

Das Mikrospectrometer.

Von

Th. W. Engelmann

in Utrecht.

Mit einer Steindrucktafel (1) und einem Holzschnitt.

Durch die Entdeckung der Zusammensetzung der lebenden Wesen aus mikroskopisch kleinen, auf gesetzmässige Weise gebauten und angeordneten Formbestandtheilen erwuchs der Physiologie die Aufgabe, das Leben aus den Leistungen dieser kleinsten Formbestandtheile zu erklären. Auf dem Boden der mikroskopischen Anatomie erstand die Mikrophysiologie. Beide sind durch die Kleinheit ihrer Objecte gezwungen, eigenthümliche Untersuchungsmethoden anzuwenden. Diese Nothwendigkeit macht sich besonders stark da geltend, wo es darauf ankommt, Eigenschaften und Erscheinungen nicht nur qualitativ zu untersuchen, sondern zu messen. Unzweifelhaft wird der weitere Fortschritt der Physiologie zu einem nicht geringen Theil vom Auffinden solcher Methoden abhängen. Man kann inzwischen nicht behaupten, dass in dieser Richtung bereits alles billig zu Erwartende geleistet sei.

Sieht man ab von den mikrometrischen Bestimmungen der Aenderungen, welche Zahl, Form, Dimensionen kleinster Formbestandtheile während des Wachsthum und unter Einfluss von sogenannten Reizen oder anderen Agentien erleiden, von den Versuchen zur Bestimmung von Brechungscoefficienten, von den osmotischen Versuchen zur Ermittlung der isotonischen Lösungen, von der Anwendung der Bacterienmethode und quantitativen Spectralanalyse auf das Problem der Sauerstoffausscheidung von Pflanzenzellen im Licht, endlich von den PFEFFER-

sehen Versuchen über Chemotaxis, dann zeigt sich, dass wir fast überall noch auf rein qualitative Untersuchung beschränkt sind.

Das auf den folgenden Seiten zu beschreibende Instrument ist zur quantitativen Analyse der Farbe mikroskopisch kleiner Gegenstände bestimmt. Ursprünglich erfunden und bisher hauptsächlich gebraucht zur quantitativen Bestimmung der Absorption verschiedenfarbigen Lichts durch lebende chromophyllhaltende Pflanzenzellen¹, ist der Apparat zur quantitativen Mikrospectralanalyse in ihrem ganzen Umfang brauchbar, und kann er auch bei den meisten makrospectrometrischen Untersuchungen mit Nutzen an Stelle der gebräuchlichen grossen Apparate benutzt werden. Eine kurze Skizze seiner Einrichtung und Anwendung habe ich schon vor einigen Jahren gegeben². Die damals versprochene, von den zum genauen Verständniss erforderlichen Zeichnungen begleitete ausführlichere Beschreibung folgt hier.

Das Princip des Apparats ist wesentlich das des VIERORDT'schen Spectrophotometers. Die Messung erfolgt also in der Weise, dass man durch Aenderung der Spaltweite die Helligkeit eines Vergleichsspectrums nacheinander an den verschiedenen Stellen des Spectrums der Helligkeit der entsprechenden Stellen des Objectspectrums gleich macht, welches letztere bei constanter Spaltweite beobachtet wird. Da, bei gleichmässiger Beleuchtung eines Spalts in seiner ganzen Ausdehnung, die durchgelassene Lichtmenge der Spaltweite direct proportional ist, folgt aus dem bekannten Verhältniss der Spaltweiten, bei dem gleiche Helligkeit beider Spectra besteht, unmittelbar das Verhältniss der Lichtstärken beider Spectren an den verglichenen Stellen.

