

30. Hans Kautsky: Energie-Umwandlungen an Grenzflächen, VIII. Mittel.: H. Kautsky, A. Hirsch und W. Flesch: Die Bedeutung metastabiler Zustände für sensibilisierte Photo-oxydationen.

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

(Eingegangen am 13. Dezember 1934.)

I. Die vorhergehende Mitteilung¹⁾, die siebente dieser Arbeitsfolge, befaßt sich mit dem Nachweis eines metastabilen Zustandes geringer Anregungs-Energie (unter 40000 cal.) des Sauerstoff-Moleküles. Normaler molekularer Sauerstoff entzieht in Wechselwirkung mit angeregten Farbstoff-Molekülen denselben Energie und geht dadurch selbst in einen energie-reichen, metastabilen Zustand über. Dieser Vorgang ist die Ursache der von uns an vielen Farbstoffen beobachteten, mehr oder minder starken Auslöschung ihrer Fluorescenz durch Sauerstoff. Befinden sich in einem System, welches geeignete fluoreszierende Farbstoffe und Sauerstoff enthält, gleichzeitig bestimmte oxydierbare Stoffe (Sauerstoff-Acceptoren), dann werden dieselben bei einer Belichtung des Systems durch den aktiven, sehr reaktionsfähigen Sauerstoff oxydiert²⁾.

Den eben kurz umrissenen Mechanismus einer durch fluoreszierende Farbstoffe sensibilisierten Photo-oxydation haben wir, um jede Teilreaktion erfassen zu können, in einem heterogenen System aufgeklärt: Die an Gelkörnern adsorbierten Sensibilisator-Moleküle waren von den an anderen Gelkörnern adsorbierten Acceptor-Molekülen durch eine Sauerstoff-Atmosphäre geringen Druckes (etwa 0.001 mm) getrennt, so daß die metastabilen aktivierten Sauerstoff-Moleküle vom Entstehungsort zum Ort ihrer sichtbaren Wirkung hindiffundieren mußten. Lösungen waren für die Trennung einer Photo-oxydation in ihre Einzelvorgänge zuerst wenig geeignet. Von vielen Seiten wird bezweifelt, daß, wie wir angaben, der von uns aufgefundene Mechanismus, auch für photo-sensibilisierte Oxydationen in Lösungen, deren eine größere Zahl bekannt ist, gelten soll. (Wir sprechen hier nicht von der durch Licht direkt oder sensibilisiert ausgelösten Sauerstoff-Übertragung mittels Schwermetall-Ionen.) Diese Frage entscheiden nur Experimental-Untersuchungen, welchen möglichst viele saubere und einfache Systeme unterworfen werden. Es sind besonders zwei Fälle von photo-sensibilisierten Oxydationen in Lösungen, die ihres gut bekannten Verhaltens wegen, zur Untersuchung sehr geeignet scheinen. Sie wurden von H. Gaffron aufgefunden und messend verfolgt. Es handelt sich erstens um die durch Hämatorporphyrin, Chlorophyll und andere Farbstoffe photo-sensibilisierte Bildung von Isoamylamin-peroxyden mit locker

¹⁾ H. Kautsky, H. de Bruijn, R. Neuwirth u. W. Baumeister, B. **66**, 1588 [1933].

²⁾ H. Gaffron spricht (Biochem. Ztschr. **264**, 251 [1933]) die Ansicht aus, daß es vor seiner Veröffentlichung als selbstverständlich gelten konnte, daß bei photo-sensibilisierten Oxydationen die vom Farbstoff absorbierte Licht-Energie auf den molekularen Sauerstoff unter Aktivierung desselben übertragen wird. Wir möchten dazu auf unsere vorhergehenden Arbeiten verweisen und bemerken, daß es alles andere als selbstverständlich ist, daß das Sauerstoff-Molekül, sensibilisiert durch Farbstoffe, in einem metastabilen Anregungs-Zustand übergeht. Dieses unser Ergebnis aber kann erst die Grundlage für die Behauptung sein, daß die Energie direkt auf Sauerstoff übertragen wird, andernfalls wäre sie als vollkommen unbegründete Annahme unwissenschaftlich.

gebundenem Sauerstoff³⁾, und zweitens um die durch die gleichen Farbstoffe sensibilisierte Oxydation von Allyl-thioharnstoff (Thiosinamin)⁴⁾. In beiden Fällen wurde die Geschwindigkeit der Sauerstoff-Aufnahme gemessen. Für den Fall der Oxydation des Thiosinamins bestimmte Gaffron die Quanten-Ausbeute. Er fand unter günstigen Bedingungen das Verhältnis der vom Farbstoff absorbierten Licht-Quanten zur Anzahl der bei der Oxydation verbrauchten Sauerstoff-Moleküle gleich 1. Das bedeutet, daß unter bestimmten Bedingungen so gut wie 100% der absorbierten Licht-Quanten an dem Oxydationsvorgang oder in unserer Sprache: an der Aktivierung der Sauerstoff-Moleküle beteiligt sind.

Wir halten uns für berechtigt, in diesen beiden Fällen photo-sensibilisierter Oxydation in Lösungen den Sauerstoff als die Verbindung zu bezeichnen, welche den angeregten Sensibilisator-Molekülen (Hämatoporphyrin und Chlorophyll) unmittelbar die Anregungs-Energie entzieht. Der Sauerstoff ist nämlich in diesen Systemen die einzige Molekülart, welche die Fluoreszenz der Sensibilisator-Farbstoffe herabsetzt. Von den beiden Acceptoren vermag weder das Isoamylamin, noch das Thiosinamin die Fluoreszenz des Hämatoporphyrins oder Chlorophylls sichtbar zu vermindern. In Analogie zu unserem ersterwähnten Nachweis der sensibilisierten Sauerstoff-Aktivierung erklären wir, daß auch die Fluoreszenz-Tilgung durch Sauerstoff in Lösung je nach ihrer Stärke die größere oder geringere Bildungs-Geschwindigkeit metastabiler, höherquantiger Zustände der Sauerstoff-Moleküle anzeigt.

