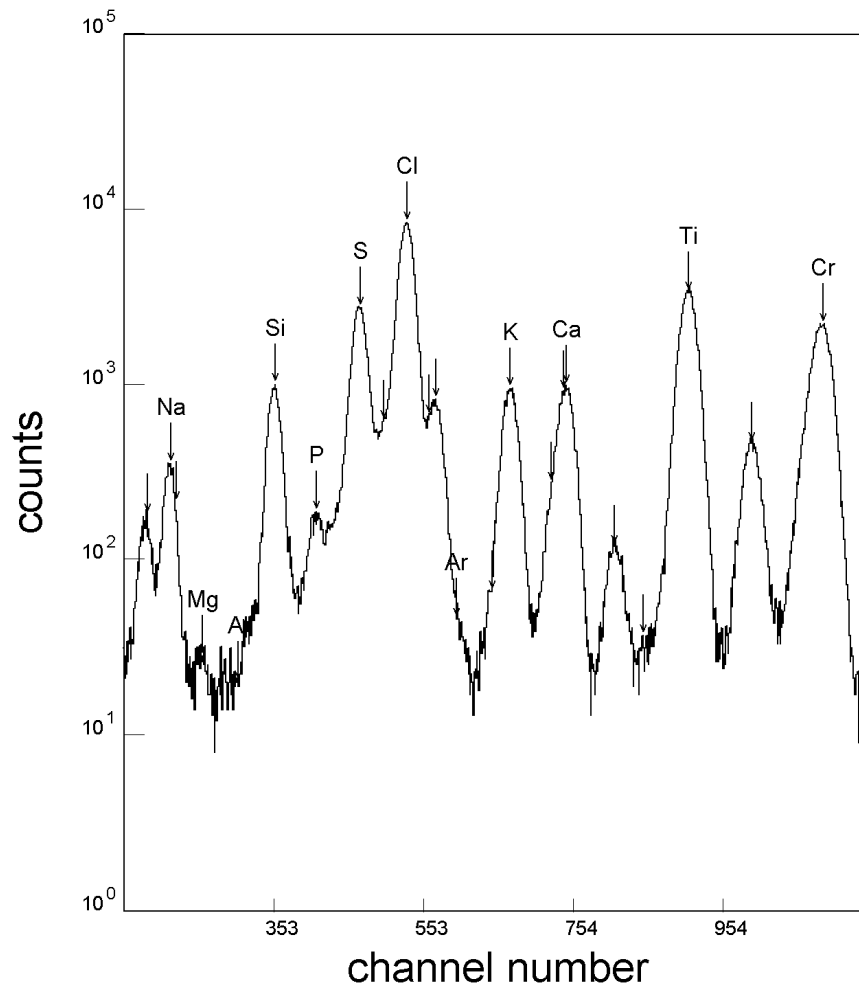


Abbildung 7.8: Spektrum einer Serumprobe (Reflektornummer 16): Der Peak links vom Na ist der Cl-Escape-Peak. Die restlichen unbeschrifteten Peaks sind K_{β} -Peaks.

Alle Spektren wurden mit QXAS-AXIL gefittet und quantifiziert. Wie in Abb. 7.10 zu sehen ist, konnte AXIL die gemessenen Spektren gut anfitten. Die Abbildungen der Spektren wurden mit Winqxas erzeugt.

BNPP (Phosphor)			
Messdatum (Reflektornr.)	erwartete Konzentration ($\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$)	gemessene Konzentration ($\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$)	Abweichung (%)
9/24/12 (1)	91.1	96.29	+5.7
10/4/12 (232)	91.1	93.08	+2.17
10/4/12 (245)	50.7	43.94	-13.33
10/17/12 (254)	50.7	55.18	+8.84

Tabelle 7.3: Vergleich der erwarteten und erhaltenen Konzentrationen der BNPP-Messungen

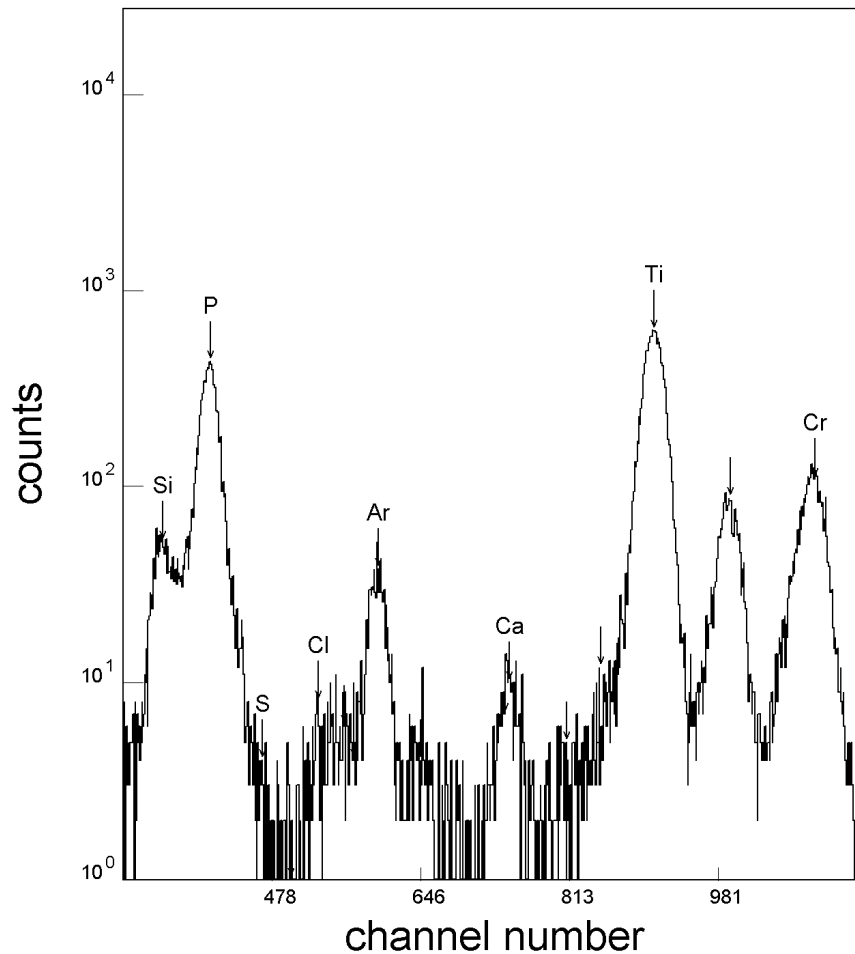


Abbildung 7.9: BNPP-Spektrum für $51 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ P (Reflektornummer 245)

Es konnte gezeigt werden, dass trotz Verwendung der Steigung der Kalibriergeraden ohne Berücksichtigung ihres Offsets, die von uns vorbereiteten Standardreferenzmaterialien durch unsere Kalibrierung zufriedenstellend ausgewertet werden.

Element	erwartete Konzentration ($\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$)	gemessene Konzentration ($\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$)	Abweichung (%)
Na	311,3	287,2	-7,7
Mg	3,1-3,7	2,9	-6,4
Al	0,009	<1,09	

Tabelle 7.4: Vergleich der erwarteten und erhaltenen Konzentrationen für Na, Mg und Al

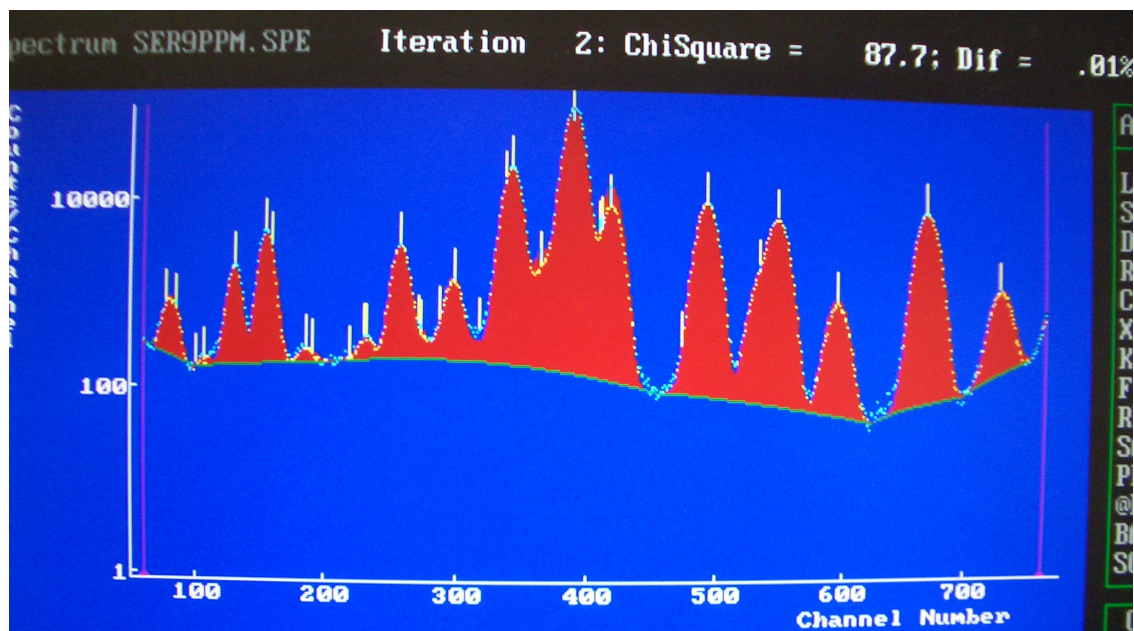


Abbildung 7.10: AXIL-Fit für eine Serumprobe mit etwa $9\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ P und $10,79\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ Ti als internen Standard

8 Messung der Proteinproben

Die Messungen wurden in zwei Messreihen durchgeführt. Die Proben wurden am VITO¹⁴ auf die Quarzglasreflektoren aufgebracht und am Atominstitut mit dem bereits beschriebenen Low Z TXRF Aufbau (s. Kap. 6) gemessen.

Der Messprozess besteht aus einem Höhenscan um das Intensitätsmaximum für den internen Standard (und somit auch für die gesamte Probe) zu finden. Anschließend wird ein Winkelscan durchgeführt um einen Winkel zu finden, bei dem das Probensignal noch groß, der Hintergrund aber bereits klein ist (vergleiche Abb. 3.10).

Die Probenhalterung braucht für ähnliche Proben nach einem Probenwechsel nicht neu justiert zu werden. Vorsichtshalber wurde nach jedem Probenwechsel trotzdem ein kurzer Höhenscan durchgeführt.

Alle Proben wurden zweimal gemessen, wobei für die zweite Messung die Quarzreflektoren um 90–180° gedreht wurden, um grobe Inhomogenitäten der Elementverteilung innerhalb der Probe ausschließen zu können.

8.1 Erste Messreihe

Bei den Proben der ersten Messreihe handelte es sich um die Dickdarmkarzinomzellen HT29 [42] und HCT116 [43]. HCT116 besitzt ein Wildtyp-APC-Gen¹⁵, während HT29 eine Mutation dieses Gens besitzt. Da das APC Einfluss auf die Phosphorylationsprozesse hat, erwarteten wir Unterschiede in der Phosphorylation.

Zu den mit HT29-2 und HCT116-2 bezeichneten Proben wurde ein Phosphatase-Inhibitor hinzugefügt, der die Dephosphorylierung während der Zelllyse verhindert, damit nach der Probenvorbereitung der Phosphorylierungsgrad der Probe derselbe wie im lebenden System ist. Zu HT29-1 und HCT116-3 wurde kein Phosphatase-Inhibitor hinzugefügt.

Weiters wurden in der ersten Messreihe noch BNPP in unterschiedlichen Konzentrationen und zwei Blindproben (Blanks, hier NH_4HCO_3) zur Überprüfung des Messsystems gemessen.

Alle Proben wurden für 1000s gemessen. Die Elementverteilung innerhalb der Proben erschien homogen.

Wie in Tab. 8.1 zu sehen ist, weichen die Ergebnisse für die HT29- und die HCT116-Proben um zwei Größenordnungen von den erwarteten Werten ab, während die Ergebnisse der Kontrollproben die Erwartungen erfüllen.

¹⁴VITO – Flemish Institute for Technological Research NV

¹⁵Ein Gen wird als Wildtyp bezeichnet, wenn es in seinem durch die Evolution entstandenen Zustand vorliegt. Die Aufgabe des APC-Proteins ist es, den Zellzyklus zu kontrollieren und bei irreversiblen DNA-Schäden Apoptose auszulösen.

Nr	Probenname	erwartete P-Konzentration ($\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$)	gemessene P-Konzentration ($\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$)	gemessene S-Konzentration ($\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$)
1	Blank	–	0	0
2	HT29-1	0,892	207,1	139,4
3	HT29-2	1,08	257,3	194,2
4	HCT116-2	1	223,0	112,5
5	HCT116-3	1,2	175,1	118,0
6	BNPP $10 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$	10	7,8	0,3
7	BNPP $1 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$	1	0,89	0
8	BNPP 100ppb	0,1	0,11	0
9	HT29-1	0,892	206,2	137,9
10	HT29-2	1,08	316,6	175,7
11	HCT116-2	1	187,1	115,8
12	HCT116-3	1,2	179,3	111,6
13	Blank	–	0	0

Tabelle 8.1: Proben der ersten Messserie mit jeweils $9,09 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ Ti als internem Standard

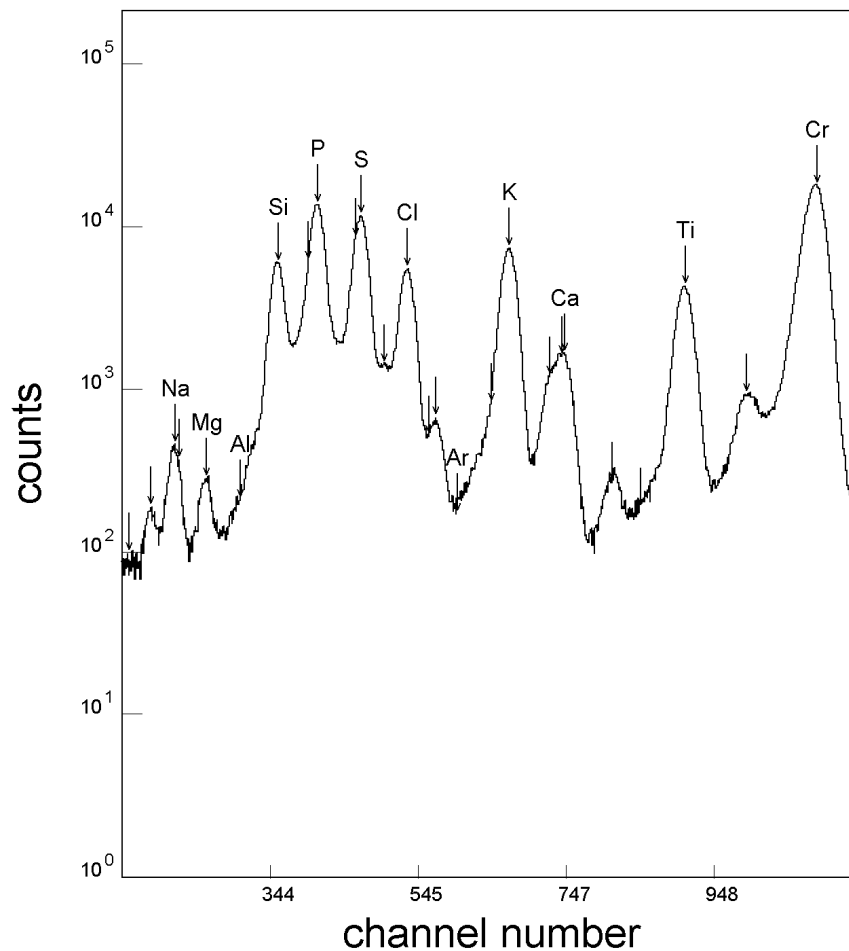


Abbildung 8.1: Spektrum der Probe 2 (HT29-1)

Es stellte sich heraus, dass die bei der Probenvorbereitung verwendeten Bufferlösungen Phos-

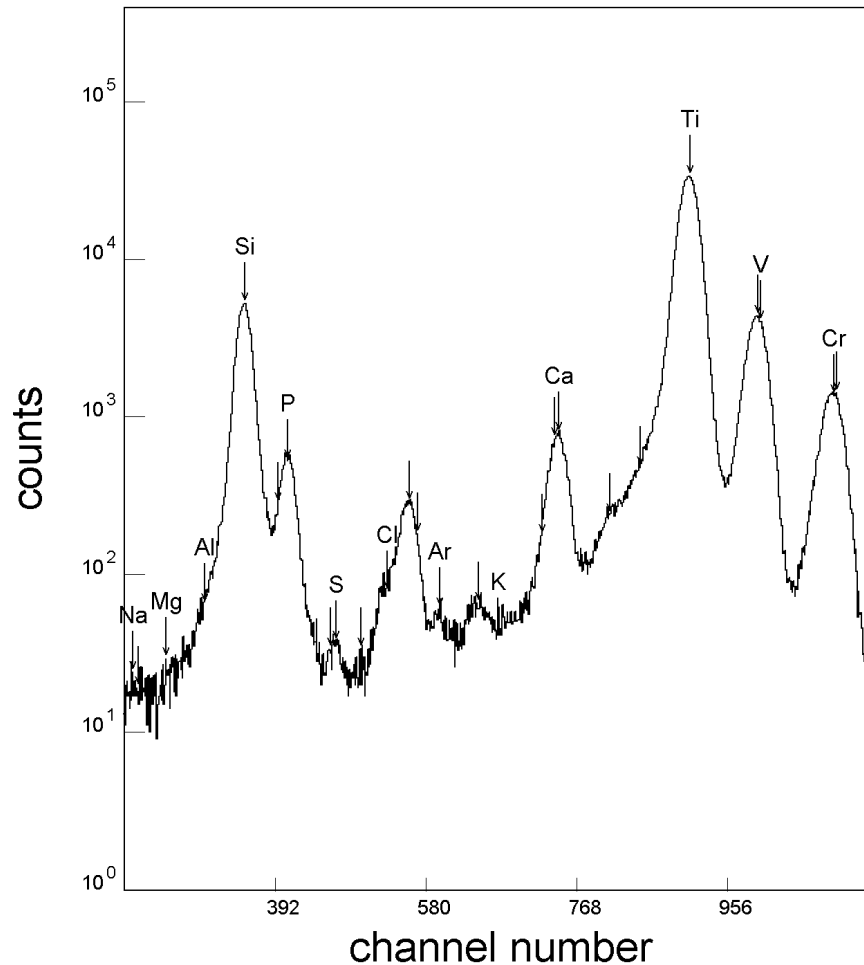


Abbildung 8.2: Spektrum der Probe 7 (BNPP $1 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$): Der Peak zwischen Cl und Ar ist der Ti-K_α Escape-Peak. Zwischen Ar und K sitzt der Ti-K_β Escape-Peak.

phor enthielten und dieser nicht, wie angenommen, bei einem späteren Reinigungsschritt wieder vollständig aus der Probe entfernt wurde.

Die für Probe 7 berechnete Nachweisgrenze für P betrug 73pg.

8.2 Zweite Messreihe

Es wurden anorganische Proben und BNPP in unterschiedlichen Konzentrationen, sowie eine β -Casein-Probe¹⁶ untersucht. Die erwarteten Konzentrationen sind in Tab. 8.2 zu sehen.

Jede Probe enthielt $10 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ Ti als internen Standard.

Beim Höhenscan zeigten einige Proben (1, 3, 4, 7, 8, 9, 11 und 13) zwei Intensitätsmaxima für den Ti-Peak bei unterschiedlichen Höhen. Dieser Effekt kann auf die Probengröße zurückgeführt werden. Die ringförmig getrockneten Proben scheinen zu groß zu sein, um

¹⁶ β -Casein ist ein Kuhmilchprotein. Es hat eine molare Masse von 25107Da und besteht aus 224 Aminosäuren. Es hat fünf Phosphorylierungsstätten (Aminosäure 30, 32, 33, 34 und 50). Diese sind alle Phosphoserine, also Esterbildungen bestehend aus der Aminosäure Serin und Phosphorsäure.

vom Detektor als Ganzes gesehen zu werden. Der Detektor sieht somit verschiedene Teile der Probe bei unterschiedlichen Höhen. Für ein paar Proben (1, 3 und 4) wurde an beiden Maxima gemessen.

Probennummer	Probe	Phosphor ($\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$)	Schwefel ($\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$)
1	anorg P+S	0,1	0,1
2	anorg P+S	1	1
3	anorg P+S	10	10
4	anorg P+S	10	10
5	anorg P+S	100	100
6	anorg P+S	1	1
7	BNPP	1	–
8	BNPP	50	–
9	BNPP	0,1	–
10	BNPP	1	–
11	BNPP	100	–
12	BNPP	10	–
13	β -Casein	20	20

Tabelle 8.2: erwartete Konzentrationen für die Proben der zweiten Messreihe

Für die Proben 4, 10 und 12 wurden Konzentrationsunterschiede von mehr als 30% für 4 und 12, sowie 67% für Probe 10 für die verschiedenen Messpositionen gefunden. Dies deutet auf eine inhomogene Probenverteilung hin.

Probe 5 zeigte beim Höhenscan zwei Intensitätsmaxima für Ti, jedoch nur ein Maximum für den P- und den S-Peak. Das Intensitätsmaximum für P und S lag zwischen den Ti-Maxima (s. Abb. 8.5). Nachdem der Quarzglasprobenträger um etwa 90° gedreht worden war, zeigte der Höhenscan ein Ti-Intensitätsmaximum, das zum S-Peak (und auch zum P-Peak) um etwa $30\mu\text{m}$ verschoben war (s. Abb. 8.7). Man kann anhand dieser beiden Höhenscans sehen, dass das Titan heterogen in der Probe verteilt ist. Diese ungleichmäßige Verteilung hat zur Folge, dass die Konzentration von P und S nicht eindeutig bestimmbar ist. Wie aus Abb. 8.6 und 8.8 zu sehen ist, erhält man aus den Höhenscans für P Konzentrationen zwischen $22,1$ und $71\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ und für S zwischen $15,9$ und $85,5\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$.

Der Abstand zwischen zwei benachbarten Scanpunkten betrug $10\mu\text{m}$.

