

Vorträge der Arbeitstagung
Anwendung physikalisch-chemischer Methoden
zur qualitativen und quantitativen Analyse
sowie zur Aufklärung der Molekülstruktur
vom 16. bis 18. April 1959 in Freiburg i. Br.

1. Molekülspektroskopie

Aus dem Laboratorium für physikalische Chemie
der Technischen Hochschule Stuttgart

**Messung von Fluoreszenzspektren mit Hilfe
von Spektralphotometern und Vergleichsstandards***

Von

E. LIPPERT, W. NÄGELE, I. SEIBOLD-BLANKENSTEIN, U. STAIGER und W. VOSS

Mit 8 Textabbildungen

(Eingegangen am 27. Mai 1959)

Messung und Darstellung von Fluoreszenzspektren

Die Fluoreszenzspektroskopie stellt ebenso wie die anderen Methoden der Molekülspektroskopie ein Hilfsmittel für die analytische Chemie dar. Den analytischen Anwendungen waren bisher enge Grenzen gesetzt durch verschiedene experimentelle Schwierigkeiten, die im Vergleich zur Absorptionsspektroskopie zusätzlich auftreten. Heute ist es aber längst nicht mehr so, daß als Apparat für „die Analyse im filtrierte ultra-violetten Licht“ im wesentlichen nur die sogenannte Analysenlampe zur Verfügung steht. Zu den meisten handelsüblichen Spektralphotometern sind Zusätze erhältlich, mit deren Hilfe Fluoreszenzspektren gemessen werden können.

In der Absorptionsspektroskopie wird die Schwächung der Intensität, die eine monochromatische Strahlung beim Durchgang durch Materie erleidet, durch den Vergleich der Intensität dieses Meßstrahls mit der Intensität eines nicht durch die Substanz geschwächten Vergleichsstrahls

* Teile dieser Arbeit sind vorgetragen worden von E. LIPPERT auf der 55. Hauptversammlung der Deutschen Bunsengesellschaft in Freiburg/Br. 1956, auf dem Colloquium Spectroscopicum Internationale Amsterdam 1956 und auf der Fachgruppentagung Analytische Chemie der Gesellschaft Deutscher Chemiker, Freiburg/Br. 1959.

bestimmt. Das Verhältnis der Intensitäten ist unabhängig davon, ob die Intensitätsmessung etwa energie- oder quanten-proportional erfolgt.

In der Fluoreszenzspektroskopie gibt es zum Meßlicht kein Vergleichslicht, da Erregungs- und Fluoreszenzlicht in verschiedenen Spektralbereichen liegen. Das bedingt, daß Fluoreszenzspektren mit Einzelstrahl- und nicht mit Doppelstrahlgeräten gemessen werden. Die so gewonnenen Spektren sind daher nicht nur durch das Fluoreszenzlicht, sondern auch durch die spektrale Empfindlichkeitsverteilung des Apparates bestimmt. Da man es in der Fluoreszenzspektroskopie mit breiten Banden zu tun hat, kann sich dieser Effekt stark auf die Form der Banden und auf die Lage des Maximums auswirken. (Über den Einfluß auf Raman-Spektren vgl. ^{18,20}.)

Die spektrale Empfindlichkeitsverteilung ist eine Apparatefunktion, die mit Hilfe von spektralen Strahlungsstandards bestimmt und rechnerisch aus den Fluoreszenzspektren eliminiert werden kann. Dieses Verfahren ist jedoch nicht nur umständlich, sondern es kann auch leicht zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Weder die spektrale noch die absolute Empfindlichkeit des Apparates noch die Intensität des Erregungslichtes müssen mit Notwendigkeit zeitlich konstant sein. — Die Intensität der als Strahlungsstandards zur Verfügung stehenden Lampen ist normalerweise sehr viel größer als die Intensität der fluoreszierenden Proben. Die Intensität der Lampe muß daher in geeigneter, vor allem spektral gleichmäßiger Weise so weit geschwächt werden, daß sie innerhalb der linearen Intensitätsanzeige des Apparates gemeinsam mit dem Probenlicht gemessen werden kann.

Zur Behebung dieser und anderer Schwierigkeiten haben wir fluoreszierende Lösungen als Vergleichsstandards ausgewählt und deren Fluoreszenzspektren gemessen. Die Küvetten mit der Probe und mit dem Vergleichsstandard werden (etwa im Küvettengehäuse des Apparates) in gleicher Weise und zweckmäßigerweise unter einem mittleren Einfallswinkel von etwa 30° erregt. Das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten wird unter einem Austrittswinkel von etwa 0° aus demselben Ultrasil-Küvettenfenster als Funktion der Wellenzahl mit Hilfe des Monochromators und Empfängers gemessen. Die genannten Winkel haben sich als vorteilhaft erwiesen zur möglichst weitgehenden Vermeidung von Fehlerquellen durch Reabsorption und verschiedene Konzentrations- und Brechzahl-Effekte⁴. Bei der Verwendung der Vergleichsstandards in der beschriebenen Weise kompensieren sich Lampen- und Empfindlichkeits-Schwankungen in ähnlicher Weise wie in der Absorptionsspektroskopie. Es wird das Verhältnis zweier größenordnungsmäßig gleicher Intensitäten unter den gleichen optischen und elektrischen Bedingungen gemessen.

Fluoreszenzspektren sind das Ergebnis quantenhafter Absorptions- und Emissions-Prozesse zwischen bestimmten Energieniveaus. Es ist daher sinnvoll, Fluoreszenzspektren durch quantenproportionale Verteilungsfunktionen $q(\tilde{\nu})$ über der Wellenzahl darzustellen. $q(\tilde{\nu})$ soll also der Anzahl der in der Zeiteinheit im Wellenzahlenbereich $\tilde{\nu} \dots \tilde{\nu} + d\tilde{\nu}$ emittierten Quanten proportional sein.

Eine absolute Intensitätsskala gewinnt man jedoch erst dann, wenn man die spektrale Quantenverteilung $q(\tilde{\nu})$ auf die Anzahl der absorbierten Quanten normiert. Man erhält die spektrale Quantenausbeute $F_Q(\tilde{\nu})$.

$\int_{\nu=0}^{\infty} F_Q(\tilde{\nu}) d\tilde{\nu} = \eta_Q$ ist die absolute Quantenausbeute der Fluoreszenz, deren Bestimmung also noch zusätzlich erforderlich ist. (Über die Methoden dazu vgl. 4). Wir beschränken uns im folgenden auf die Angabe des Weges zur Bestimmung von $q(\tilde{\nu})$ und zeichnen die Maxima der langwelligeren Absorptionsbande und der Fluoreszenzbande auf gleiche Höhe.

Änderungen von Fluoreszenzintensitäten untersucht man zweckmäßigerweise nicht mit Spektrometern, sondern mit Fluorimetern. Zu den handelsüblichen Spektralphotometern sind Fluorimeterzusätze erhältlich, in denen sich die Probe direkt vor dem Empfänger befindet, während der Monochromator des Apparates als Filter für das Erregungslicht dienen kann.

Wegen der mit der Fluoreszenz konkurrierenden strahlungslosen Desaktivierungsprozesse, die zu bleibenden Veränderungen in der Probe führen können, sollen die Messungen *rasch* erfolgen. Außerdem handelt es sich meist um die Messung *kleiner Intensitäten*, da die Quantenausbeute kleiner als 1 und der erfaßte Raumwinkel des allseitig emittierten Fluoreszenzlichtes gering ist.