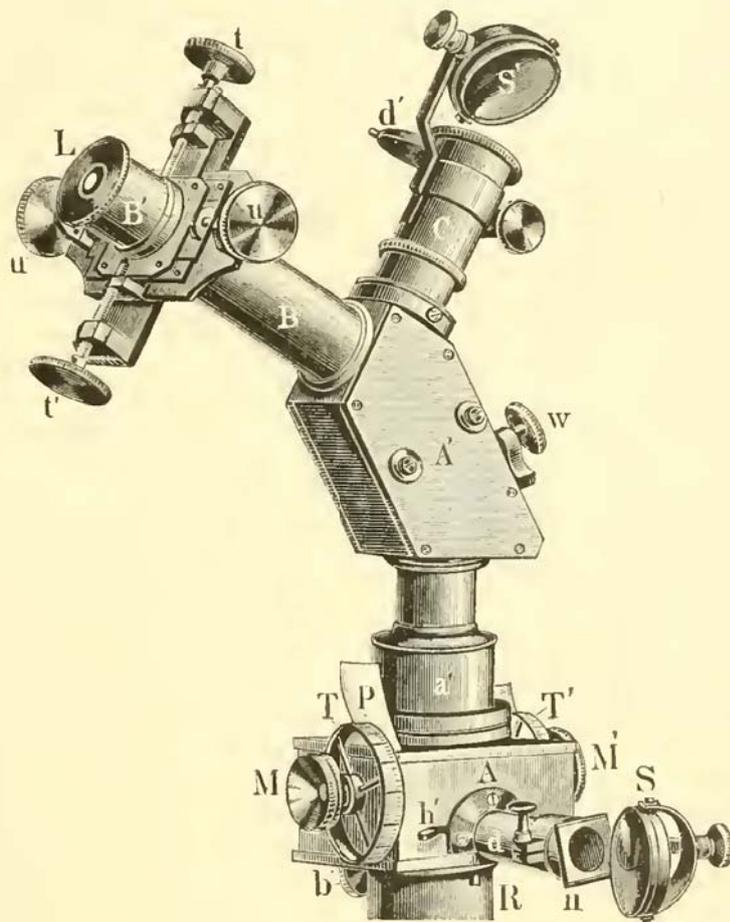
Der Apparat, welcher beim Gebrauch an Stelle des Oculars in den Mikroskoptubus kommt, ist auf beistehendem Holzsnitte in halber Grösse abgebildet. Er besteht aus zwei Stücken, deren Einrichtung aus den Durchschnittszeichnungen Tafel I. Figur 1 und 2, ersichtlich ist.

1. Das Unterstück (Figur 1) enthält den doppelten Spaltmechanismus und die Vorrichtung zum Erhalten eines Spectrums von einer seitlich vom Mikroskop befindlichen Lichtquelle, deren Licht man mit dem des farbigen Objects quantitativ zu vergleichen wünscht. Das Oberstück (Figur 2) ist das eigentliche Spectroskop.

¹) Onderzoek. ged. in het physiol. laborat. der Utrechtsche Hoogeschool. (3) IX. B. 9. 1884; Ebenda X, B. 107, 1887; Cfr. a. Botan. Zeitg. 1884, No. 6 p. 81 (diese Zeitschr. Bd. I, 1884 p. 257).

²) Proc. verb. d. K. Akad. v. wetensch. v. 24 Nov. 1883; Onderzoek. etc. l. c.; Botan. Zeitg. l. c. Der Apparat wurde von CARL ZEISS in Jena ausgeführt. Der Preis beträgt M. 480.

