

Zusammenfassung.

Für ein früher als „Isobufalin“ bezeichnetes, bisher nur in Form kristallisierter Derivate isoliertes amorphes Bufogenin aus Ch'an Su wird der Name Resibufogenin vorgeschlagen. – Die Bereitung von reinem, amorphem Resibufogenin aus dem kristallisierten Hydrochlorid wird beschrieben, ebenso der oxydative Abbau von kristallisiertem Resibufogenin-acetat. Die bisherigen Ergebnisse lassen vermuten, dass von den 4 Sauerstoffatomen des Resibufogenins ($C_{24}H_{32}O_4$) zwei im Cumalinring, eines als sekundäre HO-Gruppe und das vierte als Oxydring vorliegen.

Resibufogenin lässt sich in ein kristallisiertes Isomeres umlagern, das von *Kotake* als „Anhydrobufalin“ bezeichnet wurde. Wir schlagen vor, diesen Namen durch Artebufogenin zu ersetzen. Artebufogenin liefert bei der Acetylierung mit Pyridin-Acetanhydrid zwei isomere Acetate A und B, die beide noch den unveränderten Cumalinring enthalten. Das in grösserer Menge gewonnene Acetat A ist wahrscheinlich durch eine Isomerisierung entstanden. Die Abbauresultate deuten darauf hin, dass es eine träge Carbonylgruppe enthält. Die weiteren Sauerstoffatome liegen im Cumalinring und in der Acetoxygruppe vor. Auch das Acetat A scheint somit keine tertiäre HO-Gruppe wie die bisher in ihrer Konstitution aufgeklärten Bufogenine zu enthalten.

Sowohl Resibufogenin wie Artebufogenin zeigten bei intravenöser Infusion an der Katze bis zu Dosen von etwa 5 mg/kg keine Herzwirkung.

Pharmazeutische Anstalt der Universität Basel.

304. Chlorophyll a. Untersuchung der Polarisation des Fluoreszenzlichts zur Ermittlung der Richtungen der Übergangsmomente von Absorptionsbanden

von Robert Stupp und Hans Kuhn.

(11. X. 52.)

Die einzelnen Absorptionsbanden einer Substanz können bekanntlich nicht nur durch Lage und Intensität, sondern im allgemeinen auch durch die Richtung des Übergangsmoments charakterisiert werden, das dem Elektronensprung zuzuordnen ist, der einer solchen Bande zugeschrieben werden kann. Um diese Richtung zu kennzeichnen, denken wir uns die Molekel mit linear polarisiertem Licht, dessen Wellenlänge in den Bereich einer herausgegriffenen Absorptionsbande fällt, bestrahlt. Man findet, dass dieses Licht maximal absorbiert wird, wenn die Molekel so orientiert ist, dass die mit den

Achsen der Moleköl feste Richtung des Übergangsmoments parallel zur Richtung steht, in welcher der elektrische Vektor des Lichts schwingt. Steht umgekehrt die Richtung des Übergangsmoments senkrecht zur Schwingungsrichtung des elektrischen Vektors des Lichts, so tritt keine Absorption durch die betreffende Moleköl auf¹⁾.

Im Falle einfacher gebauter Farbstoffe kann die Richtung des Übergangsmoments einer herausgegriffenen Absorptionsbande, ähnlich wie Lage und Intensität der Bande, theoretisch ermittelt werden²⁾. Im Hinblick auf eine Prüfung der theoretischen Aussagen über die Lichtabsorption von Farbstoffen an der Erfahrung ist es von Interesse, diese Richtung in den untersuchten Fällen auch experimentell zu bestimmen. Dies gilt insbesondere im Falle der Absorptionsbanden von Chlorophyll im Zusammenhang mit Arbeiten³⁾ über die Deutung der Lichtabsorption dieser Substanz.

Das direkteste Verfahren zur Ermittlung der Orientierung der Übergangsmomente von Absorptionsbanden, das erstmals von *W. Kuhn, H. Dührkop & H. Martin*⁴⁾ und später in abgeänderter Form von verschiedenen Autoren⁵⁾ zur Anwendung gebracht wurde, besteht in der Untersuchung des Dichroismus einer Gesamtheit von Molekölern, die eine gewisse Vorzugsorientierung besitzen. In der vorliegenden Arbeit wird zur experimentellen Ermittlung der Richtungen der Übergangsmomente der einzelnen Chlorophyllbanden ein indirektes Verfahren angewandt, welches insbesondere von *F. Perrin*⁶⁾ entwickelt worden ist. Dieses Verfahren beruht auf der Feststellung des Polarisationsgrades des Fluoreszenzlichts, das beim Bestrahlen einer verdünnten Lösung von Chlorophyll mit linear polarisiertem Licht emittiert wird.

¹⁾ Durch obige Betrachtung werden die tatsächlichen Verhältnisse in etwas vereinfachter, nur näherungsweise richtiger Form wiedergegeben. Bei genauerer Betrachtung wäre nämlich zu berücksichtigen, dass die Richtung des Übergangsmoments nicht allein durch den Elektronensprung bestimmt ist, sondern dass die gleichzeitig damit erfolgende Anregung einer Schwingung des Molekölgerüsts für diese Richtung mitbestimmend ist. Da bei Einstrahlung in verschiedenen Bereichen einer Bande sehr verschiedene Schwingungen des Molekölgerüsts angeregt werden, kann auch das Übergangsmoment in den einzelnen Bereichen etwas verschieden orientiert sein, auch wenn die gesamte Bande ein und demselben Elektronensprung angehört. Nach Untersuchungen von *W. Kuhn & R. Landolt* (Helv. **34**, 1900, 1929 (1951)) kann diese Erscheinung in gewissen Fällen (Polyenen) beträchtliches Ausmass besitzen.

²⁾ *H. Kuhn*, J. chem. Phys. **16**, 840 (1948); Helv. **34**, 1308 (1951).

³⁾ *H. Kuhn*, Chimia **4**, 203 (1950), insbes. S. 215ff., *R. Stupp*, Diss. Basel 1952.

⁴⁾ *W. Kuhn, H. Dührkop & H. Martin*, Z. physikal. Ch. (B) **45**, 121 (1939).

⁵⁾ *G. Scheibe, S. Hartwig & R. Müller*, Z. El. Ch. **49**, 372 (1943); *E. H. Land & C. D. West*, Alexander's Colloid Chemistry, Reinhold, New York 1946, Vol. VI, p. 160.

⁶⁾ *F. Perrin*, Ann. Chim. Phys. [10] **12**, 169 (1929). Siehe auch *P. Froehlich*, Z. f. Phys. **35**, 193 (1925); *W. Levshin*, Z. f. Phys. **32**, 307 (1925); *S. I. Vavilov*, Z. f. Phys. **55**, 690 (1929); **58**, 447 (1929); *A. Jablonski*, Z. f. Phys. **96**, 236 (1935); *L. Grisebach*, Z. f. Phys. **101**, 13 (1936), ferner die zusammenfassenden Darstellungen in *P. Pringsheim*, Phosphorescence and Fluorescence, Interscience Publishers, New York 1949; *Th. Förster*, Fluoreszenz organischer Verbindungen, Vandenhoeck & Ruprecht, Göttingen 1951.