Apparatives

Perkin-Elmer Modell 13 U mit Reflexionszusatz

Auf Grund der im vorigen Kapitel genannten Forderungen sind hochempfindliche, rasch registrierende Spektralphotometer, die auf bequeme Weise die Erregung unter etwa 30° und die Messung unter etwa 0° gestatten, für die Messung von Fluoreszenzspektren besonders geeignet. Günstig sind ferner Wechsellicht-Spektralphotometer, wenn der Unterbrecher (etwa eine rotierende Halbkreisscheibe) auf bequeme Weise in den Strahlengang des Erregungslichtes gebracht werden kann.

Als besonders geeignet hat sich das Spektralphotometer Modell 13 U von Perkin-Elmer erwiesen. Bei dem ursprünglichen Gerät Modell 13 handelt es sich um einen IR-Apparat — kenntlich an der auch für die

Fluoreszenzspektroskopie wichtigen Reihenfolge Lichtquelle/Probe/Monochromator/Empfänger — der nach Auswechslung des Thermoelementes gegen einen Sekundärelektronenvervielfacher RCA 1 P 21 sowie durch andere Maßnahmen im UV verwendet werden kann.

Das Blockdiagramm Abb. 1 zeigt die optische Anordnung. Der Apparat registriert das Verhältnis I/I_0 oder die Differenz $I - I_0$ der Fluoreszenzintensitäten der Lösungen in den Küvetten K und K_0 . Durch

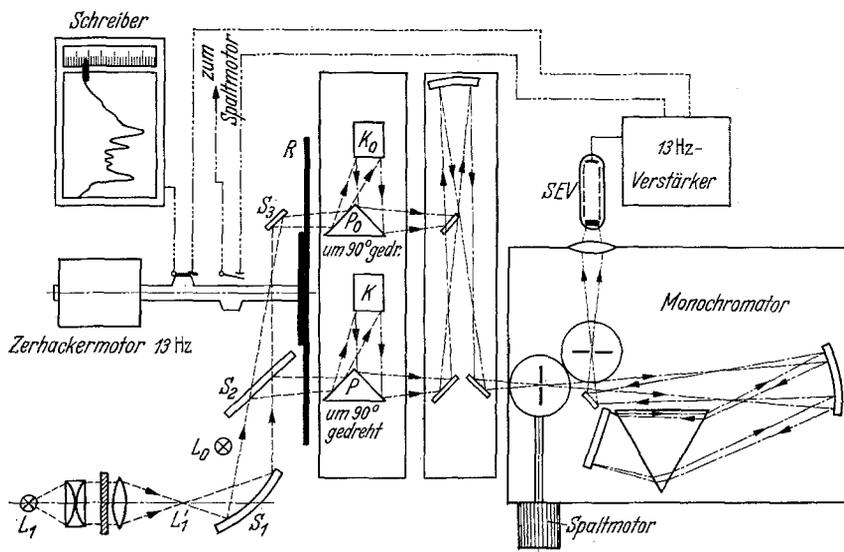


Abb. 1. Block-Diagramm des Perkin-Elmer-Spektralphotometers Modell 13 U, mit Reflexionszusatz, eingerichtet zum Messen von Fluoreszenzspektren nach dem Zweistrahlprinzip: Der Konkavspiegel S_1 ist soweit geschwenkt, daß nicht das Licht von L_0 (der Lichtquelle für Absorptionsmessungen) sondern das gefilterte Erregungslicht von L_1 in den Apparat gelangt. Die Teilung des Lichtbündels erfolgt durch den Planspiegel S_2 , der nur bis zur Höhe der optischen Achse reicht, so daß die obere Hälfte des Lichtbündels nach S_3 gelangt. Die Teilbündel werden durch den rotierenden Sektor R abwechselnd mit 13 Hz unterbrochen und erregen in diesem Takt die Fluoreszenz in den Küvetten K_0 und K , und zwar unter einem mittleren Einfallswinkel von 30° durch die optisch bearbeitete Bodenplatte hindurch. Zu dem Zweck werden die Lichtbündel von den Oberflächen von P_0 und P_1 aus der horizontalen in die vertikale Ebene und umgekehrt umgelenkt. - - - - - Anregungslicht; ———— Fluoreszenzlicht; — · — · — Elektrische Verbindungen

Multiplikation mit der spektralen Quantenverteilung $q_0(\tilde{\nu})$ des Fluoreszenzlichtes des Vergleichsstandards in K_0 erhält man die spektrale Quantenverteilung des Fluoreszenzlichtes der Probe in K ,

$$q(\tilde{\nu}) = q_0(\tilde{\nu}) I/I_0.$$

Im phasengesteuerten Resonanzverstärker wird nur das Wechsellicht von 13 Hz, also nur die Fluoreszenz verstärkt. Eine möglicherweise zusätzlich auftretende Phosphoreszenz wird nicht mitgemessen, da die Abklingzeit der Phosphoreszenz im allgemeinen größer als $1/13$ sec ist.

In gleicher Weise werden alle langsamen Schwankungen des Erregungslichtes und der Empfindlichkeit des Apparates eliminiert. Raschere Schwankungen werden vom Tintenschreiber nicht mehr registriert. Ferner wird durch das Photometerprinzip eine etwaige Fluoreszenz des Küvettenmaterials teilweise kompensiert.

Intensitätseichung

Zur Bestimmung der spektralen Empfindlichkeitsverteilung des Apparates bzw. zur Messung der spektralen Quantenverteilung der Fluoreszenz der Vergleichsstandards standen als spektrale Strahlungsstandards eine Wolframbandlampe und ein UV-Standard zur Verfügung. Der Apparat wurde auf Einzelstrahlbetrieb geschaltet, der Reflexionszusatz entfernt, die Küvette K_0 bei L_1' aufgestellt und schräg von vorn unter einem Einfallswinkel von etwa 30° mit dem Erregungslicht bestrahlt. Nach der Messung des Spektrums $I_0(\tilde{\nu})$ wurde bei L_1' an Stelle der Küvette eine Blende aufgestellt, die von rückwärts mit den Strahlungsstandards bestrahlt wurde, und zwar aus einem so großen Abstand (> 1 m), daß das Spektrum des Standards innerhalb der Linearität der Intensitätsanzeige des Apparates mit der gleichen Einstellung gemessen werden konnte wie $I_0(\tilde{\nu})$.

Der einzige Unterschied in der Messung von Fluoreszenz- und Standard-Licht liegt darin, daß das Licht des Strahlungsstandards nicht den ganzen Öffnungswinkel des Monochromators ausfüllt. Die spektrale Durchlässigkeit der optischen Anordnung hängt aber in bestimmter Weise vom Einfallswinkel auf den Eintrittsspalt ab. Zur Untersuchung des hierdurch bedingten Fehlers wurde das Strahlungsstandard hinter der Blende in allen drei Richtungen des Raumes verschoben und die dabei auftretende Änderung der Registrierkurve beobachtet. — Es zeigt sich, daß die Fehler innerhalb der Meßgenauigkeit liegen, weil Änderungen der spektralen Empfindlichkeitsverteilung erst bei großen Einfallswinkeln auftreten, bei denen die Absolutempfindlichkeit bereits sehr stark abgenommen hat.

