

## Zur Analytik von Spurenelementen in biologischem Material

Günther Tölg

Laboratorium für Reinstoffe des Instituts für Werkstoffwissenschaften  
am Max-Planck-Institut für Metallforschung, Katharinenstr. 17, D-7070 Schwäbisch Gmünd

Eingegangen am 8. Mai 1976

---

*On the Analysis of Trace Elements in Biological Material.* It is known, that numerous trace elements can catalyse or inhibit biological processes. Precise studies of their complex interactions require ever lower detection limits and greater reliability in the analytical procedures for the elements bonded in various forms. These analytical problems and current limitations of the trace analytical techniques can be demonstrated by the example of the elements selenium and mercury. The greatest problems lie in the systematic errors inherent in the methods, which are not easily eliminated and increase the difficulty of the analytical measurement as the absolute amount of the element to be determined is decreased. In the mercury example, the highly troublesome way to obtain reliable results also in the very low concentration range is described and a recent developed emission spectrometric method for ng and pg amounts of Hg in a microwave field with excited oxygen is proposed.

Further possibilities for the dependable decomposition of organic matrices with acids and pure oxygen for the determination of environmentally relevant trace elements and current developments from the view point of multielement determinations are discussed. The trend of determination methods points in the direction of X-ray fluorescence analysis after chemical enrichment of the trace elements or solution emission spectrometry with HF or microwave excitation.

*Zusammenfassung.* Die Erkenntnis, daß zahlreiche Spurenelemente biologische Vorgänge stimulieren oder hemmen können, setzt heute zum genauen Studium dieser komplexen Wechselwirkungen immer nachweisstärkere und zuverlässigere Analysenverfahren für die Elemente in ihren verschiedenen Bindungsformen voraus. Diese analytischen Aufgaben werden am Beispiel der Elemente Selen und Quecksilber demonstriert, ebenso die derzeitigen methodischen Grenzen der Spurenanalyse. Die größten Probleme bereiten systematische Fehler der Methoden, die nicht leicht aufzuspüren sind und um so schwerwiegender die analytischen Aussagen belasten, je kleiner die zu bestimmenden absoluten Mengen der Elemente sind. Am Beispiel des Quecksilbers wird der recht mühsame Weg zu zuverlässigen Daten auch in sehr niedrigen Konzentrationsbereichen beschrieben und eine neuentwickelte emissionsspektrometrische Bestimmungsmethode für ng- und pg-Mengen von Hg in anorganischen und organischen Matrices nach Aufschluß mit im Mikrowellenfeld angeregtem Sauerstoff vorgestellt.

Weiterhin werden Möglichkeiten zum zuverlässigen Aufschluß von organischen Matrices mit Säuren und reinem Sauerstoff zur Bestimmung umweltrelevanter Elementspuren ebenso wie aktuelle methodische Entwicklungen unter dem Gesichtspunkt der Multielementbestimmung diskutiert. Der Trend der Bestimmungsmethoden weist in Richtung Röntgenfluoreszenzanalyse nach chemischer Anreicherung der Elementspuren bzw. Lösungsemissionsspektrometrie mit HF- bzw. Mikrowellenanregung.

Analyse von Spurenelementen in Biolog. Material.

---

### 1. Einleitung

In die Untersuchungen biochemischer Vorgänge in der belebten Natur wurden die Elemente über lange

Plenarvortrag anlässlich der Tagung „Biochemische Analytik 76“ 9.–13.4.1976 in München.

Zeit nur zögernd einbezogen. Ein Grund hierfür war sicher ihre Analytik, die zunächst nur die Elemente zu betrachten erlaubte, die in relativ hohen Konzentrationen Bestandteile von Lebewesen sind bzw. sich — in Organen und Drüsen angereichert — an Lebensprozessen beteiligen.

Dagegen machte man sich zunächst nur wenig Gedanken über eventuelle Beziehungen der anderen Elemente zum Leben, die in verschiedenen — teilweise nur sehr geringen — Häufigkeiten unsere Erdkruste aufbauen [15]. Viele von ihnen interessierten die Lebenswissenschaftler erst dann, wenn sie, vom Menschen zu höheren Gehalten angereichert, Lebewesen appliziert wurden und natürliche Gleichgewichte störten. Dieser Störung nahmen sich bevorzugt Toxikologen und Gerichtsmediziner an.

Erst in jüngster Zeit mußten wir alle erfahren, daß die Wechselwirkungen dieser von uns immer stärker aus der Erdkruste in die Biosphäre transferierten Elemente — für die wir das schöne Wort „umwelt-relevant“ geprägt haben — wesentlich komplexer sind als ursprünglich angenommen und zum schwerwiegenden Problem unserer Zivilisation wurden. Leider kam diese Entwicklung so unerwartet rasch über uns, daß wir ihr von Tag zu Tag hilfloser gegenüber stehen. So ist es zu verstehen, daß wir uns aus den verschiedensten Perspektiven heraus hektisch bemühen, diese unerfreuliche Situation zu meistern. Dies konfrontiert uns jedoch zunehmend mit neuen Problemen, die nicht zuletzt darin gipfeln, daß nun das aktivierte riesige interdisziplinäre Aufgebot unter größten Verständigungsschwierigkeiten leidet, die häufig mit der analytischen Sprache beginnen.

Fragen wir jetzt: warum dieses Dilemma?

Bei der Aufklärung der äußerst komplexen Vorgänge, bei denen plötzlich viele Elemente gleichzeitig — teilweise bis in Konzentrationsbereiche ihrer sehr niedrigen Allgegenwart — zur Diskussion stehen, werden analytische Forderungen gestellt, die hinsichtlich ihres Umfangs und der analytischen Güte bis an die Grenzen des methodisch Möglichen gehen. Mit anderen Worten, unsere Gesellschaft erwartet praktisch über Nacht, daß ihre Analytiker im weitesten Sinn des Wortes nur auf diesen Zeitpunkt hingearbeitet haben. Leider war dies aber ganz anders: Analytisches Denken wurde viele Jahrzehnte zurückgedrängt zugunsten fast überall höher bewerteten, produktiven oder konstruktiven Denkens. Ganz besonders darunter zu leiden hatte die Analytische Chemie, die in Lehre und Forschung während über 20jähriger Abwertung gegenüber ihren chemischen Nachbardisziplinen alle die Grundlagen vernachlässigen mußte, die uns heute — vor allem in der Spurenanalyse — fehlen. Da niemand diese Entwicklung voraussehen konnte, dürfen wir heute nur diejenigen tadeln, die trotz aller äußerer Zeichen ein Auf und Ab in der Attraktivität der Wissenschaften nicht wahr haben wollen und — aus welchen Gründen auch immer — noch auf den alten Stellenwerten beharren. Meine Absicht kann es deshalb nur sein,

durch einige fundierte Beispiele aus der Spurenanalyse der Elemente etwas zum Nachdenken anzuregen.

An den Beispielen der Elemente Se und Hg soll die derzeitige Situation der Spurenanalyse der Elemente belegt werden. Zunächst soll versucht werden, die heutigen Aufgaben der Analytik aus strategischer Sicht abzugrenzen. Folgerichtig muß sodann auf die analytische Realität eingegangen und der mühsame Weg skizziert werden, den man zur Überbrückung der großen Kluft zwischen Wunschdenken und Praxis leider gehen muß. Diese Darlegungen weisen schließlich eindeutig auf die Frage: „Wie soll es weitergehen?“ — und somit zum letzten Teil meiner Betrachtungen, der der künftigen Entwicklungen gewidmet sein wird.