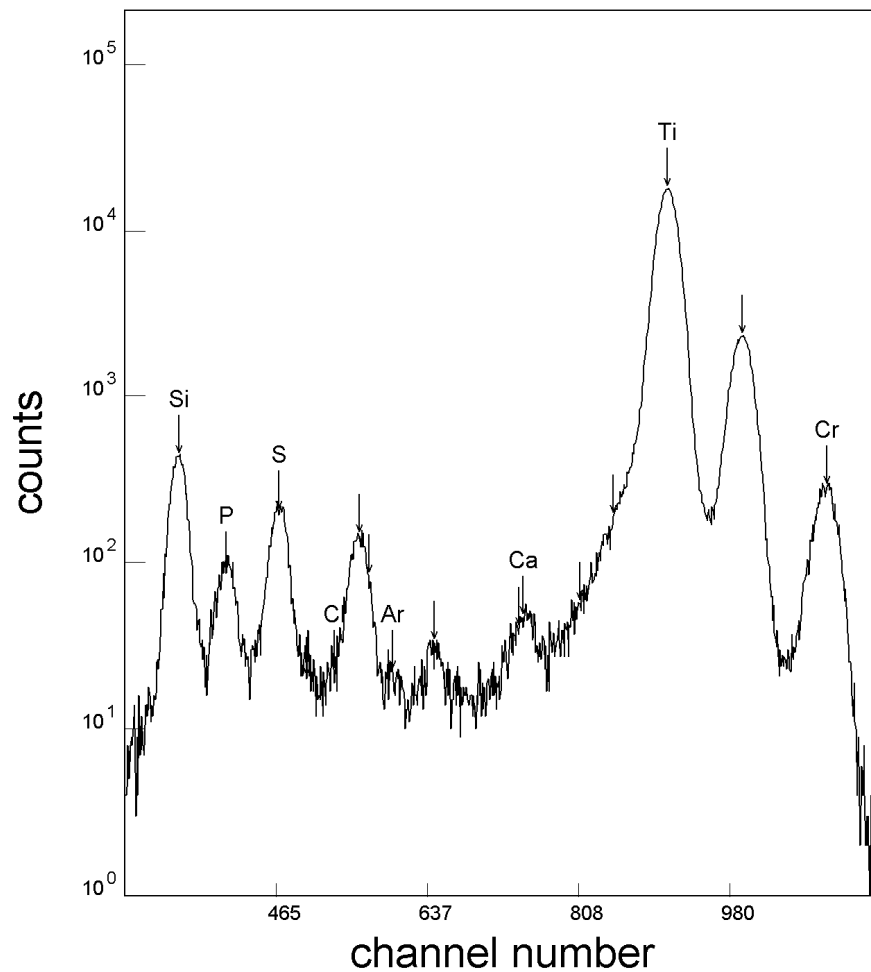


Abbildung 8.3: Spektrum der Probe 2: Der Peak zwischen Cl und Ar ist wieder der Ti- K_{α} Escape-Peak. Zwischen Ar und K sitzt der Ti- K_{β} Escape-Peak.

Da die Messung einiger Proben Inhomogenitäten in der Elementverteilung in der Probe gezeigt hatten, wurden die Proben noch einmal mit einem kommerziellen TXRF-Spektrometer, der Atomika 8030C, gemessen. Die Anregung erfolgte mittels der W- L_{β} -Linie. Die Messungen wurden unter He-Atmosphäre durchgeführt.

Der Vorteil dieses Spektrometers gegenüber unseren Low Z-Aufbaus ist die größere Detektorfläche (80mm^2). Wir erhofften uns dadurch, ein Spektrum der gesamte Probe zu sehen, so dass die heterogene Probenverteilung innerhalb der Probe keinen Einfluss mehr auf die bei der Auswertung erhaltenen Konzentrationen hat.

Ein Vergleich der Ergebnisse des Low Z Aufbaus und der Atomika 8030C sind in Tab. 8.4 zu sehen. Wie man sieht, liegen die Ergebnisse beider Messsysteme teilweise weit unter den Erwartungswerten, wobei die Ergebnisse des Low Z TXRF-Spektrometers im Allgemeinen etwas höher sind.

Die für Probe 9 (und bei der Atomika-Messung auch für Probe 12) gefundenen S-Peaks deuten auf eine Probenverunreinigung hin.

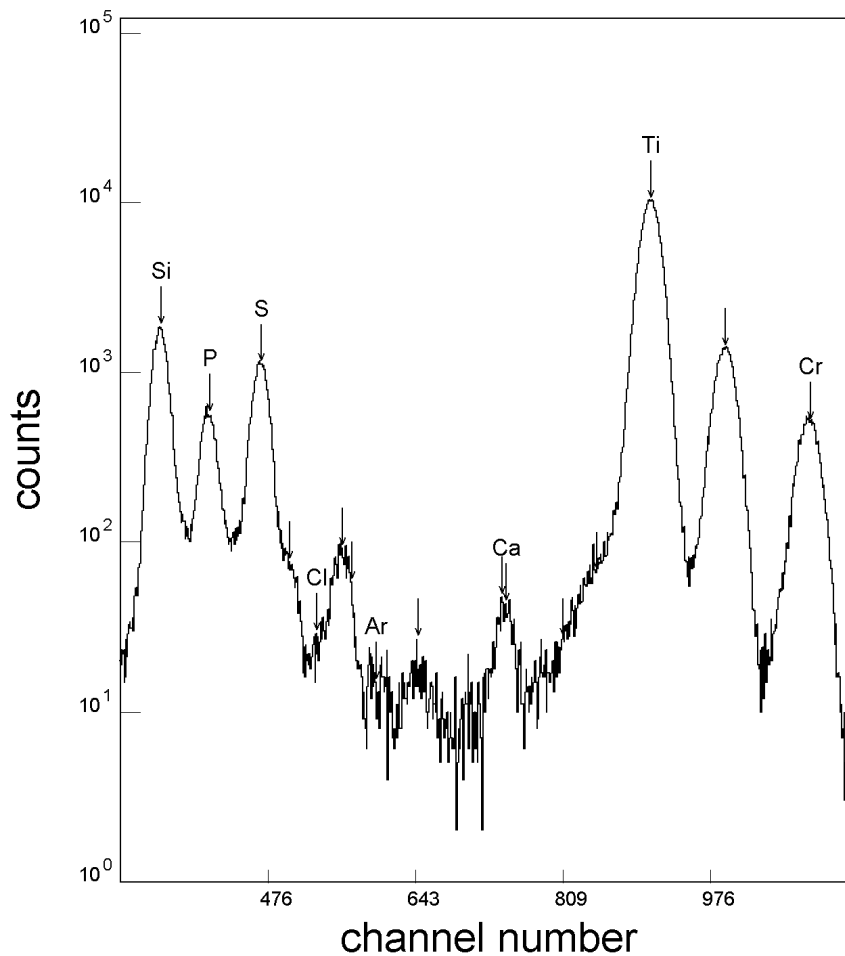


Abbildung 8.4: Spektrum der Probe 4: Auch in diesem Spektrum sind die Ti-Escape-Peaks zu sehen.

Die Abweichung der Low Z Ergebnisse von den erwarteten Konzentrationen ist in Tab. 8.5 zu sehen.

Die Nachweisgrenzen (Tab. 8.3) für diese Messreihe wurden aus den Ergebnissen der Probe 4 berechnet. Es wurde mit den aus der Messung erhaltenen Konzentrationen für P und S gerechnet.

Element	DL ₁₀₀₀ (pg)
P	33,5
S	18,5
Ti	4,6

Tabelle 8.3: Nachweisgrenzen für Probe 4

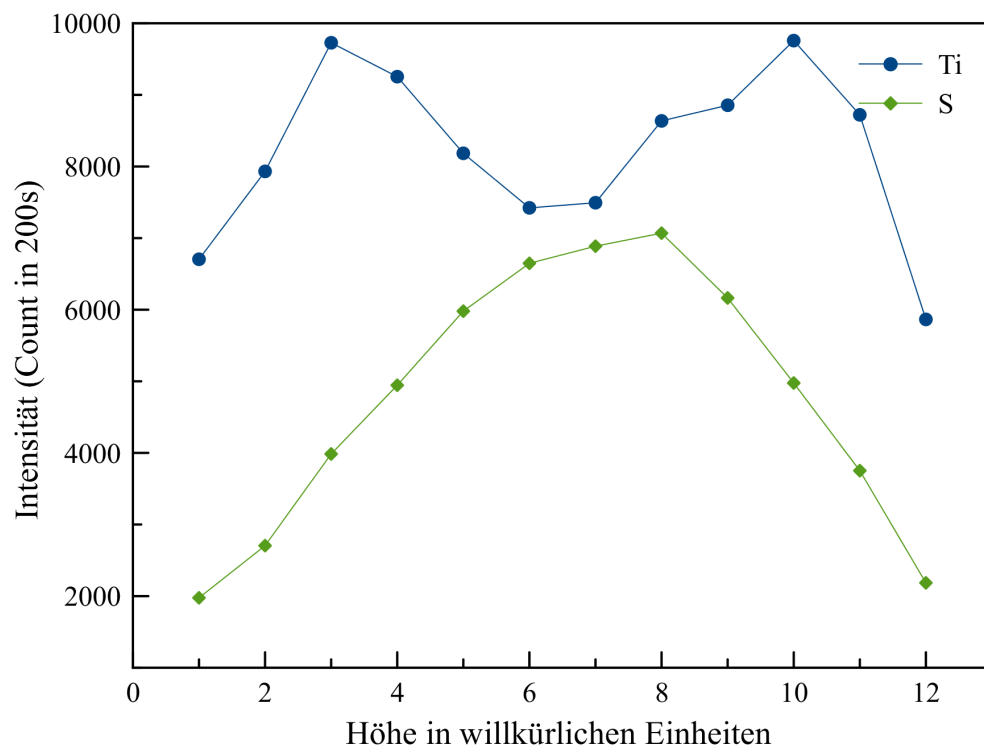


Abbildung 8.5: Höhenscan für die erste Messposition von Probe 5

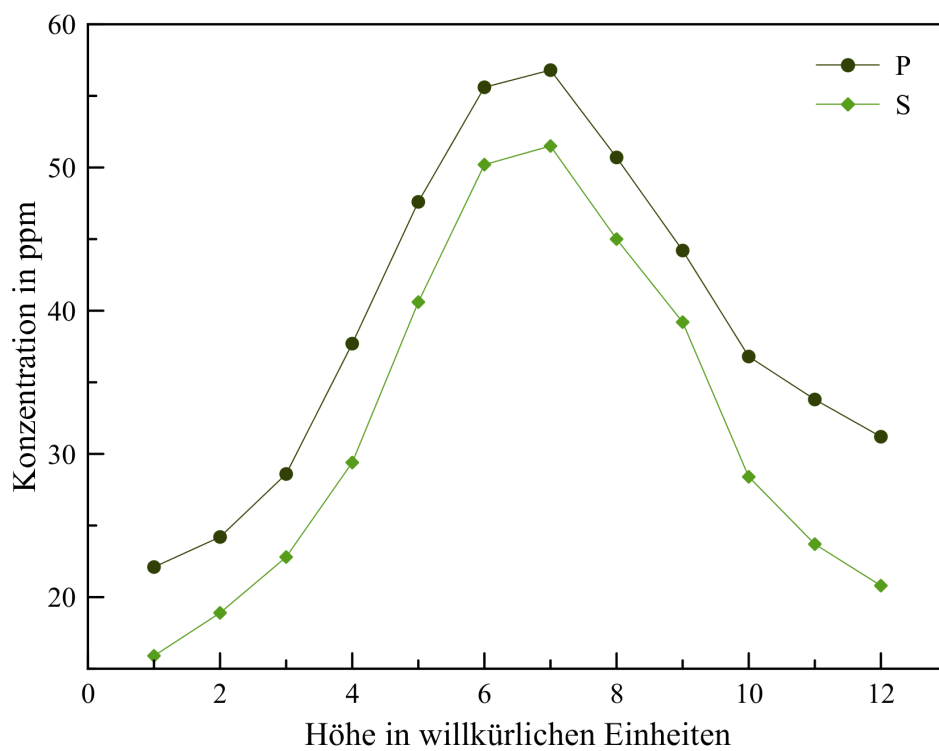


Abbildung 8.6: P- und S-Konzentration entlang des Höhenscans für die erste Messposition

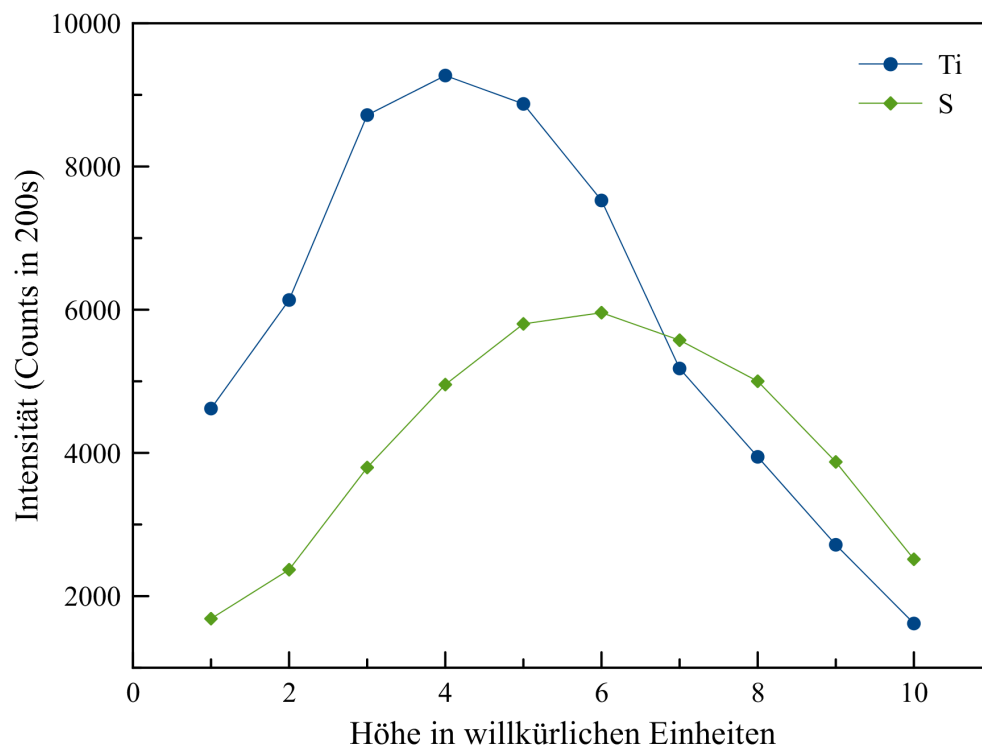


Abbildung 8.7: Höhenscan für die zweite Messposition von Probe 5

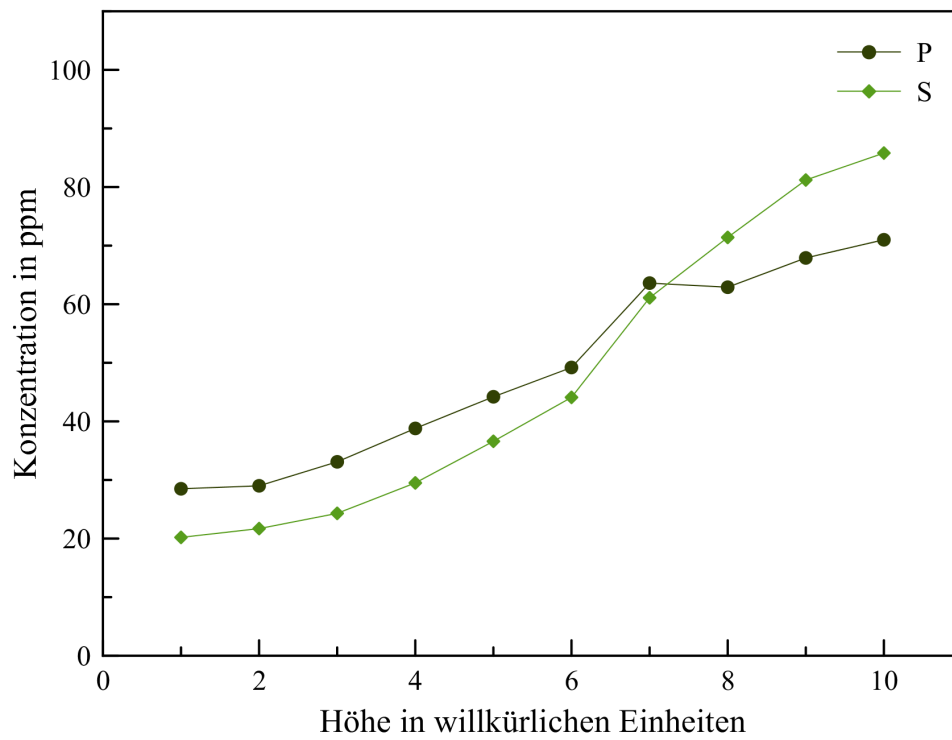


Abbildung 8.8: P- und S-Konzentration entlang des Höhenscans für die zweite Messposition

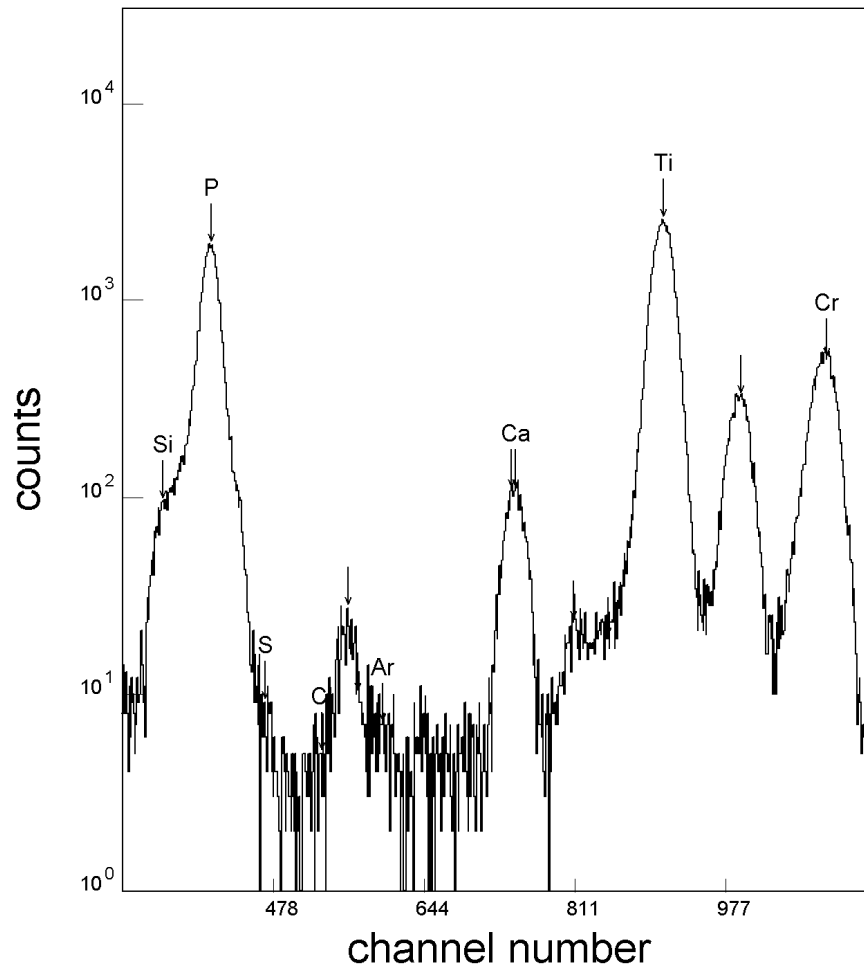


Abbildung 8.9: Spektrum der Probe 11

Probe	Low Z TXRF		Atomika 8030C		Abweichung	
	P ($\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$)	S ($\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$)	P ($\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$)	S ($\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$)	P (%)	S (%)
1	0	0	0	0	-	-
2	0,61	0,88	0,52	0,88	-14	0
3	6,04	5,47	4,18	4,41	-30,9	-19,5
4	4,92	5,64	4,06	4,37	-17,5	-22,3
5	22,1–71	15,9–85,8	19,06	17,23	–	–
6	0,60	0,86	0,65	0,47	8,2	-46
7	1,23	0	0,76	0	-38,5	–
8	35,99	0	27,38	0	-23,9	–
9	0,35	0,46	0	0,41	–	-10,5
10	0,76	0	0,87	0	14,3	–
11	63,17	0	44,54	0	-29,5	–
12	7,52	0	6,81	0,12	-9,4	–
13	8,57	11,80	6,0	9,55	-30	+24

Tabelle 8.4: Vergleich der Ergebnisse der zweiten Messreihe für Low Z Aufbau und Atomika 8030C

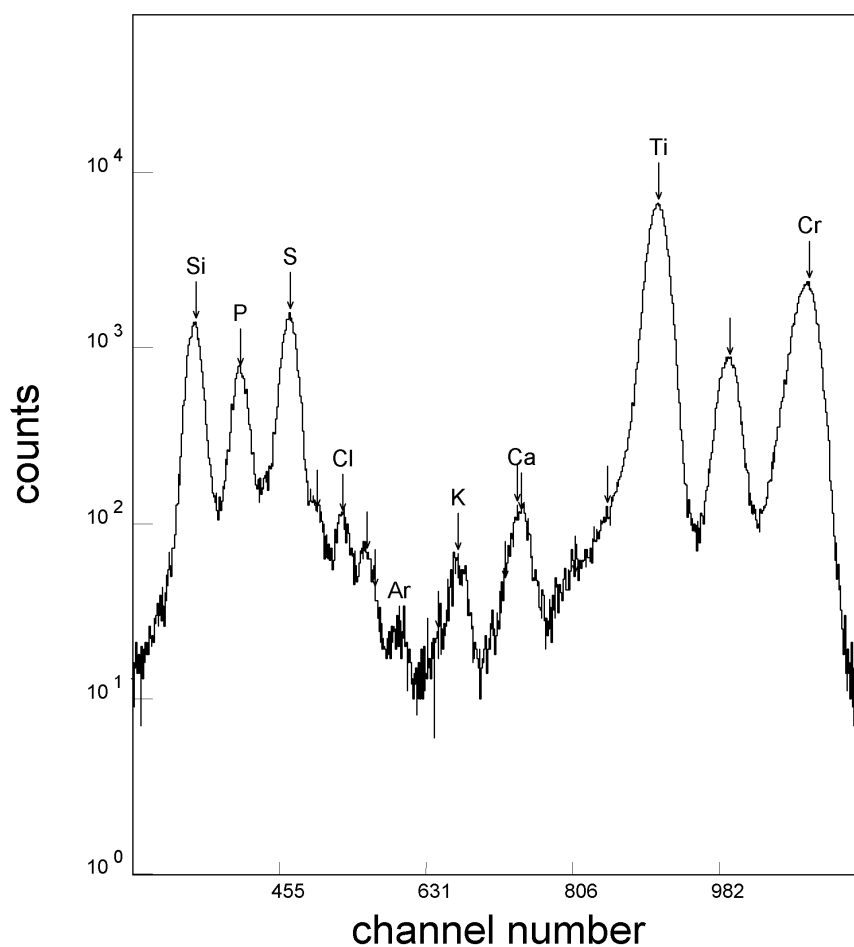


Abbildung 8.10: Spektrum der Probe 13

Probe	Erwartungswerte		Low Z TXRF		Abweichung	
	P ($\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$)	S ($\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$)	P ($\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$)	S ($\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$)	P (%)	S (%)
1	0,1	0,1	0	0	–	–
2	1	1	0,61	0,88	–39	–12
3	10	10	6,04	5,47	–40	–45
4	10	10	4,92	5,64	–51	–44
5	100	100	22,1–71	15,9–85,8	–	–
6	1	1	0,60	0,86	–40	–14
7	1	–	1,23	0	+23	–
8	50	–	35,99	0	–28	–
9	0,1	–	0,35	0,46	+250	–
10	1	–	0,76	0	–24	–
11	100	–	63,17	0	–37	–
12	10	–	7,52	0	–25	–
13	20	20	8,57	11,80	–57	–41

Tabelle 8.5: Abweichung der Low Z Ergebnisse von den erwarteten Konzentrationen

Die Auswertung der angelieferten Proben zeigten starke Abweichungen von den Erwartungswerten, die wir uns zum Teil nicht erklären können. So wurde in beiden Messreihen, wie auch

schon zur Validierung der Kalibrierung BNPP gemessen. Doch während die Validierung der am Atominstitut vorbereiteten Standardreferenzmaterialien (BNPP und Seronorm Trace Elements Serum L-2) gute Übereinstimmungen ergaben, wichen die Ist-Werte der BNPP-Proben der beiden Messreihen deutlich von den Soll-Werten ab. Diese Diskrepanzen erfordern weitere Erforschung.