Das Unterstück besteht aus einem rechteckigen Kästchen *A*, oben und unten mit weiter, kreisförmiger Oeffnung, gegen welche angeschraubt sind, unten: die Röhre *b*, die beim Gebrauch an Stelle des gewöhnlichen Oculars in den Mikroskoptubus *B* geschoben und hier mittels der Schraube *b'* festgesetzt wird; oben: die Röhre *c*, in welche beim Einstellen des Objects das kleine Ocular *oc* kommt, während später, nach Entfernung von *oc*, das cylindrische Unterstück *a'* (Figur 2) des



Spectroskops darüber geschoben wird. Das letztere ruht dann mit dem Ring *r* in der kreisförmigen Rinne *s* und wird hier durch einen, in den Zeichnungen nicht sichtbaren, einfachen Mechanismus in der in Bezug auf die Spaltrichtung erforderlichen constanten Lage fixirt. Aufsetzen und Abnehmen des Oberstücks erfolgen äusserst bequem, ohne Erschütterung, sodass viel weniger Gefahr für Verschiebung des Objectbilds aus dem Spalt besteht, als beim Mikrospectralocular von *ABBE* und *ZEISS*, dessen Ober- und Unterstück beweglich miteinander verbunden sind.

An die rechte Seitenwand des Kästchens *A* ist das, in Figur 1 nicht sichtbare, Röhrechen *d* angesetzt, durch welches Licht von einer seit-

lichen Lichtquelle auf das kleine total reflectirende Glasprisma pr (Figur 1) fallen kann, welches mittels des kleinen, bei h' aus dem Kästchen A herausragenden Hebels h nach Belieben unter oder aus dem Bereich des rechten, das Vergleichsspectrum liefernden Spalts gebracht werden kann.

Am Röhrchen d ist, in jeder Richtung verstellbar, das Planspiegelchen S befestigt, das auch, z. B. bei Benutzung eines Glühlämpchens als seitlicher Lichtquelle, durch eine positive Linse ersetzt werden kann. In der äusseren Oeffnung von d streckt ein kurzes Röhrchen mit dem Rahmen n , in welchen Diaphragmen von verschiedener Weite, matte oder farbige Gläser eingesetzt werden können. Um in allen Fällen eine gleichmässige, vom Stand des beobachtenden Auges soviel wie möglich unabhängige Erleuchtung des Vergleichsspalts zu erhalten, ist auf Vorschlag von Prof. ABBE in der inneren Oeffnung des Röhrchens d eine schwache positive Linse angebracht, welche von der äusseren, zur Aufnahme der Diaphragmen u. s. w. eingerichteten Oeffnung von d ein virtuelles Bild im Mikroskoptubus ungefähr an der Stelle entwirft, wo sich die Oeffnung des Objectives befindet, durch welches der Objectspalt Licht erhält.

Der wichtigste Theil des Unterstücks ist der doppelte Spaltmechanismus. Er besteht in der Hauptsache aus zwei, symmetrisch und unabhängig von einander in derselben horizontalen Ebene beweglichen Spalten, Object- und Vergleichspalt, die sich in der Mitte berühren und in der Verlängerung vor einander liegen. Die symmetrische Bewegung der Schneiden wird in derselben Weise, wie schon bei meinem Mikrospectralobjectiv¹ und beim Spaltapparat von DONDERS² durch eine einzige Schraube erzeugt, deren Axe zwei entgegengesetzt gewundene Schraubengänge trägt.

Figur 1 zeigt einen der beiden im Kästchen A befindlichen Spaltapparate im verticalen Durchschnitt. Die Schneiden p und p' , welche den Spalt zwischen sich lassen, sind an die Blöckchen e und e' festgeschraubt, welche geschlitzte, durch Schraubchen anziehbare Muttern für die Schraubengänge der gemeinschaftlichen Axe a darstellen. Die Schraube in e ist rechts, die in e' links gewunden. Eine in der Figur nicht sichtbare stählerne Feder strebt, zur Vermeidung des tothen Gangs

¹) Proc. verb. K. Akad. v. wetensch. Zitting v. 25. Febr. 1882; Onderzoek. ged. in het physiol. lab. etc. (3) VII, 1882. p. 191. Botan. Zeitg. 1882, No. 26 p. 419 ff.