## 2. Die strategische Bedeutung der Element-Spurenanalyse

Zunächst aber zum *Beispiel 1*, zum Selen:

Seine biochemische Geschichte veranschaulicht — wie die keines anderen Spurenelementes — den Wandel in der wissenschaftlichen Anschauung und läßt die Komplexität biochemischer Vorgänge deutlich erkennen [6].

Bereits 1842 wurde die Toxizität des Selens bei Tieren nachgewiesen. Die Selenose — die chronische Selenvergiftung — machte deutlich, daß Selen und seine anorganischen und organischen Verbindungen starke Gifte sind, wenn sie in Gehalten  $\geq 5$  ppm über längere Zeiträume inkorporiert werden [24]. So prägte ausschließlich die Giftigkeit des Selens viele Jahre seine Rolle in der Biochemie. 1943 kam der Verdacht auf, daß Selen auch krebserregend sein könne. Damit verstärkte sich sein unheilvolles Image, das ihm heute noch unbewiesen anlastet. Erst 1957 wechselte die Szenerie, als Schwartz u. Flotz entdeckten, daß ihm auch die Eigenschaften eines essentiellen Spurenelementes zugeschrieben werden müssen.

Selenmangel ruft, wie jetzt beobachtet wurde, die gleichen Erscheinungen hervor, wie Vitamin E-Mangel. Der synergetische Zusammenhang zwischen beiden Stoffen ließ gemeinsame physiologische Ursachen vermuten. Dies aktivierte die Selenforschung jetzt unter umgekehrten Vorzeichen. Zuwenig Selen und/oder Vitamin E in der Nahrung führt zum Tod von Neugeborenen bei Tieren und auch Menschen. Erst kürzlich konnte nun nachgewiesen werden [5,26], daß ein Enzym, die Glutathionperoxidase (GSH-Peroxidase) stöchiometrische Mengen Selen enthält und das Selen ein essentieller Bestandteil eines wichtigen Enzyms ist. Dies läßt den Schluß zu, daß Selenmangel die physiologische Funktion der GSH-Peroxidase hemmt und erklärt die pathologischen

Befunde bei Se-Diät, die auf oxidative Zerstörung von Zell- und Organmembranen zurückzuführen sind.

Eine weitere, erst kürzlich gemachte Beobachtung spricht für die notwendige Gegenwart geringer Se-Gehalte: Selen bindet toxische Schwermetalle in Organismen, z.B. Hg, Ag, Cd und vielleicht auch Pb [4, 11, 13]. Doch weiß man noch so gut wie nichts über die förderlichen Konzentrationen und den Mechanismus der Maskierung, der vermutlich über inerte Selenide oder auch Selenite führt. Andere Beobachtungen lassen jetzt sogar anticancerogene Wirkungen des Selen erwarten [14]. Damit zeichnet sich für den Analytiker ein sehr unbehagliches Gefühl ab: Die Grenzkonzentration der Toxizität des Selen und seine Mindestkonzentration als essentielles Spurenelement liegen vermutlich nicht viel mehr als 2 Größenordnungen auseinander, wenn man dem neuesten Stand der Selenforschung Glauben schenken darf.

Gleich zum *zweiten Beispiel*, das eng mit der Selenproblematik zusammenhängt:

Es berührt kurz die nicht weniger aktuelle umweltrelevante Biochemie des *Quecksilbers*, dessen Giftigkeit und biologische Wirksamkeit die Gemüter schon seit dem Altertum bewegt. Wie alle chemischen Elemente ist es allgegenwärtig, wenn auch nur in sehr niedrigen Konzentrationen [3, 23]. Ganz besonders interessieren jedoch seine mobilen Phasen: der Metallampf und bestimmte metallorganische Verbindungen – die Formen, in denen letztlich alles anthropogene Hg in unserer Biosphäre angereichert wird. Durch ein grobes Beobachtungsraster gesehen, kann diese Tatsache zur Prophezeiung katastrophaler Folgen verleiten: Allein die Hg-Menge, die durch Verbrennungs- und Erhitzungsprozesse aus unseren Rohstoffen in die Atmosphäre gelangt [19], würde ausreichen, binnen weniger Generationen alles Leben in hochtechnisierten Gebieten auszulöschen. Es läßt sich heute zwar eine erhebliche Anreicherung des Hg in unseren Kulturböden feststellen (Abb. 1), aber man darf trotzdem mit großer Wahrscheinlichkeit behaupten, daß diese Gefahr sich nicht so schnell einstellen wird. Der größte Teil des Quecksilbers wird mit verhältnismäßig kurzer Halbwertszeit wieder in biologisch inaktiver Form festgelegt, z.B. als praktisch unlösliche Verbindungen (HgSe, HgS usw. [27]). Ausnahmen treten allerdings immer dann auf, wenn in Ermangelung antagonistischer Reaktionspartner (z.B. Se und S) naturgegebene Gleichgewichte stark gestört werden [20, 27] (bei den japanischen Unfällen in der Minamata-Bucht z.B. durch Anreicherung von hohen Hg-Gehalten in biologisch aktiver Form, z.B. als Methylquecksilber, in der Nahrungskette).

Dieses Beispiel weist auf die Rolle des Analytikers hin, die Gesellschaft vor einer übertriebenen Umwelthysterie bewahren zu helfen.

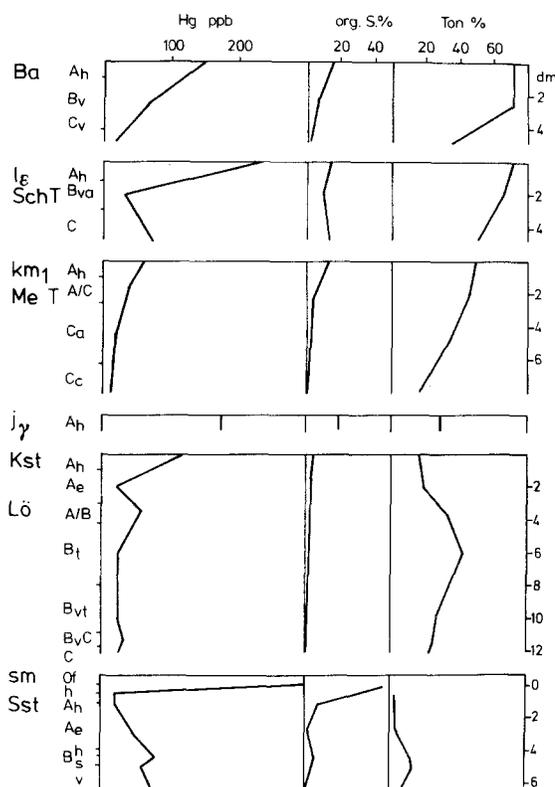


Abb. 1. Quicksilbergehalte in verschiedenen Bodentypen (*Ba* = Basalt; *SchT* = Schieferton; *MeT* = Mergelton; *Kst* = Kalkstein; *Lö* = Löß; *Sst* = Sandstein) und Bodenprofilen aus dem Gebiet des Schwarzwaldes nach E. Schlichting und G. Tölg, unveröffentlicht. Das Quecksilber ist in den A-Horizonten (obere Bodenschichten) stark angereichert

Im speziellen Fall der Hg-Problematik liefert die Bestimmung der Gesamtquecksilbergehalte im Rahmen der Umweltüberwachung ein völlig falsches Bild. Das Hg muß zusätzlich in seine biologisch verschieden wirksame Substanzklassen (z.B. metallische, ionogene, metallorganische) aufgeschlüsselt werden. Auch müßten die Gehalte antagonistischer Elemente (z.B. Se) berücksichtigt werden, die – wenn in überstöchiometrischer Menge vorhanden – den größten Teil des in die Biosphäre emittierten Hg fixieren. Diese prinzipiellen Erwägungen sind jedoch nur ein Teil der Schwierigkeiten, die den Analytiker z.Z. tangieren. Viel schwerwiegender und bedenklicher scheinen mir diejenigen, die sich leider bereits bei der Bestimmung des Gesamtgehaltes des Hg ergeben. Ich werde gleich darauf zurückkommen.

