

Informations - Informationen - Informazioni - Notes

STUDIORUM PROGRESSUS

Mikrophotometrie

VON K. ANTENEN*

I. Aufgaben und Probleme der Mikrophotometrie

In der Histologie wird der Wunsch immer stärker, nicht nur die Morphologie der Zelle und einzelner Bestandteile zu studieren, sondern den chemischen Aufbau und dessen Veränderungen unter bestimmten Bedingungen. Es stellt sich nun die Frage, wie man zu quantitativen Aussagen gelangen kann.

Es war ein erfolgversprechender Gedanke, die Spektralphotometrie, die bei makroskopischer Analyse derart Wertvolles geleistet hat, ins Mikroskopische auszudehnen. Entsprechende Arbeiten werden denn auch besonders in den letzten Jahren von verschiedenen Forschern ausgeführt.

Welches sind nun die Fragen, die den Histologen wie den Histochemiker beschäftigen und die auf histophotometrischem Wege angegangen werden könnten?

1. Chemische Analyse einer bestimmten Stelle (zum Beispiel des Innern eines Zellkerns),
2. Lokalisation eines bestimmten Stoffes,
3. Konzentration eines bestimmten Stoffes an einem bestimmten Orte.

Die Absorptionsanalyse basiert einmal auf der Tatsache, dass bestimmte Substanzen bestimmte Absorptionsspektren aufweisen (das heisst die Absorption ist eine Funktion der Wellenlänge). Vergleicht man analoge Lösungen verschiedener Konzentration (aber mit demselben «Lichtweg»), so zeigt es sich, dass die Absorption eine Funktion der Konzentration ist. Praktisch wird man so vorgehen, dass man die Absorption bei einer bestimmten Wellenlänge (und einem bestimmten Lichtweg, der durch die Abmessungen einer Küvette gegeben ist) bei verschiedenen Standardlösungen verschiedener Konzentration misst und eine Eichkurve erstellt. Misst man dann bei einer analogen Lösung unbekannter Konzentration eine bestimmte Absorption bei derselben Wellenlänge, so kann deren Konzentration sofort aus der Eichkurve entnommen werden. Das Vorgehen vereinfacht sich dann, wenn das Beer-Lambertsche Gesetz gilt, was oft der Fall ist:

$$E = k \cdot c \cdot d.$$

E = Extinktionskoeffizient (log 10 des Kehrwertes der Transmission),

k = eine spezifische Konstante,

c = Konzentration des gelösten Stoffes,

d = Dicke der absorbierenden Schicht.

Es ist sofort evident, dass sich die Konzentration zweier Lösungen bei Gültigkeit dieses Gesetzes wie die entsprechenden Extinktionen verhalten. Anstatt einer Eichkurve genügt jetzt ein einzelner Eichwert (Extinktion bei einer bestimmten Konzentration).

Die Histophotometrie stellt nun zahlreiche zusätzliche Probleme. Einmal ist das Aufstellen einer Eichkurve schwierig. Auch wenn es dem Biochemiker gelingt, die in

Frage stehende Substanz zu gewinnen (durch Extraktion zum Beispiel), so ist damit noch nicht gesagt, dass sie in der Zelle bei den dort vorliegenden hohen Konzentrationen (wegen der geringen Schichtdicke von vielleicht einigen μ müssen die Konzentrationen für Absorptionsmessungen hoch sein) in demselben Aggregatzustand vorliegt. Der Aggregatzustand spielt aber für die Extinktion eine sehr wesentliche Rolle (das heisst k im Beer-Lambertschen Gesetz ist eine Funktion des Aggregatzustandes). Ein weiteres Problem ist die Schichtdicke, die durch die Geometrie der Zelle bestimmt wird. Überdies werden die Präparate fixiert, was bedeutet, dass auch der Einfluss dieser Massnahme untersucht werden muss. Die 3 vorhin aufgeworfenen Fragen (Analyse, Lokalisation, Konzentration) versucht man heute vor allem durch spezifische chemische Reaktionen zu untersuchen, die sich meistens von den sonst üblichen Färbemethoden wesentlich unterscheiden.

Trotz den auftretenden Schwierigkeiten sehen namhafte Physiologen, Histologen und Histochemiker die Histophotometrie als jene Forschungsmethode an, die am meisten geeignet erscheint, um in die Geheimnisse des Zellchemismus einzudringen.

Die Histologie stellt wahrscheinlich die höchsten Ansprüche an ein Mikrophotometer. Andere Anwendungsgebiete sind zum Beispiel:

1. Die Mineralogie. Zum Beispiel lässt sich mit einem Mikrophotometer genau die Schwärzung pleochroitischer Höfe bestimmen.
2. Die Technik. Eindringen von Farbstoffen in Textilfasern, Gläser, Kunststoffe, Papier usw., Schwärzung bzw. Färbung von Filmnegativen usw.