A. Prinzip des Verfahrens.

Das Absorptionsspektrum von Chlorophyll weist im Intervall zwischen $360 \text{ m}\mu$ und $680 \text{ m}\mu$ eine Reihe von Banden auf (Fig. 3b, ausgezogener Linienzug). Wird nun eine verdünnte Lösung dieser Substanz mit beispielsweise monochromatischem Licht bestrahlt, dessen Wellenlänge in den Bereich irgendeiner dieser Banden fällt, so tritt eine Fluoreszenz der Lösung auf und man stellt fest, dass die spektrale Zusammensetzung des Fluoreszenzlichts unabhängig von der Wellenlänge des einfallenden Lichts ist (Fig. 3b, gestrichelter Linienzug). Dieses Verhalten, wie es bei fluoreszierenden Farbstoffen allgemein beobachtet wird, ist bekanntlich durch das Schema Fig. 1 zu deuten: bei Erregung mit kürzerwelligem (Fig. 1a) bzw. längerwelligem Licht (Fig. 1b) erfolgt ein Übergang vom Grundzustand in einen energiereicheren bzw. energieärmeren Elektronenanregungszustand. Das System gelangt dann in das unterste Vibrationsniveau des energieärmsten Elektronenanregungszustandes A unter Abgabe der Überschussenergie als thermische Energie an die umgebenden Lösungsmittelmolekülen. Hierauf erfolgt ein Übergang in den Grundzustand G unter Aussendung von Fluoreszenzlicht.

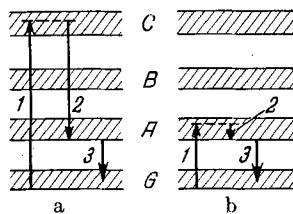


Fig. 1.

Zustandekommen der Fluoreszenz

- a) bei Anregung mit relativ kurzwelligem Licht;
- b) bei Anregung mit relativ langwelligem Licht.

Pfeile 1: Anregung; Übergang des Systems vom Grundzustand G in einen der Elektronenanregungszustände A–C.

Pfeile 2: Strahlungloser Übergang in das unterste Vibrationsniveau des Zustandes A.

Pfeile 3: Übergang nach G unter Aussendung von Fluoreszenzlicht, dessen spektrale Zusammensetzung unabhängig ist von der Wellenlänge des erregenden Lichts.

Bestrahlen wir nun eine verdünnte Lösung von Chlorophyll in einem viskosen Medium mit linear polarisiertem Licht, dessen elektrischer Vektor in der z-Richtung eines rechtwinkligen Koordinatensystems schwingt und beobachten wir das Fluoreszenzlicht, das etwa in der x-Richtung ausgestrahlt wird (Fig. 2a). Man stellt dann fest, dass das Fluoreszenzlicht teilweise polarisiert ist¹⁾. Der Polarisationsgrad

$$p = \frac{I_z - I_y}{I_z + I_y} \quad [I_z(\text{bzw. } I_y) \text{ Intensität des Fluoreszenzlichts, dessen elektrischer Vektor parallel (bzw. senkrecht) zum elektrischen Vektor des einfallenden Lichts schwingt}] \quad (1)$$

¹⁾ Diese Erscheinung wurde erstmals von F. Weigert, Verh. d. Dtsch. Phys. Ges. 23, 100 (1920), an einer Reihe von Farbstofflösungen beobachtet.

ist abhängig von der Wellenlänge des einfallenden Lichts und kann positives oder negatives Vorzeichen besitzen. Aus Vorzeichen und Betrag des Polarisationsgrades p des Fluoreszenzlichts, das bei Erregung mit Licht beobachtet wird, dessen Wellenlänge in den Bereich einer herausgegriffenen Absorptionsbande fällt, können Aussagen über die Orientierung des Übergangsmoments dieser Bande erhalten werden.

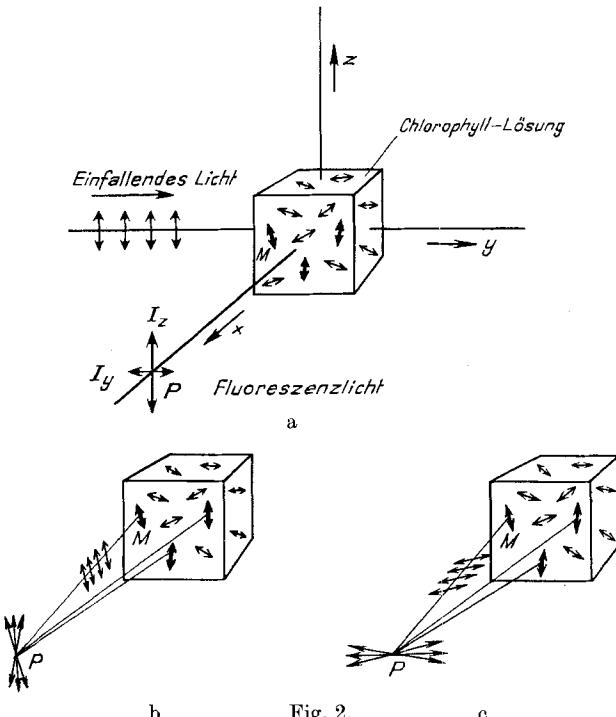


Fig. 2.

- Polarisation des Fluoreszenzlichts bei Erregung mit linear polarisiertem Licht.
- Molekellachsen statistisch orientiert. Anregung vorwiegend jener Molekülen (kräftig angedeutet), bei welchen das Übergangsmoment der Absorptionsbande, in deren Bereich die Wellenlänge des erregenden Lichts fällt, mehr oder weniger parallel zur z -Richtung (Richtung des elektrischen Vektors des einfallenden Lichts) steht.
 - Übergangsmoment der Absorptionsbande, in deren Bereich die Wellenlänge des erregenden Lichts fällt, und Übergangsmoment der Fluoreszenzbande parallel zueinander gerichtet. Das in P beobachtete Fluoreszenzlicht ist teilweise polarisiert. Der elektrische Vektor schwingt vorwiegend in der z -Richtung (Polarisationsgrad p positiv).
 - Übergangsmoment der Absorptionsbande, in deren Bereich die Wellenlänge des erregenden Lichts fällt, und Übergangsmoment der Fluoreszenzbande stehen senkrecht aufeinander. Der elektrische Vektor des Fluoreszenzlichts in P schwingt vorwiegend in der y -Richtung (Polarisationsgrad p negativ).

