

Mit Tetranitro-methan erhält man folgende Färbungen: (A) in Methylalkohol: hellgelb, in Äther: rotorange, (B) in Methylalkohol: gelbgrün, in Äther: gelb. Beide Verbindungen geben in festem Zustand, direkt mit Tetranitro-methan ohne Lösungsmittel versetzt, rotorange Färbung. Beim Verdünnen mit einigen Tropfen Methylalkohol oder Äther bleibt (A) rotorange, während (B) hell gelbgrün wird. Dies Verhalten spricht dafür, daß (A) stärker ungesättigt ist als (B). Ein analoges Verhalten wie (B) zeigt 1-Phenyl-3,4-dimethyl-4-benzyl-pyrazolon.

327. Hans Kautsky: Energie-Umwandlung an Grenzflächen, VII. Mitteil.: H. Kautsky, H. de Bruijn, R. Neuwirth und W. Baumeister: Photo-sensibilisierte Oxydation als Wirkung eines aktiven, metastabilen Zustandes des Sauerstoff-Moleküls.

[Aus d. Chem. Institut d. Universität Heidelberg.]

(Eingegangen am 25. September 1933.)

Wir bringen in diesem Bericht den experimentellen Nachweis eines metastabilen, aktiven Zustandes des Sauerstoff-Moleküls, der bei der Einwirkung von Sauerstoff auf angeregte Moleküle fluoreszierender Stoffe entsteht. Eine kurze vorläufige Mitteilung über diesen Gegenstand wurde von Kautsky und de Bruijn in den „Naturwissenschaften“¹⁾ veröffentlicht. Die Versuche wurden danach erneut, mit verbesserten Methoden und mit einer eingehenderen Prüfung möglicher Einwände von Hrn. Neuwirth, anfänglich zum Teil gemeinsam mit Hrn. Dr. Baumeister, durchgeführt.

Sehr lange schon, bevor wir die aktive metastabile Form des Sauerstoffs nachgewiesen hatten, waren ihre stark oxydierenden Wirkungen als „Photo-dynamische Wirkung fluoreszierender Farbstoffe“²⁾ bekannt. Wir halten es für angebracht, diese noch vielfach gebrauchte Bezeichnung abzuändern in „Photo-sensibilisierte Oxydation“. Damit ist wohl deutlicher ausgedrückt, worum es sich handelt: oxydierbare Stoffe (Acceptoren), im lebenden Organismus oder im Reagensglas, welche im Dunkeln wie im Licht durch den Luft-Sauerstoff nicht oder nur kaum verändert werden, nehmen, in Gegenwart fluoreszierender Stoffe (Sensibilatoren) belichtet, molekularen Sauerstoff auf.

Durch Anwendung sehr vereinfachter, sauberer Versuchs-Bedingungen war es möglich, festzustellen, daß der primäre Grundvorgang bei der photo-sensibilisierten Oxydation in einer Wechselwirkung zwischen angeregten fluoreszierenden Molekülen und Sauerstoff besteht³⁾. Diese Wechselwirkung findet ihren unmittelbar sichtbaren Ausdruck in der mehr oder minder starken Auslöschung der Fluoreszenz in verschiedenen fluoreszierenden Systemen bei Zugabe von Sauerstoff. Versuche, die in dieser Arbeit mitgeteilt werden, führen zu einem tieferen Verständnis der photo-sensibilisierten Oxydation: Sauerstoff-Moleküle entziehen dem belichteten, fluoreszierenden System Anregungs-Energie, wodurch sie ihrerseits in eine frei diffundierende, metastabile, aktive Form verwandelt werden, welcher eine sehr gesteigerte Oxydationsfähigkeit zukommt.

¹⁾ H. Kautsky u. H. de Bruijn, Naturwiss. **19**, 1043 [1931].

²⁾ Literatur-Übersicht bei H. Gaffron, B. **60**, 2229 [1927].

³⁾ H. Kautsky u. A. Hirsch, B. **64**, 2677 [1931].

Die Anlage unserer Versuche gründete sich auf die Vermutung, daß bei der Wechselwirkung zwischen angeregten Molekülen fluoreszierender Stoffe und Sauerstoff aktivierte Sauerstoff-Moleküle entstehen, die sich räumlich auszubreiten, also eine gewisse Strecke zu diffundieren vermögen, bevor sie wieder in normalen Sauerstoff unter Energie-Verlust rückverwandelt werden. Wir trennen deshalb räumlich die Moleküle des Sensibilisators von denen des Acceptors, d. h. wir legen eine geringe Entfernung zwischen den Ort, an dem der Sauerstoff aktiviert wird, und dem Ort, an dem der aktivierte Sauerstoff seine besonderen oxydierenden Wirkungen, die ihn vom normalen Sauerstoff unterscheiden, ausüben soll. Entsteht am Sensibilisator tatsächlich eine längerlebige, aktive Modifikation gasförmigen Sauerstoffs, so erwarten wir, daß trotz der räumlichen Trennung des Entstehungs-Ortes vom Wirkungs-Ort eine Oxydation des Acceptors zu beobachten sein wird. Eine lediglich an den Sensibilisierungs-Ort, also an das fluoreszierende Molekül, gebundene Oxydationswirkung, wie sie bisher angenommen wurde, wäre damit ausgeschlossen.

Sensibilisator wie Acceptor müssen, um wirksam zu sein, in molekularer Verteilung vorliegen. In molekularer Verteilung lassen sich die beiden aber nur dann voneinander räumlich trennen, wenn die Moleküle ihrer freien Beweglichkeit beraubt, also örtlich festgelegt sind. Diese örtliche Festlegung ist durch polare Adsorption der Moleküle an die ausgedehnten inneren Grenzflächen eines Gels zu erreichen⁴⁾. Wir stellen getrennt zweierlei Adsorbate her, eines den Sensibilisator, das andere den Acceptor enthaltend. Vermengen wir kleine Teilchen eines Sensibilisator-Adsorbates mit denen eines Acceptor-Adsorbates, so berühren sich zwar die verschiedenartigen Gelteilchen, aber die Moleküle des Sensibilisators können dabei nicht in Wechselwirkung mit denen des Acceptors treten, denn die adsorbierten Moleküle befinden sich praktisch in ihrer gesamten Menge gleichmäßig verteilt in fester Bindung im Innern der Gel-Stückchen. So sind sich die Sensibilisator- und die Acceptor-Moleküle nah und sind doch vollkommen voneinander getrennt.