Die Wolframbandlampe Type W2 KGV 321 von Philips, Eindhoven, besitzt einen hornförmigen Kolben, um ähnlich wie bei einer Raman-Lampe die Abstrahlung von reflektiertem Licht in Richtung des Meßstrahls zu unterdrücken. Die Lampe ist mit Argon gefüllt, um eine längere Lebensdauer beim Betrieb mit großen Stromstärken zu ermöglichen. Zum gelegentlichen kontrollierenden Vergleich der Eichwerte steht eine evakuierte Lampe gleicher Konstruktion zur Verfügung. Die Temperatur des Bandmaterials ist als Funktion der Stromstärke vom Hersteller gemessen worden. Diese Messungen erfolgten mit dem gleichen Lampengehäuse, das auch bei unseren Messungen verwendet wurde. Das spektrale Emissionsvermögen des für die Herstellung der Lampe

verwendeten Bandmaterials als Funktion der Temperatur ist von DE VOS²² gemessen worden. Dabei handelt es sich um Präzisionsmessungen, die gut mit den Ergebnissen früherer Messungen an Wolfram übereinstimmen. (Die Emissionsspektren lassen sich nicht durch Kurven für bestimmte Farbtemperaturen in befriedigender Weise annähern.) Das Absorptionsspektrum der Quarzfenster ist vor dem Einschmelzen gemessen worden.

Von DE VOS wurde die Größe $E(\lambda)$ tabelliert. Wegen $E(\lambda) d\lambda = E(\tilde{\nu}) d\tilde{\nu} = (hc_0/\lambda) \cdot (-d\lambda/\lambda^2) \sim q(\tilde{\nu}) d\lambda/\lambda^3$ sind die Tabellenwerte mit λ^3 zu multiplizieren, um $q(\tilde{\nu})$ zu erhalten.

Im violetten und ultravioletten Spektralbereich ist die Eichung der Sekundärstandards mit der Wolframbandlampe wegen des starken Intensitätsabfalls nicht mehr hinreichend genau, so daß nur noch der UV-Standard verwendet werden kann. Dieser ist eine Quecksilberlampe besonderer Bauart, also ein Linienstrahler mit Untergrund-Kontinuum.

Für das Verhältnis der Intensitätsmeßwerte $\alpha(\tilde{\nu})$ eines Kontinuumstrahlers (Vergleichsstandard) und α_L eines reinen Linienstrahlers an der Stelle $\tilde{\nu} = \tilde{\nu}_L$ gilt

$$\frac{\alpha(\tilde{\nu})}{\alpha_L} = \frac{q(\tilde{\nu})}{q_L} \cdot \left(\frac{\Delta\tilde{\nu}}{B}\right) B.$$

B und $\Delta\tilde{\nu}$ sind die geometrische und spektrale Breite des Austrittspaltes. Das Verhältnis $B/\Delta\tilde{\nu}$ ist eine Apparatefunktion und heißt die lineare Dispersion. Wir haben $B/\Delta\tilde{\nu}$ im ganzen sichtbaren Spektralbereich gemessen und mit Hilfe einer von VON KEUSSLER⁷ angegebenen Formel ins UV extrapoliert. Die Formel enthält neben der Brechzahl des Prismenmaterials (Kristallquarz) als Funktion der Wellenlänge (die wir durch Interpolation von Literaturwerten⁸ gewonnen haben) nur die Brennweite f der Hohlspiegel, den brechenden Winkel γ des Prismas und den Einfallswinkel e des Parallellichtbündels in das Prisma. Während f und γ genau bekannt sind, haben wir e durch Anpassung der theoretischen Kurve an die Meßpunkte der linearen Dispersion im Sichtbaren bestimmt. Man erkennt aus Abb. 2, daß die Meßpunkte durch die Anpassung dieses einen Parameters gut und ohne erkennbaren systematischen Fehler approximiert werden.

Die Messung der Intensitätsausschläge α_L für die verschiedenen Liniengruppen des UV-Standards erfolgte mit engem Eintritts- und weitem Austrittsspalt. Unter diesen Bedingungen tritt noch kein Fehler durch Beugung am Eintrittsspalt auf und der Apparat registriert statt eines spitzen Dreiecks ein Trapez, dessen Höhe sich genau ausmessen läßt. Die Intensitäten der Liniengruppen sind von RÖSSLER¹⁹ angegeben worden.

Die spektrale Empfindlichkeitsverteilung des Apparates besitzt ein Maximum bei 24000 cm^{-1} und ist bei 16000 und 32500 cm^{-1} auf 10% und bei 15000 und 33500 cm^{-1} auf 1% abgefallen. Im günstigen Überlappungsbereich von 23000 bis 28000 cm^{-1} stimmen die mit den beiden

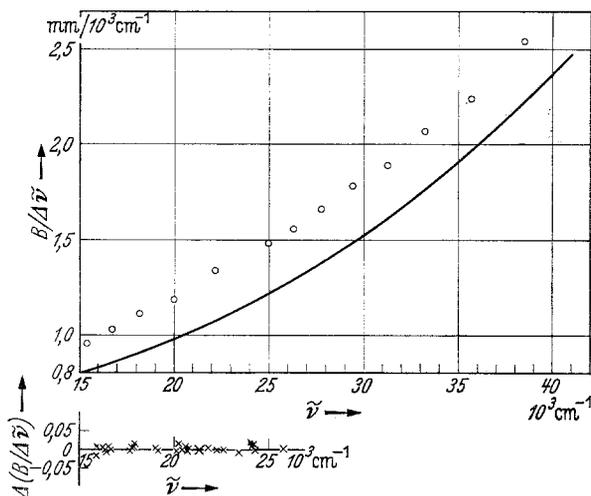


Abb. 2. Lineare Dispersion des Littrow-Monochromators mit Kristallquarzprisma zum Spektralphotometer 13 U. Die Kreuze x sind Meßpunkte, die aus dem mittleren Bildabstand des Eintrittspaltes in der Ebene des Austrittspaltes für Licht eng benachbarter Metalldampf- und Edelgaslinien bestimmt sind. Die Abstände werden mit einem Meßmikroskop gemessen, dessen Skala in Trommelteilen des Austrittspaltes geeicht wird. Ausgezogene Linie: Berechnet nach Gl. (5) von Referenz⁷. Hohlkreise: Berechnet nach Angaben des Perkin-Elmer-Manuals, Vol. 1, Fig. 7

Strahlungsstandards erhaltenen Kurven auf $\pm 5\%$ überein. Dieser Fehler ist im wesentlichen durch die Streuung der Messungen mit dem UV-Standard bedingt.

Spektrometer mit Oscillographenanzeige

Für die Messung der Fluoreszenzspektren stand ferner das schon bei früheren Arbeiten¹³ verwendete Spektrometer von FÖRSTER u. SCHÖN⁵ zur Verfügung, das besonders für Messungen unterhalb 16000 cm^{-1} sowie für die Prüfung der zeitlichen Konstanz der Spektren verwendet wurde. Dabei handelte es sich um einen Apparat mit Prismenmonochromator, Sekundärelektronenvervielfacher, Gleichstromverstärker und Oscillographenanzeige, der die Aufnahme eines Fluoreszenzspektrums innerhalb weniger Sekunden gestattete.

Die Fluoreszenz wird mit zwei Quecksilberdampf-Hochdrucklampen Type Hanau S 81 erregt. Das Erregungslicht trifft die Küvette beiderseits unter einem Winkel von 30° zur Normalenrichtung eines Küvettenfensters. Die Fluoreszenz wird in Richtung dieser Normalen gemessen.

Um photochemische Zersetzungsreaktionen in der Probe hintanzuhalten, können Verschlüsse in die Strahlengänge gebracht werden, die das Erregungslicht nur während der Messungen freigeben.

Der fluoreszierende Bereich der Lösung wird mit einer Quarzglaslinse auf den Eintrittsspalt des Monochromators abgebildet. Der Einfach-Spiegelmonochromator der Fa. Leiss, Berlin, kann wahlweise mit einem Kristallquarz- oder Flintglas-Prisma ausgerüstet werden. Es standen ein rotempfindlicher und ein blauempfindlicher Sekundärelektronenvervielfacher zur Verfügung (Maurer Type Vp 690 A/e und Vp u.v. 690 I).

