

Neuere Ergebnisse der Fluoreszenzanalyse auf dem Gebiete der Chemie und verwandter Wissenschaften*)

Von MAX HAITINGER, Physikalisches Institut der Universität Wien

In letzter Zeit hat die Fluoreszenzanalyse als Hilfsmittel der Mikrochemie immer mehr Interesse und auch Anwendung gefunden. Dies erscheint durch die große Empfindlichkeit der neuen Methode gerechtfertigt, die jener der Spektralanalyse sehr nahe, manchmal sogar gleichkommt. Einzelne Stoffe gelingt es noch bei Verdünnungen von 10^{-10} bis 10^{-11} auf diesem Wege nachzuweisen, was bei den geringen Mengen, welche dazu notwendig sind, einer Erfassungsgrenze von 10^{-7} bis 10^{-8} entspricht. Allerdings sind dazu bestimmte Versuchsbedingungen erforderlich, und es genügt die rein visuelle Beobachtung für die Erfassung so geringer Grenzwerte und die Agnoszierung einzelner Stoffe durch die Fluoreszenz nicht. Dieser Weg führt überhaupt zu vielen Irrtümern und kann daher für mikroanalytische Untersuchungen nicht beschritten werden. Man kann wohl einzelne Stoffe durch die ihnen eigentümliche, die sog. Eigenfluoreszenz, agnoszieren, solange man sich nur mit einem eng begrenzten Gebiet von Stoffen beschäftigt; es gelingt dies aber nicht, wenn die Zahl der zu untersuchenden Proben größer wird, schon deshalb nicht, weil viele Stoffe ähnliche Fluoreszenzfarben zeigen. Es ist natürlich auch nicht möglich, die Farbe durch Hinweis auf bekannte Stoffe, wie etwa Smaragdgrün oder Vergilbmeinnichtblau usw., zu definieren, weil wir für die vielen Farbennuancen, die es gibt, zu wenig Bezeichnungen haben. Auch gelingt es nicht, eine Farbe durch Vergleich mit anderen Farben, wie sie sich etwa in den bekannten Farbtafeln darbieten, einwandfrei zu charakterisieren. Eine wirklich genaue Farbermittlung ist nur durch spektralanalytische Untersuchungen durchführbar oder aber dadurch, daß man die drei Bestimmungsstücke, Farbton, Sättigung und Helligkeit, zahlenmäßig durch photometrische Untersuchungen angibt. Dies gelingt durch eine auf der Young-Helmholtzschen Theorie aufgebaute Methode, welche es ermöglicht, den Farbton durch die Wellenlänge in $m\mu$, die Sättigung in Bruchteilen der maximalen Sättigung und die Helligkeit im Verhältnis zur Helligkeit eines passend gewählten Standards anzugeben. Die Durchführung solcher Messungen geht auf photometrische Bestimmungen zurück, die jeweils unter Anwendung roten, grünen und blauen Lichtes durchgeführt werden. Man benötigt hierzu ein Pulfrich-Photometer oder ein Photometerokular, das an Stelle des Okulars auf jedes Mikroskop aufgesetzt werden kann und die Farbbestimmung am mikroskopischen Bild bei jeder Vergrößerung gestattet, wodurch das Arbeiten mit sehr kleinen Substanzmengen möglich wird. Derartige Farbbestimmungen sind sehr einfach und in kurzer Zeit durchführbar. Die erreichbare Genauigkeit ist für den Farbton $0,5 m\mu$, für die Sättigung $0,5\%$. Über Einzelheiten dieser Methode sei auf die Monographie von E. Haschek u. M. Haitinger verwiesen (5).

Nachdem die Farbe fluoreszierender Stoffe das wesentliche Kriterium für ihre Erkennung ist, läßt sich die Methode der genauen Farbbestimmung dazu verwenden, einzelne Stoffe an ihrer Fluoreszenzfarbe zu agnoszieren und reproduzierbare Werte zu ermitteln, die für diese Stoffe charakteristisch sind. Sie ist also für die qualitative Fluoreszenzanalyse ein wertvolles Hilfsmittel, darüber hinaus gestattet sie auch quantitative Untersuchungen durchzuführen.