Der eigentliche entscheidende Versuch zum Nachweis des diffundierenden, aktivierten Sauerstoffs besteht darin, daß man das innige Gemenge beider Sorten von Adsorbat-Körnchen in Gegenwart von Sauerstoff belichtet und feststellt, ob der Acceptor trotz vollkommener Trennung vom Sensibilisator oxydiert wird. Es ist zu erwarten, daß die Lebensdauer energie-reicher, metastabiler Sauerstoff-Moleküle von der Häufigkeit der Zusammenstöße mit anderen Molekülen abhängen wird. Die Oxydation des Acceptors im Licht muß demnach abhängig sein vom Sauerstoff-Druck und von der Entfernung des Acceptors vom Sensibilisator. Unter diesen Gesichtspunkten sind die Versuche angestellt worden.

Beschreibung der Versuche.

Im folgenden wird die Art und Anordnung der einzelnen stofflichen Bestandteile des Systems und der speziellen Versuchs-Bedingungen besprochen.

⁴⁾ H. Kautsky u. W. Baumeister, B. 64, 2446 [1931].

Herstellung und Verhalten der einzelnen Adsorbate.

Das Adsorbens: Als Adsorbens benützten wir ausschließlich Silica-Gel B Korngröße 1–3 mm von der „Agfa“*), das daselbst in großen Mengen sehr gleichmäßig und recht rein hergestellt wird. Das Gel ist evakuiert glasklar, und es ist weitporig, was für den notwendigen raschen Gas-Austausch von Vorteil ist. Es enthält geringe Mengen Fe(III)-Verbindungen, die bei der Adsorption des Acceptors auf diesen oxydierend wirken. Deshalb wurde das Gel besonders gereinigt: Eine größere Menge Gel wird so oft mit Schwefelsäure (1 Vol. H_2SO_4 : 1 Vol. H_2O) behandelt, bis eine Probe davon mit Diphenylamin-Schwefelsäure und auch mit Kalium-ferrocyanid keine noch so geringe Blaufärbung mehr gibt. Das dauert ungefähr 3 Wochen. Dann wird fortlaufend mit Wasser, dem etwas Ammoniak zugesetzt wurde, und schließlich mit reinem Wasser gewaschen, bis keine Spur Ammoniak mit Neßlers Reagens mehr nachzuweisen ist.

Das Sensibilisator-Adsorbat: Sensibilisator war der stark fluoreszierende Farbstoff Trypaflavin, der als basischer Farbstoff von Silica-Gel polar adsorbiert wird.

Trypaflavin-Standardlösung: 5 Millimol (1.2946 g reines Trypaflavin) in 1 l Wasser.

Bereitung des Adsorbats: 10 g gepulvertes Silica-Gel in eine Lösung, enthaltend 5 ccm Trypaflavin-Standardlösung in 95 ccm Wasser, eintragen, rühren, über Nacht stehen lassen, mit Wasser waschen und dann das Adsorbat im Trockenschrank bei etwa 50° vortrocknen. Zur Ausführung der Versuche in der Apparatur Fig. 2 müssen die Ad-

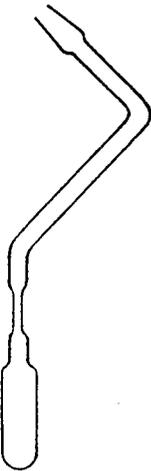


Fig. 1. Vorrichtung zum Abspumpen der Adsorbate.

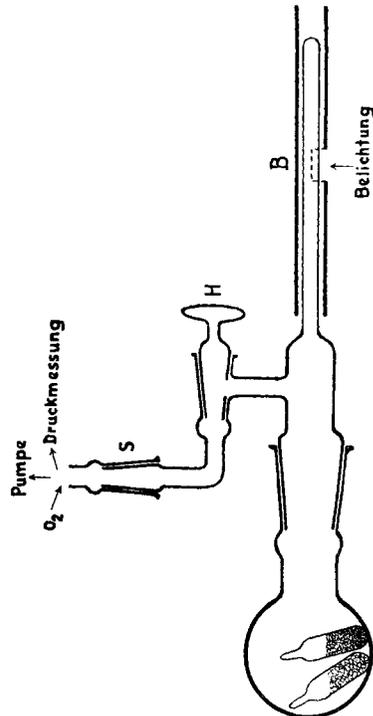


Fig. 2. Apparat zum Nachweis der aktivierten metastabilen Form des Sauerstoff-Moleküls.

*) Für die freundliche Überlassung dieses Materials sind wir der Agfa zu besonderem Dank verpflichtet.

sorbate in zugeschmolzenen, sehr dünnwandigen Phiolen, hochevakuiert, frei von Gasen und Dämpfen, vorliegen. Man erreicht dies in der einfachen kleinen Vorrichtung Fig. 1. Sie besteht aus einem gewinkelten Glasrohr, dessen offenes Ende in einen Schliff zum Ansetzen an die Hochvakuum-Pumpe endigt, und an dessen anderem Ende ein etwa 4 cm langes Stück Reagensglas angesetzt ist. Nahe dieser Ansatzstelle wird nach dem Einfüllen des vorgetrockneten Adsorbats das Rohr stark verengt, so daß es später im Hochvakuum leicht abgeschmolzen werden kann. Die Verengung bietet auch Schutz gegen das starke Stauben des Adsorbates während des Entgasens. Evakuiert wird mindestens 4 Stdn., bei einer Bad-Temperatur von 110°.

Die Eigenschaften der Trypaflavin-Adsorbate, ihre gelbe Farbe, ihre intensiv gelbgrüne Fluoreszenz und Phosphoreszenz, und die für die hier angestellten Versuche besonders wichtige Tilgung der Lumineszenz durch Sauerstoff sind ausführlich in der II. und IV. Mitteilung⁵⁾ dieser Arbeitsfolge beschrieben worden. Hervorzuheben wäre noch die Verfärbung der Trypaflavin-Adsorbate bei langem intensiven Belichten. Sie wird mit steigendem Sauerstoff-Druck immer deutlicher und äußert sich darin, daß die belichtete Stelle unter allmählicher, geringer Sauerstoff-Aufnahme rostbraun wird und ihr Lumineszenz-Vermögen vollständig verliert. Dieses Verhalten kommt später noch zur Sprache.

