



Spektrale onderzoeken over chemo- en bioluminescentie

<https://hdl.handle.net/1874/362977>

A. gpr. 192, 1943

**SPEKTRALE ONDERZOEKINGEN OVER
CHEMO- EN BIOLUMINESCENTIE**

A. VAN DER BURG

Diss. Utrecht 1943

SPEKTRALE ONDERZOEKINGEN OVER CHEMO- EN BIOLUMINESCENTIE

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DE GRAAD VAN DOCTOR
IN DE WIS- EN NATUURKUNDE AAN DE RIJKS-
UNIVERSITEIT TE UTRECHT, OP GEZAG VAN DEN
RECTOR MAGNIFICUS L. VAN VUUREN, HOOG-
LERAAR IN DE FACULTEIT DER LETTEREN EN
WIJSBEGEERTE, VOLGENS BESLUIT VAN DE SE-
NAAT DER UNIVERSITEIT TEGEN DE BEDENKINGEN
VAN DE FACULTEIT DER WIS- EN NATUURKUNDE
TE VERDEDIGEN OP MAANDAG 26 JULI 1943, DES
NAMIDDAGS TE 4 UUR

DOOR

ALIDA VAN DER BURG

GEBOREN TE UTRECHT



1943

DRUKKERIJ Fa. SCHOTANUS & JENS — UTRECHT

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK UTRECHT



3794 0636



Aan mijn Ouders.

Aan de nagedachtenis van mijn leermceester L. P. Ornstein.

Het onderzoek, dat in dit proefschrift wordt beschreven, verrichtte ik als medewerkster van de Biophysiese Werkgroep. Aan de leiders van deze groep, Prof. Dr. A. J. Kluyver en Prof. Dr. J. M. W. Milatz, mijn promotor, wil ik op deze plaats mijn oprechte dank betuigen voor het grote vertrouwen, dat zij in mij hebben gesteld en voor hun voortdurende belangstelling in het mij opgedragen onderzoek. Aan de tijd, gedurende welke ik onder hun leiding heb mogen werken, bewaar ik de mooiste herinneringen.

De invloed, die het groepsverband op mij en op mijn werk heeft gehad, is niet te onderschatten en laat zich moeilijk analyseren. Onderlinge gedachtenwisseling, wederzijdse hulp en vriendschap vormden één geheel, welke het gemakkelijker maakte te blijven volharden en de juiste lijn te blijven volgen bij het vaak zo moeilijke wetenschappelijke werk. Hiervoor ben ik allen, die medewerkten in de groep zeer dankbaar. In het bijzonder geldt dit Dr. G. J. M. van der Kerk en C. J. P. Spruit, die mij steeds met raad en daad terzijde stonden, waar ik behoefte had aan hulp op chemies gebied.

Voorts wil ik mijn hartelijke dank betuigen aan allen, die buiten de Biophysiese Werkgroep op enigerlei wijze bijdroegen tot het tot stand komen van dit proefschrift, in het bijzonder aan Mej. E. J. van Rijckevorsel en aan F. A. Rodrigo.

INLEIDING

Het lichten van planten en dieren, dat men vooral in warmer streken in zo talloze vormen in de levende natuur ontmoet, heeft door alle tijden heen een diepe indruk gemaakt. Fascinerend als het lichten is, werd het door vele onderzoekers bestudeerd. De bedrieglijke eenvoud van het verschijnsel heeft hen echter in zoverre teleurgesteld, dat het tot nog toe slechts mocht gelukken enkele zeer algemene trekken ervan op te helderen.

Daar men hier met een zeer karakteristiek biologies-physies verschijnsel te maken heeft, nam de Biophysiese Werkgroep, die in 1935 op initiatief van de Rockefeller Foundation haar werkzaamheden onder leiding van Prof. Dr. L. S. Ornstein en Prof. Dr. A. J. Kluver begon, onder meer ook het bioluminescentievraagstuk ter hand.

Dit proefschrift nu vindt zijn oorsprong in de gedachte, dat de spektrale verdeling van het licht, dat door levende organismen wordt uitgezonden, aanwijzingen moet kunnen geven over de aard van het emitterend molecuul. Zelfs kan men zo ver gaan te zeggen, dat men in beginsel aan het spectrum het emitterend molecuul zou moeten kunnen herkennen. In deze konkrete vorm werd het probleem herhaalde malen door Prof. Kluver op de groepsbesprekingen naar voren gebracht. Hoewel deze gedachte in hoofdzaak zeker juist is, heeft de ervaring geleerd, dat we van de verwezenlijking ervan nog zéér ver zijn verwijderd en is de opgave, die de bioloog hier aan de physicus stelt, een zéér zware gebleken te zijn.

Reeds lang geleden is men tot het inzicht gekomen dat de lichtemissie door levende organismen bij één van de vele chemiese omzettingen geschiedt, die in de cel plaats vinden, vermoedelijk als onderdeel van het ademhalingsproces. De bioluminescentie moeten we daarom zien als een bijzonder geval van de chemoluminescentie, evenwel minder toegankelijk dan deze laatste, doordat het biologies kleed, dat het omgeeft, de reactie waarbij het licht uitgezonden wordt, verbergt. Daarom kan een studie van het lichten bij chemiese reacties ons nader brengen tot het oplossen van het probleem der bioluminescentie.

Het nagaan van het verband, dat bestaat tussen de spektrale samenstelling van het licht, dat bij bekende chemiese reacties wordt uitgezonden en de aard van het emitterend molecuul was dan ook sinds lang een programmapunt van de Biophysiese Werkgroep. Het was daarbij de

bedoeling de verkregen kennis zo mogelijk te gebruiken om de structuur van het molekuul, dat in de bioluminescentie een rol speelt, op te helderen. Door Mej. Dr. J. G. Eymers en Ir. K. L. van Schouwenburg werd hiermede een begin gemaakt. Dit proefschrift vormt een voortzetting van hun werk.

Voor we het vraagstuk van de samenhang tussen spektrum en molekuulbouw aan de orde stellen, voelen we de behoefte om de bouw en het ontstaan van het spektrum *zelf* te begrijpen. Daarbij komen voor een physicus verschillende vragen naar voren: Welk soort overgangen in het molekuul zijn verbonden met de lichtemissie? Wat is de oorzaak van het continue karakter van het spektrum? Hoe geschiedt de aanslag en welke processen verlopen er tussen het moment van de aanslag en van het uitzenden van het licht?

Door een studie van absorptie- en fluorescentiespektra is het mogelijk op deze vragen ten dele een antwoord te geven. De wijze van aanslag, namelijk door absorptie van licht, verschilt weliswaar van die bij de chemoluminescentie, waar ze geschiedt tengevolge van een chemiese reactie. Daartegenover staat echter, dat fluorescentie als vorm van lichtemissie beter onderzocht is en tot op zekere hoogte inzicht moet kunnen geven in de lichtverschijnselen bij chemiese reacties. Deze laatsten zijn op hun beurt minder toegankelijk dan het verschijnsel der fluorescentie, doordat het chemies kleed, dat hen omgeeft, het emitterend molekuul verbergt.

Uitgaande van de kennis over absorptie- en fluorescentieprocessen zullen we ons een beter gedetailleerd beeld kunnen vormen van het chemoluminescentieproces. Na het bestuderen van enkele chemoluminescente reacties behandelen we in het laatste hoofdstuk de spektrale zijde van het bioluminescentievraagstuk en gaan na in hoeverre het in de voorafgaande hoofdstukken verkregen inzicht tot een oplossing van dit vraagstuk kan bijdragen. Het zal dan blijken, dat, hoewel ons inzicht in het chemoluminescentie- en het bioluminescentieproces verdiept is, het op het ogenblik nog moeilijk is, uit de aard van het bepaalde spektrum gevolgtrekkingen te maken aangaande de bouw van het emitterend molekuul.

HOOFDSTUK I

ALGEMENE BESCHOUWINGEN OVER ABSORPTIE- EN FLUORESCENTIEPROCESSEN DOOR ORGANIESE MOLEKULEN IN OPLOSSING

Het in dit hoofdstuk gegeven beeld van het absorptie- en het fluorescentieproces is ontstaan uit een bewerking van in de literatuur verspreid voorkomende experimentele gegevens en theoretiese beschouwingen.

We beperkten ons daarbij tot een globale beantwoording van die vragen, die voor ons verdere werk van belang zijn. Op tal van punten zijn aanvullingen mogelijk, terwijl meerdere nog niet begrepen verschijnselen zijn weggelaten. De vele literatuurverwijzingen voorzien, naar wij hopen, enigermate in dit tekort.

§ 1. Gebruik van golflengte- en frequentieschaal.

Voor we tot de eigenlijke bespreking van het onderwerp van dit hoofdstuk overgaan, moeten we enige woorden wijden aan de wijze, waarop men absorptie- en emissiespektra voorstelt.

In het algemeen zet men in het absorptiespektrum de absorptiecoëfficiënt uit tegen de golflengte van het licht, in het emissiespektrum de per eenheid van golflengtegebied, per sek. uitgezonden energie.

In beginsel is het juister de spektra niet tegen de *golflengte* maar tegen de *frequentie* van het licht uit te zetten, daar deze grootheid evenredig is met de energie van het lichtquant volgens de betrekking van Einstein: $E = h\nu$.

In plaats van de frequentie ν gebruikt men als regel het ermede evenredige *golfgetal* $\frac{1}{\lambda}$ uitgedrukt in cm^{-1} . Het verband tussen deze grootheid en de energie van het lichtquant wordt gegeven door: $E = \frac{hc}{\lambda}$.

Wanneer men de spektra op deze wijze uitzet, spreekt men van het gebruik van de *frequentieschaal* in tegenstelling tot het gebruik van de *golflengteschaal*.

Het verband tussen de energiën $E(\lambda)$ en $E(\nu)$ in de emissiespektra wordt gegeven door de betrekking:

$$E(\lambda)d\lambda = E(\nu)d\nu,$$

waarin $d\lambda$ en $d\nu$ met elkander korresponderende golflengte- en frequentiegebieden voorstellen,

$$\text{of ook door: } E(\nu) = E(\lambda) \frac{\lambda^2}{c}$$

Ook energiën drukt men wel korthedshalve uit in cm^{-1} , d.w.z. men gebruikt het golfgetal van het lichtquant, dat volgens de betrekking van Einstein met de betreffende energie overeenkomt, als maat voor deze energie.

In het algemeen zullen we ons aan de meer gebruikelijke golflengteschaal houden. Alleen in die gevallen, waarin de frequentieschaal theoretische voordelen oplevert, zullen we deze laatste gebruiken.

§ 2. Het absorptieproces als elektronenovergang.

Daar de verzadigde organiese verbindingen eerst beneden 2000 Å absorberen, zullen we hier uitsluitend de *onverzadigde organiese verbindingen* beschouwen. De absorptiespektra, die men bij de ingewikkelder molekulen van dit type aantreft, bestaan als regel uit enkele zeer brede banden in het ultraviolet. Dit geldt voornamelijk voor de vloeibare en de opgeloste toestand, maar in vele gevallen ook voor het gas. Wanneer het absorptiespektrum zich tot in het zichtbare golflengtegebied uitstrekt, spreekt men van een *kleurstof*.

In analogie met de spektra van eenvoudige molekulen in de gas-toestand zullen we het absorptiespektrum moeten toeschrijven aan een *beperkt aantal elektronenovergangen* in het molekuul.

Tot op heden is ons inzicht in de aard van de elektronenovergang, die bij de absorptie plaats heeft, zeer beperkt. Zo heeft men lange tijd in het duister getast aangaande de vraag, in welk gedeelte van het molekuul in de verschillende gevallen deze overgang zich afspeelt. Daarbij meenden sommige onderzoekers, dat ze in een *bepaalde binding* kon worden gelokaliseerd. Voor absorptieprocessen, waarbij de golflengte van het geabsorbeerde licht in het verre ultraviolet is gelegen, is deze opvatting voor een deel juist gebleken. Een sprekend voorbeeld hiervan is de dubbele binding in de carbonylgroep, $\text{C}=\text{O}$. Deze geeft aanleiding tot een absorptieband bij ca. 2800 Å, die men bij alle aldehyden en ketonen aantreft ¹⁾.

Langzamerhand is men echter tot het inzicht gekomen, dat bij vele van de absorptieprocessen, die plaats vinden in het zichtbare en ultraviolette deel van het spektrum, niet de elektronen van een bepaalde binding worden aangeslagen, maar dat men te maken heeft met een *verandering van de toestand van het elektronensysteem van het molekuul als geheel, of van een gedeelte ervan*. Dit is bijvoorbeeld het geval voor het bandensysteem van benzol bij 2500 Å ²⁾.

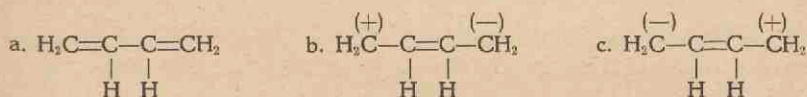
Enerzijds was men van experimentele zijde tot dit inzicht gekomen. Anderzijds voerde de toepassing van de quantenmechanica op molekuul-

problemen tot dezelfde opvatting en leidde tot een verdieping van het inzicht. Door de quantenmechanica wordt tevens de weg gewezen tot een kwantitatieve behandeling van de chemiese en optiese eigenschappen van de door ons beschouwde organiese molekulen *). Voorlopig is dit echter nog slechts mogelijk voor zeer eenvoudige gevallen.

Door Lewis en Calvin⁴⁾ is enkele jaren geleden een poging gedaan door toepassing van enkele zeer algemene regels, deels nog werkend met klassieke voorstellingen, ook de absorptiespektra van ingewikkelder organiese molekulen te interpreteren. Aan de hand van één der eenvoudigste voorbeelden zullen we dit nader toelichten:

We beschouwen het molekuul aethyleen $\text{H}_2\text{C}=\text{CH}_2$ enerzijds, butadien $\text{H}_2\text{C}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}_2$ anderzijds. De absorptie van aethyleen is gelegen beneden $2000 \text{ \AA}$ en moet worden toegeschreven aan een elektronenovergang in de dubbele binding tussen de twee C-atomen. In dit gebied absorbeert ook butadien, welke absorptie we aan dezelfde elektronenovergang toeschrijven als in aethyleen, aangezien de enkele C-C-binding bij aanzienlijk korter golflengte absorbeert. Daarnaast bezit butadien een absorptiegebied bij groter golflengte (tot $2300 \text{ \AA}$), dat overeenkomt met een elektronenovergang in het molekuul als geheel.

Quantenmechanies moet men zich dit als volgt denken: De grondtoestand van een molekuul kan als regel niet door één structuurformule met bepaalde enkele en dubbele bindingen worden beschreven. In zekere benadering kan ze worden opgevat als de superpositie van meerdere dergelijke structuren. Voor butadien zijn daarbij de structuren a, b en c de belangrijkste:



De niet-polaire structuur a met de kleinste energie heeft het grootste aandeel in de grondtoestand, terwijl de beide polaire structuren b en c een groter energie bezitten en minder tot de grondtoestand bijdragen. De werkelijke grondtoestand, die een superpositie is van a, b en c, bezit door deze samenwerking of resonantie een energie, die kleiner is dan die van elk der afzonderlijke structuren **).

*) Voor de theoretiese organiese chemie zijn deze beschouwingen zeer vruchtbaar gebleken, waar men overigens reeds veel vroeger tot dergelijke voorstellingen was gekomen door de verschijnselen van mesomerie en tautomerie³⁾.

**) In het algemeen spreekt men alleen van de resonantie van meerdere structuren, wanneer deze gelijke energie bezitten, zoals dat met de twee Kékulé structuren van benzol het geval is:



Behalve deze superpositie, die de toestand van laagste energie vormt, zijn ook andere superposities mogelijk met hoger energie, die overeenkomen met *aangeslagen toestanden* van het molekuul. Volgens Lewis spelen in de aangeslagen toestanden, die door absorptie van licht ontstaan, de polaire structuren b en c een belangrijke rol, zodat we kunnen schrijven:

Golffunctie van de grondtoestand:

$$\psi_1 = A\psi_a + b\psi_b + c\psi_c, \text{ waarin } A > b \text{ en } c.$$

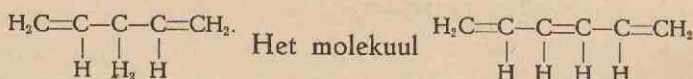
Golffunctie van de aangeslagen toestand:

$$\psi_2 = a\psi_a + B\psi_b + C\psi_c, \text{ waarin } a < B \text{ en } C.$$

Hierin stellen ψ_a , ψ_b en ψ_c de golffuncties voor overeenkomende met de structuren a, b en c.

De structuren b en c danken de mogelijkheid van hun bestaan aan de afwisseling van enkele en dubbele bindingen, zogenaamd *gekonjugeerde dubbele binding*, tussen de vier C-atomen en onderscheiden zich van structuur a, behalve door de ladingsverschuiving, nog door de verandering van dubbele bindingen in enkele en omgekeerd. Daar de grondtoestand nòch door a, nòch door b of c gegeven wordt, maar alle drie bevat, is het niet mogelijk de dubbele en enkele bindingen te lokaliseren. Men kan dit zó opvatten, dat de dubbele bindingselektronen enigermate over het gehele molekuul verdeeld zijn. Op deze wijze kunnen we ons voorstellen, dat er absorptieprocessen mogelijk zijn, waarbij het elektronensysteem van het gehele molekuul betrokken is. In de meeste gevallen zijn het dit soort overgangen, die een rol spelen in fluorescentie- en chemoluminescentieprocessen van organiese molekulen.

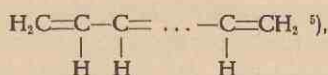
Wanneer men de konjugatie der dubbele bindingen in butadien door tussenvoegen van een verzadigd koolstofatoom verbreekt, zijn de polaire structuren met de verlegde dubbele binding niet meer mogelijk en bezit het molekuul alleen nog de absorptiebanden, die karakteristiek zijn voor de C=C binding:



gedraagt zich weer als butadien enz.

Als algemene regel⁴⁾ heeft men gevonden, dat de absorptiegebieden, die met elektronenovergangen van het zo juist beschreven type corresponderen, bij des te langer golflengte zijn gelegen naarmate het molekuul een groter opeenvolging van gekonjugeerde dubbele bindingen bezit. Dit is bijvoorbeeld het geval in de reeks benzol, naphthaline, anthraceen¹⁾, die een toenemende roodverschuiving van het absorptie-

spektrum vertonen, en bij de zo juist beschreven polyenen



die eveneens bij langer golflengte absorberen naarmate de keten van C-atomen langer is.

Men moet zich voorstellen, dat deze roodverschuiving samenhangt met de grootte van het elektronensysteem, dat betrokken is bij veranderingen van de elektronentoestand van het molekuul. Daarnaast spelen ook andere invloeden een rol, o.a. de aanwezigheid van bepaalde atoomgroepen, ionentoestanden van het molekuul enz. Hiervan treffen we in de hoofdstukken IV en V enige voorbeelden aan.

§ 3. Trillingsstructuur van het absorptiespektrum.

Het absorptiespektrum van een atoom is een *lijnspektrum*. Elke lijn komt overeen met een overgang van het valentieelektron van de grond- naar een aangeslagen toestand.

Ook het elektronensysteem van een tweeatomig molekuul kan in verschillende toestanden voorkomen. Bovendien voeren de atomen trillingen ten opzichte van elkaar uit en roteert het molekuul. Daarbij zijn alleen diskrete trillings- en rotatietoestanden mogelijk. De energie der trillingen is klein ten opzichte van het energieverschil tussen grond- en aangeslagen elektronentoestand. De energie der rotatie is klein ten opzichte van die der trillingen.

Het absorptiespektrum van een dergelijk molekuul is een *bandenspektrum*. Bij elke elektronenovergang behoort een bandengroep. Elke band komt met een bepaalde trillingsovergang overeen, terwijl de lijnen, waaruit één band opgebouwd is, overeenkomen met verschillende rotatieovergangen. Voor nadere bijzonderheden zie men bijv. bij Sporer⁶⁾.

Bij de door ons beschouwde organiese molekulen heeft men vele trillingsmogelijkheden. Daaronder zijn er van grote energie, 1000 à 3000 cm^{-1} , zoals de trillingen van de atomen in de groepen OH, CH, C=O, C—O, C—C ten opzichte van elkaar. Echter zijn er ook trillingen van kleine energie. Tot deze laatsten rekenen we de trillingen van los gebonden molekulen van het oplosmiddel ten opzichte van de opgeloste stof, bijvoorbeeld de watermolekulen van gehydrateerde stoffen. Door deze trillingen van kleine energie zijn de afstanden der afzonderlijke trillingsniveau's zeer gering.

Van een bepaalde rotatietoestand van een molekuul in een oplossing kan men niet spreken, daar de rotatie sterk gestoord wordt door de omringende molekulen. Hiervoor in de plaats komen onregelmatige bewegingen, die niet gequantiseerd zijn en des te sterker zijn naarmate de temperatuur hoger is.

Wat de trillingen betreft, zijn bij kamertemperatuur uitsluitend de trillingen van kleine energie aangeslagen, daar de energie der warmtebeweging, $\frac{1}{2} kT$ klein is, namelijk van de orde van 50 cm^{-1} .

Alle absorptieprocessen gaan daardoor uit van de zeer lage trillingsniveau's van de elektronengrondtoestand.

Bij de overgang van het elektronensysteem van de grond- naar de aangeslagen toestand verandert als regel ook de trillingstoestand van het molecuul, waarbij verschillende trillingen in verschillende mate kunnen worden aangeslagen. Elke trillingsovergang geeft aanleiding tot een continue absorptieband in tegenstelling tot de scherpe lijnen in het spektrum van een molecuul in de gastoestand. Op de oorzaken van deze verbreding komen we hieronder nog terug.

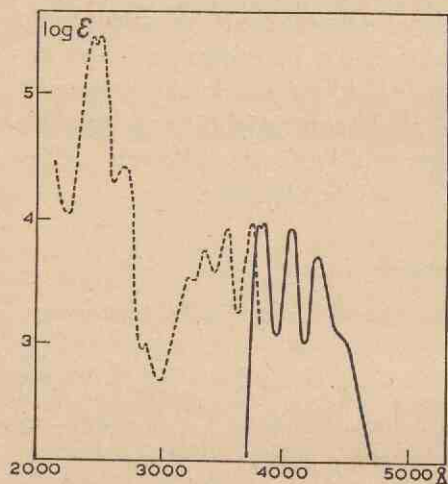


Fig. 1.

Absorptie- en fluorescentiespektrum van anthraceen volgens Ley en Specker⁷⁾.

De verschillende trillingsbanden behorend bij één elektronenovergang zijn vaak tot een vloeiende kromme verenigd. In andere gevallen zijn ze nog als deelbanden in het absorptiespektrum aanwezig. Dit is bijvoorbeeld het geval bij anthraceen. Zie fig. 1. De deelbanden van de absorptieband tussen 3000 en 3900 Å liggen hier op konstante afstanden in de

frequentieschaal en komen overeen met één bepaalde trillingsmogelijkheid van grote energie, die in verschillende mate aangeslagen wordt analoog aan de trillingstoestanden van een harmoniese oscillator. We moeten ons hierbij voorstellen, dat één deelband waarschijnlijk nog opgebouwd is uit de absorptiebanden, die overeenkomen met trillingsovergangen van kleine energie.

De intensiteitsverdeling in het gedeelte van het absorptiespektrum, behorend bij één elektronenovergang wordt in eerste benadering gegeven door het principe van Franck-Condon⁸⁾. Volgens het oorspronkelijke principe van Franck⁹⁾ veranderen op het moment van de elektronenovergang de snelheden en onderlinge afstanden der atomen niet. In grond- en aangeslagen elektronentoestand zullen in het algemeen de evenwichtsafstanden der atomen verschillend zijn, daar de bindingswijze verandert. Dit betekent, dat wanneer aanvankelijk geen trilling aangeslagen is, bij de elektronenovergang zeer bepaalde trillingstoestanden aangeslagen worden. Zijn aanvankelijk wel trillingen aangeslagen dan zullen eveneens zeer bepaalde trillingsovergangen plaats hebben. Ter illustratie hiervan diene fig. 2 a en b voor een tweeatomig molecuul. Hierin is de potentiële energie der kernen uitgezet tegen hun onderlinge afstand voor grond- en aangeslagen elektronentoestand. In

fig. 2 a verandert de evenwichtsafstand der atomen, bepaald door het minimum der potentiaalkromme, niet en wordt vanuit de trillingsgrondtoestand bij overgang naar de hogere elektronentoestand geen trilling aangeslagen. In fig. 2 b verandert de evenwichtsafstand wel en vindt overgang plaats naar een trillingstoestand, waarbij de oorspronkelijke evenwichtsafstand *omkeerpunt* is van de beweging, daar alleen bij deze overgang de snelheid en de onderlinge afstand der kernen niet verandert.

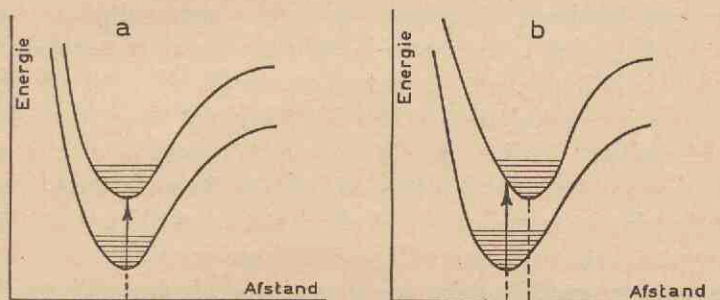


Fig. 2. Principe van Franck voor een 2-atomig molecuul.

Later werd door Condon het principe van Franck uitgebreid en is als zodanig bekend onder de naam van het principe van Franck-Condon. Volgens dit principe zijn ook andere overgangen mogelijk, echter met een waarschijnlijkheid, die klein is ten opzichte van die voor overgangen waarbij aan het principe van Franck is voldaan. We zullen hier echter niet verder op ingaan.

§ 4. Ontstaan van absorptiebanden door verbreding.

We gaan nu over tot een bespreking van de oorzaken, die aan de verbreding ten grondslag liggen en aan het absorptiespektrum zijn continue karakter geven.

De verbreding van één trillingsband ontstaat zowel door oorzaken in het molecuul zelf als door de *wisselwerking* met de omringende vloeistof. De stoorvelden der naburige molekulen veroorzaken:

- 1°. het wegvallen der rotatiestructuur;
- 2°. een wisselende verschuiving en dus een verbreding van het *elektronenniveau* (Starkeffekt).

Ook naburige delen van het molecuul kunnen dit veroorzaken, zodat de verbreding van het elektronenniveau een verbredingsoorzaak is, die zowel inter- als intramolekulaar van karakter is. Hetzelfde geldt voor de derde oorzaak:

- 3°. Verbreding van het bij de overgang aangeslagen *trillingsniveau* tengevolge van een korte levensduur van de trillingstoestanden, hetzij door uitwisseling der trillingsenergie, hetzij door ontleding van het molecuul.

Als vierde oorzaak voor het continue karakter van het absorptiespektrum kunnen we nog aangeven:

4°. Het dicht opeenliggen der trillingsniveau's, die vanuit de grondtoestand kunnen worden aangeslagen.

Over de vraag, hoe in de verschillende gevallen deze mogelijke oorzaken samenwerken tot het ontstaan van de al of niet uit deelbanden opgebouwde absorptieband, is nog slechts weinig bekend. De verschillende onderzoekers verschillen van opvatting over de mate waarin deze oorzaken van betekenis zijn. Blijkbaar is voor eenvoudige, symmetrische molekulen als benzol, anthraceen de laatste oorzaak niet zó sterk aanwezig, dat de trillingsstructuur geheel verdwijnt. Het aantal mogelijke trillingen in deze molekulen is betrekkelijk klein.

De verbreding, die het gevolg is van het wegvallen der rotatiestructuur, omvat het golfengtegebied, dat in de ongestoorde toestand van het molekuul ingenomen wordt door niet te zwakke rotatielijnen.

De aanwezigheid van de tweede verbredingsoorzaak ligt voor de hand, daar de grootte van de elektronenovergang mede bepaald wordt door de ligging der omringende molekulen van het oplosmiddel, die met het absorberend molekuul in wisselwerking staan. Deze ligging draagt een toevallig karakter. Over het bedrag van de verbreding kan men misschien een indruk krijgen uit de verschuiving, die optreedt in het absorptiespektrum, wanneer men van het ene naar het andere oplosmiddel overgaat. Deze bedraagt als regel niet meer dan enkele tientallen Ångströmeenheden. We schatten daarom, dat de verbreding van het elektronenniveau, die het gevolg is van de wisselwerking met de nabuurmolekulen, ook van de grootteorde van 10 Å is.

De verbreding van het elektronenniveau door naburige delen van het molekuul ontstaat op analoge wijze, doordat de verschillende delen van het molekuul tengevolge van de thermische beweging enigszins verschillende standen ten opzichte van elkaar kunnen innemen. Bijvoorbeeld is dat het geval bij biphenyl¹⁰⁾:



Eventueel kunnen ook *deformaties* van het molekuul verbreding van het elektronenniveau tengevolge hebben.

De derde oorzaak werd door Lewis⁴⁾ naar voren gebracht om de waargenomen breedte der trillingsbanden in molekulen als benzol, anthraceen e.a. te verklaren:

Het verband tussen de *natuurlijke breedte* van een niveau en de *levensduur* ervan wordt gegeven door de onzekerheidsrelatie van Heisenberg:

$$\tau \times \Delta E = h, \text{ waarin } \tau = \text{levensduur, } \Delta E = \text{breedte van het niveau,} \\ h = \text{konstante van Planck.}$$

Bij een verbreding van 100 à 1000 cm^{-1} behoort volgens deze formule een levensduur van $3 \cdot 10^{-13}$ à $3 \cdot 10^{-14}$ sek.

Volgens Lewis zou de energie, die bij de aanslag aan bepaalde trillingen wordt toegevoerd, in 10^{-13} à 10^{-14} sek. worden verdeeld over alle trillingsmogelijkheden van het molecuul van kleine energie, zodat de trillingsband een breedte krijgt van 100 à 1000 cm^{-1} zoals men als regel waarneemt. We kunnen ons daarbij voorstellen, dat de zo over het gehele molecuul verdeelde trillingsenergie, waardoor het „warmer” is dan de omgeving, naar de omringende molekulen wegvloeit.

Dat er inderdaad een zeer snelle omzetting van de trillingsenergie plaats heeft, blijkt uit een studie der fluorescentiespektra, waarop we in § 6 nog terug komen. Hieruit volgt dat de omzetting in hoogstens 10^{-10} à 10^{-11} sek. plaats heeft. Of ze zo snel geschiedt als door Lewis wordt aangenomen, kan men hieruit nog niet opmaken.

Daarnaast treedt in vele gevallen een sterke verkorting van de levensduur op doordat het molecuul tengevolge van de toegevoerde trillingsenergie *ontleed* wordt ¹⁰⁾, een proces, dat of gelijktijdig met de absorptie plaats heeft (dissociatie) of zeer kort daarna (predissociatie).

Zoals we gezien hebben treden enkele van de verbredende oorzaken ook reeds op in het *ongestoorde* molecuul: De ontleding en de storende invloed van naburige delen van het molecuul zijn in de zeer verdunde gastoestand de voornaamste oorzaken voor het optreden van brede absorptiebanden of van geheel continue absorptie. Voor een mooi overzicht van de theoretiese en experimentele resultaten, die men verkregen heeft bij de studie van de absorptiespektra van molekulen in de gastoestand, verwijzen we naar een verhandeling van Terenin ¹¹⁾ in de Acta Physica Polonica V, 229—254, 1936.

§ 5. Het proces der fluorescentie.

We vragen ons nu af, wat het lot is van de energie der elektronenaanslag. Voor een aangeslagen molecuul zijn er twee mogelijkheden:

1°. Het keert naar de grondtoestand terug onder emissie van een lichtquant (*fluorescentie*).

2°. Het keert stralingsloos naar de grondtoestand terug, waarbij de elektronenenergie in *trillingsenergie* wordt omgezet; of ondergaat een chemiese verandering, waarbij de energie voor een deel ook in *chemiese energie* wordt omgezet.

Bij niet fluorescerende molekulen treden alleen de onder 2° genoemde processen op. Bij fluorescerende molekulen treedt daarnaast ook het eerste proces op wanneer het quantenrendement der fluorescentie, d.i. de verhouding van het aantal geëmitteerde en geabsorbeerde quanten, kleiner is dan één. Bij enkele zeer sterk fluorescerende stoffen heeft men onder geschikte omstandigheden een quantenrendement van nagenoeg één kunnen waarnemen ¹²⁾. Daarbij treedt dus geen degradatie der elek-

tronenenergie op wanneer de aanslag geschiedt naar hetzelfde elektronenniveau als van waaruit de fluorescentie plaats heeft.

We beschouwen nu de onder 2° genoemde stralingsloze processen nader. Ten dele hebben deze plaats onder invloed van de omringende vloeistofmolekulen, ten dele ligt de oorzaak ervan in het molecuul zelf, zoals blijkt uit de afwezigheid van fluorescentie bij de meeste organiese verbindingen in de verdunde gastoestand¹¹⁾. Men heeft daar vaak een ontleding van het molecuul tengevolge van de absorptie kunnen waarnemen, terwijl in andere gevallen geen ontleding optreedt en het molecuul stralingsloos naar de grondtoestand moet zijn teruggekeerd.