Beim Übergang von starken zu schwachen Konzentrationen bleibt nämlich der Farbton, wie man leicht vermuten könnte, bei allen Farben mit Ausnahme der rein blauen und rein gelben nicht der gleiche, sondern er verändert sich, u. zw. mit abnehmender Konzentration nach kürzeren Wellenlängen hin. Dabei gehört zu jeder Konzentration ein eindeutig bestimmter Farbton. Deshalb läßt sich die Methode auch für die Konzentrationsbestimmung und für die mengenmäßige Erfassung der gelösten Substanz heranziehen. Man braucht dazu nur sehr geringe Substanzmengen, einige nm^3 genügen. Da sich die Faränderung durchschnittlich bis zu einer Verdünnung von 10^{-7} verfolgen läßt, können in der Lösung noch Bruchteile

*) Dieser Bericht bezieht sich auf jene Arbeiten, welche nach dem Erscheinen meiner beiden Monographien in den Jahren 1937 und 1938 bekannt wurden (1, 2). Dabei wird es manchmal notwendig werden, auf bereits Bekanntes zurückzukommen, um das Neue verständlich zu machen. Dies soll jedoch in aller Kürze geschehen, ohne daß auf die bezügliche Literatur näher verwiesen werden soll.

von γ pro cm^3 nachgewiesen werden. Wir haben in der letzten Zeit Versuche gemacht, bei einigen Stoffen, z. B. den 1,2-Dicarbonsäuren, die kleinsten Mengen zu ermitteln, welche noch quantitativ nachweisbar sind; diese ergeben nämlich durch Schmelzen mit Resorcin grünfluoreszierende Reaktionsprodukte (3). Da diese für die verschiedenen Säuren auch verschiedene Farbtöne und Sättigungsgrade zeigen, kann diese Methode auch zur qualitativen Bestimmung dieser Säuren verwendet werden; darüber hinaus können aber auch bis zu gewissen Grenzen die einzelnen Ausgangsprodukte quantitativ erfaßt werden. Dies gelingt z. B. für die Phthalsäure bis zu $0,18 \gamma$, für die Bernsteinsäure bis zu 3γ usw.

Es steht uns also für die Fluoreszenzanalyse neben der Beobachtung der Eigenfluoreszenz eines Stoffes noch die Überführung nicht fluoreszierender Verbindungen in fluoreszierende für analytische Untersuchungen zur Verfügung. Dieser Weg wurde auch bei verschiedenen anderen organischen Stoffen, in neuerer Zeit bei der Milchsäure mit o-Oxy-diphenyl, bei Oxyaldehyden und Ketonen mit Naphthoresorcin, bei Orcin mit 2,4-Dioxy-benzaldehyd²⁾ und vielen anderen Verbindungen beschritten. Manchmal genügt es, die zu untersuchende Probe mit Säuren oder Alkalien zu versetzen, um an der entstehenden Fluoreszenz die Substanz zu erkennen. So fluoresciert Follikulin³⁾ durch Zugabe von Schwefelsäure intensiv gelb, andererseits gibt Aminoterephthalsäure nach Zusatz von Alkalien blaue Fluoreszenz. Ähnlich verhalten sich noch viele andere Stoffe, die als fluoreszierende Indikatoren verwendet werden können. Ihre Zahl wurde in letzter Zeit durch die Untersuchungen verschiedener Autoren wesentlich vermehrt⁴⁾.

Von sonstigen neu vorgeschlagenen Reaktionen sei zunächst der Nachweis von Aluminium mit „Pontachrom blue Black R“, das ist ein Zinksalz des 4-Sulfo-2,3-dihydroxyazonaphthalins, erwähnt, das die Aluminiumsalze an der auftretenden orangefarbenen Fluoreszenz erkennen läßt⁵⁾. Borssäure gibt mit Alizarin S rosenrote Fluoreszenz⁶⁾, Molybdänäure mit Cochenilletinktur bei $pH=5,7$ feuerrote Fluoreszenz⁷⁾.