Das Acceptor-Adsorbat: Der Acceptor muß eine Verbindung sein, die von Silica-Gel polar adsorbiert wird, und die unter den gegebenen Bedingungen nicht von normalem Sauerstoff, wohl aber von aktiviertem Sauerstoff, oxydiert wird. Diesen Bedingungen entsprechen Leukoverbindungen der Triphenyl-methan-Farbstoffe. Sie besitzen den besonderen Vorteil, daß sie infolge der bei der Oxydation eintretenden Umwandlung in die intensiv gefärbten Farbstoffe als sichtbare Indicatoren schon für sehr geringe Mengen aktivierten Sauerstoff dienen. Die ersten Versuche wurden mit *p*-Leukanilin durchgeführt, die späteren mit Leuko-malachitgrün, welches weit günstiger ist, weil die bei der Oxydation dieser Verbindung auftretende blaue Farbe des Malachitgrüns sich leichter unterscheiden läßt von der eben erwähnten rostroten Verfärbung des Trypaflavin-Adsorbats bei langdauernder Belichtung. Wir beschreiben hier nur Versuche, in denen Leuko-malachitgrün Acceptor war.

Herstellung des Leuko-malachitgrüns: Malachitgrün in Salzsäure lösen, mit Zinkstaub (nicht zu viel) reduzieren, bis die Lösung beinahe farblos ist. Durch Zusatz von Natronlauge die Leukobase ausfällen, abnutschen, in Alkohol lösen und mehrmals aus Alkohol umkrystallisieren. Das so gewonnene Leuko-malachitgrün muß rein weiß aussehen.

Leuko-malachitgrün-Standardlösung: 2 Millimol (0.660 g Leuko-malachitgrün), gelöst in wenig verdünnter Salzsäure und mit Wasser auf 100ccm verdünnt (dunkel aufbewahren).

Bereitung des Adsorbates: 5 g gepulvertes Silica-Gel in eine Lösung, welche 5 ccm Leuko-malachitgrün-Standardlösung und 95 ccm Wasser enthält, eintragen, 15 Min. rühren (längere Adsorptions-Zeiten sind ungünstig, da feuchte Adsorbate sich an der Luft allmählich oxydieren), 4-mal mit Wasser auswaschen und zuletzt 1-mal schnell mit wenig reinem Aceton überspülen, um eine raschere Trocknung des Adsorbates zu erreichen. Die Adsorbate dürfen nicht feucht an der Luft lagern, da sie bald bläulich gefärbt werden, deshalb müssen sie rasch evakuiert werden (Apparat Fig. 1). Es empfiehlt sich, zuerst 2 Stdn., ohne zu erwärmen, und dann noch 3—4 Stdn. bei 50—60° zu evaku-

⁵⁾ H. Kautsky, A. Hirsch u. W. Baumeister, B. 64, 2053 [1931]; H. Kautsky u. A. Hirsch, daselbst S. 2677.

icren. Das in der Phiole eingeschmolzene Leuko-malachitgrün-Adsorbat ist fast vollkommen farblos und unbegrenzt haltbar.

Der wesentlichste Punkt ist das Verhalten des Acceptor-Adsorbates gegenüber Sauerstoff bei intensiver Belichtung. Es darf unter diesen Bedingungen allein, ohne Gegenwart eines Sensibilisators auch nicht die geringste Farbänderung zeigen. Das trockene, evakuierte Leuko-malachitgrün-Adsorbat wird in idealster Weise diesen Anforderungen gerecht: 10-stdg., intensives Belichten in dem Apparat Fig. 2 bei den verschiedensten Sauerstoff-Drucken verändert das Adsorbat in keiner Weise.

Die Versuchs-Anordnung (Fig. 2): In den durch einen weiten Schliff angesetzten, sehr dickwandigen Rundkolben (etwa 300 ccm Inhalt) werden je nach der Art des Versuches 1 oder 2 evakuierte Phiolen, welche die Adsorbate enthalten, eingeschoben, hierauf der nur im oberen Teil gefettete Schliff aufgesetzt und die gesamte Apparatur vollkommen evakuiert. Nach dieser Vorbereitung wird der Hahn H geschlossen und der Apparat bei dem Schliff S abgenommen. Durch Schütteln gelingt es, die Phiolen zu zertrümmern. Sind es 2 Phiolen, deren Inhalt gut vermischt werden muß, so schüttelt man weiter bis eine gleichmäßige Vermengung erreicht ist. Die Adsorbate läßt man, indem man den Apparat neigt, in das enge, 6 mm weite, dünnwandige Belichtungs-Röhrchen B fließen, und steckt danach den Apparat wieder an den Schliff S, wodurch er in Verbindung gebracht werden kann mit der Hochvakuum-Pumpe und ferner mit einem Quecksilber-Manometer und einem Mac-Leod-Apparat, welche die beliebig einstellbaren Sauerstoff-Drucke in der Apparatur zu messen erlauben. Die eigentlichen Versuche werden in dem mit den Adsorbaten oder Adsorbat-Gemischen gefüllten Belichtungs-Röhrchen B ausgeführt. Über dieses ist eine lose anliegende, verschiebbare Röhre aus schwarzem Papier geschoben, an der ein viereckiges Fenster ausgeschnitten ist. Durch dieses Fenster fällt das Licht auf den Inhalt des Röhrchens B. Man bekommt auf diese Weise scharf abgegrenzte, belichtete Stellen, welche sich, wenn sie photochemisch verändert wurden, nach Abziehen des Papierrohres, deutlich von der unveränderten Umgebung abheben. Die Lichtquelle war eine „Neu Liliput-Bogenlampe“ (5 Amp. Gleichstrom) der Firma Leitz, Wetzlar. Das Licht wird durch die an der Bogenlampe befindliche Linse gerade auf das Fenster konzentriert. Ein zwischengeschaltetes Kupfersulfat-Filter schützt das belichtete System vor Erwärmung.

Der Einfluß des Sauerstoff-Druckes auf die photo-sensibilisierte Oxydation im Adsorbat-Gemenge.