Nach dieser Skizzierung zweier biochemischer Problemstellungen aus der Fülle der möglichen, die die analytischen Aufgaben eindeutig zu formulieren erlauben, müssen wir jetzt fragen, ob sie auch gelöst werden können?

Bei der Beantwortung dieser Frage scheiden sich allerdings die Geister in zwei Lager: in das der

„Datenoptimisten“ und das der „Datenpessimisten“ – überspitzt ausgedrückt. Die einen berufen sich auf bewährte Analysemethoden, wie sie ja schon von vielen Geräteherstellern angepriesen werden und sehen keinerlei Probleme in ihrer Handhabung. Die anderen argumentieren, daß man dieser kommerzialisierten Analytik keinesfalls trauen darf, zumindest nicht in speziellen Fällen, da müßte man erst noch leistungsfähige Methoden ausarbeiten.

Jeder erfahrene Spurenanalytiker hat jedoch längst gelernt, daß er sich im ppb-Bereich unmöglich so absichern kann, daß er jedem Vorwurf der Unzulänglichkeit entgeht. Deshalb schadet dem Spurenanalytiker nichts mehr, als Mangel an Selbstkritik. Mit diesem Zweckpessimismus ist die Partei des Moderators, dessen Rolle zu übernehmen, ich hier dankenswerterweise gebeten wurde, bereits eindeutig bestimmt. Man darf nicht vergessen, daß die plötzlich einsetzende und ständig wachsende Nachfrage nach analytischen Daten und die sprunghafte Verlagerung der Probleme in den Spurenbereich – teilweise bis an die Grenzen des überhaupt Möglichen – unbedingt neue kritische Diskussionen über Qualitätsbegriffe von Analysendaten in diesem erweiterten Bereich erforderlich machen. Aus einem großen Angebot von Beispielen, die diese Notwendigkeit leider allzu deutlich durch Ergebnisse von Ringuntersuchungen auf nationaler und internationaler Ebene belegen, möchte ich nur den einen Fall – Quecksilber – herausgreifen.

### 3. „Richtige“ Analyseergebnisse

Bei einer Ringuntersuchung zur Bestimmung niedriger Hg-Gehalte in einer Milchpulverprobe, an der sich über 10 leistungsfähige Laboratorien beteiligten, streuten die Ergebnisse zwischen 0,5 und 136 ppb (Tabelle 1). Jedes Laboratorium konnte mit verhältnismäßig befriedigenden Standardabweichungen aufwarten. So erwartete man auch in diesem Fall, daß nach den Gesetzen der Fehlerstatistik der arithmetische Mittelwert des Kollektivs von 35 ppb dem „wahren“ bzw. „richtigen“ Gehalt sehr nahe kommen müßte. Es konnte aber eindeutig gezeigt werden, daß der niedrigste Wert von 0,5 ppb dem richtigen am ehesten entspricht.

Er wurde mit drei unterschiedlichen Methoden übereinstimmend gefunden, bei deren Entwicklung man sich bemüht hatte, alle systematischen Fehler zu finden und möglichst niedrig zu halten. Bei einer üblichen statistischen Auswertung wäre jedoch gerade dieser Wert – als ein sehr unwahrscheinlicher – einem Ausreißertestverfahren zum Opfer gefallen. Es muß aber sehr ausdrücklich darauf hingewiesen werden, daß diese Problematik der Richtigkeit von Ana-

Tabelle 1. Quecksilber-Ringuntersuchung des Arbeitsausschusses „Umweltschutz-Analytik“ im Chemikerausschuß der GDMB. □ Dieser Wert liegt dem wahren Gehalt am nächsten

Mittelwerte der Laboratorien [ppb]	Gesamtmittelwert [ppb]	Standardabweichung [ppb]	Variationskoeffizient [%]
10	35,5	44	124
1			
100			
8			
□ 0,5			
10			
44			
1,4			
50			
11			
136			
54			

lysenresultaten bei höheren Gehalten schnell zurücktritt.

Reproduzierbare Ergebnisse garantieren in der Spurenanalyse also nicht unbedingt auch ihre „Richtigkeit“. Der Einfluß der „systematischen“ Fehler, die die Richtigkeit der Analysendaten beeinträchtigen, kann also – abhängig von der Methode, der Matrix und den Elementspuren – ab einer bestimmten Grenze der Gehalte nach unten (etwa < 1 ppm) so überhandnehmen, daß es sogar unsinnig werden kann, Ergebnisse statistisch optimieren zu wollen, da u. U. die wichtigste Voraussetzung dafür – die Gültigkeit einer Normalverteilung der Fehler – gar nicht vorhanden ist [21]. Solche Ergebnisse, bei denen Unterschiede von 1 Größenordnung bei der Bestimmung des Hg-Gehaltes im unteren ppb-Bereich einer „umweltrelevanten Matrix“ heute noch toleriert werden müssen, stimmen besonders nachdenklich, wenn man sie auf die anfangs angedeutet Problematik der wesentlich differenzierten Betrachtung des biochemischen Hg-Kreislaufes projiziert, bei der nun auch noch die verschiedenen Bindungsformen des Hg unbedingt zu berücksichtigen sind.

Beim Selen liegen die Verhältnisse nicht wesentlich anders, wenn wir uns vergegenwärtigen, daß z. B. nach der neuen Trinkwasserverordnung – die im Falle Selen sicher nicht den neuesten Erkenntnissen gerecht wird – für Verfahren zur Bestimmung von Selengehalten um 8 ppb – der zuverlässigen Grenzkonzentration – eine Schwankungsbreite der Fehler von nur 30% zugelassen wird [22].

Es ist sicher nicht erforderlich, diese hier angesprochene Problematik noch mehr zu vertiefen.

Fragen wir gleich: „Welche Chance haben wir Analytiker, die Qualität solcher analytischer Informationen, die weitreichende Konsequenzen haben kann, zu verbessern?“

Zunächst muß man die Antwort bei den systematischen Fehlern suchen, die – wie heute bekannt – um so mehr als Ursache schwerwiegender Diskrepanzen in Frage kommen, je niedriger der zu bestimmende Gehalt eines Elementes ist.

#### 4. Systematische Fehler als Ursache falscher Ergebnisse

Die Fehlerquellen sind vielschichtig und verteilen sich jeweils über das gesamte Analysenverfahren von der Probennahme bis zur Auswertung der Analysendaten [16, 17].