9 Tausch des Si(Li)-Detektors gegen einen SDD



Abbildung 9.1: Vakuumkammer nach dem Umbau

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der bisher im Low Z-Spektrometer verwendete Si(Li)-Detektor durch einen Siliziumdriftdetektor ersetzt. Die Vorteile des SD-Detektors gegenüber dem Si(Li)-Detektor wurden bereits in Kap. 4.3.1 aufgezählt. Der verwendete Detektor ist ein Ketek VIAMP mit 20mm^2 Detektorfläche, einer Chipdicke von $450\mu\text{m}$ und einem 300nm dicken Polymer-Fenster (AP3.3 s. Abb. 4.6). Auch der verwendete digitale Pulsprozessor stammt von Ketek.

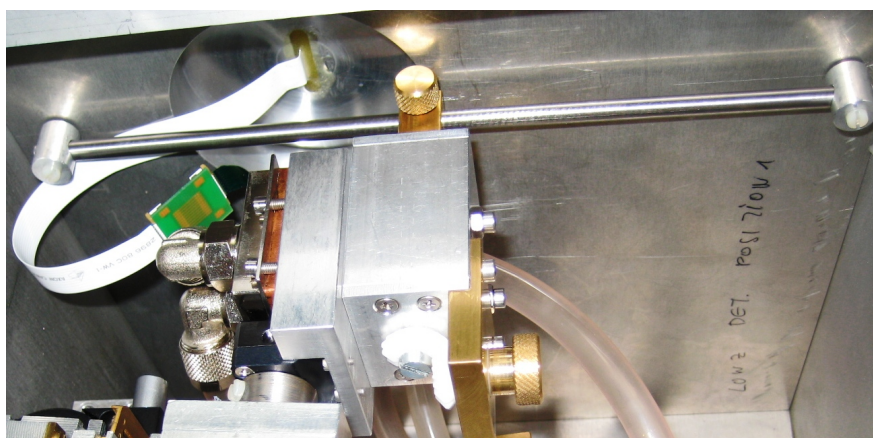


Abbildung 9.2: Neue Detektorhalterung

Da der Detektor durch seine kleines Design (s. Anhang A.2) und sein leichtes Gewicht sehr handlich ist, konnte eine Halterung konstruiert werden, die es erlaubt die Detektorposition

sowohl vertikal wie auch horizontal zu verändern. Die Baupläne für diese Halterung sind im Anhang A.3 zu sehen.

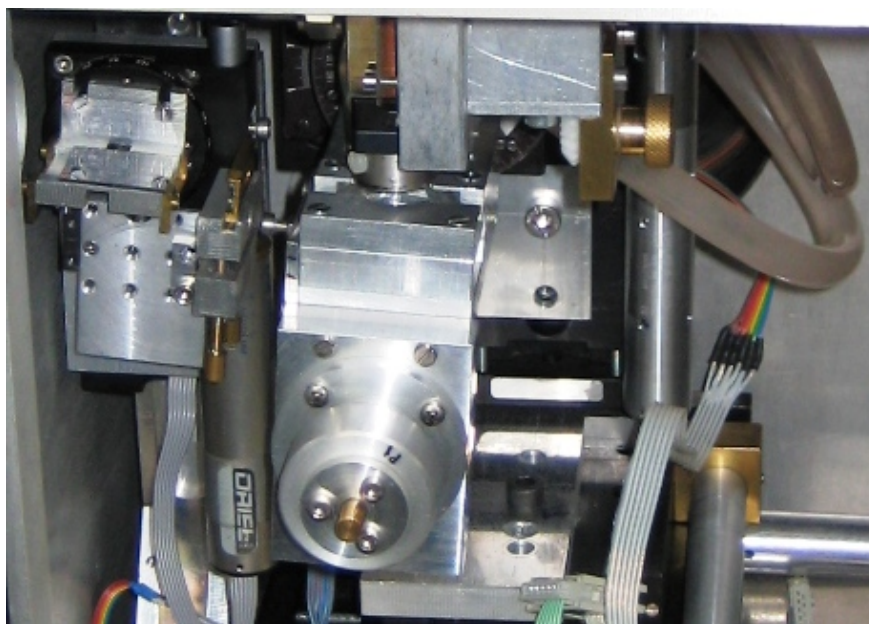


Abbildung 9.3: Messanordnung

Horizontal lässt sich die Position des Detektor über eine 22cm lange Schiene (s. Abb. 9.2) einstellen und mit einer Schraube fixieren. In der Höhe kann der Detektor über ein Kegelräder-Schraubensystem um 4cm variiert werden, weitere 1,5cm können erreicht werden, wenn der Al-Block statt an den oberen an den unteren Gewinden des in den Plänen als Teil 1 bezeichneten Bauteils montiert wird.

Die Detektorposition kann nun der Probengröße angepasst werden. Durch horizontales Verschieben des Detektors und Drehen der Probe kann praktisch jede beliebige Position auf der Probe gemessen werden. Dies ist besonders für die Messung von 200mm Si-Wafern, die ebenfalls mit diesem Aufbau durchgeführt werden können von Bedeutung.

Da das Peltierelement des SD-Detektors seine Wärme im Vakuum nicht abgeben kann, wurde eine Wasserkühlung in die Messkammer eingebaut. Dafür wurde an die heiße Seite des Peltierelements ein CPU-Kühlkörper angebracht und über Wasserschläuche mit einem CPU-Kühler und einer Aquariumpumpe (s. Abb. 9.4) und einem Radiator verbunden. Dadurch ist der Detektor im Vakuum vor Überhitzung geschützt. Außerdem erlaubt uns die Wasserkühlung, sowohl in Luft wie auch unter Vakuumbedingungen bei konstanter Temperatur zu messen.

Während diesen Umbau wurde das „Low Z TXRF“-Messsystem vom „Grazing Incidence XRF“-Messsystem getrennt. Bis dahin wurden die Motoren der beiden Anlagen mit denselben Controllern gesteuert. Dadurch konnten die beiden Systeme nicht gleichzeitig betrieben



Abbildung 9.4: Die im Aufbau verwendete Pumpe und der Radiator

werden.

Für die Messungen mit dem SDD wurden dieselbe Elektronenfalle, wie für den Si(Li)-Detektor verwendet (s. Kap. 6).

Für die Energieauflösung garantiert Ketek eine Peakhalbwertsbreite $< 139\text{eV}$ bei $5,9\text{keV}$. Für Messungen mit einer ^{55}Fe -Quelle wurden für den Mn- K_α -Peak ($5,9\text{keV}$) eine Energieauflösung von 131eV erhalten.

Um die relativen Empfindlichkeiten des SDD bestimmen zu können, wurde mit denselben Proben (s. Tab. 7.1) wie schon für den Si(Li)-Detektor eine Kalibrierung (Abb. 9.6–9.11) erstellt. Die aus den Steigungen der Kalibriergeraden abgelesenen relativen Empfindlichkeiten sind in Abb. 9.12 über die Ordnungszahlen aufgetragen.

Wie man aus Tab. 9.12 sieht, sind die relativen Empfindlichkeiten für den SD-Detektor etwas geringer als für den Si(Li)-Detektor.

Abb. 9.13 vergleicht die Empfindlichkeiten des SiLi- und des SD-Detektors für die $24\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ NaF-Kalibrierprobe. Dafür wurden die Empfindlichkeiten gemäß:

$$S = \frac{\text{Zahlrate in cps}}{\text{Masse in ng}} \quad (65)$$

berechnet. Man sieht, dass die Empfindlichkeiten des SD-Detektors etwa eine Größenordnung über denen des Si(Li)-Detektors liegen.

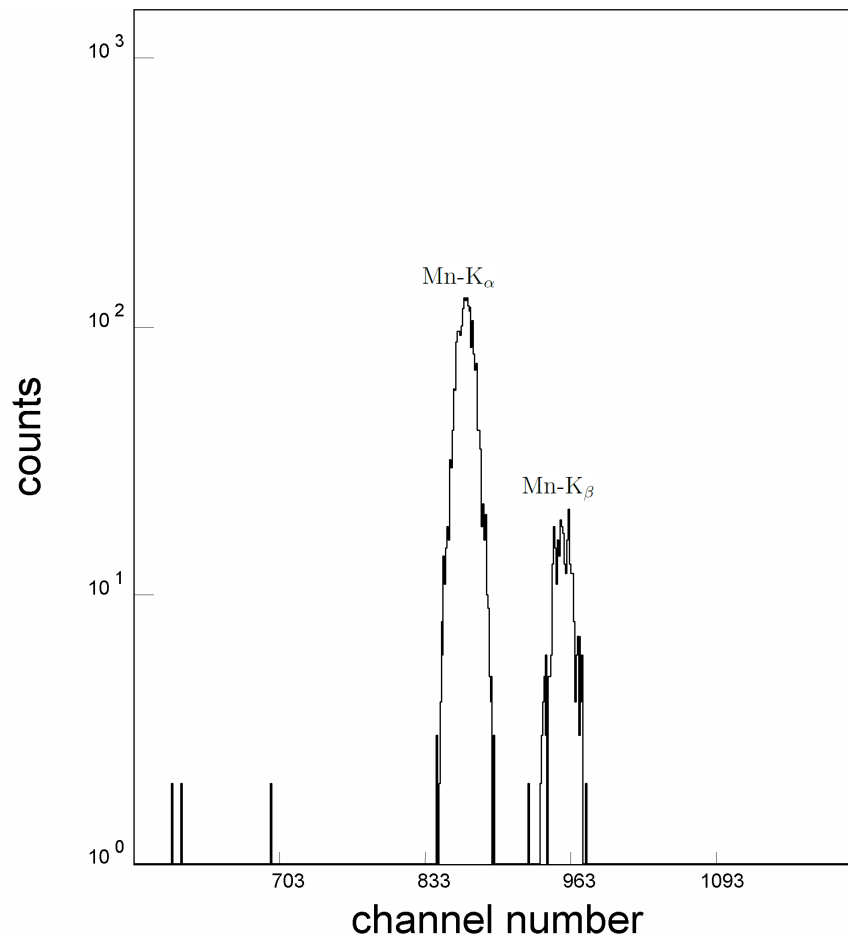


Abbildung 9.5: Spektrum der ^{55}Fe -Quelle

In Abb. 9.14 werden die Spektren der $24\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ Na-Kalibrierprobe für den SD- und den Si(Li)-Detektor verglichen. Wie man sieht, ist die Zählrate für den SDD deutlich höher.

Die Nachweisgrenzen für den SD-Detektor wurden mit den Nachweisgrenzen für den früher verwendeten Si(Li)-Detektor verglichen. Tabelle 9.2 zeigt, dass die Nachweisgrenzen für F und Na deutlich unter den älteren Werten liegen. Die Werte für Mg und Al sind etwas höher als die Werte des vorigen Aufbaus.

Es war möglich, mit diesem Aufbau auch Kohlenstoff zu messen. Aufgrund eines elektronischen Störsignals knapp unterhalb des C-Peaks ist jedoch die Nachweisgrenze (117ng) sehr hoch.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass für den SDD bessere Intensitäten erreicht werden können und dadurch zum Teil deutlich bessere Nachweisgrenzen erhalten werden. So zeigte F eine Verbesserung der Nachweisgrenze um 43%. Grund für diese besseren Intensitäten ist der geringe Abstand zwischen Detektorchip und Fenster, der zu einem kleineren Abstand zwischen Chip und Probe führt. Die bessere Energieauflösung wird durch die kleinst