²) Onderzoek. etc. (3) VII, 1882. p. 18.

e und e' auseinander zu halten. Da die Axe a sich wegen ihrer Befestigung in dem starken metallenen Rahmen m (Figur 1) nicht in ihrer Längsrichtung verschieben kann, die Blöcke e und e' mit den daran befestigten Schneiden p und p' aber wohl (und zwar ausschliesslich in dieser Richtung), müssen beim Drehen von a beide Spaltränder sich gleichviel gegen die unveränderliche Mitte der Spalte verschieben.

Die Grösse der Verschiebung kann auf der mit Theilung versehenen, auf a befestigten Trommel T (Figur 1) abgelesen werden, deren fünfzig, etwa 1.57 mm auseinander stehende Theilstriche Hundertsteln eines Millimeters entsprechen ¹. Mit grosser Genauigkeit können also Unterschiede der Spaltweite von 1 μ noch geschätzt werden. Die Scalentrommel ist mittels der Mutter M auf der Axe a festgesetzt und kann, nach Losschrauben von M , um a gedreht, der Nullpunkt der Scala also bei eventuell unrichtigem Stand leicht corrigirt werden. Im Holzschnitt sieht man noch p , ein Stückchen weissen Cartons, das zur besseren Beleuchtung der Scala des Vergleichspalts dient.

Der zweite Spaltapparat (Objectspalt), von dem in Figur 1 nichts und im Holzschnitt nur die Trommel T' und der Schraubenkopf M' sichtbar ist, gleicht völlig dem ersten.

In der Mitte berühren sich beide, sodass auch beide Spectra hier unmittelbar aneinander grenzen, was für die Entscheidung über Gleichheit oder Ungleichheit der Helligkeit beider erfahrungsgemäss vortheilhaft ist.

Von grösster Bedeutung ist, dass die Mitte des einen Spalts genau die Verlängerung von der Mitte des anderen bilde. Ist dies nicht der Fall, dann berühren sich beide Spectra mit verschiedenen Farben, ein Fehler, der besonders an Stellen schnellen Farbenwechsels, also beson-

¹) Gang und Anweisungen der Mikrometerschraube wurden in der Weise controllirt, dass der Spaltapparat auf dem Objecttisch eines Mikroskops fixirt und die verschiedenen Stellungen der Schraube entsprechenden Spaltweiten direct, bei 500maliger Vergrösserung, mit einem Ocularmikrometer gemessen wurden. Es zeigte sich, dass zwischen 0 und 0.25 mm Spaltweite, den gewöhnlich innegehaltenen Grenzen, ein Theilstrich der Scala 0.0101 mm (statt 0.01 mm) entsprach. Beim Einstellen durch Drehen der Schraube in der nämlichen Richtung waren die Abweichungen von diesem Mittelwerthe an den verschiedenen Stellen der Schraube klein genug, um unberücksichtigt bleiben zu können. Bei Einstellung abwechselnd durch Auf- und Zudrehen ergab sich neuerdings ein constanter Unterschied von etwa 0.01 mm (todter Gang). Die hierin gelegene Fehlerquelle ward vorläufig dadurch beseitigt, dass bei Bestimmung des Nullpunkts wie bei den Einzelmessungen die Einstellung stets durch Drehung der Schraube in der nämlichen Richtung (Zudrehen) bewirkt ward.

ders im Gelb, sehr störend wirken könnte. Sollte infolge unvorsichtiger Handhabung, z. B. zu starkem Anziehen einer der beiden Mikrometerschrauben, die Mitte eines Spalts sich verschoben haben, so müssen die verschobenen Schneiden wieder richtig gelagert werden. Sie sind zu dem Zwecke jede mittels zweier Stellschraubchen mit einigem Spielraum in den Platten f und f' befestigt, welche die Blöcke e und e' tragen.

2. Das Oberstück, in Figur 2 auf dem Längsschnitt abgebildet, dient zum Entwerfen und Beobachten der beiden zu vergleichenden Spectra. Der Holzschnitt zeigt es so, wie es während der Messungen auf dem Unterstück fixirt ist.