Wir können die Fluorescenzerscheinungen sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch beobachten. Im ersten Falle genügen die von verschiedenen Firmen in den Handel gebrachten Analysenlampen, welche in den meisten Fällen eine Quecksilber-Niederdruckdampflampe als Lichtquelle besitzen. Für die mikroskopische Beobachtung werden aber Lampen großer Flächenhelligkeit notwendig, um das mikroskopische Präparat mit ultraviolettem Licht intensiv zu beleuchten. Denn zum Unterschied von der Tageslichtmikroskopie beobachtet man bei der Fluoreszenzmikroskopie Selbstleuchter, die im Präparat selbst liegen, also Lichtquellen von sehr geringer Größe und daher auch geringer Helligkeit. In dieser Beziehung ist wohl die Eisenbogenlampe allen anderen Lichtquellen überlegen; sie versagt aber bei Wechselstrom. Diesem Übelstande konnte in jüngster Zeit durch die Einführung der Quecksilber-Hochdrucklampen als Lichtquellen für das Fluoreszenzmikroskop abgeholfen werden. Sie besitzen in dem für die Beobachtung in Frage kommenden Wellenlängengebiet stark verbreiterte Banden, so daß sich ein beinahe kontinuierliches Spektrum ergibt. Sie sind einfach zu bedienen, stehen an Ultraviolettreichtum der Eisenbogenlampe ziemlich nahe und brennen außerordentlich ruhig⁸⁾.

Die mikroskopische Beobachtung ist der makroskopischen weit überlegen. Dies gilt namentlich für Stoffgemische, wie sie viele technische Produkte und Nahrungsmittel darstellen. Wenn z. B. in einem Präparat blau, rot und grün fluoreszierende

*) Bisher nicht veröffentlicht.

**) E. Egriev, Mikrochemie 23, 123 [1937].

*) F. A. Koëszi u. B. Brugyi, Mikrochim. Acta 2, 291 [1937].
**) F. A. Koëszi u. Z. von Sz. Nagy, Z. anal. Chem. 108, 217; L. Szabellédy u. K. Sik, Ber. ungar. pharmaz. Ges. 14, 333, 387, 391, 394, 397, 401, 405, 409, 413, 418 [1938]; J. Jonas u. L. Szabellédy, Z. anal. Chem. 113, 422 [1938].

*) C. E. White u. C. S. Love, Ind. Engng. Chem., Anal. Ed. 9, 430 [1937].

**) L. Szabellédy u. S. Tanay, Z. anal. Chem. 107, 26 [1936].

**) L. Szabellédy u. J. Jonas, Mikrochim. Acta 1, 46 [1937].

*) Wir benützen die von der Firma Reichert, Wien, in den Handel gebrachte Lux U.-W.-Lampe, welche sowohl für mikroskopische als auch für makroskopische Beobachtungen geeignet ist.

Teilchen enthalten sind, so sehen wir bei der makroskopischen Beobachtung eine Mischfarbe, welche je nach dem Überwiegen der einen oder der anderen Komponente mehr ins Blau, Rot oder Grün schlägt. Unter dem Mikroskop aber sehen wir die einzelnen Teilchen diskret in den ihnen zukommenden Fluoreszenzfarben aufleuchten und können oft schon durch bloße visuelle Beobachtung im mikroskopischen Bild auf die Mengenverteilung der einzelnen Stoffe schließen. So kann man z. B., wie schon bekannt, an einem Kautschukstückchen Cadmiumsulfat, Aldol und Zinkoxyd an ihrer orangeroten, blauen und gelbgrünen Fluoreszenz erkennen. Ebenso gewinnt man etwa bei der Beurteilung von Mineralfarben erst durch die mikroskopische Beobachtung einen sicheren Anhaltspunkt, ob Mischungen oder Verfälschungen vorliegen. So zeigt eine Mischung von Bleiweiß und Zinkweiß, wenn nur 10% des letzteren vorhanden sind, makroskopisch die Fluoreszenz des Zinkweiß, weil sie jene des Bleiweiß vollkommen überträgt. Andererseits tritt bei Titanweiß erst bei einem Zusatz von 25% Zinkoxyd eine mattgelbe Fluoreszenz auf, die vielleicht auf das Vorhandensein des letzteren schließen läßt. Im Mikroskop sieht man aber das gelbgrün fluoreszierende Zinkoxyd neben dem beigeartig leuchtenden Bleiweiß oder dunkelvioletten Titanweiß deutlich differenziert. An organischen Farbstoffen kann man leicht unterscheiden, ob sie einheitlicher Natur oder Gemische verschiedener Stoffe sind. Diese wenigen Beispiele zeigen, daß gerade auf dem Gebiete der angewandten Chemie die makroskopische Beobachtung in der Regel nur zu höchst unsicheren Ergebnissen führt, durch die Fluoreszenzmikroskopie dagegen oft schon durch die reine Beobachtung der Eigenfluoreszenz sichere und eindeutige Angaben gewonnen werden können (6).