Bei direkten instrumentellen Verfahren, z.B. bei der instrumentellen Aktivierungsanalyse (IAA), Festkörpermassenspektroskopie (FMS), Emissionsspektalanalyse (OES) oder Röntgenfluoreszenzanalyse (RFA) [21], treten sie bevorzugt bei der Probenvorbereitung und beim Anregungsvorgang auf, weniger bei der spektralen Trennung der Signale oder ihrer Detektion. Eine weitere schwerwiegende systematische Fehlerquelle ist die Eichung all dieser Relativverfahren mit genau analysierten Standardproben, die in diesen Fällen fast nie zur Verfügung stehen.

Bei den zwar einfacher zu eichenden Lösungs- bzw. sog. Verbundverfahren, wie z. B. bei der AAS oder bei voltammetrischen Verfahren [21] treten aber neue, anders geartete Fehlerquellen auf durch die erforderlichen Aufschluß-, Trenn- und Anreicherungsoperationen, die vor allem auf Elementblindwerten aus Luft, Reagentien und Gerätematerialien, auf Wechselwirkungen oder kleinen zu bestimmenden Absolutmengen (ng- und pg-Bereich) in Gasen und Lösungen an Phasengrenzflächen (Adsorption, Desorption, Verflüchtigung u. a.) beruhen und die mit niedriger werdenden Elementkonzentrationen exponentiell wirksam werden.

Es wäre ein sehr zeitraubendes Unternehmen, sie alle beschreiben zu wollen, dazu sind Verallgemeinerungen sehr gefährlich, da von Fall zu Fall andere Parameter und Störungskombinationen zu berücksichtigen und Extrapolationen die größte Fehlerquelle sind.

Zunächst jedoch einige Möglichkeiten der Erkennung von systematischen Fehlern [17]:

Man untersucht z. B. eine sorgfältig ausgewählte Probe nach mindestens zwei oder drei verschiedenen Verfahren mit verfahrenstechnisch unterschiedlichen systematischen Fehlerquellen. Oder man kann gestaffelte Einwaagen der gleichen Probe analysieren bzw. der Probe definierte, ebenfalls gestaffelte Mengen

des Elementes in Form von Standardlösungen zusetzen.

Der systematische Fehler kann auch radiochemisch kontrolliert werden, wenn ein radioaktives Nuklid mit meßtechnisch geeigneter Strahlungsenergie und Halbwertszeit des zu bestimmenden Elementes zugänglich ist.

Die beste Lösung für die Ausschaltung der systematischen Fehler ist es, das Verfahren von vornherein so zu optimieren, daß die Fehler so klein wie irgend möglich sind. Die umfangreichen statistisch signifikanten Ausbeutebestimmungen zur Überprüfung der einzelnen Analysenschritte sind zwar recht mühevoll, lohnen sich aber immer. Wenn irgend möglich, wird man sich dabei radiochemischer Tracermethoden bedienen.

In der Praxis der ppb-Spurenanalyse kommt man in den meisten Fällen nur durch Kombination dieser verschiedenen Methoden zum Ziel.

Im folgenden sollen die wichtigsten systematischen Fehlerquellen etwas eingehender beschrieben werden:

*Elementblindwerte* möglichst klein und konstant zu halten, ist mit Abstand das schwierigste Problem in der extremen Spurenanalyse. Die Tatsache, daß praktisch jedes Element in jeder Substanz, jedem Wirkstoff – selbst wenn sie komplizierten Reinigungsprozessen unterworfen wurden – allgegenwärtig ist und ab bestimmten Grenzkonzentrationen sich als Element-Blindwert bemerkbar macht, begrenzt somit in einem vorgegebenen System das Nachweisvermögen einer spurenanalytischen Methode. In grober erster Näherung kann geschlossen werden, daß sich der Blindwert eines Elementes um so einfacher beherrschen läßt, je geringer dessen prozentuale Häufigkeit in der Erdkruste ist [15].

Die Laboratoriumsluft jedoch kann neben den besonders häufig auftretenden Elementen noch viele Elemente u. U. – je nach der Vorgeschichte des Labors – stark angereichert enthalten, ganz besonders jedoch der Laboratoriumsstaub.

Die Entwicklung der Hochleistungs-Schwebestoff-Filter ist aber heute soweit fortgeschritten, daß ganze Räume von Staubteilchen weitestgehend freigehalten werden können [18, 21].

Weit komplexer werden die Verhältnisse bei gasförmigen Verunreinigungen in der Luft, die sich nicht abfiltern lassen. Da das Hg zu ihnen zählt, das in der Laboratoriumsluft zudem besonders stark angereichert sein kann, führt es leicht zu unkontrollierbaren Blindwerten und Kontaminationen von Proben, Geräteoberflächen und Reagentien (Tabelle 2), auf die in erster Linie die vorhin beschriebenen, starken Streuungen der Ergebnisse der Ringuntersuchungen zurückzuführen sind.

Die kommerziellen reinsten Reagentien genügen oft kaum noch den Ansprüchen der extremen Spurenanalyse, ihre erzielbaren Reinheitsgrade liegen im unteren ppb-Bereich. Es gibt überhaupt nur noch wenige Reagentien, die sich wie Wasser, Salzsäure, Flußsäure und Salpetersäure verhältnismäßig leicht sehr rein darstellen lassen. Es sind von Fall zu Fall erst sehr aufwendige Reinigungsverfahren zu entwickeln [18].

Tabelle 2. Kontamination von Oberflächen verschiedener Materialien durch Quecksilber beim Lagern an Luft [20]

Exponiertes Material	Expositionsort	Expositionsdauer [h]	Aufgenommene Quecksilbermenge [ng]
Bodenprobe <sup>a</sup>	Laboratorium (ohne Luftbewegung/statisch)	45	2
	Reinraum (Luftdurchsatz 20 m <sup>3</sup> /min)	45	4
Goldplättchen <sup>b</sup>	Laboratorium (statisch)	6	2,8
	Reinraum (Luftdurchsatz 20 m <sup>3</sup> /min)	6	3,6
	Reinraum (clean bench)	6	3,5
	Reinraum (Besucher)	14	32
	Laboratorium (statisch)	14	10
	Laboratorium (statisch)	46	36
Glas <sup>b</sup>	Laboratorium (statisch)	6	0,5

<sup>a</sup> 100 mg auf ca. 5 cm<sup>2</sup> verteilt.

<sup>b</sup> 1 cm<sup>2</sup> Oberfläche.

*Adsorptionseffekte.* Die Verluste durch Wechselwirkungen sehr verdünnter Analysenlösungen mit den Oberflächen der Aufbewahrungsgefäße liegen größenordnungsmäßig bei 10<sup>-9</sup> – 10<sup>-12</sup> Mol/cm<sup>2</sup> Oberfläche. Eine Vielzahl von Parametern ist dabei zu berücksichtigen, wie Art des Gefäßmaterials, Ionenart, Ionenkonzentrationen, pH-Wert, weitere Lösungspartner, Temperatur, Kontaktzeit und nicht zuletzt die Beschaffenheit der Oberfläche und ihre Vorbehandlung. Wiederum am Beispiel des Hg lassen sich diese Effekte besonders gut demonstrieren (Abb.2). Ausschalten kann man sie, wenn man die Oberfläche von Fall zu Fall speziell konditioniert oder – wie hier – komplexierende Reagentien schon bei der Probennahme der Lösung zusetzt. Entsprechende Untersuchungen sind also unbedingt bei jeder Ausarbeitung spurenanalytischer Verfahren mit einzubeziehen [21].