Es besteht aus dem prismatischen Kästchen A' , welches das analysirende Prismensystem P birgt, das aus zwei Prismen von Crown Glas (Brechungsindex für die gelben Strahlen 1.511, Brechungswinkel $40^{\circ}20'$) und einem von Flintglas (Index 1.691, Winkel $110^{\circ}42'$) zusammengesetzt ist. Unten am Kästchen ist die Collimatorröhre a' festgeschraubt, welche in obenerwähnter Weise zur Fixirung des Spectroskops auf dem Unterstück dient, und oben die Linse l enthält, welche die von den Spalten kommenden Strahlen parallel auf das Prismensystem P wirft. Die Axe der Collimatorröhre bildet mit der Längsaxe des Kästchens A' einen Winkel von 30° .

Die aus P austretenden Strahlen sind in der Richtung nach dem Beobachtungsrohr B gebrochen, dessen Axe unter 30° gegen die von A' und unter 60° gegen die von a' , also auch gegen den Mikroskop-tubus geneigt ist. Mittels des Objectivs l' wird in der Ebene von i ein reelles Spectrum der beiden Spalten entworfen, das mit der im Röhrechen B' verschiebbaren Lupe L bei etwa 20maliger Vergrößerung betrachtet wird. Die scheinbare Grösse der Spectra übertrifft dann etwa viermal die des Spectrums im Mikrospectralocular von ABBE-ZEISS und achtmal die von SORBY-BROWNING'S Ocular. Auf 250 mm Abstand projicirt, beträgt der Abstand der FRAUNHOFER'schen Streifen a und g 185 mm. — Die Lichtstärke ist genügend, um auch bei Anwendung von Gaslicht die Benutzung der stärksten Immersionssysteme in vielen Fällen noch zu gestatten. Nur im äussersten Roth und im Violett sind wegen der geringen Empfindlichkeit des Auges für diese Strahlen genaue quantitative Bestimmungen nicht wohl ausführbar, wenn man nicht äusserst starke Lichtquellen und schwache Objective anwendet. Das Gesichtsfeld erstreckt sich deshalb auch nur auf die Wellenlängen zwischen etwa 0.75μ und 0.42μ .

In Betreff der Reinheit und Schärfe der Spectra sei bemerkt, dass bei einer Spaltweite von 0.025 mm und weniger, im Spectrum von

Sonnenlicht, das durch zwei Mattgläser gedämpft war, die D-Linie deutlich doppelt erscheint und zwar die brechbarere der beiden Linien beträchtlich breiter und dunkler als die andere, etwa so wie in der Abbildung des Sonnenspectrums von G. MÜLLER auf Taf. 33 in No. 6 des zweiten Bandes der „Publicationen des astrophysikalischen Observatoriums zu Potsdam“. Die Zahl der deutlich erkennbaren FRAUNHOFER'schen Streifen steht kaum hinter der auf dieser Tafel abgebildeten zurück.