Die pulverisierten, innig vermengten Adsorbate von Trypaflavin und von Leuko-malachitgrün werden im Belichtungs-Röhrchen B bei verschiedenen Sauerstoff-Drucken belichtet. Sauerstoff, oder ebenso gut Luft, läßt man in die Apparatur eintreten und bestimmt mit dem Mac-Leod-Apparat, oder im Falle höherer Drucke mit dem Quecksilber-Manometer, den eingestellten Druck. Die so gemessenen Sauerstoff-Drucke sind nicht die an der Grenzfläche der Adsorbate herrschenden; es sind lediglich die Drucke, die mit der an den Adsorbat-Grenzflächen adsorbierten Sauerstoff-Menge im Gleichgewicht stehen. Für jeden neu eingestellten Sauerstoff-Druck wird das belichtete Fenster des Röhrchens B um mehr als eine volle Fensterbreite seitlich verschoben, so daß nebeneinander in einer Reihe die Resultate der

einzelnen, gleichdauernden Belichtungen bei verschiedenen Sauerstoff-Drucken übersehen werden können.

Resultate einiger Belichtungen sind in der folgenden Tabelle zusammengefaßt.:

O ₂ -Druck in 0.0001 mm	Belichtungszeit in Min.	Färbung
0.4	10	keine
1.4	10	keine
12	10	wenig
18	10	blau
24	10	wenig
40	10	keine

Bei höheren Drucken als den in der Tabelle angegebenen bis zum Partialdruck des Sauerstoffs in Luft ist auch bei ausgedehnteren Belichtungs-Zeiten eine Blau-Färbung der belichteten Stelle nicht mehr wahrzunehmen. Der Sauerstoff-Druck vermindert sich meßbar mit zunehmender Belichtungs-Dauer: es wird Sauerstoff verbraucht. Ob und wieviel Sauerstoff im Bereiche sehr geringer Drucke von unter 0.0001 bis etwa 0.005 vorhanden ist, läßt sich auch aus der Dauer der Phosphoreszenz des Trypoflavin-Adsorbates schließen³⁾.

Das Ergebnis dieser Versuche: Trotz räumlicher Trennung von Sensibilisator und Acceptor ist eine Oxydation des Acceptors, wenn das System dem Lichte ausgesetzt wird, an dem Auftreten der blauen Farbe zu beobachten. Die Anwesenheit von Sauerstoff ist dazu unbedingt erforderlich. Die photo-sensibilisierte Oxydation tritt unter den gegebenen Versuchs-Bedingungen nur in einem sehr beschränkten und vor allem sehr niederen Druckgebiet ein, eine Tatsache, die durch die Mitwirkung eines metastabilen Anregungs-Zustandes des Sauerstoff-Moleküls ohne weiteres erklärlich ist. Daß bei zu geringen Drucken in den angegebenen Versuchs-Zeiten die Färbung ausbleibt, ist nicht verwunderlich, da die in dieser Zeit entstehende Menge aktivierten Sauerstoffs zu gering ist, um sichtbare Veränderungen zu bewirken.

Einfluß der Entfernung der Acceptor-Moleküle von den Sensibilisator-Molekülen bei der photo-sensibilisierten Oxydation.

Die obere Grenze des Sauerstoffdruck-Gebietes, in dem die photo-sensibilisierte Oxydation noch zu beobachten ist, muß wesentlich durch die Entfernung der Sensibilisator-Moleküle von den Acceptor-Molekülen bestimmt werden. Je geringer diese Entfernungen werden, desto mehr wird sich die Grenze der noch eintretenden Blaufärbung, bei vergleichbaren Versuchs-Zeiten und Licht-Intensitäten, nach höheren Drucken ausdehnen. Eine Zunahme dieser Entfernung muß aber im entgegengesetzten Sinne wirken. Die Grenze wird sich schließlich nach so geringen Sauerstoff-Drucken zurückziehen, daß auch in wesentlich längeren Versuchs-Zeiten nur eine so geringe Menge Acceptor zur Oxydation gelangt, daß sie als sichtbare Blaufärbung nicht mehr zum Ausdruck kommen kann. Diese Überlegungen sind experimentell geprüft worden.

Verringerung der Entfernung zwischen Acceptor und Sensibilisator: Wir verringern den Diffusionsweg, den der aktive Sauerstoff

vom Sensibilisator zum Acceptor zurücklegt, indem wir Sensibilisator und Acceptor gemeinsam an ein und dieselben Gel-Teilchen adsorbieren. So entsteht ein Doppel-adsorbat, in welchem die beiden Molekülarten in außerordentliche Nähe gerückt werden.

Herstellung des Doppel-adsorbates: 5 g Trypaflavin-Adsorbat (dasselbe wie in der früheren Versuchsreihe) werden in eine Lösung, die 5 ccm Leuko-malachitgrün-Standardlösung und 95 ccm Wasser enthält, eingetragen. Die Weiterbehandlung des so entstehenden Trypaflavin + Leuko-malachitgrün-Silicagels gleicht in allen Punkten der des vorherbeschriebenen, einfachen Leuko-malachitgrün-Adsorbates; nur ist während der Herstellung Ausschluß des Lichtes erforderlich.

Die Belichtung dieses Doppel-adsorbates im Röhrchen B der Apparatur Fig. 2 bei verschiedenen Sauerstoff-Drucken zeigt bezüglich der Druck-Abhängigkeit ein gänzlich abweichendes Verhalten gegenüber dem des Gemisches zweier Adsorbate, von denen eines nur den Sensibilisator, das andere nur den Acceptor trägt. Das bestrahlte Doppel-adsorbat bläut sich bei beliebig eingestellten Sauerstoff-Drucken von 0.0003 mm bis zu 1 Atmosphäre. Die Abhängigkeit der photo-sensibilisierten Oxydation vom Sauerstoff-Druck ist bei dieser Anordnung der Moleküle ganz zurückgetreten. Der Weg, den der einmal aktivierte Sauerstoff vom Sensibilisator zum Acceptor zurücklegen muß, ist im Doppel-adsorbat so verkürzt, daß die Anzahl der auf diesem Wege stattfindenden, desaktivierenden Zusammenstöße ungeheuer herabgesetzt ist gegenüber denen im System der getrennten Adsorbate.

Vergrößerung der Entfernung zwischen Sensibilisator und Acceptor: Wir trennen eine Schicht eines Trypaflavin-Adsorbates von einer Schicht Leuko-malachitgrün-Adsorbat durch einen Zwischenraum von wenigen Millimetern. Das läßt sich experimentell in verschiedener Weise ermöglichen*). Das Ergebnis auch sehr lang dauernder Belichtungen ist stets ein negatives gewesen. Eine Blaufärbung des Acceptors ist weder bei niederen, noch bei hohen Drucken sichtbar geworden. Die Entfernung bedingte eben einen derartigen Konzentrations-Abfall an aktivierten Sauerstoff-Molekülen, daß die photo-sensibilisierte Oxydation des Acceptors ausbleibt.