Aus gleichen Gründen ist auch die Konstanthaltung des Titers bei der Aufbewahrung sehr verdünnter Standard- und Maßlösungen problematisch. Die günstigsten Aufbewahrungsbedingungen sind von Fall zu Fall vorher zu untersuchen. Die vielseitigen Wechselwirkungen von verdünnten Ionenlösungen mit den verschiedenen Behältermaterialien, die bei Lösungskonzentrationen < 10<sup>-6</sup> M zunehmend ins Gewicht fallen, sind derart komplex, daß auch hier dringend vor irgendwelchen Verallgemeinerungen gewarnt werden muß. Aus diesem Grund sollte man z.B. bei Dosierung von Elementgehalten im ng- bzw. pg-Bereich immer Lösungen verhältnismäßig hoher Konzentrationen, z. B. 10<sup>-4</sup> – 10<sup>-5</sup> M Standardlösungen im µl-Bereich mit Ultramikrobüretten abmessen [19].

All diese Erfahrungen, die dem Radiochemiker schon lange bekannt sind, werden leider nur langsam Allgemeingut des Spurenanalytikers.

Aber auch die Konditionierung einer Oberfläche kann sehr problematisch werden, wie Abbildung 3

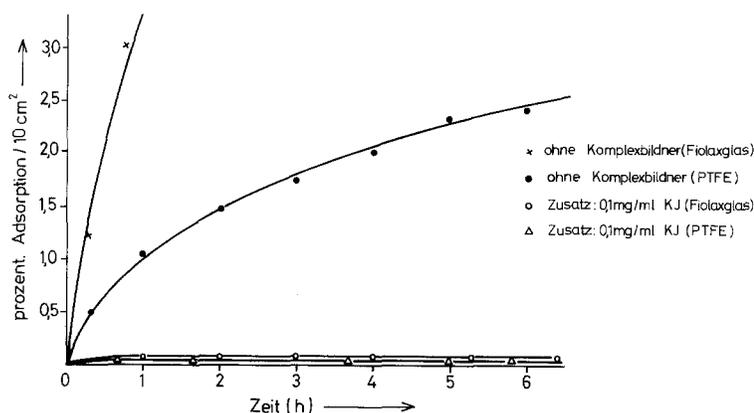


Abb.2. Verluste von Quecksilber aus wäßrigen Lösungen (0,5 N HNO<sub>3</sub>, 2 ppb <sup>203</sup>Hg<sup>2+</sup>) durch Adsorption an PTFE und Fiolaxglas mit und ohne Zusatz von Komplexbildnern



Abb. 3. Veränderung der effektiven Oberfläche von PTFE bei Behandlung mit konz.  $\text{HNO}_3$  bei ca.  $170^\circ\text{C}$  in einem Druckgefäß. Links: unbehandelt (ERM: 3000fach vergrößert). Rechts: nach  $\text{HNO}_3$ -Behandlung (ERM: 1000fach vergrößert)

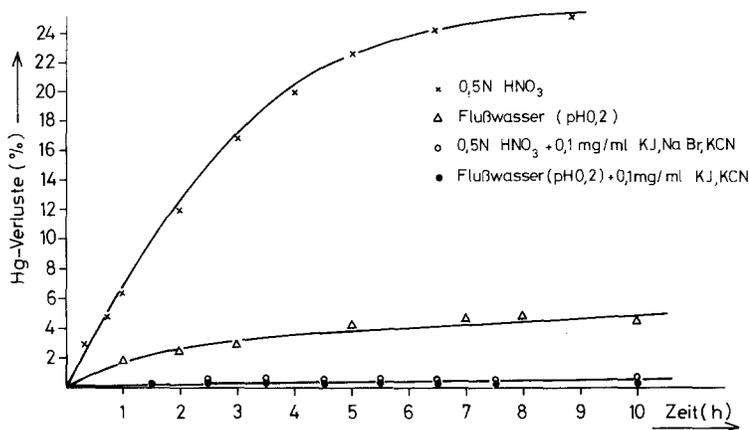


Abb. 4. Verflüchtigung von Quecksilber aus wäßrigen Lösungen. ( $0,5\text{ N HNO}_3$ ,  $2\text{ ppb }^{203}\text{Hg}^{2+}$ , PTFE-Gefäß,  $1,5\text{ cm}^2$  Flüssigkeitsoberfläche ohne Bewegung bei  $20^\circ\text{C}$ )

von PTFE-Oberflächen unter einem Rasterelektronenmikroskop zeigt: die eine Teflonoberfläche, jungfräulich (ERM: 3000fach vergrößert), und die andere nach mehrfacher Behandlung mit konz.  $\text{HNO}_3$  bei ca.  $170^\circ\text{C}$  unter Druck (ERM: 1000fach vergrößert).

Da kein Werkstoff chemisch indifferent ist – wie eben am PTFE demonstriert –, überlagern sich den normalen Adsorptionseffekten an der Oberfläche chemische Reaktionen, die vor allem bei Temperaturen  $> 200^\circ\text{C}$  beachtlichen Umfang annehmen können.

Adsorptions- und Desorptionseffekte treten selbstverständlich auch bei allen Filtrationsoperationen auf. Am geringsten sind sie bei PTFE-Membran-

filtern, die seit jüngster Zeit zur Verfügung stehen. Sie stören aber auch oft Ionenaustausch- und andere Trennverfahren mit festen Phasen. Bei Flüssig-Flüssig-Verteilungsverfahren lassen sie sich erst mit speziellen Techniken weitestgehend ausschalten [19].

*Verflüchtigungen* sind ebenfalls oft Ursachen schwerwiegender systematischer Fehler, besonders dann, wenn man nicht mit ihnen rechnet. Auch stark verdünnte Lösungen von Hg, Se, As z.B. können nur unter ganz speziellen Vorkehrungen verlustlos eingedampft werden (vgl. Abb. 4).

Gerade beim Hg muß auch berücksichtigt werden, daß es als Metalldampf bereits bei Zimmertemperatur leicht durch Plastikfolien diffundiert, wobei die Ge-