Unsere Fragestellung ist, wie wir gleich sehen werden, mit der bei der Thiosinamin-Oxydation gefundenen Quanten-Ausbeute 1 verknüpft. Wenn diese große Quanten-Ausbeute in direktem Zusammenhang mit der Tilgung der sichtbaren Fluoreszenz durch Sauerstoff steht, müßte die Fluoreszenz-Tilgung unter den gegebenen Bedingungen eine vollkommene sein. Das ist aber nicht der Fall⁵⁾. Die Fluoreszenz der Hämatoporphyrin- und Chlorophyll-Lösungen ist zwar in Gegenwart von reinem Sauerstoff deutlich schwächer als in Stickstoff oder im Vakuum, aber von einer 100-proz. Tilgung weit entfernt. Die Konzentration des gelösten Sauerstoffs ist demnach selbst bei einem Gleichgewichts-Druck von 760 mm im Gasraum noch viel zu gering, als das genug wirksame, d. h. auslöschende, Zusammenstöße der Sauerstoff-Moleküle mit den angeregten Farbstoff-Molekülen stattfinden würden, um eine vollständige Tilgung der Fluoreszenz herbeizuführen.

Wir müssen uns deshalb in Hinblick auf die hohe Quanten-Ausbeute fragen, welche Bedeutung die Tilgung der Fluoreszenz des Sensibilisator-Farbstoffes für die Größe der Sauerstoff-Aktivierung in Beziehung zur Menge der absorbierten Licht-Quanten hat? Das hängt in erster Linie von der Fluo-

³⁾ H. Gaffron, B. **60**, 2229 [1927]. ⁴⁾ H. Gaffron, B. **60**, 755 [1927].

⁵⁾ Eine so gut wie vollständige Tilgung der Chlorophyll-Fluoreszenz haben wir sogar schon bei geringen Sauerstoff-Drucken in lebenden Blättern gefunden. Diesmal handelt es sich aber um eine an Grenzflächen stattfindende Energie-Übertragung vom angeregten Chlorophyll auf dissoziabel gebundenen Sauerstoff. Zu den gegenteiligen Ansichten von A. Stoll (Naturwiss. **20**, 955 [1932]), R. Willstätter (Naturwiss. **21**, 252 [1933]) und H. Gaffron (Biochem. Ztschr. **264**, 251 [1933]) werden wir in folgenden Arbeiten über „Chlorophyll-Fluoreszenz und Kohlensäure-Assimilation“ in der Biochem. Ztschr. Stellung nehmen.

rescenz-Ausbeute, d. h. von dem Verhältnis der absorbierten Licht-Quanten zu den wieder emittierten Licht-Quanten, in der betreffenden Farbstoff-Lösung ab. Ist sie 1 oder doch nahe an 1, wie z. B. bei Uranin oder anderen stark fluorescierenden Lösungen, dann wird die sichtbare Fluorescenz-Tilgung ein direktes Maß für die gesamte Sauerstoff-Aktivierung sein. Es fällt aber auf, daß viele Farbstoffe, welche sich bisher durch eine hohe Quanten-Ausbeute als besonders wirksam in den Versuchen zur photo-sensibilisierten Oxydation erwiesen haben, wie Hämatoporphyrin, Chlorophyll, Eosin, Rose bengale u. a., in den angewandten Lösungen verhältnismäßig schwach fluorescieren. Dieses schwach bezieht sich nur auf einen Vergleich mit stark fluorescierenden Lösungen (Uranin, Rhodamine, Isochinolinrot usw.), und zwar auf sauerstoff-freie Lösungen von Zimmer-Temperatur. Die maximale Fluorescenz einer acetonischen Lösung von Rhodamin B verhält sich zur Fluorescenz einer Rose-bengale- oder auch einer Chlorophyll-Lösung, wie sie zur Thiosinamin- oder Isoamylamin-Oxydation verwendet wurden, wie der Tag zur Nacht. Daraus folgt, daß die Fluorescenz-Ausbeute in einer solchen Lösung nur gering ist, und es folgt weiter, daß die Anzahl der Anregungs-Zustände, welche zur Fluorescenz führen, nur einen ganz unbedeutenden Bruchteil der durch die Licht-Absorption überhaupt geschaffenen Anregungs-Zustände ausmacht. Die bei der Photo-oxydation von Thiosinamin gefundene Quanten-Ausbeute 1 verlangt aber eine praktisch vollzählige Beteiligung der sämtlichen, im Verlauf der Belichtung entstehenden, angeregten Farbstoff-Moleküle an der Sauerstoff-Aktivierung. Somit spielen die sichtbare Fluorescenz und ihre Tilgung durch Sauerstoff bei den gering fluorescierenden Farbstoffen eine beinahe zu vernachlässigende Rolle; das Hauptaugenmerk richtet sich vielmehr auf unsichtbare, d. h. nicht durch Fluorescenz in Erscheinung tretende, Quanten-Zustände, welche ausschlaggebend für die Sensibilisator-Wirkung sein müssen.