Meßgenauigkeit

Der relative Fehler der Intensität in den Spektren der Vergleichsstandards dürfte im Sichtbaren 1,5% vom maximalen Intensitätswert der einzelnen Standards betragen. Im IR und UV dürfte er auf 5%

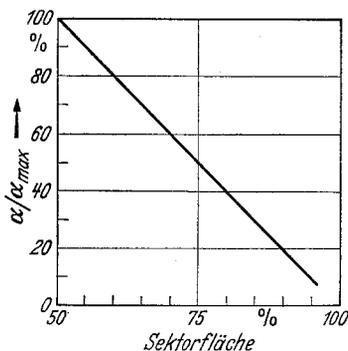


Abb. 3

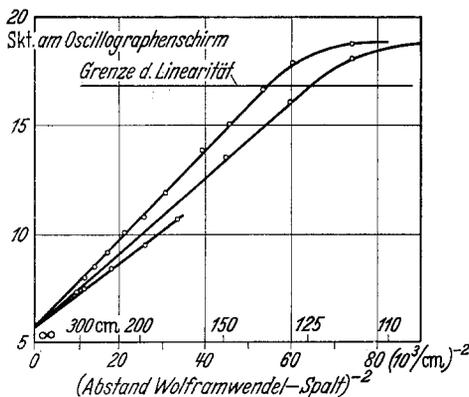


Abb. 4

Abb. 3. Prüfung der Linearität der Intensitätsanzeige des Spektralphotometers 13 U mit Hilfe eines rotierenden Sektors von 200 Hz, bei L_1 (vgl. Abb. 1) in den Strahlengang gebracht, Apparat auf Einzelstrahlbetrieb umgestellt

Abb. 4. Prüfung der Linearität der Intensitätsanzeige des im Text genannten automatischen Spektrometers mit Oszillographenanzeige durch Veränderung des Abstandes zwischen einer Glühlampe und einer am Küvettenort aufgestellten Blende

ansteigen. Im IR beruht der höhere Fehler im wesentlichen auf dem Rauschen des Sekundärelektronenvervielfachers, im UV auf der weniger genauen Eichung mit dem UV-Standard.

Die Linearität der Intensitätsanzeige ist bei beiden verwendeten Apparaten innerhalb bestimmter Meßbereiche mit hinreichender Genauigkeit gegeben (vgl. Abb. 3 u. 4). Die Linearität ist aber nur bei der (für die Eichung der Vergleichsstandards notwendigen) Verwendung von Einzelstrahlgeräten erforderlich und nicht bei der Messung von Fluoreszenzspektren mit Hilfe von Vergleichsstandards in Spektralphotometern, die nach dem „optical-null“-Prinzip arbeiten⁹.

Zusätzliche Fehler können durch ungenügend gefiltertes Erregungslicht auftreten. Abb. 8 (S. 14) zeigt, wie die Intensität der kurzwelligen Schwingungsbande der Anthracen-Fluoreszenz bei 26500 cm^{-1} durch das Licht nicht vollständig ausgefilterter Linien der Erregungslichtquelle (teils Hg-Linien, teils Linien des Grundgases Argon) in ihrer Intensität erhöht werden kann. Als Erregungslichtquellen wurden die Quecksilberhochdrucklampen Hanau S 81 und Osram H QA 500 verwendet. Die Erregungslinien wurden im parallelen Strahlengang von Quarzglas-Doppelkondensoren ausgefiltert. Es wurden folgende Filterkombinationen verwendet:

22,9 kK bzw. $436\text{ m}\mu$: 4 mm GG 3 + 3 mm BG 12 (Schott)

27,4 kK bzw. $366\text{ m}\mu$: 2 mm BG 12 + 2 mm UG 2 (Schott)

31,9 kK bzw. $313\text{ m}\mu$: 2 mm UG 11 (Schott) + K_2CrO_4 -Lösung.

Das Produkt aus Konzentration und Schichtdicke der Lösung von K_2CrO_4 in 0,05 n NaOH wurde auf $2 \cdot 10^{-3}\text{ cm} \cdot \text{Mol/l}$ eingestellt.

Vergleichsstandards

Chemisches. Die für die Herstellung der Vergleichsstandards verwendeten Substanzen und Lösungsmittel wurden wie folgt erhalten und gereinigt:

4-Dimethylamino-4'-nitrostilben wurde dargestellt durch Kondensation von p-Dimethylaminobenzaldehyd mit p-Nitrophenyllessigsäure. Die Reinigung erfolgte durch Umkristallisation aus Alkohol bis zum Schmelzpunkt von 256°C .

m-Dimethylaminonitrobenzol wurde der chemischen Präparatensammlung des Instituts entnommen und durch Umkristallisation aus einem Aceton-Benzolgemisch als orangefarbene Prismen vom Schmelzpunkt $59-60^\circ\text{C}$ erhalten.

3-Aminophthalimid wurde hergestellt durch Verschmelzen von 3-Nitrophthalensäure mit Ammoniumrhodanid bei 170°C . Zur Reinigung wurde das Imid zweimal aus Äthanol bis zum Schmelzpunkt von 260°C umkristallisiert.

Chininsulfat wurde von der Fa. Schuchardt bezogen. Aus dem Salz wurde das Chinin durch verdünnte Ammoniaklösung ausgefällt, im Trockenschrank bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und als Chinin in 0,1 n Schwefelsäure eingewogen.

β -Naphthol wurde als p.a.-Präparat von der Fa. E. Merck bezogen.

Anthracen (Riedel-DeHaën, rein) wurde heiß chromatographisch gereinigt. Als Lösungsmittel wurde p.a. Toluol verwendet. Die Säule war mit Aluminiumoxyd (Fabrikat Woelm, Akt.-Stufe I) gefüllt; der Schmelzpunkt lag bei 214°C .

o-Dichlorbenzol stammte von der Fa. Schuchardt und enthielt keine fluoreszierenden Bestandteile. Es wurde zweimal destilliert.

Benzol, p.a. von der Fa. E. Merck, wurde über Natriumdraht getrocknet und destilliert.

n-Hexan wurde mehrere Stunden mit Chlorsulfonsäure unter Rückflußkühlung gekocht, 3 mal mit 10% iger Natronlauge gewaschen, zuletzt mit Wasser. Es wurde über Natriumsulfat getrocknet und über Natriumdraht rektifiziert.

Weiterhin wurden verwendet: 0,1 n Schwefelsäure der Fa. E. Merck; 0,1 m Standardacetatpuffer der Fa. E. Merck, Methanol p.a.