Das Fluoreszenzlicht ist aus folgenden Gründen teilweise polarisiert:

Die Achsen der Farbstoffmoleküle sind in der Lösung statistisch zueinander orientiert. Bei Erregung mit linear polarisiertem Licht,

dessen Wellenlänge in den Bereich einer bestimmten Absorptionsbande fällt, werden nun aber offenbar diejenigen Moleküle vorwiegend angeregt, bei welchen das Übergangsmoment dieser Bande mehr oder weniger parallel steht zum elektrischen Vektor des einfallenden Lichts (Fig. 2a).

Es sei nun zunächst angenommen, dass das Übergangsmoment der Fluoreszenzbande parallel stehe zum Übergangsmoment der Absorptionsbande, in deren Bereich die Wellenlänge des erregenden Lichts fällt. Der elektrische Vektor des Fluoreszenzlichts, das von einer herausgegriffenen Molekül M (Fig. 2b) in den Beobachtungspunkt P gelangt, schwingt dann, wie in der Fig. angedeutet, senkrecht zur Strahlenrichtung MP und zudem in der Ebene, die durch diese Strahlenrichtung und durch die Richtung des Übergangsmoments der Fluoreszenzbande gegeben ist. Da im betrachteten Fall die Richtung dieses Übergangsmoments mit der Richtung des Übergangsmoments der Absorptionsbande zusammenfällt und da diese Momente gemäss Fig. 2a im Falle der Mehrzahl der angeregten Moleküle mehr oder weniger parallel zur z-Richtung orientiert sind, wird der elektrische Vektor des von der Gesamtheit der angeregten Moleküle beigesteuerten Fluoreszenzlichts im Beobachtungspunkt P ebenfalls vorwiegend in der z-Richtung schwingen. Es wird also $I_z > I_y$ sein, so dass gemäss (1) der Polarisationsgrad p positives Vorzeichen besitzen wird. Die quantitative Untersuchung¹⁾ zeigt, dass im betrachteten Fall $p = \frac{1}{2}$ ist.

Nehmen wir nun umgekehrt an, dass das Übergangsmoment der Fluoreszenzbande senkrecht stehe zum Übergangsmoment der Absorptionsbande, in deren Bereich die Wellenlänge des erregenden Lichts fällt. Der elektrische Vektor des Fluoreszenzlichts, das von M nach P gelangt, schwingt wiederum senkrecht zur Strahlenrichtung MP und zudem in der Ebene, die durch diese Strahlenrichtung und durch die Richtung des Übergangsmoments der Fluoreszenzbande gegeben ist. Wie man durch Vergleich von Fig. 2b und Fig. 2c erkennt, steht die besagte Richtung senkrecht zur Schwingungsrichtung des elektrischen Vektors des im vorhin betrachteten Fall von M nach P gelangenden Fluoreszenzlichts. Im Gegensatz zu jenem Fall wird daher nun der elektrische Vektor des von der Gesamtheit der gelösten Moleküle in P erzeugten Fluoreszenzlichts vorwiegend in der y-Richtung schwingen. Es wird also $I_z < I_y$, der Polarisationsgrad gemäss (1) also negativ sein. Wie die quantitative Betrachtung¹⁾ zeigt, ist $p = -\frac{1}{3}$.

Schliessen die Übergangsmomente der Absorptionsbande, in deren Bereich die Wellenlänge des erregenden Lichts fällt, und der Fluoreszenzbande miteinander den Winkel α ein, so ist der Polarisationsgrad p gegeben durch die Beziehung¹⁾

$$p = p_0 = \frac{3 \cos^2 \alpha - 1}{\cos^2 \alpha + 3} \quad (\text{Brown'sche Bewegung vernachlässigt}), \quad (2)$$

¹⁾ F. Perrin, l. c.

welche in den oben betrachteten Extremfällen $\alpha = 0^\circ$ bzw. $\alpha = 90^\circ$ die angegebenen Werte $p = \frac{1}{2}$ bzw. $p = -\frac{1}{3}$ annimmt.

Diese Beziehung gilt unter der Voraussetzung, dass die angeregten Chlorophyllmoleküle in der Zeit zwischen der Aufnahme der Lichtenergie und der Fluoreszenzstrahlung praktisch keine Schwenkung ihrer Achsen durch *Brown'sche* Bewegung erfahren. Diese Bedingung ist nur bei genügend grosser Viskosität des Lösungsmittels erfüllt.

Bei kleinerer Viskosität des Lösungsmittels findet in der Zeit zwischen Anregung der Moleköl und Emission der Fluoreszenzstrahlung eine teilweise Desorientierung der Achsen der angeregten Moleküle statt. Ist die Zeit Θ , welche eine Moleköl durchschnittlich benötigt, um in der Lösung durch *Brown'sche* Bewegung eine Viertelsumdrehung auszuführen, klein gegenüber der mittleren Lebensdauer τ der Moleköl im angeregten Zustand, so werden die Achsen der Moleküle im Zeitpunkt der Ausstrahlung des Fluoreszenzlichts praktisch genommen statistisch orientiert sein. Das Fluoreszenzlicht wird also unpolarisiert sein, während umgekehrt im Falle $\Theta \gg \tau$ der Polarisationsgrad durch Gleichung (2) gegeben ist. Im Zwischenbereich gilt nach *Perrin*¹⁾ für kugelförmige Teilchen:

$$\frac{1}{p} - \frac{1}{3} = \left(\frac{1}{p_0} - \frac{1}{3} \right) \left(1 + \frac{6\tau}{\Theta} \right) \quad (\text{Brown'sche Bewegung berücksichtigt}), \quad (3)$$

wobei p_0 den durch Gleichung (2) gegebenen Polarisationsgrad darstellt, den das Fluoreszenzlicht bei Abwesenheit von *Brown'scher* Bewegung besitzen würde. Die Orientierungsrelaxationszeit Θ , welche gleich dem reziproken Wert der Rotationsdiffusionskonstante ist, ist in diesem Falle gegeben durch die Beziehung

$$\Theta = \frac{6\eta V}{kT}, \quad (4)$$

wobei η die Viskosität des Lösungsmittels, V das Teilchenvolumen, k die *Boltzmann'sche* Konstante und T die absolute Temperatur darstellt.

Im Falle stark abgeplatteter Rotationsellipsoide ist die Rotationsdiffusionskonstante für Bewegungen um eine senkrecht zur Figurennachse stehende Achse gleich gross wie diejenige für Bewegungen um die Figurennachse¹⁾, und daher ist Gl. (3) für solche Teilchen ebenfalls zulässig. Bei abgeplatteten Rotationsellipsoiden von beliebigem Achsenverhältnis unterscheiden sich diese beiden Rotationsdiffusionskonstanten nur wenig, so dass auch im Falle solcher Teilchen Gl. (3) angenähert zutrifft²⁾.