Wil men zich een beeld vormen van een dergelijke stralingsloze overgang naar de grondtoestand, dan moet men zich voorstellen dat de potentiaaloppervlakken in de $(n+1)$ -dimensionale ruimte (n = aantal koördinaten van het molecuul) van grond- en aangeslagen toestand in bepaalde gebieden *elkaar zeer dicht naderen*, zodat er een grote waarschijnlijkheid is voor een overgang in dit gebied van het ene op het andere oppervlak waarbij geen sprong in de energie van het systeem optreedt. Voor een tweeatomig molecuul kan men bijvoorbeeld een situatie hebben als in figuur 3 is weergegeven. De stralingsloze overgang heeft plaats in het punt B, wanneer het molecuul zich vanuit toestand A in de richting van toestand C beweegt onder verlies van zijn trillingsenergie. Het komt daarbij in de hoge trillings-toestand D van de elektronengrondtoestand en valt tenslotte terug naar toestand E onder verdere afgifte van zijn trillingsenergie.

De stralingsloze terugkeer naar de grondtoestand, zoals deze hierboven werd beschreven, kan in sommige gevallen eerst optreden wanneer het molecuul door de omringende molekulen *gestoord* wordt. Of ze kan het gevolg zijn van een *botsing*, waarbij een deel der energie aan de botsende partner overgedragen wordt. Tenslotte kan het aangeslagen molecuul ontleden of chemies reageren met molekulen uit de omgeving¹³⁾ en op deze manier de elektronenenergie in

chemiese energie omzetten. Deze processen spelen een rol bij de zogenaamde *damping der fluorescentie*. Hieronder verstaat men de afname van het fluorescentierendement van een stof tengevolge van de toevoeging van bepaalde stoffen, veelal in lage concentraties.

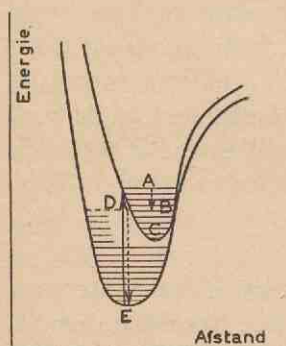


Fig. 3. Schematische voorstelling van een stralingsloze overgang van de aangeslagen naar de grondtoestand voor een 2-atomig molecuul.

§ 6. De wet der spiegelsymmetrie.

We letten nu op de spektrale samenhang tussen fluorescentie en absorptie. Volgens de wet van Stokes is de golflengte van het uitgezonden licht groter dan van het geabsorbeerde, of ook: Het fluorescentiespektrum ligt bij kleiner frequentie dan het absorptiespektrum.

Het is reeds vroeg opgevallen, dat er een zekere mate van symmetrie bestaat tussen beide spektra, welke in fig. 1 voor anthraceen duidelijk zichtbaar is. In absorptie en fluorescentie heeft men hetzelfde aantal

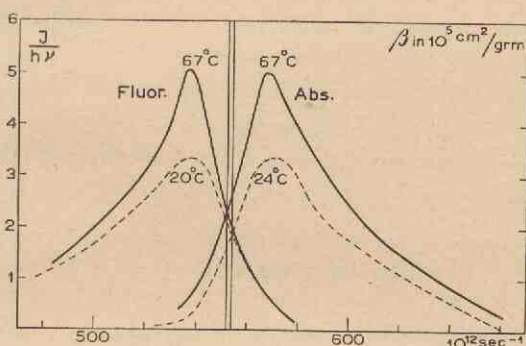


Fig. 4. Voorbeeld van spiegelsymmetrie bij kleurstoffen: Rhodamine 6G extra volgens Lewschin¹⁴⁾.

deelbanden met dezelfde relatieve intensiteitsverdeling. We laten daarbij het absorptiespektrum beneden 3000 Å buiten beschouwing, daar dit waarschijnlijk bij een andere elektronenovergang behoort.

De kwalitatieve symmetrie wordt in sommige gevallen kwantitatief, wanneer men de spektra uitzet tegen de frequentie en de intensiteit in het fluorescentiespektrum in quanten/sek. uitdrukt. Zie fig. 4. In deze vorm werd de wet der spiegelsymmetrie in 1931 door Lewschin¹⁴⁾ naar voren gebracht. Hij liet zien, dat door vele kleurstoffen aan deze wet voldaan wordt en gaf in 1937¹⁵⁾ een interpretatie ervan, die we hier verkort weergeven.

We beschouwen het absorptie- en fluorescentiespektrum behorend bij één elektronenovergang en onderstellen, dat zowel absorptie als fluorescentie uitgaan van de trillingsgrondtoestanden (fig. 5 a en b) terwijl de overeenkomstige afstanden der trillingsniveau's dezelfde zijn voor grond- en aangeslagen elektronentoestand. In het absorptiespektrum treden dan de frequenties $\nu_0 + \Delta_n$ op, waarin:

ν_0 = frequentie overeenkomend met de elektronenovergang.

Δ_n = frequentie overeenkomend met de trillingsovergang.

In het fluorescentiespektrum treden de frequenties $\nu_0 - \Delta_n$ op. Wanneer nu de overgangswaarschijnlijkheden voor overgangen van het 0^e naar het n^e trillingsniveau in absorptie en fluorescentie gelijk zijn, krijgt men in beide spektra dezelfde intensiteitsverdeling over de trillingsbanden.

Deze is in fig. 5 c weergegeven en voldoet aan de wet der spiegelsymmetrie. De bovendien nog optredende verbreding der afzonderlijke frequenties tengevolge van de in § 4 naar voren gebrachte oorzaken, verandert dit in beginsel niet.

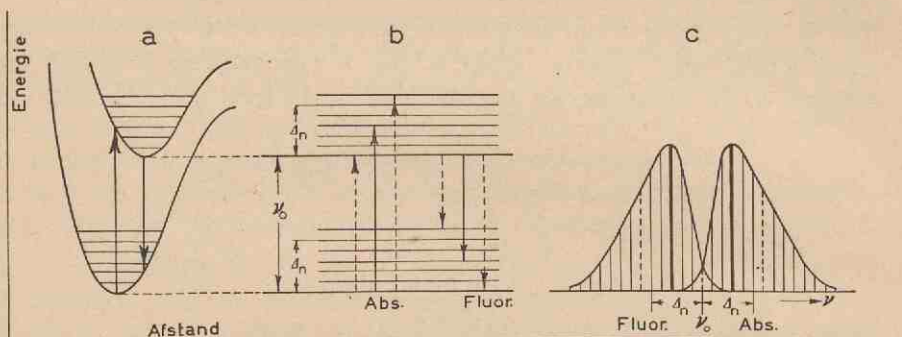


Fig. 5. Schematische voorstelling van het ontstaan van spiegelsymmetrie in absorptie- en fluorescentiespektrum.

Het is eenvoudig in te zien, dat er in het algemeen spiegelsymmetrie zal optreden wanneer aan de volgende voorwaarden is voldaan:

1°. de ligging der trillingsniveau's ten opzichte van elkaar in grond- en aangeslagen toestand dezelfde is;

2°. de verdeling der molekulen, die absorberen resp. fluoresceren over deze trillingsniveau's dezelfde is;

3°. de waarschijnlijkheid voor een overgang van het n^e trillingsniveau van de grondtoestand naar het m^e van de aangeslagen toestand gelijk is aan de waarschijnlijkheid voor een overgang van het n^e trillingsniveau van de aangeslagen toestand naar het m^e van de grondtoestand.

In het algemeen is aan voorwaarde 1° niet voldaan. Bijvoorbeeld zijn bij anthraceen de afstanden der deelbanden konstant en in het absorptiespektrum gelijk aan 1430 cm^{-1} , in het fluorescentiespektrum gelijk aan 1350 cm^{-1} , d.w.z. de afstanden der trillingsniveau's zijn verschillend in de grond- en in de aangeslagen toestand.

De tweede voorwaarde houdt in, dat de verdeling der fluorescerende molekulen over de trillingstoestanden van de aangeslagen toestand de *temperatuurverdeling* zal zijn, daar dit voor de grondtoestand zo is. Dit betekent, dat de door de aanslag toegevoerde extra trillingsenergie verdwenen moet zijn in een tijd, die kort is ten opzichte van de levensduur van de aangeslagen toestand. Dit past geheel in de voorstelling van Lewis⁴).

De juistheid van deze onderstelling kon in meerdere gevallen op de volgende wijze getoetst worden: Wanneer het instellen van de evenwichtsverdeling van de molekulen in de aangeslagen toestand over de trillingsniveau's een proces is, dat *langzaam* verloopt vergeleken met de

overgang naar de grondtoestand onder emissie van een fluorescentiequant, moet men verwachten, dat het fluorescentiespektrum afhankelijk zal zijn van het trillingsniveau, dat bij de absorptie wordt aangeslagen, dus van de golflengte van het geabsorbeerde licht. In alle onderzochte gevallen bleek, dat het fluorescentiespektrum *onafhankelijk* is van de golflengte van het ingestraalde licht ^{16, 17}). Een voorbeeld hiervan treft men aan in hoofdstuk IV voor dimethyldiacridylumnitraat. Een uitzondering moet misschien gemaakt worden voor visceuze oplosmiddelen bij anti-Stokes'se aanslag ¹⁸), d.w.z. bij absorptie in het golflengtegebied waarin ook fluorescentie optreedt. Dit betreft een geheel ander verschijnsel, waar we hier niet op in zullen gaan daar de hierop betrekking hebbende experimentele gegevens nog zeer onvolledig zijn.

Verder kunnen er ook in de gastoestand afwijkingen optreden bij gasdrukken beneden 0.1 mm ¹¹). Hieruit blijkt, dat de wisselwerking met de omringende molekulen een rol speelt bij het bereiken van de evenwichtsverdeling.

Uit het feit, dat het fluorescentiespektrum onafhankelijk is van de golflengte van het geabsorbeerde licht, mogen we besluiten, dat de evenwichtsverdeling der molekulen over de trillingstoestanden bereikt wordt in een tijd, die kort is ten opzichte van de levensduur van de aangeslagen toestand. Deze laatste werd voor enkele kleurstoffen zowel langs direkte ¹⁹) als langs indirecte ²⁰) weg gemeten en bleek 10^{-8} à 10^{-9} sek. te bedragen. Hieruit zou volgen, dat de uitwisseling van trillingsenergie plaats heeft in een tijd van hoogstens 10^{-10} sek. Het zou interessant zijn na te gaan of het fluorescentiespektrum voor bepaalde kleurstoffen en onder daartoe gunstige omstandigheden niet inderdaad afhankelijk is van de golflengte van het geabsorbeerde licht. We denken hier speciaal aan zeer zwakke en aan sterk gedempte fluorescenties, waar men waarschijnlijk met een korter levensduur van de aangeslagen toestand te maken heeft tengevolge van het optreden van concurrerende processen.

Aan de derde voorwaarde zal in het algemeen *kwalitatief* zijn voldaan. Met behulp van het principe van Frank-Condon kunnen we dit als volgt begrijpen: Wanneer de evenwichtsafstanden der atomen bij de overgang niet veranderen, heeft de trillingsovergang $0-0$ de grootste waarschijnlijkheid. Voor de overgangen $0-n$ neemt de waarschijnlijkheid af naarmate n toeneemt. Veranderen daarentegen de evenwichtsafstanden wel, dan zal een overgang $0-p$ de grootste waarschijnlijkheid hebben. Voor de overgangen $0-n$ neemt de waarschijnlijkheid af, naarmate n meer van p gaat verschillen. Dit geldt zowel bij de absorptie als bij de fluorescentie.

Wanneer voor een 2-atomig molecuul de potentiaalkrommen in grond- en aangeslagen toestand *symmetries* en *gelijk van vorm* zijn, kan men aantonen ²¹), dat de intensiteitsverdeling in absorptie- en fluorescentie-

spektrum dezelfde is. Is hieraan niet voldaan, dan treden er afwijkingen op, die des te groter zijn naarmate de krommen meer verschillen. *Kwantitatief* zijn er dan ook grote afwijkingen mogelijk van de derde voorwaarde, waaraan voldaan moet zijn voor het optreden van spiegelsymmetrie. Een voorbeeld hiervan treffen we aan in hoofdstuk IV.

Naar aanleiding van het voorgaande kunnen we nog twee belangrijke gevolgtrekkingen maken:

1°. *In die gevallen, dat het fluorescentiespektrum onafhankelijk is van de golflengte van het geabsorbeerde licht, vindt de fluorescentieovergang plaats vanuit één aangeslagen elektronentoestand.*

Immers, wanneer er fluorescentie mogelijk is vanuit meer dan één elektronentoestand, is het spektrum een superpositie van de bij deze verschillende toestanden behorende fluorescentiespektra. De relatieve intensiteit dezer spektra zal in dat geval worden bepaald door de golflengte van het geabsorbeerde licht. Bijvoorbeeld moet het dan mogelijk zijn het spektrum, behorend bij de laagste aangeslagen elektronentoestand afzonderlijk te krijgen door in te stralen met licht van voldoende grote golflengte.

Het is intussen niet uitgesloten, dat vanuit het bepaalde elektronenniveau fluorescentieovergangen plaats hebben naar meer dan één lager liggend niveau. De waarschijnlijkheid hiervoor is echter gering en als regel zal men alleen met een overgang naar de elektronengrondtoestand te maken hebben. Voor dat geval geldt de tweede gevolgtrekking:

2°. *Wanneer er tevens spiegelsymmetrie optreedt van absorptie- en fluorescentiespektrum vindt de overgang in de symmetrische delen van deze spektra plaats van de elektronengrondtoestand naar de laagste aangeslagen toestand en omgekeerd.*

In dat geval kan men dus met zekerheid het fluorescentiespektrum en het spiegelsymmetrische deel van het absorptiespektrum aan één en dezelfde elektronenovergang toeschrijven.

§ 7. Fluorescentierendement in afhankelijkheid van de golflengte van het ingestraalde licht.

Sterk fluorescente stoffen zijn zeer sporadies in de grote klasse van organiese verbindingen. Zwak fluorescente stoffen zijn er aanzienlijk meer, terwijl men de bewering, dat *elke* stof fluoresceert, zij het ook met een zéér klein rendement, niet kan tegenspreken. Enerzijds moet men dus zeggen, dat fluorescentie in het geheel niet zo'n zeldzaam verschijnsel is als men vaak meent. Anderzijds neemt dit niet weg, dat de stralingsloze terugkeer van de aangeslagen- naar de grondtoestand (ev. chemiese reactie) *regel* is, terwijl de terugkeer onder emissie van een fluorescentiequant een hoge uitzondering moet worden genoemd. Voor bepaalde molekulen kan deze echter belangrijk worden.

Men moet zich voorstellen, dat beide processen naast elkaar voorkomen. Daarbij is de waarschijnlijkheid voor de overgang verbonden met straling als regel aanzienlijk kleiner dan voor de stralingsloze overgang. De verhouding van deze waarschijnlijkheden bepaalt het quantenrendement der fluorescentie.

Een sterke fluorescentie of wel een hoog fluorescentierendement kan men nu toeschrijven of aan een grotere overgangswaarschijnlijkheid voor de spontane emissie of aan een kleinere waarschijnlijkheid van de stralingsloze processen. Blijkbaar is het laatste het geval: De levensduren van 10^{-8} à 10^{-9} sek., die men voor fluorescerende kleurstoffen gemeten heeft, komen namelijk overeen met geheel normale overgangswaarschijnlijkheden voor spontane emissie.

Een sterke fluorescentie moeten we dus toeschrijven aan een kleine waarschijnlijkheid der stralingsloze processen.

Schematies kunnen we een sterk fluorescerend en een niet-fluorescerend

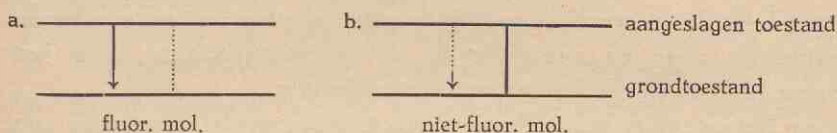


Fig. 6. Schematische voorstelling van een fluorescerend en een niet-fluorescerend molecuul.

molecuul voorstellen als in fig. 6 a en b *). De verticale pijl symboliseert de met straling verbonden overgang, de verticale streep de stralingsloze overgang. Deze laatste is als het ware een *kortsluiting* tussen de twee niveau's.

We beschouwen nu het geval, dat bij een fluorescerend molecuul een hoger elektronentoestand aangeslagen wordt. We kunnen dan de volgende twee extreme gevallen onderscheiden, weergegeven in fig. 7 a en b:

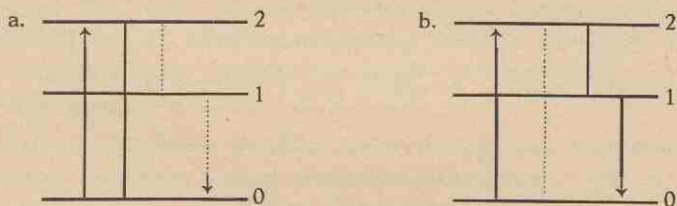


Fig. 7. Aanslag naar hoger elektronentoestand bij een fluorescerend molecuul.

a. Er treedt geen fluorescentie op bij absorptie in de band, die met de hogere elektronentoestand overeenkomt.

*) De afzonderlijke trillingstoestanden, behorend bij één elektronentoestand zijn in fig. 6 en 7 als één niveau weergegeven.

Dit is het geval, wanneer het betreffende niveau 2 door een stralingsloze overgang kortgesloten is met de grondtoestand 0. Een voorbeeld hiervan treft men aan bij decacycleen²²⁾.

b. De fluorescentie wordt ook opgewekt in de absorptieband, die met de hogere elektronentoestand overeenkomt. Het fluorescentierendement is *hetzelfde* als voor de fluorescentie opgewekt in de bij groter golflengte liggende absorptieband.

Dit is het geval wanneer het hogere niveau 2 door een stralingsloze overgang kortgesloten is met het niveau 1 van waaruit de fluorescentie plaats heeft, niet echter met de grondtoestand 0.

Een voorbeeld van dit geval treffen we aan in hoofdstuk V bij 3-aminophtaalzuurhydrazide.

Behalve deze extreme gevallen zijn alle *tussenvormen* denkbaar, waarbij het fluorescentierendement in de bij korter golflengten gelegen absorptiebanden kleiner is dan in de absorptieband, die met de fluorescentie korrespondeert. In die gevallen zal het mogelijk zijn het absorptiespektrum te analyseren naar de verschillende elektronenovergangen door het rendement te bepalen als funktie van de golflengte.

Het op het ogenblik beschikbare, geringe experimentele materiaal zou erop kunnen wijzen, dat geval *b* regel is. Bij uitzondering treedt geval *a* op, namelijk wanneer de overgang naar de twee aangeslagen elektronentoestanden 1 en 2 plaats heeft in twee delen van het molekuul, die wat betreft hun elektronensystemen van elkander *geïsoleerd* zijn.

Volledigheidshalve vermelden we hier nog, dat het quantenrendement binnen de absorptieband korresponderend met de fluorescentieband, voor enkele kleurstoffen konstant gevonden werd door Wawilow²³⁾, terwijl Szczeniowski¹²⁾ en Nichols²⁴⁾ een geringe toename vonden bij toenemende golflengte van het ingestraalde licht. Het fluorescentierendement in het anti-Stokes'e absorptiegebied neemt volgens Jablonski²⁵⁾ en Wawilow²⁶⁾ snel af. Op de interpretatie van dit verschijnsel gaan we hier niet in.

HOOFDSTUK II

ALGEMENE BESCHOUWINGEN OVER CHEMOLUMINESCENTIE.

§ 1. Voorkomen van chemoluminescentie.

In de loop van de tijd zijn er vele chemiese reacties bekend geworden, die onder lichtemissie verlopen. Verreweg de meeste van deze reacties zijn *oxydatieprocessen*. Voorbeelden hiervan zijn:

a. de oxydatie van fosfor door zuurstof ²⁷⁾.

b. de oxydatie van talloze organiese verbindingen in oplossing al of niet bij aanwezigheid van een katalysator: aldehyden, pyrogallol, palmitinezuur, aesculine, lophine, Grignard verbindingen ^{28, 29)}.

De bekendste reacties van dit type zijn de in de hoofdstukken IV en V te behandelen chemoluminescenties van dimethyldiacridylumnitraat en van 3-aminophtaalzuurhydrazide. Bij de eerste wordt een sterk *groen*, bij de tweede een sterk *blauw* licht uitgezonden. Verder is ook de reactie van pyrogallol ²⁹⁾ met peroxyd en formaline in alkalies milieu zeer bekend. Deze verloopt onder grote warmteontwikkeling, waarbij een vrij zwak *rood* licht wordt uitgezonden.

c. Chemoluminescentie van aan oppervlakken geadsorbeerde kleurstoffen bij behandeling met ozon ³⁰⁾ en van aan gels geadsorbeerde kleurstoffen bij oxydatie van het gel ³¹⁾.

Daarnaast zijn er ook chemoluminescente *ontledingsreacties* bekend, o.a. de droge destillatie van hydrobenzamide in waterstofatmosfeer ³²⁾.

Een derde type van chemoluminescente reacties treft men aan in de gasphase, namelijk bij de *reactie van metalen met halogenen*, o.a. natrium en kwik met chloor ³³⁾.

Een chemoluminescente reactie onderscheidt zich van een gewone reactie doordat een deel van de vrijkomende bindingsenergie in de vorm van *licht* uitgezonden wordt. Bij niet-chemoluminescente reacties komt ze geheel als *warmte* vrij, de zogenaamde reaktiewarmte.

Daar de emissie van een lichtquant in het zichtbare golflengtegebied overeenkomt met een grote reaktiewarmte, voor $\lambda = 5000\text{\AA}$ bedraagt deze 57 kcal/grm, zal men chemoluminescentie alleen waarnemen bij reacties met een *groot energieoverschot*. Daardoor is het begrijpelijk, dat juist bij oxydatieprocessen het verschijnsel het veelvuldigst voorkomt. Omge-

keerd behoeft een reactie waarbij veel energie vrijkomt, allerminst chemoluminescent te zijn, daar het chemoluminescent vermogen zeer nauw samenhangt met de *optiese* eigenschappen der betrokken molekulen.

§ 2. Het chemoluminescente proces.

Het probleem der chemoluminescentie kunnen we splitsen in twee delen, die tot op zekere hoogte gescheiden kunnen worden behandeld:

- a. het verloop van de chemiese reactie;
- b. het eigenlijke proces der chemoluminescentie.

Het verloop van de chemiese reactie is in de meeste gevallen slechts ten dele bekend. Als regel neemt men aan, dat men te maken heeft met een *reaktieketen*, d.w.z. een reactie, die uit meerdere schakels bestaat. De reaktieschema's, die door de verschillende onderzoekers zijn opgesteld, berusten grotendeels op hypothesen, die in vele opzichten nog nader getoetst moeten worden. In hoofdstuk IV en V zullen we hiervan twee gevallen nog nader bespreken. Daar dit gebied echter grotendeels buiten ons onderzoek valt, zullen we er slechts in zoverre op ingaan als in verband met ons werk nodig is.

We gaan nu over tot een nadere beschouwing van het eigenlijke proces der chemoluminescentie. Hieronder verstaan we dat onderdeel van de reactie waarbij de chemiese energie als licht vrijkomt.

Volgens het natuurkundig inzicht in emissieverschijnselen moet men zich voorstellen dat *het uitzenden van een lichtquant gepaard gaat aan een overgang van één of ander elektronensysteem van een hoger naar een lager energietoestand*. Dit elektronensysteem zal het elektronensysteem van een bepaald chemies individu zijn. Hieronder verstaan we in dit verband een al of niet in chemies opzicht stabiel molekuul, een radikaal, een ion, een additieprodukt van twee molekulen enz. In het volgende zullen we er vaak eenvoudig „*molekuul*” voor schrijven.

We kunnen nu twee gevallen onderscheiden, die ieder weer onderverdeeld kunnen worden:

A. Direkte chemoluminescentie.

Het molekuul, dat het chemoluminescentielicht uitzendt, is tussen- of eindprodukt van de reactie en *ontstaat* bij de reactie in aangeslagen toestand.

B. Indirekte chemoluminescentie of chemofluorescentie door overdracht.

Het emitterend molekuul is een willekeurig in het reaktiemengsel voorkomend molekuul, dat in aangeslagen toestand is geraakt door *botsing* met een tussen- of eindprodukt van de reactie, dat drager is van reactieenergie.

In deze paragraaf zullen we ons uitsluitend bezig houden met het geval van de direkte chemoluminescentie, terwijl in § 3 de indirecte chemoluminescentie behandeld zal worden.

Hoe moeten we ons voorstellen, dat een tussen- of eindprodukt bij de reactie in een aangeslagen toestand ontstaat? Hierin is niets wonderlijks gelegen. *Immers, elke chemiese deelreactie komt uiteindelijk neer op een overgang van de elektronensystemen der reagerende partners in die der reactieprodukten.* Het is zeer goed denkbaar, dat daarbij het elektronen-systeem van één der reactieprodukten niet in de *grond-* maar in een *aangeslagen* toestand ontstaat.

Wat de aard van het door dit molekuul uitgezonden licht betreft, kunnen we nog drie gevallen onderscheiden:

1°. het chemoluminescentielicht is steeds afkomstig van *hetzelfde* goed gedefinieerde chemiese individu, dat tijdens de levensduur van de aangeslagen toestand niet in wisselwerking staat met andere reactieprodukten.

2°. het emitterend molekuul ondergaat gedurende de levensduur der aangeslagen toestand *veranderingen*. We kunnen ons hierbij denken, dat het molekuul „in staat van wording” is of dat het in een tijdsafhankelijke wisselwerking met andere reactieprodukten staat.

3°. het emitterend molekuul is weliswaar een onafhankelijk chemies individu, als onder 1° aangegeven werd, het kan echter in *meerdere* goed gedefinieerde modifikaties optreden. We denken hier bijvoorbeeld aan enolisatie of ionisatie in een voor de chemiese reactie onbelangrijke zijketen.

In het eerste geval ligt het voor de hand te onderstellen, dat het betrokken molekuul door absorptie van licht in dezelfde aangeslagen elektronentoestand kan komen en daarbij een fluorescentie zal vertonen van dezelfde spektrale samenstelling als het chemoluminescentielicht. Met andere woorden, dat chemoluminescentie- en fluorescentiespektrum identiek zullen zijn.

In welke *trillingstoestand* het molekuul tengevolge van de chemiese reactie ontstaat, doet in dit verband niet ter zake. In hoofdstuk I zagen we namelijk, dat de bij absorptie aan het molekuul toegevoerde extra trillingsenergie verloren gaat in een tijd die zeer kort is vergeleken met de levensduur van de aangeslagen toestand. Er is geen reden aan te nemen, dat dit niet het geval zou zijn voor een molekuul, dat tengevolge van een chemiese reactie in aangeslagen toestand is ontstaan.

Het is echter niet uitgesloten, dat het betrokken molekuul niet fluoresceert of dat chemoluminescentie- en fluorescentiespektrum niet identiek zijn doordat de elektronentoestand, die bij de chemiese reactie ontstaat, niet door absorptie vanuit de grondtoestand kan worden aangeslagen. Voor molekulen in oplossing is dit echter in hoge mate onwaarschijnlijk, daar in dat geval de storing door de omringende molekulen zó groot is, dat de eventuele verbodsregels voor bepaalde overgangen veel minder scherp zijn dan in de verdunde gastoestand.

Met vrij grote zekerheid kunnen we dus zeggen, dat in het onder

1° genoemde geval het chemoluminescerende molekuul ook fluoresceert en dat de spektra identiek zijn.

Het voorgaande geldt evenzeer voor de *afzonderlijke* molekuulvormen van de onder 2° en 3° genoemde gevallen. Echter is dan het uiteindelijke spektrum in het tweede geval een superpositie van de spektra van een continuüm van molekuulvormen, in het derde geval een superpositie van de spektra van een aantal bepaalde molekuulvormen. Het derde geval zal uiteraard weinig voorkomen, daar de onderstelling van meerdere molekuulvormen in de meeste gevallen op zichzelf reeds onwaarschijnlijk is en tevens omdat, zo deze al aanwezig zijn, het zeer goed mogelijk is, dat slechts één daarvan tot emissie in staat is. Wat het tweede geval betreft, is het moeilijk enige definitieve uitspraak te doen.

In de volgende hoofdstukken zullen we ons veelal op het standpunt van het eerste geval plaatsen, daar de onderstelling, dat een bepaald chemies individu, hetzij stabiel hetzij instabiel, het chemoluminescentie-licht uitzendt, de eenvoudigste onderstelling is, die men kan maken.

§ 3. Chemofluorescentie door overdracht en chemofluorescentie door absorptie.

Onder indirecte chemoluminescentie of chemofluorescentie door *overdracht* verstaan we die vorm van chemoluminescentie, waarbij de reactie-energie door botsing overgedragen wordt aan een ander in het reactiemengsel voorkomend molekuul, dat het als fluorescentielicht uitzendt. Hiervan vinden we in de literatuur twee voorbeelden:

1°. de chemoluminescente reactie van natrium en chloor in de gasphase. Hierbij wordt de Na-D lijn uitgezonden,

2°. de chemoluminescentie van aan gels geadsorbeerde kleurstoffen bij oxydatie van het gel en van de chemoluminescente oxydatie van aan gels geadsorbeerde kleurstoffen door ozon.

In het eerste geval maakten Evans en Polanyi³³⁾ het waarschijnlijk, dat de energie vrijkomend in de reactie:



als *trillingsenergie* in het molekuul NaCl wordt opgehoopt. Door botsing met een Na-atoom wordt deze trillingsenergie omgezet in *elektronen-energie* van het Na-atoom.

Het tweede voorbeeld betreft de door Kautsky³¹⁾ onderzochte chemoluminescentie van aan uitgelicht silikon geadsorbeerde kleurstoffen, die bij oxydatie van het gel door kaliumpermanganaat chemoluminescentie vertonen in de kleur van de fluorescentie van de betreffende kleurstof. In welke vorm de reactie-energie in dit geval door het reagerend molekuul van het gel overgedragen wordt aan het kleurstofmolekuul, is niet bekend. Hetzelfde verschijnsel treedt op wanneer de geadsorbeerde kleurstof *zelf* geoxydeerd wordt met behulp van ozon³⁰⁾. De overdracht

geschiedt in dat geval van een geoxydeerd op een niet-geoxydeerd kleurstofmolekuul.

We gaan nu na in hoeverre deze processen kunnen optreden bij chemoluminescente reacties in *oplossing*. Het is duidelijk, dat daar de omstandigheden voor overdracht van energie, hetzij als trillings- hetzij als elektronenenergie, door de aanwezigheid van het oplosmiddel veel ongunstiger zijn dan bij een adsorbaat of in een gas. Een eenvoudige berekening leert, dat bij de gebruikelijke concentratie aan chemoluminescente stof de bovenste grens van de waarschijnlijkheid voor een direkte overdracht van energie slechts 15 % bedraagt:

De levensduur van een trillingstoestand van hoge energie in een vloeistof moeten we volgens hoofdstuk I, § 6 op niet langer dan 10^{-10} sek. schatten. Hetzelfde geldt voor een aangeslagen elektronentoestand, die niet met fluorescentie verbonden is. In deze tijd legt een willekeurig molekuul van de soort A, dat drager is van de reactieënergie, hetzij als trillings- hetzij als elektronenenergie, in de oplossing een weg af van de orde van 10^{-6} cm, wanneer het met een snelheid beweegt, die overeenkomt met de temperatuurbeweging. We nemen daarbij aan, dat het molekulairgewicht van de orde 200 is. De weg, die het molekuul moet afleggen om te botsen met een voor de lichtemissie verantwoordelijk molekuul B, berekenen we als de vrije weglengte van molekuul A in een gas van molekulen B. Nemen we daarbij aan, dat de molekulen bollen zijn met een straal van 3.10^{-8} cm, terwijl de concentratie van de molekulen B 5.10^{-6} grm/cm³ bedraagt, dan vinden we, dat deze afstand ca. 7.10^{-6} cm is. Waar de reactieënergie gemiddeld over een weg van ten hoogste 10^{-6} cm wordt verplaatst, zien we dus, dat bij deze concentratie van het emitterend molekuul B hoogstens in 15 % van de gevallen de reactieënergie van A op B kan worden overgedragen.

In werkelijkheid is de waarschijnlijkheid voor overdracht veel geringer dan uit de bovenstaande berekening volgt, daar de weg, die de molekulen doorlopen zeker niet rechtlijnig is, maar vergelijkbaar met de Brownse beweging van een kolloidaal deeltje in een vloeistof. Dat dit over deze kleine afstanden reeds het geval is, volgt uit absorptiemetingen aan gasen wanneer deze met inerte gasen verdund worden¹¹). Daarbij blijkt, dat het aantal botsingen tussen gelijksoortige molekulen aanzienlijk kleiner wordt door de aanwezigheid van het inerte gas.