Zugleich mit den beiden Spectren kann eine ÅNGSTRÖM'sche Scala der Wellenlängen in die Ebene i projectirt werden. Hierzu dient die Röhre C , in der sich bei sc eine Glasplatte mit der Scala (helle Streifen auf dunklem Grund) befindet, welche mittels des Spiegels S' beleuchtet wird. Wünscht man sie nicht zu sehen, dann wird das um c drehbare Deckelchen d' vor die Oeffnung von C geschoben. Mittels der Linsen l'' und l''' werden die von sc ausgehenden Strahlen parallel auf die letzte brechende Fläche des Prismensystems P geworfen, von hier in der Richtung nach B reflectirt und durch Objectiv l' in der Ebene i zu einem reellen Bild vereinigt. Um der Scala stets den in Bezug auf das Spectrum richtigen Stand geben zu können, ist die Röhre C im Kästchen A' innerhalb gewisser Grenzen beweglich befestigt und zwar so, dass der Stand ihrer Axe in Bezug auf die letzte brechende Fläche von P und damit die Lage der Scala rücksichtlich des Spectrums geändert werden kann. Zu dem Ende ist C an dem metallenen Arm m' befestigt, der durch eine starke Feder v gegen die Schraube w angedrückt wird. Durch Drehen von w kann man dann leicht C den richtigen Stand geben. Man verwendet hierzu am besten die Natronlinie, sei es den dunkeln Streifen im Sonnenspectrum, sei es den hellen Streif einer Natronflamme. Ist sie mit der Wellenlänge 0.589 der Scala zur Deckung gebracht, dann müssen auch alle anderen Wellenlängen an der richtigen Stelle stehen, was mittels der FRAUNHOFER'schen Linien zu prüfen ist. Bei meinem Exemplar wird, nach einer anfänglichen sehr unbedeutenden Correction des Standes von P , dieser Forderung sehr vollkommen genügt. Von Zeit zu Zeit ist Nachprüfung nöthig. Mit Rücksicht auf etwaige kleine Verschiebungen von P innerhalb A' ist es vielleicht rathsam, in Zukunft einen besonderen Mechanismus zur Adjustirung von P anzubringen. Bei der jetzigen Fixirung von P in A' ist eine Correction ziemlich lästig und zeitraubend.

Im Röhrechen B sind schliesslich noch zwei in der Ebene i senkrecht zu einander bewegliche Schieberpaare angebracht. Der eine dient, nach VIERORDT'schem Muster, zum Ablenden der Spectra bis auf die beschränkte Gruppe von Wellenlängen, deren relative Helligkeit man

zu messen wünscht. Seine Schneiden werden durch die Schrauben t und t' verstellt. Ihre Ränder laufen nicht grade, sondern, den FRAUNHOFER'schen Linien parallel, schwach gebogen, damit der aus dem Spectrum ausgeschnittene Lichtstreif in seiner ganzen seitlichen Ausdehnung gleiche Farbe habe. Das andere Schieberpaar, durch die Schrauben u und u' (s. den Holzschnitt) beweglich, dient zur Ablendung der Spectra von der Seite her, speciell zum Gleichmachen der Breite von Object- und Vergleichsspectrum. Die farbigen mikroskopischen Objecte sind oft so klein, dass ihr Spectrum auch bei der stärksten zulässigen Vergrößerung nur einen schmalen Streifen im Gesichtsfeld liefert. Das seitlich vom Object vorbeigehende Licht würde dann durch Contrast sehr stören, muss also abgeblendet werden. Ausserdem lehrt die Erfahrung, dass es für die Schärfe der Messungen wesentlich ist, dass die beiden auf ihre Helligkeit zu vergleichenden Lichtfelder genau gleiche Form und Grösse besitzen, überhaupt in jeder Beziehung völlig gleich gemacht werden können. Hierauf ist auch bei der Wahl der Objecte sehr zu achten. Besonders muss man dafür sorgen, dass der Theil des Objectbilds, welcher in den Spalt fällt, optisch so homogen wie möglich sei, eine Bedingung, der bei farbigen Flüssigkeiten, Krystallen oder mit Farbstoff imbibirten homogenen Plättchen (von Gelatine z. B.) in der Regel leichter zu genügen ist, als bei organisirten farbigen Objecten.

In Bezug auf die specielle Ausführung und weitere Einrichtung der Versuche sei auf meine früheren Mittheilungen¹ und auf die Winke und Vorschriften verwiesen, welche in den bekannten Abhandlungen von VIERORDT und dessen Nachfolgern gegeben sind.

Utrecht, Mai 1888.

¹) Onderzoekingen etc. (3) IX, 1884, p. 1—9; X, 1887, p. 153—161; Botan. Zeitg. 1884, No. 6, 1887, No. 28.

[Eingegangen am 4. Juni 1888.]