

to mention other mines of seemingly lesser importance.

Finally we would like to comment on the genesis of the gold mineralization of eastern Thasos. The ore in the Acropolis hill (TG 90) is of primary origin probably formed by hydrothermal solutions. On the other hand, the gold of the Kinyra area (TG 80) is of secondary origin, probably fitted in the marble fissures as sediments from surface and underground water.

We would like to thank our archaeologist colleagues Drs. H. Gropengiesser, A. Muller, and G. Weisgerber for valuable advice. For the archaeological licence we thank the general director of antiquities Prof. N. Jalouris and Dr. Chrysantaki-

Koukouli. The microprobe analyses have been accomplished by Prof. A. El Goresy and J. Janicke. For technical assistance we thank mining foreman S. Marmaras (IGME) and U. Schwan (MPI). The project was supported with funds by the Stiftung Volkswagenwerk.

Received March 4, 1981

1. Wagner, G.A., et al.: *Naturwissenschaften* 66, 613 (1979)
2. Herodotus VI, 47
3. De Coincy, H.: *Géographie* 38, 408 (1922)
4. Vavelidis, M.: Diplomarbeit Univ. Stuttgart 1978
5. Muller, A.: *BCH Suppl.* V, 315 (1979)
6. Vavelidis, M.: IGME Internal Rep. (1980)

Austauschvorgänge von Spurenelementen an Schwebstoffen

W. Calmano und K.H. Lieser

Fachbereich Anorganische Chemie und Kernchemie der Technischen Hochschule, D-6100 Darmstadt

Auf die Schwebstoffe entfällt ein großer Anteil des Spurenelementgehaltes in natürlichen Gewässern. Die Verteilung von Spurenelementen zwischen Schwebstoff und Lösung wird durch die chemischen Bedingungen beeinflusst. Deshalb ist die Kenntnis der Austauschvorgänge zwischen Schwebstoff und Lösung von großer Bedeutung, insbesondere für die Beurteilung der „Verfügbarkeit“ von toxischen Spurenelementen.

Die instrumentelle Aktivierungsanalyse erlaubt es, etwa 20 bis 30 Spurenelemente in Wasser und in Schwebstoffen gleichzeitig zu bestimmen [1]. Mit radioaktiven Indikatoren können die Austauschvorgänge zwischen Schwebstoff und Lösung verfolgt werden, ohne dabei störend in das System einzugreifen.

Für die Untersuchungen wurden Radionuklide mit geeigneten Halbwertszeiten ausgewählt, die in hoher spezifischer Aktivität eingesetzt und γ -spektrometrisch nebeneinander gemessen werden können: ^{74}As , ^{140}Ba , ^{109}Cd , ^{139}Ce , ^{58}Co , ^{51}Cr , ^{137}Cs , ^{59}Fe , ^{22}Na und ^{65}Zn . Die spezifische Aktivität von ^{59}Fe betrug 16 Ci/g, die der anderen Radionuklide war > 100 Ci/g; ^{137}Cs und ^{22}Na waren trägerfrei. Die Radionuklide lagen als Chloride vor. Die zugesetzte Menge betrug im allgemeinen weniger als 1% der vorhandenen Menge, so daß keine merkliche Störung des Systems eintrat.

Für die Experimente wurde Flußwasser 10 cm unter der Wasseroberfläche entnommen, und zwar Rheinwasser bei Gernsheim (Stromkilometer 463) in der Nähe des rechten Ufers (pH 6,0) und Mainwasser in Frankfurt (Obermainbrücke) in der Nähe des linken Ufers (pH 6,4). Das Wasser wurde in Polyäthylenflaschen transportiert und sofort weiterverarbeitet. Ein Teil wurde direkt in gereinigte 1-l-Polyäthylen-Flaschen gefüllt, ein weiterer Teil in einer Durchflußzentrifuge von den Schwebstoffen befreit, mit einer der Schwebstoffmenge entsprechenden Menge Kaolin versetzt und ebenfalls in 1-l-Polyäthylen-Flaschen gefüllt. Die Polyäthylen-Gefäße wurden mit Aluminiumfolie umwickelt, um den Wuchs der Grünalgen zu verhindern.