Of deze vorm van chemoluminescentie, namelijk door overdracht van reactieënergie in een bepaald geval geheel voor het lichten aansprakelijk is, kan men experimenteel nagaan door de intensiteit van het chemoluminescentielicht te meten als functie van de concentratie van de chemoluminescente stof. Bij kleine concentraties zal de intensiteit ongeveer evenredig zijn met het kwadraat ervan, daar zowel de reactiesnelheid als de waarschijnlijkheid voor een botsing evenredig zullen zijn met de concentratie. We onderstellen daarbij, dat de overdracht geschiedt aan een molekuul van de chemoluminescente stof of aan een daaruit gevormd molekuul.

Daarnaast is het zeer goed denkbaar, dat dit proces als *nevenverschijnsel* optreedt bij chemoluminescente reacties van het type A als

in § 2 werd beschreven. De levensduur van de drager der reaktieënergie, het chemoluminescente molekuul, is in dat geval langer (10^{-8} à 10^{-9} sek.) en daardoor is de waarschijnlijkheid voor chemofluorescentie door overdracht groter. In dit verband zullen we er in hoofdstuk IV nog op terugkomen.

In de gasphase treedt blijkbaar een direkte overdracht van trillings-energie bij de reaktie tussen natrium en chloor *wel* in belangrijke mate op. Men moet dit hieraan wijten, dat de trillingsenergie in dat geval alleen overgedragen wordt aan reaktiepartners en niet, zoals in een vloeistof het geval is, bijna uitsluitend aan indifferente molekulen van de oplossing. Bij kleurstofadsorbaten zijn de omstandigheden eveneens geheel anders: het geoxydeerde molekuul en het luminescerende kleurstof-molekuul bevinden zich in elkanders direkte nabijheid.

Voorbeelden van deze vorm van chemoluminescentie in *oplossingen* zijn er niet bekend. Wel worden er in de literatuur enkele gevallen vermeld. Deze berusten echter ten dele op een geheel ander verschijnsel, dat we *chemofluorescentie door absorptie* zullen noemen. Dit proces treedt op, wanneer het chemoluminescentielicht van een bepaalde reaktie door een in de vloeistof voorkomende fluorescente stof wordt geabsorbeerd en in diens fluorescentielicht wordt omgezet. Een voorbeeld hiervan treffen we aan in hoofdstuk IV.

Volgens Tamamushi³⁴⁾ en Schales³⁵⁾ zou er, op direkte energieoverdracht berustende, chemofluorescentie optreden bij de chemoluminescentie van 3-aminophtaalzuurhydrazide bij aanwezigheid van een fluorescerende kleurstof, bv. fluoresceïne. Men neemt in dat geval waar, dat het *blauwe* licht van de chemoluminescente reaktie van 3-amino overgaat in het *groene* fluorescentielicht van fluoresceïne. Dit wordt toegeschreven aan een direkte overdracht van de elektronenenergie van het aangeslagen oxydatieprodukt van 3-amino op het fluorescerende molekuul.

Het is echter ook mogelijk het waargenomen verschijnsel op de volgende wijze te verklaren:

Bij de door Tamamushi en Schales gebruikte concentraties aan fluoresceïne wordt in het absorptiegebied van fluoresceïne alle door 3-amino uitgezonden licht geabsorbeerd en daarbij grotendeels omgezet in fluorescentielicht van fluoresceïne. Van het chemoluminescentielicht blijft daardoor alleen het buiten het absorptiegebied van fluoresceïne liggende deel over. Doordat het fluorescentiespektrum van fluoresceïne direkt aansluit bij het absorptiespektrum, ligt dit deel in hetzelfde golflengtegebied als waar fluoresceïne fluoresceert. De oplossing zendt dus in hoofdzaak licht uit van golflengten, die ook in het fluorescentiespektrum van fluoresceïne voorkomen, waarbij het blauwe deel van het chemoluminescentiespektrum nagenoeg is verdwenen, terwijl het groene

deel is versterkt. De onderlinge ligging der spektra van 3-amino en fluoresceïne zijn weergegeven in fig. 8.

Dat de door de ontdekkers der chemofluorescentie gegeven interpretatie *onjuist* is, blijkt nu hieruit, dat het verschijnsel niet optreedt

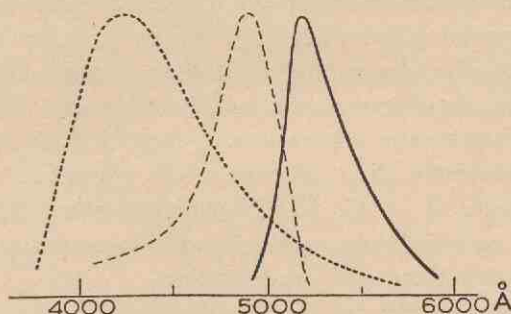


Fig. 8. ————— fluorescentiespektrum van fluoresceïne.
 - - - - - absorptiespektrum van fluoresceïne.
 chemolum. spektrum van 3-aminophthz. hydr.

wanneer men het 3-amino, bij elektrolyse van de oplossing, aan de anode oxydeert. In dat geval treedt de emissie van het chemoluminescentielicht alleen op in een dun vloeistofhuidje om de anode *). Wanneer men de anode waarneemt als deze zich vlak bij de kuvetwand bevindt, kan men op het oog *geen* kleurverandering waarnemen van de helder blauw lichtende anode bij toevoeging van fluoresceïne aan de oorspronkelijke oplossing van 3-amino. Wanneer er *direkte overdracht* van de aanslagenergie van het chemoluminescente molecuul op het fluoresceïnemolecuul plaats had, zou men nu de kleurverandering van blauw naar groen ook moeten opmerken.

Neemt men bij aanwezigheid van fluoresceïne de anode door een dikke laag van de vloeistof waar, dan is de kleur groen tengevolge van de absorptie van het blauwe deel van het chemoluminescentielicht. Er treedt dus wel absorptie op van het licht door het toegevoegde fluoresceïne, welke gevolgd wordt door fluorescentie; deze laatste stoort hier echter niet, daar ze hoofdzakelijk *buiten* de lichtende zône plaats heeft. Bovendien is ze door de plaatselijke emissie van het chemoluminescentielicht veel zwakker dan in het geval van een homogeen lichtende vloeistof, waar in een bepaald volumenelement chemoluminescentielicht uit *alle delen* van de oplossing wordt geabsorbeerd en omgezet in fluorescentielicht. In hoofdstuk IV zullen we een analoog geval ontmoeten.

Samenvattend onderscheiden we de volgende emissieverschijnselen:

*) Voor bijzonderheden van de elektrolysemethode verwijzen we naar hoofdstuk V, § 3.

A. *Fluorescentie*. Het emitterend molekuul komt door absorptie van licht in de aangeslagen toestand.

B. *Direkte chemoluminescentie*. Het emitterend molekuul ontstaat bij een chemiese reactie in aangeslagen toestand en is tussen- of eindprodukt van de reactie.

C. *Indirekte chemoluminescentie of chemofluorescentie door overdracht*. Het emitterend molekuul is een willekeurig in het reaktiemengsel voorkomend molekuul en komt in aangeslagen toestand door botsing met een reactieprodukt, dat drager is van reactieënergie.

Tenslotte een combinatie van proces A met B of C:

D. *Chemofluorescentie door absorptie*. De chemoluminescentie verloopt volgens proces B of C. Het chemoluminescentielicht wordt geabsorbeerd door een in het reaktiemengsel aanwezige stof en als fluorescentielicht van deze stof gereëmitteerd.

Tenslotte merken we nog op, dat bij een bepaalde chemoluminescente reactie de processen B, C en D naast elkaar kunnen optreden.

HOOFDSTUK III

EXPERIMENTELE METHODEN.

In de loop van het onderzoek werden zowel absorptie- als emissiespektra bepaald. De absorptiespektra werden *fotoëlektries*, de emissiespektra *fotografies* gemeten.

§ 1. De absorptiemeting.

In fig. 9 is de opstelling voor het opnemen der absorptiespektra

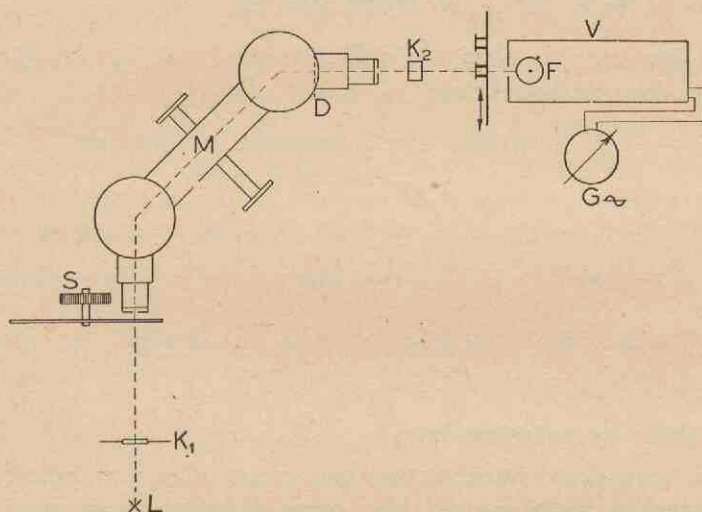


Fig. 9. Opstelling voor bepaling van absorptiespektra.

schematies weergegeven. Monochromatis licht werd verkregen van de lichtbron L met behulp van een kwartsdubbelmonochromator M volgens van Cittert. De relatieve intensiteit van de monochromatische lichtbundel werd gemeten met behulp van een wisselstroomversterker V volgens Milatz³⁶). Als fotocel werd een Cs-CsO vacuümfotocel in kwartsballon F gebruikt. Daar de versterker alleen wissellicht met een periode van 50 per sek. meet, was voor de monochromator een Saja-synchroonmotor S geplaatst waarop een schijf met 30 openingen was aangebracht. Bij een toerental van 100 per minuut wordt het licht dan juist 50 keer per sek. onderbroken.

Als lichtbron in het ultravioleet diende een Philips hogedrukkwiklamp HP 300, 75 Watt zonder glasballon en zo nodig de anode van een koolboog in lucht. In het zichtbare golflengtegebied en het nabije ultra-

violet tot 3400 Å werd een 12 Volts autolampje gebruikt. Het door de monochromator doorgelaten golflengtegebied bij gebruik van de koolboog bedroeg 10 Å, bij gebruik van het autolampje 20 Å.

De absorptiemeting geschiedde *achter* de monochromator, waarbij achtereenvolgens een kuwet met de te meten oplossing en eenzelfde kuwet met oplosmiddel in de lichtbundel werd gebracht op de plaats, waar de kwarts lens K_2 een afbeelding geeft van het in de monochromator aangebrachte diafragma D. De kuvetten bestonden uit dikwandige cilindrische glazen buizen, die afgesloten werden door kwartsplaatjes tegen de vlakke uiteinden te klemmen.

De intensiteit I van de lichtbundel, zoals deze door de uitslag van de galvanometer, die met de versterker verbonden is, wordt gegeven, werd direkt als logaritmie afgelezen, zodat het verschil van de twee aflezingen,

$\log \frac{I_0}{I}$ evenredig is met de absorptiecoëfficiënt.

In de figuren is de absorptiecoëfficiënt β uitgezet, in cm^2/gram , gedefinieerd door de betrekking:

$$\beta = \frac{1}{cd} \ln \frac{I_0}{I}, \text{ waarin } c = \text{koncentratie in gram/cm}^3$$

$d = \text{laagdikte in cm.}$

$\frac{I}{I_0} = \text{doorlating van de oplossing van kon-}$

centratie c en laagdikte d voor een evenwijdige monochromatische lichtbundel.

De nauwkeurigheid, waarmede de absorptiecoëfficiënt op deze wijze werd bepaald, bedraagt 1 à 2 %.

§ 2. Bepaling der emissiespektra.

Bij de fotografiese intensiteitsmeting ter bepaling der emissiespektra werd gebruik gemaakt van een klein type glasspektrograaf merk Fuess, met uittredeopening $f/9$. Bij de latere opnamen van zeer zwakke chemoluminescente reacties en van de emissiespektra van schimmels en lichtbakteriën werd de fotografiese lichtsterkte van deze spektrograaf nog circa vier keer vergroot door het spektrum twee keer verkleind af te beelden.

Het lichtend objekt, waarvan de spektrale verdeling moest worden bepaald, werd met behulp van een achromatische lens afgebeeld op de spleet van de spektrograaf. Als regel werd een trapspleet gebruikt met enkele treden van verschillende breedte, zodat meerdere spektra gelijktijdig werden opgenomen en de nauwkeurigheid door middelen kon worden vergroot. De zwartingsmerken werden opgenomen door het lichtend objekt te vervangen door een met magnesiumoxyd gewit vlak, verlicht door een geijkte wolfraambandlamp of door een 12 Volt—20 Watt autolampje, dat met behulp van deze bandlamp geijkt was. Door voor de spleet van de spektrograaf een Schott-filter BG 23, 2 mm

te plaatsen werd bereikt, dat het rode deel van het spektrum van de bandlamp werd verzwakt en de zwarting in het spektrum gelijkmatiger was.

Voor de zwartingsmerken werd steeds eenzelfde trapspleet gebruikt met zes treden, variërend tussen 0,02 en 0,30 mm. Daardoor was het mogelijk een volledig stel zwartingsmerken te verkrijgen met behulp van slechts twee of drie belichtingen bij verschillende stroomsterkten van de bandlamp. Het gelijktijdig opnemen van meerdere zwartingsmerken was vooral in ons geval de meest aangewezen weg daar de belichtingstijden vaak zeer lang waren. Voor de zwartingsmerken en voor de opname mogen deze niet te veel uiteenlopen. In ons geval verschilden de belichtingstijden hoogstens een faktor drie.

De golflengte in de gefotografeerde continue spektra werd vastgelegd door twee heliumlijnen op het spektrum te superponeren. Hiervoor werden de 6678 Å en de 3889 Å-lijn gebruikt, die met behulp van geschikte filters (Schott, RG 1, 2 mm resp. UG 1, 2 mm) uit het licht van een heliumontladingsbuisje werden geïsoleerd.

De ijking van de trapspleet geschiedde op drie manieren:

- 1°. door *uitmeten* der spleetbreedtes onder de comparateur;
- 2°. *fotografies*, met behulp van een serie opnamen van de trapspleet bij verschillende stroomsterkten van de bandlamp;
- 3°. *fotoëlektries*, door de doorlating der spleten te meten wanneer de homogeen verlichte eindspleet van de monochromator met een lens afgebeeld werd loodrecht op de lengterichting van de trapspleet.

De drie bepalingen leverden binnen de meetfout van ca. 5 % dezelfde waarden.

Tussen het voorwerp en de lens, die de afbeelding op de spleet van de spektograaf verzorgt, was steeds een diafragma geplaatst. De plaats van dit diafragma werd zodanig bepaald, dat het beeld, dat door de lens en door de kollimatorlens van de spektograaf van het diafragma gevormd wordt, in het midden van de spektograaf lag. De grootte van het diafragma werd zo gekozen, dat de lichtbundel in de spektograaf niet verder gedialfragmeerd werd door prisma en lenzen. Hierdoor wordt bereikt, dat bij een maximale opening van de lichtbundel het in de spektograaf optredende valse licht tot een minimum beperkt wordt, daar geen onregelmatige reflectie aan de lensranden kan plaats vinden. Tevens is deze wijze van diafragmeren voor punten op verschillende hoogte van de voorspleet dezelfde en zijn de intensiteiten in de zes treden van het zwartingsmerk daardoor evenredig met de spleetbreedten.

Als fotografiese plaat werd steeds Agfa Isopan Super Special gebruikt, welke over het golflengtegebied van 3800—6500 Å een vrij gelijkmatige en grote gevoeligheid bezit, zodat steeds het emissiespektrum in dit gebied in één opname kon worden bepaald. Boven 6500 Å daalt de gevoeligheid van de fotografiese plaat snel tot nul, terwijl beneden 3800 Å

het licht door de glasdelen van de spektrograaf te sterk wordt geabsorbeerd om gemeten te kunnen worden. Voorts werden de platen steeds met rood licht voorbelicht tot een zwarting van ca. 6 %. Voor zwartingen van 20 % wordt de gevoeligheid daardoor nog ruim twee keer vergroot.

Voor het opnemen van fluorescentiespektra werd de oplossing in een rechthoekig kuvet gebracht. Het licht, dat de fluorescentie opwekt, werd ingestraald in een richting *loodrecht* op de richting van waarneming. Als lichtbron werd een Philips hogedrukkwiklamp, HPW 500, 120 Watt gebruikt met nikkeloxyd glasballon en tussengeplaatst Schott-filter UG 1, 2 mm. Het ingestraalde licht bestaat zodoende hoofdzakelijk uit het kwiktriplet 3650—3663 Å, enkele procenten van de 3342 Å-lijn en een zwak continuüm met banden beneden 3850 Å.

Het uitwerken van de fotografiese opname geschiedde op de gebruikelijke wijze door fotometrereren der spektra met behulp van een microfotometer volgens Moll en het bepalen van het verband tussen zwarting en intensiteit bij bepaalde golflengten met behulp van de zwarting en de intensiteit in de zwartingsmerken bij deze golflengten. De intensiteit is bekend uit de ijking van de bandlamp en van de trapspleet, de zwarting uit het fotogram. Met behulp van de op deze wijze voor elke golflengte verkregen zwartingskrommen kunnen de zwartingen in de te meten spektra in relatieve intensiteiten worden omgezet.

§ 3. Korrektie der emissiespektra op absorptie.

Deze korrektie zullen we in drie vormen nodig hebben:

A. Puntvormige emissie.

De spektrale verdeling $E(\lambda)$ van het uit een absorberende laag van dikte d tredende licht wordt gegeven door:

$$E(\lambda) = J(\lambda) e^{-a(\lambda)d} \quad \dots \quad (1a)$$

waarin: $J(\lambda)$ = spektrale verdeling van het primair uitgezonden licht, en $a(\lambda) = \ln \frac{I_0}{I}$, waarin $\frac{I}{I_0}$ de doorlating voorstelt van een 1 cm dikke laag van de absorberende stof voor een evenwijdige lichtbundel van golflengte λ .

Uit (1a) volgt:

$$J(\lambda) = E(\lambda) e^{a(\lambda)d} \quad \dots \quad (1b)$$

De gemeten verdeling $E(\lambda)$ wordt dus op absorptie gecorrigeerd door te vermenigvuldigen met de faktor $e^{a(\lambda)d}$.

B. Homogeen lichtende laag.

In een richting *loodrecht* op de laag wordt de intensiteit van het uit-tredende licht gegeven door:

$$E(\lambda) = J(\lambda) \int_0^d e^{-a(\lambda)x} dx \text{ of } E(\lambda) = J(\lambda) \frac{1 - e^{-a(\lambda)d}}{a(\lambda)} \quad (2)$$

We schrijven (2) in de gedaante:

$$J(\lambda) d = E(\lambda) \frac{a(\lambda)}{1 - e^{-a(\lambda)d}} \quad (3)$$

waarin $a(\lambda) = a(\lambda)d$.

De gemeten verdeling $E(\lambda)$ wordt dus op absorptie gecorrigeerd door te vermenigvuldigen met de faktor $\frac{a(\lambda)}{1 - e^{-a(\lambda)d}}$, waarin $a(\lambda) = \ln \frac{I_0}{I}$ en $\frac{I}{I_0}$

de doorlating voorstelt van de betreffende laag van dikte d voor een evenwijdige monochromatische lichtbundel van golflengte λ .

C. Tijdsafhankelijke absorptie en emissie.

Formule (1a) en (2) schrijven we in de gedaante:

$$E(\lambda) = J(\lambda) A(\lambda) \quad (4)$$

waarin $A(\lambda)$ het omgekeerde is van de korrektiefaktor.

Wanneer de absorptie en eventueel ook de emissie met de tijd veranderen, moeten we voor (4) schrijven:

$$E(\lambda, t) = J(\lambda) (F(t) A(\lambda, t)) \quad (4a)$$

waarbij we onderstellen, dat de *spektrale verdeling* der primaire emissie $J(\lambda)$ niet met de tijd verandert, wel de *intensiteit*. Dit wordt tot uitdrukking gebracht door de faktor $F(t)$.

We integreren (4a) over de tijd, die gebruikt is voor de opname:

$$\int_{t_1}^{t_2} E(\lambda, t) dt = J(\lambda) \int_{t_1}^{t_2} F(t) A(\lambda, t) dt$$

Hierin stelt het linkerlid de gemeten spektrale energieverdeling voor, $J(\lambda)$ de primaire emissie. De faktor voor absorptiecorrectie krijgt dus de gedaante:

$$\frac{1}{\int_{t_1}^{t_2} F(t) A(\lambda, t) dt},$$

waarin $F(t)$ = intensiteit der emissie als funktie van de tijd,

$A(\lambda, t)$ = omgekeerde van de korrektiefaktor als funktie van de tijd.

De korrektiefaktor kan in een bepaald geval numeriek berekend worden, wanneer de absorptie en de emissie als funktie van de tijd bekend zijn.

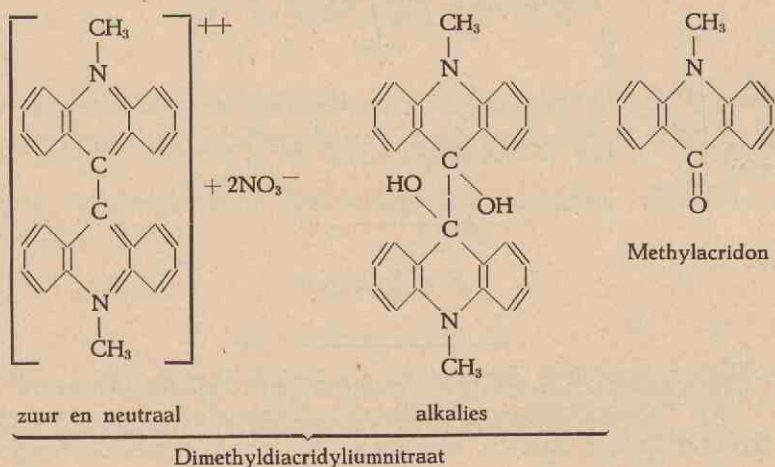
HOOFDSTUK IV

DE CHEMOLUMINESCENTIE VAN DIMETHYL- DIACRIDYLIUMNITRAAT

§ 1. Inleiding.

Dimethyldiacridyliumnitraat *) is een gele stof, die met een eveneens gele kleur in water oplost. Daarbij doet ze door een sterke groene fluorescentie veel denken aan fluoresceïne. De fluorescentie verdwijnt voor een deel, wanneer men de oplossing alkalies maakt, bijv. met een kleine hoeveelheid kaliumhydroxydoplossing. Voegt men nu wat waterstofperoxyd toe, dan gaat de gehele oplossing sterk groen lichten. Vooral wanneer men de concentratie aan „dimethyl” niet te klein neemt (ca 1 mg/cm³) is deze chemoluminescentie een buitengewoon indrukwekkend gezicht.

In alkalies milieu is „dimethyl” bij aanwezigheid van zuurstof instabiel. Dit komt doordat de chemoluminescente reactie ook reeds *zonder* peroxyd verloopt: de alkaliese oplossing licht bij kamertemperatuur zwak. Bovendien treedt er in het daglicht een *ontleding* op van de alkaliese oplossing (fotolyse), die waarschijnlijk zonder lichtemissie verloopt. Er vormt zich daarbij een bruin neerslag, dat hoofdzakelijk uit *methylacridon* blijkt te bestaan. Bij de chemoluminescente reactie vormt zich deze zelfde stof met een opbrengst van ca 10 %. De chemiese formules van dimethyldiacridyliumnitraat en methylacridon zijn hieronder weergegeven.



*) In het volgende zullen we dit vaak afkorten tot „dimethyl”. De bij sommige schrijvers voorkomende benaming *lucigenine* gebruiken we niet.

Bij temperaturen van 60° tot 100° C vertoont de chemoluminescentie een geheel ander beeld: Een alkaliese oplossing van „dimethyl” van een voldoende lage concentratie (ca 0.1 mg/cm^3) licht bij aanwezigheid van peroxyd bij kamertemperatuur zwak groenblauw. Verwarmt men deze oplossing in een reageerbuis boven de vlam, dan ziet men op de verwarmde plaatsen helder blauwe slierten ontstaan. Zodra de gehele vloeistof verwarmd is, licht ze gedurende korte tijd zeer intensief hemelsblauw. De kleur van deze chemoluminescentie verschilt zo opvallend van die bij lage temperatuur, dat men zich moeilijk anders kan voorstellen, dan dat men met twee geheel verschillende luminescentieverschijnselen te maken heeft. Dit zal ook inderdaad het geval blijken te zijn. Zoals in § 3 nader uiteengezet zal worden mag men echter deze gevolgtrekking niet zonder meer maken. Er treden namelijk twee storende processen op, die bij lage temperatuur de kleurindruk kunnen vervalsen: zelfabsorptie en chemofluorescentie door absorptie (zie blz. 24). De intensiteit van het licht bij lage temperatuur en bij zó lage concentraties, dat deze storende verschijnselen geen rol meer spelen, is te gering om de kleur te kunnen waarnemen. We kunnen daarom dit probleem alleen oplossen door de spektrale verdeling van het chemoluminescentielicht te bepalen. Dit wordt in § 4 beschreven.

Verwarmt men de met zuurstof verzadigde alkaliese oplossing *zonder* dat men er peroxyd aan toevoegt, dan treedt het kortdurende blauwe lichten eveneens op. De intensiteit is echter veel geringer. Maakt men de oplossing bovendien *zuurstofvrij*, dan licht ze bij verwarmen niet. Het „dimethyl” wordt dan tengevolge van de hoge temperatuur echter wel vernietigd, zoals blijkt bij toevoegen van peroxyd aan de afgekoelde oplossing: Het blauwgroene lichten blijft achterwege. *Behalve de chemoluminescente reactie treedt dus bij hoge temperatuur ook een snel verlopende donkere nevenreactie op.*

In § 2 en § 3 zullen we eerst de fluorescentie- en absorptieeigenschappen van „dimethyl” en van het reaktiemengsel behandelen, daar we deze in § 4 bij de bepaling en de bespreking van het chemoluminescentiespektrum nodig zullen hebben.

§ 2. Fluorescentie- en absorptieeigenschappen van dimethyldiacridylum-nitraat.

In fig. 10 is het absorptie- en het fluorescentiespektrum van een neutrale oplossing van dimethyldiacridylumnitraat weergegeven, uitgezet tegen de golflengte. Het absorptiespektrum is voor $\lambda > 3900 \text{ \AA}$ opgebouwd uit drie banden, resp. bij $4550 \text{ \AA}$, $4320 \text{ \AA}$ en $4100 \text{ \AA}$. In het fluorescentiespektrum kan men nog slechts *twee* banden onderscheiden, resp. bij $4800 \text{ \AA}$ en $5100 \text{ \AA}$.

Om na te gaan in hoeverre er aan de wet der spiegelsymmetrie is voldaan, zijn de spektra in fig. 11 uitgezet tegen het golfgetal voor

het golflengtegebied boven 3800 Å. De intensiteit in het fluorescentiespektrum is in quanten per sek. uitgedrukt.

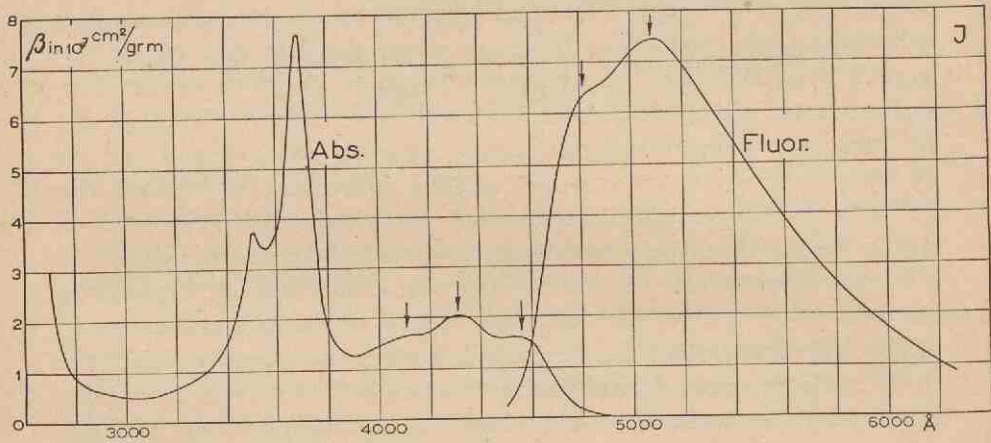


Fig. 10. Absorptie- en fluorescentiespektrum van dimethyldiacr. nitr.

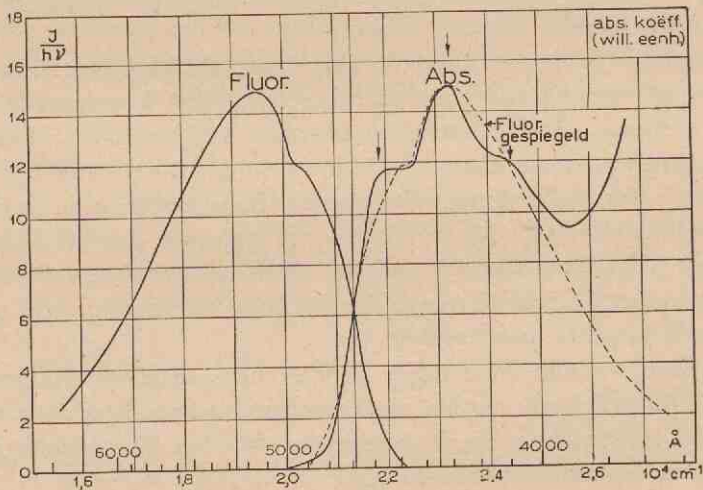


Fig. 11. Toetsing van de wet der spiegelsymmetrie voor dimethyldiacr. nitr.

Wanneer men de absorptiekromme en de gespiegelde fluorescentiekromme vergelijkt, krijgt men de indruk, dat mogelijk ook het fluorescentiespektrum opgebouwd is uit *drie* banden, die in sterker mate verbreed zijn dan in het absorptiespektrum het geval is. Hierdoor is de derde verdwenen en liggen de banden in het fluorescentiespektrum dichter bij elkaar dan in het absorptiespektrum. Dit laatste kan misschien teruggebracht worden tot het algemene verschijnsel, dat de afstand tussen de maxima van twee deelbanden *kleiner* wordt naarmate de verbreding toeneemt.

Met niet te veel moeite kan men aan fig. 11 de wet der spiegelsymmetrie herkennen, zij het ook dat er slechts *kwalitatief* aan is voldaan. Hierdoor is het mogelijk het absorptiespektrum enigermate te analyseren (zie blz. 16). Het absorptiegebied boven 3900 Å correspondeert met *één elektronenovergang*: dezelfde als bij de fluorescentie plaats heeft. Het gebied tussen 3000 en 3900 Å moet aan een tweede elektronenovergang worden toegeschreven, daar deze absorptie niet in het fluorescentiespektrum wordt weerspiegeld.

Het gebied beneden 3000 Å behoort waarschijnlijk bij een derde overgang *).

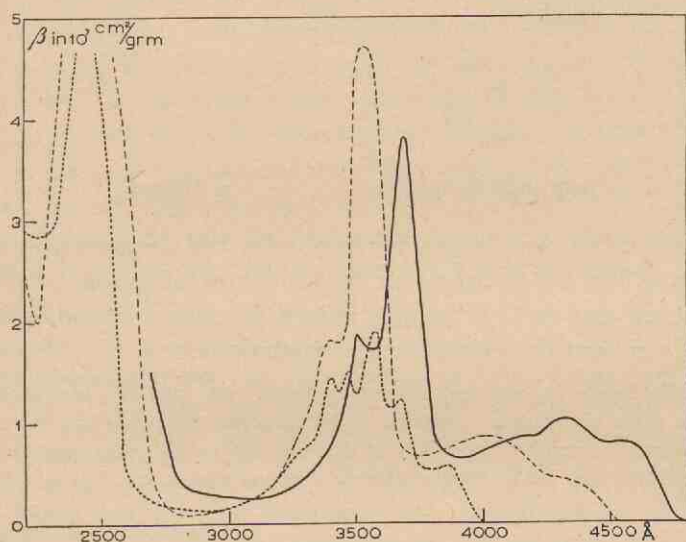
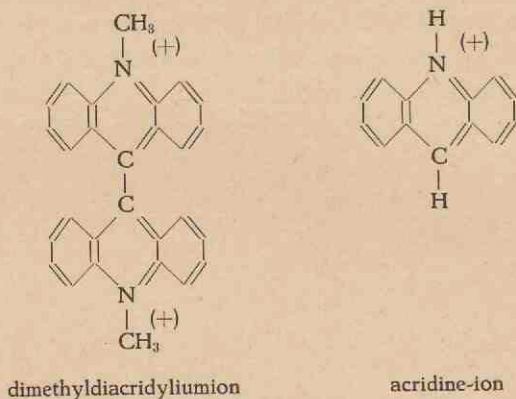


Fig. 12. ————— dimethyldiacr. nitr.
(halve schaal)
----- acridine-ion } volgens
..... acridine } Radulescu³⁷⁾ } absorptiespektra

We vragen ons nu af wat de aard is van de elektronenovergang, die met de fluorescentie is verbonden. Daartoe vergelijken we in fig. 12 het absorptiespektrum van dimethyldiacridylumnitraat met het door Radulescu³⁷⁾ bepaalde spektrum van het acridine-ion: De overeenkomst in bouw der spektra is zeer duidelijk. *We moeten hieruit besluiten,*

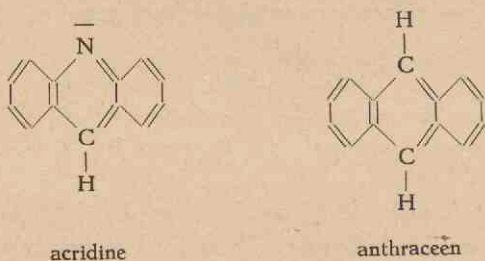
*) Zoals we in hoofdstuk I, § 7 reeds zagen wordt in vele gevallen de fluorescentie ook opgewekt in de absorptiebanden, die met overgangen naar hoger elektronentoestanden overeenkomen; dit is voor „dimethyl” eveneens het geval. Is daarbij het fluorescentierendement *afhankelijk* van de elektronenovergang, dan kan men met behulp van het rendement een analyse van het absorptiespektrum doorvoeren. Is daarentegen het rendement *konstant* (zie bijv. hoofdstuk V, § 10), dan vervalt deze mogelijkheid. De analyse met behulp van de spiegelsymmetrie in fluorescentie- en absorptiespektrum kan men dan nog *wel* toepassen.

dat de absorptie van het dimethyldiacridyliumion, zoals dat in de neutrale oplossing van het nitraat voorkomt, teruggebracht moet worden op de absorptie van het halve ion. Behoudens de methylgroep is dit identiek met het acridine-ion, zoals uit de hieronder weergegeven formules blijkt.