II. Anforderungen an ein Mikrophotometer

Ein Mikrophotometer ist eine Kombination eines Spektralphotometers mit einem Mikroskop, wie aus den vorhergehenden Ausführungen zu entnehmen ist. Es soll dazu dienen, Absorptionen bei verschiedenen Wellenlängen an verschiedenen, möglichst eng umgrenzten Präparatstellen zu messen. Falls keine theoretischen oder technischen Grenzen gesetzt sind – über die später berichtet werden soll –, haben sich die Anforderungen nur nach der Praxis zu richten. Die Praxis (vor allem in Histologie und Biochemie) verlangt:

1. Möglichst kleiner «photometrischer Fleck» (das heisst auszumessender Fleck). Natürlich möchte der Cytologe Bereiche ausmessen, deren untere Grenze einzig durch das Auflösungsvermögen des Mikroskopes gegeben ist. Dieses Verlangen begegnet grundsätzlichen wellenoptischen Schwierigkeiten, wie der nächste Abschnitt zeigen wird. Vernünftig ist ein photometrischer Fleck von wenigen μ Durchmesser.

2. Es sollte eine Halbwertsbreite von wenigen $m\mu$ (zum Beispiel 2–4 $m\mu$) im sichtbaren Bereiche erreicht werden. Im UV sollte sie eher kleiner, im infraroten Bereiche dürfte sie grösser sein. Diese Halbwertsbreite ist gegeben durch den Verlauf spektraler Absorptionskurven.

Die Fehlergrenze soll für mittlere Durchlässigkeiten bei etwa 1% relativem Fehler liegen (hier sind Apparatfehler gemeint). Damit können Konzentrationen genügend genau bestimmt werden.

4. Die Bedienung der Apparatur soll bequem sein; sie soll weitgehend automatisiert werden können.

* Wissenschaftlicher Mitarbeiter der Firma Wild Heerbrugg AG, Werke für Optik und Feinmechanik, Heerbrugg/Schweiz.

Diese vier Punkte stellen beachtliche Anforderungen an ein Mikrophotometer. Die drei ersten berühren vor allem die Qualität der Optik, die Stabilität des Zusammenbaus, Genauigkeit des Justierens und Einstellens (und damit Genauigkeit der Tischeinstellung), die Notwendigkeit, gewisse Stellen des Strahlenganges abzdunkeln sowie Streulicht zu vermeiden. Die drei ersten Punkte allein lassen, sofern man sich auf das sichtbare Gebiet beschränkt, immer noch einen visuellen oder einen elektronischen Messvorgang zu. Dagegen erlaubt der vierte Punkt, gerade wegen der Forderung der Automatisierung, nur noch einen elektronischen Messvorgang. Dieser wird auch nahegelegt dadurch, dass

5. nicht nur im sichtbaren, sondern auch im ultravioletten, wenn möglich im infraroten Bereich soll gemessen werden können. Dies macht – zur visuellen Beobachtung und Scharfstellung des Bildes – einen Lichtwandler notwendig. Die besten Ausführungen funktionieren heute elektronisch.

Weitere vom Praktiker gestellte Anforderungen sind:

6. Universalität.

a) Das Präparat soll nicht nur ausgemessen, sondern ohne zeitraubende Umstellungen beobachtet oder photographiert werden können, und zwar mit monochromatischem oder «weissem» Licht.

b) Es soll mit Leichtigkeit von der Mikrophotometrie zu gewöhnlicher Spektralphotometrie übergegangen werden können. Dies ist dann erwünscht, wenn mikrophotometrisch erhaltene Resultate *in vitro* nachgeprüft werden sollen.

c) Von Interesse sind auch Fluoreszenzmessungen. Zu diesem Zwecke müsste das Licht nicht vor, sondern nach dem Mikroskop durch einen Monochromator gehen. Andererseits kann auch hier monochromatische Anleuchtung eines Präparates erwünscht sein, um die spektrale Verteilung des Fluoreszenzlichtes in Funktion der einfallenden Lichtwellenlänge zu ermitteln.

Das Problem kann durch Anbringen verschiedener Filter geringer Bandbreite nach dem Präparat genügend genau gelöst werden.

III. Einige Betrachtungen mehr theoretischer Natur

1. Photometrischer Fleck. Es wurde bereits darauf hingewiesen, dass man den photometrischen Fleck nicht allzu klein machen kann (3–4 μ). Der Grund liegt darin: Jedem kreisförmigen Fleck im Präparat entspricht im Zwischenbild wegen der Beugung – selbst bei Verwendung eines ideal korrigierten Objectives – ein vergrößerter Fleck, der aber von konzentrischen Ringen umgeben ist. Dies bedeutet, dass ein Teil der Energie sich nicht im geometrisch-optischen Bilde des Fleckes findet, sondern ausserhalb. Je kleiner nun der photometrische Fleck ist, um so mehr Energie fällt nicht in dessen geometrisch-optisches Bild. Diese Verhältnisse werden dargestellt durch die folgende Abbildung, bei der die Abszisse x einen Kreisdurchmesser im Objekt (Präparat), die Ordinate y den Bruchteil der Energie bedeutet, der durch das geometrisch-optische Bild erfasst wird. Aus der Darstellung geht beispielsweise hervor, dass bei einem photometrischen Fleck, dessen \varnothing dem Auflösungsvermögen

$$\frac{\lambda}{\text{NA Obj.} + \text{NA Kond.}}$$

gleichkommt, bloss 83% der Energie im geometrisch-optischen Bilde zu finden sind, während 17% ausserhalb durchgehen.