Fluoreszenzspektren

In der Tabelle sowie in Abb. 5 sind die Vergleichsstandards und deren Fluoreszenzspektren angegeben. Die Fluoreszenzbanden sind breit, nicht strukturiert und überdecken lückenlos etwa den Bereich von

Tabelle. Vergleichsstandards

4-Dimethylamino- 4'-nitrosobifen 10 ⁻³ molar in o-Dichlorbenzol Raumtemperatur	$\bar{\nu}$ 10 ³ cm ⁻¹	q/q_{\max} %	m-Dimethylamino- nitrobenzol 10 ⁻⁴ molar in 30 Vol.-% Benzol, 70 Vol.-% Hexan. Raumtemperatur		3-Aminophthalimid 5 · 10 ⁻⁴ molar in 0,1 n H ₂ SO ₄ Raumtemperatur		Chinin, 10 ⁻³ molar in 0,1 n H ₂ SO ₄ Raumtemperatur		β -Naphthol 2 · 10 ⁻⁴ molar in Standardacetatpuffer (Merck) (0,020 ± 0,001) n						
			$\bar{\nu}$ 10 ³ cm ⁻¹	q/q_{\max} %	$\bar{\nu}$ 10 ³ cm ⁻¹	q/q_{\max} %	$\bar{\nu}$ 10 ³ cm ⁻¹	q/q_{\max} %	20° C	21° C	22° C	23° C	24° C	25° C	
10,5	12,5	12	14	1,5	15	0	18,5	—	—	—	—	—	—		
10,75	18,5	12,25	14,25	3,0	15,25	1,5	18,75	—	—	—	—	—	—		
11	24,5	12,5	14,5	5,0	15,5	3,0	19	6,0	6,0	6,0	6,0	6,5	6,5		
11,25	32,5	12,75	14,75	7,5	15,75	4,5	19,25	7,0	7,0	7,0	7,0	7,5	8,0		
11,5	41,5	13	15	10,0	16	6,0	19,5	8,5	8,5	8,5	9,0	9,0	9,5		
	50,5	13,5	15,5	13,0	7,5	7,5	20	10,0	10,5	10,5	11,0	11,5	12,0		
12	60,0	13,5	15,5	16,0	9,5	9,5	20	12,5	13,0	13,0	13,5	14,0	14,5		
	70,5	20,0	16	19,0	11,5	11,5	20,5	15,5	16,0	16,0	16,5	17,0	17,5		
12,5	80,5	14	16	22,0	17	14,0	20,5	19,0	19,5	19,5	20,0	20,5	21,0		
	89,0	27,5	16,5	25,5	17,25	16,0	21	23,0	23,5	24,0	24,5	25,0	25,5		
13	95,0	14,5	16,5	29,5	17,5	18,0	21	27,5	28,0	28,5	29,5	30,0	30,5		
	98,5	35,5	16,75	33,5	18	20,5	21,5	33,0	33,5	34,0	35,0	35,5	36,5		
13,5	100,0	15	17	38,5	18	24,0	21,5	39,0	39,5	40,0	41,0	42,0	43,0		
	98,0	45,0	17,5	44,0	18,5	28,5	22	45,0	45,5	46,0	47,0	48,0	49,5		
14	94,0	15,5	17,5	50,0	19	34,5	22	51,5	52,0	52,5	53,5	55,0	56,5		
	88,0	55,5	18	56,5	19,5	40,5	22,5	58,0	58,5	59,5	60,5	62,0	63,5		
14,5	81,0	16	18	65,0	19	46,0	22,5	64,5	65,0	66,0	67,5	68,5	70,0		
	72,0	68,0	18,5	73,0	19,5	52,5	23	70,5	71,5	72,5	74,0	75,0	76,5		
15	61,5	16,5	18,5	82,5	19,5	58,5	23	76,0	77,0	78,0	79,5	81,0	82,5		
	51,0	78,0	19	90,0	20	65,0	23,5	81,0	82,0	83,0	84,5	86,0	87,5		
15,5	41,0	17	19	95,0	20	71,5	23,5	84,5	85,5	86,5	88,0	89,5	91,0		
	32,0	87,0	19,5	98,5	20	78,5	23,5	86,5	87,5	88,5	90,0	91,5	93,0		

(Fortsetzung)

16	24,0	17,5	91,5	19,5	100,0	20,5	84,5	24	86,5	87,5	89,0	90,0	91,5	93,0
	17,5		95,0		98,5	90,0			85,5	86,5	87,0	88,5	90,0	91,5
16,5	13,0	18	97,5	20	94,5	21	95,0	24,5	82,5	83,5	84,5	86,0	87,5	89,0
	9,0		99,5		87,5	98,5			79,0	79,5	80,5	82,0	83,0	84,0
17	6,0	18,5	99,5	20,5	77,5	21,5	100,0	25	75,0	75,5	76,0	77,0	78,0	79,0
	4,0		97,5		66,0	99,5			70,0	70,5	71,0	72,0	73,0	74,0
17,5	2,5	19	93,5	21	53,0	22	98,0	25,5	66,0	66,5	67,0	68,0	69,0	69,5
	2,0		87,0		39,5	94,5			62,5	62,5	63,0	64,0	65,0	65,5
18	1,5	19,5	80,0	21,5	28,0	22,5	89,0	26	60,5	61,0	61,0	62,0	62,5	63,0
			71,5		17,5		82,5		60,5	61,0	61,0	62,0	62,5	62,5
Max.		20	61,0	22	11,0	23	74,0	26,5	63,0	63,0	63,5	64,0	64,5	65,0
13,5	100,0	20,5	51,0	22,5	6,0	23,5	65,5		67,5	67,5	67,5	68,5	69,0	69,5
			41,5		3,0		55,5	27	73,0	73,0	73,0	74,0	74,5	75,0
		21	32,5	23	1,5	24	46,0	27,5	79,5	79,5	79,5	80,5	81,0	81,0
			23,5		1,0		37,5		87,0	87,0	87,0	87,5	87,5	87,5
		21,5	16,0	Max.		24,5	29,5	28	93,0	93,0	93,0	93,5	93,5	94,5
			10,5	19,5			21,0		98,0	98,0	98,0	98,0	98,0	98,5
		22	6,0		100,0	25	15,0	28,5	100,0	100	100,0	100	100,0	100,0
			3,0			25,5	10,5		98,0	98,0	98,0	98,0	98,0	98,0
		22,5	2,0				6,5		93,0	93,0	93,0	93,0	93,0	93,0
			1,5			26	4,0	29	86,0	86,0	86,0	86,0	86,0	86,0
		Max.				Max.	2,5	29,5	76,0	76,0	76,0	76,0	76,0	76,0
		18,4	100,0			21,6	1,0	30	60,5	60,5	60,5	60,5	60,5	60,5
								30,5	42,0	42,0	42,0	42,0	42,0	42,0
							100,0		22,0	22,0	22,0	22,0	22,0	22,0
									9,0	9,0	9,0	9,0	9,0	9,0
								Max. 1						
								23,9	87,0	88,0	89,0	90,5	92,0	93,5
								Max. 2	100	100	100	100	100	100
								28,2						

10000 bis 30000 cm^{-1} . Mit Ausnahme des β -Naphthols überschneiden sich die langwellige Absorptionsbande und die (mit dem Maximum auf gleiche Höhe gezeichnete) Fluoreszenzbande bei Werten $q < 10\%$. Die Reabsorption des Fluoreszenzlichtes führt deshalb bei geringen Änderungen der Geometrie der optischen Anordnung zu keiner Änderung des äußeren Fluoreszenzspektrums.