Prüfung verschiedener Einwände.

Die bisherigen Versuche machen das Entstehen und die Wirkung eines angeregten metastabilen Zustandes des Sauerstoffs bei der photo-sensibilisierten Oxydation glaubhaft; bevor sie jedoch Beweiskraft erlangen, müssen noch verschiedene Einwände experimentell geprüft werden. Vor allem fehlt der bündige Beweis dafür, daß in Versuchen, bei denen Entstehungs- und Wirkungs-Ort des aktivierten Sauerstoffs räumlich getrennt sind, also getrennt hergestellte Adsorbate vermischt wurden, innerhalb der Versuchs-Zeiten weder die Moleküle des Trypaflavins in das Leuko-malachitgrün-Adsorbat einwandern, noch die Leuko-malachitgrün-Moleküle in das Trypaflavin-Adsorbat hineindiffundieren. Nur wenn wir einwandfrei beweisen können, daß die Acceptor-Moleküle von den Sensibilisator-Molekülen während der Belichtung vollkommen voneinander getrennt sind, schließt der Mechanismus der sensibili-

*) Die Beschreibung der einzelnen Anordnungen soll hier wegfallen, weil sie zu viel Platz beansprucht.

sierten Oxydation die Notwendigkeit eines gasförmigen Zwischenträgers in sich.

Voraussetzung zur Prüfung des Einwandes, daß die adsorbierten Moleküle des Sensibilisators oder des Acceptors diffundieren, ist die Möglichkeit, die Teilchen des Sensibilisator-Adsorbates von denen des Acceptor-Adsorbates vor und nach den Versuchen genau unterscheiden zu können. Die bisher angewendeten feinpulvrigen Gemische sind zu einer solchen Unterscheidung nicht geeignet. Als Merkmal zur Unterscheidung der beiden Arten von Adsorbaten, haben wir jedem derselben durch fraktioniertes Aussieben zerstößener Silicagel-Stücke eine gleichmäßige, charakteristische Teilchengröße verliehen. Die Herstellung der Adsorbate erfolgt sonst genau so wie mit feinpulvrigen Gelen. Um eine möglichst große Austritts-Fläche für den aktivierten Sauerstoff aus dem Sensibilisator-Adsorbat zu haben, wurden die Teilchen dieses Adsorbats besonders klein gewählt (0.15—0.3 mm), im Gegensatz dazu die Teilchen des Acceptor-Adsorbates groß (1.0—1.5 mm). Im Adsorbat-Gemenge sind dann die großen Acceptor-Adsorbat-Teilchen von den kleinen Sensibilisator-Teilchen umgeben, wie dies durch Fig. 3 veranschaulicht wird.

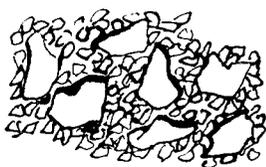


Fig. 3.



Fig. 4.

Ein Wandern der adsorbierten Moleküle von einem Gel-Teilchen zum andern wäre in diesem System leicht festzustellen. Bleibt die intensive Fluoreszenz des Trypaflavins nicht nur auf die Sensibilisator-Teilchen beschränkt, sondern fluorescieren nach dem Versuch auch Acceptor-Teilchen, dann ist das Trypaflavin in das Acceptor-Adsorbat gewandert; sind nach der Belichtung unter Bedingungen, die zu einer Blaufärbung führten, nicht nur die Acceptor-, sondern auch die Sensibilisator-Adsorbat-Teilchen gebläut, dann sind Acceptor-Moleküle in das Sensibilisator-Adsorbat eingedrungen.

Um diese Untersuchung durchzuführen, wird das Belichtungs-Röhrchen nach den Versuchen (B Fig. 2) abgeschnitten und belichtete und unbelichtete Stellen portionenweise mit einem feinen Spatel sehr vorsichtig herausgeholt und die Körnchen auf Glas ausgebreitet. Genügt meist schon die Betrachtung der Unterschiede an großen und kleinen Teilchen mit dem bloßen Auge, so gibt doch eine genaue mikroskopische Untersuchung noch größere Sicherheit in der Beurteilung.

Die Festigkeit der adsorptiven Bindung des Trypaflavins an Silica-Gel: Gel-Teilchen, die Trypaflavin adsorbiert enthalten, fluorescieren unter der Analysen-Quarzlampe intensiv grün. Mit Hilfe dieser Fluoreszenz ist es möglich, kleinste Mengen von Trypaflavin nachzuweisen.

Versuch: Vor-evakuiertes, feinteiliges Trypaflavin-Adsorbat wird mit Silicagel-Teilchen von der Größe 1.0—1.5 mm, wie sie zur Herstellung des eben erwähnten Leukomalachitgrün-Adsorbates verwendet wurden, gemeinsam 3 Stdn. bei 90° ausgepumpt und dann vermischt 14 Tage stehen gelassen. Eine Fluoreszenz-Untersuchung der

farbstoff-freien, gröberen Teilchen verlief nach diesem Zeitpunkt vollständig negativ. Ebenso wenig wie dieses reine Silica-Gel fluorescierten Teilchen des Leuko-malachitgrün-Adsorbates, die lange Zeit mit Trypaflavin-Adsorbat in Berührung waren, gleichgültig, ob vorher belichtet wurde oder nicht. Die Trypaflavin-Moleküle zeigen also, an Silica-Gel adsorbiert, keine nachweisbare Beweglichkeit. Sie sind an den inneren Grenzflächen vollkommen festgelegt.

Festigkeit der Bindung des adsorbierten Leuko-malachitgrüns: Wäre die photo-sensibilisierte Oxydation an eine direkte Berührung des Acceptors mit dem Sensibilisator gebunden, so müßte die Leukoverbindung in das Trypaflavin-Adsorbat hineinwandern und die Blaufärbung in den belichteten Teilchen des Trypaflavin-Adsorbates hervorgerufen; denn von den Trypaflavin-Molekülen wissen wir jetzt sicher, daß sie ihr Gel-Teilchen, in dem sie adsorbiert sind, nicht verlassen können. Belichtungsversuche mit dem Gemisch, bestehend aus feinkörnigem Sensibilisator- und grobkörnigem Acceptor-Adsorbat, entscheiden diese Frage.