Welcher Art sind diese unsichtbaren Quanten-Zustände? Es kann sich nur um langlebige, also metastabile Zustände handeln, wenn bei der herrschenden geringen Sauerstoff-Konzentration in der Lösung jedes angeregte Farbstoff-Molekül in einem wirksamen Zusammenstoß mit einem Sauerstoff-Molekül seine Energie auf dieses übertragen soll. Wir sahen ja, daß die kurzlebige sichtbare Fluorescenz unter dem gegebenen Sauerstoff-Druck zwar vermindert, aber sehr weit entfernt von einer 100-proz. Tilgung ist.

Es ist jetzt die für uns entscheidende Frage, ob wir die nach unserer Auffassung zu erwartenden metastabilen Anregungs-Zustände der Sensibilisierungs-Farbstoffe in Lösung direkt nachweisen können?

Nur Luminescenz-Nachweise dürften empfindlich genug sein, die langlebigen Zustände der Beobachtung unmittelbar zugänglich zu machen. Wir sahen vorerst zwei Möglichkeiten: Erstens einen direkten Nachweis der Lebensdauer durch Beobachtung eines Nachleuchtens in der reinen Farbstoff-Lösung mittelst des Phosphoroskops, und zweitens die ebenfalls phosphoroskopische Beobachtung einer sensibilisierten Fluorescenz in dem Augenblick, wo die Lösung eines Farbstoffes großer Fluorescenz-Ausbeute und geringer Anregungs-Energie mit einer Lösung, welche metastabile Zustände größerer Anregungs-Energie enthält, vermischt wird.

Die Versuche zur sensibilisierten Fluoreszenz sind eben erst begonnen worden, wir wissen noch nicht, ob sie Erfolg bringen werden. Die Versuche zur Messung eines Nachleuchtens reiner Farbstoff-Lösungen haben die aus unseren Ergebnissen gezogenen Folgerungen voll bestätigt: An einer größeren Anzahl sehr verdünnter, sauerstoff-freier Farbstoff-Lösungen läßt sich ein Nachleuchten beobachten, welches in manchen Fällen bis zu schätzungsweise 10^{-2} Sek. dauert. Damit ist das Vorhandensein metastabiler Zustände der Sensibilisierungs-Farbstoffe in Lösung bewiesen.

II. Infolge der Messung der Leuchtdauer der Fluoreszenz von Farbstoff-Lösungen durch E. Gaviola⁶⁾ hat sich allgemein die Überzeugung eingewurzelt, daß die Lebensdauer angeregter Moleküle fluoreszierender Farbstoffe in Lösung etwa 10^{-9} bis 10^{-8} Sek. beträgt, also in der gleichen Größenordnung wie die einfacher Atome ist. Bedenkt man aber, daß alle diese Messungen der Lebensdauer in luft-haltigen Lösungen ausgeführt wurden, so bekommt dieses Resultat eine andere Bedeutung. Angaben über Fluoreszenz sollten sich ganz allgemein immer auf sauerstoff-freie Systeme beziehen. In Gegenwart von Luft werden die längerlebigen Zustände der Farbstoff-Moleküle durch den Sauerstoff weggefressen, und es bleiben nur die kurzlebigen, welche vor ihrem Ausleuchten keine wirksamen Zusammenstöße mit Sauerstoff-Molekülen erfahren, übrig. Wir erinnern an unsere Versuche mit adsorbierten, fluoreszierenden Farbstoffen, deren oft mehrere Sekunden dauerndes Nachleuchten schon bei einem Sauerstoff-Druck von 10^{-3} mm getilgt wird, während sich ein auslöschender Einfluß des Sauerstoffs auf die kurzlebige Fluoreszenz vieler adsorbierter Farbstoffe erst bei Drucken von 10^2 mm gerade bemerkbar macht⁷⁾. Aus diesem Grunde müssen wir bei unseren jetzigen Versuchen erwarten, daß ein durch metastabile Zustände verursachtes Nachleuchten der Farbstoff-Lösung außerordentlich sauerstoff-empfindlich und deshalb nur in ganz sauerstoff-freien Lösungen zu beobachten sein wird.

Die Tatsache, daß F. Perrin⁸⁾ und S. I. Wawilow⁹⁾, ohne den Sauerstoff fern zu halten, für die Fluoreszenz von Uranylsalzen Lebensdauern von 10^{-4} bis 10^{-3} Sek. fanden, spricht nicht gegen unsere Auffassung. Wir haben festgestellt, daß das Nachleuchten der Uranylsalze (in Lösung wie auch an Grenzflächen adsorbiert) nicht im geringsten durch Sauerstoff beeinflusst wird. Allerdings müssen wir daraus schließen, daß das Uranyl-Ion nicht dazu geeignet ist, die von ihm adsorbierte Licht-Energie auf Sauerstoff-Moleküle zu übertragen. Photo-oxydationen, in welchen Uranylsalze als Sensibilisatoren wirken, sind immer mit einer Reduktion des Uranyl-Ions verknüpft. Der Mechanismus der in Gegenwart von UO_2^{++} im Lichte stattfindenden Oxalsäure-Oxydation¹⁰⁾ ähnelt wohl eher dem der photochemischen Umwandlung von Trioxalatoferriat, wobei Oxalsäure unter Übergang von Fe^{+++} in Fe^{++} oxydiert wird. Es ist ersichtlich, daß es sich hier nicht um eine photo-sensibilisierte Oxydation in unserem Sinne handelt.

⁶⁾ Ztschr. Physik **42**, 853 [1927].

⁷⁾ H. Kautsky u. A. Hirsch, B. **64**, 2677 [1931].

⁸⁾ F. Perrin, Compt. rend. Acad. Sciences **182**, 929 [1926], **186**, 428 [1928].

⁹⁾ S. I. Wawilow u. Lewschin, Ztschr. Physik **48**, 397 [1928].

¹⁰⁾ P. F. Büchi, Ztschr. physikal. Chem. **111**, 269 [1924].