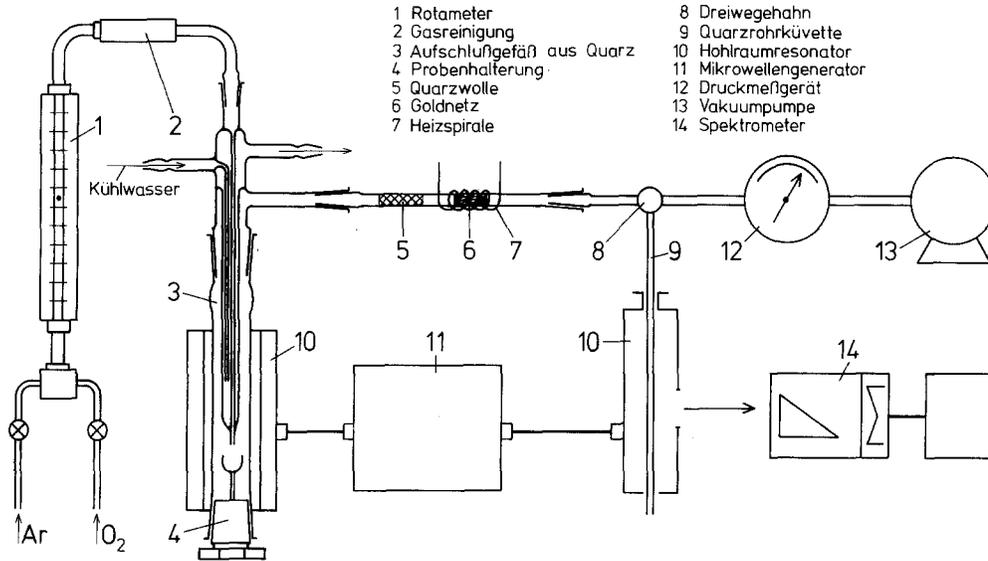


Abb.5. Funktionsschema einer Apparatur zur emissionsspektrometrischen Bestimmung von Hg-Gehalten  $\geq 0,05$  ppb in anorganischen und organischen Matrices. Ein Mikrowellengenerator mit zwei Entladungsräumen ermöglicht die Kombination eines Aufschlusses der Probe durch im Mikrowellenfeld angeregten Sauerstoff mit der Bestimmung des Hg durch Anregung in einem mikrowelleninduzierten Argonplasma

fahr, daß durch die Laboratoriumsluft, die oft relativ hohe Hg-Konzentrationen aufweist, eine in Plastikfolien verpackte Probe bei der Lagerung Hg aufnimmt, bedeutend größer ist, als daß sie Hg an die Luft verliert. Hierdurch können Proben mit Hg-Gehalten im ppb-Bereich um Größenordnungen kontaminiert werden.

*Durch chemische Umsetzungen bedingte Fehler:* Bekannte Beispiele sind Wertigkeitsänderungen durch Oxidation oder Reduktion (z. B. durch Staub, Plastikmaterial), durch bakterielle Umsetzungen  $S^{2-}/SO_4^{2-}$  oder photochemische Reaktionen.

Ein weiteres Beispiel sind Fällungsaustauschreaktionen z. B. beim Hg (Zementation an unedleren Metallen oder chemische Wechselwirkungen an Schlauchoberflächen mit anderen Elementen wie Cl bei PVC oder Sb bei rotgefärbtem Gummi u. a.). Noch viel zu wenig bekannt und untersucht sind auch chemische Umsetzungen beim Anregungsvorgang einer Probe z. B. bei der optischen Emissionsspektroanalyse (OES) oder bei der AAS mit flammenloser Atomisierung [17].

##### 5. Wie lassen sich systematische Fehler ausschalten?

Optimal wäre es, alle Schritte eines mehrstufigen Verbundverfahrens, also Probenaufschluß, Abtrennung der Elementspuren und ihre Bestimmung in einem geschlossenen System mit möglichst kleiner Oberfläche aus indifferenten Werkstoffen bei möglichst niedriger Temperatur ablaufen zu lassen. Dabei

darf nur ein Minimum leicht zu reinigender Reagentien verwendet werden. Verflüchtigungen sind zu unterbinden, oder so zu leiten, daß sie quantitativ verlaufen und die verflüchtigten zu bestimmenden Elemente quantitativ aufgefangen werden können und bei der Anreicherung bzw. Abtrennung und der Bestimmung, gasförmig bleiben [18].

In diesem Zusammenhang ist das Prinzip der Verdampfungsanalyse, das auf Bunsen zurückgeht und von Geilmann in den 50er Jahren in die Spurenanalyse eingeführt wurde, immer noch – wenn anwendbar – unübertroffen. (Die flüchtigen Elemente bzw. ihre flüchtigen Verbindungen werden bei entsprechenden Temperaturen durch einen Trägergasstrom von den nicht flüchtigen Matrixelementen abgetrennt) [18].

Bei der Bestimmung leicht flüchtiger Elemente (z. B. von Hg), traten zunächst große Probleme auf, da eine vollständige Kondensation des Hg aus dem Trägergasstrom im ng- und pg-Bereich nicht gelang; sie sind jedoch in jüngster Zeit gelöst worden: Die Methode erlaubt nun, 0,05 ng Hg in anorganischen und organischen Matrices zuverlässig zu erfassen. Bei Probenmengen um 1 g lassen sich also noch 0,05 ppb nachweisen, Gehalte die schon weit unterhalb der Allgegenwartskonzentration des Hg liegen.

Durch umfangreiche systematische Untersuchungen mit Hilfe von Radiotracer ( $^{203}\text{Hg}$ ) konnte die Richtigkeit des Verfahrens belegt werden. Die Probe (max. 1 g) wird in einem Quarzgefäß (3 in Abb.5)

mit im Mikrowellenfeld aktiviertem Sauerstoff langsam verascht. Das mit den Verbrennungsprodukten freigesetzte Hg wird an einer kleinen Säule aus Goldgaze (6) durch Amalgambildung zurückgehalten. Die Ausbeute beträgt bei Mengen  $\geq 50$  pg  $> 97\%$ . Durch Aufheizen der Säule im Argonstrom wird das auf dem Gold gesammelte Hg in die Quarzcapillare (9) überführt. In ihr wird das Argon durch einen 2. Mikrowellenresonator angeregt und das emittierte Hg-Licht (253,7 nm) integrierend photometriert [8].

Diese enge Kopplung des Prinzips der Verdampfungsanalyse mit sehr nachweisstarken Detektoren ermöglicht, noch eine Anzahl weiterer Elemente, z. B. Se [10] aber auch Te, As, Sb, Bi, Tl, B und Si in anorganischen und organischen Matrices in Konzentrationsbereichen zu bestimmen, die mit den konventionellen Techniken wegen zahlreicher systematischer Fehlerquellen nicht mehr erfaßt werden können, worauf leider nicht näher eingegangen werden kann.

Welche optimalen methodischen Möglichkeiten ergeben sich für die Bestimmung der Elemente, bei denen sich die Einzeloperationen eines Verbundverfahrens nicht in der eben aufgezeigten idealen Weise des geschlossenen Systems verbinden lassen, was leider für die meisten Elemente (z. B. Cu, Cd, Pb, Te, Mo, V) zutrifft?

Wir erhalten zusätzlich weitere systematische Fehler beim Überführen der Elemente von einem System ins andere und auch die meisten Operationen, die der eigentlichen Bestimmung der Elemente vorgeschaltet werden müssen, wie z. B. Mineralisieren, Einengen, Ausschütteln, Mitfällen oder andere Trennverfahren sind fehlerbehafteter. Hier können ebenfalls nur neue Techniken weiterhelfen. Ein wesentlicher Gesichtspunkt ist dabei, z. B. alle Operationen nach Möglichkeit wenigstens im gleichen Gefäß durchzuführen. Dies konnte bereits in mehreren Fällen mit guter Näherung verwirklicht werden, wie die beiden folgenden Möglichkeiten zeigen sollen: Schon seit einigen Jahren haben sich zum Mineralisieren von organischen Proben Aufschlüsse in Druckgefäßen aus PTFE z. B. mit Salpetersäure bewährt (geringe systematische Fehler). Bei dieser Operation können weder flüchtige Elemente (z. B. Hg, Se, As, J) verloren gehen, noch Blindwerte eingebracht werden. Bei zweckmäßiger Konstruktion solcher Aufschlußbomben [21] lassen sich dann auch alle weiteren Anreicherungsoperationen im gleichen PTFE-Gefäß fast frei von systematischen Fehlern durchführen [9, 19].