Wir erlauben uns folgende Abschätzung: Einen Kreis mit $\varnothing x$ in der Objektebene besitze die Transmission T_1 , dessen Umgebung (deren \varnothing grösser sei als etwa $2x$) hingegen die Transmission T_2 .

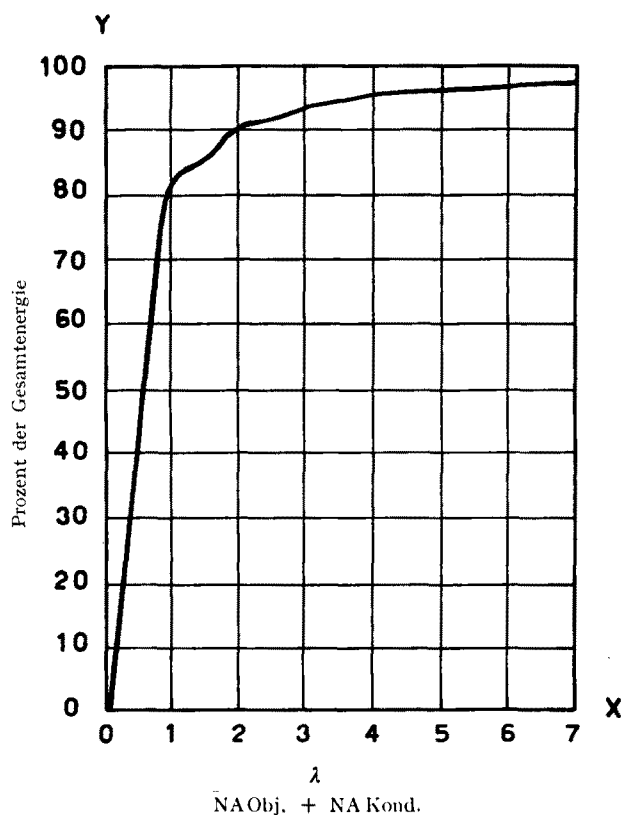


Fig. 1. Energieverluste infolge Beugung.

Der Anteil des Lichtes von x , der in das geometrisch-optische Bild fällt, beträgt

$$T_1 \cdot y \quad (y \text{ in } \%).$$

Der Anteil des Lichtes im geometrisch-optischen Bild, der von Flächenelementen ausserhalb x her stammt, beträgt angenähert

$$T_2 (100 - y).$$

Ist $T_1 = T_2$, das heisst das Objekt gleichmässig durchsichtig, so bedeutet dies, dass im Zwischenbilde die Flächenhelligkeit überall gleich gross ist, nämlich

$$T [100 (\%) - y (\%) + y (\%)] = T \cdot 100 (\%).$$

Dies muss natürlich herauskommen.

Wie schon dargelegt und später näher ausgeführt wird, misst man beim Photometrieren einmal die Transparenz des interessierenden Fleckes, T_1 , dann jene der Umgebung T_2 , und bildet den Quotienten

$$\frac{T_1}{T_2}$$

Wir fragen uns nun, wie gross der relative Fehler u unter den angenommenen Umständen wird, wenn wir u definieren als

$$u = \frac{\text{falsches Resultat} - \text{richtiges Resultat}}{\text{richtiges Resultat}}$$

$$u = \frac{\frac{T_1 y + T_2(100\% - y)}{T_2} - \frac{T_1}{T_2}}{\frac{T_1}{T_2}}$$

$$= \frac{T_1 \cdot y + T_2(100\% - y) - T_1}{T_1} = T_1 \cdot 100\%$$

$$= \frac{(T_1 - T_2)(y - 100\%)}{T_1}$$

Wenn $T_1 = T_2$, so entsteht kein Fehler, wie es sein muss. Ist aber beispielsweise $T_1 = 10\%$, $T_2 = 100\%$ ($T_2 = 10 T_1$), so erhält man

$$u = 9 [100\% - y (\%)]$$

Dies ergibt bei einem photometrischen Fleck, dessen \varnothing an der Grenze des Auflösungsvermögens liegt, einen relativen Fehler von mehr als 150%!

Bei einem photometrischen Fleck, dessen \varnothing das 10fache des Auflösungsvermögens beträgt, beläuft sich $100\% - y$ (%) auf etwa 2%. Der relative Fehler u beträgt dann weniger als 20%.

Diese Erkenntnisse zwingen uns zu folgender Folgerung:

a) Das Leuchtfeld muss sich dem Gesichtsfeld eng anschmiegen, das heisst, es sollte im wesentlichen nur der auszumessende Fleck beleuchtet sein. Wir haben deshalb eine Leuchtfeldblende und ein wirksames (gut korrigiertes) Beleuchtungssystem zu fordern.

b) Die Lichtstreuung muss sehr gering sein. Dies ist vor allem eine präparative Forderung. Der Konstrukteur kann lediglich beitragen, indem er den ersten Punkt möglichst gut befriedigt.