Eine Art Phosphoreszenz von Farbstoffen wurde in sehr zähen Lösungen organischer Stoffe, wie Zucker, Glycerin, Gelatine u. a., beobachtet¹¹⁾, ohne daß dabei Sauerstoff ausgeschlossen wurde. Rascher Sauerstoff-Verbrauch an der belichteten Stelle und nur außerordentlich langsame Nachdiffusion dürften die Ursachen dafür sein, daß das Nachleuchten zu beobachten ist; ein ganz ähnlicher Vorgang, wie wir ihn bei den Papier-Phosphoren¹²⁾ fanden.

III. Versuche: Mit einem einfachen, früher angegebenen Phosphoroskop¹³⁾ haben wir im Lichte einer Bogenlampe sehr verdünnte, sauerstofffreie Lösungen fluoreszierender Farbstoffe auf ihre Leuchtdauer untersucht. Das kürzeste, in unserem Phosphoroskop noch meßbare, Nachleuchten beträgt ungefähr 10^{-3} bis 10^{-4} Sek. Diese Zeiten ergeben sich aus Vergleichen mit Uranylsulfat-Lösungen in Schwefelsäure bestimmter Zusammensetzung, deren Nachleuchtdauer aus phosphoroskopischen Messungen von S. I. Wawilow⁹⁾ und von F. Perrin⁸⁾ bekannt ist. Ein sichtbares Nachleuchten bei der höchsten Tourenzahl des Phosphoroskops bedeutet, daß die Lösung wenigstens 10^{-4} bis 10^{-3} Sek. nachleuchtet. Beobachtet man ein Nachleuchten noch bei einer starken Verminderung der Umdrehungsgeschwindigkeit oder gar beim Andrehen der Phosphoreszenz-Trommel mit dem Finger, dann kommt man schätzungsweise zu Leuchtdauern bis zu 10^{-2} oder gar 10^{-1} Sek. Besonders zu betonen ist, daß das Ausbleiben eines Nachleuchtens nicht bedeutet, daß überhaupt keine metastabilen Anregungszustände in der Lösung vorkommen, sondern nur daß keine durch Lumineszenz in Erscheinung tretenden metastabile Anregungszustände bei den gegebenen Versuchs-Bedingungen vorhanden sind, die länger als 10^{-3} bis 10^{-4} Sek. leben.

Die zu untersuchenden Farbstoff-Lösungen befanden sich vor dem Spalt des Phosphoroskops in einer kleinen, etwa 30 ccm fassenden Waschflasche aus phosphoreszenz-freiem Quarz durch welche dauernd absolut sauerstoff-freier Stickstoff¹⁴⁾ perlte.

Einige der von uns untersuchten Farbstoffe stellen wir geordnet nach ihrer Fluoreszenz-Helligkeit in Aceton zusammen. Stark fluoreszierend: Uranin, Rhodamin 6 GN, Rhodamin B, Isochinolinrot. Mittelstark fluoreszierend: Trypaflavin, Benzoflavin, Euchrysin, Eosin. Schwach fluoreszierend: Hämatoporphyrin, Chlorophyll, Erythrosin, Phloxin, Rose bengale.

Die gesperrt gedruckten Namen gehören Farbstoffen an, deren Lösungen nachleuchten¹⁵⁾; an den übrigen konnte bisher ein Nachleuchten von uns nicht beobachtet werden.

Das Nachleuchten stammt aus der homogenen Lösung und nicht von Farbstoff-Molekülen, welche an der Quarzwand adsorbiert sind. Sobald

¹¹⁾ A. Pospiewow, Verhandl. Dtsch. Physikal. Ges. **16**, 411 [1914].

¹²⁾ H. Kautsky u. A. Hirsch, B. **65**, 403 [1932].

¹³⁾ H. Kautsky, A. Hirsch u. W. Baumeister, B. **64**, 2053 [1931]. — Für den dauernden Betrieb empfiehlt es sich, die Phosphoroskop-Trommel nicht wie in der Arbeit angegeben auf Stahlspitzen, sondern auf kleinen Kugellagern laufen zu lassen.

¹⁴⁾ H. Kautsky u. H. Thiele, Ztschr. anorgan. allgem. Chem. **152**, 342 [1926].

¹⁵⁾ Das intensiv rote Nachleuchten des Chlorophylls wurde bisher nur in Lösungen von reinem Isoamylamin beobachtet.

die Lösung aus dem Gefäß entfernt wird, ist das Nachleuchten verschwunden, die feuchte Quarzwand leuchtet nicht nach. Überdies werden die besonders gut nachleuchtenden sauren Farbstoffe Eosin, Erythrosin, Phloxin, Rose bengale an Quarz so gut wie gar nicht adsorbiert.

Die sehr verdünnten Farbstoff-Lösungen — wenn nichts besonderes bemerkt ist, handelt es sich um acetonische Lösungen — werden so hergestellt, daß entweder 2—4 Tropfen einer im Liter 5 Millimole Farbstoff enthaltenden Lösung in 20 ccm Lösungsmittel verteilt werden, oder auch durch direktes Auflösen einer sehr geringen Menge des kristallisierten, sehr reinen Farbstoffes. Die Konzentration dieser Lösungen war ungefähr 0.05-millimolar und zur Beobachtung des Nachleuchtens gut geeignet.

Das Nachleuchten ist, wie zu erwarten, von geringer Intensität und häufig nur mit ausgeruhtem Auge deutlich zu sehen. Solch schwaches Nachleuchten ist, wie z. B. beim Isochinolinrot, unbestimmt weißlich in der Farbe. Bei einigen Farbstoffen ist das Nachleuchten stärker und schön gefärbt: beispielsweise erscheint Benzoflavin grün, Erythrosin gelblichrot, Hämatoporphyrin und Chlorophyll dunkelrot. Das emittierte Licht wurde bisher von uns nicht näher untersucht.

