

The following abbreviations are used:

FAD = flavinadenin dinucleotide
 FMN = flavinmononucleotide
 Rib. = riboflavine
 ATP = adenosintriphosphate

F. NAVAZIO and N. SILIPRANDI

*Institute of Biological Chemistry, University of Rome,
 February 18, 1955.*

Riassunto

Gli autori hanno determinato il FAD e la frazione FMN + Rib. nel fegato di ratti normali e diabetici da allossana. Il FAD è stato trovato diminuito in modo significativo nei diabetici. Somministrando riboflavina + ATP si ottiene un aumento dei valori del FAD. Questi valori restano quasi immutati somministrando riboflavina da sola.

PRO LABORATORIO

Zur Mikroabsorptionsspektralanalyse im sichtbaren Spektralgebiet und im UV¹

Die Mikroabsorptionsspektralanalyse, insbesondere im UV, ist in den letzten Jahren wesentlich von CASPERSSON² zu einem wichtigen experimentellen Hilfsmittel für biologische und biochemische Fragestellungen entwickelt worden. Die bisher üblichen Geräte zur Mikroabsorptionsspektralanalyse haben sich aus dem Mikroskop entwickelt, wobei entweder die gewöhnliche Mikroskopierlampe durch einen Monochromator ersetzt oder ein von einem Mikroskopobjektiv entworfenes Bild des Objektes auf einen Spektrometerspalt geworfen wird (vgl. zum Beispiel 2). Entsprechend der mikroskopischen Praxis wird hierbei das Objektfeld meist nach den Prinzipien des Köhlerschen Strahlenganges ausgeleuchtet. In neuerer Zeit werden Spiegelobjektive zur Mikroabsorptionsspektralanalyse herangezogen³, welche durch ihre Achromasie die Einstellung und Justierung der Mikrospektrometer erleichtern.

In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, dass die Verwendung von Quarzobjektiven in einer an sich bekannten optischen Anordnung gewisse Vorzüge bietet, die gerade durch die sonst ungünstig beurteilte Nichtachromasie dieser Objektive bedingt sind. Wir haben dabei die von v. ROHR berechneten Zeiss-Objektive mit den Aperturen 0,2, 0,35 und 0,85 (Glyzerinimmersion) verwendet. Bekanntlich ist in einem Gerät zur Spektralanalyse der messbare Extinktionsbereich durch den Anteil an «falschem Licht» begrenzt: an Prismenfassungen, Blenden und Gehäuse gestreutes Licht fremder Wellenlängen gelangt zur Photometriereinrichtung und lässt die Extinktion zu niedrig erscheinen. Bei Geräten zur mikroskopischen Spektralanalyse mit Köhlerscher Beleuchtung tritt noch eine zusätzliche, andersartige Erniedrigung des Messbereiches auf:

Das mikroskopische Objekt liegt in einem gleichmässig ausgeleuchteten Gesichtsfeld. Es kann daher

Strahlung neben dem zu untersuchenden Objekt im Objektiv gestreut werden und so das Messergebnis verfälschen. Der letztere Fehler ist zu beseitigen, wenn man statt der Köhlerschen Beleuchtungsanordnung (für mikroskopische Beobachtung grösserer Flächen gedacht) eine Lichtsonde ähnlich wie im Mikroskopphotometer zur Beleuchtung des interessierenden Objektes wählt, die durch ein Mikroskopobjektiv gebildet werden kann, welches den Monochromatorspalt direkt im Objekt abbildet. Zum Erzielen einer guten Abbildung muss sich der Monochromatorspalt in ungefähr der normalen Tubuslänge von diesem Objektiv entfernt befinden. Gleichzeitig hat man den Vorteil, mit relativ engen Blenden (also spektralreinem Licht) und einem Monochromator kleiner Öffnung trotz guter Intensitätsausbeute arbeiten zu können, da der Monochromator nur noch ein kleines Flächenelement und nicht das gesamte Gesichtsfeld intensiv ausleuchten muss. Ein weiterer wesentlicher Vorteil wird durch die Beseitigung anisotroper Beleuchtungsapertur einer Köhlerschen Anordnung mit Monochromator gewonnen, auf deren störenden Einfluss insbesondere bei Messungen im polarisierten Licht LÜTHY¹ hinwies und die auf der Wirkung des Monochromatorspaltes als Aperturblende beruht. Als Beleuchtungsapertur verwenden wir die Objektivapertur, welche durch geeignete Wahl des Beleuchtungsobjektes beliebig einstellbar ist.