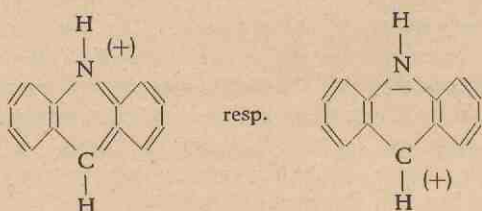
De verschuiving naar langer golflengte van het absorptiespektrum van het „dimethyl”ion ten opzichte van dat van het acridine-ion, moet worden toegeschreven aan de C-C binding tussen de twee molekuulhelften van „dimethyl” en aan de substitutie der methylgroepen.

In dezelfde figuur is ook het absorptiespektrum van acridine weergegeven, dat niet als ion maar als neutraal molecuul in de oplossing aanwezig is. Het absorptiespektrum hiervan verschilt belangrijk van dat van het ion. Het vertoont daarentegen veel overeenkomst met het absorptiespektrum van anthraceen (zie fig. 1).



Het absorptiegebied boven 3000 Å komt bij acridine en anthraceen overeen met slechts één elektronenovergang, zoals uit het fluorescentiespektrum blijkt.

Het verschil tussen acridine en het acridine-ion is gelegen in de positieve lading van de laatste. Deze kan zich zowel bij de N bevinden als bij de C:



Deze beide vormen maken deel uit van de grondtoestand van het molekuul. Een dergelijke structuur treedt bij acridine niet op. Dit molekuul is wat zijn elektronen-systeem betreft geheel gelijkwaardig aan anthraceen.

Men moet zich ons inziens voorstellen, dat de hierboven besproken elektronen-overgangen, die aanleiding geven tot absorptie in het golflengtegebied boven 3000 Å, overgangen zijn in het elektronensysteem van de driering *als geheel*. Voor anthraceen kon men dit langs quantenmechanische weg aantonen²⁾.

Voor dimethyldiacridylumnitraat werd nagegaan of het fluorescentiespektrum onafhankelijk was van de golflengte van het ingestraalde licht en wel voor de golflengten 2534 Å, 3650—3663 Å en 4356 Å. Deze werden met behulp van een kleine kwartsspektrograaf uit het licht van een hogedrukkwiklamp geïsoleerd. De drie fluorescentiespektra bleken binnen de nauwkeurigheid der fotografiese intensiteitsmeting volkomen identiek te zijn. We hebben hier dus te maken met het op blz. 18 besproken geval, dat de aanslag naar een hoger elektronenniveau gevolgd wordt door een stralingsloze overgang naar het lager liggende elektronenniveau van waaruit de fluorescentie plaats heeft. Daar het fluorescentierendement bij de drie golflengten van het ingestraalde licht niet werd gemeten, kunnen we niet zeggen of dit proces een waarschijnlijkheid van 100 % bezit of dat de aanslagenergie ook op andere wijze kan verdwijnen, bijvoorbeeld door een stralingsloze overgang direkt naar de grondtoestand.

Het absorptiespektrum van de *alkaliese* en van de *zure* oplossing valt geheel samen met dat van de neutrale. Naar alle waarschijnlijkheid geldt dit ook voor het *fluorescentiespektrum*. Met het oog beoordeeld hangt de kleur van het fluorescentielicht nl. niet af van de p_H der oplossing (verg. ook de noot onder aan blz. 39). Zoals we reeds in § 1 vermeldde, is de fluorescentieintensiteit van de alkaliese oplossing evenwel aanzienlijk geringer dan die van de neutrale nl. ca zes keer zwakker, terwijl er gelijktijdig fotolyse optreedt. Het is niet uitgesloten, dat het lage rendement der fluorescentie in de alkaliese oplossing veroorzaakt wordt doordat de fluorescentie en de ontleding van het aangeslagen molekuul concurrerende processen zijn.

In neutrale en zure oplossing is het het „dimethyl”ion, dat absorbeert en fluoresceert. In alkaliese oplossing neemt men als regel aan, dat het molekuul als carbinolbase aanwezig is (zie blz. 32). Dit zou betekenen, dat ion en carbinolbase *dezelfde* optiese eigenschappen zouden bezitten. Gezien de verschillende elektronenkonfiguratie komt ons dit vreemd voor. In hoeverre de gemaakte gevolgtrekking dan ook juist is, durven we niet te zeggen.

§ 3. Fluorescentie- en absorptieeigenschappen van methylacridon en van het reaktiemengsel.

In fig. 13 is het absorptie- en fluorescentiespektrum van methylacridon weergegeven, dat als eindprodukt bij de chemoluminescente reactie op-

treedt en bij de ontleding van de alkaliese oplossing van „dimethyl” onder invloed van licht ontstaat. In fig. 14 zien we, dat een toetsing van de wet der spiegelsymmetrie het verrassende resultaat levert, dat de symmetrie bijna volmaakt is. De relatieve hoogte van de twee hoofdmaxima is iets verschillend. Verder is in beide spektra bij ca 26800 cm^{-1} een uitbochtiging aanwezig, die wijst op de aanwezigheid van nog één of meer trillingsbanden.

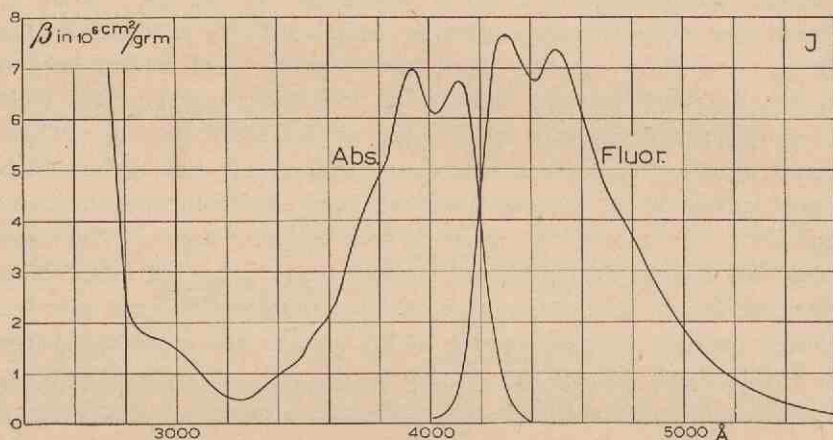


Fig. 13. Absorptie- en fluorescencespectrum van methylacridon.

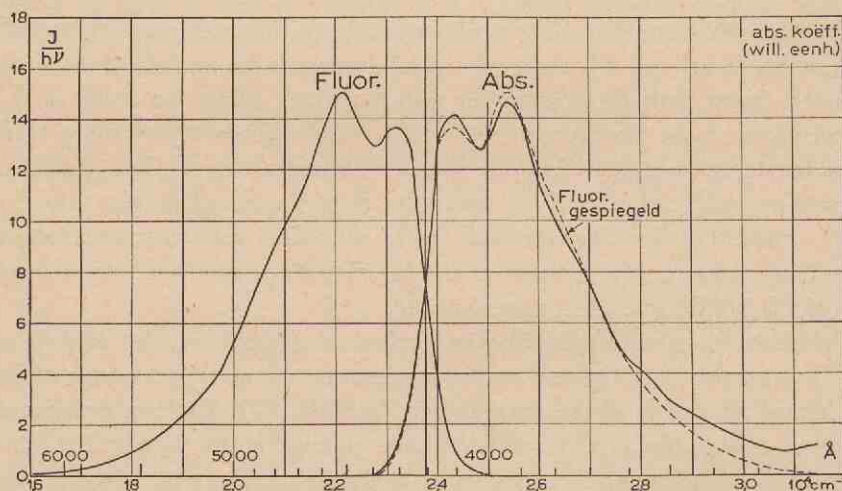


Fig. 14. Toetsing van de wet der spiegelsymmetrie voor methylacridon.

Het tweetoppig absorptiegebied in het nabije ultraviolet moeten we dus, zoals uit het fluorescencespectrum blijkt, toeschrijven aan één elektronenovergang. Beneden 3400 Å begint er een absorptie op te treden, die aan een elektronenovergang naar een hoger niveau moet worden toegeschreven.

Om na te gaan welke fluorescerende stoffen in het reaktiemengsel voorkomen, werd het fluorescentiespektrum opgenomen *tijdens* en *na* de reactie. De reactie werd uitgevoerd met een oplossing, waarin de concentratie aan „dimethyl” $8 \text{ } \gamma/\text{cm}^3$ bedroeg, aan KOH 0.024 n., aan H_2O_2 0.04 %. Veertig minuten na menging was de intensiteit der chemoluminescentie ongeveer op de halve beginwaarde gekomen en werd de oplossing gedurende vijf minuten voor de spektrograaf geplaatst en met de kwiklamp bestraald. Dit werd twaalf keer met verschillende oplossingen herhaald. De absorptie werd aan het begin en aan het eind van de vijf minuten gemeten en veranderde in die tijd slechts weinig. De absorptiecorrectie van het fluorescentiespektrum werd aangebracht met behulp van de gemiddelde waarde van de gemeten absorptie. Het feit, dat de oplossing tijdens de opname ook chemoluminescentie licht uitzendt, stoorde hier niet, daar de intensiteit ervan niet meer dan 1 % van de fluorescentieintensiteit bedroeg.

Het fluorescentiespektrum van de oplossing, zestien uur na het begin der reactie, werd eveneens opgenomen en bleek identiek te zijn met dat van methylacridon. Het fluorescentiespektrum van de oplossing *tijdens* de reactie bleek een lineaire combinatie te zijn van de spektra van dimethyldiacridylumnitraat en methylacridon.

*Hieruit volgt, dat in het reaktiemengsel alleen het „dimethyl” zelf en het gevormde methylacridon in merkbare mate fluoresceren *).*

§ 4. Chemoluminescentiespektrum van „dimethyl” bij lage temperatuur.

Bij hoge concentraties van „dimethyl” in het reaktiemengsel (ca $1 \text{ mg}/\text{cm}^3$) is de kleur van het chemoluminescentie licht *helder groen*. Naarmate men de concentratie verlaagt, wordt ze meer blauwgroen. Bij een zo lage concentratie, dat men nog juist de kleur kan waarnemen is deze eerder *blauw* dan groen. Ten dele kan dit berusten op het Purkinje-effekt: bij kleine intensiteiten wordt het oog voor blauw licht relatief gevoeliger. Grotendeels moet de waargenomen kleurverandering echter ons inziens worden toegeschreven aan de twee in § 1 genoemde storende effecten, namelijk:

1°. zelfabsorptie van het uitgezonden licht door het in de oplossing aanwezige „dimethyl” voor golflengten beneden 4800 Å ;

2°. chemofluorescentie door absorptie, waarbij het geabsorbeerde chemoluminescentie licht omgezet wordt in fluorescentie licht van „dimethyl”.

Bij de fotografiese bepaling van de spektrale samenstelling van het

*) Er is hier stilzwijgend aangenomen, dat het fluorescentiespektrum van „dimethyl” in alkaliese oplossing identiek is met het spectrum van de neutrale oplossing. Op blz. 37 hadden we reeds een aanwijzing voor de identiteit, terwijl het hier gevonden resultaat er een bevestiging van geeft.

uitgezonden licht kan men voldoende nauwkeurig op zelfabsorptie corrigeren en zodoende het eerste storende effect uitschakelen *). Het zo bepaalde spektrum is het *somspektrum* van het per volumeneenheid uitgezonden chemoluminescentie- en fluorescentielicht. We gaan nu na in welke verhouding deze componenten in het op absorptie gecorrigeerde spektrum aanwezig zijn:

We denken ons de gehele ruimte gevuld met een vloeistof die homogeen licht uitzendt van golflengte λ . De vloeistof absorbeert het licht van deze golflengte eveneens, zodat alle primair uitgezonden licht weer door de vloeistof wordt geabsorbeerd. De hoeveelheid licht, die per volumeneenheid wordt geabsorbeerd is in dit geval gelijk aan de hoeveelheid, die per volumeneenheid wordt uitgezonden. In een vloeistof echter, die zich in een vat van bepaalde afmetingen bevindt, is de absorptie per volumeneenheid *kleiner* dan de primaire emissie.

In ons geval wordt een geheel spektrum uitgezonden, waarvan alleen het licht van golflengten beneden $4800 \text{ \AA}$ door het in de oplossing aanwezige „dimethyl” wordt geabsorbeerd. Zoals uit het chemoluminescentiespektrum in fig. 15 zal blijken, wordt daardoor hoogstens de helft van het aantal uitgezonden quanten geabsorbeerd. Verder zagen we in § 2, dat het fluorescentierendement van de alkaliese oplossing van „dimethyl” ongeveer 15 % bedraagt van het rendement van de neutrale oplossing. Als bovenste grens voor het fluorescentierendement kunnen we dus 15 % opgeven. Het aantal quanten, dat per volumeneenheid als fluorescentielicht wordt uitgezonden, bedraagt daardoor maximaal 8 % van het aantal quanten, dat als chemoluminescentielicht wordt uitgezonden **).

Het fluorescentielicht van „dimethyl” ondergaat in de oplossing prakties geen absorptie en geeft daardoor geen aanleiding tot verdere fluorescentieprocessen, waarmee men eventueel rekening zou moeten houden. Ook treedt er geen fluorescentie op van het in het reactiemengsel gevormde methylacridon, daar deze stof niet absorbeert in het golflengtegebied, waarin het chemoluminescentielicht wordt uitgezonden.

Uit het voorgaande blijkt, dat tengevolge van het lage rendement der fluorescentie van „dimethyl” in alkalies milieu de *chemofluorescentie door absorptie, slechts een ondergeschikte rol kan spelen.*

*) Bij het aanbrengen der absorptiecorrectie volgens hoofdstuk III § 3 nemen we aan, dat de emissie *homogeen* is. Hieraan is niet geheel voldaan, wanneer er chemofluorescentie door absorptie optreedt. De per volumeneenheid geabsorbeerde energie en dus ook de per volumeneenheid als fluorescentielicht uitgezonden energie is namelijk afhankelijk van de plaats in het kuwet en van de vorm ervan. Dit is echter een tweede-orde effect en kan als regel verwaarloosd worden.

**) Door een geschikte keuze van de vorm van het reactievat en de concentratie van „dimethyl” kan men het effect nog aanzienlijk kleiner maken dan met de hierboven weergegeven maximale waarde overeenkomt: geen der afmetingen van het vat moet groter zijn dan nodig is, terwijl de concentratie zo laag mogelijk gehouden moet worden.

Behalve chemofluorescentie door absorptie, bestaat de mogelijkheid van chemofluorescentie door *overdracht* der reactieënergie aan een fluorescerend molecuul van de oplossing. Dat dit niet in merkbare mate optreedt, volgt uit de concentratie-afhankelijkheid van de lichtintensiteit. Deze is niet kwadratisch, zoals bij de indirecte chemoluminescentie het geval is (zie blz. 23), maar lineair.

Hieruit volgt, dat we te maken hebben met een directe chemoluminescentie, waarbij het emitterend molecuul reactieproduct is en in aangeslagen toestand ontstaat.

We geven nu de wijze van opnemen van het chemoluminescentiespektrum en het resultaat ervan kort weer:

De reactie werd uitgevoerd in een laagdikte van 8 mm bij een concentratie aan „dimethyl” van 0.15 mg/cm³, in 0.12 n KOH en 0.2 % H₂O₂. Het kuvet werd 20 sek. na menging gedurende 7 min. voor de spektrograaf geplaatst, in welke tijd de chemoluminescentie-intensiteit tot ongeveer de halve beginwaarde daalde. De reactie werd 150 keer herhaald zodat de opname zich over bijna 20 uur uitstreckte.

Het aanbrengen der absorptiecorrectie geschiedde volgens de in hoofdstuk III § 3 onder C beschreven methode (blz. 31), waarvoor de intensiteit en de absorptie van de oplossing als funktie van de tijd gemeten werden. Voor $\lambda > 4300 \text{ \AA}$ neemt de absorptiecoëfficiënt ongeveer even snel exponentieel af als de lichtintensiteit. Voor $\lambda < 4300 \text{ \AA}$ is de afname der absorptie langzamer, waarschijnlijk tengevolge van de vorming van andere absorberende stoffen. De korrektiefactor (blz. 31) bedroeg bij 4800 Å, 1.1; bij 4700 Å, 1.6; bij 4500 Å, 2.8 en voor $\lambda < 4350 \text{ \AA}$ ca 3.3. Voor de opname werd een spleetbreedte gebruikt van 0.3 mm. In het spektrum komt dit overeen met een golflengtegebied van 18 Å bij 4200 Å, 38 Å bij 5000 Å en 65 Å bij 6000 Å.

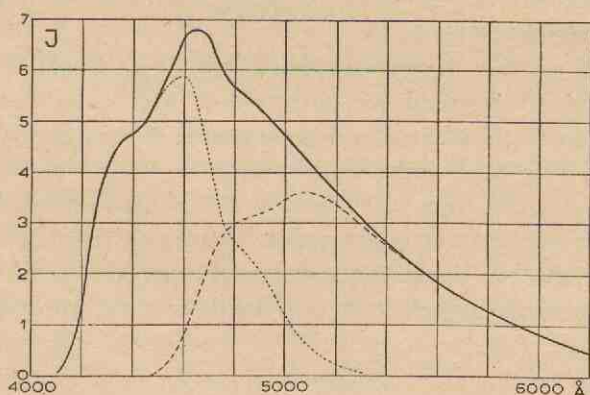


Fig. 15. Chemoluminescentiespektrum van dimethyldiacr. nitr. bij kamertemperatuur.

————— fluorescentiespektrum dimethyl
 blauwe component

} Analyse-krommen

Het resultaat van twee opnamen is in fig. 15 weergegeven. De nauwkeurigheid van dit spektrum is geringer dan men onder gunstige omstandigheden met de fotografiese intensiteitsmeting kan bereiken. De oorzaak hiervan is gelegen in de vrij grote absorptiecorrectie en in het feit dat het opgenomen spektrum vrij zwak was.

Bij het beoordelen van het spektrum moeten we er volgens het voorgaande mee rekening houden, dat het een somspektrum is van het eigenlijke chemoluminescentielicht en het na absorptie uitgezonden fluorescentielicht van „dimethyl”. De totale intensiteit van dit fluorescentielicht schatten we op hoogstens 4 % *) van die van het chemoluminescentielicht en kunnen we in eerste benadering verwaarlozen.

§ 5. Het bestaan van twee chemoluminescente processen bij de oxydatie van „dimethyl”.

Zoals uit het gemeten chemoluminescentiespektrum bij lage temperatuur blijkt, is er nog een belangrijke emissie in het blauwe deel van het spektrum. De kleur van het licht zou *groenblauw* zijn wanneer er geen absorptie optrad. Ze verschilt diensgevolge van de kleur der chemoluminescentie bij hoge temperatuur, die zeer bepaald *blauw* is.

We moeten hieruit besluiten, dat er tenminste twee verschillende chemoluminescente processen mogelijk zijn.

Een tweede aanwijzing hiervoor vinden we in de literatuur bij Gleu en Schaarschmidt³⁸⁾, die o.a. de chemoluminescentie van *diphenyldiacridylumnitraat* onderzochten. Ze namen daarbij het volgende waar: Bij lage concentraties aan „diphenyl” en peroxyd is de kleur der chemoluminescentie helder blauw. Laat men in een dergelijke *blauw* lichtende oplossing een druppel gekoncentreerd waterstofperoxyd vallen, dan krijgt men op die plaats een intensieve *groene* luminescentie. Hier hangt het blijkbaar van de peroxydkoncentratie af welke van de reacties de meest waarschijnlijke is.

In verband met het voorgaande heeft het zin te trachten een analyse van het in fig. 15 weergegeven spektrum te geven, daar het zeer goed mogelijk is, dat dit spektrum een superpositie is van de chemoluminescentiespektra van twee verschillende reacties.

Het blijkt nu, dat voor $\lambda > 5100 \text{ \AA}$ de spektrale verdeling van het door de oplossing bij kamertemperatuur uitgezonden licht dezelfde gedaante heeft als het fluorescentiespektrum van „dimethyl”. Trekt men dit van het gemeten spektrum af, dan houdt men een spektrum over, dat in fig. 15 als de „blauwe komponent” is aangegeven. Dit vertoont zekere

*) We nemen daarbij aan, dat het fluorescentierendement van de neutrale oplossing van „dimethyl” niet 100 % maar 50 % bedraagt. Een fluorescentierendement van bijna 100 % heeft men namelijk alleen nog waargenomen in zeer visceuze oplosmiddelen⁴²⁾. In waterig milieu is ze als regel kleiner.

overeenkomst met het fluorescentiespektrum van methylacridon, maar ligt ca. 50 Å meer naar het rood. Vergelijk fig. 13 en fig. 15. Hoewel het verschil tussen de spektra van deze blauwe component en dat van de fluorescentie van methylacridon vrij groot is, is het niet uitgesloten, dat ze bij een nauwkeuriger bepaling van de spektrale verdeling van het bij de chemoluminescente reactie uitgezonden licht, identiek zouden blijken te zijn.

Wanneer het emissiespektrum bij hoge temperatuur bekend is, zal het mogelijk zijn te zeggen of aan de gegeven analyse de betekenis mag worden gehecht van een *analyse van het spektrum in de spektra der afzonderlijke reacties*. Het emissiespektrum bij hoge temperatuur moet in dat geval uit *dezelfde* twee componenten zijn opgebouwd in andere intensiteitsverhouding; eventueel kan het identiek zijn met dat van de blauwe component.

In deze gedachtengang voortgaande, moeten we ons dan voorstellen, dat bij de ene chemoluminescente reactie het „dimethyl” molecuul in aangeslagen toestand ontstaat en zijn fluorescentielicht uitzendt (zie ook § 6); bij de andere reactie een ander molecuul (methylacridon?), dat de blauwe component als fluorescentielicht uitzendt.

Tenslotte merken we naar aanleiding van deze onder groot voorbehoud gegeven analyse nog op, dat de groene component van het spektrum niet kan worden toegeschreven aan chemofluorescentie door overdracht van reactieënergie aan het „dimethyl” molecuul, daar we hier te maken hebben met een *direkte* chemoluminescentie, zoals we op blz. 41 reeds opmerkten naar aanleiding van de lineaire concentratie-afhankelijkheid van de intensiteit van het uitgezonden licht.

§ 6. Reaktiemechanisme en emitterend molecuul.

We zullen hier kort weergeven, welke reaktiemechanismen men in de loop van de tijd heeft voorgesteld, om na te gaan in hoeverre deze in overeenstemming zijn met de door ons gevonden feiten.

Volgens Gleu en Petsch³⁹⁾ komt de reactie neer op een oxydatie van het „dimethyl” door peroxyd, gevolgd door een reductie, eveneens door peroxyd, waarbij het „dimethyl” teruggevormd wordt. Het ontstaat daarbij in aangeslagen toestand en zendt het fluorescentielicht van „dimethyl” uit. Uiteindelijk komt deze reactie neer op een splitsing van waterstofperoxyd in water en zuurstof, waarbij „dimethyl” als katalysator optreedt. De energie van het lichtquant zou dus afkomstig zijn van de ontleding van peroxyd.

Ook door Tamamushi en Akiyama⁵⁰⁾ is een reaktieschema opgesteld, dat in wezen hetzelfde is.

Dat er in het proces een reductietrap is ingeschakeld zou volgen uit de waarneming, dat men de chemoluminescentie ook te voorschijn kan roepen bij afwezigheid van peroxyd met een sterk reductiemiddel en

zuurstof. Men schrijft dit echter ook wel toe aan een intermediaire vorming van peroxyd.

Het reactieschema volgens Gleu en Petsch verkreeg een grote waarschijnlijkheid toen Eymers en van Schouwenburg⁴⁰⁾ het chemoluminescentiespektrum van „dimethyl” bepaalden en vonden, dat dit identiek was met het fluorescentiespektrum. Daar ze echter met een hoge concentratie aan „dimethyl” werkten en geen correctie aanbrachten voor absorptie moet de identiteit van de door hen bepaalde spektra toegeschreven worden aan een prakties volledige absorptie van het blauwe deel van het chemoluminescentielicht.

Tot op zekere hoogte is het door ons bepaalde spektrum in *tegenspraak* met de opvatting, dat bij de chemoluminescente reactie het „dimethyl”-molekuul aansprakelijk is voor de lichtemissie. Immers, het chemoluminescentiespektrum is *niet* identiek met het fluorescentiespektrum van „dimethyl”. Wanneer het echter blijkt, dat de in de vorige paragraaf gegeven analyse juist is, en één van de chemoluminescente processen een spektrum heeft, dat identiek is met het fluorescentiespektrum van „dimethyl”, dan kan het voorgestelde reaktiemechanisme voor dit proces in ere hersteld worden. Op het ogenblik kan men daar echter niets van zeggen.

Daarnaast bestaat de mogelijkheid, dat we bij lage temperatuur met slechts één reactie te maken hebben. In dat geval zal men het gemeten spektrum in zijn geheel moeten toeschrijven aan de emissie door een bepaald molekuul, waarschijnlijk een tussenprodukt. Vanuit dit standpunt kan men opmerken, dat het ongeanalyseerde chemoluminescentiespektrum, zoals dat in fig. 15 is weergegeven, overeenkomst vertoont met het fluorescentiespektrum van „dimethyl” in fig. 10 en zeer goed het emissiespektrum kan zijn van een aan „dimethyl” verwant molekuul. Het is namelijk opgebouwd uit drie banden, zoals we in § 2 ook voor het fluorescentiespektrum van „dimethyl” vonden. Het chemoluminescentiespektrum ligt als geheel bij korter golflengte dan het fluorescentiespektrum.

Het lijkt ons echter waarschijnlijker, dat bij lage temperatuur twee reacties naast elkaar voorkomen en we dus met een *mengspektrum* te maken hebben.

We komen tenslotte tot de gevolgtrekking, *dat verdere spektrale onderzoeken nodig zijn om over het emitterend molekuul en het reaktiemechanisme definitieve uitspraken te kunnen doen, in het bijzonder bij hoge temperatuur.*

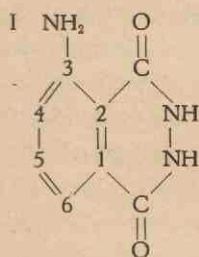
HOOFDSTUK V

DE CHEMOLUMINESCENTIE DER PHTAALZUUR- HYDRAZIDEN EN VAN PYROMELLIETZUURHYDRAZIDE.

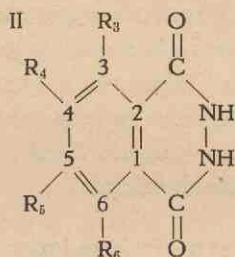
EXPERIMENTEEL GEDEELTE.

§ 1. Inleiding.

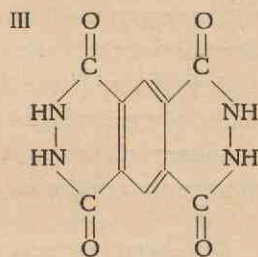
De oxydatie van 3-aminophtaalzuurhydrazide (I), ook wel *luminol* genoemd, in alkaliese oplossing is een der bekendste chemoluminescente reakties. Het uitgezonden licht is zeer sterk en helder blauw van kleur.



3-aminophtz. hydr.



gesubst. phtz. hydr.



pyromellietz. hydr.

Niet alleen het 3-aminophtaalzuurhydrazide is chemoluminescent, maar *alle* phtaalzuurhydraziden (II) vertonen het verschijnsel der chemoluminescentie in meer of minder mate. Afhankelijk van de substituenten, die men in de benzolring op de plaatsen 3, 4, 5 en 6 invoert, varieert de kleur van het uitgezonden licht van *violet* tot *blauwgroen*. Dit feit maakt het aantrekkelijk aan deze groep stoffen de invloed na te gaan van een kleine verandering in het molekuul — nl. de substitutie van een bepaalde groep in de benzolring — op het chemoluminescentiespektrum. Met dit doel werd het spektrale onderzoek van de chemoluminescentie der phtaalzuurhydraziden dan ook opgezet.

In de loop der jaren zijn, in het bijzonder door Drew⁴¹⁾ een betrèkkelijk groot aantal derivaten van phtaalzuurhydrazide bereid en werd door enkele onderzoekers de kleur en intensiteit der chemoluminescentie van deze derivaten vastgesteld⁴¹⁻⁴⁴⁾. De *kleur* geeft echter alleen aanwijzingen betreffende de spektrale ligging van het maximum van emissie, voor zover er geen storende absorptie optreedt. Van de *spektrale energie-*

verdeling zijn in de literatuur slechts drie opgaven aanwezig, die alle betrekking hebben op 3-aminophtaalzuurhydrazide ^{40, 45, 46}). Van enkele andere derivaten werden ook *fotometerkrommen* gepubliceerd van gefotografeerde spektra ^{47, 48}). Deze zijn echter voor ons doel van niet meer waarde dan de opgave van de kleur van het uitgezonden licht. Het was om deze reden een buitengewoon gelukkige omstandigheid, dat wij Prof. H. D. K. Drew van Queen Mary College, Londen bereid vonden ons kleine hoeveelheden van de door hem bereide en reeds op chemoluminescent vermogen onderzochte gesubstitueerde phtaalzuurhydraziden af te staan. Het is ons een behoefte Prof. Drew ook hier ter plaatse onze zeer welgemeende dank te betuigen voor deze voor ons zo belangrijke medewerking.

Doordat Prof. Dr. J. P. Wibaut zo vriendelijk was een kleine hoeveelheid mellietzuur af te staan, was bovendien Dr. G. J. M. van der Kerk in de gelegenheid enig *pyromellietzuurhydrazide* (III) voor ons te vervaardigen, waarvan bekend is, dat het eveneens chemoluminescent is met een gele kleur van het uitgezonden licht.

Behalve het *chemoluminescentiespektrum*, werden van deze elf stoffen ook *fluorescentie-* en *absorptiespektra* opgenomen, met het doel de invloed der substitutie in de benzolring na te gaan op de ligging der energieniveau's in de bekende uitgangsstof. Door de invloed op het chemoluminescentiespektrum hiermede te vergelijken was het de bedoeling iets naders te weten te komen van de aard van het bij de chemoluminescente reactie emitterende molecuul.

§ 2. De chemoluminescente reactie in homogeen milieu.

De meest gebruikelijke wijze om de phtaalzuurhydraziden onder licht-emissie te oxyderen is door aan de alkaliese oplossing van de hydraziden waterstofperoxyd en een sterk oxydatiemiddel, bv. natriumhypochloriet toe te voegen. Het oxydatiemiddel kan men ook vervangen door een katalysator, d.w.z. een stof, die uit peroxyd zuurstof vrijmaakt, resp. deze daarin aktiveert, zoals kaliumferricyanide, koperzouten, haemine en peroxydase uit aardappelen. Afhankelijk van de p_H der oplossing en de concentraties aan peroxyd en oxydatiemiddel of katalysator verkrijgt men een *korte sterke* lichtemissie of een *langdurig zwak* lichten der oplossing. Vooral met haemine en peroxyd verloopt bij 3-aminophtaalzuurhydrazide de reactie onder de emissie van een fraai intensief blauw licht.

Peroxyd speelt steeds een essentiële rol in zoverre dat naast het oxydatiemiddel of de katalysator de aanwezigheid ervan steeds nodig is om een *sterke* lichtemissie te verkrijgen. Peroxyd alléén is echter niet voldoende: voegt men geen katalysator of oxydatiemiddel toe, dan licht de alkaliese oplossing van 3-amino met peroxyd slechts zwak. De intensiteit van dit licht neemt toe bij verhoging der temperatuur.