Die Dauer des Nachleuchtens ist für die untersuchten Farbstoffe verschieden. Es gibt solche, wie das Chlorophyll, Eosin und Erythrosin, welche bis zu 10^{-2} Sek. und vielleicht noch darüber nachleuchten. Meist sieht man aber die Erscheinungen deutlich erst bei mittleren oder höheren Umdrehungsgeschwindigkeiten des Phosphoroskopes.

Bedeutend ist der Einfluß der Konzentration auf die Intensität und Dauer der Leucht-Erscheinung. Bei extrem niedrigen Konzentrationen ist eine geringe Steigerung derselben mit einer Verstärkung des Nachleuchtens verbunden. An Phloxin- und Chlorophyll-Lösungen konnten wir dies beobachten. Vermehren wir aber weiter die Anzahl der gelösten Farbstoff-Moleküle, so sehen wir bald eine Abnahme und Verkürzung des Leuchtens. Als charakteristisches Beispiel dafür beschreiben wir kurz das Verhalten von Hämatoporphyrin-Lösungen aus dem gleichzeitig auch der Einfluß veränderter Temperaturen ersichtlich wird: 1) Lösungen dieses Farbstoffs, so verdünnt, daß sie so gut wie ungefärbt sind, aber sehr deutlich rot fluorescieren, leuchten bei einer mittleren Umdrehungszahl der Phosphoroskop-Trommel tief rot, sowohl bei 10^0 als auch bei -80^0 . 2) In etwas konzentrierteren, deutlich rot gefärbten Lösungen sehen wir bei einer Temperatur von 10^0 erst bei einer höheren Umdrehungszahl ein Leuchten von nur weißlicher Farbe. Bei -80^0 jedoch ist das Nachleuchten schon bei geringeren Umdrehungen ebenso stark rot wie in den verdünntesten Lösungen. 3) Lösungen mit hohem Hämatoporphyrin-Gehalt lassen selbst bei tiefen Temperaturen, wie auch bei den höchsten Geschwindigkeiten des Phosphoroskops keine Spur eines Nachleuchtens mehr erkennen.

Von Einfluß ist ferner auch noch das Lösungsmittel, in welchem der Farbstoff gelöst ist. Die Dauer des Nachleuchtens ist z. B. für die Farbstoffe Eosin, Phloxin, Erythrosin und Rose bengale in den Lösungsmitteln Wasser, Propylalkohol und Aceton verschieden. Aceton erwies sich im Vergleich zu den beiden anderen Lösungsmitteln als weniger günstig. In Wasser und Propylalkohol war das Nachleuchten meist heller und schon bei geringeren Umdrehungen zu sehen.

Mit diesen kurzen Angaben wollen wir uns vorderhand begnügen; sie dürfen als einwandfreier Beweis für das Vorhandensein metastabiler Anregungs-Zustände vieler Farbstoffe in ihren fluorescierenden Lösungen gelten. Im Verein mit dem Ergebnis der hohen Quanten-Ausbeute bei den durch diese Farbstoffe sensibilisierten Photo-oxydationen kommen wir zu der Vorstellung, daß bei vielen Farbstoff-Lösungen, welche in dem gegebenen Falle schwach fluorescieren, nach der primären Absorption der Licht-Quanten ein bedeutender Anteil der angeregten Farbstoff-Moleküle in einen metastabilen Zustand übergeführt wird. Die Ursache für dieses Verhalten könnte in einer Wechselwirkung der angeregten Farbstoff-Moleküle mit den Lösungsmittel-Molekülen oder auch den nicht angeregten artgleichen Farbstoff-Molekülen liegen.

Die Selbst-auslöschung der sichtbaren Fluorescenz durch Erhöhung der Konzentration ist hier mit einbezogen; doch ist zu bedenken, daß einer der Gründe für diese Auslöschung auch eine weitgehende Assoziation der Farbstoff-Moleküle in konzentrierteren Farbstoff-Lösungen sein kann. Einige Versuche in dieser Richtung lassen hoffen, eine experimentelle Charakterisierung der beiden, in Frage kommenden Vorgänge zu ermöglichen. Während im allgemeinen eine Temperatur-Erhöhung eine Verminderung der Fluorescenz bewirkt, finden wir bei einer ganzen Anzahl von Farbstoff-Lösungen, insbesondere bei erhöhten Konzentrationen oder bei Zusatz von Flüssigkeiten, welche die Löslichkeit des Farbstoffes herabsetzen, einen umgekehrten Temperatur-Einfluß, indem die unter Umständen schon weitgehend getilgte Fluorescenz durch Erhöhung der Temperatur wieder zu hellem Leuchten gelangt. Die Ursache ist wohl eine gesteigerte molekulare Löslichkeit in dem erwärmten Lösungsmittel. Wir belegen dies durch wenige Beispiele: 1) Wäßrige und auch alkoholische Lösungen von Farbstoffen der Fluorescein-Reihe (Uramin, Eosin, Rhodamine u. a.), deren Fluorescenz durch Konzentrations-Erhöhung stark ausgelöscht ist, fluorescieren wieder sehr hell bei einer Steigerung der Temperatur. Für diese Versuche eignen sich besonders Flüssigkeiten wie Wasser und auch Alkohol, in denen viele Farbstoffe zur Assoziation neigen, während z. B. Benzol ungeeignet ist. 2) Die stark rote Fluorescenz einer Lösung von Chlorophyll in Propylalkohol wird durch allmählichen Wasser-Zusatz zum Verschwinden gebracht. Es ist bekannt, daß Chlorophyll in reinem Wasser kolloid-dispers gelöst ist. Erhitzt man die luminescenz-leere, wäßrig-propylalkoholische Lösung, so zeigt uns ein Vergleich der nicht fluorescierenden, kalten Lösung mit der erwärmten unter der Analysen-Quarzlampe, daß die Temperatur-Erhöhung die Fähigkeit zu fluorescieren wieder hervorruft.