Die große Stokessche Rotverschiebung der Fluoreszenz beruht in allen Fällen auf dem Franck-Condon-Prinzip, das in verallgemeinerter Form besagt, daß die Lage und der Bewegungszustand der Atomkerne

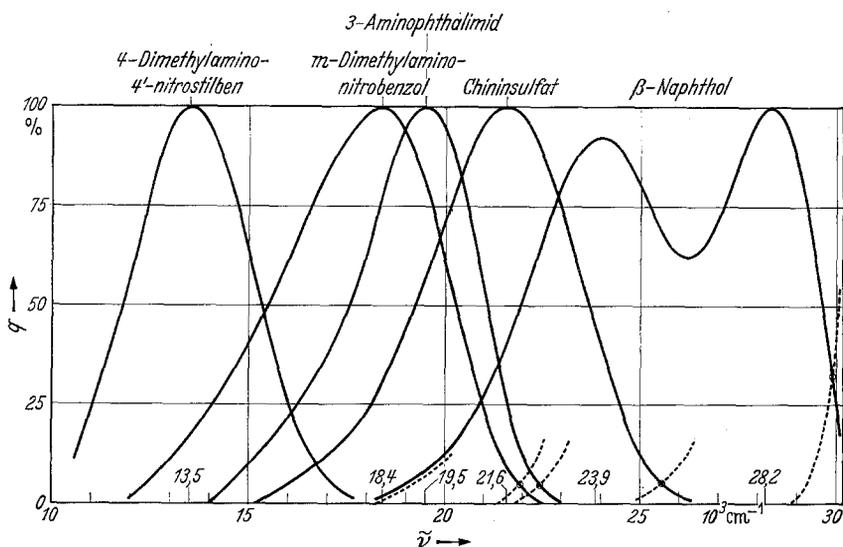


Abb. 5. Fluoreszenzspektren der Vergleichsstandards aus Tab. 1, gemessen in Richtung der Normalen eines Quarzglas-Küvettenfensters, erregt unter einem mittleren Einfallswinkel von 30° zu dieser Normalen mit dem Licht der Hg-Linien bei 366 $\text{m}\mu$ bzw. 27400 cm^{-1} , ausgenommen β -Naphthol mit 313 $\text{m}\mu$ bzw. 32000 cm^{-1} . Aufgetragen ist die relative spektrale Quantenverteilung q (in Prozenten) als Funktion der Wellenzahl $\tilde{\nu}$ (in 1000 cm^{-1}). Auf der Abszisse sind die Wellenzahlen der Fluoreszenzmaxima angegeben. Die gestrichelten Linien stellen die langwelligen Ausläufer der Absorptionsspektren dar und markieren den Schnittpunkt mit dem Fluoreszenzspektrum für den Fall, daß das Fluoreszenzmaximum mit dem Absorptionsmaximum auf gleiche Höhe gezeichnet wird

eines Systems während eines Elektronenübergangs erhalten bleiben. In der Zeit zwischen der Absorption und der Emission stellt sich jedoch eine neue Kernkonfiguration ein, die in den hier vorliegenden Fällen von der ursprünglichen stark verschieden ist (Dipol-Dipol-Orientierung¹², Photodissoziation³ usw.).

Beim β -Naphthol ist der neue Gleichgewichtszustand bis zur Emission des Fluoreszenzlichtes noch nicht vollständig erreicht. Mit zunehmender Pufferkonzentration und mit zunehmender Temperatur nimmt die Konzentration des Naphtholations und damit die Intensität der zugehörigen

Fluoreszenzbande bei 23900 cm^{-1} zu. Deshalb ist das Fluoreszenzspektrum der β -Naphthollösung in der Tabelle für verschiedene Temperaturen angegeben. Zwischen diesen Werten kann linear interpoliert werden (Abb. 6, 7).

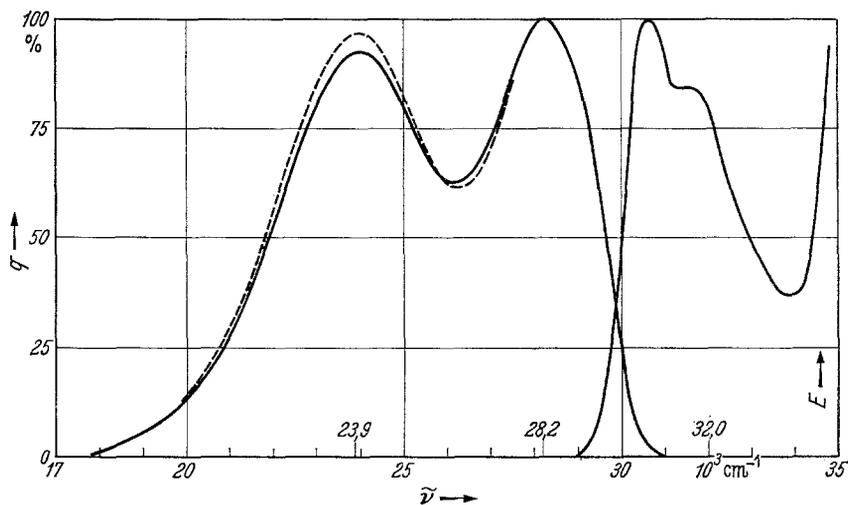


Abb. 6. Der Einfluß der Acetatpufferkonzentration auf das Fluoreszenzspektrum von β -Naphthol bei $24,3^\circ\text{ C}$. Ausgezogene Linie $0,020\text{ n}$, fällt innerhalb der Meßgenauigkeit mit $0,021\text{ n}$ zusammen. Gestrichelte Linie $0,022\text{ n}$

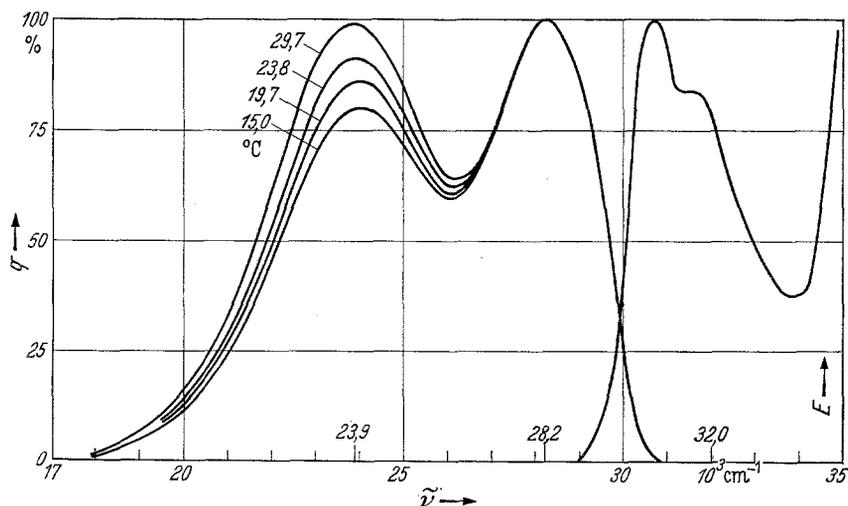


Abb. 7. Temperaturabhängigkeit des Fluoreszenzspektrums von β -Naphthol in $0,02\text{ n}$ Standardacetatpuffer

Bis auf die Acetatpufferkonzentration, die auf 5% richtig sein muß, sind bei allen anderen Konzentrationsangaben Fehler von $\pm 10\%$ ohne Einfluß auf die spektrale Quantenverteilung der Fluoreszenz. Es ändert

sich lediglich die Gesamtintensität der Fluoreszenz, und zwar proportional mit der Konzentration der fluoreszierenden Komponente. Eine Konzentrationslöschung tritt in keinem Fall in Erscheinung. Ebenso

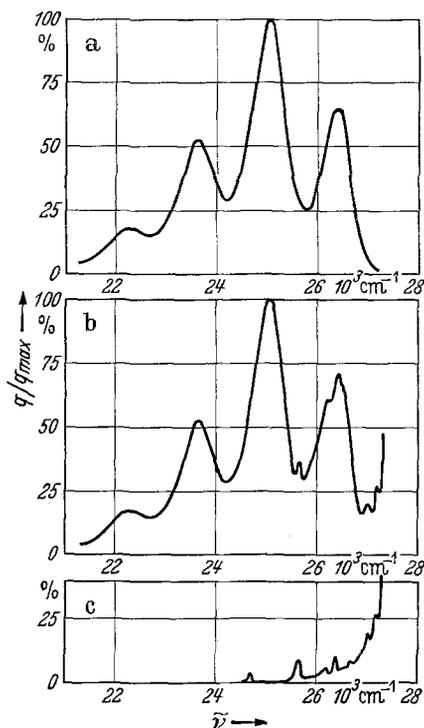


Abb. 8. Fluoreszenzspektrum einer $4 \cdot 10^{-5}$ m Lösung von Anthracen in Methanol, *a* erregt mit $313 \text{ m}\mu$, *b* erregt mit $366 \text{ m}\mu$. Kurve *c* ist unter den gleichen Bedingungen wie *b* erhalten, jedoch mit reinem Methanol statt der Lösung in der Kuvette; *c* stellt daher den Anteil des gestreuten, nicht vollständig ausgefilterten Lichtes der Erregungslichtquelle HQA 500 dar, um den *b* gegenüber *a* verfälscht ist

führt eine längere Bestrahlung der Lösung des 4-Dimethylamino-4'-nitrostilbens zwar zu einer allmählichen geringfügigen Abnahme der Intensität, aber nicht zu einer Änderung der spektralen Quantenverteilung der Fluoreszenz. In allen anderen Fällen wird überhaupt keine zeitliche Änderung der Fluoreszenz beobachtet.