Nehmen wir an, wir hätten ein Gesichtsfeld vom $\varnothing x$ und daneben eine gleichmässig erhellte Fläche, deren Flächenhelligkeit aber – zum Beispiel durch Streulicht – bloss 1% der Helligkeit des Gesichtsfeldes betragen soll, so zeigt eine der vorhergehenden analoge Betrachtung, dass, wenn $T_2 = 10 T_1$, immer noch 2–3% relativer Fehler entstehen, wenn x dem Auflösungsvermögen entspricht.

Es ist zu erwähnen, dass die Lichtstreuung auch auf direktem Wege grosse Fehler macht, nicht nur auf dem Umweg über die Aufhellung des Präparates und Beugung.

Wenn man daher bloss etwa 1% Gesamtfehler der Apparatur zulassen will, so wird nicht zu umgehen sein, den \varnothing des kleinsten photometrischen Fleckes

$$\text{etwa } 10 \cdot \frac{\lambda}{\text{NA Obj.} + \text{NA Kond.}}$$

zu wählen

Dies ergibt für $\lambda = 0,6 \mu$, n.A. Obj. = 1,3, n.A. Kond. = 0,7 (diese soll nicht zu gross sein)

$$\varnothing = 10 \cdot 0,3 \mu = 3 \mu$$

2. *Lichtstreuung und UV.* Die obigen Ausführungen mögen den Gedanken nahelegen, der photometrische Fleck könnte bei Verwendung von UV kleiner gemacht werden. Dies ist tatsächlich der Fall, nur darf der dadurch erreichte Gewinn nicht zu hoch eingeschätzt werden, da der Hauptfehler im UV durch Lichtstreuung («Scattering») entsteht. Die Lichtstreuung geht bekanntlich mit $1/\lambda^4$. Dies bedeutet, dass bei Verkürzung der Wellenlänge von 600 auf 300 $\mu\mu$ das Streulicht $2^4 = 16 \times$ zunimmt.

3. *Aperturen.* Im Hinblick auf das Auflösungsvermögen ist den Aperturen bei Mikrophotometrie keine allzu grosse Beachtung zu schenken, da der photometrische Fleck im Vergleich dazu ohnehin recht gross sein muss, wie vorhin ausgeführt wurde.

Die übersichtlichsten und saubersten Verhältnisse liegen dann vor, wenn der photometrische Fleck durch nahezu paralleles Licht beleuchtet wird, da die Absorptionsgesetze normalerweise unter dieser Voraussetzung gültig sind. Eine Eichung der Apparatur für verschiedene Beleuchtungsaperturen ist allerdings bei homogenen Präparaten nicht kompliziert. Eine geringe Kondensorapertur ist auch erwünscht, weil die Schärfentiefe (vom Beleuchtungssystem aus gesehen) zunimmt, wodurch die durch Aberrationen verursachten Fehler vor allem bei dickeren Objekten kleiner werden. Dagegen ist eine relativ hohe Objektivapertur erwünscht, damit möglichst alles abge-