§ 3. De chemoluminescente reactie bij de elektrolysemethode.

De door ons gevolgde methode voor het opnemen der chemoluminescentiespektra werd het eerst beschreven door Harvey⁴⁹⁾ en wijkt enigszins van die in homogeen milieu af. Ze bestaat uit het elektrolyseren van de met KOH alkalies gemaakte oplossing van het hydrazide, waaraan wel waterstofperoxyd maar geen oxydatiemiddel of katalysator is toegevoegd. De aan de anode gevormde atomaire zuurstof speelt dan de rol van het oxydatiemiddel. Men bereikt hierdoor, dat de chemoluminescente reactie alleen plaats heeft in een dun vloeistofhuidje om de anode, in tegenstelling tot de andere methoden, waarbij de gehele vloeistof homogeen licht. Ook kan men de reactie elk ogenblik stopzetten, nl. door de elektrolyse te onderbreken. Een verder voordeel van deze methode is, dat het door een lens gevormde beeld van de lichtende anode gebruikt kan worden als spleet van de spektrograaf, zodat alle geëmitteerde licht, voor zover de openingshoek van de spektrograaf dat toelaat, gebruikt wordt voor het vormen van het spektrum. Bij de andere methoden zou men dit alleen kunnen bereiken door gebruik te maken van een zeer smal kuvet. Daar we van de meeste derivaten slechts over zeer kleine hoeveelheden, variërend tussen 70 en 1000 mgr beschikten, was de elektrolysemethode wel de meest aangewezen. Een laatste voordeel van praktische aard is, dat eenzelfde oplossing gedurende lange tijd gebruikt kan worden. Deze bedroeg maximaal 24 uur en zou in beginsel nog verlengd kunnen worden door van een groter volumen oplossing uit te gaan. Echter gaat dan het stofverbruik, tengevolge van het altijd aanwezige zwakke homogene lichten, overwegen op het verbruik aan de anode.

De intensiteit van het licht aan de anode neemt snel af, wanneer er niet voor een voortdurende verversing van de vloeistof om de anode wordt gezorgd. Dit werd bereikt door de stilstaande elektroden te plaatsen in een glazen kuvet, dat op een wagentje heen en weer werd bewogen met behulp van een motor.

De intensiteit van het licht is afhankelijk van de concentraties aan alkali, peroxyd en hydrazide, van de stroomsterkte en van de aard van de anode. Een glad oppervlak levert beter resultaten dan een ruw. Metaalelektroden verkleuren op den duur en zouden door selectieve reflectie vertekening van het spektrum geven. Daarom werden kool-elektroden gebruikt: Faber potloodstiften van 0,8 mm dikte.

Als funktie van de stroomsterkte en de alkalikonzentratie gaat de lichtintensiteit door een maximum. De optimale alkalikonzentratie *) ligt bij 5 à 10 keer de concentratie van het hydrazide. De optimale lichtintensiteit is *onafhankelijk* van de peroxydkonzentratie, wanneer deze groter is dan die van het hydrazide. Ze neemt evenredig met de peroxyd-

*) Er worden hier *molaire* concentraties bedoeld.

koncentratie af, wanneer deze kleiner dan die van het hydrazide wordt. Op deze waarneming komen we in § 18 nog terug. Tenslotte is de lichtintensiteit onder optimale omstandigheden evenredig met de hydrazide-koncentratie, wanneer deze van de orde van 10^{-2} gm/cm³ of kleiner is.

§ 4. Het opnemen van het chemoluminescentiespektrum.

De lichtende anode werd afgebeeld in het midden van de wijd geopende voorspleet van de spektrograaf, zodat het anodebeeld de rol van de spleet vervulde. Dit werd gedaan om de spektrale vertekening te ondervangen, die optreedt tengevolge van de chromatiese aberratie van de afbeeldende lens. Deze gaat een rol spelen, wanneer de breedte van het beeld van het lichtend objekt van dezelfde grootteorde wordt als de spleetbreedte. Door de anode vergroot of verkleind af te beelden werd hetzelfde bereikt als men anders door spleetbreedtevariatie verkrijgt. De zeer zwakke spektra werden opgenomen met een twee keer vergrote afbeelding, overeenkomend met een spleetbreedte van 1,6 mm, de sterkere met een twee keer verkleinde afbeelding, overeenkomend met een spleetbreedte van 0,4 mm. Voor de zeer zwakke spektra werd bovendien de uittredeopening van de spektrograaf en daarmee ook de fotografiese lichtsterkte vier keer vergroot door de lens, die het spektrum afbeeldt, te verdubbelen (zie hoofdstuk III, blz. 28). De belichtingstijd bedroeg in dat geval toch nog acht etmalen.

In alle gevallen bleek het noodzakelijk de gemeten chemoluminescentiespektra te corrigeren op de absorptie, die het licht ondergaat bij het doorlopen van de vloeistoflaag tussen elektrode en kuwetwand. De absorptie van de oplossing neemt naar het ultraviolet snel toe. Naarmate de oplossing langer gebruikt is, neemt de absorptie bij bepaalde golflengte geleidelijk af, aangevende dat het hydrazide bij de elektrolyse verbruikt wordt. Het bleek voldoende nauwkeurig de *gemiddelde* absorptiecoëfficiënt van de oplossing vóór en na gebruik in rekening te brengen voor het bepalen van de absorptiecorrectiefactor, e^{ad} . In de meeste gevallen werd de correctie eerst merkbaar in de naar het violet aflopende tak van het emissiespektrum, terwijl de hydrazidekoncentratie zó gekozen werd, dat de correctiefactor voor de bij de kleinste golflengten gelegen punten niet groter werd dan 1,20. Aanvankelijk gebruikten we een afstand van de anode tot de glaswand van ca. 0,8 mm en brachten de correctie aan voor een laagdikte van 1 mm, rekening houdend met de dikte van de anode. Om bij de zwakst lichtende hydraziden de concentratie te kunnen opvoeren en de belichtingstijd te verkorten, brachten we de correctiefactor tot een minimum terug door de elektrode vlak langs de glaswand te laten lopen en een laagdikte van $\frac{1}{4}$ mm in rekening te brengen. De grootste onnauwkeurigheid in de absorptiecorrectie is in dat geval afkomstig van de laagdikte, die men in rekening moet brengen.

Voor het nitrophtaalzuurhydrazide en het pyromellietzuurhydrazide

bedroeg de absorptiecorrectie voor $\lambda < 4100 \text{ \AA}$ meer dan 20%. Wegens de betrekkelijk grote onnauwkeurigheid in de correctiefactor ligt daarvoor het maximum van de emissiekromme van het nitrophthaalzuurhydrazide niet voldoende vast. Voor het gekorrigeerde spektrum ligt dit bij $4020 \text{ \AA}$, voor het niet-gecorrigeerde spektrum bij $4130 \text{ \AA}$.

Voor dit hydrazide was het noodzakelijk bij de elektrolyse de elektroden te *scheiden*, daar tengevolge van de reductie aan de kathode uit 3-nitrophthaalzuurhydrazide kleine hoeveelheden van het tienduizend keer sterker chemoluminescente 3-aminophthaalzuurhydrazide wordt gevormd. Dit uit zich daarin, dat na verloop van tijd de sterkte van het licht aan de anode toeneemt en aanzienlijk groter wordt dan de oorspronkelijke lichtintensiteit. De scheiding geschiedde door de elektroden in verschillende kuvetten te plaatsen, die door een agarbrug verbonden werden.

Iets dergelijks treedt op bij het Na 3-hydrazino β -sulfonaat, waar ook bij gescheiden elektroden de anode-intensiteit door een maximum gaat. Waarschijnlijk hebben we hier te maken met een *oxydatie* van de substituent, waardoor het hydrazide in een sterker chemoluminescent hydrazide overgaat. Het bepaalde spektrum wordt daarom met enig voorbehoud gegeven.

§ 5. Chemoluminescentiespektra der phtaalzuurhydraziden.

In de figuren 16, 17 en 18 zijn de spektra weergegeven van de tien phtaalzuurhydraziden, waaronder het ongesubstitueerde phtaalzuurhydrazide zelf, voorts acht hydraziden met een substituent op de 3-plaats

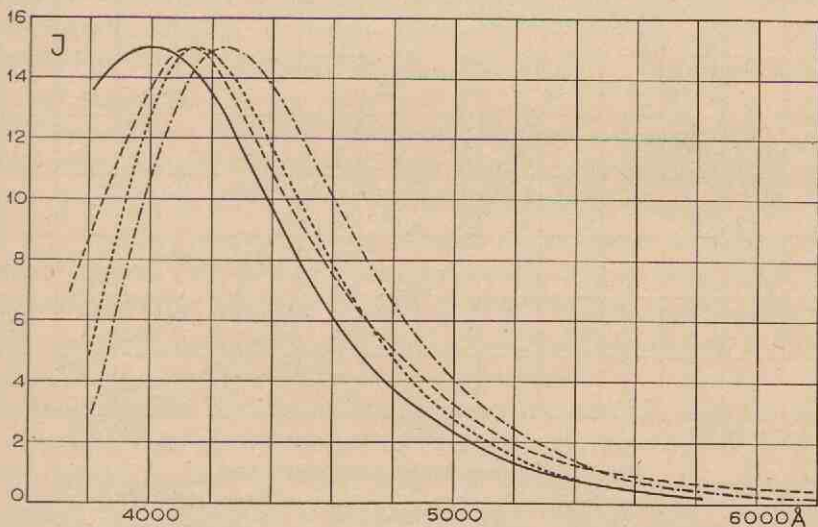


Fig. 16. Chemoluminescentiespektra van:

- | | | | |
|-----|---------------------|-----------|----------------------|
| — | phtaalzuurhydrazide | | 3-hydroxyphtz. hydr. |
| --- | 3-nitrophtz. hydr. | - . - . - | 3-aminophtz. hydr. |

in de benzolring, o.a. het 3-aminophtaalzuurhydrazide en tenslotte het phtaalzuurhydrazide met de aminogroep op de 4-plaats. Ter vergelijking is in alle drie de figuren het spektrum van 3-amino opgenomen.

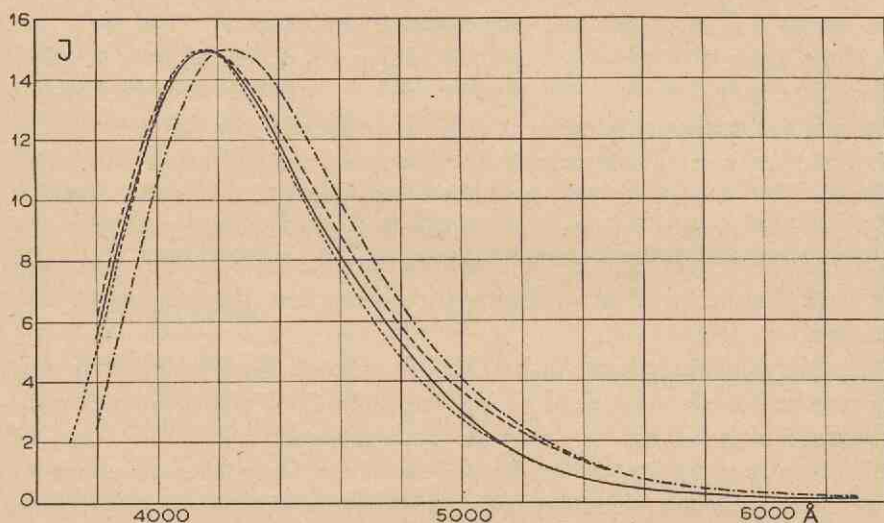


Fig. 17. Chemoluminescentiespektra van:

- | | |
|-------------------------------|-------------------------------|
| ----- 3-hydroxyphthz. hydr. | ———— 4-aminophthz. hydr. |
| - . - . - 3-broomphthz. hydr. | - . . . - 3-aminophthz. hydr. |

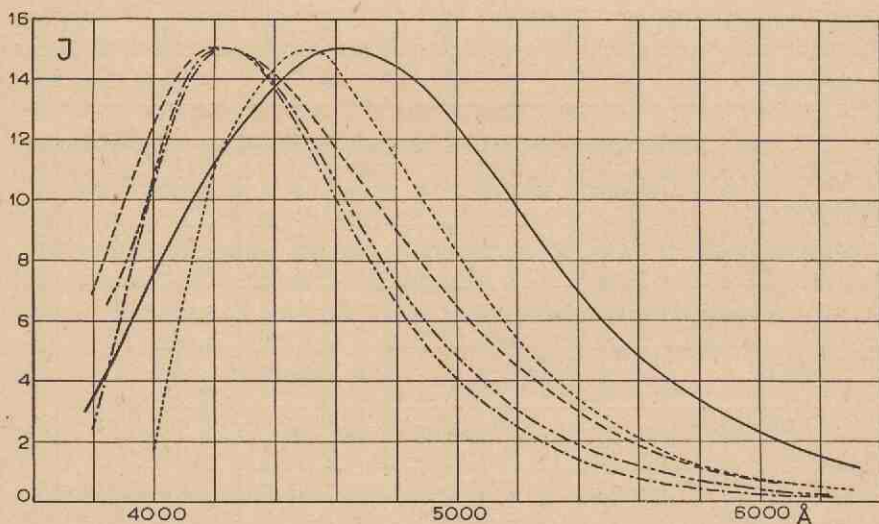


Fig. 18. Chemoluminescentiespektra van:

- | | |
|---|------------------------------------|
| - . . . - 3-aminophthz. hydr. | ----- 3-acetamidophthz. hydr. |
| ----- 3-methylaminophthz. hydr. | ———— 3-acetylcarbamidophthz. hydr. |
| Na 3-hydrazino β-sulf. phthz. hydr. | |

In tabel I zijn enkele gegevens van deze spektra verzameld.

TABEL 1.

Stof	Substituent	$\lambda_{\max}$	λ_1	λ_2	Halfw. breedte $\lambda_2 - \lambda_1$	Int.	Breedte v.h. anode-beeld in mm
3-Nitro Ongesubst.	phtz. hydr. —NO ₂	4020 Å	?	4510 Å	?	0,01	1,6
3-Hydroxy	" " —H	4125	3760 Å	4600	840 Å	0,02	1,6
3-Broom	" " —OH	4160	3860	4620	760	20	0,8
4-Amino	" " —Br	4170	3840	4680	840	1	0,8
3-Amino	" " —NH ₂	4175	3850	4645	795	4	0,8
	" " —NH ₂	4240	3920	4740	820	100	0,4
Na 3-Hydrazino β-sulfonaat	$\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{H} \\ \quad \\ -\text{N}-\text{N}-\text{SO}_3\text{Na} \end{array}$	4240	3900	4790	890	0,2	1,6
3-Acetaamido	$\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{O} \\ \quad \\ -\text{N}-\text{C}-\text{CH}_3 \end{array}$	4240	3810	4910	1100	1	0,8
3-Methylamino	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ -\text{N}-\text{CH}_3 \end{array}$	4510	4110	5040	930	60	0,4
3-Acetyl carbamido	$\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{O} \quad \text{H} \quad \text{O} \\ \quad \quad \quad \\ -\text{N}-\text{C}-\text{N}-\text{C}-\text{CH}_3 \end{array}$	4625	4000	5360	1360	2	0,8
Pyromellietzuur hydrazide (A ₁)	—	5400	4330	6260	1930	0,2	1,6
R ₄ : R ₃ -phtz. hydr. (A ₂)	—	4170	3960	4660	700	> 0,2	1,6

In kolom 2 vindt men van elke substituent de chemiese formule. In kolom 4 en 5 stellen λ_1 en λ_2 de golflengten voor, waar de energie in het spectrum de helft is van de waarde in het maximum. Het verschil van deze golflengten, weergegeven in kolom 6 is de zg. *halfwaardebreedte* van het spectrum.

De intensiteiten in kolom 7 zijn visueel bepaald. De lichtende anode werd daarbij vergeleken met een door een lampje plus blauw filter verlichte witte naald, waarvan de belichtingssterkte op bekende wijze kon worden gevarieerd door regeling van de stroom door het lampje. De nauwkeurigheid van deze meting bedraagt niet meer dan 100 %. De intensiteit van het 3-amino is daarbij willekeurig op 100 gesteld. De andere intensiteiten gelden voor *gelijke* concentraties van het hydrazide onder optimale omstandigheden.

Met behulp van deze ruwe intensiteitsmeting was het mogelijk direct de juiste belichtingstijd te kiezen voor de fotografiese opname van het spectrum. In beginsel is het mogelijk om achteraf uit deze opname de intensiteit van de chemoluminescente reactie nauwkeuriger te bepalen door het verkregen spectrum te vergelijken met de zwartingsmerken, voor welke de intensiteit in absolute waarde bekend is. De intensiteit van de anode is echter vrij sterk afhankelijk van het oppervlak van de

anode en van andere factoren, die men niet in de hand heeft. Daardoor was de sterkte van het licht tijdens de opname ver van konstant en had een nauwkeuriger intensiteitsmeting weinig zin. Alleen voor 3-amino voerden we de berekening *wel* uit, nl. om een schatting van de absolute waarde van het *quantenrendement* te kunnen maken. Hiervoor vonden we de waarde van $0,4\%$, d.w.z.:

Per tienduizend molekulen 3-amino, die bij de reactie worden verbruikt, worden slechts vier quanten als chemoluminescentielicht uitgezonden. De quantenopbrengst per aan de anode gevormd zuurstofatoom is nog ca. 10 keer kleiner.

De phtaalzuurhydraziden zijn in de tabel gerangschikt naar de ligging van het maximum van emissie. Voor het 3-nitrophtaalzuurhydrazide ligt dit bij de kleinste golflengte, daarop volgt het phtaalzuurhydrazide zelf, daarop het 3-hydroxy, 3-broom en 4-amino met prakties dezelfde ligging van het maximum (fig. 17), daarop het 3-amino, Na 3-hydrazino β -sulfo-naat en het 3-acetamido, daarop het methylamino en tenslotte het 3-acetylcarbamido (fig. 18). We willen hier alleen nog op het volgende wijzen:

De spektra van de hydraziden met de amino- of een daarvan afgeleide groep op de 3-plaats zijn het verst naar het rood verschoven ten opzichte van het ongesubstitueerde hydrazide en vertonen de grootste halfwaardebreedten. We komen later hierop nog terug.

Het spektrum van het 3-aminophtaalzuurhydrazide is het gemiddelde van drie verschillende opnamen. De afwijking der afzonderlijke spektra ten opzichte van het gemiddelde bedroeg maximaal 5 %. Het spektrum van het 4-aminophtaalzuurhydrazide is het gemiddelde van twee verschillende opnamen die onderling maximaal 5 % verschilden. De overige spektra zijn afkomstig van telkens één opname, waarbij van één stof drie spektra gelijktijdig opgenomen werden door de anode af te beelden in het midden van een trapspleet met drie treden, die verschillend lang belicht werden. De in de figuren weergegeven spektra zijn steeds de gemiddelden van deze drie spektra. De nauwkeurigheid moeten we op ca. 5 % stellen. Voor $\lambda < 4000 \text{ \AA}$ is de nauwkeurigheid geringer tengevolge van het steile verloop der apparaatgevoeligheid, welke veroorzaakt wordt door een afnemende plaatgevoeligheid en door een toenemende absorptie van het licht bij afnemende golflengte door de glasdelen van de spektrograaf. Een kleine fout in de golflengtebepaling veroorzaakt daardoor een betrekkelijk grote fout in de energie, terwijl tevens in dat gebied de energie als regel bepaald werd met behulp van kleine zwartingen.

§ 6. Vorm en nauwkeurigheid der spektra.

Legt men door de meetpunten een vloeiende kromme zonder neven-

maxima, dan spreiden de punten om deze kromme maximaal 5 %. Hieruit mogen we besluiten, dat binnen de bereikte nauwkeurigheid van ca. 5 % geen nevenmaxima of aanwijzingen daarvoor aanwezig zijn.

Behalve met de nauwkeurigheid van de fotografiese intensiteitsmeting hebben we echter bij het beoordelen der spektra ook te maken met de *vertekening* door de apparaatkromme, die in ons geval geheel wordt bepaald door de breedte van het anodebeeld. In de laatste kolom van tabel 1 is deze breedte opgegeven bij de opname der verschillende chemoluminescentiespektra, terwijl in tabel 2 de hiermee korresponderende golflengtegebieden zijn opgegeven bij vier golflengten in het spektrum.

TABEL 2.

λ	Spleetbreedte		
	0,4 mm	0,8 mm	1,6 mm
3800 Å	17 Å	34 Å	68 Å
4200	25	50	100
5000	50	95	190
6000	85	170	340

Binnen deze gebieden verwachten we geen fijnstructuur van het chemoluminescentiespektrum, gezien de aard van het weliswaar nog onbekende emitterende molekuul. Een steun hiervoor is gelegen in de absorptiespektra der phtaalzuurhydraziden, die met groter golflengtenauwkeurigheid bepaald konden worden en geen fijnstructuur van deze orde vertonen. In § 11 komen we op deze kwestie nog terug.

In een kontinu spektrum is op een helling de vertekening tengevolge van de spleetbreedte van de tweede orde, in maxima en minima van de eerste orde. Vergelijking van de golflengtegebieden uit tabel 2 met de spektra in de figuren 16, 17 en 18 leert, dat de energie in de maxima hoogstens 1 % te laag is bepaald door de optredende vertekening. Dit geldt ook voor eventuele bredere nevenmaxima, die na de vertekening buiten onze waarneming vallen.

Tenslotte is er nog één oorzaak voor vertekening aanwezig, die de gedaante van het spektrum kan hebben gewijzigd, nl. in die gebieden, waar de apparaatgevoeligheid sterk verloopt in het met de spleetbreedte overeenkomende golflengtegebied. Dit is het geval voor $\lambda < 4000$ Å. Berekening aan de hand van een bepaald geval, nl. dat van het spektrum van phtaalzuurhydrazide bij een spleetbreedte van 1,6 mm leert, dat de energie bij 4000 Å 2 %, bij 3900 Å 4 % en bij 3800 Å 8 % te hoog bepaald werd. Hiervoor werd geen korrektie aangebracht, daar de fout in de fotografiese intensiteitsmeting bij deze golflengten allicht van dezelfde grootte is.

§ 7. Chemoluminescentiespektrum van 3-aminophtaalzuurhydrazide.

In de literatuur zijn drie opgaven van de spektrale energieverdeling van het licht, uitgezonden bij de chemoluminescente reactie van 3-aminophtaalzuurhydrazide te vinden:

Harris en Parker⁴⁶⁾ bepaalden het spektrum van de reactie met waterstofperoxyd en natriumhypochloriet fotografies. Ze publiceerden dit echter niet, maar volstaan met de opmerking, dat het een vlak maximum bezit tussen 4100 en 4400 Å, zich uitstrekt van het violet tot ver in het rood en dat het licht voornamelijk uitgezonden wordt in het golflengtegebied tussen 3800 en 5000 Å. Deze opgave is geheel in overeenstemming met het door ons gevonden spektrum (fig. 16).

Eymers en van Schouwenburg⁴⁰⁾ bepaalden het spektrum van de reactie met waterstofperoxyd en kaliumferricyanide en vinden een kromme met maximum bij 4750 Å. Later bepaalden zij het spektrum van de reactie met peroxyd en haemine⁴⁵⁾ en vonden een van de vorige afwijkende kromme met maximum bij 44 à 4600 Å. De spektra werden *niet* op absorptie gecorrigeerd. In deze gevallen is het zeker nodig dit te doen, daar zowel kaliumferricyanide als haemine voor $\lambda < 4600$ Å sterk en selectief absorberen. Hoewel het dus lijkt alsof deze literatuur-opgaven geen waarde hebben voor een vergelijking met het door ons bepaalde spektrum, is dit toch niet helemaal het geval. Achteraf is het nl. mogelijk de door hen bepaalde spektra op absorptie te corrigeren voor golflengten beneden 4400 Å: Voor een homogeen lichtende oplossing is de absorptiecorrectiefactor van de gedaante $\frac{a}{1-e^{-a}}$, waarin a evenredig is met de absorptiecoëfficiënt. Voor $\lambda < 4400$ Å was bij Eymers en van Schouwenburg de waarde van a zó groot, dat $\frac{a}{1-e^{-a}}$ vervangen kan worden door a . Daardoor is het relatief verloop der absorptiecorrectiefactor bekend ook al is deze, door gebrek aan gegevens, zelf niet bekend. Na vermenigvuldiging der spektra met de absorptiecoëfficiënt van kaliumferricyanide resp. haemine verkrijgt men dan in beide gevallen krommen met maximum bij 42 à 4300 Å, terwijl het door ons bepaalde spektrum een maximum bezit bij 4240 Å. Voorts blijkt, dat voor $\lambda > 5000$ Å de beide spektra nagenoeg evenredig zijn met dat van fig. 16 voor 3-aminophtaalzuurhydrazide.

Uit deze beide feiten mag men besluiten, dat er sterke aanwijzingen zijn voor de gehele of nagenoeg gehele identiteit van het emissiespektrum van de chemoluminescente reactie met kaliumferricyanide resp. met haemine en dat van de reactie aan de anode bij elektrolyse van de oplossing.

Om dit geheel buiten twijfel te stellen, bepaalden we zelf ook het spektrum van de reactie met peroxyd en haemine, waarbij zo nauwkeurig mogelijk op absorptie werd gecorrigeerd.

Voor de opname werden 64 reakties uitgevoerd in een kuvet van 1 cm dikte. De molaire concentraties aan 3-amino, KOH, peroxyd en haemine bedroegen in het reaktiemengsel resp. 10^{-6} , 8.10^{-6} , $1.6.10^{-6}$ en 3.10^{-9} grm per cm^3 . Elk reaktiemengsel werd gedurende 5 minuten voor de spektrograaf geplaatst, 20 sek. na menging. Gedurende deze 5 minuten verandert de absorptie van de oplossing en daarmee de waarde van a in de absorptiecorrectiefactor $\frac{a}{1 - e^{-a}}$. Daar de absorptie tengevolge van de aanwezigheid van haemine groter was dan bij de elektrolysemethode werd de in hoofdstuk III onder C beschreven exakte methode gebruikt voor de bepaling van de absorptiecorrectiefactor. De lichtintensiteit werd visueel gemeten en bleek exponentieel af te nemen met de tijd. De absorptie werd als functie van de tijd gemeten met behulp van de absorptieopstelling (blz. 27). Achteraf bleek, dat de ruwere methode voor het aanbrengen der absorptiecorrectie met behulp van de gemiddelde absorptie der oplossing, binnen de beoogde nauwkeurigheid dezelfde waarde leverde. Bij 4000 Å bedroeg de correctiefactor 1,2, bij 3900 Å 1,5 en bij 3800 Å 3,0.

Het zo bepaalde spektrum valt binnen de meetfout (5 %) samen met het gemiddelde van twee opnamen volgens de elektrolysemethode. Het gemiddelde van de drie spektra is in de figuren 16, 17 en 18 weergegeven.

We mogen dus besluiten, dat het chemoluminescentiespektrum van 3-aminophthalzuurhydrazide onafhankelijk is van de wijze waarop men de reactie uitvoert. Met zekerheid geldt dit voor de reactie met haemine en voor de reactie aan de anode bij elektrolyse van de oplossing. Met grote waarschijnlijkheid geldt het ook voor de reactie met kaliumferri-cyanide en voor die met natriumhypochloriet.

§ 8. Chemoluminescentiespektrum van pyromellietzuurhydrazide.

In het geval van pyromellietzuurhydrazide werden de drie afzonderlijke spektra der opname niet tot één kromme gemiddeld, maar twee ervan werden gemiddeld tot het spektrum a, het derde werd afzonderlijk weergegeven als spektrum b (fig. 19). Er bleek nl. een buiten de meetfout

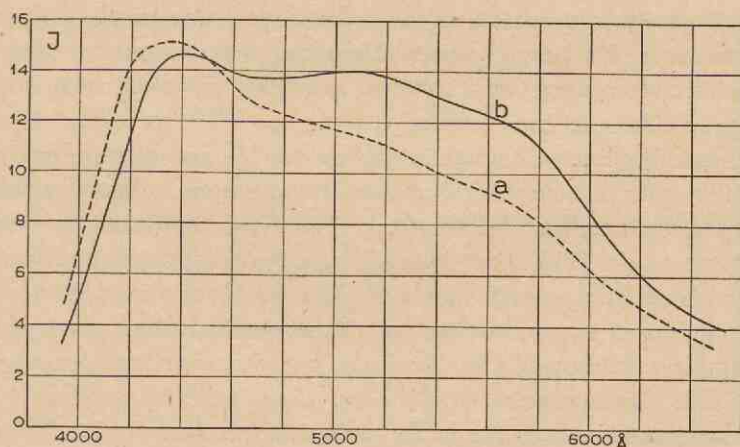
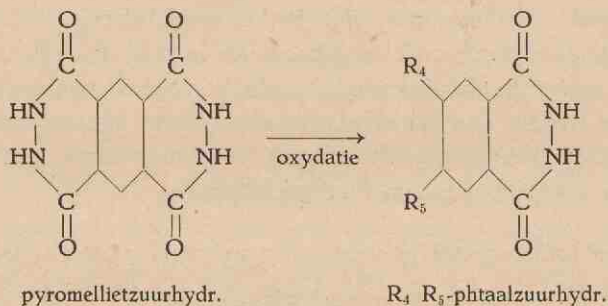


Fig. 19. Chemoluminescentiespektrum van pyromellietzuurhydrazide.

vallend verschil op te treden tussen dit spektrum en de beide andere: Zowel het spektrum a als het spektrum b vertonen een maximum bij 4300 Å à 4400 Å en een breed nevenmaximum in het geelgroene gebied. Echter is dit laatste voor b meer uitgesproken dan voor a.

Nu is het spektrum a afkomstig van oplossingen die gebruikt zijn tot gemiddeld ruim de helft van het hydrazide verdwenen was. Het spektrum b is afkomstig van oplossingen, waarvan gemiddeld slechts 30 % van het hydrazide gebruikt werd. De oorzaak voor de afwijking, die tussen de spektra a en b optreedt, is voor de hand liggend: Bij de al- of niet chemoluminescente oxydatie van een hydrazide neemt men algemeen aan, dat er althans ten dele een reactie verloopt waarbij de hydrazidering afgebroken wordt. Uit het pyromellietzuurhydrazide ontstaat dan, zoals uit de hieronder weergegeven formules blijkt, in eerste instantie een op de 4- en 5-plaats gesubstitueerd phtaalzuurhydrazide, waarbij de substituenten de resten van de afgebroken hydrazidering zijn.



Eventueel zou zich meer dan één phtaalzuurhydrazide kunnen vormen, die alle meer of minder chemoluminescent zullen zijn. De spektra a en b zijn nu superposities van het chemoluminescentiespektrum van pyromellietzuurhydrazide en één of meer van deze phtaalzuurhydraziden. In spektrum a is dit laatste naar verhouding meer aanwezig dan in b, doordat de oplossing langer werd gebruikt en zich meer van het phtaalzuurhydrazide kon vormen.

Aannemende, dat we te maken hebben met de superpositie van slechts twee spektra, is het mogelijk de beide componenten te bepalen, wanneer we verder onderstellen, dat voor $\lambda < 4150$ Å in hoofdzaak de ene komponent, voor $\lambda > 5500$ Å uitsluitend de andere komponent aanwezig is. Deze onderstelling is voor de hand liggend, daar de spektra a en b in deze gebieden evenredig zijn, terwijl we verder weten, dat voor bijna alle phtaalzuurhydraziden het deel van het chemoluminescentiespektrum boven 5500 Å te verwaarlozen is (fig. 16, 17 en 18).

De twee componenten A_1 en A_2 vindt men als het verschil der spektra a en b, nadat men ze resp. voor $\lambda < 4150$ Å en $\lambda > 5500$ Å door evenredige vergroting heeft doen samenvallen en zijn in fig. 20 weergegeven.

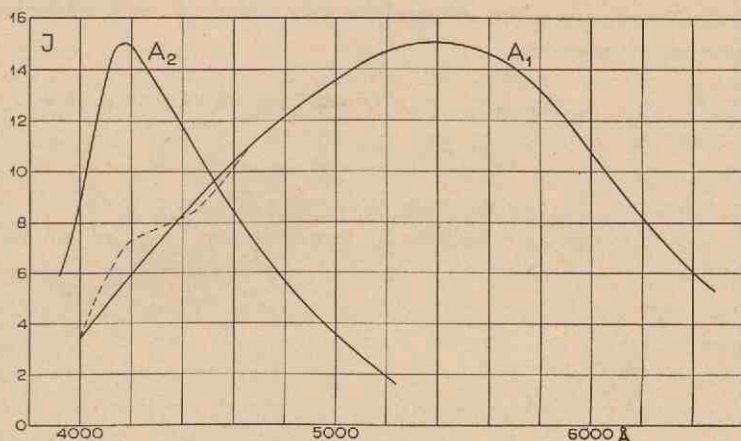


Fig. 20. Analyse van het chemoluminescentiespektrum van pyromellietzuurhydrazide.