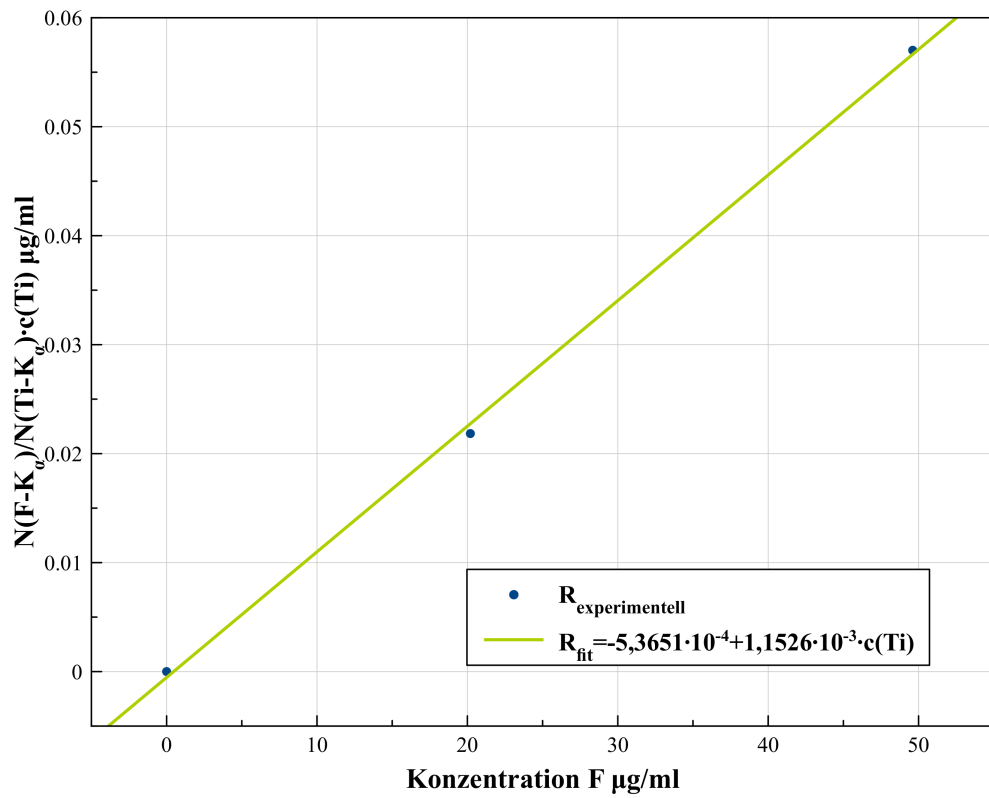


Abbildung 9.6: Fluor-Kalibrierkurve für den SDD

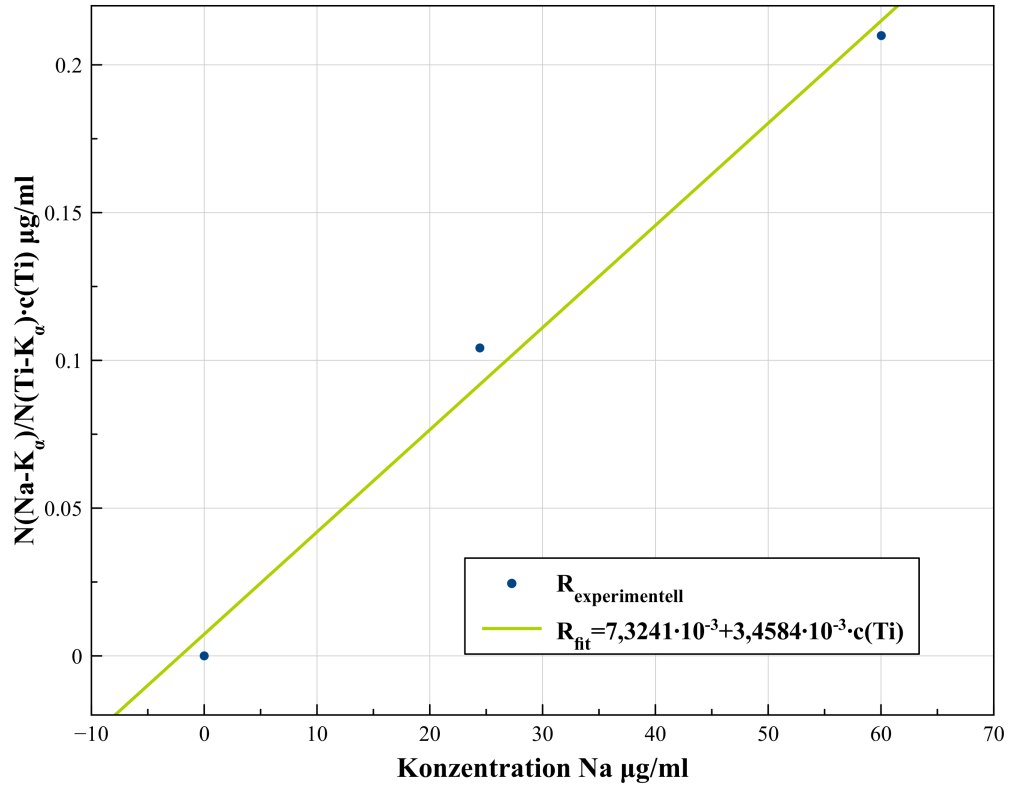


Abbildung 9.7: Natrium-Kalibrierkurve für den SDD

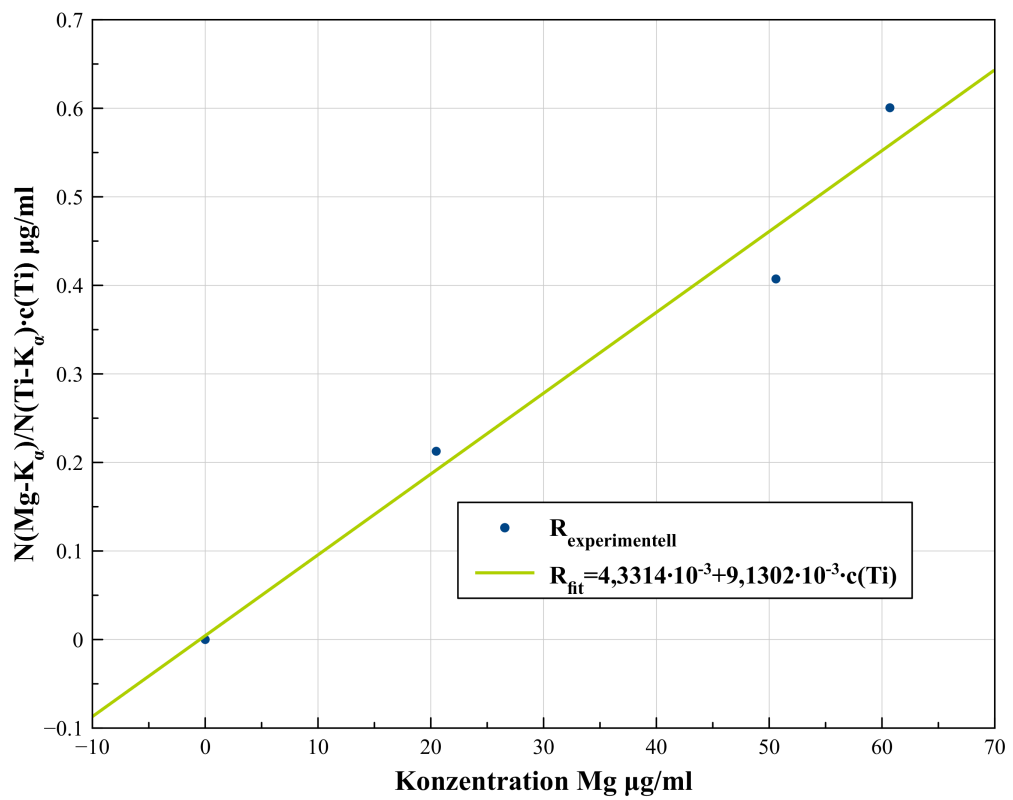


Abbildung 9.8: Magnesium-Kalibrierkurve für den SDD

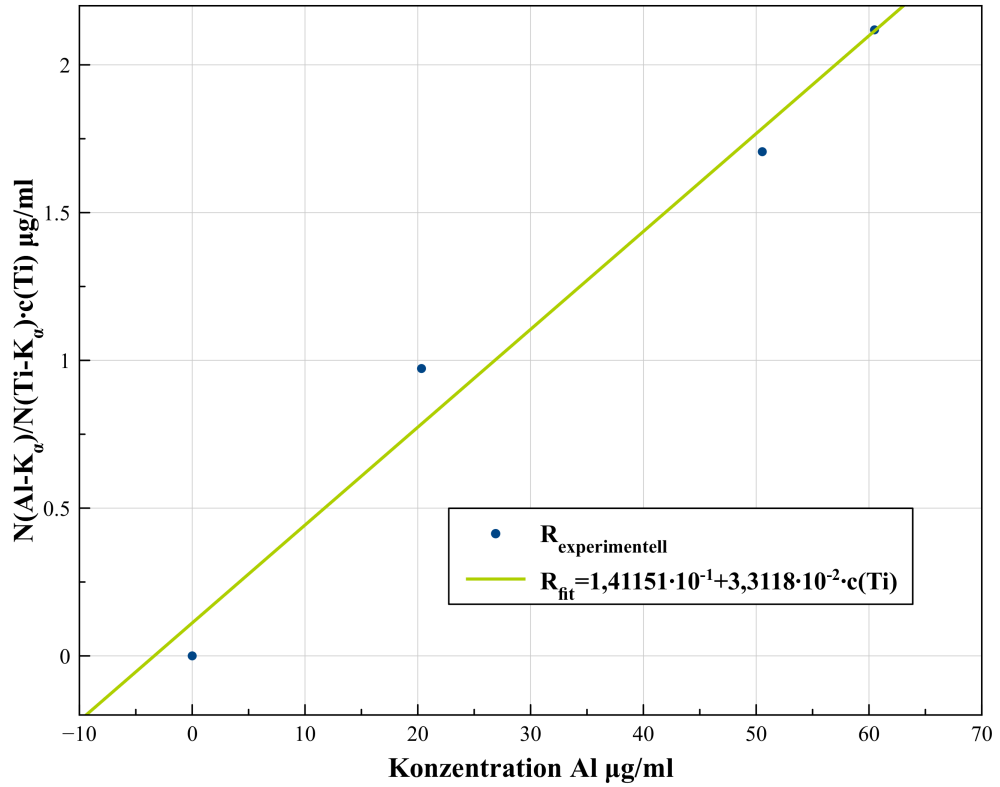


Abbildung 9.9: Aluminium-Kalibrierkurve für den SDD

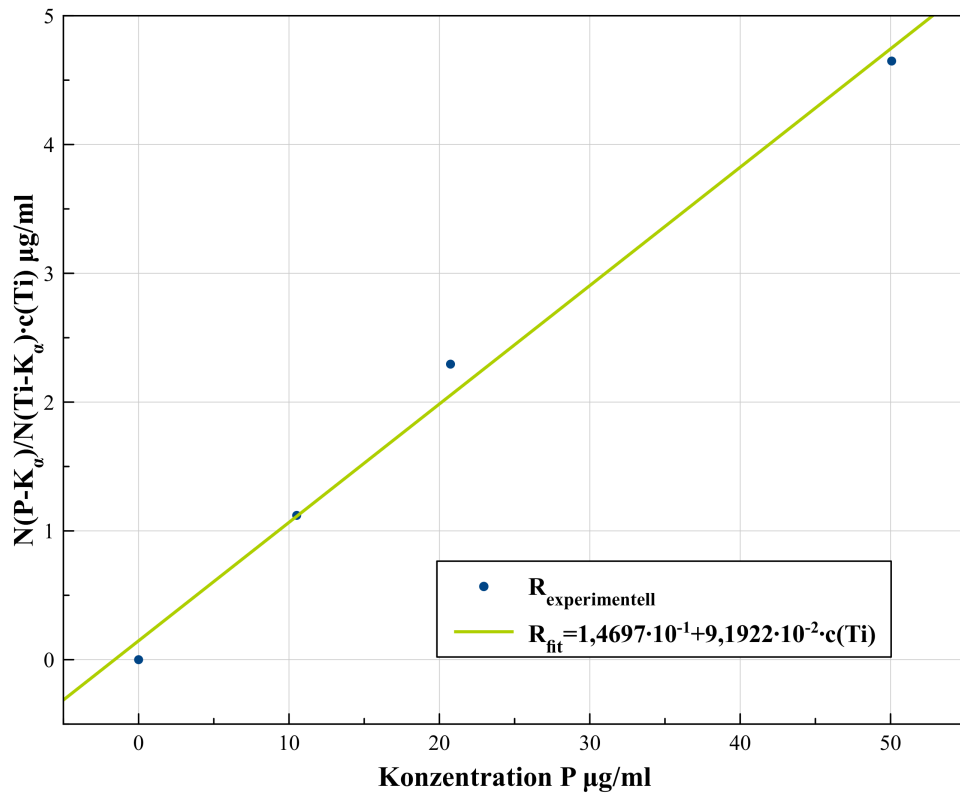


Abbildung 9.10: Phosphor-Kalibrierkurve für den SDD

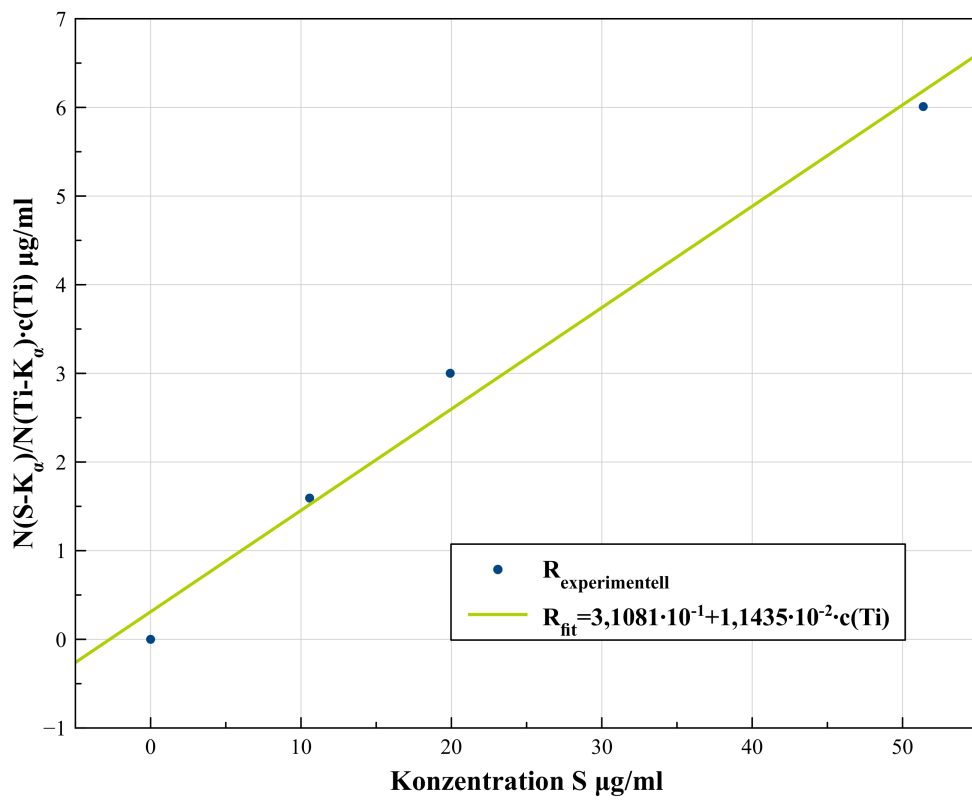


Abbildung 9.11: Schwefel-Kalibrierkurve für den SDD

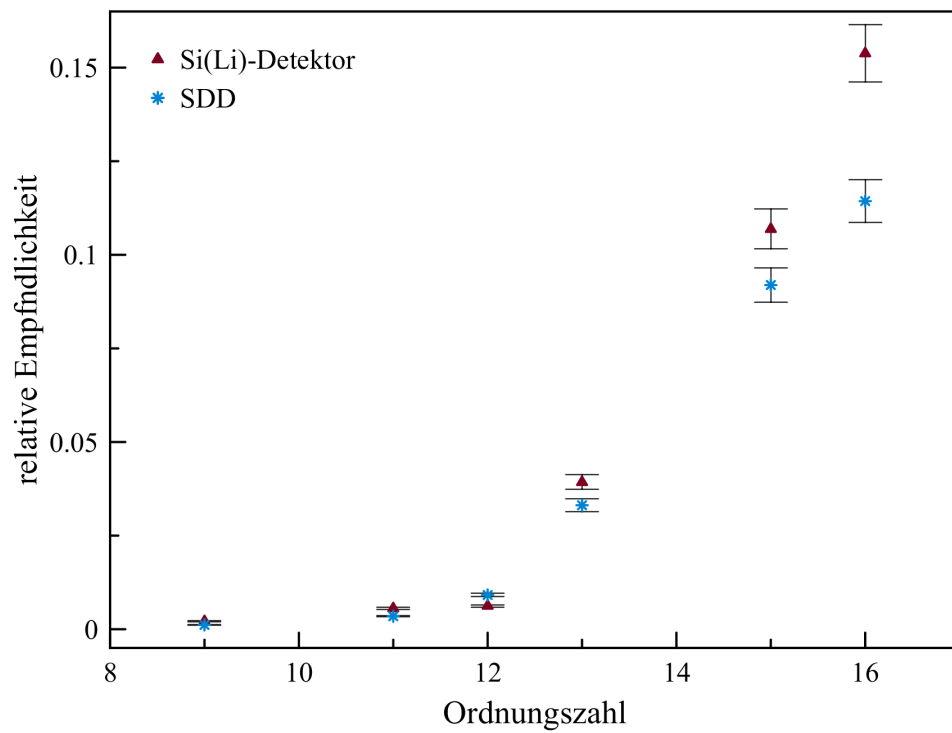


Abbildung 9.12: Vergleich der relativen Empfindlichkeiten für den Si(Li)- und den SD-Detektor

Dimensionierung der Sammelelektrode, die zu einer Verminderung des Rauschens führt, erreicht. Zur Kühlung des Siliziumdriftdetektors ist kein Stickstoff mehr nötig. Mit der neuen Detektorhalterung lassen sich große Flächen abscannen und es kann praktisch auf jedem Punkt der Probe gemessen werden.

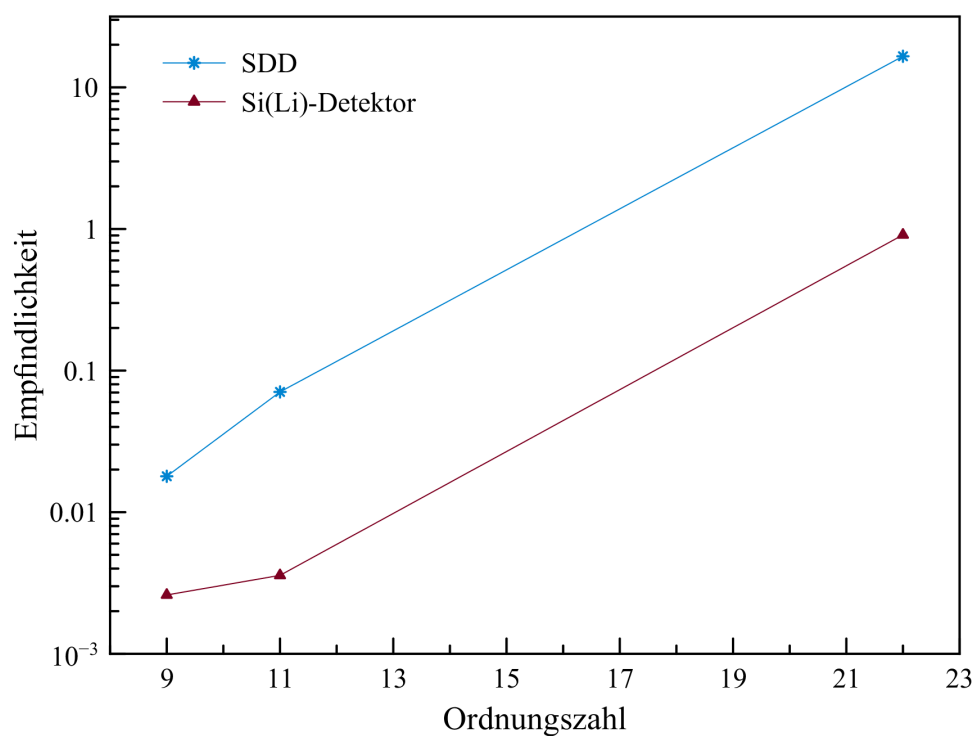


Abbildung 9.13: Vergleich der Empfindlichkeiten für den Si(Li)- und den SDD für die NaF-Kalibrierproben

Element	relative Empfindlichkeiten	
	SDD	Si(Li)-Detektor
F	$1,15 \cdot 10^{-3} \pm 5,77 \cdot 10^{-5}$	$2,11 \cdot 10^{-3} \pm 1,06 \cdot 10^{-4}$
Na	$3,46 \cdot 10^{-3} \pm 1,73 \cdot 10^{-4}$	$5,55 \cdot 10^{-3} \pm 2,78 \cdot 10^{-4}$
Mg	$9,13 \cdot 10^{-3} \pm 4,57 \cdot 10^{-4}$	$6,23 \cdot 10^{-3} \pm 3,12 \cdot 10^{-4}$
Al	$3,31 \cdot 10^{-2} \pm 1,66 \cdot 10^{-3}$	$3,93 \cdot 10^{-2} \pm 1,96 \cdot 10^{-3}$
P	$9,19 \cdot 10^{-2} \pm 4,60 \cdot 10^{-3}$	$1,07 \cdot 10^{-1} \pm 5,34 \cdot 10^{-3}$
S	$1,14 \cdot 10^{-1} \pm 5,72 \cdot 10^{-3}$	$1,54 \cdot 10^{-1} \pm 7,69 \cdot 10^{-3}$

Tabelle 9.1: Relative Empfindlichkeiten für den SDD

Element	Nachweisgrenze (pg)	
	SDD	Si(Li)-Detektor (früherer Aufbau [44, für F–Al]) und [45, für P und Ti]
F	493	870
Na	201	230
Mg	196	180
Al	134	120
P	48	19
S	36	–
Ti	0,3	3

Tabelle 9.2: Vergleich der Nachweisgrenzen

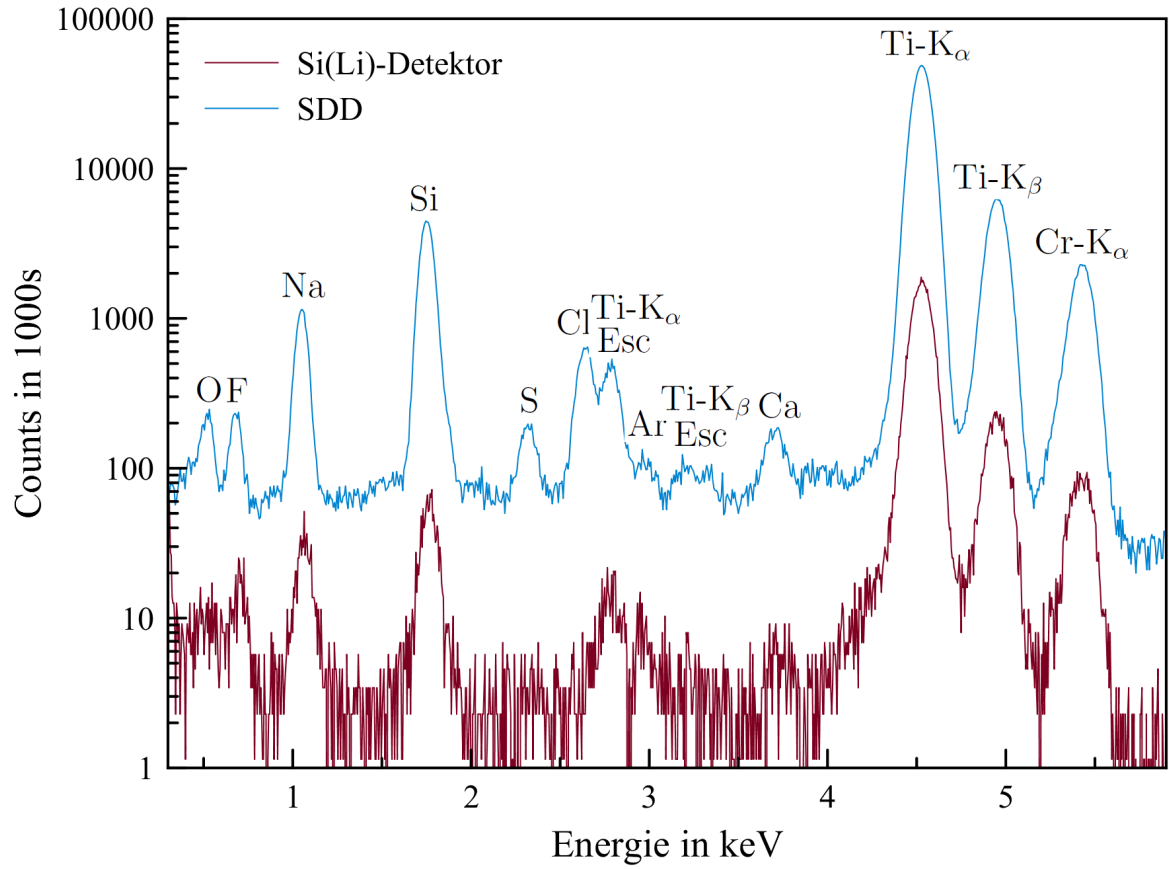


Abbildung 9.14: Vergleich des $24\mu\text{g}$ Na-Spektrums für den SD- und den Si(Li)-Detektor. Beide Spektren sind auf 1000s normiert.

Element	Si(Li)-Detektor		SDD	
	Nettocounts	Hintergrund	Nettocounts	Hintergrund
O	112	56	1552	1329
F	227	58	1694	1233
Na	519	60	12599	1260
S	1	75	2264	1411
Cl-K $_{\alpha}$	10	79	8825	1517
Ti-K $_{\alpha}$ Escape	289	81	6112	1527
Ca	53	93	1700	2156
Ti-K $_{\alpha}$	42131	101	891287	3339
Ti-K $_{\beta}$	5779	107	121698	3746

Tabelle 9.3: Vergleich der Nettocounts und des Hintergrunds für die Na-Spektren (Abb. 9.14). Die Werte für den Si(Li)-Detektor sind auf 875s normiert, die des SDD auf 1000s.

10 Zusammenfassung und Ausblick

Diese Arbeit hatte zum Ziel, die Anwendung der TXRF zur Bestimmung des P/S-Verhältnisses in Proteinen zu untersuchen. Weiters sollte durch die Konstruktion einer neuen Probenhalterung der Probenwechselaufwand reduziert und stabilisiert werden, sowie der Si(Li)-Detektor durch einen SDD mit verbesserter interner Geometrie und Energieauflösung ersetzt werden.

Daher wurden die relativen Empfindlichkeiten der Element F bis S bezüglich eines internen Standards (Ti) bei Cr-K $_{\alpha}$ -Anregung bestimmt. Diese Kalibrierung wurde anschließend mit organischen Standardproben (Seronorm Trace Elements Serum L-2 und Bis(4-nitrophenyl)hydrogenphosphat) kontrolliert. Die Abweichungen der gemessenen P- und S-Werte war $< 14\%$ bei Probenkonzentrationen in $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$.

Die BNPP-Proben der ersten und zweiten Messreihe zeigten bereits größere Abweichungen. Unter Vernachlässigung der 0,1ppm-Probe sind die Abweichungen dieser Proben von den P-Erwartungswerten zwischen 11 und 37%.

Diese Werte könnten durch Einwiegen der Proben und Standards anstelle des reinen Pipettierens bei der Vorbereitung verbessert werden.

An den Ergebnissen der anorganischen ICP-Standards für P und S (Proben 1–6 der zweiten Messreihe) zeigte sich, dass die Probenvorbereitung wohl komplizierter ist als ursprünglich angenommen. Die P-Werte zeigten hier Abweichungen $>40\%$, während die S-Konzentrationen zwischen 12 und 45% von den Erwartungswerten abwichen.

Es konnte für die zweite Messreihe sowohl eine inhomogene Verteilung von P und S innerhalb der Proben (Probe 4, 10, 12), als auch eine inhomogene Verteilung des internen Standards in Probe 5 nachgewiesen werden.

Diese Effekte beruhen vermutlich auf einer schlechten Tröpfchenbildung auf dem Quarzglas.

Die aufgrund des ineffizienten Reinigungsschrittes unerwartet hohen Werte für die Proteinproben der ersten Messreihe (HT29 und HTC116) zeigten, dass auch die Herstellung der Proteinproben schwieriger als erwartet ist.

Trotz der zum Teil nicht den Erwartungen entsprechenden Messergebnisse der Realproben konnte gezeigt werden, dass sich die TXRF-Analyse zur Untersuchung von P/S-Verhältnissen eignet. Aufgrund der guten Nachweisgrenzen für P (34pg) und S (19pg) sollten nicht nur ganze Proteine, sondern auch Proteinteilstücke (mit niedrigeren Konzentrationen) mittels TXRF analysierbar sein. Dies würde neben einer Konzentrationsbestimmung der Phosphorylierung auch eine Ortsbestimmung der Phosphatgruppen erlauben.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der TXRF-Aufbau außerdem softwaremäßig vollständig vom GI-Aufbau getrennt und stellt jetzt ein vollkommen unabhängiges Messsystem dar.

Durch die neue Probenhalterung muss das System nicht nach jedem Probenwechsel neu justiert werden. Weiters können Höhen- und Winkelscans durchgeführt werden.

Der neue SD-Detektor hat im Vergleich zum Si(Li)-Detektor um eine um etwa eine Größenordnung höhere Empfindlichkeiten, diese werden auch durch die deutlich höhere Zählraten dokumentiert.

Der Tausch des Si(Li)-Detektors gegen SDD ermöglichte eine Verbesserung der Nachweisgrenze für F (493pg) um 43%. Die Nachweisgrenzen der anderen Elemente (Na:201pg, Mg:196pg, Al:134pg, P:53pg, S:36pg) waren den alten Werten ähnlich.

Die gute Nachweisgrenze für Fluor wie auch die Tatsache, dass C mit dem SDD messbar ist, lassen hoffen, dass sich die Nachweisgrenze für Kohlenstoff durch intensivere Auseinandersetzung mit dem Rauschpeak noch deutlich verbessern lässt.