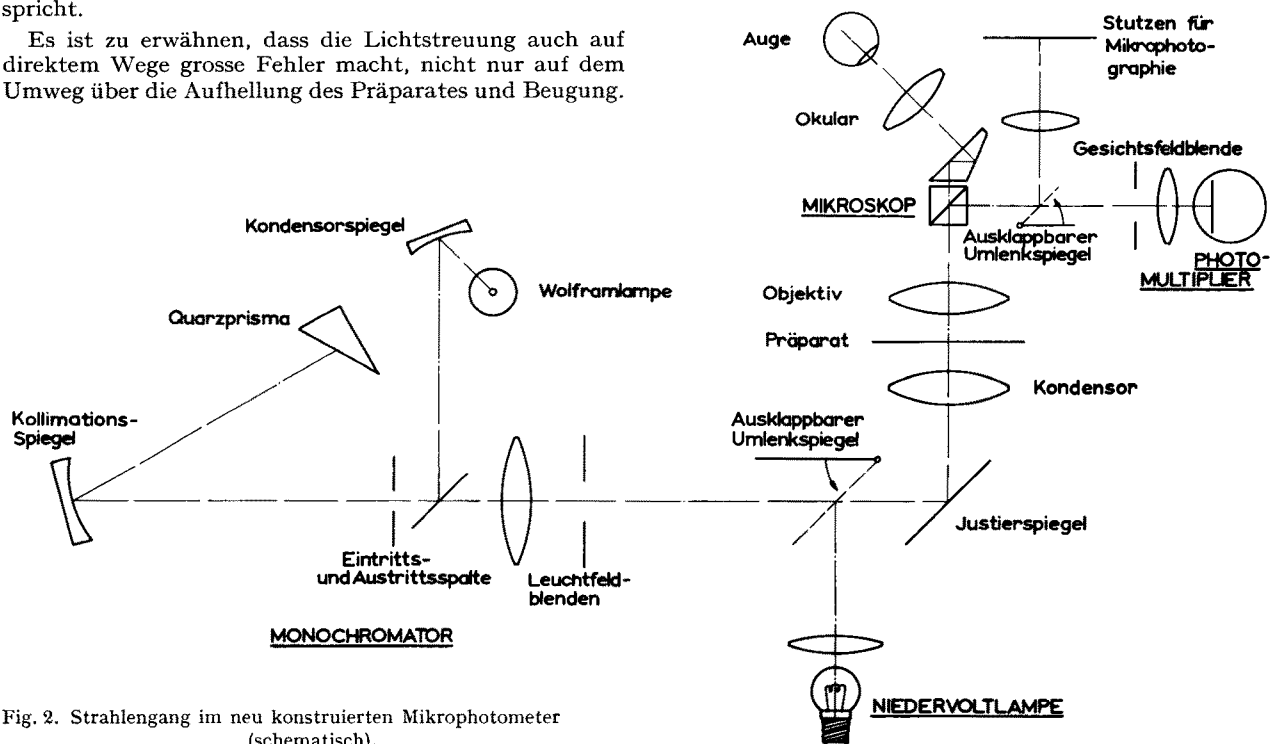


Fig. 2. Strahlengang im neu konstruierten Mikrophotometer (schematisch).

beugte Licht ins Objektiv eintreten kann. Mit der Verkleinerung der Kondensorapertur nimmt bei Beibehaltung des Gesichtsfeldes natürlich der Lichtstrom und damit die Empfindlichkeit der Apparatur ab.

IV. Einige die Konstruktion betreffende Überlegungen

Ein Spektralmikrophotometer umfasst grundsätzlich folgende Teile (siehe Abb. 2):

1. Spektralphotometer mit einer oder mehreren Lichtquellen, Prisma (oder Gitter), Ein- und Austrittsspalt, Zwischenoptik. Die Zwischenoptik bildet den Eintrittspunkt auf den Austrittsspalt ab. Das Prisma zeigt Farbdispersion, so dass das Bild des Eintrittsspalt farbig ist. Die Farbe kann je nach der Stellung des Prismas verändert werden. Für den sichtbaren Spektralbereich sowie das angrenzende UV und IR erweist sich eine Niedervoltlampe als geeignet. Speziell für Messungen im UV wird eine Wasserstoff- oder Quecksilberlampe in Frage kommen.

2. Ein leistungsfähiges Forschungsmikroskop mit Apochromaten oder Semiapochromaten (für den sichtbaren Bereich und das nähere UV), einem genau gehenden und bequem einzustellenden Tisch sowie Binokulartubus für visuelle Beobachtung und Scharfstellung.

3. Ein sehr gutes Beleuchtungssystem, wie im vorigen Abschnitt dargelegt wurde. Der Spalt des Monochromators wird deshalb mit Vorteil zuerst auf eine Ebene abgebildet, in der eine Blende liegt. Diese Blende dient als Leuchtfeldblende. Sie wird mit einer Zwischenoptik und dem Mikroskopkondensor in die Präparatebene abgebildet, während in der Eintrittspupille des Kondensors ein Zwischenbild der Lichtquelle entsteht (Köhlerbeleuchtung). Der \varnothing des Leuchtfeldes soll aus praktischen Gründen etwas grösser sein als jener des photometrischen Fleckes (kleinster Wert 3–4 μ), aber aus Gründen der Lichtbeugung und -streuung nicht zu gross. Er kann 5–6 μ betragen (kleinster Wert). Bei gegebener Apertur eines Spektralphotometers und vorgegebenem Leuchtfeld ist dann die Beleuchtungsapertur des Mikroskopes nicht mehr frei wählbar. Eine Apertur von ungefähr 0,6 ist leicht erreichbar, und eine höhere Beleuchtungsapertur ist nicht erwünscht, wie schon dargelegt wurde.

Die Zwischenoptik muss gemeinsam mit dem Kondensor ein achromatisches System bilden (zuerst einmal achromatisch für den visuellen Spektralbereich), damit der Kondensor bei Änderung der Wellenlänge nicht nachgestellt werden muss, und soll austauschbar sein gegen ein speziell für das UV-Gebiet berechnetes System, das leider aus recht teuren Gläsern (Quarz und Flußspat) bestehen muss, sofern man nicht Spiegeloptik verwenden will.

Aus Gründen der Universalität sollte im Beleuchtungsstrahlengang ein Küvettengehäuse angebracht sein, dessen Konstruktion erlaubt, wahlweise verschiedene Küvetten zu durchstrahlen. Eine Leerposition dient für Mikrophotometrie. Durch Entfernen des mikroskopischen Präparates und Einschieben einer Glaslamelle an dessen Stelle kann dann von Mikrophotometrie zu gewöhnlicher Spektralphotometrie übergegangen werden.

4. Einige Sehfeldblenden, die in einer Zwischenbildene liegen und den Durchmesser des jeweiligen photometrischen Fleckes bestimmen. Es ist vernünftig, mehrere Sehfeldblenden (die zum Beispiel in einem Revolver angebracht sind und wahlweise in den Strahlengang gebracht werden können) zu verwenden. Zwar kann man mit einem kleinen photometrischen Fleck alle Aufgaben lösen, die auch einen grösseren Fleck zulassen. Ein grösserer photo-

metrischer Fleck hat aber einen grösseren Lichtstrom und deshalb eine grössere Empfindlichkeit zur Folge.