De nauwkeurigheid van deze werkwijze is uit den aard der zaak gering. Het spektrum A_1 zullen we onder voorbehoud toeschrijven aan dat van het pyromellietzuurhydrazide en is als zodanig in tabel 1 vermeld. Het spektrum A_2 is dat van een op de 4- en 5-plaats gesubstitueerd phtaalzuurhydrazide. Het vertoont de meeste overeenkomst met de spektra van het 3-hydroxy, 3-broom en 4-aminophtaalzuurhydrazide: De ligging van het maximum is hetzelfde evenals de naar het rood aflopende tak. De naar het violet aflopende tak is steiler, ligt echter ook minder goed vast (verg. fig. 17 en tabel 1).

De onderstelling, dat het gemeten spektrum opgebouwd is uit dat van het pyromellietzuurhydrazide en nog één ander spektrum, behoeft niet te betekenen, dat zich slechts één chemoluminescent phtaalzuurhydrazide vormt. Het is voldoende te onderstellen, dat er één verre de overhand heeft, hetzij door zijn grote vormingswaarschijnlijkheid, hetzij door zijn groot chemoluminescent vermogen. Daar de lichtintensiteit van de anode bij enkele der oplossingen na enige tijd boven de beginintensiteit uitkwam, is het chemoluminescent vermogen van het betreffende phtaalzuurhydrazide zeker groter dan dat van het pyromellietzuurhydrazide.

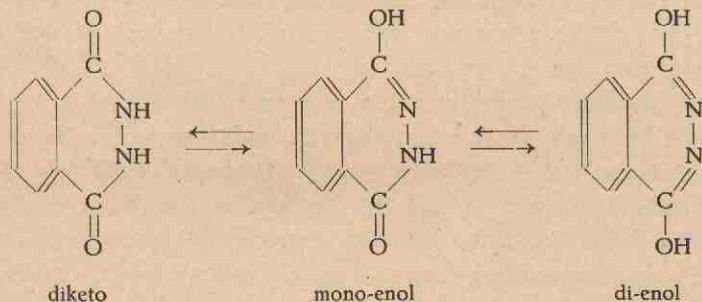
Een andere overweging, die de gevolgde werkwijze rechtvaardigt, is gelegen in het feit, dat zoals we op blz. 76 zullen zien, men moet verwachten, dat de spektra van deze op de 4- en 5-plaats gesubstitueerde phtaalzuurhydraziden zeer weinig uiteenlopen en zeer dicht staan bij die van het 3-broom, 3-hydroxy en 4-aminophtaalzuurhydrazide. Dit is voor het spektrum A_2 inderdaad het geval.

Na de zo juist gegeven beschrijving van de chemoluminescentiespektra der hydraziden, behandelen we in § 9—§ 11 de fluorescentie- en absorptie-eigenschappen van deze hydraziden.

§ 9. Fluorescentie- en absorptiespektra van 3-amino- en 3-methylamino-phtaalzuurhydrazide.

Vanouds is de sterke fluorescentie van 3-amino in zuur milieu opgevallen, waarvan de kleur op het oog niet te onderscheiden is van die der chemoluminescentie. Dit feit heeft enkele onderzoekers tot de onderstelling gebracht, dat het de zure vorm van het hydrazide zelf is, dat bij de chemoluminescente reactie in aangeslagen toestand ontstaat en het licht uitzendt (zie ook § 19). De *al of niet identiteit* der beide spektra is daarom één der eerste belangrijke gegevens, dat een onderzoek der fluorescentiespektra kan leveren. Zoals uit fig. 22, blz. 61 blijkt, zijn de spektra *niet* identiek. Daarmede vervalt deze mogelijkheid voor een identifikatie van het chemoluminescente molekuul. De door ons verrichte studie van de fluorescentie- en absorptie-eigenschappen der phtaalzuurhydraziden moeten we daarom beschouwen als een studie over de invloed van een substitutie in de benzolring op de optiese eigenschappen van de bekende uitgangsstof.

Deze eigenschappen zijn op vrij ingewikkelde wijze afhankelijk van de p_H der oplossing. Vanuit chemies standpunt is dit begrijpelijk, daar we bij de phtaalzuurhydraziden de mogelijkheid van een keto-enolovergang *) hebben volgens onderstaand schema:



In het algemeen kan men verwachten, dat bij de enolvormen de COH-groepen kunnen ioniseren tot $CO^- + H^+$, zodat men theoreties vele vormen van het molekuul heeft: diketo-, mono- en di-enolvorm, al of niet geïoniseerd. Voor de gesubstitueerde phtaalzuurhydraziden maakt het daarbij nog verschil, welk van de twee C=O-groepen geëniliseerd is, resp. welk van de C—OH-groepen geïoniseerd is.

Over het al of niet voorkomen van deze verschillende vormen van het hydrazide bij een bepaalde p_H is het moeilijk enige definitieve uitspraak te doen.

Daar we niet weten met welke vorm het bij de chemoluminescente reactie emitterende molekuul de grootste overeenkomst vertoont, interesseert ons zowel de fluorescentie en absorptie in zuur als in alkalies milieu, al vindt de chemoluminescente reactie in alkalies milieu plaats. Van de

*) B. Eistert³⁾ „Tautomerie und Mesomerie” blz. 38 e.v.

verschillende phtaalzuurhydraziden zullen we eerst de eigenschappen van 3-amino en 3-methylamino bespreken:

In zuur milieu vertoont 3-amino een intensieve blauwe fluorescentie, die bij een $p_H = 3$ het sterkst is. In niet te sterk alkalies milieu is de fluorescentie ca. 300 keer zwakker en blauwviolet van kleur, terwijl bij zeer hoge p_H (ca. 14) een eveneens zwakke vaalgroene fluorescentie verschijnt. De absorptie- en fluorescentiespektra werden opgenomen bij een $p_H = 3$ (0.001 n HCl), een $p_H = 12$ (0.01 n KOH) en een $p_H = 14$ (1 n KOH). Deze zijn in fig. 22 op blz. 61 weergegeven *): de fluorescentiespektra in het rechterdeel der figuur bij de grote golflengten, de absorptiespektra in het linkerdeel bij de kleine golflengten. De eerste bezitten slechts één maximum, de laatste zijn tweetoppig.

In fig. 21 a en b, waar de spektra tegen de frequentie zijn uitgezet, zien we, dat wanneer we voorlopig alleen letten op het absorptiemaximum bij de grootste golflengte, absorptie- en fluorescentiespektra bij de p_H 's 3 en 12 spiegelsymmetries zijn, zij het ook dat deze symmetrie niet geheel kwantitatief is. Verder zien we, dat in 0.01 n KOH zowel absorptie- als fluorescentiespectrum naar het violet verschoven zijn ten opzichte van die in 0.001 n HCl. Men kan zich hierbij denken, dat bij de overgang van het molecuul van de zure naar de alkaliese modifikatie de energie van de elektronenovergang toeneemt, waardoor de beide spektra naar kleiner golflengte verschuiven.

Het is niet mogelijk met zekerheid te zeggen welke vormen van het molecuul voor de achtereenvolgende fluorescenties verantwoordelijk zijn.

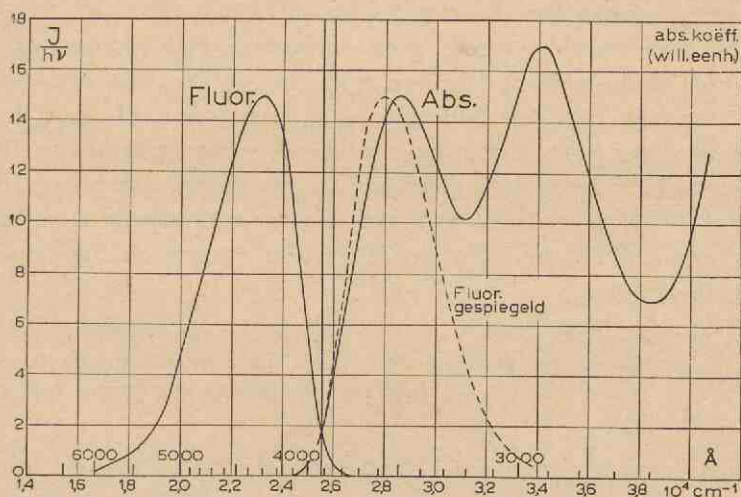


Fig. 21a. Toetsing van de wet der spiegelsymmetrie voor de zure oplossing van 3-aminophthz. hydr. (0.001 n HCl).

*) De golflengtenauwkeurigheid in de fluorescentiespektra korrespondeert met een spleetbreedte van hoogstens 0,3 mm. Zie tabel 2 blz. 53.

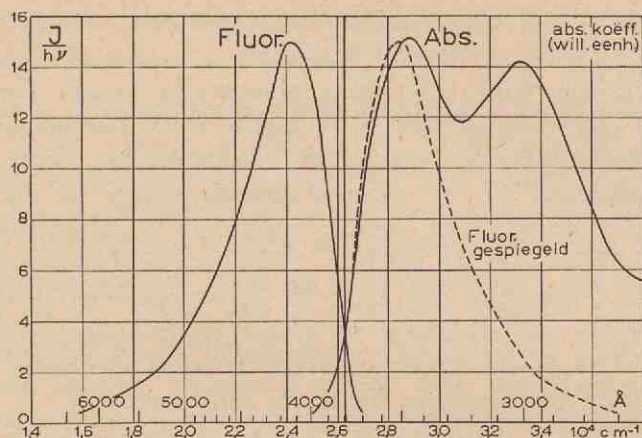


Fig. 21b. Toetsing van de wet der spiegelsymmetrie voor de alkaliese oplossing van 3-aminophthz. hydr. (0.01 n KOH).

Die in zuur milieu schrijft men als regel toe aan de *diketovorm* (blz. 58). Die in alkalies milieu zou dan bij een *enolvorm* behoren. Verder moeten we nog rekening houden met de mogelijkheid, dat de zwakke fluorescenties, zoals deze in alkalies milieu optreden, afkomstig kunnen zijn van verontreinigingen.

Bij 3-methylamino is de ligging der absorptie- en fluorescentiespektra (fig. 23) geheel analoog aan die bij 3-amino. Alle spektra zijn naar het rood verschoven t.o.v. de overeenkomstige spektra bij 3-amino. Er zijn twee verschilpunten met 3-amino:

- 1°. bij zeer hoge p_H treedt geen vaalgroene fluorescentie op,
- 2°. waar bij 3-amino de alkaliese oplossing slechts *zwak* fluoresceerde, is de intensiteit bij 3-methylamino juist zeer groot, nl. van dezelfde grootteorde als die der zure oplossing. Hierdoor wordt het waarschijnlijk, dat de zwakke blauwviolette fluorescentie van de oplossing van 3-amino in 0.01 n KOH reëel is en niet aan een verontreiniging moet worden toegeschreven. Blijkbaar is het rendement bij 3-amino veel geringer dan bij 3-methylamino.

In het p_H -gebied tussen 5 en 8 vindt bij 3-methylamino een geleidelijke overgang plaats van de blauwgroene fluorescentie in zuur, naar de blauwe fluorescentie in alkalies milieu, in die zin, dat het spektrum een lineaire combinatie blijkt te zijn van de spektra bij $p_H = 3$ en $p_H = 12$.

Wanneer we de chemoluminescentiespektra van 3-amino en 3-methylamino (fig. 22 en 23) bekijken ten opzichte van de fluorescentiespektra, komen daarbij twee punten naar voren:

- 1°. het maximum van het chemoluminescentiespektrum valt voor beide stoffen samen met het maximum van het fluorescentiespektrum der zure oplossing;

2°. de chemoluminescentiespektra zijn *breder* dan de overeenkomstige fluorescentiespektra.

In § 13 komen we hierop nog terug.

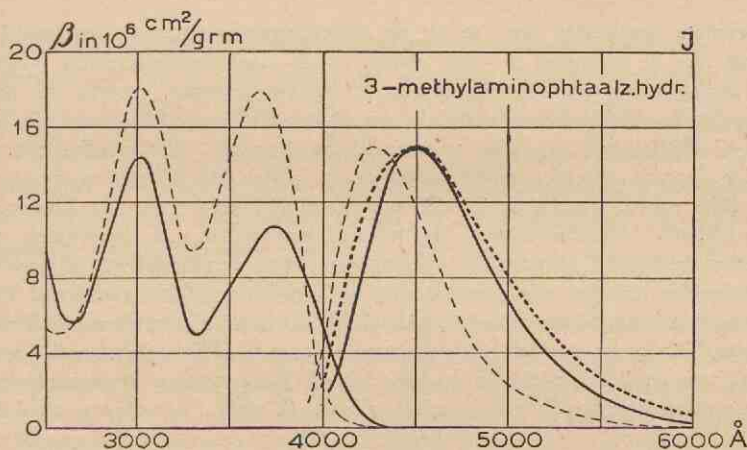
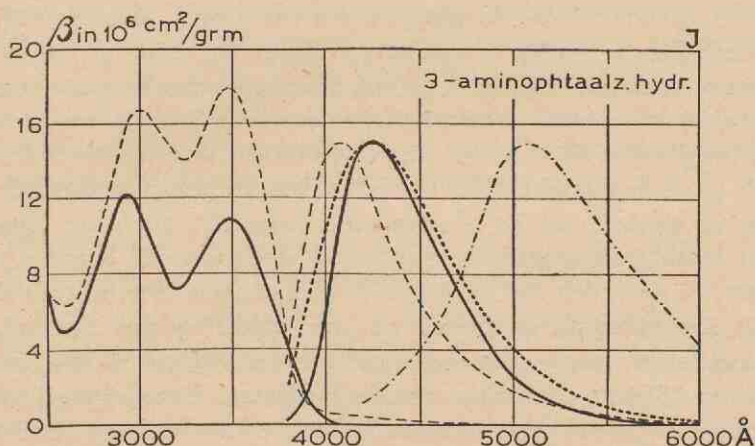


Fig. 22 en Fig. 23. Absorptie- en emissiespektra van 3-amino en 3-methylaminophthz. hydr.

- absorptie en fluorescentie van de zure oplossing (0.001 n HCL).
- idem van de alkaliese oplossing (0.01 n KOH).
- . - . - fluorescentie van de alkaliese oplossing (1 n KOH).
- chemoluminescentie.

§ 10. Fluorescentie- en absorptiespektra van 4-aminophthalic acid hydrazide. Beperkte geldigheid van de wet der spiegelsymmetrie.

In zuur milieu fluoresceert 4-amino vrij sterk blauw. Het rendement is ca. vier keer kleiner dan bij 3-amino, het maximum ligt bij dezelfde golflengte, de halfwaardebreedte van het spectrum is echter groter. In alkaliese oplossing ontbreekt de bij kleiner golflengte liggende fluores-

centie en treedt alleen een vale en zwakke blauwgroene fluorescentie op met maximum bij 4800 Å. Zie fig. 28, blz. 65.

De absorptiespektra (fig. 28) verschillen aanzienlijk van die der beide vorige derivaten. Het eerste absorptiemaximum ligt bij veel kleiner golflengte en is lager. Van de spiegelsymmetrie tussen fluorescentie- en absorptiespektra is weinig overgebleven: Waar bij kleine golflengte het fluorescentiespektrum eindigt, is er nog bijna geen sprake van absorptie. *Het is alsof de spektra afkomstig zijn van verschillende stoffen.* Dat dit *niet* het geval is, blijkt uit een bepaling van het fluorescentierendement:

Zoals we in hoofdstuk I (blz. 18) bespraken heeft men in verschillende gevallen gevonden, dat het fluorescentierendement, dit is het quotiënt van het aantal geëmitteerde en het aantal geabsorbeerde quanten, konstant was bij instralen met licht van golflengten uit verschillende delen van het absorptiespektrum. Voor de zure oplossing van 3-aminophtz. hydr. toetsten we eerst deze wet voor drie golflengten: 3650—3663 Å, 3132 Å en 2654 Å, afkomstig van de kwiklamp. Deze zijn gelegen in het eerste absorptiemaximum, tussen het eerste en tweede en voorbij het tweede maximum (fig. 22).

De bepaling geschiedde door de uit de monochromator tredende lichtbundel door een kuwet met de oplossing te laten vallen en de fluorescentieintensiteit visueel te meten. Daarbij werd tegen het kuwet een wit vlakje geplaatst, waarin een opening was aangebracht om het fluorescentielicht waar te nemen. Het vlakje werd met behulp van een 12-Volts lampje, voorzien van een blauw filter verlicht. De intensiteitsmeting geschiedde door de afstand van het lampje zó te regelen, dat vlakje en opening even sterk verlicht waren, waarbij de intensiteit evenredig is met het omgekeerde kwadraat van de afstand. Vervolgens werd de totale intensiteit van de opvallende monochromatische lichtbundel gemeten met behulp van een microthermozuil volgens Moll, direct verbonden aan een galvanometer volgens Zernike (type Ze, aanwijstijd 7 sek.). Een uitslag van 1 mm bij een schaalafstand van 50 cm korrespondeerde met 7.10^{-8} Volt in de keten. Dit kwam overeen met een energiestroom van 4.10^{-5} Watt worden opgevoerd door de monochromatorspleten voldoende breed te nemen (2 mm). Vervolgens werd bij de verschillende golflengten de absorptiecoëfficiënt, β , van de oplossing bepaald met de versterkeropstelling.

Het relatieve quantenrendement der fluorescentie, η , bij deze golflengten kan men nu berekenen met behulp van de formule:

$$\eta = \frac{I}{E\beta\lambda}, \text{ waarin: } I = \text{intensiteit der fluorescentie}$$

$E = \text{intensiteit van het opwekkende monochromatische licht}$
met golflengte λ ter plaatse, waar de fluorescentie gemeten wordt.

Voor het relatieve rendement bij de golflengten 3650—3663 Å, 3132 Å en 2654 Å vonden we resp. 1,2, 1,3 en 1,0. We zien, dat binnen onze vrij grote meetfout het rendement *konstant* is.

Hetzelfde voerden we uit voor de zure oplossing van 4-aminophtz. hydr. en vonden resp. 0,25, 0,4 en 0,3. De afwijking van de konstantheid is

hier iets groter, maar valt toch grotendeels binnen de meetfout *). Uit de geldigheid van de rendementswet voor de fluorescentie van 4-amino mogen we nu omgekeerd besluiten, dat deze afkomstig is van een stof met een absorptiespektrum, dat weinig verschilt van het gemeten spektrum, o.a. bij 3660 Å een zêér geringe absorptie bezit. Naar alle waarschijnlijkheid is deze stof 4-amino zelf, al kan de mogelijkheid van een verontreiniging niet worden uitgesloten. Echter blijft ook dan de op het ogenblik belangrijkste gevolgtrekking geldig, nl. dat er blijkbaar aanzienlijke afwijkingen mogelijk zijn van de wet der spiegelsymmetrie. In § 16 komen we op de interpretatie hiervan terug.

§ 11. Fluorescentie- en absorptiespektra der overige phtaalzuurhydraziden en van pyromellietzuurhydrazide.

In de fig. 24 t/m 31 zijn van elk der overige phtaalzuurhydraziden de absorptie- en fluorescentiespektra weergegeven: die van de zure oplossing getrokken, die van de alkaliese oplossing gestreept. Ter vergelijking is ook het chemoluminescentiespektrum kort gestreept ingetekend. De voornaamste bijzonderheden vermelden we hieronder in het kort:

In zuur milieu zijn de fluorescentiespektra van 3-aceetamido, 3-nitro en 3-broomphtz. hydr. *identiek* met dat van 3-amino, terwijl die van Na-3-hydrazino β -sulfonaat en 3-acetylcarbamido slechts zeer weinig daarvan afwijken: de topligging is dezelfde evenals de violette tak. De rode tak valt langzamer af, waardoor de halfwaardebreedte groter is dan bij 3-amino. De fluorescentie van de zure oplossing van het ongesubstitueerde phtaalzuurhydrazide was te zwak om waar te nemen.

In alkalies milieu vertonen 3-aceetamido, 3 broom en het ongesubstitueerde phtaalzuurhydrazide weer de weinig karakteristieke zwakke vaalgroene fluorescentie. 3-Acetylcarbamido daarentegen bezit in de alkaliese oplossing alleen een blauwviolette fluorescentie, die bij kleiner golflengte is gelegen dan die van de zure oplossing. Hetzelfde geldt voor het 3-hydroxyphtaalzuurhydrazide. Van deze stof werden de spektra echter niet opgenomen, daar ze vooral in alkalies milieu onderhevig is aan een sterke fotolyse, die zich uit in een snelle verandering van het absorptiespektrum en een bruinkleuring van de oplossing. Het 3-nitrophtaalzuurhydrazide fluoresceert in alkalies milieu niet merkbaar, evenmin het Na 3-hydrazino β -sulfonaat.

In tabel 3 vindt men het fluorescentierendement voor de zure en de alkaliese oplossing van de verschillende phtaalzuurhydraziden opgegeven. Het betreft hier een ruwe schatting aan de hand van de fotografiese opname, waarbij het rendement van het betreffende hydrazide vergeleken werd met dat van de zure oplossing van 3-amino. Voor deze laatste

*) De lage waarde van het rendement bij 3665 Å kan een gevolg zijn van bij groter golflengten absorberende verontreinigingen, die hier een groter rol spelen dan bij de beide andere golflengten tengevolge van de zeer geringe absorptie van het 4-amino zelf.

FIG 25

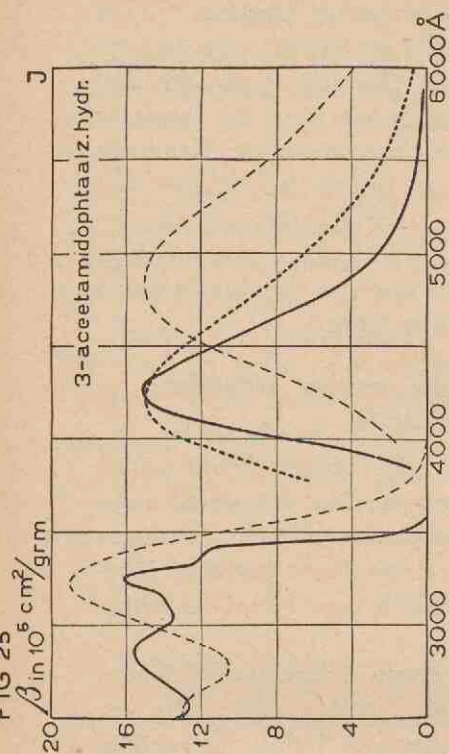


FIG 27

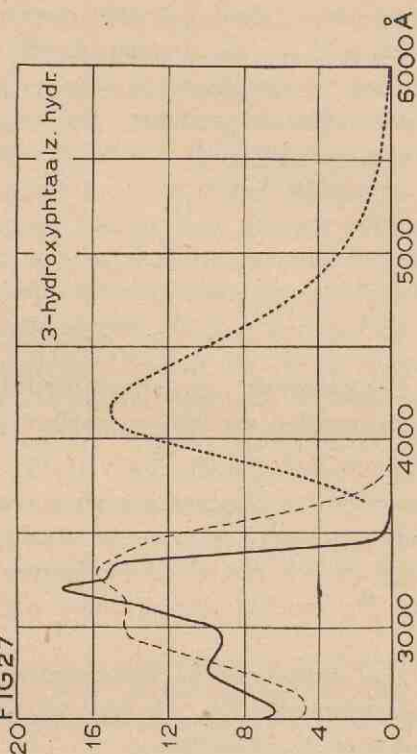


FIG 24

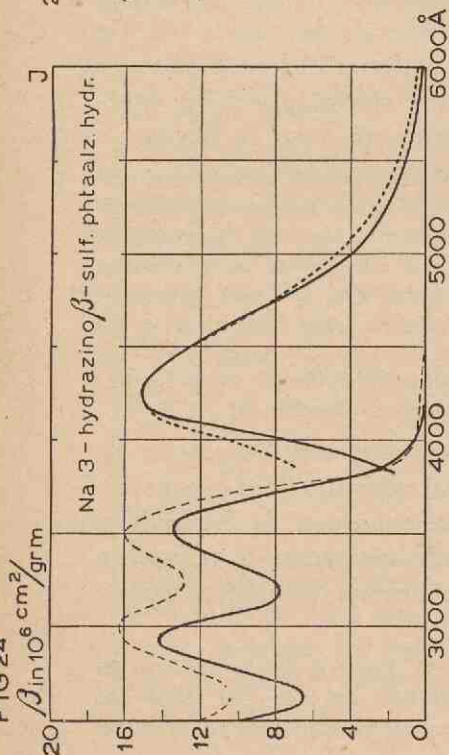


FIG 26

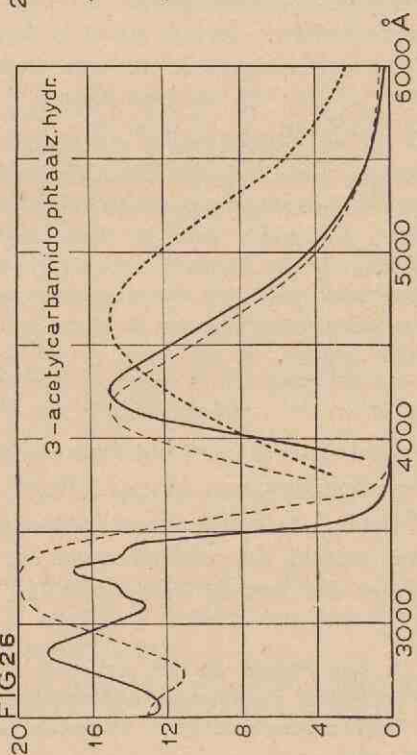


Fig. 24 t/m 27. Absorptie- en emissiespectra van verschillende phthaalzuurhydraziden.
 — absorptie en fluorescentie van de zure oplossing (0.01 n HCl).
 - - - - - idem van de alkaliese oplossing (0.01 n KOH).
 - - - - - chemoluminescentie.

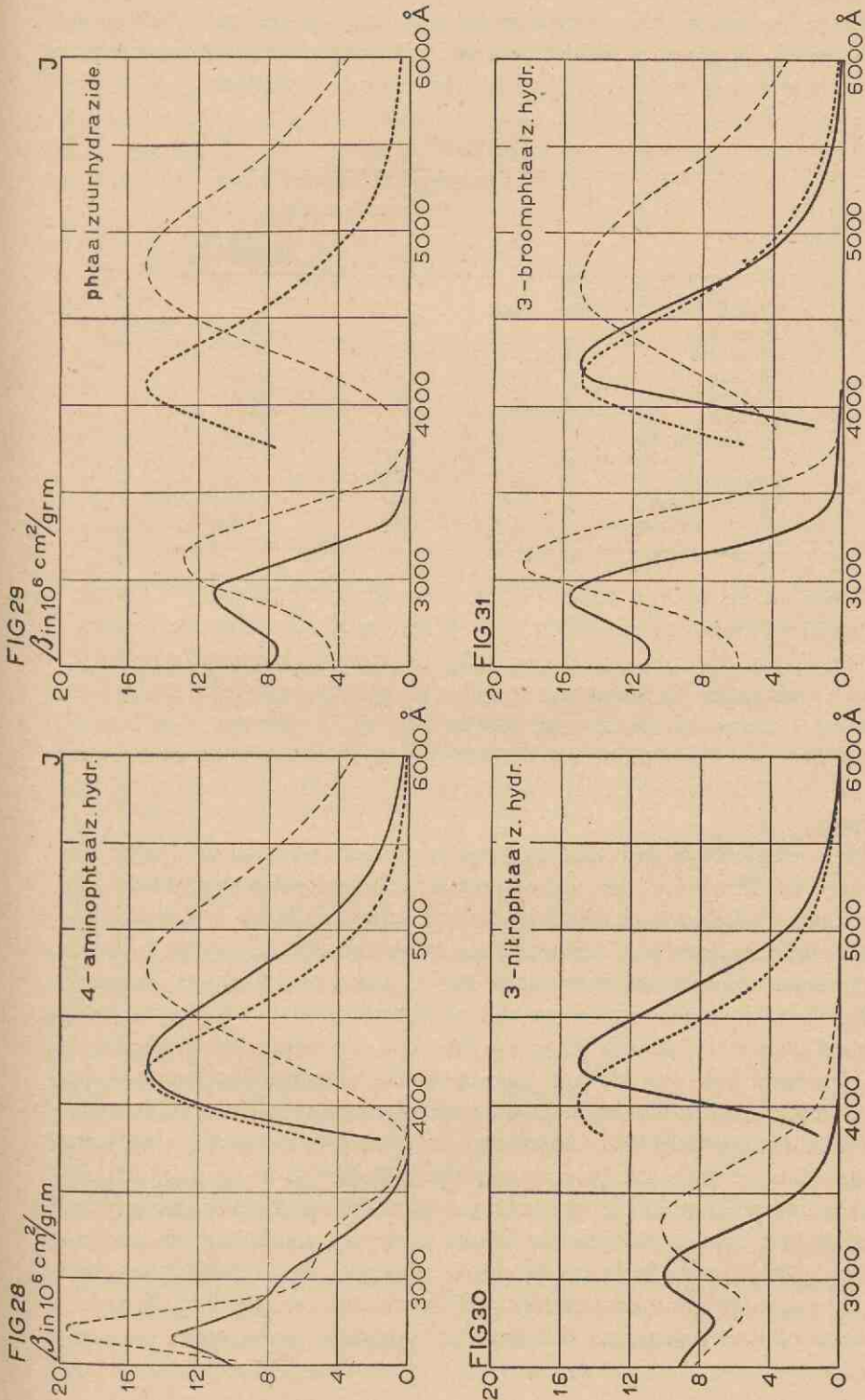


Fig. 28 t/m 31. Absorptie- en emissiespektra van verschillende phtaalzuurhydraziden.
 — absorptie en fluorescentie van de zure oplossing (0.001 n HCl).
 --- idem van de alkaliese oplossing (0.01 n KOH).
 ----- chemoluminescentie.

berekenden we de absolute waarde van het rendement, dat ca. 10 % bleek te bedragen. Het fluorescentierendement van de zure oplossing is als regel vrij groot, nl. enkele procenten, die van de alkaliese oplossing daarentegen zeer gering, nl. slechts enkele tiende promilles.

TABEL 3.

Stof		Fluoresc. Rendement in %	
		Zuur	Alkalies
3-Nitro	phtz. hydr.	0,02	—
Ongesubst.	" "	—	0,02
3-Hydroxy	" "	2	0,02
3-Broom	" "	2	0,01
4-Amino	" "	2	0,03
3-Amino	" "	10	0,03
Na 3-Hydrazino			
β -sulfonaat	" "	0,02	—
3-Acetamido	" "	7	0,02
3-Methylamino	" "	10	10
3-Acetyl carbamido	" "	0,1	0,06

Zoals uit de figuren blijkt, vertonen de *absorptiespektra* der diverse phtaalzuurhydraziden onderling veel groter verschillen dan de *fluorescentiespektra*. Verder zien we, dat bij de meeste de *spiegelsymmetrie* tussen *absorptie-* en *fluorescentiespektrum* geheel ontbreekt, zoals dat ook bij 4-amino het geval was. Alleen bij Na 3-hydrazino β -sulfonaat heeft men dezelfde situatie als bij 3-amino en 3-methylamino en bestaat er een kwalitatieve spiegelsymmetrie voor de spektra van de zure oplossing.

Naar aanleiding der absorptiespektra maken we nog de volgende opmerking: Het absorptiespektrum van de zure oplossing van enkele der phtaalzuurhydraziden nl. het 3-hydroxy, 3-aceetamido en 3-acetylcarbamido (fig. 25, 26 en 27), vertoont meer structuur dan de overige spektra. Het eerste absorptiemaximum bezit één of meer nevenmaxima, waaruit volgt, dat het opgebouwd moet zijn uit meerdere afzonderlijke banden. Dit zal waarschijnlijk ook het geval zijn voor de andere absorptiespektra en eventueel ook voor de emissiespektra. De afzonderlijke banden zijn daar echter tot een vloeiende kromme verenigd of voor zover ze nog als aanduiding aanwezig zijn, ontsnappen ze aan de waarneming. Intussen is de waargenomen structuur in de absorptiespektra zo gering, dat ze bij een fotografiese intensiteitsmeting slechts door een herhaalde meting zou kunnen worden vastgelegd. Echter is dit een aanleiding om ook bij de emissiespektra bedacht te zijn op de eventuele aanwezigheid van een zwak aangeduide bandenstructuur. Bij een nauwkeuriger bepaling der spektra blijft het denkbaar dat deze te voorschijn zou komen.

Pyromellietzuurhydrazide fluoresceert in zuur milieu zwak blauw. Daar zich in de zure oplossing direkt een wit neerslag vormt, hetgeen gepaard gaat aan een vrij ingrijpende verandering van het absorptiespektrum, is de oorsprong van deze fluorescentie twijfelachtig. In alkalies milieu treedt een zeer zwakke gele fluorescentie op, die niet meer kon worden gemeten. In fig. 32 zijn daarom alleen de absorptiespektra weergegeven benevens het chemoluminescentiespektrum.