Der Low Z-Aufbau könnte noch durch eine in der Vakuumkammer angebrachte Kamera verbessert werden. Diese Kamera wäre auf den Strahl gerichtet und würde so die Justierung erleichtern. Um das Einbrennen des Strahls zu verhindern, müsste sie so montiert sein, dass sie nach dem Justiervorgang abgeschirmt werden kann.

Tabellenverzeichnis

2.1	Anzahl und Verteilung der Orbitale	5
2.2	Bezeichnungen der Elektronenschalen und maximale Besetzungszahlen	5
2.3	Siegbahn- und IUPAC-Notation für Emissionslinien	8
2.4	Wirkungsgrad unterschiedlicher Anodenmaterialien	12
3.1	Vergleich von WDXRF und EDXRF	20
3.2	Fluoreszenzausbeuten leichter Elemente [25]	33
6.1	Die im Aufbau verwendeten Komponenten	48
7.1	Eingewogene Kalibrierproben	53
7.2	Erwartete und erhaltene Konzentrationen der Serum-Messungen	58
7.3	Vergleich der erwarteten und erhaltenen Konzentrationen der BNPP-Messungen	59
7.4	Vergleich der erwarteten und erhaltenen Konzentrationen für Na, Mg und Al	60
8.1	Proben der ersten Messserie	62
8.2	Erwartete Konzentrationen für die Proben der zweiten Messreihe	64
8.3	Nachweisgrenzen für Probe 4	66
8.4	Vergleich der Ergebnisse der zweiten Messreihe	69
8.5	Abweichung der Low Z Ergebnisse von den erwarteten Konzentrationen . . .	70
9.1	Relative Empfindlichkeiten für den SDD	80
9.2	Vergleich der Nachweisgrenzen	80
9.3	Vergleich der Nettocounts und des Hintergrunds für die Na-Spektren	81

Abbildungsverzeichnis

2.1	Röntgenspektrum mit kontinuierlichen Anteil und charakteristischen Linien .	3
2.2	Entstehung der charakteristischen Röntgenstrahlung	6
2.3	Elektronen-Energieniveauschema für ein schweres Atom	7
2.4	Moseleys Gesetz	9
2.5	Fluoreszenzausbeute	9
2.6	Entstehung der Bremsstrahlung	10
2.7	Bremsspektrum einer Wolframanode	10
2.8	Schematischer Aufbau einer Röntgenröhre	11
2.9	Energieabhängigkeit der Richtungsverteilung der Bremsstrahlung	11
2.10	Comptoneffekt als Stoßprozess	13
2.11	Wechselwirkungswahrscheinlichkeiten	14
2.12	Energieabhängigkeit des Massen-Photoabsorptionskoeffizient für Phosphor .	15
2.13	Massenschwächungskoeffizienten	16
3.1	WDXRF	19
3.2	EDXRF	19
3.3	Geometrieüberlegung zur Fluoreszenzintensität	20

3.4	TXRF	24
3.5	Totalreflexion von Wellen	25
3.6	Reflektivität gegen Einfallswinkel	27
3.7	Eindringtiefen bei verschiedene Energien	28
3.8	Stehendes Wellenfeld zwischen einfallender und reflektierter Röntgenstrahlung	29
3.9	Intensität bei verschiedenen Einfallswinkeln in und oberhalb einer Si-Schicht	30
3.10	Winkelabhängigkeiten des Fluoreszenzsignals	31
3.11	Spektrum von Nist 1643e	32
3.12	Photoelektrischer Absorptionskoeffizient für Na	33
3.13	Photoelektrischer Absorptionskoeffizient für S	34
4.1	Ladungsträgerverarmungszone ohne und mit äußerer Gegenspannung	35
4.2	Schema eines Si(Li)-Detektors	36
4.3	Schema eines Siliziumdriftdetektors	38
4.5	Theoretischer Wirkungsgrad eines Si(Li)- und eines Ge-Detektors	40
4.6	Transmission durch das AP3.3 ultradünne Fenster der Firma Moxtek	41
5.1	Allgemeine Form der α -L-Aminosäuren	43
5.2	Polypeptide	43
5.3	Die wichtigsten proteinogenen Aminosäuren	44
5.4	Polypeptidkette	45
6.1	Außenansicht der ATI Low Z TXRF Kammer	47
6.2	Schema des Low Z Spektrometers	47
6.3	Alte Probenhalterung	49
6.4	Seitenansicht der neue Probenhalterung	49
6.5	Probenführung	49
6.6	Dreidimensionales Schema der Probenhalterung	49
6.7	Strahlengang	50
6.8	Messaufbau	50
6.9	Winkelscan einer 51ppm S Kalibrierprobe mit 11ppm Ti	52
7.1	Kalibrierkurve für Fluor	54
7.2	Kalibrierkurve für Natrium	54
7.3	Kalibrierkurve für Magnesium	55
7.4	Kalibrierkurve für Aluminium	55
7.5	Kalibrierkurve für Phosphor	56
7.6	Kalibrierkurve für Schwefel	56
7.7	Relative Empfindlichkeit der kalibrierten Elemente	57
7.8	Spektrum einer Serumprobe	58
7.9	BNPP-Spektrum	59
7.10	AXIL-Fit	60
8.1	Spektrum der Probe 2 (HT29-1)	62

8.2	Spektrum der Probe 7 (BNPP $1 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$)	63
8.3	Spektrum der Probe 2	65
8.4	Spektrum der Probe 4	66
8.5	Höhenscan für die erste Messposition von Probe 5	67
8.6	P- und S-Konzentration entlang des Höhenscans für die erste Messposition .	67
8.7	Höhenscan für die zweite Messposition von Probe 5	68
8.8	P- und S-Konzentration entlang des Höhenscans für die zweite Messposition	68
8.9	Spektrum der Probe 11	69
8.10	Spektrum der Probe 13	70
9.1	Vakuumkammer nach dem Umbau	72
9.2	Neue Detektorhalterung	72
9.3	Messanordnung	73
9.4	Die im Aufbau verwendete Pumpe und der Radiator	74
9.5	Spektrum der ^{55}Fe -Quelle	75
9.6	Fluor-Kalibrierkurve für den SDD	76
9.7	Natrium-Kalibrierkurve für den SDD	76
9.8	Magnesium-Kalibrierkurve für den SDD	77
9.9	Aluminium-Kalibrierkurve für den SDD	77
9.10	Phosphor-Kalibrierkurve für den SDD	78
9.11	Schwefel-Kalibrierkurve für den SDD	78
9.12	Vergleich der relativen Empfindlichkeiten für den Si(Li)- und den SD-Detektor	79
9.13	Vergleich der Empfindlichkeiten für den Si(Li)- und den SDD	80
9.14	Vergleich des $^{24}\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ Na-Spektrums für den SD- und den Si(Li)-Detektor . . .	81

Literaturverzeichnis

- [1] WEDLER, G.: Lehrbuch der physikalischen Chemie. 5., vollst. überarb. und aktualisierte Auflage. Weinheim: Wiley-VCH, 2004. ISBN 3-527-31066-5
- [2] GÖRGL, R.: Energiedispersive Messung der Emissionsspektren von Röntgenröhren sowie Vergleich mit theoretischen Berechnungen. Dissertation. TU Wien: 1995
- [3] BOHR, N.: I. On the constitution of atoms and molecules. In: Philosophical Magazine, Series 6, 26 (1913): 151, S. 1–25. DOI 10.1080/14786441308634955 <http://dx.doi.org/10.1080/14786441308634955>
- [4] MOHR, P. J.; TAYLOR, B. N.; NEWELL, D. B.: CODATA Recommended Values of the Fundamental Physical Constants: 2010. Preprint. Version: März 2012 (Webversion 6.3) <http://physics.nist.gov/cuu/Constants/Preprints/lsa2010.pdf> Abruf: 07.02.13 NIST Standard Reference Database 121
- [5] KRIEGER, H.: Grundlagen der Strahlungsphysik und des Strahlenschutzes. 4., überarb. und erw. Auflage. Wiesbaden: Vieweg + Teubner Verlag, 2012. ISBN 978-3-8348-2238-3 (eBook)
- [6] DEMTRÖDER, W.: Experimentalphysik 3. Atome, Moleküle und Festkörper. 3., überarb. Auflage. Berlin: Springer, 2005. ISBN 3-540-21473-9
- [7] FABER, M.; LEEB, H.: Atom-, Kern und Teilchenphysik I. Vorlesungsskriptum, TU Wien, SS 2009
- [8] JENKINS, R.; MANNE, R.; ROBIN, R.; SENEMAUD, C.: Nomenclature, symbols, units and their usage in spectrochemical analysis - part VIII. Nomenclature system for X-ray spectroscopy. In: Pure Appl. Chem. 63 (1991): 735–746. DOI:10.1351/pac199163050735 <http://dx.doi.org/10.1351/pac199163050735> International Union of Pure and Applied Chemistry
- [9] NAVE, C. R.: Moseley plot. HyperPhysics hosted by the Department of Physics and Astronomy ©2013 C. R. Nave, Georgia State University. <http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu/hbase/hframe.html> Abruf: 11.02.13
- [10] STRELI, C.; WOBRAUSCHEK, P.: Praktische Übungen aus Strahlenphysik. Energiespezifische Röntgenfluoreszenzanalyse. Vorlesungsskriptum, TU Wien, SS 2012
- [11] THEISEN, M.: Quellidentifizierung und Luftstaubanalytik unter Verwendung von Totalreflexions-Röntgenfluoreszenz-Spektroskopie. Techn. Universität München, Herbert Utz Verlag, 1999. ISBN 3-896-75635-4

- [12] HAKEN, H.; WOLF, H. C.: Atom- und Quantenphysik. Einführung in die experimentellen und theoretischen Grundlagen. 8., aktualisierte u. erw. Auflage. Berlin: Springer-Verlag, 2004. ISBN 978-3-540-02621-1
- [13] MARINGER, F. J.: Strahlenphysik und die gesellschaftlichen Aspekte des Strahlenschutzes. Vorlesungsskriptum, TU Wien, WS 2010
- [14] BERGER, M.J.; COURSEY, J.S.; ZUCKER, M.A.; CHANG, J.: Stopping-Power and Range Tables for Electrons, Protons, and Helium Ions. NISTIR 4999. NIST <http://physics.nist.gov/PhysRefData/Star/Text/ESTAR.html> Abruf: 03.03.13
- [15] BETHGE, K.; WALTER, G.; WIEDEMANN, B.: Kernphysik. Eine Einführung. 3. Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2008. ISBN 978-3-540-74567-9 (eBook)
- [16] MANTLER, M.; SCHREINER, M.: X-Ray Fluorescence Spectrometry in Art and Archaeology. X-Ray Spectrometry 29.1 (2000): 3–17
- [17] MANTLER, M.: Physikalische Analytik: Photonenspektrometrie. Vorlesungsskriptum, TU Wien, SS 2004
- [18] BERTIN, E. P.: Principles and practice of X-ray spectrometric analysis. 2. Auflage. New York, London: Plenum Press, 1975. ISBN 0-306-30809-6
- [19] KLOCKENKÄMPER, R.: Total reflection X-ray fluorescence spectrometry. New York (u.a): Wiley, 1997. ISBN 0-471-30524-3
- [20] VAN GRIEKEN, R.; MARKOWICZ, A.: Handbook of X-ray spectrometry. 2., überarb. und erweiterte Auflage. New York: Marcel Dekker, 2002 ISBN 0-824-70600-5
- [21] STRELI, C.; POLJANC, K.: Strahlenphysik. Vorlesungsskriptum, TU Wien, SS 2012
- [22] DEMTRÖDER, W.: Experimentalphysik 2. Elektrizität und Optik. 4., überarb. Auflage. Berlin: Springer, 2005. ISBN 3-540-33794-6
- [23] JAMES, R. W.: The Optical Principles of the Diffraction of X-Rays. London: G. Bell and sons LTD, 1962. <http://archive.org/details/opticalprinciple031059mbp> Abruf: 25.05.13
- [24] HEIN, A.: Röntgenfluoreszenzanalyse bei Totalreflexion der anregenden Synchrotronstrahlung an ELSA. Dissertation. Bonn: Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität, 1996. <http://mommsen.hiskp.uni-bonn.de/promoanno/vincent.html> Abruf: 25.05.13
- [25] Krause, M.O.: Atomic Radiative and Radiationless Yields for K and L Shells. J. Phys. Chem. Ref. Data. 8, 307, 1979. <http://www.csrii.iit.edu/periodic-table.html> Abruf: 26.06.13

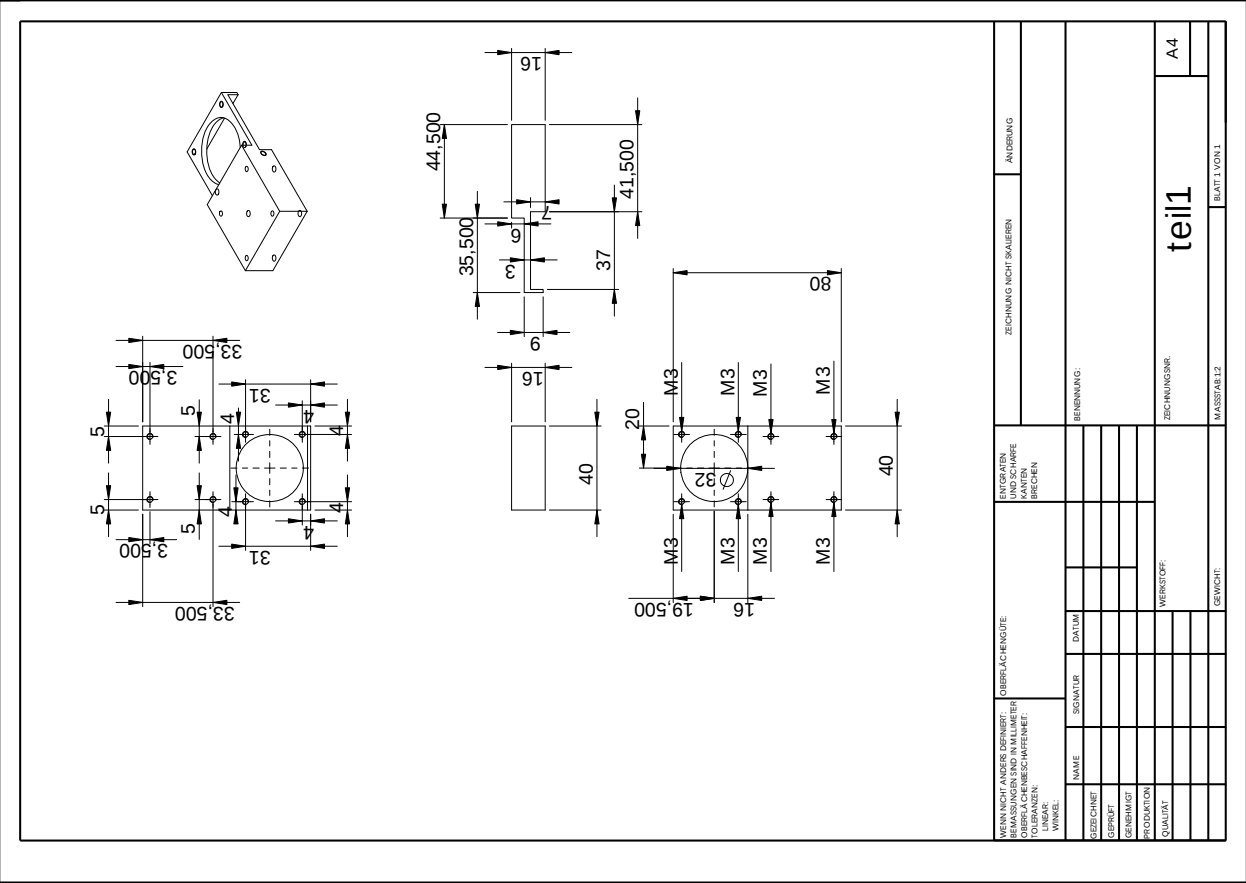
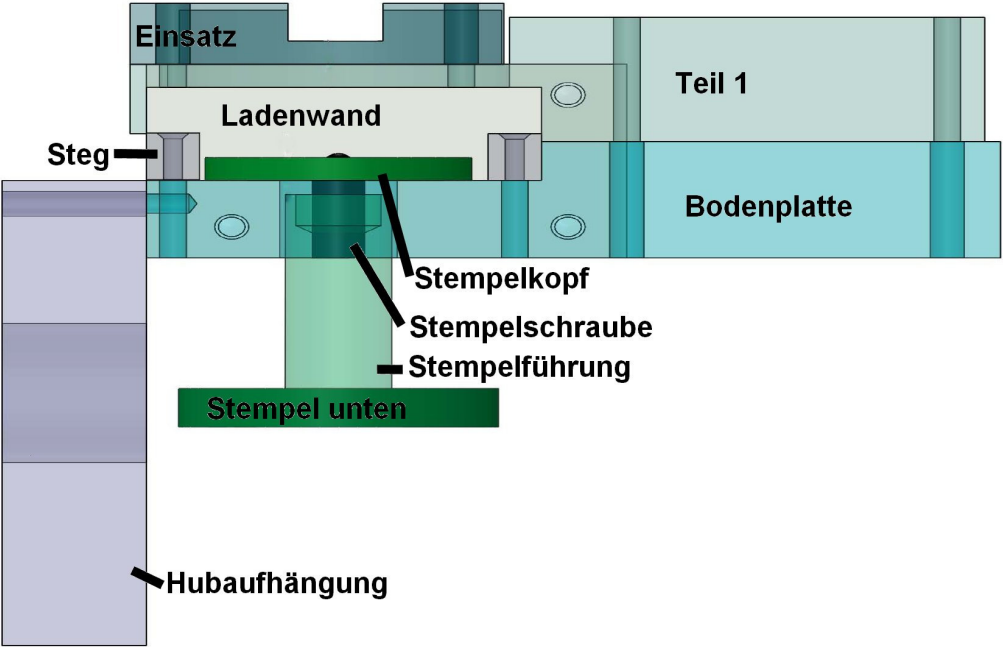
- [26] CHANTLER, C. T.; OLSEN, K.; DRAGOSET, R. A.; CHANG, J.; KISHORE, A. R.; KOTOCHIGOVA, S. A.; ZUCKER, D. S.: X-Ray Form Factor, Attenuation and Scattering Tables (version 2.1). National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD. 2005. <http://physics.nist.gov/ffast> Abruf 26.06.13.
- [27] DEMTRÖDER, W.: Experimentalphysik 4. Kern-, Teilchen- und Astrophysik. 3., überarb. Auflage. Berlin: Springer, 2010. ISBN 978-3-642-01597-7
- [28] PN DETECTOR: Silicon Drift Detector. Product Brochure. 2011 – Firmenbroschüre http://www.pndetector.de/documents/Brox_spreads_A4-pub.pdf Abruf: 28.05.13
- [29] FRIEDBACHER, G.; BUBERT, H. (Hrsg.): Surface and thin film analysis. 2., überarb. Auflage. Weinheim: Wiley-VCH, 2011. ISBN 978-3-527-32047-9
- [30] KETEK GmbH: Welcome to Ketek: Silicon drift detectors for x-ray spectroscopy. – Firmenbroschüre <http://www.ketek.net/downloads/> Abruf: 28.05.13
- [31] MOXTEK: Ultra-thin AP3 X-ray Windows. Datasheet. <http://www.moxtek.com/x-ray-windows/ap3-ultra-thin-polymer-windows.html> Abruf: 30.05.13
- [32] POEGGEL, G.: Kurzlehrbuch Biologie. Stuttgart: Thieme Verlag, 2005. ISBN 3-131-40981-9
- [33] KARLSON, P.; DOENECKE, D.; KOOLMAN, J.; FUCHS G.; GEROK, W.: Karlsons Biochemie und Pathobiochemie. Stuttgart: Thieme Verlag, 2005. ISBN 3-13-357815-4
- [34] LÖFFLER, G.; PETRIDES, P. E.; HEINRICH, P. C. (Hrsg.): Biochemie und Pathobiochemie. 8., völlig neu bearb. Auflage. Heidelberg: Springer-Lehrbuch, 2007. ISBN 978-3-540-32680-9
- [35] SECKO, D.: Protein Phosphorylation: A global regulator of cellular activity. The Science Creative Quarterly. August 2003. <http://www.scq.ubc.ca/protein-phosphorylation-a-global-regulator-of-cellular-activity/> Abruf 12.03.13
- [36] ZOLNIEROWICZ, S.; BOLLEN M.: Protein phosphorylation and protein phosphatases De Panne, Belgium, September 19–24, 1999. The EMBO journal 19.4 (2000): 483. DOI: 10.1093/emboj/19.4.483 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC305585/> Abruf: 12.3.13
- [37] UBERSAX, J. A.; FERRELL J. E. Jr.: Mechanisms of specificity in protein phosphorylation. Nature Reviews Molecular Cell Biology 8.7 (2007): 530–541. DOI: 10.1038/nrm2203 [http://www.ulb.ac.be/sciences/physcell/pdf/cours/Bibliographie/Ubersax et Ferrel \(2007\) - Nat Rev Mol Cell Biol.pdf](http://www.ulb.ac.be/sciences/physcell/pdf/cours/Bibliographie/Ubersax%20et%20Ferrel%20(2007)%20-%20Nat%20Rev%20Mol%20Cell%20Biol.pdf) Abruf: 12.03.13