5. Einen Binokulartubus, der vor und während des Messvorganges visuelle Beobachtung des Präparates erlaubt. Ein Okular trägt in seiner Zwischenbildebene ein Glasplättchen mit konzentrischen Ringen, die genau denselben Präparatausschnitt umfassen sollen, wie ihn die entsprechenden Blenden in einer anderen Zwischenbildebene darstellen. Diese Korrespondenz muss sehr genau sein und erfordert deshalb einen Justiervorgang, bei dem an Stelle des Präparates ein Spiegel eingeschoben und das Blendenbild mit dem entsprechenden Ring im Okular zur Deckung gebracht wird.

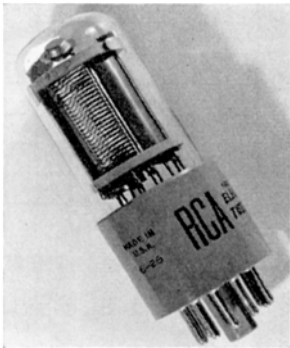


Abb. 3a.

Ebenfalls mit Hilfe visueller Beobachtung werden die Präparatebene und das Leuchtfeld scharf eingestellt und letzteres zentriert.

6. Einen Empfänger für Lichtenergie, mit Vorteil wegen des geringen Lichtstromes ein Photomultiplier (etwa 10^{-4} – 10^{-3} lm). Da die Photomultiplier ausgeprägte spektrale Empfindlichkeitsmaxima besitzen, benutzt man für den Bereich des visuellen Spektrums mit Vorteil deren zwei, zum Beispiel 1 P 22 und 1 P 28 (RCA). Der erste besitzt ein Empfindlichkeitsmaximum bei 400 m μ und ist brauchbar bis 700–800 m μ . Der zweite besitzt ein Empfindlichkeitsmaximum bei 350 m μ und ist brauchbar bis 600–700 m μ . Wahlweise kann der eine oder andere in den Strahlengang eingeschaltet werden.

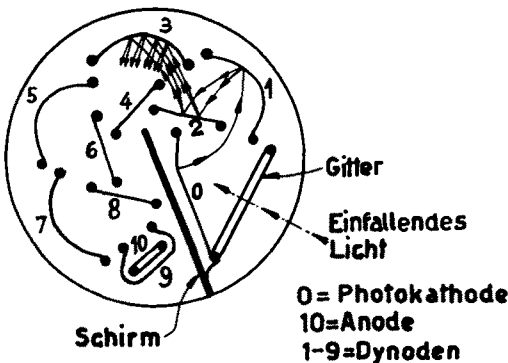


Abb. 3b. Schema eines Photomultipliers.

7. Einen elektronischen Messteil, um die von den Photomultipliern erzeugten Ströme zu messen. Für den gewöhnlichen, manuellen Gebrauch des Instruments kann er prinzipiell so konstruiert sein, dass der Photostrom am Gitterableitwiderstand einer Elektrometerröhre zum Beispiel eine Gitterspannungsänderung hervorruft. Diese

Änderung kann durch Entgegenschaltung derselben Spannung kompensiert werden. Schaltet man in den Anodenkreis der Verstärkerröhre ein Nullinstrument, so

so ausgeführt sein, dass an einem andern Potentiometer der Dunkelstrom abgeglichen und an einem weiteren Potentiometer die Empfindlichkeit kontinuierlich geändert werden kann (damit man bei angegebener Halbwertsbreite des Lichtes, das heisst vorgegebener Spaltbreite die Transmission irgend einer Präparatstelle – zum Beispiel der Umgebung – willkürlich auf 100% stellen und damit die Transmission irgend einer anderen Präparatstelle relativ zur ersten direkt messen und ablesen kann). Damit die Apparatefehler 1% nicht überschreiten, darf die Elektronik allein nur Fehler von einigen Promille machen. Photomultiplier und Verstärkerröhren müssen also mit hochstabilen Spannungen bedient werden, die am besten Batterien entstammen.

Der Messvorgang soll weitgehend automatisiert werden können. Das Prisma (Monochromator) muss deshalb automatisch (mit einem Motor) gedreht und die Elektronik mit einem Nachlaufschreiber verbunden werden können. In diesem Falle wird nicht eine Kompensationschaltung benutzt, sondern der Nachlaufschreiber wird im Prinzip wie ein direktanzeigendes Messinstrument in den Anodenkreis einer Verstärkerröhre geschaltet.

8. Einen mikrophotographischen Teil. Es muss möglich sein, das Präparat vor oder nach der Messung auf bequeme Art zu photographieren. Der Strahlengang muss also anstatt auf den Photomultiplier durch einfaches Einschalten eines Prismas auf eine Photokamera umgelenkt werden können. Gleichzeitig ist binokulare Beobachtung möglich.

Ein universelles Gerät erfordert auch Ausbaufähigkeit für Messungen im UV, eventuell im Infrarot. An die Stelle visueller Beobachtung im Binokulartubus kann dann elektronische Übertragung auf einen Leuchtschirm treten («Fernsehmikroskop»).