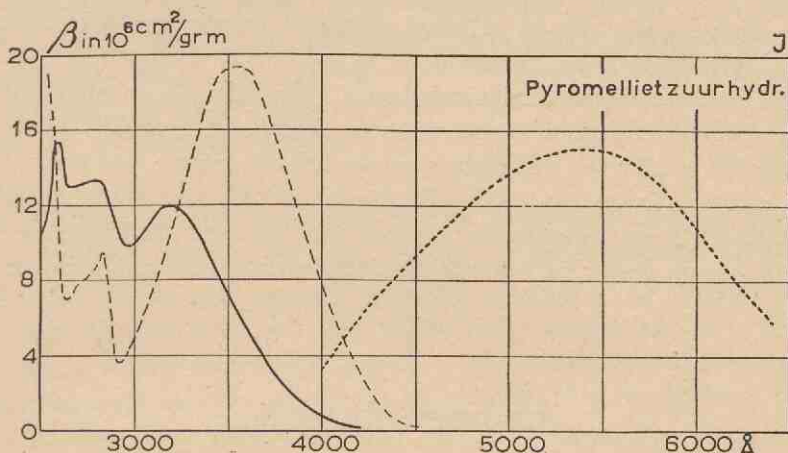


Fig. 32. Absorptie- en emissiespektra van pyromellietzuurhydrazide.

- absorptie en fluorescentie van de zure oplossing (0,001 n HCl).
- — — absorptie van de alkaliese oplossing (0,01 n KOH).
- chemoluminescentie (Analysekromme A₁, fig. 20).

§ 12. Samenvatting der experimentele resultaten.

De chemoluminescentiespektra der phtaalzuurhydraziden (fig. 16—18) zijn vloeiende krommen zonder nevenmaxima en lopen onderling vrij sterk uiteen. De spektra van de hydraziden met een substituent afgeleid van de aminogroep zijn het verst naar het rood verschoven en vertonen de grootste halfwaardebreedten. De chemolum. spektra der overige gesubstitueerde phtaalzuurhydraziden zijn in vergelijking met dat van 3-aminophthz. hydr. naar kleiner golflengte verschoven; de vorm van het spectrum verandert daarbij slechts weinig.

Bij 3-methylamino vertoont het fluorescentiespectrum van de zure oplossing in vergelijking met dat van 3-amino een verschuiving naar groter golflengte en wel van dezelfde grootte als de verschuiving van het chemoluminescentiespectrum. Bij de overige hydraziden verschillen daarentegen de fluorescentiespektra van de zure oplossing, in tegenstelling tot de chemoluminescentiespektra, onderling nagenoeg niet. Het samenvallen van het maximum van chemoluminescentie- en fluorescentiespectrum, zoals dat bij 3-amino, 3-methylamino, 3-aceetamido en Na 3-hydr. β -sulf. optreedt, moet daarom als een toevallige *koïncidentie* worden

beschouwd. Bij 3-nitro, 3-broom, 4-amino en 3-acetylcarbamido vallen de maxima *niet* samen. Verder zijn met uitzondering van 4-amino de chemoluminescentiespektra *breder* dan de overeenkomstige fluorescentiespektra.

Bij 3-amino, 3-methylamino en Na 3-hydr. β -sulf. bestaat er een kwalitatieve *spiegelsymmetrie* tussen het fluorescentiespektrum van de zure en de alkaliese oplossing en de overeenkomstige absorptiespektra wat betreft de bij de grootste golflengte liggende absorptieband. Deze symmetrie onthreekt bij de overige hydraziden geheel.

De fluorescentie van de *alkaliese* oplossing der hydraziden is slechts zwak, behalve bij 3-methylamino.

De *absorptiespektra* der verschillende hydraziden lopen sterk uiteen.

Het chemoluminescentiespektrum van 3-aminophtz. hydr. blijkt *onafhankelijk* te zijn van de wijze waarop men de reactie uitvoert.

Tenslotte is het gemeten chemoluminescentiespektrum van pyromellietzuurhydrazide een superpositie van het spektrum van dit hydrazide zelf en van een op de 4- en 5-plaats gesubstitueerd phtaalzuurhydrazide.

THEORETIES GEDEELTE.

§ 13. Algemene opmerkingen.

In de volgende paragrafen zullen we een poging wagen de verkregen resultaten te behandelen vanuit elektronentheoreties standpunt. Een exakte quantenmechaniese behandeling van het beschouwde molekuulprobleem is echter zó ingewikkeld, dat de mogelijkheid van een oplossing daarvan ten enen male is uitgesloten. Voor een half empiriese, half quantenmechaniese behandeling van de invloed van de substituent op de optiese eigenschappen van het molekuul is daarentegen een bepaald inzicht nodig in het elektronensysteem van het grondmolekuul. Hierin schiet onze kennis verre tekort. Het enige, dat we daarom kunnen doen is te trachten verband te leggen tussen het spektrum enerzijds en bekende elektromere verschijnselen van de substituent in verband met het verdere molekuul anderzijds (zie § 14). Voor we hiertoe overgaan maken we nog enkele opmerkingen naar aanleiding van de in § 12 samengevatte experimentele resultaten:

Het feit dat het fluorescentiespektrum van de hydraziden prakties onafhankelijk is van de substituent, het chemoluminescentiespektrum daarentegen sterk varieert betekent, *dat de invloed van de substituent op het spektrum in sterke mate afhangt van het molekuul, waaraan het is gesubstitueerd* en voorts, *dat het in de zure oplossing fluorescerende molekuul en het chemoluminescerende molekuul essentieel verschillend van bouw zijn*. Bij 3-methylamino is dit in vergelijking met 3-amino niet het geval en is de invloed van de substituent op het fluorescerend en het

chemoluminescerend molekuul dezelfde. Dit afwijkend gedrag van de methylaminogroep is moeilijk te begrijpen.

In de tweede plaats wezen we er op, dat de chemoluminescentiespektra breder zijn dan de fluorescentiespektra der zure oplossing, waaraan men de gevolgtrekking zou kunnen verbinden, dat het chemoluminescentiespektrum opgevat moet worden als de superpositie van meerdere spektra, zoals dat op blz. 21 ter sprake kwam. Bij 4-amino treedt echter juist het omgekeerde op en is het fluorescentiespektrum breder. Hierdoor verliest de onderstelling in zijn algemeenheid aan waarschijnlijkheid en komt het ons voor, *dat de verschillende vorm van het chemoluminescentie- en fluorescentiespektrum teruggebracht moet worden op een verschillende bouw der emitterende molekulen zelf.*

§ 14. Invloed van de substituent op de elektronenverdeling van het grondmolekuul in verband met het chemoluminescentiespektrum.

Volgens de op het ogenblik algemeen aanvaarde opvatting van de chemiese binding komt deze tot stand door middel van de valentie-elektronen der bij de binding betrokken atomen. Bij de zg. *homopolaire* enkele binding stelt elk atoom één valentieëlektron beschikbaar, zodat deze binding door twee elektronen wordt verzorgd, het zg. *gemeenschappelijke elektronenpaar*. Op dezelfde wijze komt de dubbele en driedubbele binding tot stand door middel van vier, resp. zes valentie-elektronen.

Wanneer een C, N of O-atoom is opgenomen in molekuulverband is het aantal valentieëlektronen waarover het beschikt als regel *acht*, zodat zijn L-schaal geheel gevuld is (Oktetregel). De elektronen afkomstig van de bindingspartners van het atoom moet men daarbij meetellen. Zoals men onmiddellijk inziet gaat daarbij het C-atoom met *vier* valentieëlektronen vier bindingen aan (4 enkele, 2 enkele en één dubbele enz.). Het N-atoom met *vijf* valentieëlektronen gaat drie bindingen aan en houdt twee valentieëlektronen over als een zogenaamd *eenzaam elektronenpaar*. Het O-atoom met zes valentieëlektronen gaat twee bindingen aan en houdt twee eenzame elektronenparen over. Het Br-atoom met *zeven* valentieëlektronen gaat één binding aan en houdt drie eenzame elektronenparen over.

Daarnaast spelen ook de zg. *semipolaire* bindingen een rol, waarbij beide elektronen van het gemeenschappelijk elektronenpaar van een binding van één der partners afkomstig zijn.

In de schrijfwijze van E i s t e r t³⁾ wordt een elektronenpaar voorgesteld door een streep of pijl en wel:

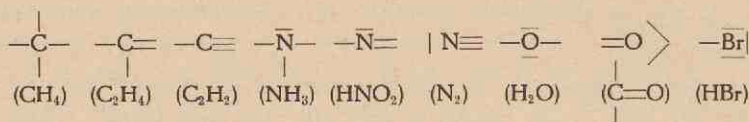
A — B, een streep tussen twee atomen, wanneer één elektron afkomstig is van A, één van B (*homopolaire* binding).

A → B, een pijl tussen twee atomen, wanneer beide elektronen afkomstig zijn van A (*semipolaire* binding).

A |, een streep langs het atoom voor een „eenzaam elektronenpaar”.

Met behulp van deze schrijfwijze kan men de elektronenstructuur van een molecuul overzichtelijk weergeven.

Voorbeelden van homopolaire bindingen:

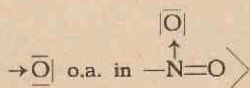


Voorbeelden van semipolaire bindingen:

a. afgifte van elektronenpaar:



b. opname van elektronenpaar:

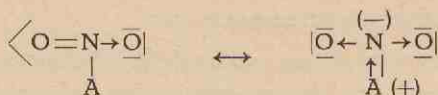


Voor verdere bijzonderheden aangaande de chemiese binding verwijzen we naar het boekje „Tautomerie und Mesomerie” van B. Eistert³⁾, waaraan ook de hier volgende beschouwingen zijn ontleend, betreffende de invloed van de substituent op de elektronenverdeling van het molecuul, waaraan het is gesubstitueerd.

We letten allereerst op de nitro- en de aminogroep. In de schrijfwijze volgens Eistert moet men deze als volgt weergeven:



Het chemies gedrag van molekulen, waarin deze groepen voorkomen heeft nu tot het volgende inzicht geleid: Wanneer de nitrogroep is opgenomen in een gekonjugeerd systeem A, bijv. aan benzol gesubstitueerd, heeft het de neiging uit dit systeem een elektronenpaar op te nemen volgens onderstaand schema *):



De nitrogroep krijgt daardoor een *negatieve* lading $-e$, het systeem A een *positieve* lading $+e$.

Wanneer de aminogroep opgenomen is in een gekonjugeerd systeem A, heeft het de neiging zijn eenzaam elektronenpaar af te staan om met dat systeem een dubbele binding aan te gaan **):

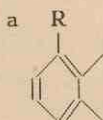


*) en **) Zie Eistert, blz. 89.

De aminogroep krijgt in dat geval een positieve lading $+e$, het systeem A een negatieve lading $-e$.

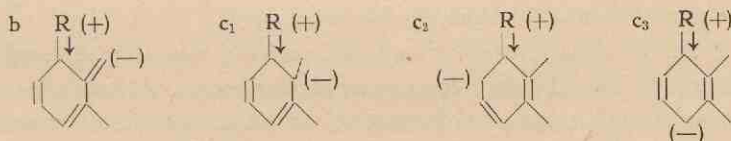
Deze beide zogenaamde *elektromere verschijnselen*, resp. de opname en de afgifte van een elektronenpaar door de substituent, spelen een grote rol in de chemie o.a. bij het begrijpen van substitutiereacties. Ten gevolge van deze elektromere verschijnselen wijzigt zich de elektronenverdeling van het grondmolekuul in die zin, dat bepaalde structuren *) van het molekuul en wel *polaire*, meer op de voorgrond treden. De quantenmechaniese uitdrukking hiervan is, dat deze polaire structuren een groter aandeel in de grondtoestand verkrijgen.

We illustreren dit aan de hand van het chemoluminescente molekuul, waarvan we de chemiese formule als volgt schematiseren:



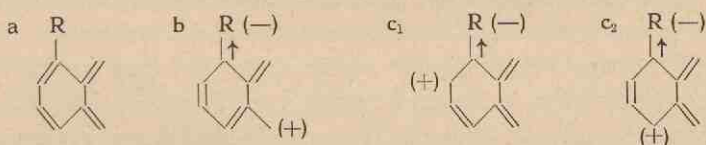
We laten hierbij in het midden hoe het rechterdeel van het molekuul er uit ziet.

Een substituent van het type van de aminogroep zal nu naast de hoofdstructuur a de volgende structuren, b en c meer naar voren brengen in de grondtoestand van het molekuul.

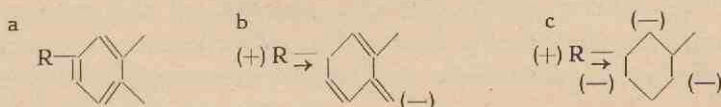


De negatieve lading verschijnt bij structuur b in het hydrazidegedeelte van het molekuul, bij de structuren c in de benzolring in ortho- of parapositie en wel als eenzaam elektronenpaar aan een C-atoom.

Een substituent van het type van de nitrogroep bevoordrecht de structuren volgens c, nu echter met een positieve lading in ortho- of parapositie. Zoals men eenvoudig inziet is het opnemen van de negatieve lading vanuit de hydrazidering alleen mogelijk, wanneer deze een dubbele binding heeft naar de benzolring:



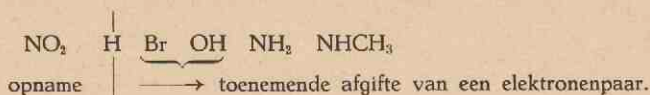
De aminogroep gesubstitueerd op de 4-plaats geeft aanleiding tot analoge polaire structuren b en c naast de hoofdstructuur a.



*) Een „structuur” van het molekuul moeten we hier opvatten in dezelfde betekenis als ze op blz. 5 werd gebruikt. Ze komt overeen met de klassieke structuurformule van de organiese chemie, stelt echter geen *toestand* van het molekuul voor.

De vraag die we ons nu moeten stellen is, wat het verband is tussen de invloed van de substituent op de elektronenverdeling van het molecuul en de ligging van grond- en aangeslagen toestand ten opzichte van elkaar; met andere woorden wat het verband is tussen de elektromere verschijnselen en de golflengte van het uitgezonden licht. In zijn artikel geeft Lewis⁴⁾ enige voorbeelden, waarbij het meer op de voorgrond treden van polaire structuren in de grondtoestand, gepaard gaat aan een *roodverschuiving* van de absorptieband.

Nu kan men met behulp van gegevens uit de chemie een volgorde opstellen van substituenten, die het elektromere verschijnsel in toenemende mate vertonen. Voor de door ons gebruikte substituenten is deze volgorde de volgende:



De volgorde NO_2 , H, (Br, OH, NH_2 , NHCH_3) spreekt voor zichzelf, daar de NO_2 -groep een elektronenpaar opneemt, de groepen Br, OH, NH_2 en NHCH_3 een elektronenpaar afgeven, terwijl het H-atoom nòch opneemt nòch afgeeft. Tot de volgorde Br, OH, NH_2 , NHCH_3 komt men op grond van de volgende overwegingen:

Het is in de chemie een bekend feit, dat de zg. *elektronenaffiniteit* (zie E i s t e r t blz. 30) toeneemt voor elementen in horizontale richting van het periodiek systeem, afneemt in vertikale richting. Daardoor is de elektronenaffiniteit van O groter dan van N. Dit houdt in, dat bij O het eenzaam elektronenpaar *vaster* gebonden is dan bij N het geval is. Hierdoor is het elektromeer effect van de OH-groep kleiner dan van de NH_2 -groep, zoals in de chemie welbekend is. De elektronenaffiniteit van O is volgens de bovengenoemde regels kleiner dan van F, van Br eveneens kleiner dan van F, zodat de volgorde van de elektronenaffiniteit van Br en O hieruit niet volgt. Om die reden zijn in de bovenstaande reeks de groepen Br en OH door een accolade verbonden. Doordat van de CH_3 -groep bekend is dat ze het elektronenoktet van het atoom, waaraan ze gebonden is instabiel maakt (zie E i s t e r t blz. 35), is het eenzaam elektronenpaar van de N in de NHCH_3 -groep beweeglijker dan bij de NH_2 -groep en het elektromeer effect daardoor groter.

Wanneer we de op deze wijze verkregen reeks van substituenten vergelijken met tabel 1 op blz. 51, zien we, dat het maximum van het chemoluminescentiespektrum in dezelfde volgorde naar het rood verschuift. Het maximum bij de Br- en de OH-groep ligt daarbij op dezelfde plaats.

We zien dus, dat een toenemend elektromeer effect van de substituent in verband met het verdere molecuul, gepaard gaat aan een roodverschuiving van het chemoluminescentiespektrum. Daar het spektrum van

het op de 4-plaats gesubstitueerde hydrazide bij korter golflengte is gelegen dan dat van 3-amino, kan men omgekeerd konstaten, dat een substitutie op de 4-plaats blijkbaar als een verzwakking van het elektromere effect werkt.

We onderwerpen nu de groep van substituenten, afgeleid van NH_2 aan een nadere beschouwing. We zien, dat in deze groep de chemoluminescentiespektra het meest uiteenlopen. Het spektrum is in het algemeen breder dan bij 3-amino zelf, hetgeen al of niet gepaard gaat aan een roodverschuiving. We kunnen daarbij drie gevallen onderscheiden:

1°. Het spektrum verschuift naar langer golflengte met slechts een kleine verbreding: methylamino.

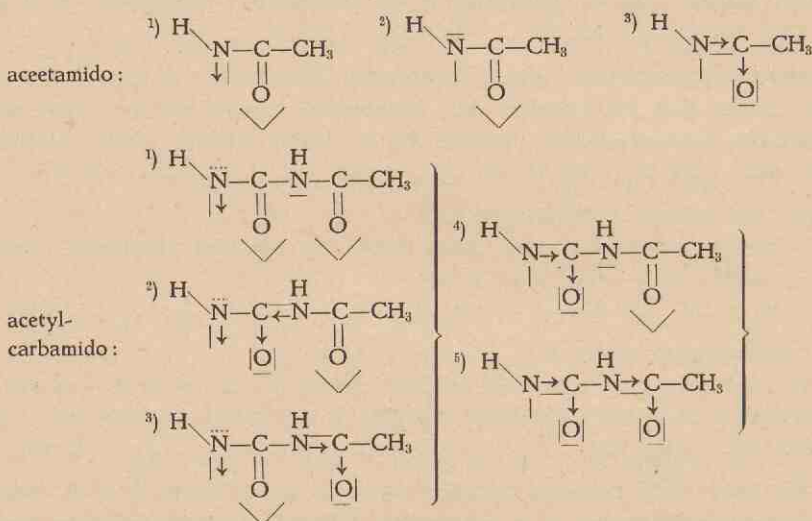
2°. Het spektrum verbreedt zich, terwijl de top niet verplaatst: aceet-amido en Na hydrazino β -sulfonaat.

3°. Er heeft zowel een verbreding als een roodverschuiving plaats: acetylcarbamido.

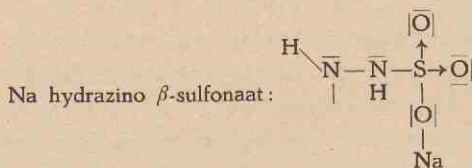
Het spektrum van methylamino past geheel in de zo juist opgestelde serie: NO_2 , H, Br, OH, NH_2 , NHCH_3 , die zich kenmerkt door een toenemende roodverschuiving met behoud van de vorm van het spektrum. We denken hierbij aan een verandering in de grootte van de elektronenovergang, die blijkbaar in de genoemde volgorde afneemt bij toenemend elektromere effect van het eenzaam elektronenpaar van de substituent. De spektra van de drie andere van amino afgeleide substituenten vertonen een verbreding, die we kunnen opvatten als een herverdeling van de intensiteit in de emissieband. Volgens hoofdstuk I § 3 moeten we dit op het principe van Frank-Condons⁸⁾ terugvoeren: De configuratie der atomen in de aangeslagen toestand van het molecuul ten opzichte van die in de grondtoestand wijzigt zich. Naarmate deze configuratie meer gaat afwijken van die in de grondtoestand, worden bij de overgang van het molecuul van de aangeslagen- naar de grondtoestand hoger trillingsniveau's aangeslagen en heeft een verbreding van het spektrum plaats, waarbij het maximum van emissie naar langer golflengte verschuift, zonder dat daarbij de elektronenovergang behoeft te veranderen. Wanneer men te maken heeft met spektra van uiteenlopende gedaante, is de *violetgrens* van het spektrum het beste kenmerk voor de grootte van de elektronenovergang. Voor de hier beschouwde substituenten krijgen we op grond van de uit de chemoluminescentiespektra bepaalde violetgrens (zie tabel 5b, blz. 80), de volgorde: aceetamido, acetylcarbamido, Na hydrazino β -sulfonaat, amino waarbij de laatste twee prakties gelijk zijn. Zoals we hieronder zullen zien is dit wederom de volgorde waarin het elektromere effect van het eenzaam elektronenpaar van de substituent toeneemt.

We letten daartoe op de elektromere verschijnselen, die zich in de substituenten zelf kunnen afspelen, nl. bij aceetamido en acetylcarbamido. Het eenzaam elektronenpaar van de aan benzol gebonden stikstof is in beide gevallen zowel verplaatsbaar naar de eraan verbonden ketogroep

als naar het hydrazidemolekuul. Bij acetylcarbamido is nog een tweede stikstofatoom aanwezig, dat zijn eenzaam elektronenpaar zowel naar de eerste als naar de tweede ketogroep van de substituent kan sturen. We hebben dus de volgende mogelijkheden:



In het geval van aceetamido is het eenzaam elektronenpaar in minder mate beschikbaar voor het hydrazidemolekuul dan bij amino, daar het ook naar de ketogroep kan uitwijken, waardoor het elektromere effect kleiner is. Bij acetylcarbamido is dit in minder mate het geval daar de dubbele functie van het eenzaam elektronenpaar van het eerste stikstofatoom voor een deel overgenomen wordt door het eenzaam elektronenpaar van het tweede stikstofatoom. In Na hydrazino β -sulfonaat is het weer volledig ter beschikking van het hydrazidemolekuul. De elektronenkonfiguratie hiervan wordt gegeven door de formule:



Het eenzaam elektronenpaar van het tweede stikstofatoom is onbeveeglijk en er treden in deze substituent geen elektromere verschijnselen op. Het elektromere effect naar het hydrazidemolekuul is daardoor hetzelfde als bij amino.

We mogen dus besluiten, dat voor alle substituenten de grootte van de elektronenovergang parallel gaat met het elektromere effect van het eenzaam elektronenpaar van de substituent naar het hydrazidemolekuul, in die zin, dat de elektronenovergang in grootte afneemt naarmate het elektromere effect toeneemt.

Hoewel we hier een bevestiging hebben van de door Lewis⁴⁾ op-

gestelde wetmatigheid, twijfelen we eraan, of deze regel algemeen geldig zal blijken te zijn. Vanuit theoreties standpunt lijkt het alleszins denkbaar, dat de bedoelde wetmatigheid nog door andere factoren zal worden doorkruist.

We letten nu op de *vorm* van het spektrum. Bij de niet van NH_2 afgeleide substituenten is de halfwaardebreedte (tabel 1, blz. 51) nagenoeg konstant. Voor de van NH_2 afgeleide substituenten neemt ze van 820 Å tot 1360 Å toe in de volgorde: 3-amino, Na 3-hydr. β -sulf., 3-methylamino, 3-aceetamido, 3-acetylcarbamido. We merken nu op, dat in dezelfde volgorde ook de elektromerie in de substituent toeneemt. Voor de eerste drie is deze beperkt tot het eenzame elektronenpaar van het stikstofatoom. Bij 3-aceetamido neemt, zoals we reeds zagen ook de ketogroep deel aan de elektromerie, terwijl bij 3-acetylcarbamido twee ketogroepen en het eenzame elektronenpaar van het tweede stikstofatoom meewerken. De verbreding van het spektrum van 3-methylamino t.o.v. dat van 3-amino wordt hiermede niet verklaard; deze is echter slechts gering.

Dat de verbreding niet samenhangt met de *lengte* van de substituent volgt uit het gedrag van Na 3-hydr. β -sulf., waarvoor ze in dat geval dezelfde zou moeten zijn als voor 3-acetylcarbamido. In werkelijkheid is het spektrum echter slechts weinig breder dan dat van 3-amino.

Het verschil in vorm van de chemoluminescentiespektra der phtaalzuurhydraziden met een van NH_2 afgeleide substituent brengen we dus in verband met de elektromere verschijnselen in de substituent. Naarmate de elektromerie groter is, is het spektrum breder.

We vergelijken tenslotte onze resultaten met de opgaven van Drew⁴¹⁾, weergegeven in tabel 4. Er blijkt in hoofdzaak overeenstemming te bestaan. Op enkele punten is er een bevestiging en uitbreiding mogelijk:

TABEL 4.

Substitutie	Kleur chemolum.	Substitutie	Kleur chemolum.
3-hydroxy	blauwviolet	3-methylamino	groenblauw
3- en 3: 6-chloor	"	3-aceetamido	"
3-amino	blauw	3: 6-diaacetamido	groenachtig
3-hydrazino	"	4-amino	blauw
3-benzamido	"	4-aceetamido	"
3: 6-diamino	witachtig blauw	4: 5-diamino	blauwviolet
3-hydrazino	blauwwit	4: 5-dichloor	"
β -sulfoonaat	"	3-nitro	witachtig geel
ongesubstitueerd	"	4-nitro	" "

Bij het beoordelen van de opgegeven kleuren moeten we het volgende bedenken: de benaming van een kleur is subjectief en kan voor eenzelfde persoon op verschillende tijden vrij sterk uiteenlopen naar gelang van de diverse tinten, die hem tegelijk worden

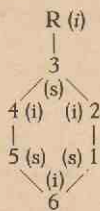
voorgelegd. Voorts speelt bij de benaming de intensiteit een rol, terwijl tenslotte selektieve absorptie de kleur kan doen veranderen.

We zien nu uit bovenstaande tabel, dat een enkele en een dubbele substitutie van chloor weinig verschil maken met hydroxyl en dus ook overeenkomen met de broomsubstitutie. Hydrazine, NHNH_2 gedraagt zich overeenkomstig onze verwachting als 3-amino. Benzamido, NHCOC_6H_5 , eveneens, terwijl we verwachten, dat het zich als acetamido zal gedragen. De kleurbenaming van 3-hydrazino β -sulfonaat als blauwwit kan betrekking hebben op de kleine verbreding van het spektrum. Waarschijnlijker is het echter, dat ze samenhangt met de lage intensiteit, daar ook het zeer zwakke onge-substitueerde phtaalzuurhydrazide blauwwit genoemd wordt, dat volgens ons blauwviolet zou moeten zijn. De benamingen van methylamino en acetamido komen overeen met onze verwachtingen. Een dubbele substitutie in para-positie van de amino en de acetamidogroep geeft blijkbaar een verbreding, eventueel ook een roodverschuiving van het spektrum, zoals blijkt uit de benamingen *witachtig* en *groenachtig*. Een roodverschuiving (en een verbreding bij acetamido) zouden we verwachten, wanneer een dubbele substitutie werkt als een vergroting van het elektromeer effect. De kleurbenoeming van 4-amino moet volgens ons blauwviolet zijn in plaats van blauw. Dit berust waarschijnlijk op een subjektief effect. Of 4-acetamido al of niet naar het rood is verschoven ten opzichte van 4-amino is daardoor niet uit de tabel op te maken. Merkwaardig is, dat 4:5-diamino en 4:5-dichloor gelijk van kleur zijn en blauwviolet. Dit kan betekenen, *dat alle substituties op de 4- en 5-plaats weinig invloed op het spektrum hebben*. Voor 4:5-diamino zou het ook kunnen betekenen, dat de substituenten elkaars werking verzwakken, aangezien 4-amino blauw genoemd wordt. Tenslotte moet de kleurbenaming van 3- en 4-nitro berusten op een sterke zelfabsorptie voor golflengten beneden 5000 Å, daar de oplossing sterk geelbruin gekleurd is tengevolge van de hoge concentratie, die nodig is om de kleur van het uitgezonden licht te kunnen waarnemen.

Uit het voorgaande volgt, dat we voor het 4:5-gesubstitueerde derivaat van phtaalzuurhydrazide, dat ontstaat bij de oxydatie van pyromellietzuurhydrazide aan één der hydrazideringen, een chemoluminescentie moeten verwachten in hetzelfde golflengtegebied als 4-amino. Zoals we reeds gezien hebben is dit ook het geval (tabel 1, analysekromme A_2). In dit verband moeten we erop wijzen, dat pyromellietzuurhydrazide zelf zich *niet* als een 4:5-gesubstitueerd phtaalzuurhydrazide gedraagt en de ringvorming blijkbaar een grote invloed heeft op het spektrum. We zouden dit kunnen vergelijken met de werking van acetylcarbamido op de 3-plaats en dus het waargenomen zeer brede spektrum niet zozeer toeschrijven aan een verandering van de elektronenovergang als wel aan een zeer sterke herverdeling der intensiteit in het spektrum tengevolge van een sterke elektromerie in de hydrazidering, die niet bij de chemoluminescente reactie betrokken is.

We willen hier nog vermelden, dat men in de chemie een tweede verschijnsel in verband met de binding onderscheidt, nl. het zogenaamde effect van de alternerende polariteit *). Hieronder verstaat men een afwisselende opeenvolging van stabiele en instabiele elektronenoktets van atomen in een keten, welke afwisseling zich door de keten voortplant.

*) Zie Eistert³⁾, blz. 31 e.v.



Heeft bijv. de substituent R een instabiel elektronenoktet, dan worden de elektronenoktets van de C-atomen 3, 1 en 5 gestabiliseerd (s), van de C-atomen 2, 6 en 4 instabiel gemaakt (i). Het omgekeerde geldt voor het geval, dat de substituent een stabiel elektronenoktet bezit. De grootte van dit effect wordt bepaald door de elektronenaffiniteit van het direkt aan de benzolkern gebonden atoom. Daardoor neemt het voor de groepen H, Br, OH, NH₂, NHCH₃ in dezelfde volgorde toe als het elektromere effect, nl. bij afnemende elektronenaffiniteit van het centrale atoom. Het N-atoom in de NO₂-groep heeft echter verreweg het minst stabiele elektronenoktet en komt geheel rechts in de rij te staan, terwijl het wat zijn spektrum betreft geheel links staat. Hieruit kan men de gevolgtrekking maken, dat het alternerende effect van de substituent op de benzolkern waaraan het is gesubstitueerd, *niet* te maken heeft met de optiese eigenschappen van het molekuul.

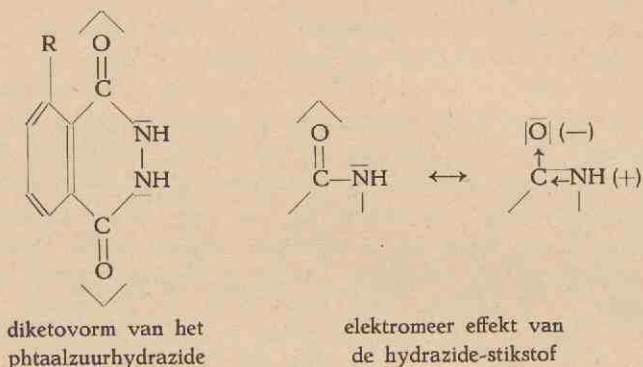
In ieder geval verwachten we, dat het elektromere effect belangrijker is voor de optiese eigenschappen, daar dit direkte veranderingen van de elektronentoestand van het molekuul veroorzaakt naar meer polaire structuren. Hoe men zich het alternerende effect in de quantenmechanica moet voorstellen is daarentegen niet duidelijk. Ook in chemies opzicht is het elektromere effect beter bekend en is het belangrijker dan het alternerende effect, dat nog wel aan enige twijfel onderhevig is. We hebben daarom gemeend de bespreking van de invloed van de substituent op de elektronenverdeling van het molekuul in hoofdzaak tot het elektromere effect te moeten beperken.

§ 15. Vergelijking van de invloed van de substituent op het fluorescerend en chemoluminescerend molekuul.

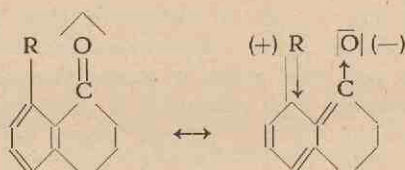
We gaan nu over tot een bespreking van de fluorescentiespektra van de phtaalzuurhydraziden in de zure oplossing en nemen daarbij aan, dat daarin de diketovorm aanwezig is. Zoals we gezien hebben, weerspiegelen de verschillende substituties in de benzolkern zich prakties niet in de fluorescentiespektra. Wanneer men tracht zich een idee te vormen, wat hiervoor de reden is, vervalt men vanzelf in meer of minder spekulatieve beschouwingen. Vanuit het gezichtspunt, zoals we dat in de vorige paragraaf naar voren hebben gebracht, kan men op meer dan één wijze trachten een verklaring te geven, die echter geen van alle in staat zijn het afwijkend gedrag van de methylaminogroep te begrijpen. Het komt ons daarom voor, dat het eerst mogelijk zal zijn deze problemen op te lossen, wanneer men over meer gegevens en middelen beschikt om de optiese eigenschappen af te leiden uit de molekuulbouw.

We willen toch een enkele van deze beschouwingen hier weergeven, omdat men daaraan kan laten zien, hoe in de toekomst de chemoluminescentiespektra direkte aanwijzingen kunnen geven aangaande de bouw van het emitterend molekuul.

In de diketovorm van het phtaalzuurhydrazide hebben we behalve met het elektromere effect van de substituent ook te maken met een elektromeer effect in de hydrazidering, dat zijn oorsprong vindt in de eenzame elektronenparen van de stikstofatomen in deze ring.