Vor eingehenden Untersuchungen wollen wir nicht zu weitgehende Mutmaßungen über die Ursache der Umwandlung primär angeregter Farbstoff-Moleküle in metastabile Formen aussprechen. Der Einfluß der Lösungsmittel-Moleküle und der Konzentrations-Erhöhung der Farbstoffe erinnert an den Einfluß von Fremdgasen und der Dampfdruck-Erhöhung des Quecksilbers bei der Umwandlung des kurzlebigen 3P_1 -Zustandes des Quecksilberatoms in den metastabilen 3P_0 -Zustand unter Auslöschung der Emission der Resonanzlinie¹⁶⁾.

¹⁶⁾ Literatur bei K. F. Bonhoeffer u. P. Harteck, Grundlagen der Photochemie [1933], S. 199.

Die zunächst wichtigste Frage ist die nach dem Verhalten des Nachleuchtens fluoreszierender Lösungen gegenüber Sauerstoff. Erklären wir doch die hohe Quanten-Ausbeute bei der photo-sensibilisierten Oxydation des Thiosinamins durch die Ausbeute an wirksamen Zusammenstößen von Sauerstoff-Molekülen mit den in metastabilen Quanten-Zuständen befindlichen Farbstoff-Molekülen. Eine gewisse, wenn auch lange nicht 100-proz. Ausbeute an auslöschenden Stößen mit Sauerstoff-Molekülen war schon bei der kurzlebigen Fluoreszenz der Farbstoff-Lösungen bei höheren Sauerstoff-Drucken festzustellen. Die Wahrscheinlichkeit solcher wirksamer Zusammenstöße muß aber mit zunehmender Lebensdauer der Anregungs-Zustände stark anwachsen, so daß die Auslöschung des Nachleuchtens, welches die Lebensdauer der metastabilen Zustände anzeigt, weitgehend unabhängig vom Sauerstoff-Druck werden und schon bei sehr geringen Sauerstoff-Drucken zu beobachten sein muß. Die Versuche ergeben, daß in allen Lösungsmitteln bereits sehr geringe Sauerstoff-Mengen jedes Nachleuchten der Farbstoffe austilgen.

Der Einfluß des Sauerstoffs ist sehr hübsch zu beobachten in einem Lösungsmittel, welches nur wenig Sauerstoff löst, z. B. im Wasser. Wir durchspülen eine Eosin-Lösung längere Zeit mit sauerstoff-freiem Stickstoff. Durch das Beobachtungsrohr des Phosphoroskopes sehen wir dann ein deutliches Leuchten. Nach Abstellen des Stickstoffs bringen wir etwas Luft in den Gasraum über der Farbstoff-Lösung und schwenken ganz vorsichtig einige Male hin und her. Gleichzeitig verblaßt das Leuchten und ist in wenigen Sekunden vollständig ausgelöscht. Treiben wir jetzt wieder den reinen Stickstoff in raschem Strom durch die Lösung, so erscheint nur sehr allmählich ein Schein, der zunehmend heller wird und erst nach 2 Min. seine volle Helligkeit wieder erreicht. Dieser Versuch läßt sich beliebig oft wiederholen.

Die schwerstwiegende Frage zur Entscheidung, ob der von uns angegebene Mechanismus photo-sensibilisierter Oxydationen, zumindest in den von uns bisher untersuchten Fällen, zutrifft, ist die nach dem Verhalten des Nachleuchtens der Sensibilisatoren gegenüber den Sauerstoff-Acceptoren Thiosinamin und Isoamylamin. Hier liegt die endgültige Entscheidung darüber, ob die Energie vom Farbstoff ausschließlich auf den Sauerstoff oder (wie Gaffron meint) direkt auf den Acceptor übertragen wird. Ist das letztere richtig, dann muß Isoamylamin und auch Thiosinamin das Nachleuchten des Chlorophylls und Hämatoporphyrins auslöschten.

Wir finden nicht den geringsten Einfluß dieser Acceptoren auf das Nachleuchten einer sauerstoff-freien Hämatoporphyrin-Lösung. Weder durch acetonische Thiosinamin-Lösung geringer und hoher Konzentration, noch durch Isoamylamin. Im Gegenteil, in keinem Lösungsmittel ist das rote Nachleuchten bei phosphoroskopischer Betrachtung einer sehr verdünnten, stark belichteten Lösung von Hämatoporphyrin schöner zu sehen als in reinstem, unverdünntem Isoamylamin. Vom Chlorophyll wurde, wie angegeben, ein Nachleuchten bisher überhaupt nur in Isoamylamin beobachtet.

Die Ergebnisse dieser Versuche gehen noch wesentlich über die Feststellung hinaus, daß die sichtbare Fluoreszenz durch die beiden Verbindungen nicht beeinflusst wird; es bedeutet außerordentlich viel mehr, daß auch die angeregten Farbstoff-Moleküle in ihren langlebigen metastabilen Zuständen trotz der wachsenden Wahrscheinlich-

keit wirksamer Zusammenstöße nicht daran denken, ihre Energie auf die Acceptor-Moleküle zu übertragen.