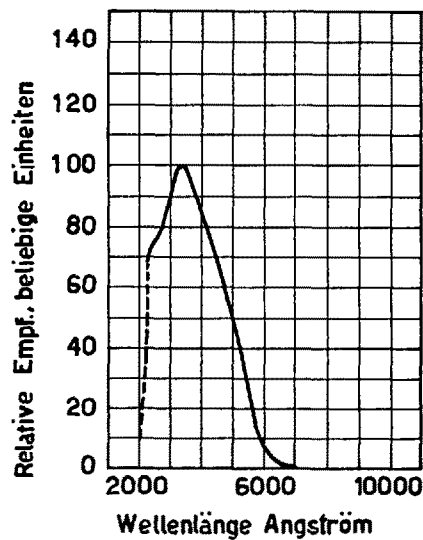


Abb. 3c. Spektrale Empfindlichkeit des Photomultipliers

lässt sich die erfolgte Gittervorspannungsänderung ermitteln und ist ein Mass für die Grösse des Photostromes, damit auch für den Lichtfluss und demzufolge für die Transmission. Die Gittervorspannungsänderung kann über ein (zum Beispiel in Prozent Transmission geeichtes) Potentiometer kompensiert werden. Die Schaltung muss

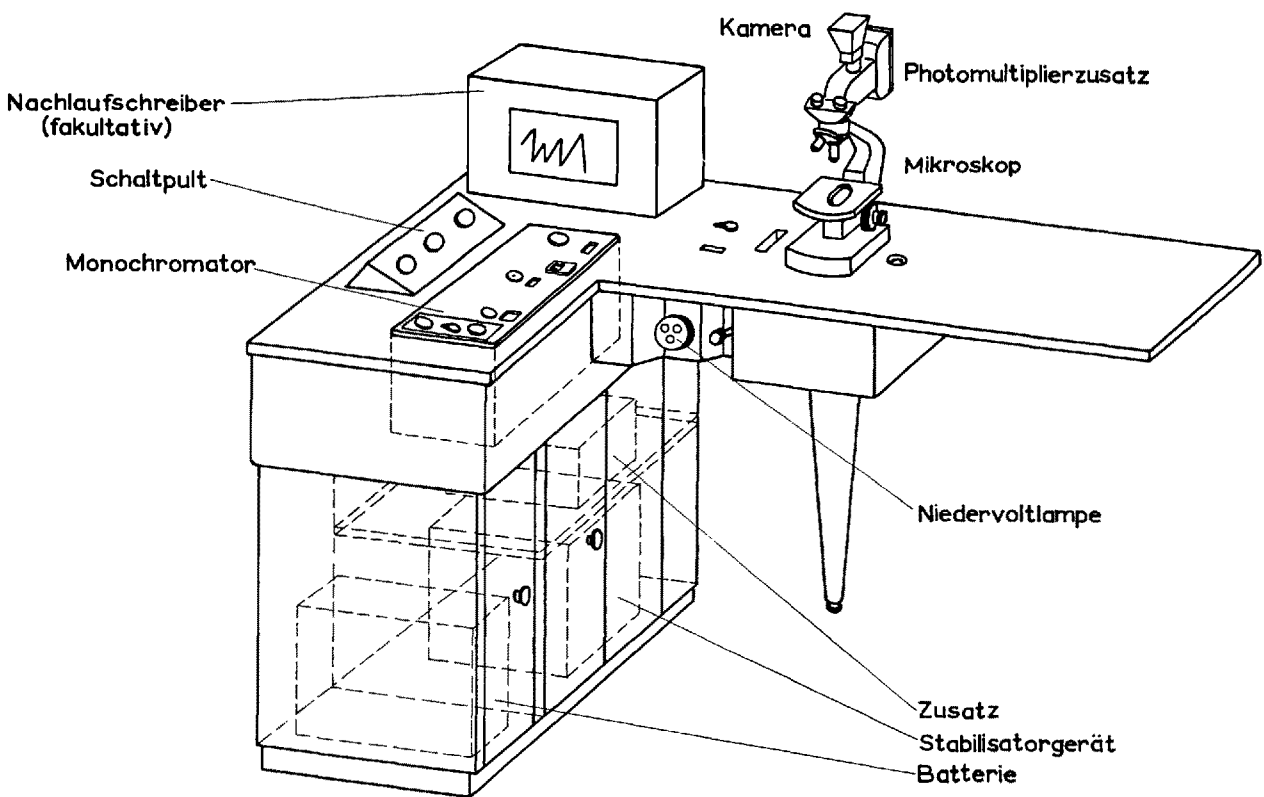


Abb. 4. Gesamtbild des neuen Mikrophotometers (schematisch)

V. Praktische Ausführung

Die angestellten Überlegungen führten zur Konstruktion eines neuen Mikrophotometers (Abb. 4*).

Der Monochromator (es handelt sich um ein Beckman-Modell) ist stabil in einem zweckmässigen Tisch eingebaut, der in mehreren Fächern die notwendigen Zubehörteile enthält (8-V-Akku, Stabilisatorgerät zum stetigen Nachladen des Akkus, Batteriekasten mit Trockenbatterien zur Speisung der Photomultiplier).