Versuch: Die beiden verschiedenteiligen Adsorbate werden unmittelbar vor der Belichtung vermischt. Bestrahlt wird $1\frac{1}{2}$ Stdn. bei 0.005 mm Sauerstoff-Druck. Nach dieser Zeit ist die dem Licht ausgesetzte Stelle stark, doch ungleichmäßig blau gefärbt. Man sieht schon mit bloßem Auge, besser noch mit dem Mikroskop, daß ausschließlich nur Teilchen des Leuko-malachitgrün-Adsorbates blau gefärbt sind. Die kleinen, Trypaflavin enthaltenden Gel-Teilchen bewahren unverändert ihr Aussehen. Sie weisen nicht einmal geringe Merkmale einer Oxydation des Trypaflavins auf, die als rotbraune Verfärbung deutlich hervortreten würde.

Durch diesen Versuch ist eine photo-sensibilisierte Oxydation bei vollkommener räumlicher Trennung des Sensibilisators vom Acceptor einwandfrei nachgewiesen.

Es schien uns der Mühe wert, Versuche anzustellen, in denen Sensibilisator- und Acceptor-Adsorbate längere Zeit vor der Belichtung vermischt in Berührung waren. Eine geringe Beweglichkeit der adsorbierten Moleküle des Leuko-malachitgrüns könnte in langen Berührungs-Zeiten doch eine Wanderung des Leuko-malachitgrüns in das Trypaflavin-Adsorbat, insbesondere an den Berührungs-Stellen der Gel-Teilchen, zur Folge haben.

Versuch: Acceptor- und Sensibilisator-Adsorbat verschiedener Korngröße werden in der Apparatur vermengt und bleiben in diesem Zustande 10 Tage lang sich selbst überlassen. Nach dieser Zeit belichten wir eine bestimmte Stelle. In Abhängigkeit vom Sauerstoff-Druck beginnt in kürzeren oder längeren Belichtungs-Zeiten eine Blaufärbung sichtbar zu werden: bei einem Sauerstoff-Druck von 0.004 mm in 15 Min., bei 0.015 mm in 25 Min. Es fällt auf, daß in diesem Versuche der Einfluß des Sauerstoff-Druckes ungleich geringer ist als bei den Versuchen mit Adsorbaten, die unmittelbar nach dem Vermischen belichtet wurden. Dadurch gewinnen wir den Eindruck, als ob durch die lange Berührung der beiden Adsorbate Sensibilisator- und Acceptor-Moleküle in größere Nähe gerückt wären. Nach $1\frac{1}{2}$ -stdg. Belichtung, die eine sehr starke Blaufärbung in den eben angegebenen Druck-Gebieten verursacht, untersuchen wir den Inhalt des Belichtungs-Röhrchens mit dem Mikroskop. Neben großen, blau gefärbten Acceptor-Teilchen sind in größerer Anzahl kleine Trypaflavin-Teilchen vorhanden, die intensiv blau gefärbte Stellen erkennen lassen. Die Art der Färbung legt die Vermutung nahe, daß die Leukoverbindung nur an den Berührungspunkten der verschiedenen Gel-Teilchen während der langen Zeiten des Beisammenliegens in das Trypaflavin-Adsorbat hineindiffundiert ist (Fig. 4). Dieselbe Erscheinung findet man, allerdings in sehr viel geringerem Maße, schon bei Berührungs-Zeiten von $1\frac{1}{2}$ Tagen.

Diese Ergebnisse zeigen, daß die Moleküle des an Silica-Gel adsorbierten Leuko-malachitgrüns eine, wenn auch sehr geringe, Beweglichkeit

besitzen. Sie beweisen aber auch, daß gerade in den entscheidenden Versuchen zur Aufklärung der photo-sensibilisierten Oxydation, für welche ganz kurze Berührungs-Zeiten Voraussetzung waren, ein Zusammentreffen von Molekülen des Sensibilisators mit solchen des Acceptors während der Belichtung ausgeschlossen ist.

Wir wissen jetzt, daß an dem Sensibilisator durch das Belichten ein gasförmiger, stark oxydierend wirkender Stoff entsteht, der zu den Acceptor-Molekülen hin diffundiert und diese oxydiert. Es fragt sich aber, ob unsere Annahme berechtigt ist, daß dieser gasförmige Zwischenträger eine aktivierte metastabile Form des Sauerstoffs sei. Wenngleich die Anwesenheit von molekularem Sauerstoff für das Zustandekommen einer photo-sensibilisierten Oxydation Vorbedingung ist, sind doch auch noch andere Möglichkeiten in Betracht zu ziehen. In dem Sensibilisator-Adsorbat sind außer dem reaktionslosen Silica-Gel die Trypaflavin-Moleküle vorhanden und vielleicht auch Wasser-Moleküle, die durch das Evakuieren nicht in ihrer Gesamtheit von der Oberfläche entfernt wurden. Flüchtige, wenig beständige, photochemische Umwandlungsprodukte des Trypaflavins und des Wassers, welche unter Mitwirkung von Sauerstoff entstehen, könnten die Ursache der Oxydation des Leuko-malachitgrüns zu Malachitgrün im Adsorbat sein. Wir besprechen getrennt diese beiden Möglichkeiten.

Bedeutung der Zersetzung des Sensibilisators: Ist die photo-sensibilisierte Oxydation des Leuko-malachitgrüns durch eine Photo-oxydation des Trypaflavins bedingt, so erwarten wir eine umso stärkere Blaufärbung des Acceptors, je mehr die braunrote Farbe des im Lichte oxydierten Trypaflavins in Erscheinung tritt. Dem stehen die Tatsachen entgegen. Die schönste Blaufärbung des Acceptor-Adsorbates wurde immer dann beobachtet, wenn das Trypaflavin-Adsorbat nicht oder nur kaum verfärbt wurde: bei niederen Sauerstoff-Drucken. Bei höheren Sauerstoff-Drucken, bei denen das Trypaflavin-Adsorbat stark braunrot wurde, blieb die photo-sensibilisierte Oxydation des Acceptors vollkommen aus. In den entscheidenden Belichtungs-Versuchen mit Adsorbat-Gemischen bei geringem Sauerstoff-Druck und kurzen Belichtungs-Zeiten, in welchen der Acceptor tief blau verfärbt wurde, ist die Farbe des Trypaflavin-Adsorbats überhaupt nicht verändert worden.