Nach Zugabe der Radionuklide wurden die Polyäthylen-Flaschen fortwährend geschüttelt. In bestimmten Zeitabständen wurde der pH-Wert gemessen, außerdem wurden 2-ml-Proben entnommen und filtriert (Membranfilter, 0,45 μm Porendurchmesser). Im Filtrat wurde die Aktivität γ -spektrometrisch gemessen [Ge(Li)-Detektor in Kombination mit einem Mehrkanalimpulshöhen-Analysator]. Die Spektren wurden mit einem Rechenprogramm ausgewertet. Nachdem sich ein Gleichgewicht zwischen Schwebstoff und Lösung eingestellt hatte, wurden die Schwebstoffe bzw. der Ton abgetrennt und

gemessen. Weitere Flußwasserproben wurden nach Einstellung des Austauschgleichgewichts zwischen Schwebstoff und Lösung mit 30 g Natriumchlorid versetzt (dadurch wird etwa die Salzkonzentration von Meerwasser erreicht) und weiter geschüttelt, bis sich erneut ein Gleichgewicht einstellte. Dann wurden die Schwebstoffe bzw. der Ton ebenfalls abgetrennt und gemessen.

In Fig. 1 ist die relative Aktivität von ^{109}Cd in Mainwasser als Funktion der Schüttelzeit aufgetragen. Das zugegebene Cadmiumsalz geht verhältnismäßig rasch von der Lösung an den Schwebstoff über; nach etwa 50 h befinden sich nur noch 5 bis 10% in der Lösung. Dann steigt der Gehalt an ^{109}Cd in der Lösung allmählich wieder an; nach 150 h werden etwa 30% des zugegebenen Cadmiums in der Lösung gefunden. Hier spielen offenbar langsame Vorgänge eine Rolle, wobei das Cadmium entweder als Komplex oder in kolloidaler Form in die Lösung übergeht und somit durch die Poren des Membranfilters läuft.

Nach Zugabe von Natriumchlorid steigt die Konzentration des Cadmiums in der Lösung sprunghaft an, und es werden jetzt etwa 95% des zugegebenen Cadmiums in der Lösung gefunden. Dies zeigt, daß das Cadmium an den Schwebstoffen nicht fest gebunden ist, sondern durch Natriumchlorid „remobilisiert“ wird. Da der pH-Wert sich bei der Zugabe von Natriumchlorid nicht nennenswert ändert, kann man schließen, daß das Cadmium an den Schwebstoffen nicht durch hydrolytische Absorption gebunden wird, sondern im wesentlichen durch Ionenaustausch oder physikalische Adsorption von leicht verdrängbaren Komplexverbindungen des Cadmiums.

In Anwesenheit von Tonmineralien (Kaolin) zeigt Cadmium ein ähnliches Verhalten

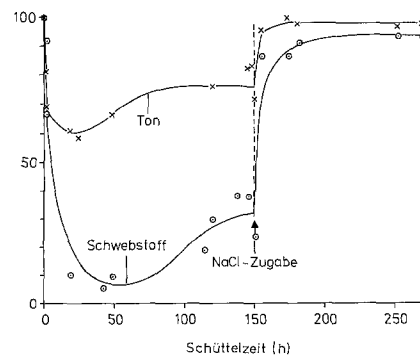


Fig. 1. Relative Aktivität (%) von Cadmium in der Lösung als Funktion der Zeit

wie bei Anwesenheit von Flußwasser-schwebstoff (Fig. 1). Nur der Umfang der Fixierung am Schwebstoff und der Umfang der „Remobilisierung“ sind verschieden. Das Verhalten des Cadmiums kann also qualitativ durch die Anwesenheit von Tonmineralien im Flußwasser gedeutet werden.

Die Kurven für die anderen Elemente zeigen zum Teil einen ähnlichen, zum Teil einen deutlich verschiedenen Verlauf. Z.B. sinkt die Aktivität von ^{139}Ce in Mainwasser auf sehr kleine Werte (etwa 2%), ohne wieder anzusteigen. Auch nach Zugabe von Natriumchlorid steigt die Aktivität in der Lösung nicht. Cer wird also an den Schwebstoffen ziemlich fest gebunden, zum großen Teil wahrscheinlich durch hydrolytische Adsorption an den Tonmineralien. Das Verhalten von Chrom(III) ähnelt dem von Cer, nur verläuft die Aktivität hier durch ein flaches Minimum. Durch die Zugabe von Natriumchlorid wird Chrom(III) ebensowenig „remobilisiert“ wie Cer. Cäsium wird auch überwiegend an den Schwebstoffen gebunden (im Gegensatz zu Natrium); die Aktivität in der Lösung sinkt dabei auf etwa 15%. Nach Zugabe von Natriumchlorid steigt die Cäsiumaktivität zunächst auf etwa 70% des Ausgangswertes, um dann sehr langsam auf etwa 50% abzufallen. Die „Remobilisierung“ der Cäsium-Ionen durch den hohen Überschuß an Natrium-

Ionen ist leicht verständlich; dann stellt sich das Austauschgleichgewicht der Cäsium-Ionen an den Tonmineralien neu ein. Dieser Austausch erfolgt im Inneren der Tonmineralien sehr langsam (Halbwertszeit etwa 20 h).