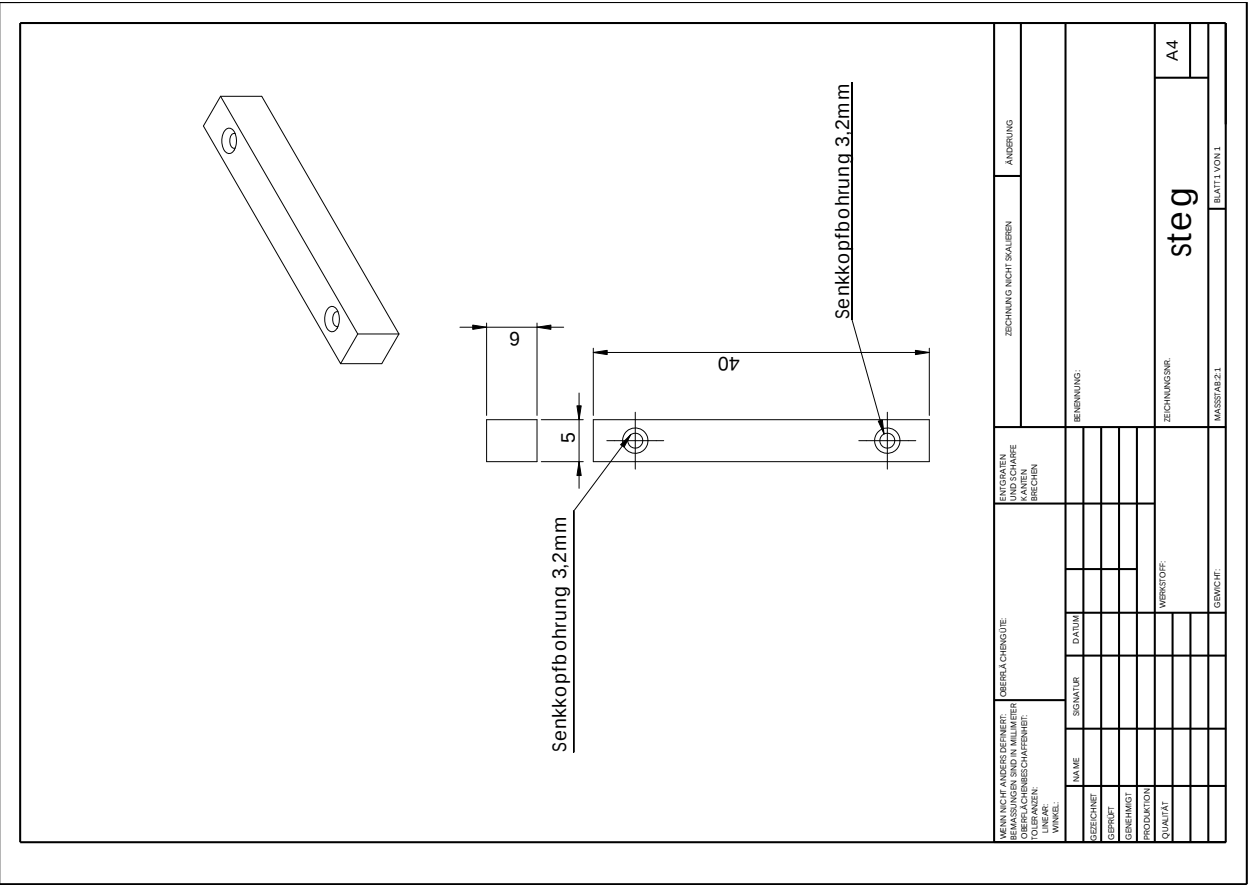
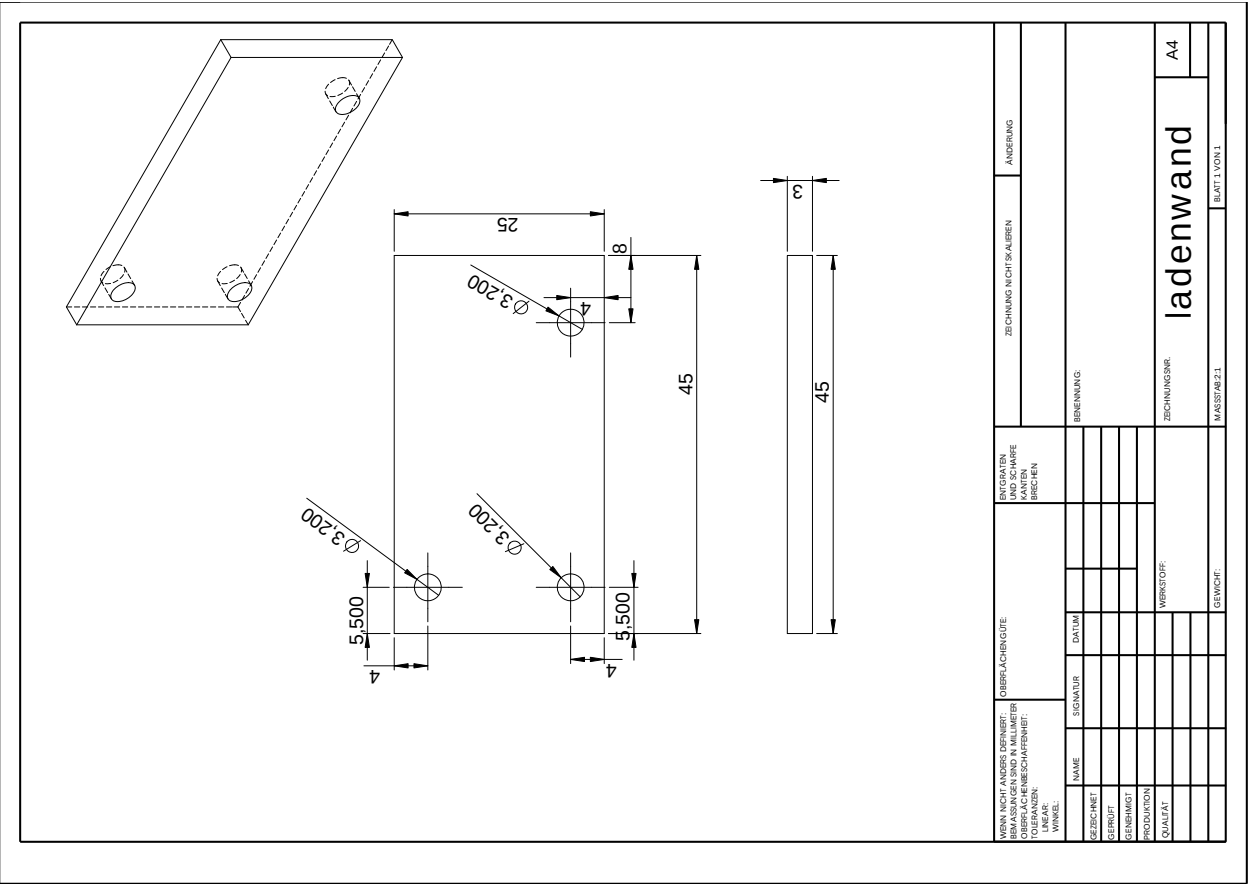
- [38] MANNING, G.; WHYTE, D. B.; MARTINEZ, R.; HUNTER, T.; SUNDARSANAM, S.: The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298 (2002): 1912–1934. DOI: 10.1126/science.1075762 <http://ss.textcube.com/blog/3/37590/attach/XaLxMbRS7m.pdf> Abruf: 12.03.13
- [39] CIESLA, J.; FRANCZYK, T.; RODE, W.: Phosphorylation of basic amino acid residues in proteins: important but easily missed. *Acta Biochim Pol* 58 (2011): 137–147. http://www.actabp.pl/pdf/2_2011/137.pdf Abruf: 12.03.13
- [40] COHEN, P.: The role of protein phosphorylation in human health and disease. *European Journal of Biochemistry* 268.19 (2001): 5001–5010. DOI: 10.1046/j.0014-2956.2001.02473.x <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.0014-2956.2001.02473.x/pdf> Abruf: 12.03.13
- [41] SASAMORI, S.; MEIRER, F.; ZÖGER, N.; STRELI, C.; KREGSAMER, P.; SMOLEK, S.; MANTLER, C. WOBRAUSCHEK, P.: Si wafer analysis of light elements by TXRF. *ECS Transactions* 25 (3), 2009: 301–302
- [42] PUBLIC HEALTH ENGLAND: Culture Collection. General Cell Collection: HT29. http://www.hpacultures.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=91072201&collection=ecacc_gc Abruf: 17.06.13
- [43] PUBLIC HEALTH ENGLAND: Culture Collection. General Cell Collection: HTC116. http://www.hpacultures.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=91091005&collection=ecacc_gc Abruf: 17.06.13
- [44] STRELI, C.; WOBRAUSCHEK, P.; SCHRAIK, I.: Comparison of SiLi detector and silicon drift detector for the determination of low Z elements in total reflection X-ray fluorescence. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 59 (2004): 1211–1213. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0584854704001107> Abruf: 4.06.13
- [45] HÖFLER, H.: Totalreflexions-Röntgenfluoreszenzanalyse von leichten Elementen in Umweltproben. Diplomarbeit. TU Wien: 2005

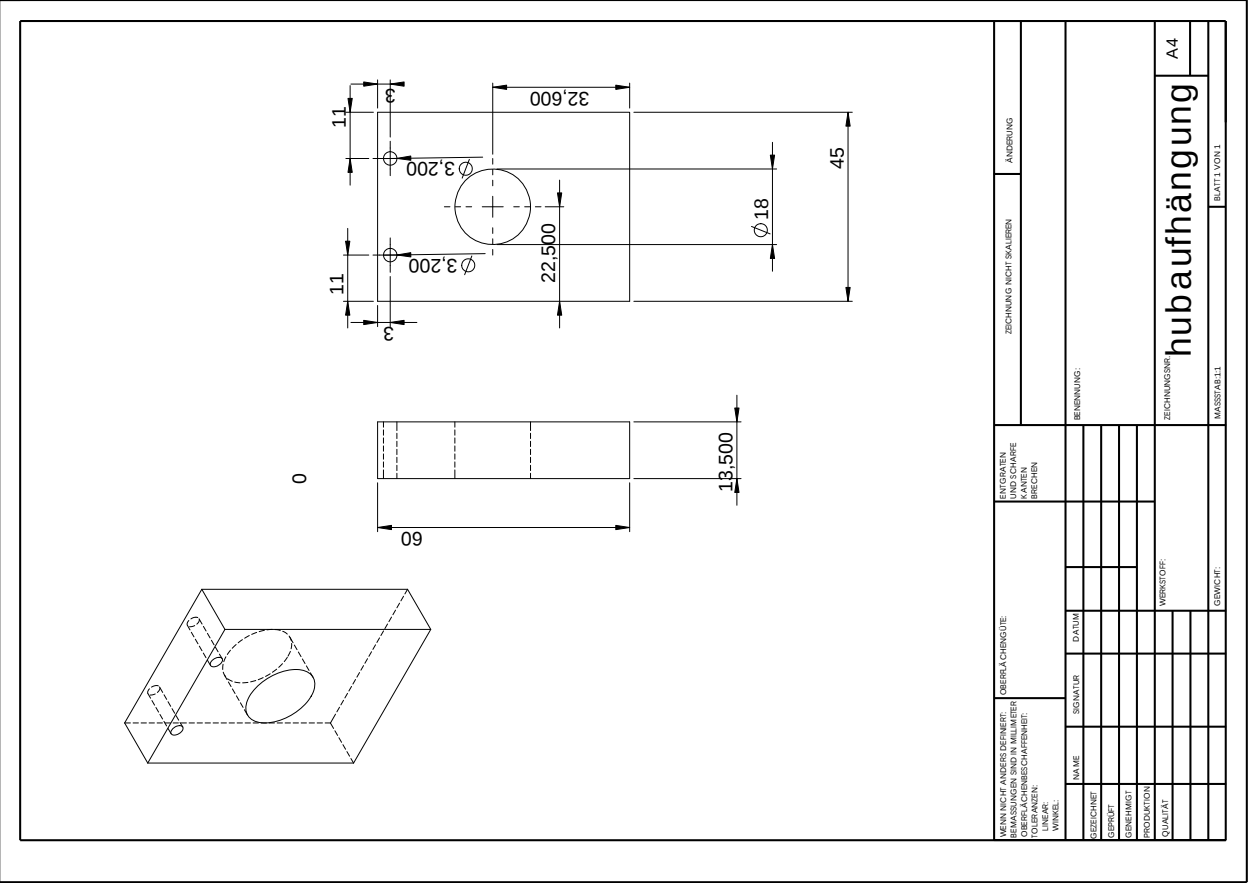
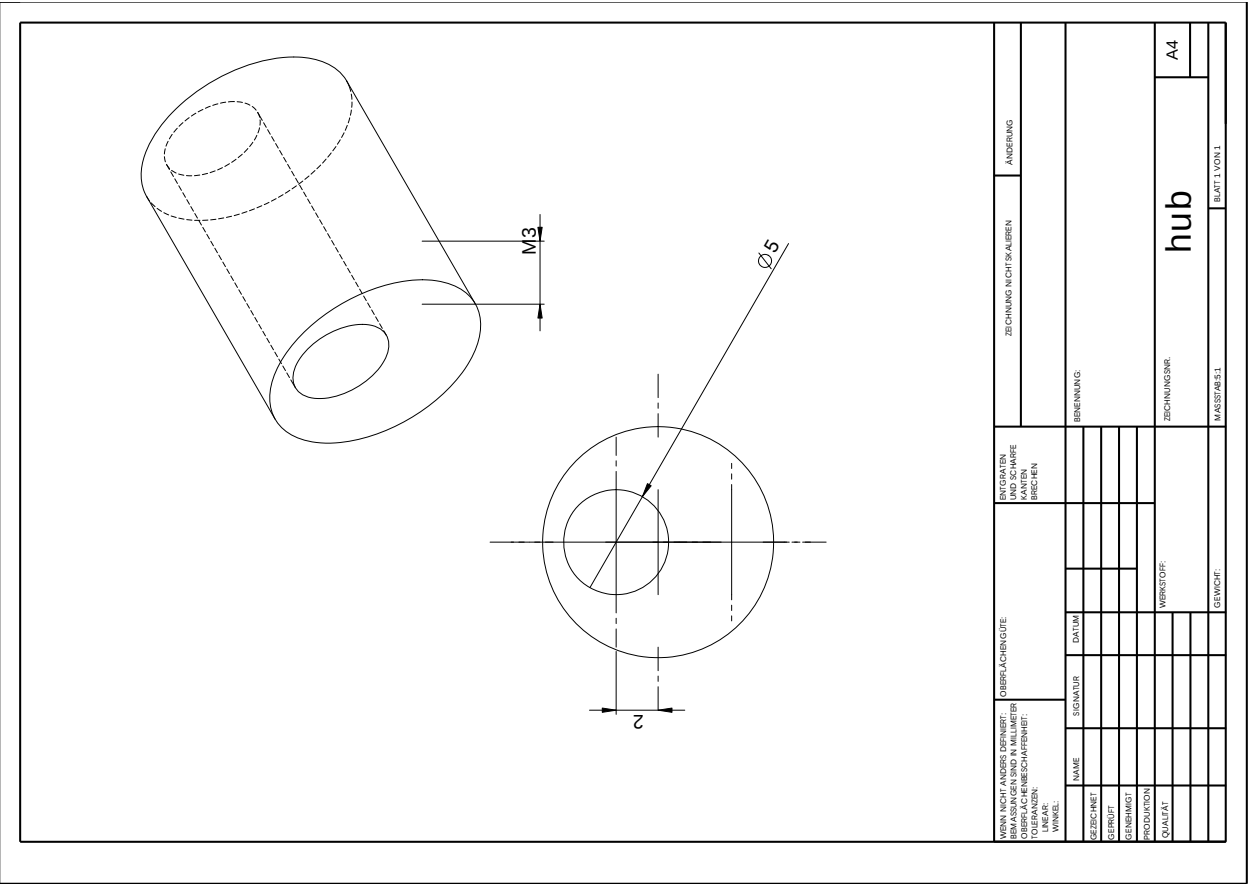
A Technische Zeichnungen

Alle Bemaßungen sind in Millimetern angeben.