Als Mikroskop wird das neue Forschungsmodell M20 in modifizierter Form verwendet. Ein spezieller Stutzen für Mikrophotometrie und Mikrophotographie (dieser Stutzen trägt die verschiedenen Sehfeldblenden, ein Photomultipliergehäuse und, wenn erwünscht, die Aufsatzkamera II) kann zwischen Binokulartubus und Stativ eingesetzt werden. Die Tischtriebe wurden zwecks genauerer und bequemerer Einstellbarkeit eines bestimmten Präparatausschnittes modifiziert.

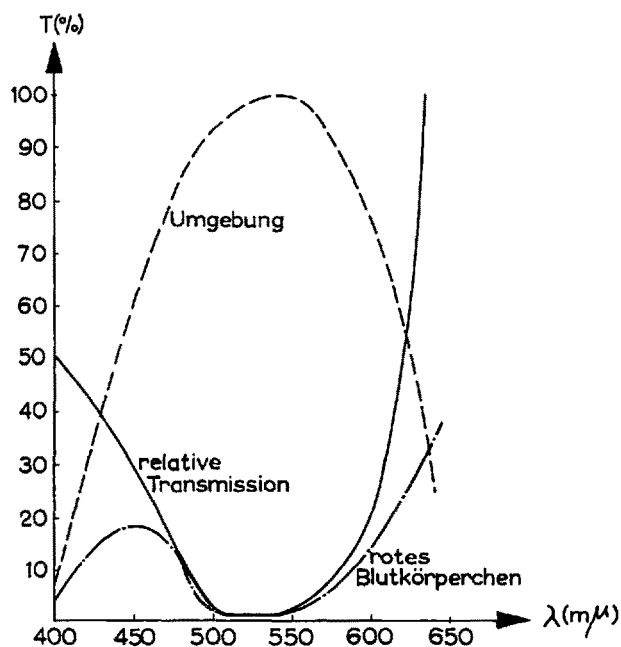


Abb. 5. Durchlässigkeitskurve eines Erythrozyten.

Der über den Monochromator führende Strahlengang wird über einen sehr genau einstellbaren, im Tisch eingebauten Spiegel ins Mikroskop umgelenkt. Dieser Spiegel dient auch zur Zentrierung des Leuchtfeldes. Die Beleuchtung des Präparates kann entweder mit monochromatischem oder «weissem» Licht (von einer Niedervoltlampe) erfolgen, wobei die Niedervoltlampe mit der stabilisierten Normalspannung 6 V oder zur Erhöhung der Empfindlichkeit mit der ebenfalls stabilisierten Über-

spannung 8 V betrieben werden kann. Der Tisch trägt ein Schaltbrett, auf dem alle Schalter, Messinstrumente (für Lampenspannung und Einstellung der Stabilisierung) und Kontrollämpchen übersichtlich angeordnet sind. Die Bedienungsknöpfe der Elektronik, des Prismas und des Spaltes bilden die Fortsetzung des Schaltbrettes auf dem Tisch.

Je nach Wunsch können durch einfache Manipulationen ein Motor zur automatischen Drehung des Prismas (SERA) und ein Nachlaufschreiber angeschlossen werden. Der ganze Aufbau des Apparates wurde so gewählt, dass der Anwendungsbereich nicht auf die Histologie und Histochemie beschränkt bleibt, sondern auch auf andere Gebiete wie die Mikrochemie, Mineralogie usw. ausgedehnt werden kann. Daher wurde auch an Stelle der üblichen Bezeichnung Histophotometer der mehr allgemeine Ausdruck Mikrophotometer gewählt.

Herrn Professor Dr. GOTTSCHESKI, Max-Planck-Institut für Tierzucht und Tierernährung, Mariensee/Trentthorst, möchte ich für seine vielseitigen Anregungen an dieser Stelle bestens danken.

Summary

The possibilities of microphotometry, and the demands to be made upon a microphotometer, are investigated and the resulting principles for construction are discussed. The advantage of a stable combination of a one-ray spectrophotometer with a high performance research microscope is stressed. The use of a photomultiplier as receiver of light energy is recommended, owing to its high degree of sensitivity. The preparation can be observed through a binocular tube and photomicrographs taken with a photomicrographic camera. A cell holder built into the illumination system serves for the usual spectrophotometry and the results obtained microscopically can be compared with macroscopic measurements. The illumination can rapidly be changed from monochromatic to 'white' light (originating from a low voltage lamp, for visual observation, photography, fluorescence measurements).

The smallest photometric spot by which exact absorption measurements in the visible spectral region can be made, has a diameter of about 3μ . A well adjusted field diaphragm is of decisive importance.

It should be possible to arrange a considerable degree of automation in the measuring process.

BIBLIOGRAPHIE:

- ¹ R. C. MELLORS, *Analytical Cytology, Newer Methods for Studying Cellular Form and Function* (Mc Graw-Hill Book Company, Inc., New York 1955).
- ² T. CASPERSSON, *Skand. Arch. Physiol.* 73, Suppl. 8, 1 (1936).
- ³ A. H. BENNETT, H. JURNICK, H. OSTERBERG, and O. W. RICHARDS, *Phase Microscopy* (John Wiley and Sons, Inc., New York 1951).
- ⁴ P. DEBYE, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 51, 75 (1949).

* Herstellerfirma: Wild Heerbrugg, Heerbrugg (St. Gallen).