Für die modellmässige Beschreibung denken wir uns die Chlorophyllmoleköl durch ein abgeplattetes Rotationsellipsoid vom Achsenverhältnis $\frac{1}{4}$ ersetzt. Die Orientierungsrelaxationszeit Θ , welche gleich dem reziproken Wert der mittleren Rotationsdiffusionskonstante gesetzt werden kann, ist dann gegeben durch die Beziehung

$$\Theta = \frac{13\eta V}{kT}. \quad (4a)$$

Die mittlere Lebensdauer τ der Moleküle im angeregten Zustand ist gleich³⁾

$$\tau = Q\tau_{II}, \quad (5)$$

wobei Q die Quantenausbeute der Fluoreszenz ist und τ_{II} die mittlere Lebensdauer darstellt, welche die angeregten Moleküle besitzen würden, wenn keine derselben daran verhindert würde, unter Aussendung von Fluoreszenzlicht in den Grundzustand zurückzu-

¹⁾ *W. Kuhn, H. Kuhn & P. Buchner*, Ergebnisse d. exakt. Naturw. **25**, 1 (1951), insbes. S. 88.

²⁾ Genauere Beziehungen hierüber sind von *F. Perrin*, J. physique **5**, 497 (1934); **7**, 1 (1936), angegeben worden.

³⁾ *F. Perrin*, l. c.

kehren. Diese Beziehung ergibt sich auf Grund folgender Überlegung: von einer Gesamtzahl N angeregter Molekülen gehen in der Zeit dt die Zahl $k_{fl} N dt$ unter Aussendung von Fluoreszenzstrahlung, die Zahl $k_{th} N dt$ unter Verwandlung der Anregungsenergie in thermische Energie in den Grundzustand über. Insgesamt verschwinden also $(k_{fl} + k_{th}) N dt = k N dt$ angeregte Moleküle. k_{fl} und k_{th} sind die Geschwindigkeitskonstanten der beiden Teilzerfallsprozesse, k die Geschwindigkeitskonstante des Gesamtzerfallsprozesses des angeregten Zustandes. Die Quantenausbeute Q der Fluoreszenz ist gleich dem Quotienten aus der Zahl $k_{fl} N dt$ der durch Fluoreszenz desaktivierten durch die Gesamtzahl $k N dt$ der desaktivierten Moleküle, also gleich $Q = k_{fl}/k$. Nun ist bekanntlich die Geschwindigkeitskonstante k_{fl} bzw. k gleich dem reziproken Wert der mittleren Lebensdauer τ_{fl} bzw. τ , so dass sich die Beziehung $Q = \tau/\tau_{fl}$ ergibt, welche mit (5) übereinstimmt.

B. Messergebnisse und deren Disskussion.

In Fig. 3a ist der Polarisationsgrad p des Fluoreszenzlichts von Chlorophyll in Rizinusöl in Abhängigkeit von der Wellenlänge λ des erregenden Lichts dargestellt. Da die Viskosität dieses Lösungsmittels genügend gross ist¹⁾, kann der Einfluss der *Brown'schen* Bewegung auf die Grösse von p vernachlässigt werden. Man erkennt aus der Fig., dass bei Erregung im Bereich der Bande D (Fig. 3b) p negativ ist²⁾, während bei Erregung im Bereich jeder andern Bande positives Vorzeichen von p beobachtet wird. Daraus geht hervor, dass die bekannte Hypothese von *Prins*³⁾, wonach die Banden A, B, C, D und E Vibrationsbanden seien, die ein und demselben Elektronensprung zuzuordnen sind, offenbar unzutreffend ist. *Prins* hat diese Annahme durch die Feststellung begründet, dass die Maxima der fünf Banden nach Durchlaufen ungefähr gleicher Frequenzintervalle aufeinander folgen. Wäre jene Annahme zutreffend, so hätte man zu erwarten, dass die Richtung des Übergangsmoments (welche im wesentlichen durch die Art des Elektronensprungs bestimmt ist und

¹⁾ Die Viskosität η des verwendeten Rizinusöls beträgt bei der Versuchstemperatur $T = 295^\circ\text{K}$ 9,48 poise. Das Molekulargewicht von Chlorophyll a ist gleich 902, und die Dichte wird von eins nicht sehr verschieden sein, so dass das Volumen V einer Molekel ungefähr gleich $902/(6 \cdot 10^{23}) \text{ cm}^3$ oder gleich $1500 \cdot 10^{-24} \text{ cm}^3$ zu setzen sein wird. Durch Einführen der angegebenen Zahlenwerte sowie des Werts $k = 1,38 \cdot 10^{-16} \text{ erg/Grad}$ in Gleichung (4a) ergibt sich die Orientierungsrelaxationszeit Θ zu $4,6 \cdot 10^{-6} \text{ sec}$. Anderseits berechnet sich die Lebensdauer τ_{fl} aus der Oszillatorenstärke der Absorptionsbande A (Fig. 3b), die der Fluoreszenzbande entspricht, zu $8,2 \cdot 10^{-8} \text{ sec}$ (*J. A. Prins*, *Nature* **134**, 457 (1934)). Da die Quantenausbeute höchstens gleich eins, die mittlere Lebensdauer τ nach (5) somit höchstens gleich τ_{fl} sein kann, folgt, dass Θ mindestens 50mal grösser als τ ist. In Wirklichkeit ist τ ungefähr sechsmal kleiner als τ_{fl} (siehe unten S. 2480), so dass Θ als ungefähr 300mal grösser als τ zu betrachten ist, womit auf Grund von Gleichung (3) folgt, dass der Betrag der Grösse $(1/p) - (1/3)$ um nur ungefähr 2% grösser ist als der Betrag $(1/p_0) - (1/3)$, der bei Abwesenheit von *Brown'scher* Bewegung zu erwarten wäre.

²⁾ Die im Maximum der Bande D gefundene stellt die stärkste bisher bei Farbstofflösungen beobachtete negative Polarisierung der Fluoreszenzstrahlung dar.

³⁾ *J. A. Prins*, *Nature* **134**, 457 (1934). Eine ähnliche Vorstellung wurde von *E. I. Rabinowitch*, *Rev. Modern Phys.* **16**, 226 (1944), *Photosynthesis*, Interscience Publishers Inc., New York 1951, Bd. II, Teil 1, S. 630ff, entwickelt, welcher die Auffassung vertritt, dass die Banden C, D und E Vibrationsbanden seien, die ein und demselben Elektronensprung angehörten.

durch Verschiedenheiten des Schwingungszustandes des Molekelerüsts kaum ausschlaggebend beeinflusst wird) im gesamten Bereich der fünf Banden ungefähr konstant sein müsste. Es würde also folgen, dass auch der Polarisationsgrad im Bereich dieser Banden ungefähr denselben Wert besitzen müsste. Da diese Erwartung auch nicht angenähert zutrifft und da insbesondere im Bereich der Bande D der erwähnte Unterschied im Vorzeichen gegenüber den Bereichen der übrigen Banden festzustellen ist, kann geschlossen werden, dass die Bande D und ihre Nachbarbanden C und E offenbar drei verschiedenen Elektronensprüngen zuzuordnen sind.