Auch eine zweite Anordnung — eine Weiterentwicklung eines schon früher beschriebenen Prinzips [12] — gewährt diese Vorteile (Abb. 6). Mit ihr können Probenmengen bis zu 2 g in reinem Sauerstoff bei geringster Oberfläche der Apparatur nach Zündung durch einen IR-Strahler verbrannt werden.

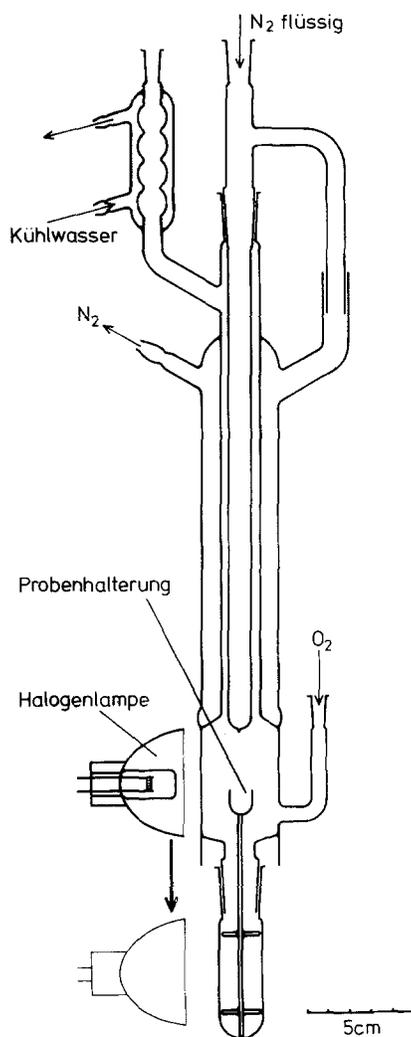


Abb. 6. Apparatur zur Veraschung organischer Proben (max. 2 g) im Sauerstoffstrom zur Bestimmung von Elementspuren im ng- und pg-Bereich

Im oberen Teil der Vorrichtung werden alle Verbrennungsprodukte mit flüssigem Stickstoff kondensiert. Die dort gleichzeitig festgehaltenen flüchtigen Elemente können ebenso wie die nichtflüchtigen, im Verbrennungsraum verbliebenen, anschließend mit einer minimalen Säuremenge durch Rückflußkochen von den Wänden der Quarzapparatur gelöst und im unteren Schließglas gesammelt werden.

In diesem Gefäß können dann auch wieder alle weiteren Operationen durchgeführt werden.

Das Arbeiten im optimierten offenen System bei der Bestimmung kleinster Te-Gehalte wurde bereits in dieser Zeitschrift beschrieben [7].

Man erkennt leicht, worauf es bei diesen Verbundverfahren, letztlich immer wieder ankommt: Die zu bestimmenden Elementspuren sind nach kontrollierter Isolierung in kleinsten Bestimmungsvolumina bzw.

auf möglichst kleinen Anregungsflächen möglichst nachweisstarken Detektoren zuzuführen, ohne dabei von den zu bestimmenden Elementen störende Mengen einzubringen oder zu verlieren. Die Wahl der Bestimmungsverfahren für die isolierten Elemente hat sich in erster Linie danach zu richten, ob sie sich bei Vermeidung systematischer Fehler in den Verfahrensverbund einpassen lassen.

Neben den atomspektroskopischen Verfahren erfreuen sich hierbei auch elektroanalytische Verfahren einer Renaissance. Besonders zu erwähnen sind die Inverse Voltammetrie und die Puls polarographie.

In speziellen Fällen gehören aber auch die gaschromatographische Elementbestimmung (z. B. Se und Be) und katalytische Verfahren (z. B. F, J, V, Mo) zu den Bestimmungsmethoden der Lösungsverfahren in der extremen Spurenanalyse [21].

### 6. Künftige methodische Entwicklungen

Die angeschnittenen Probleme und ihre Lösungsversuche stehen für viele andere in der Spurenanalyse der Elemente. Der hier propagierte Weg ist kein bequemer.

Die sorgfältige Ausarbeitung nur eines solchen extrem nachweisstarken Ein-Elementverfahrens, das allerdings für möglichst universelle – also matrixunabhängige – Anwendung konzipiert ist, nimmt in der Regel mehr als 1-Mannjahr in Anspruch. Auch der routinemäßige Einsatz ist personal- und zeitintensiv. Die Zukunft gehört deshalb zweifellos wirtschaftlicheren, nachweisstarken Multi-Elementverfahren. Nur darf man nicht übersehen, daß deren Optimierung hinsichtlich Richtigkeit im Extrembereich schwerlich an den genannten Ein-Elementverfahren vorbeiführt, weil nur mit ihnen „richtige“ Standards bzw. Bezugsgrößen geschaffen werden können.

In der Spurenanalyse biologischer oder – allgemein – umweltrelevanter Matrices wird man noch auf längere Sicht auf Lösungs- bzw. Verbundverfahren angewiesen sein im Gegensatz zur Festkörper- oder Reinstoff-Analytik, in der Instrumentelle Aktivierungsanalyse (IAA), Festkörpermassenspektroskopie (FMS) u. a. instrumentelle Direktverfahren schneller zu – richtigen – Ergebnissen führen [21].

Es ist nicht möglich, bei allen diesen Verfahren eine Rangordnung festzulegen, da diese sich immer erst aus dem anstehenden Problem ableiten läßt.

Vergleicht man z. B. die herkömmliche wellenlängendispersive RFA mit der OES oder AAS, dann schneidet die RFA primär im Hinblick auf das absolute Nachweisvermögen sehr schlecht ab. Stehen jedoch geeignete Anreicherungsverfahren und genügend Probenmaterial zur Verfügung, dann lassen sich mit ihr zahlreiche Elemente simultan selbst noch

im Konzentrationsbereich  $< 1$  ppb sicherer als mit den anderen Methoden erfassen [21].

Aber immer steht die Anreicherungs-methode im Mittelpunkt, die erlauben muß, die weitestgehend isolierten Elemente in dünner, möglichst homogener Schicht ( $\leq 100 \mu\text{m}$ ) auf kleinster Targetfläche zu konzentrieren, wenn eine zuverlässige Bestimmung im ppb-Bereich erfolgen soll.

Von den zahlreichen Präparationstechniken zur Anreicherung (z. B. Ionenaustauscher oder Ionenaustauschermembranen, Eindampfungstechniken für definierte Rückstandsschichten, Mitfällungsniederschläge auf Membranfiltern, Fällungsaustauschmethoden) soll nur auf das besonders geeignete Fällungsaustauschprinzip [23] kurz eingegangen werden. Saugt man die Probenlösung in einer Hahnschen Nutsche z. B. durch eine dünne Schicht frisch gefällten Zinksulfids, die auf ein Membranfilter aus Acetylcellulose oder besser aus PTFE aufgebracht ist, so werden alle Ionen von Elementen zurückgehalten, deren Sulfide eine geringere molare Löslichkeit besitzen als ZnS, wie z. B. Hg, Ag, Cu, Bi, Pb, Cd, Se, Te, As, Sb, Sn. Der Fällungsaustausch erfolgt, wie Radiotracer-messungen zeigen, beim einmaligen Filtrieren vollständig. Die abgetrennten Elemente können dann direkt durch RFA oder nach Lösen des Niederschlages in wenig Säure durch Lösungs-OES simultan oder durch AAS einzeln praktisch störungsfrei bestimmt werden. Diese Technik ist sehr variierbar und läßt sich vielseitig z. B. in der Umweltanalytik einsetzen.