In Rheinwasser wird für die Spurenelemente ein ähnlicher Kurvenverlauf beobachtet, wenn auch die Zahlenwerte verschieden sind. Das gleiche Bild ergibt sich beim Vergleich zwischen Flußschwebstoff und Tonmineralien: Der Verlauf der Kurven ist ähnlich, nur die Zahlenwerte sind verschieden und hängen im wesentlichen vom Gehalt an Tonmineralien und Huminsäuren ab. Die Verteilung der Spurenelemente zwischen Schwebstoff und Lösung und ihre „Remobilisierung“ werden in erster Linie durch die Anwesenheit der Tonmineralien, in zweiter Linie durch die Anwesenheit der Huminsäuren als Komplexbildner bestimmt. Dies konnte durch weitere Versuche belegt werden, in denen an Stelle von Flußwasser wäßrige Lösungen eingesetzt wurden, die mit Tonmineralien und mit Huminsäuren versetzt waren.

Die Untersuchungen wurden durch das BMFT finanziell unterstützt.

Eingegangen am 3. Februar 1981

1. Lieser, K.H., et al.: *J. Radioanal. Chem.* 37, 717 (1977)

for reliable intracellular pH determinations with such dyes. This makes it even with flow cytometers difficult to measure the intracellular pH in single cells [5]. With DCH it is possible to determine the intracellular pH of single cells by flow cytometry in a one-step measurement using a one-wavelength excitation (300–400 nm) and a simultaneous measurement of the fluorescence emission at two different wavelengths (420–440 nm (F1) and 500–580 nm (F2)). The ratio of both fluorescences is a measure for the intracellular pH.

DCH is not taken up by living or dead cells. The cells appear as black dots under the fluorescence microscope. Using, however, esters of DCH as 1,4-diacetoxy-2,3-dicyano-benzol (ADB), 1,4-dibutyroxy-2,3-dicyano-benzol (BDB) or the N-protected alanyl derivative, 1,4-(tert-butyloxy-carbonyl-l-alanyl-oxy)-2,3-dicyano-benzol (AlaDB), living cells become fluorescent within a few minutes. The esters cross the cell membrane easily but do not enrich in cell membranes or lipid droplets. DCH is liberated intracellularly from the esters by esterases. DCH is apparently not toxic for the cells during a 15 to 20 min incubation. It also does not seem to interact to a great extent with protein since the wavelength of the maximum of the fluorescence emission spectrum is not shifted in a measurable way when DCH is incubated with 10 mg/ml bovine serum albumin. The major part of DCH is found in the cytoplasm and a minor part (around 10%) within the cell organelles of rat liver if the organ is perfused with 20 µg/ml ADB solutions in saline prior to homogenization in isotonic sucrose and 1-h centrifugation at 100000 g to separate the cytoplasmic from the cell organelle fraction.

The flow cytometric measurements were performed with a Fluvo-Metricell flow cytometer which was developed earlier in our laboratory [7]. The instrument is capable of simultaneously measuring the electrical cell volume and two fluorescences. Data acquisition and display were accomplished by FORTRAN IV computer programs [8, 9]. Single-cell suspensions were prepared immediately after removal of the tissues from the organism by syringing and stored between 0 and 4 °C until the incubation with ADB in order to minimize pH changes. The intracellular pH remained constant for several hours under these conditions. Cells were suspended in saline solution, weakly buffered with 5 mM Tris/HCl to pH 7.35. ADB was added to the

Fast Intracellular pH Determination in Single Cells by Flow-Cytometry

G. Valet, A. Raffael, L. Moroder, E. Wünsch, and G. Ruhenstroth-Bauer
Max-Planck-Institut für Biochemie, D-8033 Martinsried

The maintenance of the intracellular pH within narrow limits is an important requirement for the correct function of cellular metabolism. The cytoplasmic pH is close to neutral [1] while the intralysosomal pH is acidic [2]. During anaerobic metabolism the intracellular pH drops to acidic values, a condition which is frequent in tumor cells [3]. It is of considerable interest to know the mechanisms of intracellular pH regulation in such cells in order to understand the underlying disorders. The lower pH in tumor cells could also be of value for the identification of tumor cells during early tumor growth and metastasis formation.

A variety of methods for intracellular pH measurements [1, 4, 5] have been described in the past. These methods are, however, not suitable for fast pH determinations within single cells in suspension.

We have developed a new method for fast intracellular pH determination in single cells by flow cytometry using the dye 2,3-dicyano-hydroquinone (DCH). DCH shows a pH-dependent shift of the wavelength of fluorescence emission, in contrast to most fluorescent pH indicators [6] included fluorescein which have the fluorescence emission at a constant wavelength but of pH-dependent intensity. A sequential dual-wavelength excitation is necessary