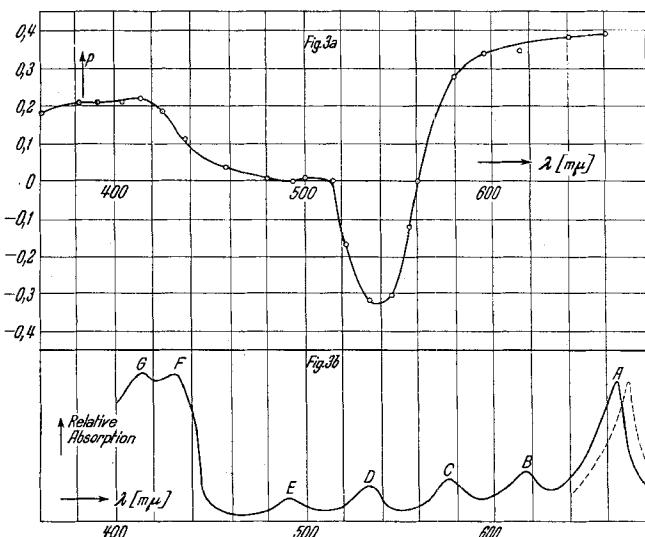


Fig. 3.

Chlorophyll a in Rizinusöl ($\eta = 9,48$ poise).

- Ordinate: Polarisationsgrad p des Fluoreszenzlichts. Abszisse: Wellenlänge λ des einfallenden Lichts.
- Absorptionsspektrum (ausgezogener Linienzug); Fluoreszenzspektrum (gestrichelter Linienzug). Schematisch, Nebenbanden überhöht dargestellt.

Man beachte, dass p zwischen 520 m μ und 560 m μ (im Bereich der Bande D) negatives Vorzeichen besitzt.

Bei der Auswertung von (2) zur Ermittlung des Winkels α zwischen den Richtungen der Übergangsmomente der Fluoreszenzbande und der Absorptionsbande, in deren Bereich die Wellenlänge λ des erregenden Lichts fällt, muss berücksichtigt werden, dass diese Beziehung nur gilt, wenn an der Stelle λ keine Überlagerung von zwei oder mehreren Absorptionsbanden mit verschieden orientierten Übergangsmomenten stattfindet. Diese Voraussetzung ist nur in gewissen Wellenlängenbereichen angenähert erfüllt.

Ist p über den gesamten Bereich einer oder mehrerer Absorptionsbanden angenähert konstant, so ist anzunehmen, dass die Störung durch überlagernde Nachbarabsorptionsgebiete zu vernachlässigen sei und es ist somit eine gewisse Gewähr dafür vorhanden, dass bei Bestrahlung in diesem Bereich praktisch nur die einem ganz bestimmten Elektronensprung zuzuordnende Absorption stattfindet. Aus Fig. 3a entnimmt man, dass diese Bedingung im Bereich der Bande A sowie der Bande G angenähert erfüllt ist.

Im Bereich der Bande A besitzt p ungefähr den Wert 0,4, der nur wenig verschieden ist vom theoretischen Grenzwert $p = 0,5$, welcher im Falle $\alpha = 0$ erwartet wird. Daraus folgt, dass α von Null nicht sehr verschieden ist, dass also die Übergangsmomente der Absorptionsbande A und der Fluoreszenzbande ungefähr parallel zueinander gerichtet sind. Dieses Ergebnis ist zu erwarten, indem die Fluoreszenzbande demselben Elektronenübergang (in umgekehrter Richtung verlaufend) entsprechen wird wie die Absorptionsbande A.

Im Bereich der Bande G besitzt p ungefähr den Wert 0,2, womit sich auf Grund von (2) der Betrag $\alpha = 40^\circ$ ergibt, wobei α den Winkel zwischen der Richtung des Übergangsmoments der Fluoreszenzbande und der Richtung des Übergangsmoments der Absorptionsbande G darstellt.

Es ist allerdings zu bemerken, dass dieses Ergebnis aus den obenstehenden Angaben über die Grösse des Polarisationsgrades p nicht zwingend folgt. Das Auftreten eines Polarisationsgrades $p = 0,2$ im Bereich der Bande G lässt sich auch unter Zugrundelegung der Vorstellung deuten, dass diese Bande das Überlagerungsprodukt von zwei Einzelbanden darstellt, die mit Übergängen vom Grundzustand in zwei verschiedene, energetisch ganz oder nahezu gleichwertige, Anregungszustände verknüpft sind. Nimmt man beispielsweise an, dass das Übergangsmoment, das der einen (bzw. der andern) dieser Teilbanden zugeordnet ist, parallel (bzw. senkrecht) zum Übergangsmoment der Fluoreszenzbande steht, so kann gemäss Abschnitt A je nach der Stärke der einen im Vergleich zur Stärke der andern Teilbande jeder Polarisationsgrad, der zwischen den Extremwerten $\frac{1}{2}$ und $-\frac{1}{2}$ liegt, also auch der beobachtete Wert $p = 0,2$, auftreten.

Die quantitative Betrachtung führt zu der Beziehung

$$p = p_0 = \frac{\frac{1}{2} \frac{Q_{||} f_{||}}{Q_{\perp} f_{\perp}} - \frac{1}{3}}{1 + \frac{Q_{||} f_{||}}{Q_{\perp} f_{\perp}}} \quad (6)$$

Darin ist $f_{||}$ (bzw. f_{\perp}) die Oszillatorenstärke der betrachteten Teilbande, deren Übergangsmoment parallel (bzw. senkrecht) zum Übergangsmoment der Fluoreszenzbande steht, und $Q_{||}$ (bzw. Q_{\perp}) stellt die Quantenausbeute der Fluoreszenz bei Stattfinden des ersten (bzw. des zweiten) der genannten Übergänge dar. Die Beziehung ergibt sich aus folgender Überlegung: Nach dem in Abschnitt A Gesagten ist

$$\frac{I_{z,||} - I_{y,||}}{I_{z,||} + I_{y,||}} = \frac{1}{2} \quad (7) \quad \text{und} \quad \frac{I_{z,\perp} - I_{y,\perp}}{I_{z,\perp} + I_{y,\perp}} = -\frac{1}{3}, \quad (8)$$

wobei $I_{z,||}$ (bzw. $I_{y,||}$) die Intensität des Fluoreszenzlichts darstellt, dessen elektrischer Vektor in der z-Richtung (bzw. der y-Richtung) schwingt und das von den Molekülen beeinflusst wird, die in den ersten der genannten Anregungszustände gebracht worden sind.