Wir besitzen aber außer der Beobachtung der Eigenfluoreszenz und der Beobachtung von Fluorescenzerscheinungen als Folge chemischer Reaktionen noch ein drittes Hilfsmittel für den Nachweis einzelner Stoffe: Es ist dies das **Fluorochromierungsverfahren**. Dieses zunächst für die Darstellung bestimmter Gewebs- und Zellelemente in histologischen Präparaten ausgebildete Verfahren hat in letzter Zeit auch bei der Untersuchung technischer Produkte zu Erfolgen geführt. Es besteht darin, daß man das zu prüfende Material mit fluoreszierenden Substanzen, den sog. Fluorochromen behandelt, welche dann von einzelnen Teilchen adsorbiert werden, von anderen nicht. Die auf diese Weise hervorgerufene Fluoreszenz wurde als sekundäre oder induzierte Fluoreszenz bezeichnet. Bei Stoffgemischen kommt es nicht selten vor, daß dann auch verschiedene Komponenten in verschiedenen Farben leuchten. Man bekommt also mit einem Fluorochrom oft polychrome Bilder, was besonders bei histologischen Präparaten wertvoll ist. Als Fluorochrome dienen fluoreszierende Farbstoffe (Acridin-, Xanthen-, Chinonimid-Farbstoffe), aber auch andere fluoreszierende Substanzen, wie etwa Chinin, Aesculin, Chrysarobin usw. Mit diesem Verfahren konnten wir die verschiedenen Arten von Kunstseide, die sich an ihrer Eigenfluoreszenz nicht erkennen lassen, unterscheiden. Hierzu eignen sich Flavophosphin GGO, Auramin, Rhodamin G extra, Brillantdianilgrün usw., ganz besonders aber das Thiazinrot R. Mit einer Lösung dieses Farbstoffes von der Konzentration 1:1000 durch 1 bis 2 min behandelt, fluoresciert Viscoseseide stark blauviolett, Kunstseide aus Acetylcellulose rein blau, Chardonneseide fleischfarben und Kupferseide rot. Bei Einhaltung gleicher Einwirkungszeiten lassen sich Messungen nach dem Verfahren der genauen Farbbestimmung durchführen und die einzelnen Produkte sowohl nach Farbtön als auch nach Sättigung und Helligkeit scharf auseinanderhalten^{9).}

In der Gerberei wird die Fluoreszenzmikroskopie dazu benutzt, nach vorhergegangener Fluorochromierung von Dünnschnitten mit Phosphin, Geranin oder Thioflavin S die Veränderungen, welche die tierische Haut durch das Einweichen, Äschen und Beizen erleidet, zu verfolgen, was zu viel schöneren Ergebnissen führt und in viel kürzerer Zeit ausführbar ist als mit den üblichen Methoden der Tageslichtmikroskopie^{10).}

Bei der Untersuchung histologischer Präparate tierischer und pflanzlicher Objekte hat sich die Fluoreszenzmikroskopie ganz besonders bewährt (4). Bei derartigen