Für die beiden Fälle der Photo-oxydation des Thiosinamins und des Isoamylamins — nach unserer Überzeugung aber noch weit darüber hinaus — ist mit unseren Versuchen der Beweis erbracht, daß auch in Lösungen der primäre Vorgang bei photosensibilisierten Oxydationen in einer durch den Farbstoff sensibilisierten Aktivierung des Sauerstoff-Moleküles durch Überführung in einen metastabilen Zustand besteht. Die Oxydation des Acceptors erfolgt sekundär durch die aktivierten Sauerstoff-Moleküle. Der Mechanismus ist, wie wir sehen, vollkommen derselbe wie in dem eingangs erwähnten heterogenen System, in welchem er zum ersten Male aufgeklärt wurde.

IV. H. Gaffron¹⁷⁾ vertritt eine der unseren entgegenstehende Meinung. Er schließt aus seinen Versuchen, daß es bei der photo-sensibilisierten Oxydation die Acceptoren, also die Thiosinamin- und Isoamylamin-Moleküle, sein müssen, welche die Anregungs-Energie der Farbstoffe übernehmen und dadurch (wie wir es bereits früher für den Sauerstoff fanden) in langlebige Zustände übergehen, während deren sie leicht angreifbar durch den normalen Luft-Sauerstoff sind. Den Hauptgrund für diese Annahme findet er in der weitgehenden Unabhängigkeit der Quanten-Ausbeute vom Sauerstoff-Druck. Er schließt ungefähr so: Die Unabhängigkeit der Quanten-Ausbeute vom Sauerstoff-Druck läßt auf langlebige Quanten-Zustände der Sensibilisator- oder der Acceptor-Moleküle schließen. Nach den Messungen von Gaviola leben angeregte Farbstoff-Moleküle nur etwa 10^{-8} Sek. Deshalb müssen die langlebigen Zustände nicht bei den Farbstoffen, sondern bei den Acceptoren angenommen werden. Die Acceptoren entziehen somit die Energie direkt dem Sensibilisator und nicht der Sauerstoff.

Gaffrons Ansichten sind durch unsere Versuche widerlegt. Seine Versuche enthalten jedoch experimentelle Aussagen, welche unsere Auffassung stützen, weswegen sie im Zusammenhang mit unseren Ergebnissen angeführt werden mögen. Gaffrons Versuche, welche ihn zur Auffassung der Acceptor-Aktivierung führten, sind mit dem von Ch. Moureu, Ch. Dufraisse und P. Dean entdeckten, stark gelb fluoreszierenden Farbstoff Rubren¹⁸⁾ ausgeführt. Die Entdecker beobachteten auch seine photochemische Peroxyd-Bildung. Die Aufnahme des Sauerstoffs im Licht wurde von Gaffron quantitativ in Beziehung zur Anzahl der verbrauchten Quanten unter sehr definierten Bedingungen gemessen.

Eine kurze Untersuchung der Fluorescenz mit Rubren und ihr Verhalten gegenüber Sauerstoff läßt uns die Gaffron'schen Ergebnisse von unseren Gesichtspunkten aus klar überschauen. Verdünnte Rubren-Lösungen fluorescieren sehr hell. Konzentrations-Zunahme bewirkt eine Verminderung der Fluorescenz (Selbst-auslöschung): Bei einer Konzentration von $5 \cdot 10^{-2}$ Mol ist die Fluorescenz nur noch gering. Aus der von Gaffron gefundenen Quanten-Ausbeute 1 bei der Photo-oxydation in dieser konzentrierten Lösung,

¹⁷⁾ H. Gaffron, *Biochem. Ztschr.* **264**, 251 [1933].

¹⁸⁾ *Compt. rend. Acad. Sciences* **182**, 1440 [1926], **183**, 101 [1926]. — Hr. Dufraisse hatte die außerordentliche Liebenswürdigkeit, uns diesen Farbstoff zur Verfügung zu stellen, wofür wir ihm nochmals besonders danken.

bei sehr geringen Sauerstoff-Drucken, kann man schließen, und das hat Gaffron (allerdings ohne einen experimentellen Nachweis) auch getan, daß das Rubren in langlebige metastabile Zustände übergeht. Die von uns am Rubren beobachtete Selbst-auslöschung der Fluoreszenz bei hoher Konzentration beruht demnach auf einem Übergang der primären Anregungs-Zustände der Rubren-Moleküle in sekundäre metastabile Zustände, in gleicher Weise wie wir es bei anderen Sensibilisierungs-Farbstoffen beobachten. Rubren ist aber ein Sensibilisator, welcher sich im Lichte selbst photo-oxydiert und damit gleichzeitig die Rolle des Sauerstoff-Acceptors übernimmt. Das gerade macht den Fall unübersichtlich, und daraus ist auch Gaffrons irrtümliche Schlußweise auf den allgemeinen Mechanismus photo-sensibilisierter Oxydationen erklärlich. Er setzt die metastabilen Molekül-Zustände des Sensibilisators und gleichzeitig Acceptors Rubren in ihrer Wirkung in Parallele mit angenehmen metastabilen Molekül-Zuständen der Acceptoren Thiosinamin und Isoamylamin, anstatt sie den Sensibilisator-Farbstoffen, wie Chlorophyll und Hämatoporphyrin, gleichzusetzen.

Uns interessiert besonders ein Ergebnis seiner Versuche, welches besagt, daß die Quanten-Ausbeute bei hohen Rubren-Konzentrationen (5×10^{-2} Mol) unabhängig vom Sauerstoff-Druck gleich 1 ist, daß dagegen in verd. Lösungen (z. B. 0.5×10^{-2} Mol) die Quanten-Ausbeute geringer und stark vom Sauerstoff-Druck abhängig ist. Er kommt zu dem merkwürdigen Ergebnis, daß in einem mittleren Konzentrations-Bereich die gleiche Wirkung dadurch erzielt wird, daß entweder die Sauerstoff-Konzentration oder die Rubren-Konzentration erhöht wird, wie er sich ausdrückt, daß: „Rubren und Sauerstoff sich in ihrer Wirkung auf die Quanten-Ausbeute vertreten können“.