Ferner konnten wir zeigen, dass auch der Einfluss von spektralunreinem Licht weitgehend auszuschalten ist, wenn nichtachromatische Mikroskopobjektive zur Beleuchtung und zur Abbildung verwendet werden. Durch eine Blende in der Okularebene ist das Bild des Monochromatorspaltes oder einer an seiner Stelle befindlichen Blende das Bild des zu untersuchenden Objektes gleichzeitig auszublenden. Die Kombination Beleuchtungs- und Abbildungsobjektiv mit Monochromator- und Okularblende wirkt dann als Linsenmonochromator, wobei diese Monochromatisierung bei geeigneter Wahl von Objektiven und Blenden für Übersichtsmessungen sogar den vorgesetzten Monochromator entbehrlich macht. Mit diesem erhält man Ergebnisse, die sonst nur mit dem Doppelmonochromator erzielt werden könnten. Bei einfacherem Aufbau wird die Nachmonochromatisierung ohne Intensitätseinbusse erzielt, und es sind keine zusätzlichen brechenden, beugenden oder spiegelnden Flächen erforderlich.

Für gute Monochromatorwirkung sollte das Bild der Monochromatorblende und der Okularblende möglichst gleich gross sein; was allerdings eine sehr sorgfältige Justierung der optischen Anordnung in die optische Achse bedingt, für die wir (ebenso wie für die Aufnahme der Fokuskurven der Objektive) ein lichtelektrisches Einstellverfahren verwendet haben. Mit auf Quarzblättchen aufgedampften Spalttestobjekten von 0,05 mm wird der maximale Lichtdurchlass bei Abbildung des Spalttestobjektes lichtelektrisch bestimmt. Bei geordneten Veränderungen der Justierbedingungen gestattet das Verfahren in sehr sicherer Weise eine Prüfung der Einstellungen und ist dem Einstellverfahren mit Fluoreszenzeinstellung überlegen.

Die Erhöhung des Extinktionsbereiches ist gerade bei Geräten zur Mikrospektralanalyse sehr willkommen. Bei festen mikroskopischen Objekten (zum Beispiel Kristallen) ist der Absorptionskoeffizient häufig so hoch, dass es allgemein Schwierigkeiten bereitet, genügend dünne Objekte zur Untersuchung zu finden. Es sei hier auch auf die an sich bekannte Tatsache hingewiesen, dass Quarzobjektive grundsätzlich für Untersuchung

¹ Mit Unterstützung der Ciba-Stiftung für chemische, medizinische und technische Forschung.

² T. CASPERSSON, Skand. Arch. Physiol. 73, Suppl. 8 (1936).

³ R. C. MELLORS, Discuss. Faraday Soc. Nr. 9, 398 (1950). – K. P. NORRIS und H. F. WILKINS, Discuss. Faraday Soc. Nr. 9, 360 (1950).

¹ H. LÜTHY, Pflüger's Arch. 253, 477 (1951).

der Anisotropie der Lichtabsorption mit polarisiertem Licht geeigneter sind als Spiegelobjektive, da ihr Strahlengang wegen der nicht abgedeckten Zentralzone geometrisch übersichtlicher ist und gleiche Vergrösserungen mit kleinerer Gesamtapertur erreicht werden können.

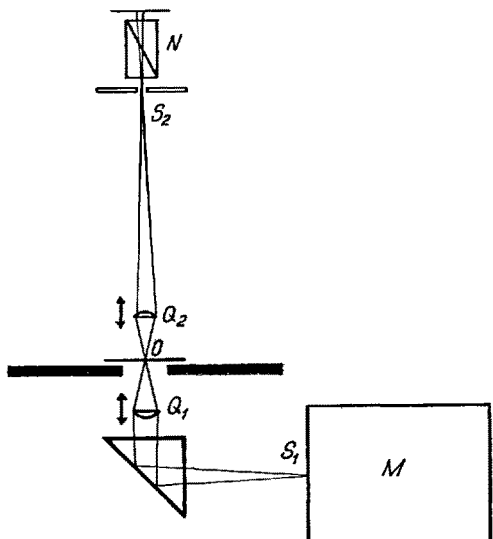


Abb. 1. Strahlengang im Mikroskopspektrometer.

Mögen diese Vorteile bei streuenden Objekten mit kleinem Dichroismus (wie sie häufig in der Biologie vorliegen) von nicht zu grosser Bedeutung sein, so sind sie für die Untersuchung von klaren Objekten mit starker Absorptionsanisotropie (wie sie Kristalle darstellen) von erheblichem Interesse. Quarzobjektive sind nur für eine einzige Wellenlänge korrigiert (zum Beispiel $275\text{ m}\mu$). Doch reicht selbst im sichtbaren Gebiet ($436\text{ m}\mu$) die sphärische Korrektur aus, um zumindest in der Nähe der optischen Achse ausreichende Schärfe zu erhalten.