$I_{z,\perp}$ und $I_{y,\perp}$ stellen die entsprechenden Anteile dar, die von den Molekülen beigesteuert werden, die in den zweiten der erwähnten Anregungszustände befördert worden sind. Aus (7) und (8) folgt

$$I_{z,\parallel} - I_{y,\parallel} + I_{z,\perp} - I_{y,\perp} = I_z - I_y = \frac{1}{2}(I_{z,\parallel} + I_{y,\parallel}) - \frac{1}{3}(I_{z,\perp} + I_{y,\perp}), \quad (9)$$

wobei I_z und I_y die beiden Komponenten des insgesamt in P beobachteten Fluoreszenzlichts darstellen. Da ferner die Intensität $I_{z,\parallel} + I_{y,\parallel}$ des Fluoreszenzlichts, das von den Molekülen herrührt, die in den ersten der betrachteten Anregungszustände gebracht worden sind, proportional $Q_{\parallel} f_{\parallel}$ und ebenso $I_{z,\perp} + I_{y,\perp}$ proportional $Q_{\perp} f_{\perp}$ ist, wird

$$\frac{I_{z,\parallel} + I_{y,\parallel}}{Q_{\parallel} f_{\parallel}} = \frac{I_{z,\perp} + I_{y,\perp}}{Q_{\perp} f_{\perp}}.$$

Daraus folgt:

$$\frac{I_{z,\parallel} + I_{y,\parallel}}{Q_{\perp} f_{\perp}} = \frac{Q_{\parallel} f_{\parallel}}{Q_{\perp} f_{\perp}} = \frac{(I_z + I_y)}{1 + \frac{Q_{\parallel} f_{\parallel}}{Q_{\perp} f_{\perp}}} = (I_z + I_y) \frac{\frac{Q_{\parallel} f_{\parallel}}{Q_{\perp} f_{\perp}}}{1 + \frac{Q_{\parallel} f_{\parallel}}{Q_{\perp} f_{\perp}}} \quad (10)$$

$$I_{z,\perp} + I_{y,\perp} = (I_z + I_y) \frac{1}{1 + \frac{Q_{\parallel} f_{\parallel}}{Q_{\perp} f_{\perp}}} \quad (11)$$

Durch Einführen von (10) und (11) in (9) ergibt sich wegen (1) sofort die zu begründende Beziehung (6). Im betrachteten Fall $p_0 = 0,2$ wird auf Grund dieser Beziehung

$$\frac{Q_{\parallel} f_{\parallel}}{Q_{\perp} f_{\perp}} = \frac{\frac{1}{3} + p_0}{\frac{1}{2} - p_0} = \frac{\frac{1}{3} + 0,2}{\frac{1}{2} - 0,2} = 1,8. \quad (12)$$

Ist $Q_{\parallel} = Q_{\perp}$, so folgt aus (12), dass die Oszillatorenstärke der Teilbande, deren Übergangsmoment parallel zum Übergangsmoment der Fluoreszenzbande steht, 1,8mal grösser sein muss als die Oszillatorenstärke der andern Teilbande.

Es ist kaum anzunehmen, dass die eben gegebene Deutung die tatsächlich zutreffende Erklärung des Sachverhalts darstellt, da es im betrachteten Fall der unsymmetrisch gebauten Chlorophyllmoleköl unwahrscheinlich ist, dass zwei Banden mit verschiedenen orientierten Übergangsmomenten zusammenfallen. Die oben zuerst gegebene Deutung, wonach die Übergangsmomente der Fluoreszenzbande und der Bande G einen Winkel von etwa 40° einschliessen, stellt daher offenbar die richtige Erklärung des Sachverhalts dar.

Am Orte der Bande D ist p stark von der Wellenlänge λ abhängig (Fig. 3a). Dies deutet darauf hin, dass im Bereich dieser Bande teilweise eine starke Überlagerung durch Nachbarbanden stattfindet. Da jedoch p ungefähr in der Mitte der betrachteten Bande den theoretischen Grenzwert $p = -\frac{1}{3}$ erreicht, darf geschlossen werden, dass an dieser Stelle der störende Einfluss durch die benachbarten Banden zu vernachlässigen sei, indem sich ein solcher Einfluss nur in einer Verkleinerung des Betrages von p äussern könnte. Nach Abschnitt A entspricht dem Wert $p = -\frac{1}{3}$ der Betrag $\alpha = 90^\circ$, d. h. die Richtungen der Übergangsmomente der Fluoreszenzbande und der Absorptionsbande D stehen ungefähr senkrecht aufeinander.

Das Zustandekommen des Wertes $p = -\frac{1}{3}$ im Bereich der Bande D kann offenbar nicht in anderer als in der beschriebenen Weise gedeutet werden. Würden wir wie oben im Falle der Bande G annehmen, dass die Bande D auch bei Ausschalten des störenden Einflusses überlagernder Nachbarbanden noch das Überlagerungsprodukt von zwei Banden mit verschieden orientierten Übergangsmomenten darstelle, so hätte man zu erwarten, dass der Polarisationsgrad des Fluoreszenzlichts stets grösser als $-\frac{1}{3}$ und kleiner als $+\frac{1}{2}$ sei, und es wäre nicht zu verstehen, weshalb p den Extremwert $-\frac{1}{3}$ erreicht. Ebensowenig könnte diese Beobachtung unter Zugrundelegung der Annahme gedeutet werden, dass die Fluoreszenzbande das Überlagerungsprodukt von Teilbanden mit verschieden orientierten Übergangsmomenten darstelle. Aus der erwähnten Beobachtung, dass der Polarisationsgrad im Bereich der Bande D den Extremwert $-\frac{1}{3}$ erreicht, folgt also, dass sowohl die Fluoreszenzbande wie die Bande D je einem ganz bestimmten Elektronensprung, dem eine ganz bestimmte Richtung des Übergangsmoments zugeschrieben werden kann, zuzuordnen ist.

Es ist zu erwähnen, dass die Polarisierung des Fluoreszenzlichts von Chlorophyll in verschiedenen Lösungsmitteln bereits von *Perrin* (l. c.) untersucht worden ist. *Perrin* verwendet ein Gemisch von Chlorophyll a und Chlorophyll b, während in der vorliegenden Arbeit reines Chlorophyll a zur Untersuchung gelangt. Ferner stellte *Perrin* ausschliesslich den Polarisationszustand der Fluoreszenz bei Erregung mit Licht der Wellenlängen 660 $m\mu$, 437 $m\mu$ und 380 $m\mu$ fest und konnte daher eine Umkehr des Vorzeichens des Polarisationsgrades nicht beobachten. Die Ergebnisse der Arbeit von *Perrin* stehen in befriedigender Übereinstimmung mit denjenigen der vorliegenden Untersuchung. Der Polarisationsgrad in Rizinusöl bei Erregung mit Licht der Wellenlänge 660 $m\mu$ bzw. 437 $m\mu$ bzw. 380 $m\mu$ ist nach *Perrin* gleich 0,435 bzw. 0,11 bzw. 0,23, nach der vorliegenden Arbeit gleich 0,40 bzw. 0,115 bzw. 0,22.