Präparaten genügt die Beobachtung der Eigenfluoreszenz nicht. Der Histologe will bestimmte Gewebs- oder Zellelemente sehen. Diese müssen im mikroskopischen Bild besonders hervorgehoben sein; deshalb werden in der Tageslichtmikroskopie die Färbemethoden verwendet. Aus demselben Grunde muß man bei der Fluoreszenzmikroskopie zur Fluorochromierung greifen. Diese liefert, wie schon gesagt, in den meisten Fällen mehrfarbige Bilder und hat außerdem den Vorteil, daß sie in sehr kurzer Zeit durchführbar ist. So besitzen wir im Coriphosphin O ein Mittel, das beispielsweise in einem Schnitt durch die menschliche Lunge bei Beleuchtung mit ultraviolettem Licht die Knorpel rot, das Bindegewebe grün, das Epithel orange und das Parenchym gelb aufleuchten läßt. Auf diesem Gebiet konnten wir in letzter Zeit eine Anzahl neuer Fluorochrome finden, so z. B. das Coriphosphin HK, Acridingelb extra, Acridinorange NO, Naphthalinrot usw., die sich sowohl in der pflanzlichen als auch in der tierischen Histologie sehr gut bewährt haben^{11).}

Im Rhodamin B und 6G wurden Fluorochrome gefunden, die sich vorzüglich zur Vitalfärbung des Protoplasmas eignen. Die Färbung ist vollkommen reversibel und inturbant^{12).} Für die Darstellung der Großhirnrinde, die, wie schon die Färbeversuche im sichtbaren Licht zeigten, viel schwieriger gelingt, als jene des Hirnstamms oder gar des Rückenmarks, hat sich die Behandlung mit Aluminiumsulfat nach vorangegangener Beize mit Ammoniak und darauf folgender Fluorochromierung mit Morin oder Brillantdianilgrün G oder Brillantdianilblau 6G, durch die die Glia zur helleuchtenden Fluoreszenz angeregt wird, besonders bewährt^{13).} Auch Liquorkristalle konnten mit verschiedenen Fluorochromen wie Fluorescein oder Coriphosphin O und Thioflavin S zur Darstellung gebracht werden^{14).}

In jüngster Zeit gelang es auch im Zellkern, Caryotin, Caryotinlymph und die Kernkörperchen zu differenzieren und an Kernteilungsstadien die Chromosomen darzustellen. Hierzu eignen sich neben den bereits bekannten Coriphosphin-Fuchsinfarbenen noch Sanguinarin und Acridinorange NO bei einer Einwirkungszeit von wenigen Minuten. Mit letzterem Farbstoff konnten auch die „Knöllchenbakterien“ an Leguminosenwurzeln sichtbar gemacht werden^{15).}

Zum Nachweis von Fischfleisch in Wurstwaren werden entsprechend vorbereitete Schnitte mit einem Gemisch von Diaminbraun und Diaminschwarz fluorochromiert; dieses regt die Muskel der Kaltblüter zur braunen, die der Warmblüter zur grünen Fluoreszenz an, so daß derartige Verfälschungen unter dem Mikroskop leicht erkannt werden können^{16).}

Für die Untersuchung des Schmutzes auf der Haut und den Erfolg des Waschens für gewerbehygienische Zwecke hat die Fluorochromierung mit Primulin bei Auflichtbeobachtung zu neuen Erkenntnissen über die Speicherung und die Eindringungstiefe des Schmutzes in die Haut und die Wirkung des Waschens geführt^{17).}

Auch in der Bakteriologie wurden zur Darstellung von Tuberkelbazillen neue Wege beschritten. So hat sich hierfür eine Fluorochromierung mit Auramin besonders bewährt^{18).} Noch schönere Bilder erhält man, wenn man bei der Fluorochromierung den nichtspezifischen Untergrund durch Behandlung mit Kaliumpermanganat und Löfflers Methylenblau entfärbt^{19).} In viel kürzerer Zeit können Tuberkelbazillen mit Acridingelb extra²⁰⁾, das auch für die Darstellung von Gonokokken sehr gut geeignet ist, fluorochromiert werden.