Die sehr helle Fluoreszenz des Rubrens in verd. Lösungen läßt darauf schließen, daß ein Übergang der primär erregten Moleküle in metastabile Formen nur in sehr beschränktem Maße stattfindet. Demnach muß die Quanten-Ausbeute der photo-sensibilisierten Oxydation in diesem Falle von der direkten Wechselwirkung primär erregter Rubren-Moleküle mit Sauerstoff abhängen, und sie muß deshalb unseres Erachtens auch parallel mit der Fluoreszenz-Tilgung durch Sauerstoff gehen. Unseren Erwartungen entsprechend, finden wir in benzolischen Rubren-Lösungen die Auslöschung der hellen Fluoreszenz durch Sauerstoff selbst im Vergleich zu Hämatoporphyrin- und Chlorophyll-Lösungen ganz besonders ausgeprägt und stark abhängig vom Sauerstoff-Druck. Daraus erklärt sich ohne weiteres Gaffrons Befund, daß bei geringen Rubren-Konzentrationen die Quanten-Ausbeute der Photo-oxydation wesentlich durch den Sauerstoff-Druck bestimmt wird.

Bei hohen Rubren-Konzentrationen ist die Fluoreszenz der Lösung gering. Die primär erregten Farbstoff-Moleküle verwandeln sich im Zusammenwirken mit unerregten Molekülen desselben Farbstoffes in metastabile Zustände, deren Lebensdauer so erheblich ist, daß auch bei sehr geringen Sauerstoff-Konzentrationen die Wahrscheinlichkeit wirksamer Zusammenstöße mit Sauerstoff sehr groß und damit die Quanten-Ausbeute hoch und unabhängig von der Sauerstoff-Konzentration wird.

Gaffron könnte einwenden, daß im Falle der durch Hämatoporphyrin und Chlorophyll sensibilisierten Photo-oxydationen von Thiosinamin eine Zunahme der Sensibilisator-Konzentration nicht, wie bei dem Rubren, erhöhend, sondern erniedrigend auf die Quanten-Ausbeute wirkt. Dieses Absinken der Quanten-Ausbeute läßt sich durch Thiosinamin-Zusatz wieder aufheben.

Wir wissen jetzt mit Sicherheit, daß nicht das Thiosinamin die Energie vom Farbstoff übernimmt; es kann sich also nur um die Frage handeln, warum bei einer Erhöhung der Farbstoff-Konzentration weniger Sauerstoff aktiviert wird. Der große Unterschied der meisten Sensibilisator-Farbstoffe gegenüber dem Rubren besteht darin, daß sie nicht selbst mit dem aktiven Sauerstoff reagieren (Gaffron, loc. cit., S. 258), wohl aber erscheint es durchaus möglich, daß, bei Zusammenstoßen mit ihnen, metastabile Sauerstoff-Moleküle wieder deaktiviert werden können. Zur Erreichung einer hohen Quantenausbeute müßte also soviel Acceptor im Verhältnis zur Farbstoff-Konzentration vorhanden sein, daß der Sauerstoff ein Thiosinamin-Molekül oxydieren kann, bevor er in einem Zusammenstoß mit einem Farbstoff-Molekül seine Anregungs-Energie verliert.

Wir möchten allen denjenigen besonders herzlich danken, die durch ihre bereitwillige Unterstützung unsere Arbeit sehr gefördert haben: Der Notgemeinschaft der Deutschen Wissenschaft, der Gesellschaft der Freunde der Universität Heidelberg und nicht zuletzt der I.-G. Farbenindustrie Leverkusen, Oppau und Ludwigshafen.

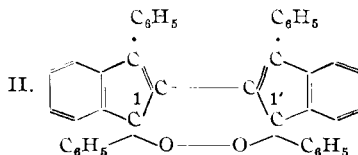
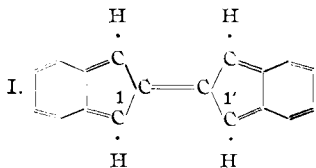
31. A. Schönberg: Über die Diradikal-Formel des Rubrens¹⁾ (Abschließende Antwort an Hrn. Dufraisse).

(Eingegangen am 10. Dezember 1934.)

In seiner jüngsten, gegen mich gerichteten Polemik^{1a)} schreibt Hr. Dufraisse²⁾: „Ich war... auch der einzige, der zeigte aus welchen Gründen die Rubene an zwei Stellen ihrer Moleküle (an den Kohlenstoffen 1 und 1' (oder 3 und 3')) die Eigenschaften freier Radikale besitzen³⁾“.

Auch diese Behauptung des Hrn. Dufraisse entbehrt m. E. schon deswegen jeder Grundlage, da er sich dort ausschließlich mit den Kohlenstoffen 1 und 1' (resp. 3 und 3') bei der Verbindung II beschäftigt; diese ist jedoch nicht ein Ruben- (vergl. I), sondern ein Inden-Derivat.

Im übrigen habe ich meinen früheren Ausführungen nichts hinzuzufügen.



¹⁾ Rubren = 1. 1'. 3. 3'- Tetraphenyl-ruben.

^{1a)} vergl. B. **67**, 1404 [1934]. ²⁾ B. **67**, 2018 [1934].

³⁾ Bull. Soc. chim. France [4] **53**, 837 [1933].