Auf Grund der Messungen von *Perrin* hat *Pringsheim*¹⁾ die Schlussfolgerung gezogen, dass Chlorophyll bei allen Wellenlängen des Erregungslichts positives Vorzeichen des Polarisationsgrades der Fluoreszenz aufweise, eine Folgerung, deren Zutreffen durch die vorliegende Untersuchung widerlegt wird.

Analog zu Fig. 3a ist in Fig. 4 bzw. 5 der Polarisationsgrad p im Falle einer Lösung von Chlorophyll a in Vaselinöl bzw. in einer Glycerin-Wasser-Mischung dargestellt. Es ist eine analoge Wellenlängenabhängigkeit von p zu beobachten wie im Falle des Lösungsmittels Rizinusöl (Fig. 3a), und es ist festzustellen, dass der Betrag von p bei gegebener Wellenlänge um so kleiner ist, je geringer die Lösungsmittelviskosität η gewählt wird.

Um die mittlere Lebensdauer τ der angeregten Chlorophyllmoleküle abzuschätzen, betrachten wir beispielsweise den Polarisationsgrad, der bei Erregung mit Licht der Wellenlänge 534 $m\mu$ beobachtet wird. Er besitzt im Falle des Lösungsmittels Vaselinöl den Wert $p = -0,19$, während der bei Abwesenheit von *Brown'scher* Bewegung zu erwartende Polarisationsgrad den Betrag $p_0 = -0,32$ besitzt, wie sich aus der entsprechenden Messung im Falle des Lösungsmittels Rizinusöl (Fig. 3a) ergibt. Durch Einführen dieser beiden Zahlenwerte in (3) folgt der Betrag $\tau/\Theta = 0,1$. Da die Orientierungsrelaxationszeit Θ im betrachteten Lösungsmittel Vaselinöl gemäss Anm. 1, Seite 2475, bei der Versuchstemperatur $T = 295^\circ$ abs. gleich $4,6 \cdot 10^{-6}$ ($\eta_{\text{Vaselinöl}}/\eta_{\text{Rizinusöl}}$) sec oder nach Einführen der Zahlenwerte $\eta_{\text{Vaselinöl}} = 0,311$ und $\eta_{\text{Rizinusöl}} = 9,48$ gleich $1,5 \cdot 10^{-7}$ sec zu setzen

¹⁾ *P. Pringsheim*, Phosphorescence and Fluorescence, Interscience Publishers, New York 1949, S. 381.

ist, folgt der Wert $\tau = 1,5 \cdot 10^{-8}$ sec. Im Falle des Lösungsmittels Glyzerin-Wasser ergibt sich in entsprechender Weise der Betrag $\tau = 1,6 \cdot 10^{-8}$ sec. Da nach Messungen von *Perrin* (l. c.) die Quantenausbeute der Fluoreszenz von Chlorophyll im Lösungsmittel Rizinusöl ungefähr gleich gross ist wie in den betrachteten beiden Lösungsmitteln, folgt, dass auch in Rizinusöl die mittlere Lebensdauer τ ungefähr den Wert $1,5 \cdot 10^{-8}$ sec besitzen wird.

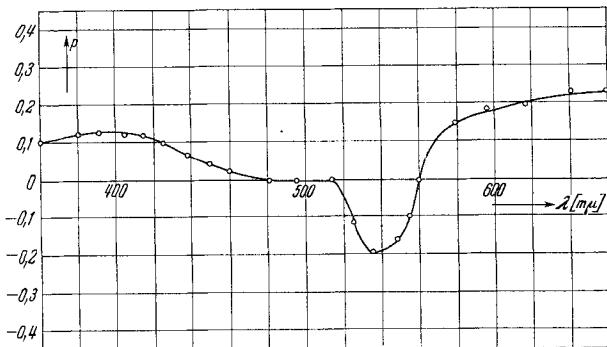


Fig. 4.

Chlorophyll a in Vaselineöl ($\eta = 0,311$ poise). Polarisationsgrad p des Fluoreszenzlichts in Abhängigkeit von der Wellenlänge λ des erregenden Lichts.

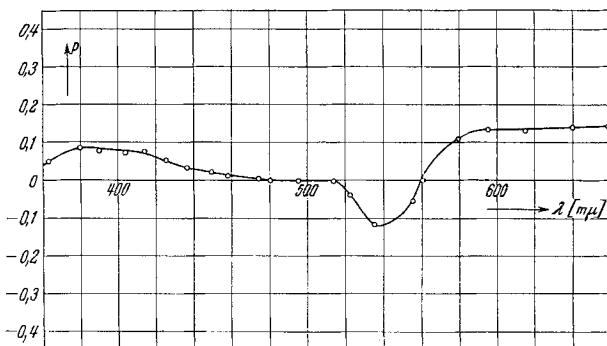


Fig. 5.

Chlorophyll a in einer Mischung von 66% Glycerin und 34% Wasser ($\eta = 0,135$ poise). Polarisationsgrad p des Fluoreszenzlichts in Abhängigkeit von der Wellenlänge λ des erregenden Lichts.

Auf dieses Ergebnis ist oben (Anm. 1, Seite 2475) bereits hingewiesen worden. Der angeführte Wert steht in ungefährer Übereinstimmung mit dem Betrag $\tau = 3 \cdot 10^{-8}$ sec, der von *Perrin* (l. c.) unter Zugrundelegung etwas anderer Annahmen berechnet worden ist.

C. Experimentelles¹⁾.

Messung des Polarisationsgrades p : Die Versuchsanordnung zur Messung von p ist in Fig. 6 angedeutet. Die Lichtquelle Q wird mittels der Linse L_1 auf den Eintrittsspalt S_1 des Prismamonochromators M abgebildet. Das aus dem Austrittsspalt S_2 des Monochromators tretende Licht wird durch ein *Nicol*'sches Prisma N linear polarisiert,

¹⁾ Näheres hierüber siehe *R. Stupp*, Diss. Basel 1952.

derart, dass der elektrische Vektor senkrecht zur Papierebene von Fig. 6 schwingt. Durch die Linse L_2 wird der Austrittsspalt des Monochromators auf die Mittelebene H der Zelle Z , in der sich die zu untersuchende Lösung befindet, abgebildet. Das emittierte Fluoreszenzlicht wird in der Richtung senkrecht zur Strahlenrichtung des Primärlichts und senkrecht zur Schwingungsrichtung des elektrischen Vektors des Primärlichts beobachtet. Ein Komplementärfilter F versperrt etwa noch vorhandenem Streulicht den weiteren Weg. Das Fluoreszenzlicht dagegen durchtritt den Analysator P (ein Polaroidfilter) und wird schliesslich von der Linse L_3 auf die Photoschicht K eines Sekundärelektronenvervielfachers fokussiert.