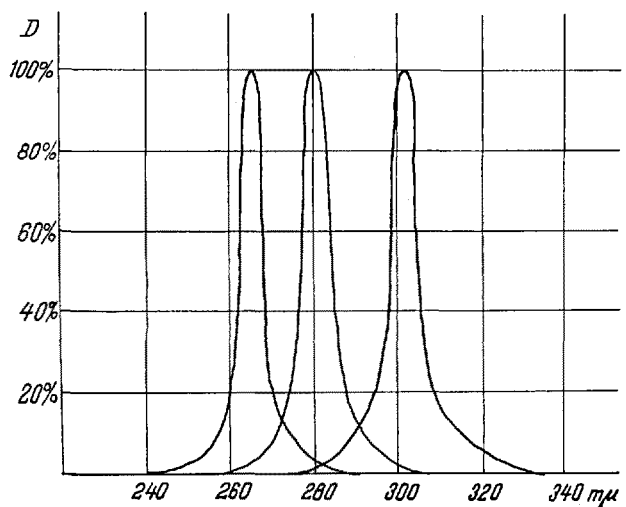


Abb. 2. Durchlässigkeitskurven des durch das Mikroskopspektrometer gebildeten Nachmonochromators.

Abbildung 1 zeigt das Prinzip der von uns verwendeten Apparatur. Der Austrittspalt S_1 eines Gittermonochromators wird durch das Objektiv Q_1 im Objekt O abgebildet; das Objektiv Q_2 bildet seinerseits das Objekt und das Spaltbild im einstellbaren Okularspalt S_2 ab, hinter welchem sich in üblicher Anordnung eine Photo-

zelle mit Sekundärelektronenvervielfacher und Quarzfenster befindet, dessen Ströme durch einen Gleichstromverstärker verstärkt und in einem Drehspulinstrument abgelesen werden. Ein präziser Mikrometerschlitten gestattet das Aus- und Einschwenken des Präparates auf $0,5\text{ }\mu$ genau. Als Lichtquelle kann wahlweise eine Quecksilberhochdruck- oder eine Wasserstoffpunktlichtlampe Verwendung finden. Für Messungen im polarisierten Licht kann ein mit Glyzerin gekittetes polarisierendes Prisma vor die Okularphotozelle gebracht werden.

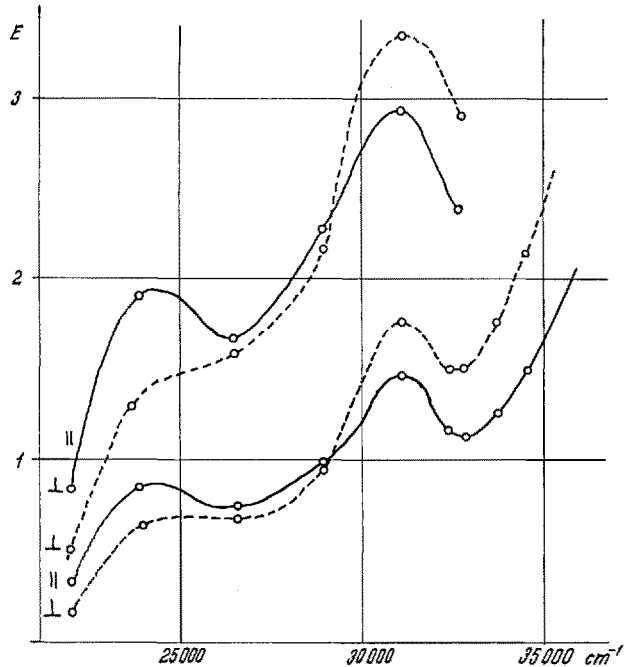


Abb. 3. Absorptionskurven einer Einschlussverbindung von *p*-Nitrophenol in Zinkhydroxyd im linear polarisierten Licht. Verschieden dicke Kristalle.

Abbildung 2 gibt einen Überblick über die monochromatisierenden Eigenschaften einer Quarzobjektivkombination mit den Aperturen 0,2 (Kondensorobjektiv), 0,35 (Abbildungsobjektiv) und einer Spaltgrösse von $14\text{ }\mu \times 28\text{ }\mu$. Die Halbwertsbreite der Durchlässigkeitskurven beträgt weniger als $10\text{ m}\mu$ trotz der relativ grossen Ausblendungsspalte.

In Abbildung 3 sind schliesslich die dichroitischen Absorptionskurven von 2 verschieden dicken Kristallen einer Einschlussverbindung von *p*-Nitrophenol in $\text{Zn}(\text{OH})_2$ als Beispiel wiedergegeben; man erkennt, dass bis zu Extinktionen von über 3 die charakteristischen Züge der Absorptionskurven erhalten bleiben. Die Lage des elektrischen Vektors zur Achse des Kristalls ist eingezeichnet.

W. HOPPE

Physiologisches Institut der Universität Bern und
Physikalisch-chemisches Institut der Technischen Hochschule München, den 31. Januar 1955.

Summary

A new instrument for the U.V. spectrometry of microscopic preparations, which uses quartz objectives not only for magnification, but also for monochromatization, permits measurements up to extinctions E of more than 2.