Ein Vergleich mit den Ergebnissen anderer Autoren ist nur beim Chininsulfat möglich. Das in dieser Arbeit angegebene Spektrum stimmt innerhalb der Fehlergrenze von $1,5\%$ der Maximalintensität mit dem von KORTUM u. HESS⁹ angegebenen überein. Diese beiden Spektren liegen zwischen denjenigen, die wir vor einigen Jahren bei unseren ersten Messungen erhalten hatten^{1,14} und bei denen wir noch eine Fehlergrenze von $\pm 5\%$ bzw. $\pm 2\%$ zulassen mußten. Die Reproduzierbarkeit ist besser als 1% .

Für die Prüfung und zum Vergleich der Arbeitsweise von Fluoreszenzspektrometern wird gelegentlich auch das Anthracen-Spektrum angegeben^{4,9}. Abb. 8a zeigt die spektrale Quantenverteilung der Anthracen-

Absolutintensitäten

Zur Aufstellung einer allgemeinen Intensitätsskala kann man die Spektren der Vergleichsstandards aneinander anschließen. Der Anschluß erfolgt mit Hilfe der Schnittpunkte der Registrierkurven.

Die Wellenzahl des Schnittpunktes der Fluoreszenzspektren zweier Vergleichsstandards hängt trotz gleichbleibender Einstellung des Apparates

von der optischen Anordnung sowie in zum Teil sehr empfindlicher Weise von der Zusammensetzung und der Temperatur der Probe ab. Einige Effekte, die hierbei eine Rolle spielen, werden im folgenden aufgeführt. Diese Darlegungen sollen verdeutlichen, daß der Vergleich der Fluoreszenzintensität verschiedenartiger Proben mit Hilfe spektroskopischer Intensitätsmessungen im allgemeinen nur mit wesentlich geringerer Genauigkeit möglich ist als die Messung der spektralen Quantenverteilung. Da die sogenannten „absoluten Intensitätsskalen“ Apparatfunktionen sind, sollten vergleichende fluoreszenzspektroskopische Intensitätsmessungen stets an der gleichen Apparatur und unter peinlicher Konstanthaltung der Meßbedingungen erfolgen. Die Genauigkeit läßt sich wesentlich erhöhen, wenn der Apparat zu diesem Zweck als Fluorimeter betrieben wird (s. o.).

Einfluß der Bandenform

Die Quantenausbeute ist das Verhältnis der Anzahl der emittierten und absorbierten Quanten. Die relative Gesamtintensität ist daher auf die Extinktion des Erregungslichtes zu beziehen. Im Grenzfall geringer Extinktion und geringer Schichtdicke nimmt die Fluoreszenzintensität proportional mit dem Extinktionskoeffizienten zu. Im Grenzfall starker Absorption ist die Fluoreszenzintensität von ϵ unabhängig. Das tatsächliche Verhalten der Lösungen liegt zwischen diesen Grenzfällen. Die rechnerische Korrektur ist im allgemeinen schwierig. Die ständige Verwendung von hinreichend dünnen Küvetten ist daher wünschenswert aber umständlich⁴. Änderungen in der Konzentration oder Temperatur der Probe können das Absorptionsspektrum und damit die Extinktion des Erregungslichtes ändern. Wenn die Erregungslinie in eine Bandenflanke trifft, können geringe Verschiebungen der Bande große Änderungen der Fluoreszenzintensität bewirken.

Die Quantenausbeute ist der Gesamtintensität und nicht der Maximalintensität des Fluoreszenzspektrums einer Probe proportional. Zum Intensitätsvergleich sind daher nicht die Höhen der Banden, sondern die Flächen unter den Banden zu bestimmen. Die Bandenflanken können durch Streulicht überlagert werden.

Das Fluoreszenzspektrum wird durch das Absorptionsspektrum teilweise überdeckt. Das Fluoreszenzlicht wird deshalb teilweise in der Probe reabsorbiert. Wenn man innere relative spektrale Quantenausbeuten vergleichen will, muß man die Reabsorption rechnerisch eliminieren⁴. Das reabsorbierte Licht bedingt eine Sekundärfluoreszenz, deren Einfluß gleichfalls rechnerisch eliminiert werden kann².

Zur Messung der inneren Quantenausbeute in verdünnten Lösungen sollte auf die Konzentration Null extrapoliert werden. Dadurch wird die Wechselwirkung zwischen den gelösten Molekülen eliminiert. Die

Extrapolation ist überdies bei der Anwendung des Beerschen Gesetzes und bei endlicher Spaltbreite grundsätzlich erforderlich¹⁷. Die Extrapolation dürfte am besten in einem $(\int q(\tilde{\nu}) d\tilde{\nu}/c; c)$ -Diagramm erfolgen.

Einfluß der Brechzahl

Von dem in der Lösung emittierten Fluoreszenzlicht tritt nur ein Teil in den Spalt des Monochromators. Durch die abbildende Optik ist der Raumwinkel sowohl außerhalb der Küvette als auch noch im Küvettenfenster festgelegt, in den das Fluoreszenzlicht eintreten muß, damit es in die Meßapparatur gelangt. Der Raumwinkel in der Lösung hängt daher von der Brechzahl der Lösung ab. Je größer die Brechzahl, desto größer ist der Öffnungswinkel. Die gemessenen Fluoreszenzintensitäten in verschiedenen Lösungsmitteln sind proportional dem Quadrat dieser Brechzahlen. — Hierzu treten noch andere Fehler, die durch die Abhängigkeit der optischen Abbildung von der Brechzahl bedingt sind. Die entsprechenden Korrekturfaktoren sind gleichfalls von der Größenordnung 1.

Die Reflexionsverluste an der Grenzfläche Luft/Küvettenfenster sind durch die optische Anordnung des Apparates bedingt. Das gilt aber nicht für die Reflexionsverluste an der Grenzfläche Lösung/Küvettenfenster. Hierfür soll im folgenden eine nützliche Abschätzung gegeben werden.