In der Mineralogie wurde makroskopisch festgestellt, daß einzelne Kalifeldspate, Kalknatronfeldspate und Datolith eine ähnlich blaue Fluoreszenz zeigen wie jene Fluorite, bei denen dieses Leuchten auf das Vorhandensein von zweiwertigem Europium zurückzuführen ist. Tatsächlich konnte durch Einbau von Europium in Schmelzprodukte ähnlicher Zusammensetzung wie die oben genannten Silicate eine solche Fluoreszenz hervorgerufen werden, eine Beobachtung, die

¹¹⁾ Bisher nicht veröffentlicht.

¹²⁾ R. Exner, Psych. neurol. Wschr. **41**, 255 [1939].

¹³⁾ Bisher noch nicht veröffentlicht.

¹⁴⁾ F. Bokatsch u. M. Haitinger, Protoplasma [im Druck].

¹⁵⁾ R. Hintersatz, Z. Infekt.-Krankh., parasitäre Krankh. u. Hygiene der Haustiere, **54**, 87 [1938].

¹⁶⁾ R. u. F. Jiger, Arch. Gewerbeopathologie u. Gewerbehigiene **9**, 276 [1938]; Z. wiss. Mikroskopie **56**, 237 [1938].

¹⁷⁾ P. H. K. Hagemann, Münch. med. Wschr. **1838**, 1066.

¹⁸⁾ W. Herrmann, Dtsch. med. Wschr. **1838**, 1864.

¹⁹⁾ M. Haitinger u. R. Schwerter, Zhl. Bakteriol., Parasitenkunde Infektionskrankh. Abt. I, **145**, 141 [1939].

⁹⁾ M. Haitinger (6).

¹⁰⁾ E. R. Theis u. E. J. Serfas, J. Amer. Leather Chemists Ass. **33**, 37 [1938].

zur Klärung biochemischer und petrogenetischer Probleme von großer Bedeutung sein dürfte²¹⁾). Neben den Kalkspaten, welche ihre Rotfluoreszenz dem Mangan verdanken, konnten in letzter Zeit auch Calcite gefunden werden, welche gleichfalls rot fluorescieren, jedoch einen ganz anderen Farbton zeigen als die manganhaltigen. Ihre Fluoreszenz ist auf einen Gehalt an Porphyrin zurückzuführen, das durch die Tätigkeit von Purpurschwefelbakterien, wie sie in H₂S-haltigen Thermalwässern vorkommen, entstanden sein dürfte²²⁾.

In diesen Bericht ist natürlich nicht alles aufgenommen, was in dem Gebiet der Fluoreszenzanalyse an neueren Arbeiten erschienen ist. So wurde grundsätzlich vermieden, Arbeiten auf dem Gebiet der Intravitalmikroskopie aufzunehmen, die namentlich von A. Hirt in hervorragender Weise ausgebildet

²¹⁾ H. Haberland u. A. Köhler, Naturwiss. 27, 275 [1939].

²²⁾ H. Haberland, ebenda 27, 613 [1939].

und zu glänzenden Erfolgen geführt wurde, weil auf diesem Gebiete keine persönlichen Erfahrungen vorliegen. Dieser kurze Bericht dürfte aber gezeigt haben, wie vielseitig die Anwendungsmöglichkeiten der Fluoreszenzanalyse und namentlich Fluoreszenzmikroskopie sind und wieviel Arbeit noch auf jedem der Einzelgebiete zu leisten ist.

Schrifttum.

Sammelwerke mit Literaturangaben.