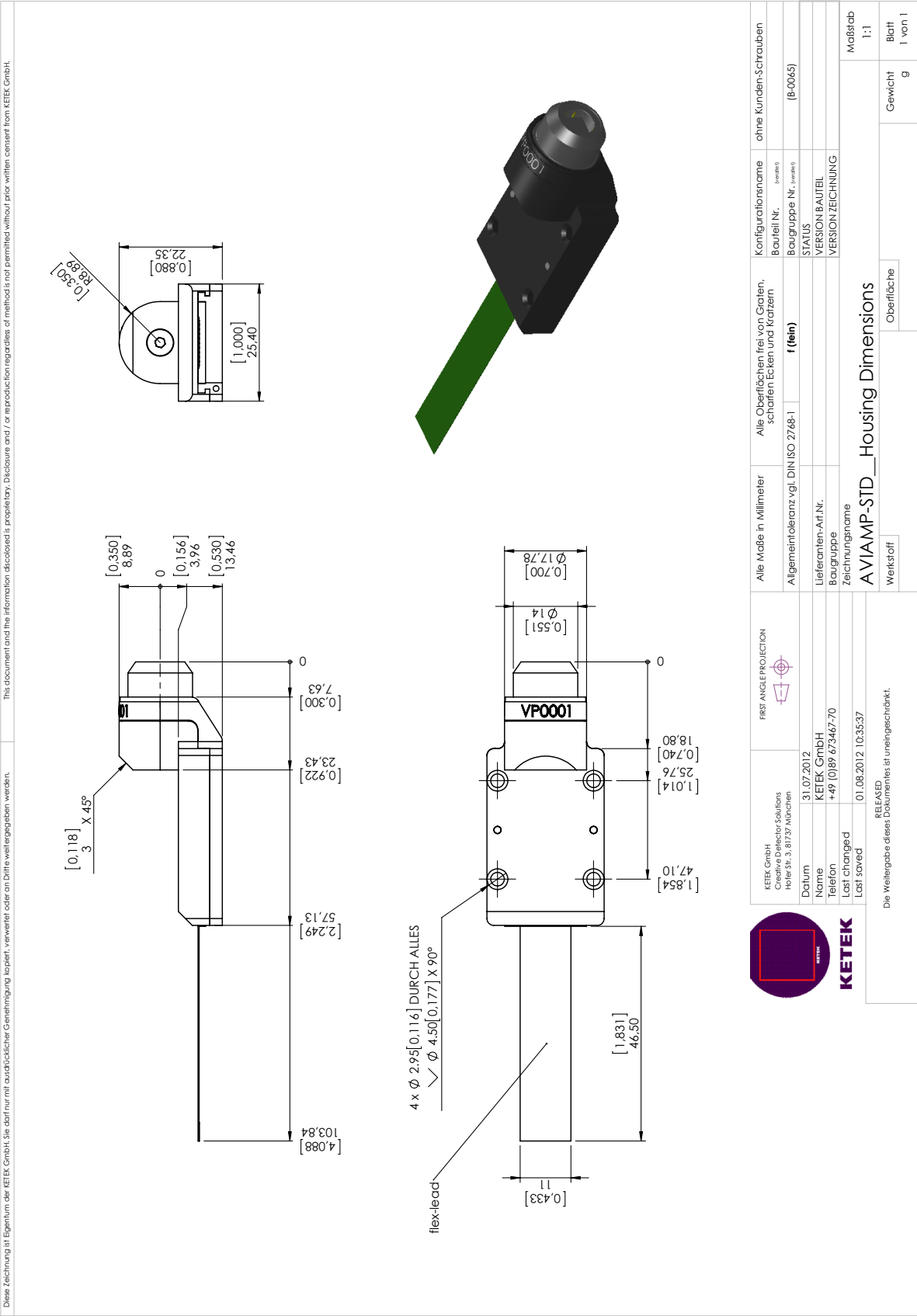
A.1 Probenhalterung



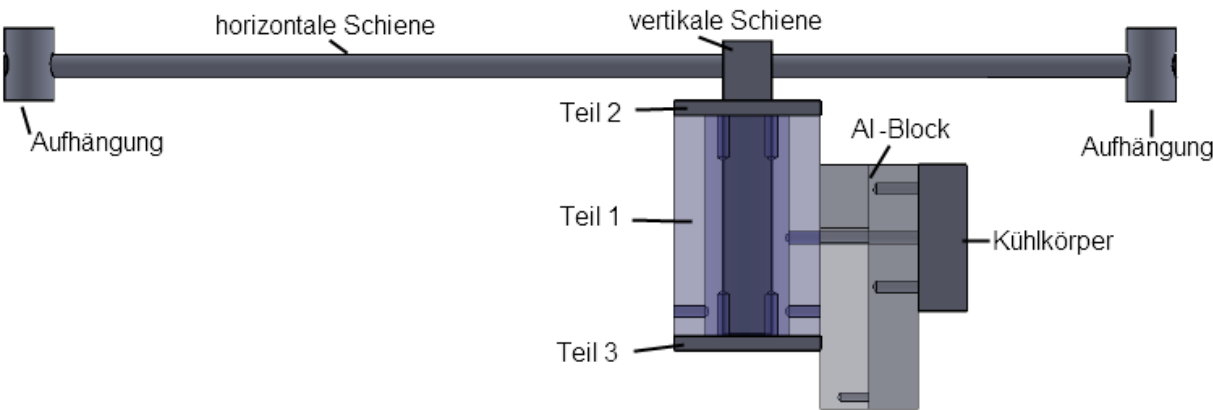




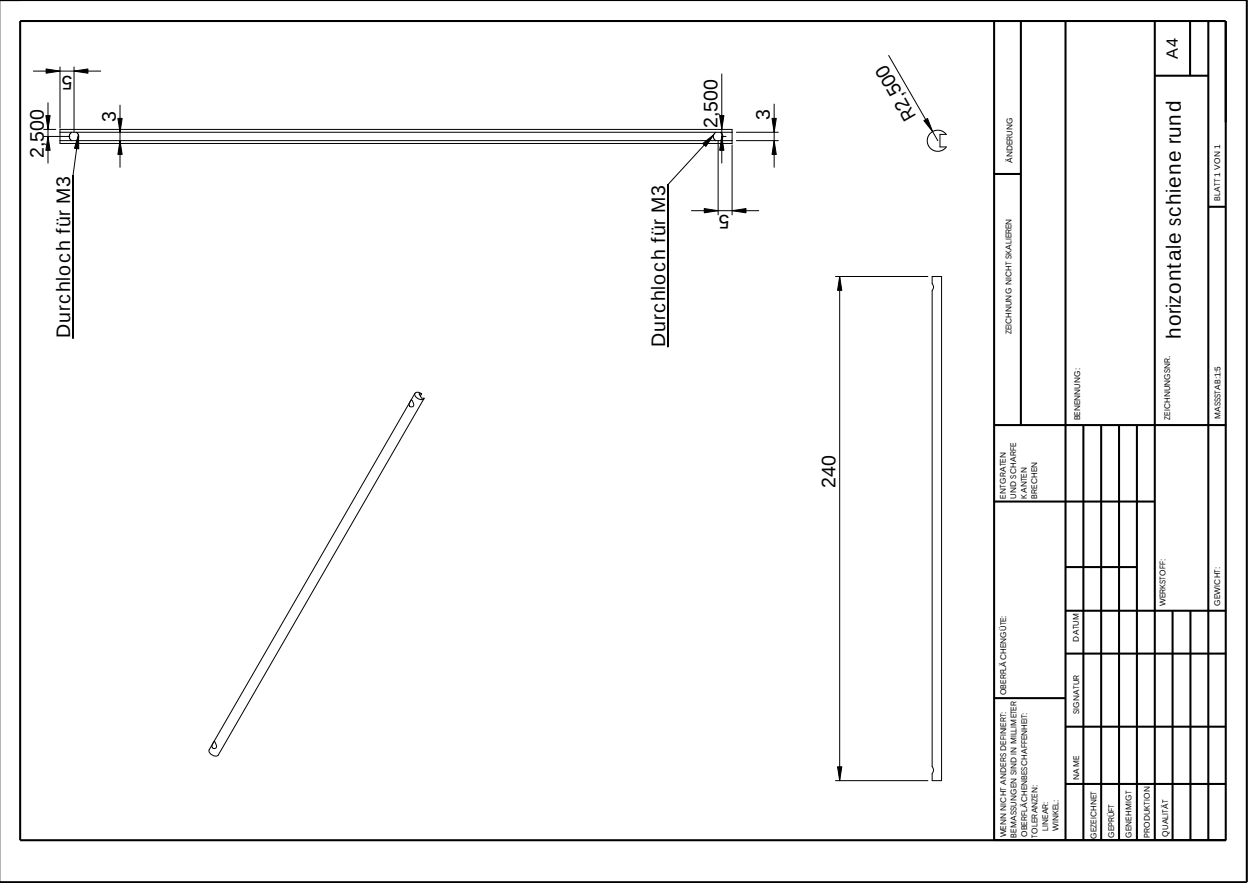
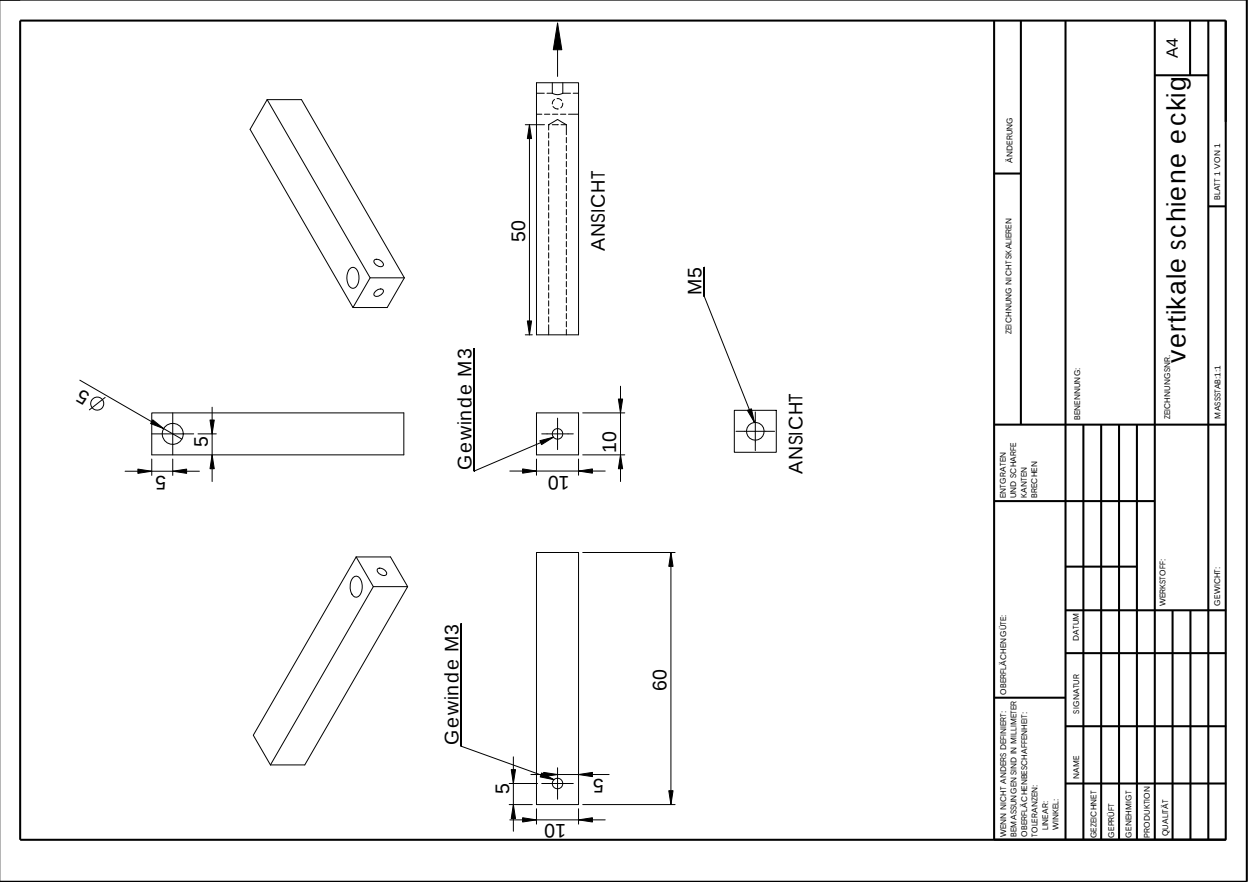
A.2 Detektor

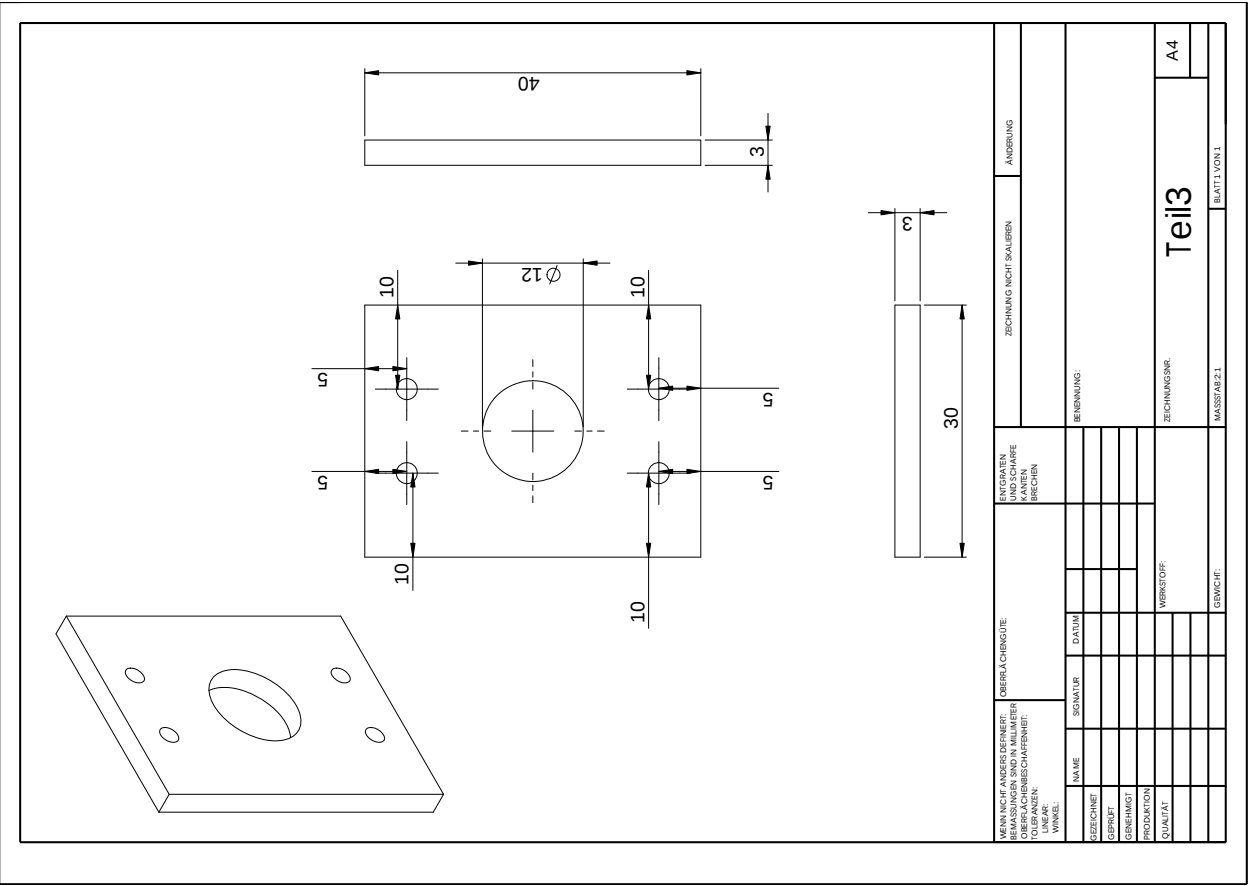
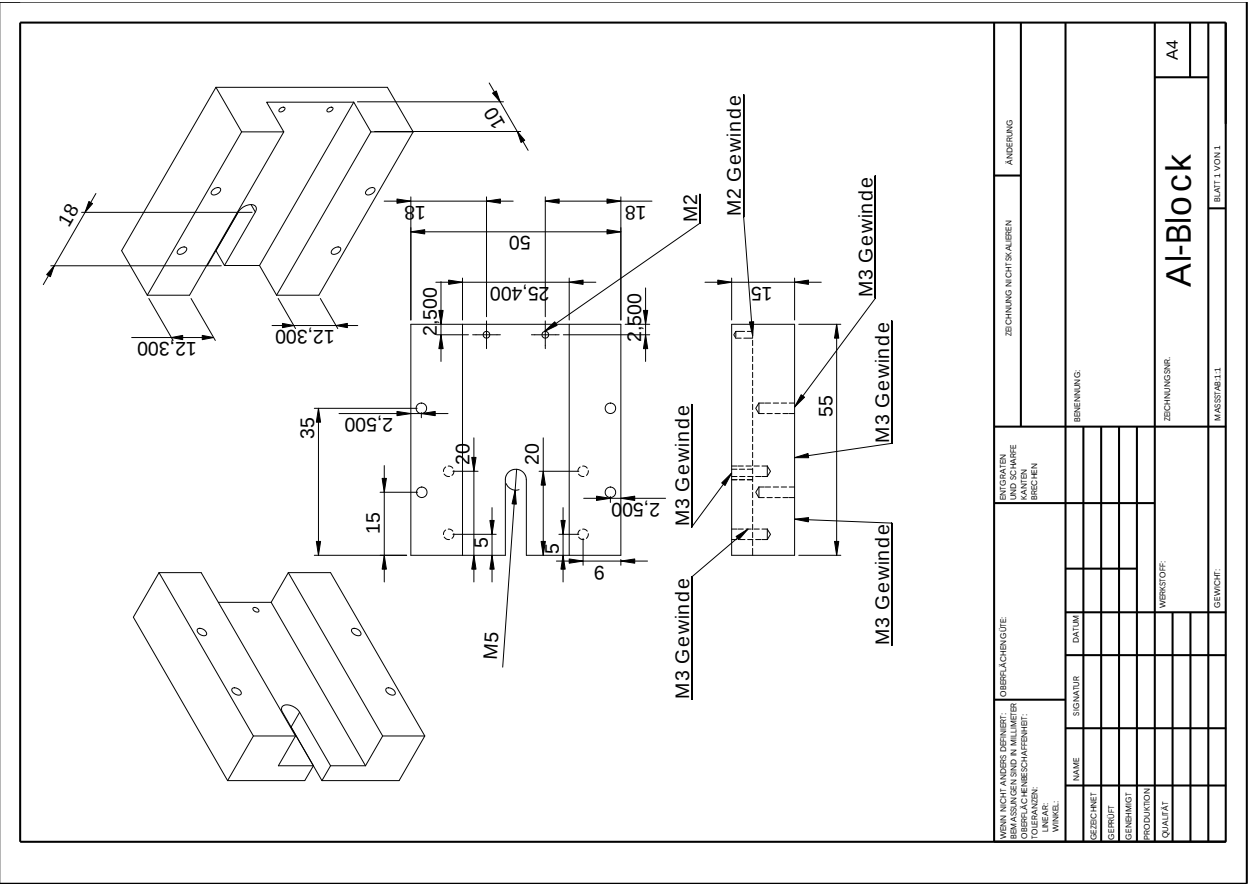


A.3 Detektoraufhängung



		ZEICHNUNG NICHT SKALIEREN		ÄNDERUNG	
		BESCHREIBUNG: KAVEN BECHEN			
WENN NICHT ANGEZEIGT: NUR FÜR OBERFLÄCHENBEZEICHNUNG VOLLSTÄNDIG WINKEL		OBERFLÄCHENBEZEICHNUNG: NUR FÜR OBERFLÄCHENBEZEICHNUNG VOLLSTÄNDIG WINKEL		BESCHREIBUNG: KAVEN BECHEN	
NAME		SIGNATUR		DATUM	
ZEICHNUNG		SIGNATUR		DATUM	
GUTGEHEIN		SIGNATUR		DATUM	
PRODUKTION		SIGNATUR		DATUM	
QUANTITÄT		SIGNATUR		DATUM	
VERKÖRPER		SIGNATUR		DATUM	
GRÖßE		SIGNATUR		DATUM	
A4		A4		A4	
Aufhängung rund		Aufhängung rund		Aufhängung rund	
MASSSTAB 2:1		MASSSTAB 2:1		MASSSTAB 2:1	
BLATT 1 VON 1		BLATT 1 VON 1		BLATT 1 VON 1	





B Zertifikate

2010-11

800626

Seronorm™ Trace Elements Serum L-2

6x3 mL

REF 203105

LOT 0903107



2016-05

IVD



Stability/Stabilité/Halbarkeit/Stabilität/Estabilidad/Estabilidade/Houdbaarheid/Stabilnost/Stabilita/Trwałość/Σταθερότητα/Stabilitet/Säilyvyys/Stabilitet/Hållbarhet

- (GB) In unopened vials kept in dark at 2°C until the expiry date stated on the vial label
- (FR) En flacons non ouverts conservés à l'obscurité à 2°C jusqu'à la date d'expiration indiquée sur le flacon
- (DE) In verschlossenen Flaschen: bis zum angegebenen Verfallsdatum bei 2°C
- (IT) In flacone sigillato mai aperto a 2°C ; fino alla data di scadenza riportata sul flacone
- (ES) En vial cerrado a 2°C ; Hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del vial
- (PT) Em frascos fechados mantidos no escuro a 2°C ; até à data de validade indicada no rótulo do frasco
- (NL) In ongeopende vials in het donker bewaren bij 2°C ; tot de expiratedatum vermeld op het etiket van de vial
- (YU) U zatvorenim bočicama držaniti u mraku na 2°C ; do roka naznačenog na nalepnici bočice
- (CZ) Neotevřenou lahvičku skladujte ve tmě při 2°C ; použiti do expirace uvedené na lahvičce
- (PL) W nieotwartych fiolkach przechowywanych bez dostępu światła w temperaturze 2°C ; do daty ważności podanej na naklejce na fiolce
- (GR) τα κλειστά φιαλίδια να φυλάσσονται σε σκοτεινό μέρος σε 2°C ; μέχρι την ημερομηνία λήξεως η οποία αναγράφεται στην ετικέτα του φιαλιδίου
- (NO) I uåpnede glass oppbevart i mørke ved 2°C ; inntil utløpsdato merket på glassetiketten
- (FI) Avaamattomat pullot valolta suojattuna 2°C ; käytettävä etikettiin merkittyn päivään mennessä
- (DK) I uåbnede glas opbevaret mørkt ved 2°C ; indtil udløb påtrykt etiketten på glasset
- (SV) Öppnade flaskor förvarade mörkt i 2°C ; enligt utgångsdatum på flaskans etikett

- (GB) After reconstitution (FR) Après reconstitution (DE) Nach der Auflösung der Kontrolle (IT) Dopo il ripristino (ES) Después de la reconstitución (PT) Depois da reconstituição (NL) Na reconstitutie
- (YU) Nakon rekonstitucije (CZ) Po rekonstituci (PL) Po przygotowaniu (GR) Μετά την ανασύσταση (NO) Etter rekonstituering (FI) Liuottamisen jälkeen (DK) Efter rekonstituering (SV) Efter rekonstituering

30°C	1 Month/1 Mois/1 Monat/1 Mese/1 Mes/1 Mês/1 Maand/1 Mesec/1 Měsíc/1 Miesiąc/1 Mήνας/1 Måned/1 Kuukausi/1 Månad
2°C	7 Days/7 Jours/7 Tage/7 Giorni/7 Dias/7 Dag/7 Dana/7 Dny/7 Dni/7 Ημέρες/7 Dager/7 Päivää/7 Dage/7 Dagar
20°C	8 Hours/8 Heures/8 Stunden/8 Ore/8 Horas/8 Uren/8 Sati/8 Hodiny/8 Godziny/8 Ωρες/8 Timer/8 Tuntia/8 Timmar

Collaborating laboratories

The analytical data of Seronorm™ Trace Elements Serum L-2 have been elaborated in collaboration with the following independent laboratory:

- SGAB Analytica, Luleå Technical University, Luleå, Sweden
- Fürst Medical Laboratory, Oslo, Norway

GB

Limitations:

- All stability data require that bacterial contamination is avoided. Increased turbidity may indicate bacterial growth.

Explanation of table

First column:

Components measured in Seronorm™ Trace Elements Serum L-2.

Second column:

Analytical values:

The analytical value is the mean value calculated from at least 12 measurements performed in different analytical series.

Third column:

Uncertainty for the assigned values is presented as a single number, U, and as a confidence interval based on an uncertainty budget where the following sources of uncertainty are taken into account:

- estimated stability for the given component
 - vial-to-vial uniformity
 - reconstitution of the freeze-dried material
 - imprecision of the method applied for assignment
- This is assembled to an expanded uncertainty, U, with a coverage factor of two (k=2).

Last column:

The acceptable range corresponds to the one established in Germany for the analytical performance of medical laboratories according to the RiliBak guideline "Richtlinien der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung in medizinischen Laboratorien (2002)". This range is provided only as an information. The interval holds inter-laboratory variations and should be used as a guideline and not uncritically applied as an internal acceptance interval.

FR

Limitations:

- Toutes les données de stabilité exigent que la contamination bactérienne soit évitée. Une solution trouble peut signifier la croissance de bactéries.

Explications du tableau

Première colonne:

Composants de Seronorm™ Trace Elements Serum L-2

Deuxième colonne:

Valeurs analytiques:

Chaque valeur analytique est la valeur moyenne calculée à partir de 12 analyses réalisées au cours de différentes séries de mesure.

Troisième colonne:

L'incertitude est exprimée par une valeur, U, et sous la forme d'un intervalle de confiance établi en prenant en compte les sources d'incertitude suivantes:

- les données disponibles concernant la stabilité du composant
- l'incertitude liée aux variations éventuelles d'un flacon à l'autre
- l'erreur pré-analytique due à la reconstitution du produit lyophilisé

Le chiffre obtenu correspondant à l'incertitude, U, a été multiplié par un facteur de deux (k=2).

Dernière colonne:

Les limites minimales et maximales acceptables correspondent à celles établies en Allemagne pour le test de la performance des laboratoires médicaux selon le Guide RiliBak "Richtlinien der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung in medizinischen Laboratorien (2002)". Ces limites qui incluent les variations inter-laboratoires devraient être interprétées comme un guide et n'être utilisées comme un intervalle acceptable pour le laboratoire que de manière critique.

DE

Einschränkungen:

- Alle Stabilitätsdaten fordern, dass bakteriell Verunreinigung zu vermeiden ist. Verstärkte Trübung kann ein Indiz für Bakterienwachstum sein.

Erklärung der Tabelle

Erste Spalte:

Analyte mit Werte-Ermittlung in Seronorm™ Trace Elements Serum L-2

Zweite Spalte:

Analysenwerte:

Der analytische Wert ist der Durchschnittswert berechnet von mindestens 12 Messungen durchgeführt in verschiedenen analytischen Serien.

Dritte Spalte:

Die gesamte Unsicherheit der Werte-Ermittlung ist nach einem Unsicherheits- budget angegeben.

Die folgenden möglichen Ursachen von Unsicherheiten der Werte-Ermittlung sind im Budget berücksichtigt:

- Bekannte Stabilität des Bestandteils
- Flasche-zu-Flasche Uniformität
- Ungenauigkeit der Auflösung
- Inpräzision der Mittelwerte nach Vielfachbestimmungen

Dies ist zu einer erweiterten Ungewissheit (U) zusammengesetzt, mit einem Multiplikatorwert von zwei (k=2).

Letzte Spalte:

Die erlaubten Bereiche entsprechen den "Richtlinien der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung in Medizinischen Laboratorien (2002)". Dieser Bereich wird nur als Zusatzinformation angegeben.

IT

Limitazioni:

- Tutti i dati di stabilità richiedono che siano evitate le contaminazioni con batteri. Una maggiore torbidità potrebbe indicare la crescita di batteri.

Spiegazione delle tabella

Prima colonna:

Componenti misurati in Seronorm™ Trace Elements Serum L-2.

Seconda colonna:

Valori di analitico:

Il valore analitico corrisponde al valore medio calcolato da almeno 12 misure ottenute in differenti serie analitiche.

Terza colonna:

L'incertezza per i valori assegnati è presentata come un insieme di varie cause. Sono prese in considerazione le seguenti cause:

- stabilità stimata per un dato componente
- uniformità da flacone a flacone
- icostituzione del materiale liofilo
- distribuzione dei valori da misure replicate (imprecisione del metodo)

I valori della Tabella sono tali da considerare un'incertezza ampliata di un fattore due (k=2).

Ultima colonna:

Il range di misura accettabile corrisponde ad una scala stabilita in Germania secondo la performance del test eseguito nei laboratori medici in accordo con le linee guida RiliBak "Richtlinien der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung in medizinischen Laboratorien (2002)".