Für das Amplitudenverhältnis von auffallendem zu reflektiertem Licht gilt nach SOMMERFELD²¹

$$R_{p,s} = \frac{n-1}{n+1} (1 \pm \alpha^2/n). \quad (1)$$

Das positive und das negative Vorzeichen gelten für den parallel (p) bzw. senkrecht (s) zur Einfallsebene polarisierten Strahl. Für das erregende Licht ist n die Brechungszahl für den Übergang vom Glas in die Lösung, beim Fluoreszenzlicht ist das Umgekehrte der Fall; α ist stets der Einfallswinkel. Gl. (1) ist eine Näherung zweiten Grades der Fresnelschen Formeln für schräge Incidenz in bezug auf α . In den Fresnelschen Formeln ist $\sin(\alpha \pm \beta) = \alpha \pm \beta - (\alpha \pm \beta)^3/3!$ gesetzt worden. Für $\alpha \pm \beta = 1$ beträgt das nächste Glied in dieser Entwicklung, nämlich $(\alpha \pm \beta)^5/5!$ nur 2⁰/₀ des vorhergehenden. Gl. (1) ist eine gute Näherung für Einfallswinkel, die kleiner oder etwa gleich 40° sind. An der betrachteten Grenzfläche treten aber Strahlen mit einem größeren Einfallswinkel nicht oder nur in sehr geringem Maße auf. Das Erregungslicht wird ja an der Phasengrenze Luft/Glas zum Einfallslot hin gebrochen.

An der Grenzfläche Lösung/Glas ändert sich die Brechzahl um weniger als etwa 10⁰/₀. Aus Gl. (1) folgt näherungsweise

$$R_{p,s} = (n - 1) (1 \pm \alpha^2)/2. \quad (2)$$

Die reflektierten Intensitäten verhalten sich wie die Amplitudenquadrate,

$$R_{p,s}^2 = (n - 1)^2 (1 \pm \alpha^2)^2 / 4. \quad (3)$$

In Gl. (3) ist es nicht von Belang, ob n die Brechzahl für den Übergang Glas/Lösung oder Lösung/Glas bedeuten soll. Mit $n = 1 \pm 0,1$ und $\alpha = 2/3$, das sind etwa 40° , ist

$$R_p^2 = 0,01 (1 + 4/9)^2 / 4 = 0,005, \quad (4)$$

$$R_s^2 = 0,01 (1 - 4/9)^2 / 4 = 0,001. \quad (5)$$

Der Fehler durch Änderung der Reflexionsverluste ist also immer kleiner als 1% . Dieser Einfluß auf die Genauigkeit der Intensitätsmessungen kann vernachlässigt werden.

Die Brechzahl beeinflusst neben der äußeren auch die innere spektrale Quantenausbeute⁴, und zwar sowohl durch den Faktor des inneren Feldes als auch unmittelbar durch die Änderung der Elektronenstruktur und der Übergangsmomente.

Mit der Brechzahl des Lösungsmittels ändert sich die Amplitude und die Fortpflanzungsgeschwindigkeit des Lichtes in der Lösung. Damit ändern sich auch die Wahrscheinlichkeiten für den Absorptions- und Emissions-Prozeß. Diese nur von der Brechzahl des Lösungsmittels abhängigen Korrekturfaktoren¹⁶ werden als „Faktor des inneren Feldes“ bezeichnet. Sie sind von der Größenordnung 1. Für den Absorptionsprozeß beispielsweise weicht der nach der Theorie von ONSAGER¹⁵ berechnete Faktor um weniger als 4% von 1 ab, wenn die Brechzahl zwischen 1 und 1,7 liegt¹¹. Diese Bedingung ist hier stets erfüllt.

Die Änderung des Übergangsmomentes ist durch das Reaktionsfeld bedingt, das vom umgebenden Dielektrikum am Ort des angeregten Moleküls induziert wird und dessen Größe von der Brechzahl des Lösungsmittels abhängt (vgl. 4). Dieser Effekt ist aber bereits Gegenstand von Untersuchungen in der Fluoreszenzspektroskopie und nicht Gegenstand der Meßtechnik. Es sei aber darauf hingewiesen, daß beim Vergleich von Absorptions- und Emissionsspektren streng genommen nicht die Funktionen $\varepsilon(\tilde{\nu})$ und $q(\tilde{\nu})$, sondern die daraus zu berechnenden Übergangsmomente oder Oscillatorstärken gegenüberzustellen sind⁴.

Zusammenfassung

Die Banden in den Fluoreszenzspektren von Lösungen organischer Verbindungen sind meist schwach und breit und gelegentlich eine Funktion der Bestrahlungsdauer durch das Erregungslicht. Zur Messung von Fluoreszenzspektren sind daher rasch registrierende, hochempfindliche lichtelektrische Spektrometer besonders geeignet. Die Gesichtspunkte werden dargelegt, die bei der Verwendung handelsüblicher UV-Spektralphotometer in der Fluoreszenzspektroskopie zu beachten sind.

Es werden fluoreszierende Lösungen ausgewählt, die als sekundäre Strahlungsstandards dienen und deren Fluoreszenzspektren gemeinsam mit denen der Proben gemessen werden. Auf diese Weise wird der Meßvorgang vereinfacht und einige Fehlerquellen werden eliminiert, die in der Fluoreszenzspektroskopie im Vergleich zur Absorptionsspektroskopie zusätzlich auftreten.

Wir danken Herrn Prof. Dr. Th. FÖRSTER herzlich für viele wertvolle Hinweise und Diskussionen, und der Deutschen Forschungsgemeinschaft ebenso wie dem Fonds der Chemischen Industrie für großzügige Beihilfen.

Literatur

- ¹ BLANKENSTEIN, I.: Diplomarbeit, Stuttgart 1955. — ² BODÓ, A., I. KETSKE-MÉTY: Acta physica Acad. Sci. hung. **7**, 207 (1957). — ³ FÖRSTER, TH.: Z. Elektrochem. angew. physik. Chem. **54**, 42, 531 (1950). — ⁴ FÖRSTER, TH.: Fluoreszenz organischer Verbindungen, Göttingen 1951. — ⁵ FÖRSTER, TH., u. J. SCHÖN: unveröffentlicht. — ⁶ KAUFFMANN, H., u. A. BEISSWENGER: Ber. dtsh. chem. Ges. **36**, 2497 (1903). — ⁷ KEUSSLER, V. von: Optik **13**, 317 (1956). — ⁸ KOHLRAUSCH, F.: Prakt. Physik Stuttgart 1956. — ⁹ KORTÜM, G.: Colorimetrie, Photometrie und Spektrometrie, 3. Auflage, Berlin 1955. — ¹⁰ KORTÜM, G., u. W. HESS: Z. physik. Chem. N. F. **19**, 142 (1959). — ¹¹ LIPPERT, E.: Dissertation, Freiburg/Br. 1951. — ¹² LIPPERT, E.: Z. Elektrochem., Ber. Bunsenges. phys. Chem. **61**, 962 (1957). — ¹³ LIPPERT, E., u. F. MOLL: Z. Elektrochem., Ber. Bunsenges. physik. Chem. **58**, 718 (1954). — ¹⁴ NÄGELE, W.: Diplomarbeit, Stuttgart 1956. — ¹⁵ ONSAGER, L.: J. Amer. chem. Soc. **58**, 1486 (1936). — ¹⁶ PERSON, W. B.: J. Chem. Phys. **28**, 319 (1958). — ¹⁷ RAMSAY, D. A.: J. Amer. chem. Soc. **74**, 72 (1952). — ¹⁸ REA, D. G.: J. opt. Soc. America **49**, 90 (1959). — ¹⁹ RÖSSLER, F.: Ann. Physik, 6. Folge, **10**, 177 (1952). — ²⁰ ROSENBAUM, E. J., H. CERATO and J. L. LAUER: J. opt. Soc. America **42**, 670 (1952). — ²¹ SOMMERFELD, A.: Optik, Wiesbaden 1950. — ²² DE Vos, J. C.: Dissertation Amsterdam 1953.

Doz. Dr. E. LIPPERT, Laboratorium für physikalische Chemie
der Technischen Hochschule, Stuttgart N, Wiederholdstraße 15