Nicht nur Trypaflavin sensibilisiert die Oxydation des Leuko-malachitgrüns im Lichte. Viele der verschiedensten, fluorescierenden Stoffe sind in der gleichen Eigenschaft wirksam. Untersuchungen von H. Kautsky und R. Neuwirth über die Beziehung der photo-sensibilisierten Oxydation zur Fluorescenz-Tilgung der Sensibilisatoren durch Sauerstoff, die Gegenstand der nächsten Mitteilung sein werden, zeigen, daß kein Zusammenhang zwischen der photo-sensibilisierten Oxydation des Acceptors und der Photo-oxydation der Sensibilisierungs-Farbstoffe bestehen. Ganz klar ersehen wir das Gleiche auch aus Messungen von H. Gaffron⁶⁾ über die Sauerstoff-Aufnahme in belichteten Lösungen fluorescierender Farbstoffe, die einen Acceptor enthalten. Das uns hier interessierende Ergebnis derselben besagt, daß nur in acceptor-freien Lösungen eine langsame Oxydation des Sensibilisators beobachtet wird. Bei genügender Acceptor-Konzentration wird

⁶⁾ H. Gaffron, Biochem. Ztschr. **179**, 171 [1926].

jedoch ausschließlich der Acceptor oxydiert, während der fluoreszierende Farbstoff in seiner gesamten Menge unverändert bleibt, sich also rein als Sensibilisator betätigt.

Zersetzungsprodukte des Sensibilisierungs-Farbstoffes können somit nicht die Ursache der photo-sensibilisierten Oxydation sein.

Bedeutung des Wassers: Versuche von H. Gaffron⁷⁾ begegnen auch dem Einwand, daß Wasser zur photo-sensibilisierten Oxydation unbedingt erforderlich sei. Er fand, daß Wasser nicht nur ausgeschlossen werden kann, sondern daß es sogar meist die Ausbeute der absorbierten Licht-Energie zur photo-sensibilisierten Oxydation stark herabsetzt. Die im folgenden kurz zusammengefaßten Tatsachen, die sich aus quantitativen Messungen von Gaffron ergeben haben, sprechen eindeutig zugunsten unserer Auffassung vom Mechanismus der photo-sensibilisierten Oxydation und widersprechen einer Auffassung, welche die oxydierende Wirkung Radikalen, die dem Wasser entstammen, zuschreiben wollte.

In wasser-freier acetonischer Lösung von Hämatoporphyrin oder Chlorophyllid wird gelöster Allyl-thioharnstoff im Lichte oxydiert. In einer etwa 10-proz. Lösung dieses Acceptors verschwindet für jedes absorbierte Lichtquant 1 Molekül des Luft-Sauerstoffes, indem es zur Oxydation des Acceptors verbraucht wird.

Ebenso wenig wie hier, können Wasser-Moleküle in einer andern, von H. Gaffron untersuchten Reaktion für die photo-sensibilisierte Oxydation verantwortlich sein. Er fand in reinem, wasser-freiem Isoamylamin, das einen fluoreszierenden Farbstoff gelöst enthielt, bei Bestrahlung eine Bindung von molekularem Sauerstoff. Im Dunklen konnte er rein katalytisch praktisch die gesamte Menge der gebundenen Sauerstoff-Moleküle wieder in Freiheit setzen. Wie ließe sich diese eigenartige Reaktion besser erklären als durch die Bildung und darauf folgende Bindung einer besonders reaktionsfähigen Form molekularen Sauerstoffs? Auch in diesen Versuchen war Wasser für das Zustandekommen der Sauerstoff-Bindung nicht nötig, im Gegenteil, ein größerer Zusatz von Wasser rief sekundäre Veränderungen hervor, die die katalytisch abspaltbare Menge Sauerstoff auf die Hälfte herabsetzten.

Ergebnis der Untersuchungen.

Die Ursache der photo-sensibilisierten Oxydation ist die photo-sensibilisierte Aktivierung des Sauerstoffs. Die photo-sensibilisierte Oxydation zerfällt in zwei Teilreaktionen, in eine Licht- und eine darauffolgende Dunkel-Reaktion. Die Licht-Reaktion besteht in der Aktivierung des Sauerstoff-Moleküls durch Übertragung der von dem Sensibilisator absorbierten Licht-Energie auf den Sauerstoff. Die Folge-Reaktion, für die eine Belichtung nicht nötig wäre, führt zur Oxydation des Acceptors durch den in der Licht-Reaktion aktivierten Sauerstoff.

Welcher Art ist dieser aktivierte Zustand des Sauerstoffs? Er entsteht durch Übertragung der von fluoreszierenden Farbstoff-Molekülen absorbierten Licht-Energie auf Sauerstoff-Moleküle. Der Energie-Betrag, der

⁷⁾ H. Gaffron, loc. cit. 2).

im Sauerstoff-Molekül aufgespeichert wird, kann nur ein verhältnismäßig geringer sein. Farbstoffe wie Hämatoporphyrin und Chlorophyll, deren Fluoreszenz im Gebiet des längerwelligen Rots liegt, sind in besonderem Maße befähigt, Sauerstoff unter Tilgung ihrer Eigen-fluoreszenz zu aktivieren. Die weiter oben erwähnte photo-sensibilisierte Oxydation des Allyl-thioharnstoffs mit Chlorophyll als Sensibilisator wurde von H. Gaffron mit weitgehend monochromatischem Licht der Wellenlänge 6600 \AA gemessen. Die auf den Sauerstoff übertragene Energie wird deshalb kaum den Betrag von 40000 cal übersteigen. An eine Spaltung des Sauerstoff-Moleküls in Atome darf unter diesen Umständen gar nicht gedacht werden, so daß auch eine Bildung von Ozon ausgeschlossen ist. Wir denken im Hinblick auf die Druck-Abhängigkeit der „photo-sensibilisierten Oxydation auf Entfernung“ in erster Linie an einen Anregungs-Zustand des Sauerstoff-Moleküls. Dieser Anregungs-Zustand muß metastabil sein. Das besagt eindeutig die nachgewiesene Diffusion des aktivierten Sauerstoffs. Eine weitere Eigenschaft dieses aktivierten Sauerstoffs ist es, sehr viel stärker oxydierend zu wirken als normaler Sauerstoff. Alle Versuche über die photo-sensibilisierte Oxydation sind Beispiele hierfür.