Questo range è fornito solo come un'informazione ed è indipendente dai valori analitici riportati nelle altre colonne. L'intervallo tiene conto della variabilità inter-laboratorio e dovrebbe essere usato come una linea guida e non come un intervallo interno di accettabilità.

Limitaciones:

- Todos los datos de estabilidad requieren que se evite la contaminación bacteriana.
- Un aumento de la turbidez puede indicar crecimiento bacteriano.

Explicación de la tabla**Primera columna:**

Componentes analizados en Seronorm™ Trace Elements Serum L-2

Segunda columna:**Valores analíticos:**

El valor analítico es la media aritmética calculada para los resultados obtenidos en 12 mediciones realizadas en diferentes series analíticas.

Tercera columna:

La incertidumbre de los valores asignados se basa en un conjunto de diferentes factores, tomándose en consideración las siguientes fuentes de incertidumbre:

- Estabilidad estimada para cada componente.
 - Uniformidad vial a vial.
 - Reconstitución del material liofilizado.
 - Distribución de valores obtenidos en varias determinaciones (imprecisión).
- Estos factores abarcan una incertidumbre expandida de K=2. La incertidumbre ($\pm U$) cubre el valor promedio con un intervalo de confianza del 95%.

Última columna:

El rango aceptable se corresponde al rango establecido en Alemania mediante los análisis realizados por diferentes laboratorios médicos siguiendo las indicaciones recogidas en la guía Rilibäck "Richtlinien der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung in medizinischen Laboratorien (2002)". Este rango se proporciona solamente a título informativo. Los intervalos consideran las variaciones inter-laboratorios, y deben ser utilizados a modo de guía y no de forma estricta como un intervalo interno de aceptabilidad.

Seronorm™ Trace Elements Serum L-2 LOT 0903107

Component	Analytical value	Analytical uncertainty		Method	Acceptable range
		U	95 % Confidence interval		
Aluminium Al	104 $\mu\text{g/L}$ 3,85 $\mu\text{mol/L}$	6 0,22	98 - 110 $\mu\text{g/L}$ 3,63 - 4,07 $\mu\text{mol/L}$	ICP-SFMS	92 - 116 $\mu\text{g/L}$ 1) 3,41 - 4,29 $\mu\text{mol/L}$
Calcium Ca	145 mg/L 3,62 mmol/L	8 0,20	137 - 153 mg/L 3,42 - 3,82 mmol/L	ICP-SFMS	136 - 154 mg/L 3,40 - 3,84 mmol/L
	139 mg/L 3,47 mmol/L	5 0,12	134 - 144 mg/L 3,35 - 3,59 mmol/L	ICP-AES	131 - 147 mg/L 3,27 - 3,67 mmol/L
Chromium Cr	4,8 $\mu\text{g/L}$ 92 nmol/L	0,4 8	4,4 - 5,2 $\mu\text{g/L}$ 84 - 100 nmol/L	ICP-SFMS	4,0 - 5,6 $\mu\text{g/L}$ 1) 77 - 107 nmol/L
Cobalt Co	3,2 $\mu\text{g/L}$ 54 nmol/L	0,2 3	3,0 - 3,4 $\mu\text{g/L}$ 51 - 57 nmol/L	ICP-SFMS	2,8 - 3,6 $\mu\text{g/L}$ 1) 47 - 61 nmol/L
Copper Cu	2887 $\mu\text{g/L}$ 45,4 $\mu\text{mol/L}$	99 1,6	2788 - 2986 $\mu\text{g/L}$ 43,8 - 47,0 $\mu\text{mol/L}$	ICP-SFMS	2689 - 3085 $\mu\text{g/L}$ 1) 42,3 - 48,5 $\mu\text{mol/L}$
	3335 $\mu\text{g/L}$ 52,5 $\mu\text{mol/L}$	134 2,1	3201 - 3469 $\mu\text{g/L}$ 50,4 - 54,6 $\mu\text{mol/L}$	ICP-AES	3067 - 3603 $\mu\text{g/L}$ 1) 48,3 - 56,7 $\mu\text{mol/L}$
Fluoride F	200 $\mu\text{g/L}$ 10,5 $\mu\text{mol/L}$			Added amount	
Gold Au	2030 $\mu\text{g/L}$ 10,3 $\mu\text{mol/L}$	170 0,9	1860 - 2200 $\mu\text{g/L}$ 9,4 - 11,2 $\mu\text{mol/L}$	ICP-SFMS	1690 - 2370 $\mu\text{g/L}$ 1) 8,6 - 12,0 $\mu\text{mol/L}$
Iron Fe	2,03 mg/L 36,3 $\mu\text{mol/L}$	0,13 2,3	1,90 - 2,16 mg/L 34,0 - 38,6 $\mu\text{mol/L}$	ICP-SFMS	1,77 - 2,29 mg/L 1) 31,6 - 41,0 $\mu\text{mol/L}$
	2,15 mg/L 38,5 $\mu\text{mol/L}$	0,10 1,8	2,05 - 2,25 mg/L 36,7 - 40,3 $\mu\text{mol/L}$	ICP-AES	1,95 - 2,35 mg/L 1) 34,9 - 42,1 $\mu\text{mol/L}$
Lithium Li	10950 $\mu\text{g/L}$ 1578 $\mu\text{mol/L}$	969 140	9981 - 11919 $\mu\text{g/L}$ 1438 - 1718 $\mu\text{mol/L}$	ICP-SFMS	10293 - 11607 $\mu\text{g/L}$ 1483 - 1673 $\mu\text{mol/L}$
	10692 $\mu\text{g/L}$ 1541 $\mu\text{mol/L}$	464 67	10228 - 11156 $\mu\text{g/L}$ 1474 - 1608 $\mu\text{mol/L}$	ICP-AES	10050 - 11334 $\mu\text{g/L}$ 1448 - 1634 $\mu\text{mol/L}$
Manganese Mn	19,9 $\mu\text{g/L}$ 0,36 $\mu\text{mol/L}$	1,1 0,02	18,8 - 21,0 $\mu\text{g/L}$ 0,34 - 0,38 $\mu\text{mol/L}$	ICP-SFMS	17,7 - 22,1 $\mu\text{g/L}$ 1) 0,32 - 0,40 $\mu\text{mol/L}$
Magnesium Mg	40,8 mg/L 1,68 mmol/L	4,7 0,19	36,1 - 45,5 mg/L 1,49 - 1,87 mmol/L	ICP-SFMS	37,7 - 43,9 mg/L 1,55 - 1,81 mmol/L
	41,0 mg/L 1,69 mmol/L	1,8 0,07	39,2 - 42,8 mg/L 1,62 - 1,76 mmol/L	ICP-AES	37,9 - 44,1 mg/L 1,56 - 1,82 mmol/L
Mercury Hg	1,87 $\mu\text{g/L}$ 9,3 nmol/L	0,13 0,6	1,74 - 2,00 $\mu\text{g/L}$ 8,7 - 9,9 nmol/L	ICP-SFMS	1,57 - 2,17 $\mu\text{g/L}$ 1) 7,8 - 10,8 nmol/L
	1,22 $\mu\text{g/L}$ 6,1 nmol/L	0,15 0,7	1,07 - 1,37 $\mu\text{g/L}$ 5,4 - 6,8 nmol/L	AFS	0,9 - 1,5 $\mu\text{g/L}$ 1) 4,6 - 7,6 nmol/L
Nickel Ni	9,8 $\mu\text{g/L}$ 167 nmol/L	0,6 10	9,2 - 10,4 $\mu\text{g/L}$ 157 - 177 nmol/L	ICP-SFMS	8,6 - 11,0 $\mu\text{g/L}$ 1) 147 - 187 nmol/L
Selenium Se	163 $\mu\text{g/L}$ 2,06 $\mu\text{mol/L}$	10 0,13	153 - 173 $\mu\text{g/L}$ 1,93 - 2,19 $\mu\text{mol/L}$	ICP-SFMS	143 - 183 $\mu\text{g/L}$ 1) 1,81 - 2,31 $\mu\text{mol/L}$
	157 $\mu\text{g/L}$ 1,99 $\mu\text{mol/L}$	7 0,09	150 - 164 $\mu\text{g/L}$ 1,90 - 2,08 $\mu\text{mol/L}$	AFS	143 - 171 $\mu\text{g/L}$ 1) 1,81 - 2,17 $\mu\text{mol/L}$
Phosphorous P	113 mg/L 3,6 mmol/L	7 0,2	106 - 120 mg/L 3,4 - 3,8 mmol/L	ICP-SFMS	103 - 123 mg/L 3,3 - 3,9 mmol/L
	107 mg/L 3,5 mmol/L	5 0,2	102 - 112 mg/L 3,3 - 3,7 mmol/L	ICP-AES	97 - 117 mg/L 3,2 - 3,8 mmol/L
Zinc Zn	2520 $\mu\text{g/L}$ 38,5 $\mu\text{mol/L}$	206 3,2	2314 - 2726 $\mu\text{g/L}$ 35,3 - 41,7 $\mu\text{mol/L}$	ICP-SFMS	2108 - 2932 $\mu\text{g/L}$ 1) 32,2 - 44,8 $\mu\text{mol/L}$
	2440 $\mu\text{g/L}$ 37,3 $\mu\text{mol/L}$	333 5,1	2107 - 2773 $\mu\text{g/L}$ 32,2 - 42,4 $\mu\text{mol/L}$	ICP-AES	1774 - 3106 $\mu\text{g/L}$ 1) 27,1 - 47,5 $\mu\text{mol/L}$

1) SERO's assessment

[Explanation of abbreviations](#)

ICP-SFMS: Inductively Coupled Plasma-Sector Field Mass Spectrometry

ICP-AES: Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectroscopy

AFS: Atomic Fluorescence Spectrometry

● Changes from version 08-2009

Additional approximate values of Seronorm™ Trace Elements Serum L-2 LOT 0903107

Component		Approximate values	Method
Antimony	Sb	80 µg/L	ICP-SFMS
Arsenic	As	0,67 µg/L	ICP-SFMS
Barium	Ba	140 µg/L	ICP-SFMS
Barium	Ba	139 µg/L	ICP-AES
Beryllium	Be	6,6 ng/L	ICP-SFMS
Bismuth	Bi	5,2 ng/L	ICP-SFMS
Boron	B	203 µg/L	ICP-SFMS
Bromine	Br	513 µg/L	ICP-SFMS
Cadmium	Cd	0,130 µg/L	ICP-SFMS
Cerium	Ce	58,2 ng/L	ICP-SFMS
Cesium	Cs	24 ng/L	ICP-SFMS
Dysprosium	Dy	4,7 ng/L	ICP-SFMS
Erbium	Er	4,9 ng/L	ICP-SFMS
Gadolinium	Gd	7,0 ng/L	ICP-SFMS
Gallium	Ga	11,3 ng/L	ICP-SFMS
Hafnium	Hf	5,6 ng/L	ICP-SFMS
Holmium	Ho	2,4 ng/L	ICP-SFMS
Iodine	I	89 µg/L	ICP-SFMS
Iridium	Ir	2,4 ng/L	ICP-SFMS
Lanthanum	La	57,7 ng/L	ICP-SFMS
Lead	Pb	1,11 µg/L	ICP-SFMS
Lutetium	Lu	0,8 ng/L	ICP-SFMS
Molybdenum	Mo	0,9 µg/L	ICP-SFMS
Neodymium	Nd	39 ng/L	ICP-SFMS
Niobium	Nb	45 ng/L	ICP-SFMS
Platinum	Pt	11,6 ng/L	ICP-SFMS
Potassium	K	240 mg/L	ICP-SFMS
Potassium	K	240 mg/L	ICP-AES
Praseodymium	Pr	13 ng/L	ICP-SFMS
Rhenium	Re	1,9 ng/L	ICP-SFMS
Rubidium	Rb	9,73 µg/L	ICP-SFMS
Samarium	Sm	13 ng/L	ICP-SFMS
Scandium	Sc	11 ng/L	ICP-SFMS
Silicon	Si	0,97 mg/L	ICP-SFMS
Silver	Ag	0,23 µg/L	ICP-SFMS
Sodium	Na	3736 mg/L	ICP-SFMS
Sodium	Na	3738 mg/L	ICP-AES
Strontium	Sr	36,3 µg/L	ICP-SFMS
Strontium	Sr	36,7 µg/L	ICP-AES
Sulphur	S	1558 mg/L	ICP-SFMS
Sulphur	S	1583 mg/L	ICP-AES
Tantalum	Ta	2,5 ng/L	ICP-SFMS
Tellurium	Te	21 ng/L	ICP-SFMS
Thallium	Tl	31 ng/L	ICP-SFMS
Terbium	Tb	1,6 ng/L	ICP-SFMS
Thorium	Th	3,4 ng/L	ICP-SFMS
Thulium	Tm	0,9 ng/L	ICP-SFMS
Tin	Sn	0,51 µg/L	ICP-SFMS
Titanium	Ti	12,9 µg/L	ICP-SFMS
Tungsten	W	110 ng/L	ICP-SFMS
Uranium	U	48 ng/L	ICP-SFMS
Vanadium	V	1,01 µg/L	ICP-SFMS
Ytterbium	Yb	2,9 ng/L	ICP-SFMS
Yttrium	Y	26 ng/L	ICP-SFMS
Zirconium	Zr	278 ng/L	ICP-SFMS



SERO AS P.O.Box 24, N-1375 Billingstad, Norway. Telephone + 47 66 85 89 00. Telefax +47 66 98 22 01. E-mail: seronorm@sero.no Web: www.sero.no

signature.no



National Institute of Standards & Technology

Certificate of Analysis

Standard Reference Material[®] 1643e

Trace Elements in Water

This Standard Reference Material (SRM) is intended primarily for use in evaluating methods used in the determination of trace elements in fresh water. SRM 1643e consists of approximately 250 mL of acidified water in a polyethylene bottle, which is sealed in an aluminized plastic bag to maintain stability. SRM 1643e simulates the elemental composition of fresh water. Nitric acid is present at a concentration of approximately 0.8 mol/L to stabilize the trace elements.

Certified Values: The certified values for 29 elements in SRM 1643e are listed in Table 1. All values are reported both as mass fractions ($\mu\text{g/kg}$) and as mass concentrations ($\mu\text{g/L}$). A NIST certified value is a value for which NIST has the highest confidence in its accuracy in that all known or suspected sources of bias have been investigated or accounted for by NIST [1]. The certified values are the average of the gravimetrically prepared value and a value determined by either inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) or inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES). The expanded uncertainty for each certified value is calculated as

$$U = ku_c$$

where k is the coverage factor for a 95 % confidence interval and u_c is the combined standard uncertainty calculated according to the ISO and NIST Guides [2]. The value of u_c is intended to represent, at the level of one standard deviation, the combined effect of uncertainty components associated with the gravimetric preparation, the ICP-MS or ICP-OES determination, method bias [3], and stability.

Information Value: A rhenium value is listed in Table 2 for information purposes only. An information value is considered to be a value that will be of interest to the SRM user, but insufficient information is available to assess the uncertainty associated with the value [1]. The information value is based on results from one NIST method.

Expiration of Certification: This certification of SRM 1643e is valid, within the measurement uncertainties specified, until **31 March 2014**, provided the SRM is handled in accordance with instructions given in this certificate. This certification is nullified if the SRM is damaged, contaminated, or modified.

Maintenance of SRM Certification: NIST will monitor this SRM over the period of its certification. If substantive technical changes occur that affect the certification before the expiration of this certification, NIST will notify the purchaser. Registration (see attached sheet) will facilitate notification.

Coordination of the NIST technical measurements was under the direction of T.A. Butler and G.C. Turk of the NIST Analytical Chemistry Division. The ICP-MS analyses were performed by T.A. Butler, L.L. Yu, and G.C. Turk. The ICP-OES analyses were performed by T.A. Butler and G.C. Turk.

Statistical analysis of the experimental data was performed by S.D. Leigh and D.D. Leber of the NIST Statistical Engineering Division.

The support aspects involved in the issuance of this SRM were coordinated through the NIST Measurement Services Division.

Stephen A. Wise, Chief
Analytical Chemistry Division

Gaithersburg, MD 20899
Certificate Issue Date: 26 March 2009
See Certificate Revision History on Last Page

Robert L. Watters, Jr., Chief
Measurement Services Division

SRM 1643e

Page 1 of 3

Table 1. Certified Values, Expanded Uncertainties, and Coverage Factors for Trace Elements in SRM 1643e

Element	Mass Fraction ($\mu\text{g/kg}$)			Mass Concentration ($\mu\text{g/L}$)			<i>k</i>
Aluminum	138.33	$\pm$	8.4	141.8	$\pm$	8.6	3.2
Antimony	56.88	$\pm$	0.60	58.30	$\pm$	0.61	2.0
Arsenic	58.98	$\pm$	0.70	60.45	$\pm$	0.72	2.0
Barium	531.0	$\pm$	5.6	544.2	$\pm$	5.8	2.0
Beryllium	13.64	$\pm$	0.16	13.98	$\pm$	0.17	2.0
Bismuth	13.75	$\pm$	0.15	14.09	$\pm$	0.15	2.0
Boron	154.0	$\pm$	3.8	157.9	$\pm$	3.9	2.4
Cadmium	6.408	$\pm$	0.071	6.568	$\pm$	0.073	2.0
Calcium	31 500	$\pm$	1 100	32 300	$\pm$	1 100	2.8
Chromium	19.90	$\pm$	0.23	20.40	$\pm$	0.24	2.0
Cobalt	26.40	$\pm$	0.32	27.06	$\pm$	0.32	2.0
Copper	22.20	$\pm$	0.31	22.76	$\pm$	0.31	2.1
Iron	95.7	$\pm$	1.4	98.1	$\pm$	1.4	2.0
Lead	19.15	$\pm$	0.20	19.63	$\pm$	0.21	2.0
Lithium	17.0	$\pm$	1.7	17.4	$\pm$	1.7	3.2
Magnesium	7 841	$\pm$	96	8 037	$\pm$	98	2.0
Manganese	38.02	$\pm$	0.44	38.97	$\pm$	0.45	2.0
Molybdenum	118.5	$\pm$	1.3	121.4	$\pm$	1.3	2.0
Nickel	60.89	$\pm$	0.67	62.41	$\pm$	0.69	2.0
Potassium	1 984	$\pm$	29	2 034	$\pm$	29	2.1
Rubidium	13.80	$\pm$	0.17	14.14	$\pm$	0.18	2.0
Selenium	11.68	$\pm$	0.13	11.97	$\pm$	0.14	2.0
Silver	1.036	$\pm$	0.073	1.062	$\pm$	0.075	3.2
Sodium	20 230	$\pm$	250	20 740	$\pm$	260	2.0
Strontium	315.2	$\pm$	3.5	323.1	$\pm$	3.6	2.0
Tellurium	1.07	$\pm$	0.11	1.09	$\pm$	0.11	3.2
Thallium	7.263	$\pm$	0.094	7.445	$\pm$	0.096	2.0
Vanadium	36.93	$\pm$	0.57	37.86	$\pm$	0.59	2.1
Zinc	76.5	$\pm$	2.1	78.5	$\pm$	2.2	2.6

Table 2. Information Value for Trace Elements in SRM 1643e

Element	Mass Fraction ($\mu\text{g/kg}$)	Mass Concentration ($\mu\text{g/L}$)
Rhenium	110	113

Preparation of Material: SRM 1643e was prepared at NIST using only high purity reagents. The containers were acid cleaned before use. In the preparation, a polyethylene cylindrical tank was filled with deionized water and sufficient nitric acid to make the solution approximately 0.8 mol/L. Known masses of the matrix elements (sodium, potassium, calcium, and magnesium) were added to the tank solution as solutions prepared from the same primary materials used to prepare the SRM 3100 Series of Single Element Solutions. Known masses of the other elements were then added to the tank solution using weighed aliquots of the SRM 3100 Series. The final total mass of the tank solution was determined, allowing calculation of the gravimetrically prepared mass fraction for each element. Mass concentrations were calculated using the measured density of 1.025 g/mL. After mixing thoroughly, the solution was transferred to clean 250 mL polyethylene bottles.

INSTRUCTIONS FOR USE

Precautions: The SRM should be shaken before use because of possible water condensation. To prevent possible contamination of the SRM, **DO NOT** insert pipettes into the bottle. Samples should be decanted at a room temperature of 17 °C to 27 °C. After use, the bottle should be recapped tightly and returned to the aluminized plastic bag, which should be folded and sealed with sealing tape. This safeguard will protect the SRM from possible environmental contamination and long-term evaporation.

The accuracy of trace element determinations, especially at the µg/L level, is limited by contamination. Apparatus should be scrupulously cleaned and only high purity reagents employed. Sampling and manipulations, such as evaporations, should be done in a clean environment, such as a Class-100 clean hood.

REFERENCES

- [1] May, W.; Parris, R.; Beck, C.; Fassett, J.; Greenberg, R.; Guenther, F.; Kramer, G.; Wise, S.; Gills, T.; Colbert, J.; Gettings, R.; MacDonald, B.; *Definition of Terms and Modes Used at NIST for Value-Assessment of Reference Materials for Chemical Measurements*; NIST Special Publication 260-136, U.S. Government Printing Office: Washington, DC (2000).
- [2] ISO; *Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement*, ISBN 92-67-10188-9, 1st ed. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland, (1993); see also Taylor, B.N.; Kuyatt, C.E.; *Guidelines for Evaluating and Expressing the Uncertainty of NIST Measurement Results*; NIST Technical Note 1297, U.S. Government Printing Office, Washington, DC (1994); (available at <http://physics.nist.gov/Pubs/>).
- [3] Levenson, M.S.; Banks, D.L.; Eberhart, K.R.; Gill, L.M.; Guthrie, W.F.; Liu, H.K.; Vangel, M.G.; Yen, J.H.; Zhang, N.F.; *An Approach to Combining Results From Multiple Methods Motivated by the ISO GUM*, J. Res. Natl. Inst. Stand. Technol., Vol. 105, p. 521 (2000).

Certificate Revision History: 26 March 2009 (Addition of a Rhenium information value and editorial revisions); 16 March 2004 (Original certificate date).

Users of this SRM should ensure that the certificate in their possession is current. This can be accomplished by contacting the SRM Program at: telephone (301) 975-2200; fax (301) 926-4751; e-mail srminfo@nist.gov; or via the Internet at <http://www.nist.gov/srm>.