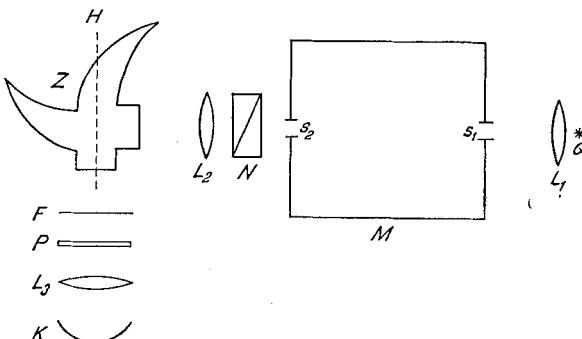


Fig. 6.

Versuchsanordnung zur Messung des Polarisationsgrades p des Fluoreszenzlichts.

Als Lichtquelle dient eine Quecksilberdampflampe¹⁾ (Linienpektrum) sowie eine Punktlampe²⁾ (kontinuierliches Spektrum). Als Zelle Z gelangt ein Rayleigh-Horn zur Anwendung. Da zur Vermeidung des Auftretens einer Konzentrationsdepolarisation eine sehr verdünnte (weniger als 10^{-5} molare³⁾) Lösung von Chlorophyll verwendet werden muss, dient als empfindlicher Lichtdetektor ein Sekundärelektronenvervielfacher⁴⁾, der bei einer angelegten Gleichspannung von 3200 Volt eine Verstärkung des Primärphotostroms um einen Faktor 10^7 bis 10^8 gestattet. Der im Vervielfacher verstärkte Photostrom wird direkt durch den Ausschlag eines Galvanometers gemessen. Da eine Konstanthaltung der am Vervielfacher angelegten Spannung für die Messung dringend notwendig ist, wird als Spannungsquelle ein stabilisiertes Netzgerät verwendet, das bei einer Sekundärspannung von 3200 Volt und bei Entnahme eines Stromes bis zu 2 mAmp einen Stabilisierungsfaktor von 500 aufweist, so dass die praktisch maximal auftretenden Spannungsschwankungen des Lichtnetzes von $\pm 10\%$ zu Schwankungen in der Speisespannung des Vervielfachers von nur $\pm (10/500)\%$ oder weniger als ± 1 Volt führen.

Reindarstellung von Chlorophyll a: Da bei Fluoreszenzmessungen an die Reinheit der verwendeten Produkte ganz besonders hohe Anforderungen gestellt werden müssen, wird zur Reindarstellung von Chlorophyll a eine von *Biermacher*⁵⁾ & *Zscheile*⁶⁾ eingehend ausgearbeitete Methode verwendet, die es gestattet, diese Substanz, in ätherischer Lösung, in optisch reiner Form zu erhalten. Durch Versetzen der Ätherlösung mit

¹⁾ Philora-Lampe HP 300 A (*Philips AG.*, Eindhoven, Holland).

²⁾ 100 c.p. Fixed Focus Pointolite Lamp (*Edison Swan Electric Co.*, London).

³⁾ *Th. Förster*, I. c., S. 178ff.

⁴⁾ SE-Vervielfacher (Institut für technische Physik der ETH. Zürich) mit nachoxydierter Cs-Sb-Photokathode. Diese besitzt eine maximale Empfindlichkeit für Licht der Wellenlänge $550 \text{ m}\mu$, weist aber im Bereich der Fluoreszenzbande von Chlorophyll bei $670 \text{ m}\mu$ noch eine ausreichende Empfindlichkeit auf.

⁵⁾ *O. Biermacher*, Diss. Fribourg 1936.

⁶⁾ *F. P. Zscheile*, Bot. Gaz. **102**, 464 (1943).

dem gleichen Volumen Rizinusöl bzw. Vaselinöl und Abdampfen des Äthers am Vakuum bei Zimmertemperatur unter Schütteln der Mischung, werden die zur Messung des Polarisationsgrades p verwendeten Lösungen von Chlorophyll a in Rizinusöl bzw. Vaselinöl erhalten. Da sich Äther mit Glyzerin nicht mischt, wird zur Herstellung einer Lösung von Chlorophyll a in Glyzerin aus der Ätherlösung zunächst durch Versetzen mit Alkohol und Abdampfen des Äthers am Vakuum eine alkoholische Lösung hergestellt. Die letztere wird dann mit Glyzerin versetzt und vom Alkohol durch Abdampfen am Vakuum befreit.

Herrn Dr. *N. Schaetti* vom Institut für technische Physik der ETH. Zürich sind wir für die Überlassung zweier Sekundärelektronenvervielfacher zu grossem Dank verpflichtet. Ebenso danken wir Herrn Prof. Dr. *E. Baldinger* vom Physikalischen Institut der Universität Basel für die Überlassung des Schaltschemas des Stabilisierungsgerätes, den Herren Dr. *P. Baertschi*, Dr. *K. Meyer* und *B. Abt* für wertvolle Ratschläge beim Bau dieses Geräts und Herrn Dr. *R. Rometsch* von der *CIBA Aktiengesellschaft* Basel für absorptionspektroskopische Messungen im Zusammenhang mit der Reindarstellung von Chlorophyll a. Der Ciba-Stiftung danken wir für finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

Zusammenfassung.

Im Zusammenhang mit Arbeiten über die Deutung der Lichtabsorption von Chlorophyll ergibt sich das Problem der experimentellen Ermittlung der Richtungen der Übergangsmomente der einzelnen Absorptionsbanden dieser Substanz. Um gewisse Aussagen über diese Richtungen zu erhalten, wird der Polarisationsgrad des Fluoreszenzlichts gemessen, das von einer Lösung von Chlorophyll a bei Erregung mit linear polarisiertem Licht (Wellenlänge 360 m μ bis 660 m μ) beobachtet wird. Im Anschluss an Arbeiten von *F. Perrin* lässt sich aus der Grösse dieser Polarisation die gegenseitige Orientierung der Übergangsmomente der Absorptionsbande, in deren Bereich die Wellenlänge des erregenden Lichts fällt, und der Fluoreszenzbande ermitteln.

Es wird festgestellt, dass bei Erregung mit Licht, dessen Wellenlänge zwischen 520 m μ und 560 m μ fällt, negatives Vorzeichen des Polarisationsgrades p des Fluoreszenzlichts auftritt, während bei Erregung mit Licht jeder andern Wellenlänge zwischen 360 m μ und 660 m μ positives Vorzeichen von p beobachtet wird.

Auf Grund dieser Feststellung folgt, dass die von *Prins* aufgestellte Hypothese, wonach die Banden A bis E (Fig. 3b) Vibrationsbanden seien, die zu ein und demselben Elektronensprung gehörten, nicht aufrecht erhalten werden kann. Aus der beobachteten Wellenlängenabhängigkeit von p ergibt sich weiter, dass die Richtung des Übergangsmoments der Fluoreszenzbande und damit der Bande A (Fig. 3b) mit der Richtung des Übergangsmoments der Bande D einen Winkel von ungefähr 90° einschliesst.

Physikalisch-chemische Anstalt der Universität Basel.