Um teilweise bis zu 4 Größenordnungen bessere absolute Nachweisgrenzen als durch RFA erreicht man mit der AAS bei flammenlosen Anregungstechniken mit vielen Varianten.

Nachteil ist jedoch, daß keine simultanen Multi-elementbestimmungen möglich sind und nur sehr kleine Mengen an Probenlösung ( $\leq 100 \mu\text{l}$ ) eingesetzt werden können. Will man deshalb nicht einen großen Teil des Nachweisvermögens durch das Aliquotieren der Probenlösung verschenken, muß man fehlerbehaftete Eindampftechniken in Kauf nehmen. Neuerdings häufen sich auch Beobachtungen, daß viele komplexe und noch wenig untersuchte Fehlerquellen beim Verdampfen und Atomisieren der Probe in der Küvette (z. B. chemische Reaktionen mit dem Küvettenmaterial, thermische Prozesse im Plasma und noch ungeklärte Transportmechanismen, Strahlungsemissionen von Plasma- und Probenbestandteilen, optische Vorgänge) zu schwerwiegenden Fehlurteilungen, besonders bei der Bestimmung von Elementspuren unter einigen ng führen [25]. Sie schränken leider die ursprünglichen großen Erwartungen in diese Anregungstechnik erheblich ein. Die kritiklose Anwendung in der Routineanalyse, die von den Geräteherstellern vielerorts unterstützt wird, ist

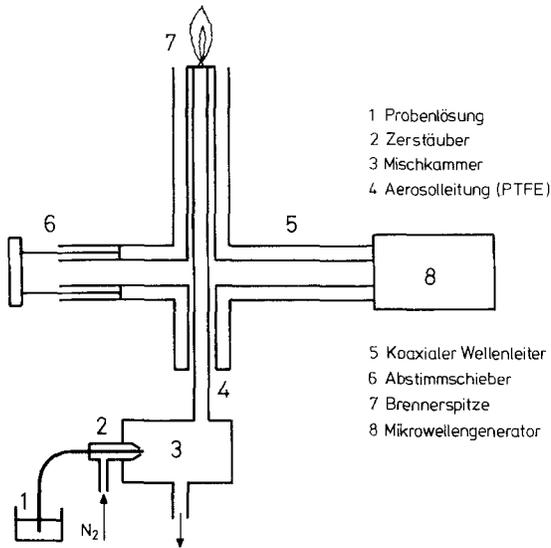


Abb. 7. Schematische Darstellung des Plasmabrenners (System ARL) mit Mikrowellenanregung zur Lösungsemissionsspektroskopie

heute ein Beispiel der Überschätzung von Methoden. Immer ist deshalb zunächst der weniger störanfälligen Anregung von Lösungen in der Flamme Vorzug zu geben, um so mehr, da heute auch hier durch spezielle Einspritztechniken für sehr kleine Lösungsmengen sehr gute Nachweisstärken zu erzielen sind [1].

Eine besonders gute Chance sollte man auch der OES von Lösungen einräumen, wenn es gelingt, die klassischen Anregungsquellen – Flamme, Bogen und Funken – durch energetisch günstigere bzw. konstantere zu ersetzen. Besonders folgende Möglichkeiten ergeben Anlaß zu großen Hoffnungen: Mikrowellen-Plasmabrenner (Abb. 7) und HF-Plasmabrenner mit induktiver Kopplung [21], die in Verbindung mit einem Vielkanalspektrometer viele Elemente lösungsspektroskopisch nachweisstark zu bestimmen erlauben [21]. Die relativ hohe Plasmatemperatur und lange Verweildauer der Atome im Plasma (ca. 2,5 ms) vermindern Interelementeffekte gegenüber herkömmlichen Verbrennungsflammen wesentlich. Das Nachweisvermögen übertrifft bei den meisten Elementen

das der AAS mit Flammenanregung wesentlich; eine Multielementbestimmung wird ohne schwerwiegende Querstörungen möglich, so daß eine Ablösung der AAS durch die Emissionsspektrometrie mit Plasmabrennern sicher nicht mehr lange auf sich warten läßt [2].

#### Literatur

- Berndt, H., Jackwerth, E.: Spectrochim. Acta **30B**, 169 (1975)
- Boumans, P. W. J. M.: diese Z. **279**, 1–16 (1976)
- Bowen, H. J. M.: Trace Elements in Biochemistry. London-New York: Acad. Press 1966
- Chen, R. W., Whanger, P. D., Fang, S. C.: Pharmac. Res. Commun. **6**, 571 (1974)
- Flohe, L., Günzler, W. A., Schock, H. H.: FEBS Letter **32**, 132 (1973)
- Frost, D. V., Lish, P. M.: Ann. Rev. Pharmac. **15**, 259 (1975)
- Grünwald, P., Tschöpel, P., Tölg, G.: diese Z. **279**, 187 (1976)
- Kaiser, G., Götz, D., Schoch, P., Tölg, G.: Talanta **22**, 889 (1975)
- Kotz, L., Kaiser, G., Tschöpel, P., Tölg, G.: diese Z. **260**, 207 (1972)
- Meyer, A., Grallath, E., Kaiser, G., Tölg, G.: diese Z. **281**, 201 (1976)
- Moffitt, A. E., Jr., Clary, J. J.: Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmac. **7**, 593 (1974)
- Morsches, B., Tölg, G.: diese Z. **219**, 61 (1966)
- Potter, S., Matrone, G.: J. Nutrition **104**, 638 (1974)
- Shamberger, R. J.: J. Nat. Cancer Inst. **44**, 931 (1970)
- Taylor, R. S.: Geochim. Cosmochim. Acta **18**, 1273 (1964)
- Tölg, G.: Talanta **19**, 1489 (1972)
- Tölg, G.: Vom Wasser **40**, 181 (1973)
- Tölg, G.: Talanta **21**, 327 (1974)
- Tölg, G.: Pure Appl. Chem. **44**, 645 (1975)
- Tölg, G.: Erzmetall **28**, 390 (1975)
- Tölg, G.: Naturwissenschaften **63**, 99 (1976)
- Trinkwasserverordnung vom 31.1.1975, Bundesgesetzblatt Teil I, Nr. 16 vom 15.2.1975
- Tschöpel, P., Disam, A., Krivan, V., Tölg, G.: diese Z. (in Vorbereitung)
- Underwood, E. J.: Trace Elements in Human and Animal Nutrition, 3. Aufl. London-New York: Acad. Press 1971
- Volland, G., Kölblin, G., Tschöpel, P., Tölg, G.: diese Z. **284**, 1 (1976)
- Wendel, A., Pilz, W., Ladenstein, R., Sawatzki, G., Weser, U.: Biochem. Biophys. Acta **377**, 211 (1975)
- Wood, J. M.: Naturwissenschaften **62**, 357 (1975)