- (1) P. W. Danckwirt: Die Fluoreszenzanalyse im filtrierten ultravioletten Licht, 3. Aufl., Leipzig: Akadem. Verlagsges. m. b. H., 1934. — (2) Ch. Dhéré: Die Fluoreszenz in der Biologie, Monographie biolog. Probleme; Paris, Les Presses Univ. d. France 1937. — (3) M. Haizinger: Die Fluoreszenzanalyse in der Mikrochemie, Wien, Julius Springer, 1937. — (4) M. Haizinger: Fluoreszenzmikroskopie, ihre Anwendung in der Histologie und Chemie, Leipzig: Akadem. Verlagsges. m. b. H., 1938. — (5) E. Haschek u. M. Haizinger: Farbmessungen, Theoretische Grundlagen und Anwendungen, Wien, Julius Springer, 1935. — (6) M. Haizinger: Fluoreszenzanalyse im Ergänzungsband der Chem.-techn. Untersuchungsmethoden, herausg. von J. D'Ans, Berlin, Julius Springer, 1939. — (7) M. Haizinger, Fluoreszenzmikroskopie im Handbuch der Virusforschung von R. Doerr u. C. Hallauer, Wien, Julius Springer, 1938.

Einjeg. 15. Januar 1940. [A. 20.]

Colorimetrie und Spektralphotometrie als analytische Methoden

Von Doz. Dr. G. KORTÜM und Dipl.-Chem. J. GRAMBOW

Phys.-chem. Abteilung des Chemischen Instituts der Universität Tübingen

Grundsätzliches zur Unterscheidung der Meßverfahren.

Die Anwendung optischer Methoden in der modernen analytischen Chemie erfreut sich stetig steigender Beliebtheit, besonders seit man Apparate entwickelt hat, die bei relativ leichter Handhabung schnelle und sichere Konzentrationsbestimmungen ermöglichen. Man unterscheidet zwei grundlegend verschiedene Verfahren:

1. Colorimeter können unter Verwendung von Testlösungen ausschließlich zu Konzentrationsbestimmungen benutzt werden.
2. Spektralphotometer, bei denen an Stelle der „Vergleichslösung“ eine meßbar veränderliche Lichtschwächungseinrichtung verwendet wird, können deshalb auch zur Extinktionsmessung dienen.

Der Vorteil spektralphotometrischer Methoden besteht darin, daß nach einmaliger Aufstellung einer „Eichkurve“ die Herstellung von „Vergleichslösungen“ bekannter Konzentration unnötig ist, was eine erhebliche Ersparnis an Zeit und Mühe bedeutet. Außerdem läßt sich bei der spektralphotometrischen Messung der störende Einfluß einer u. U. vorhandenen und von Fall zu Fall wechselnden Eigenfärbung der Lösung (z. B. Harmessungen) leicht ausschalten, was bei colorimetrischen Methoden nicht möglich ist. Diese Vorteile sind unbedingt anzuerkennen.

Dagegen wurde in einem kürzlich erschienenen Bericht¹⁾ darauf hingewiesen, daß die weitverbreitete Ansicht, spektralphotometrische Verfahren ermöglichen auch eine wesentlich größere Genauigkeit der Konzentrationsbestimmung, keineswegs zutrifft. Spektralphotometrische Verfahren besitzen vielmehr gegenüber den colorimetrischen den grundsätzlichen Nachteil, daß das Ergebnis der Messung von der Monochromasie des verwendeten Lichtes abhängt, während colorimetrische Verfahren von der Spektralreinheit des Lichtes völlig unabhängig sind. Dieser Unterschied der beiden Methoden ist auch allein für ihre Unterscheidung und für die Beurteilung der mit ihnen erreichbaren Ergebnisse maßgebend.

Für die Praxis bedeutet dies, daß die mit dem Spektralphotometer aufgestellte „Eichkurve“, die die Grundlage der Konzentrationsbestimmungen bildet, nur dann für richtige Messungen Gewähr bietet, wenn sich die Zusammensetzung des Lichtes inzwischen nicht geändert hat. Daß diese Bedingung nicht nur für lichtelektrische Präzisionsmessungen eine Rolle spielt²⁾, sondern auch für die üblichen spektralphotometrischen Bestimmungen der analytischen Praxis, soll an Hand einiger Beispiele gezeigt werden:

Es wurden Messungen mit folgenden Apparaten ausgeführt:

1. mit einem zweistufigen Eintauchcolorimeter³⁾,
2. mit dem Stufenphotometer von Zeiss, und

3. mit dem lichtelektrischen „Colorimeter“ von Dr. B. Lange, das nach der oben gegebenen Definition eigentlich ebenfalls ein Spektralphotometer darstellt.