Sehen wir uns in der Literatur nach Anregungs-Zuständen geringer Energie des Sauerstoffs um, so finden wir einen, der unseren Forderungen entspricht. Er wurde zuerst von Heurlinger⁸⁾ auf grund rein spektroskopischer Messungen gefunden. Sauerstoff besitzt eine Absorptionsbande im langwelligen Rot bei 7623 \AA ($= 37.257 \text{ cal}$). Die Absorption des Lichtes dieser Wellenlänge durch das Sauerstoff-Molekül ist so gering, daß schon daraus geschlossen wurde, daß es sich um einen metastabilen Zustand handeln dürfte. W. Childs und R. Mecke⁹⁾ ist es gelungen, durch quantitative Intensitäts-Messungen in der Absorptionsbande die Lebensdauer dieses $^1\Sigma$ -Terms des Sauerstoff-Moleküls mit Bestimmtheit auf einige Sekunden festzusetzen.

Die Versuchung ist groß, den durch Photo-sensibilisierung aktivierten Sauerstoff dem $^1\Sigma$ -Zustand des Sauerstoff-Moleküls gleichzusetzen. Einen unmittelbaren Beweis dafür haben wir nicht. Die Konzentration des durch direkte Licht-Absorption erhaltenen Sauerstoffs im $^1\Sigma$ -Zustand ist so außerordentlich gering, daß seine chemischen Eigenschaften, seine besonderen oxydierenden Wirkungen nicht untersucht und somit auch nicht mit denen des von uns untersuchten aktiven Zustandes des Sauerstoff-Moleküles verglichen werden können. Die Wahrscheinlichkeit aber, daß die beiden Aktivierungszustände identisch sind, ist recht groß in Anbetracht der Übereinstimmung wichtiger physikalischer Eigenschaften (Anregungs-Energie unter 40000 cal und metastabiler Zustand).

Ob dieser „aktivierte Sauerstoff“ in den weitverbreiteten Vorgängen der Autoxydation eine Rolle spielt, wissen wir noch nicht; wir halten es aber für wahrscheinlich, daß dieser Aktivierungs-Zustand auch bei der Übertragung chemischer Energie auf das Sauerstoff-Molekül erreicht wird.

Die Hauptbedeutung dieses aktiven Sauerstoffs liegt wohl auf biologischem Gebiet. Bedenkt man, daß in jeder grünen, assimilierenden Pflanze die

⁸⁾ Heurlinger, Dissertat., Lund 1919.

⁹⁾ W. H. I. Childs u. R. Mecke, Ztschr. Physik **68**, 344 [1931].

Fluorescenz des Chlorophylls durch Sauerstoff weitgehend getilgt wird und daß diese Fluorescenz-Tilgung in unmittelbarer Beziehung zu den Energie-Umwandlungen im Assimilations-Vorgang steht¹⁰⁾, so kann man ermessen, welche Bedeutung der aktivierte Sauerstoff für das biologische Geschehen auf der Erdoberfläche hat.

Die Mittel zur Durchführung dieser Untersuchung gewährte uns die van't Hoff-Stiftung der Königlichen Akademie der Wissenschaften in Amsterdam, wofür wir ihr unseren allerbesten Dank aussprechen.

328. Armin Hillmer: Zur Kenntnis des Lignins (VI.)¹⁾.

[Aus d. Kaiser-Wilhelm-Institut für Faserstoff-Chemie, Berlin-Dahlem.]

(Eingegangen am 18. September 1933.)

Die Messung der Ultraviolett-Absorption bietet vor jeder chemischen Methode den Vorteil, daß sekundäre Veränderungen der untersuchten Substanz, die das Ergebnis verfälschen oder von Spekulationen abhängig machen können, ausgeschlossen sind. Bei einer so empfindlichen Substanz, wie das Lignin sie darstellt, spielt dieser Gesichtspunkt eine wesentliche Rolle. Dazu kommt, daß diese Methode die Möglichkeit bietet, eine Aussage über die Gesamtmenge oder den Hauptbestandteil einer unbekanntem Substanz, soweit diese kurzwellige Strahlen in charakteristischer Weise absorbiert, zu machen, während im Falle des Lignins mit Hilfe der chemischen Methoden nur periphere Gruppen des Moleküls einwandfrei bestimmt wurden und bei der Feststellung aromatischer Abbauprodukte, wie Brenzcatechin usw., bestenfalls eine Ausbeute von etwa 20% erzielt werden konnte.

Vor mehreren Jahren, als noch gänzlich unentschieden war, ob das Lignin in die Klasse der aromatischen, hydro-aromatischen oder aliphatischen Verbindungen einzureihen wäre, konnte durch erstmalige halb-quantitative Messung des Ultraviolett-Absorptionsspektrums des Lignins mit großer Wahrscheinlichkeit die aromatische Natur des Lignins festgestellt werden^{2) 3)}. Die danach mit Hilfe einer quantitativen Methode vervollkommeneten Messungen^{4) 5) 6)} wurden dann auch von E. Hägglund und F. W. Klingstedt⁷⁾, von K. Wagner⁸⁾, sowie von A. J. Stamm, J. Semb und E. E. Harris⁹⁾ nachgeprüft bzw. bestätigt. In Gemeinschaft mit den HHrn.

¹⁰⁾ H. Kautsky, A. Hirsch u. F. Davidshöfer, B. **65**, 1763 [1932].

¹⁾ V. Mitteil.: R. O. Herzog u. A. Hillmer, Papierfabr. **30**, 205 [1932]; IV.: Papierfabr. **29**, Fest- u. Auslands-Heft, S. 40 [1931]; III.: B. **64**, 1288 [1931].

²⁾ R. O. Herzog u. A. Hillmer, B. **60**, 365 [1927].

³⁾ R. O. Herzog u. A. Hillmer, Ztschr. physiol. Chem. **168**, 117 [1927].

⁴⁾ A. Hillmer u. E. Hellriegel, B. **62**, 725 [1929]; E. Hellriegel, Dissertat., Berlin 1930.

⁵⁾ R. O. Herzog u. A. Hillmer, B. **62**, 1600 [1929], **64**, 1288 [1931]; Papierfabr. **29**, Fest- u. Auslands-Heft, S. 40 [1931]; A. Hillmer u. S. Nowakowska, Cellulose-Chemie **14** (im Druck) [1933]. ⁶⁾ E. Paersch, Dissertat., Berlin 1932.

⁷⁾ Svensk kem. Tidskrift **41**, 185 [1929]; C. **1930**, I 37; Ztschr. physikal. Chem. (A) **152**, 295 [1931].

⁸⁾ Dissertat., Leipzig 1931.

⁹⁾ Journ. physical Chem. **36**, 1574 [1932].