Dabei wurde zur Prüfung des Einflusses wechselnder Zusammensetzung des Lichtes auf die Eichkurven die Spannung an der Lichtquelle variiert, u. zw. wurde jede untersuchte Lösung bei drei verschiedenen Lampenspannungen gemessen, wie sie auch im praktischen Betrieb vorkommen können. Die einzelnen Spannungsstufen wurden unter steter Kontrolle mit einem empfindlichen Voltmeter während der Messungen in engen Grenzen konstant gehalten. Die zu untersuchenden Lösungen wählten wir so aus, daß jeweils in einem Fall Absorptionsmaximum und Filterschwerpunkt annähernd zusammenfielen, während im andern Fall der Filterschwerpunkt auf den ansteigenden Ast der Absorptionsbande der Substanz fiel. Auf diese Weise erhält man Meßergebnisse unter optimalen und unter weniger günstigen Bedingungen, was beides für die Praxis wichtig ist.

Sämtliche Einzelmessungen wurden mehrmals wiederholt und aus den Ablesungen das Mittel genommen. Der mittlere Einstellfehler betrug zwischen 0,5 und 5,0 % der Extinktion, je nach dem verwendeten Apparat und Filter. Die Temperatur der Lösungen wurde auf $\pm 1^\circ$ konstant gehalten. Als Beispiel sei eine Beobachtungsreihe aus Messungen mit dem Stufenphotometer angegeben für Benzopurpurin in der Konzentration von $c = 1,95 \cdot 10^{-5}$ Mol/l bei einer Lampenspannung von 7 V und mit Filter S 50.

Tabelle 1.

Ablesung an der Trommel	Extinktion E	Abweichung vom Mittel $\Delta E \cdot 10^3$	Fehler in % der mittl. Extinktion ΔE
20,8	0,682	-6	-0,9
20,3	0,693	+5	+0,7
20,8	0,682	-6	-0,9
21,0	0,678	-10	-1,4
20,2	0,695	+7	+1,0
20,6	0,686	-2	-0,3
20,2	0,695	+7	+1,0
20,9	0,680	-8	-1,2
20,1	0,697	+9	+1,3
20,5	0,688	± 0	± 0
Mittel: 20,54	0,688		
			Die mittleren Abweichungen der Einzelmessungen von der mittleren Extinktion absolut und in % der Extinktion ergeben sich aus der Formel für den mittleren Fehler der Einzelmessung.
			$m. F. d. E = \sqrt{\frac{\Delta^2}{n-1}}$
			$\pm 0,007$ $\pm 1,0$

In der Benzopurpurinkurve ist an entsprechender Stelle das Mittel aus dem hier angeführten mittleren Extinktionswert und demjenigen aufgetragen, der sich aus einer zweiten Meßreihe nach Vertauschen der Untersuchungscuvetten ergibt.

Messungen mit dem Stufenphotometer von Zeiss.

Abb. 1 zeigt die Eichkurven für Kaliumchromatlösungen in $n/1000$ NaOH⁴⁾ im Konzentrationsbereich von 0,4 bis $4,4 \cdot 10^{-3}$ Mol/l, u. zw. für die drei Spannungen an der Niedervoltlampe: 8,5 V, 7,0 V und 5,5 V. Die Schichtdicke betrug 1 cm, das verwendete Filter war S 43. Der Filterschwerpunkt liegt auf dem ansteigenden Ast der Absorptionsbande, die ihr Maximum bei etwa

¹⁾ Zur Vermeidung der Entstehung von Bichromat.

²⁾ G. Kortüm u. M. Seiler, diese Ztschr. 52, 687 [1930].
³⁾ Vgl. G. Kortüm u. H. v. Halban, Z. physik. Chem. Abt. A 170, 212 [1934].
⁴⁾ Das Instrument wurde uns in entgegenkommender Weise von der Firma Leitz, Wetzlar, zur Verfügung gestellt, wofür wir auch an dieser Stelle unseren verbindlichsten Dank aussprechen möchten.