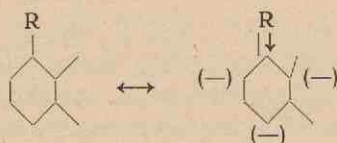


Het elektromere effect van een substituent als de aminogroep volgens schema b blz. 71, neemt de volgende gedaante aan:



We zien dus, dat de ketogroep $C=O$ zowel door het eenzaam elektronenpaar van de hydrazide-stikstof als door dat van de substituent over kan gaan in $C \rightarrow O$. Men kan zich nu voorstellen dat daardoor de invloed van de substituent op de elektronenverdeling in de hydrazidering wordt verzwakt. Aannemende, dat deze invloed voor de optiese eigenschappen van het al of niet gesubstitueerde phtaalzuurhydrazide en eraan verwante molekulen aansprakelijk is, kan men dan begrijpen, dat in het geval van de diketovorm van het molekuul de substituent géén invloed uitoefent, in het geval van het chemoluminescente molekuul wél: Wanneer het laatste molekuul overeenkomst vertoont met de diketovorm van het phtaalzuurhydrazide, zal het eenzaam elektronenpaar van de hydrazide-stikstof op een of andere wijze geblokkeerd zijn. Dat het fluorescentiespektrum van 3-methylamino wel naar langer golflengte is verschoven ten opzichte van 3-amino is hiermede niet te begrijpen, tenzij men de onwaarschijnlijke onderstelling maakt, dat het elektromere effect een drempelwaarde overschrijdt, waardoor het zich merkbaar kan maken.

Men kan ook onderstellen, dat de optiese eigenschappen van het molekuul in hoofdzaak bepaald worden door het verschijnen van negatieve lading in de benzolkern volgens schema c.



Bij het chemoluminescente molekuul zou dan géén uitwijken van deze negatieve lading naar het hydrazidegedeelte van het molekuul moeten plaats hebben en daardoor een sterke invloed van de substituent aanwezig zijn, terwijl in het fluorescerend

molekuul de negatieve lading in hoofdzaak zou uitwijken. We willen deze gedachten-gang niet verder voortzetten daar het zonder meer duidelijk is, dat we nòch over de gegevens, nòch over de middelen beschikken om hier, zij het ook slechts kwalitatieve uitspraken te doen.

De fluorescentie van de alkaliese oplossing levert geen nieuwe gezichtspunten, daar het in het geheel niet bekend is, welke vorm van het molekuul de fluorescentie veroorzaakt (zie blz. 58). Met uitzondering van methylamino is bovendien het rendement zeer laag, zodat het niet is uitgesloten, dat ze aan een verontreiniging moet worden toegeschreven.

§ 16. De absorptiespektra.

Geheel tegen onze verwachtingen in, lopen de absorptiespektra der verschillende phtaalzuurhydraziden aanzienlijk uiteen.

We beschouwen eerst de absorptiespektra van 3-amino (fig. 22), 3-methylamino (fig. 23) en Na 3-hydr. β -sulf. (fig. 24). Hierin zijn twee absorptiemaxima aanwezig, resp. bij 35 à 3700 Å en bij 29 à 3000 Å. Wegens het optreden van spiegelsymmetrie tussen het absorptie- en fluorescentiespektrum (zie fig. 21), schrijven we het absorptiemaximum bij 35 à 3700 Å toe aan één elektronenovergang en wel aan dezelfde als het fluorescentiespektrum. Het absorptiemaximum bij 29 à 3000 Å behoort bij een andere elektronenovergang.

We beschouwen nu de spektra van 3-aceetamido, 3-acetylcarbamido, 3-hydroxy en 4-amino (fig. 25—28). Hier ligt het langstgolfige, vaak meertoppige absorptiemaximum van de zure oplossing bij aanzienlijk korter golflengte dan bij de drie vorige. Wanneer men deze absorptieband aan dezelfde elektronenovergang wil toeschrijven als die bij de fluorescentie optreedt, moet men aannemen, dat tengevolge van het principe van Franck-Condon⁸⁾ òf bij de absorptie, òf bij de fluorescentie òf bij beide een overgang plaats heeft naar gemiddeld zeer hoge trillingstoestanden, waardoor een groot deel der energie als trillings-energie verloren gaat.

Een andere mogelijkheid is, dat we hier met *verschillende* elektronenovergangen te maken hebben. We moeten dan onderstellen, dat de absorptieband, die met de elektronenovergang van de fluorescentie overeenkomt, wel aanwezig is op de plaats, waar we hem volgens het principe van de spiegelsymmetrie moeten verwachten, maar dat de absorptie-coëfficiënt zó klein is, dat hij niet gemeten wordt of door het verdere absorptiespektrum wordt overdekt.

De absorptiespektra der alkaliese oplossingen van het beschouwde viertal hydraziden strekken zich naar langer golflengten uit, terwijl er boven 2700 Å slechts één breed absorptiemaximum aanwezig is, dat waarschijnlijk twee of meer elektronenovergangen omvat. Bovendien kan het nog een superpositie zijn van de spektra van meerdere vormen van het molekuul.

Tenslotte is in de absorptiespektra van het ongesubstitueerde phtaalzuurhydrazide, het 3-nitro en 3-broom (fig. 29—31) slechts één maximum aanwezig. Voor deze spektra geldt hetzelfde als gezegd werd van die der vorige vier substituenten.

We hadden gehoopt, dat de absorptiespektra nieuw licht zouden werpen op de speciale elektronenovergang die bij de fluorescentie en chemoluminescentie optreedt. Echter wordt blijkbaar het beeld door andere elektronenovergangen zó vertroebeld, dat zelfs geen analyse mogelijk is. We zien er daarom van af de absorptiespektra nog nader te interpreteren.

§ 17. Intensiteit der chemoluminescente reactie en relatief rendement van de fluorescentie van de zure oplossing.

TABEL 5a

Substitutie	Chemol. Int.	Fluor. Rend. in %	Max. Chemolum.
3-Nitro	0,01	0,02	4020 Å
Ongesubst.	0,02	0,00	4125
3-Broom	1	2	4170
3-Hydroxy	20	2	4160
3-Amino	100	10	4240

TABEL 5b

Substitutie	Chemol. Int.	Fluor. Rend. in %	Violetgrens Chemolum.
2-Acetamido	1	7	3700 Å
3-Acetylcarbamido	2	0,1	3790
Na 3-hydr. β -sulf.	0,2	0,02	3820
3-Amino	100	10	3820
3-Methylamino	60	10	4020

In de bovenstaande tabellen zijn de verschillende substituenten in twee groepen gerangschikt naar de grootte van de elektronenovergang bij de chemoluminescentie. In de eerste groep is de volgorde van deze grootte gebaseerd op het maximum, in de tweede op de violetgrens (20 % van het maximum).

We zien, dat de intensiteit van het licht bij de chemoluminescente reactie in hoofdzaak toeneemt met afnemende grootte van de elektronenovergang. Wat de diepere grond hiervan is, is niet duidelijk. Overigens is de intensiteit van de chemoluminescente reactie in veel sterker mate afhankelijk van de substituent, dan de grootte van de elektronenovergang.

Het fluorescentierendement loopt in hoofdzaak parallel met de intensiteit der chemoluminescente reactie. Hierdoor wordt het waarschijnlijk, *dat het verschil in chemoluminescent vermogen der phtaalzuurhydraziden teruggebracht moet worden op een verschil in fluorescentierendement van het emitterend molecuul.* We stellen ons hierbij op het standpunt, dat de chemoluminescentie een fluorescentie is van het emitterend molecuul (zie hoofdstuk II, § 2).

De absolute waarde van het rendement van de chemoluminescente reactie wordt bepaald door:

1°. de mate waarin nevenreacties optreden naast de eigenlijke chemoluminescente reactie;

2°. de waarschijnlijkheid, dat het emitterend molecuul bij de reactie in aangeslagen toestand ontstaat;

3°. het fluorescentierendement van het emitterend molecuul.

Op blz. 52 zagen we, dat zelfs voor het sterkst chemoluminescente phtaalzuurhydrazide, 3-amino, het rendement van de chemoluminescente reactie zeer gering is, nl. ca. 0,4 %₁₀₀. *Dit lage rendement zal in hoofdzaak moeten worden toegeschreven aan het optreden van nevenreacties en/of aan een kleine waarschijnlijkheid, dat het molecuul in aangeslagen toestand ontstaat.*

Wat betreft het fluorescentierendement en het relatief chemoluminescent vermogen der phtaalzuurhydraziden, is het vanuit theoreties standpunt veel moeilijker uitspraken te doen dan over de spektrale ligging: Het fluorescentierendement wordt bepaald door het quotiënt van de overgangswaarschijnlijkheid voor spontane emissie en de kans, dat de aanslagenergie op andere wijze verdwijnt. Zoals we in hoofdstuk I, § 7 bespraken, moet men het sterk uiteenlopende fluorescentierendement in hoofdzaak toeschrijven aan een verschillende kans op degeneratie van de elektronenenergie. Dit proces nu geeft waarschijnlijk aanleiding tot een van de meest ingewikkelde problemen op het gebied van de optiese eigenschappen van molekulen. Een enkele poging in deze richting heeft men toch gewaagd. Zo berust volgens Lewis⁴⁾ het lage fluorescentierendement van nitrobenzol ten opzichte van dat van benzol op een degeneratie van de elektronenaanslagenergie in trillingsenergie van de nitrogroep. Dat dit voor het nitro-phtaalz. hydr. niet het geval is, blijkt uit het feit, dat zowel bij de fluorescentie als de chemoluminescentie ook het ongesubstitueerde molecuul een zeer laag rendement vertoont.

§ 18. Het emitterend molecuul.

In § 12 kwamen we tot de gevolgtrekking, dat het bij de chemoluminescente reactie emitterende molecuul niet het phtaalzuurhydrazide zelf kon zijn, noch in zijn zure, noch in zijn alkaliese configuratie. In verband met de uitgesproken invloed van de substituent op het emissie-

spektrum besloten we ertoe, dat het essentieel anders van bouw moet zijn dan het molekuul waarvan we uitgaan.

Uit het volgende zullen we zien, dat het emitterend molekuul waarschijnlijk ook geen eindprodukt is van de reactie. Dit zou in dat geval een fluorescentie moeten vertonen met hetzelfde spektrum als de chemoluminescentie: Volgens sommige onderzoekers wordt er bij de reactie het vrije phtaalzuur gevormd. Het 3-hydroxy en 3-aminophtaalzuur nu fluoresceren in alkalies milieu geel, in tegenstelling tot de blauwe chemoluminescentie. In zuur milieu is er geen fluorescentie. Hiermede is de mogelijkheid, dat het vrije phtaalzuur het emitterend molekuul zou zijn, uitgesloten. Verder blijkt, dat er geen verband bestaat tussen de fluorescentie van de uitgelichte oplossing en de chemoluminescentie. Deze ligt soms bij langer soms bij korter golflengte of ontbreekt geheel. Hieruit kunnen we geen aanwijzingen putten voor de aanwezigheid van een ander eindprodukt, dat voor de chemoluminescentie aansprakelijk zou zijn. Intussen blijft het denkbaar, dat het emitterend molekuul als eindprodukt van de chemoluminescente deelreactie chemies stabiel is en het mogelijk kan zijn het reactieverloop zó te leiden dat dit niet verder wordt afgebroken. In dat geval kan men zeggen, dat het emitterend molekuul eindprodukt is van de reactie.

Tenslotte meenden we in § 13, dat er geen aanleiding was te onderstellen, dat het chemoluminescentiespektrum een superpositie is van meer dan één spektrum, niettegenstaande het als regel breder is dan de fluorescentiespektra van de zure oplossing. Hoe onwaarschijnlijk het ons ook toelijkt, mogen we deze mogelijkheid toch niet geheel uitsluiten.

§ 19. Het reaktiemechanisme.

Hoewel het niet op onze weg ligt het voor en tegen van de verschillende reaktieschema's te bespreken, die men in de loop van de tijd heeft opgesteld voor de chemoluminescente reactie, willen we toch aan de hand van enkele eigen waarnemingen een paar woorden aan dit probleem wijden.

Volgens verschillende onderzoekers (Drew²⁸), Kautsky⁵¹), Albrecht⁴⁷) wordt bij de chemoluminescente reactie uiteindelijk het oorspronkelijk molekuul teruggevormd. Hiervoor had men verschillende argumenten:

1°. De spektrale overeenkomst van het chemoluminescentielicht en de fluorescentie van de zure oplossing. Het eindprodukt zou volgens Albrecht⁴⁷) de ketovorm van het phtaalzuurhydrazide zijn, dat in aangeslagen toestand ontstaat. Daar men echter al spoedig afwijkingen van de identiteit van het fluorescentie- en chemoluminescentiespektrum meende te moeten vaststellen, verviel dit argument voor de latere onderzoekers.

2°. De grote lichtopbrengst in het geval van 3-aminophtaalzuur-

hydrazide bracht sommige onderzoekers tot de opvatting, dat elk molecuul meer dan één quant moest uitzenden. Dit was mogelijk, wanneer het de reaktieketen meerdere malen doorliep.

Harris en Parker⁴⁶⁾ bepaalden echter het quantenrendement van de reactie van 3-amino bij oxydatie met peroxyd en natriumhypochloriet op slechts 3⁰/₁₀₀, d.w.z. per 1000 molekulen worden 3 quanten uitgezonden. Uit onze schatting van het rendement bij de elektrolysemethode op blz. 52 volgde, dat het ca. 0,4⁰/₁₀₀ bedroeg voor het sterkst chemoluminescente phtaalzuurhydrazide, 3-amino en overeenkomstig minder voor de zwakkere. Hieruit is het duidelijk, dat genoemd argument voor de terugvorming van het hydrazide ten enen male vervalst.

3°. Kautsky⁵¹⁾ oxydeerde 3-amino met perchloron, $\text{Ca}(\text{OCl})_2$. Door aan de oplossing van het oxydatieprodukt in aceton waterige alkalie toe te voegen lichtte deze gedurende korte tijd sterk blauw. Na afloop was hij in staat in de oplossing 3-amino aan te tonen door er een oxydatiemiddel aan toe te voegen, waarbij de bekende chemoluminescentie van 3-amino optrad. Dit is de enige aanwijzing voor een mogelijke terugvorming van het hydrazide bij de chemoluminescente reactie. Ons inziens staat echter de verklaring van deze proeven nog min of meer open en kunnen ze niet zonder meer als bewijs dienen voor de terugvorming van het hydrazide.

Door Drew²⁸⁾ werd een reactieschema opgesteld, waarin, in tegenstelling met dat van Albrecht⁴⁷⁾ aan peroxyd een essentiële rol wordt toegekend. Inderdaad is, zoals we reeds gezien hebben, peroxyd nodig wil men een intensieve chemoluminescentie verkrijgen. Volgens Drew wordt er allereerst een peroxydverbinding van het phtaalzuurhydrazide gevormd, dat na dehydrogenatie en afsplitsen van zuurstof tot de beginstof terugvoert. Ergens op deze weg wordt het licht uitgezonden. Inderdaad gelukte het hem een peroxyd van enkele phtaalzuurhydraziden te isoleren.

Het idee van een peroxydvorming wordt nu tot op zekere hoogte gesteund door onze waarneming, dat bij de elektrolysemethode onder optimale omstandigheden de intensiteit van de chemoluminescentie onafhankelijk is van de peroxydkoncentratie mits deze groter is dan de concentratie van het phtaalzuurhydrazide. Ze neemt ten naaste bij evenredig met de peroxydkoncentratie af wanneer de concentratie kleiner wordt dan die van het phtaalzuurhydrazide. Men zou hieruit kunnen besluiten, dat het de peroxydvorm van het molecuul is, welke reageert. Tenslotte is er nog een tweede aanwijzing gelegen in het absorptiespektrum: Door toevoegen van peroxyd aan een alkaliese oplossing van het phtaalzuurhydrazide vermindert de absorptiecoëfficiënt in de naar het rood aflopende tak van het absorptiespektrum met ca. 10%. Bijzonder duidelijk is dit bij de nitroverbinding, waar de kleur van de oplossing tengevolge van de toevoeging van peroxyd van goudgeel om-

slaat naar lichtgeel. Het is niet onmogelijk dat dit aan een peroxydvorming moet worden toegeschreven. Globale waarneming leert, dat molair een één à twee keer groter hoeveelheid peroxyd moet worden toegevoegd dan van het phtaalzuurhydrazide aanwezig is, om de kleuromslag geheel tot stand te brengen. Verder toevoegen van peroxyd verandert de kleur niet meer.

Doordat er naast de eigenlijke chemoluminescente reactie ook in belangrijke mate nevenreacties optreden, wordt aan het ophelderen van het reaktiemechanisme langs chemiese weg grote moeilijkheden in de weg gelegd en is voor het verdere onderzoek een nauwe samenwerking tussen physici en chemici nodig.

HOOFDSTUK VI

BIOLUMINESCENTIE.

In dit hoofdstuk wordt de bepaling van de emissiespektra van enkele lichtbacteriën en lichtende schimmels beschreven. Hieraan worden enige algemene beschouwingen verbonden.

§ 1. Storende omstandigheden bij het bepalen van bioluminescentiespektra.

Bij de tot dusver in de literatuur gepubliceerde emissiespektra van lichtgevende mikro-organismen heeft men steeds volstaan met een spektrale analyse van het licht, zoals dit door de betreffende kultures als geheel werd uitgezonden. De hieronder volgende uiteenzetting moge doen inzien, dat het aldus verkregen resultaat niet bevredigend is, wanneer men zich tot taak stelt de spektrale energieverdeling van de straling, welke door het lichtemitterende molekuul wordt uitgezonden zo nauwkeurig mogelijk vast te stellen.

We zagen toch reeds in de beide vorige hoofdstukken, dat het bij het bepalen van het spektrum van het licht, uitgezonden bij chemiese reacties, steeds nodig is dit te korrigeren op de absorptie, die het licht in de oplossing ondergaat. Bij lichtende bacteriën, schimmels enz. is het nu niet mogelijk deze korrektie op eenvoudige wijze aan te brengen, doordat er naast absorptie ook een sterke en min of meer selektieve verstrooiing optreedt van het licht aan de cellen, die zich op de weg van het uit-tredende licht bevinden, welke de weglengte vergroot. Bovendien is de absorptie in en buiten de cel verschillend. Het is daardoor niet duidelijk voor welke laagdikte een korrektie moet worden aangebracht en evenmin welke absorptiecoëfficiënt in rekening moet worden gebracht. Het enige middel, dat ons ten dienste staat om toch het zuivere emissiespektrum te bepalen, is het beperken van de absorptie tot een minimum. Bij de lichtbacteriën kan dat gedaan worden door met zeer verdunde suspensies te werken, zoals in § 2 zal worden uitgewerkt. In zulke suspensies treedt weliswaar nog een aanzienlijke verstrooiing van het licht door de cellen op, doch deze alléén veroorzaakt geen vertekening van het spektrum, doordat de cellen hun licht in alle richtingen gelijkmatig uitzenden.

Aan het zo bepaalde spektrum kunnen we echter niet dezelfde waarde

hechten als aan de spektra verkregen van chemoluminescente reacties. Het is namelijk in laatste instantie altijd nog het emissiespektrum van een *bakteriecel* en dus reeds vertekend door de absorptie, die het licht in de cel zelf ondergaat door de daarin voorkomende gekleurde celbestanddelen.

In welke mate dit het geval is, kan niet met zekerheid gezegd worden, zolang we de inwendige structuur van de bacteriecel en de verdeling van de erin aanwezige kleurstoffen niet kennen. Het is echter wel mogelijk om met de kennis, die ons op het ogenblik ter beschikking staat, een schatting te maken van de grootte-orde ervan, waarbij het blijkt, dat de absorptie in één cel naar alle waarschijnlijkheid niet meer dan enkele procenten zal bedragen:

Van de gekleurde stoffen, die in elke bacteriecel voorkomen zijn de haemineverbindingen (fermenthaemine, cytochromen) en het lactoflavine de meest bekende. Deze spelen een rol in het ademhalingsproces van de cel en komen in hoofdzaak aan eiwitten gebonden voor. De haemineverbindingen bezitten absorptiebanden in het zichtbare gebied. Lactoflavine, vitamine B₂ is een gele kleurstof met een breed absorptiemaximum bij 4450 Å, dat in betrekkelijk grote hoeveelheden in de cel aanwezig is. De overige celbestanddelen: water (ca. 80%), eiwitten (ca. 10%), koolhydraten, anorganiese verbindingen en lipoiden absorberen eerst in het ultraviolet met uitzondering van de lipoiden, die soms zwak geel gekleurd zijn en een geringe absorptie in het violet bezitten. We kunnen ons daarom in hoofdzaak tot de aan eiwitten gebonden kleurstoffen bepalen.

Van de absorptie, die in een bacteriecel optreedt tengevolge van de aanwezigheid van lactoflavine, kunnen we een schatting maken, wanneer we onderstellen, dat ze *homogeen* over de cel verdeeld is: Volgens de metingen van Rottier⁵²⁾ bevatten lichtbakteriën ca. 40 γ lactoflavine per gram natte bakteriën *). Bij een homogene verdeling bedraagt dan de concentratie van de kleurstof 10⁻⁷ grm/cm³ (mol. gew. van lactoflavine = 367).

De absorptie door één cel berekenen we met behulp van de betrekking:

$$\ln \frac{I_0}{I} = \beta c d \quad \dots \dots \dots (a),$$

waarin $\ln \frac{I_0}{I}$ de gezochte absorptie voorstelt.

β = abs. koëff. van lactoflavine: 2,7.10⁷ cm²/grm in het maximum van absorptie (4450 Å)

c = konc. van het lactoflavine: 10⁻⁷ grm/cm³

d = halve diameter van de bacterie, ca. $\frac{1}{2} \mu$.

*) In de volgende globale berekeningen zullen we voor de verschillende celbestanddelen een soortelijk gewicht één aannemen en dus gewicht en volumen gelijk stellen.

Voor $\ln \frac{I_0}{I}$ bij 4450 Å vinden we met behulp van deze getallen de waarde van $1,3 \cdot 10^{-4}$. Daar voor $\ln \frac{I_0}{I} = 0,1$ de absorptie 10 % bedraagt is de concentratie van het lactoflavine in de bacteriecel ca. 800 keer kleiner dan met een absorptie van 10 % overeenkomt.

Bij een inhomogene verdeling van de kleurstof kan de absorptie aanzienlijk groter worden dan met de vorige berekening overeenkomt. We denken ons bijvoorbeeld, dat ze in een bolletje met straal r om het emitterend systeem aanwezig is. De waarde van cd in de formule voor $\ln \frac{I_0}{I}$ wordt dan bij eenzelfde totale hoeveelheid lactoflavine vermenig-

vuldigd met $\frac{R^3}{r^3} \cdot \frac{r}{R} = \frac{R^2}{r^2}$, waarin R de straal van de bacteriecel voorstelt.

Voor $r = \frac{R}{20}$ wordt bijv. cd 400 keer zo groot en treedt er een absorptie op van de orde van 5 %.

Het lijkt dus alsof de absorptie willekeurig hoge waarde kan aannemen, wanneer r voldoende klein wordt. De volgende overwegingen stellen hieraan echter waarschijnlijk een grens: De kleurstoffen, die in de levende cel voorkomen, verrichten een bepaalde functie en zijn daarbij, zover men weet, steeds aan eiwitoppervlakken gebonden. De maximale concentratie van de kleurstof in de cel vinden we dan door het eiwit als oppervlak ter dikte van één molecuul aanwezig te denken en dit oppervlak geheel te bezetten met kleurstofmolekulen. De volumeverhouding van kleurstof en eiwit wordt dan gegeven door de verhouding in diameter der molekulen of door de derdemachtswortel uit de verhouding der molekulairegewichten. Nemen we voor de mol. gewichten van kleurstof en eiwit resp. de waarden 400 en 10^5 aan, dan wordt deze verhouding 0,16. De maximale kleurstofconcentratie bedraagt dan $\frac{0,16}{400} \text{ gram/cm}^3 = 4 \cdot 10^{-4} \text{ gram/cm}^3$. Daar de cel voor slechts ca. 10 % uit eiwit bestaat, is bij de meest gekoncentreerde verdeling der kleurstof deze aanwezig in een bolletje met een straal, die de helft is van die van de bacteriecel. De waarde van $\ln \frac{I_0}{I}$ in formule (a) wordt nu ca. 0,25, dit is vijf keer groter dan met een absorptie van 5 % overeenkomt.

Bij een dergelijke structuur van de eiwitoppervlakken in de bacteriecel bevindt zich op elk eiwitmolecuul ca. 40 kleurstofmolekulen, terwijl men als regel aanneemt, dat één of enkele kleurstofmolekulen aan één eiwitmolecuul gebonden zijn. Daardoor wordt het waarschijnlijk, dat de hierboven gegeven bovenste grens voor de absorptie vele malen te groot is en we zeker geen absorptie behoeven te verwachten, die de waarde van 10 % overschrijdt.

In § 2 geven we op grond van experimentele gegevens nog een schatting van de betreffende absorptie.

§ 2. Bepaling van de emissiespektra van *Ph. phosphoreum* en *Ph. splendidum*.

Lichtbakteriën kan men veelal isoleren uit zeewater en met vrij grote regelmaat van dode zeevis. Nagenoeg alle soorten lichtbakteriën zijn dan ook zoutwatervormen. Men kweekt ze in vloeibare voedingsmedia of op vaste voedingsbodems (agar agar, gelatine). De groei geschiedt zeer snel, zodat men als regel een dag na het enten over een goed lichtende kultuur beschikt.

Bij voldoende lage dichtheid van een bakteriesuspensie is de kleur van het uitgezonden licht blauwgroen. Bij grote dichtheden is de kleur groen door een sterker absorptie van het blauwe deel van het spektrum. De twee bakteriesoorten, waarvan het spektrum werd opgenomen, zijn vrij makkelijk lichtsterk te verkrijgen.

*Ph. **) *phosphoreum* werd gekweekt in een aeratiekolf in een voedingsmedium met 2 % pepton, 1 % NaNO_3 en 2 % NaCl , *Ph. splendidum* in staande kolven in een voedingsmedium met 10 % gistautolysaat, 1 % NaNO_3 en 2 % NaCl . Na ca. 20 uur werden de bakteriën afgecentrifugeerd en gesuspenseerd in 0,125 molair fosfaatbuffer van $p_H = 7,5$ met 3 % glucose en 1 % NaNO_3 . De suspensie werd met lucht geaëreerd en in een kuwet voor de spektrograaf geplaatst. De achterwand van de kuwet was als regel zwart geverfd om een vergroting van de weglengte door reflectie te voorkomen.

De belichtingstijd bedroeg voor de meest verdunde suspensie twaalf uur bij een spleetbreedte van de spektrograaf van 0,3 mm (zie blz. 41).

In fig. 33 zijn verschillende emissiespektra van *Ph. phosphoreum* weergegeven. De spektra A en B hebben betrekking op suspensies met een dichtheid van resp. 2 en 8 mm³ natte bakteriën **) per cm³, beide opgenomen in een laagdikte van 1 cm. Het spektrum C werd opgenomen in een gewit kuwet bij een dichtheid van 40 mm³/cm³.

Het verschil tussen de spektra A en B is zeer gering: voor $\lambda < 4600 \text{ \AA}$ ligt spektrum A 10 à 15 % hoger dan spektrum B, voor $\lambda > 4600 \text{ \AA}$ valt het verschil binnen de meetfout en bedraagt minder dan 3 %. Blijkbaar is bij deze dichtheden de absorptie van het licht tengevolge van het doorlopen van meerdere bacteriecellen te verwaarlozen in het gebied boven 4600 Å. Beneden 4600 Å bewerkt een vier keer groter absorptie een intensiteitsafname van 10 à 15 %. Deze intensiteitsvermindering komt overeen met drie keer de absorptie, die nog in spektrum A aanwezig is, welke laatste dus 3 à 5 % bedraagt in het beschouwde golflengtegebied.

*) *Ph.* is een afkorting van *Photobacterium*, d.i. lichtbakterie.

**) De aldus aangegeven dichtheid heeft betrekking op het volumen der bakteriën na centrifugeren in een Tromsdorff-buisje.

Doordat het spektrum A het gemiddelde is van meerdere spektra en meerdere opnamen is de nauwkeurigheid ervan groter dan de 5 %, welke men als regel bij de fotografiese intensiteitsmeting bereikt en we schatten deze nauwkeurigheid op 3 %. *We kunnen dit spektrum identificeren met het gemiddelde spektrum, dat door een bacteriecel wordt uitgezonden, met uitzondering van het gebied beneden 4600 Å, waar dit laatste 3 à 5 % hoger gelegen zal zijn.*

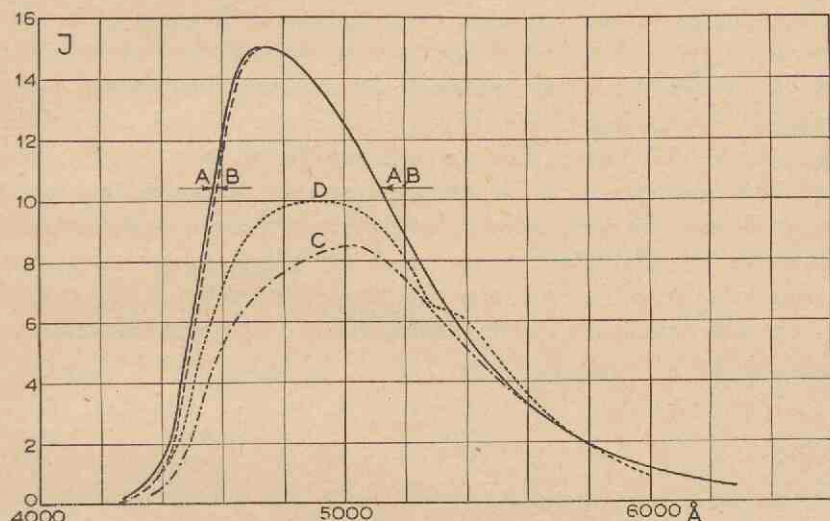


Fig. 33. Emissiespektrum van *Ph. phosphoreum*.

A. dichtheid $2 \text{ mm}^3/\text{cm}^3$, laagdikte 1 cm.

B. dichtheid $8 \text{ mm}^3/\text{cm}^3$, laagdikte 1 cm.

C. dichtheid $40 \text{ mm}^3/\text{cm}^3$, gewit kuwet.

D. emissiespektrum volgens Eymers en van Schouwenburg⁴⁰⁾.

Uit het verschil tussen de spektra A en B kunnen we tevens een ruwe schatting maken van de absorptie door één bacterie: Bij een dichtheid van 2 mm^3 per cm^3 doorloopt het licht een weg van 20μ in de bacteriën, wanneer het rechtlijnig door een 1 cm dikke laag van de suspensie gaat. De gemiddelde weglengte van het uittredende licht is, wanneer er geen verstrooiing optreedt, $0,5 \text{ cm}$, wat overeenkomt met een weg van 10μ in de bacteriën. Tengevolge van de verstrooiing wordt de gemiddelde weg langer en verandert tevens de verhouding van de weglengten, afgelegd in en buiten de bacteriecel. Van dit laatste effect is het moeilijk iets te zeggen, daar het bepaald wordt door het verloop van de brekingsindex in de bacterie. We nemen daarom aan, dat het licht bij spektrum A gemiddeld door tien bacteriecellen is gegaan. De absorptie, die hiervan het gevolg is, bedraagt zoals we zagen maximaal 5 %, zodat uit deze schatting volgt, dat de absorptie door één bacterie maximaal $\frac{1}{2} \%$ bedraagt.

Hoe ernstig de vertekening kan zijn, wanneer niet met zéér verdunde

suspensies en kleine laagdikte gewerkt wordt blijkt in fig. 33 uit kromme C, bepaald bij hoge concentratie en grote laagdikte. Voor $\lambda > 5500 \text{ \AA}$ kan men kromme C laten samenvallen met A en B. Waarschijnlijk is de absorptie in dit gebied te verwaarlozen. Van 55 tot $5100 \text{ \AA}$ treedt een zwakke absorptie op, terwijl beneden $4800 \text{ \AA}$ een gelijkmatige vrij sterke absorptie aanwezig is.

Door Eymers en van Schouwenburg⁴⁰⁾ werd in 1936 een emissiekromme van *Ph. phosphoreum* gepubliceerd, dat van het door ons bepaalde spektrum A afwijkt en in fig. 33 als kromme D is weergegeven. Bij $5400 \text{ \AA}$ vertoont het een nevenmaximum, dat door ons nooit werd gevonden. Wanneer we van dit nevenmaximum afzien, ligt kromme D tussen de krommen A en C in en we moeten dan ook besluiten, dat bij de bepaling van het emissiespektrum door Eymers en van Schouwenburg de dichtheid van de suspensie te groot is geweest. Behalve dit spektrum werden door hen later ook andere emissiespektra voor *Ph. phosphoreum* gevonden, die beter overeenstemmen met het door ons bepaalde spektrum. Onder andere ontbreekt daarin als regel het nevenmaximum. Deze werden echter niet gepubliceerd.

Op geheel dezelfde wijze als voor *Ph. phosphoreum* bepaalden we het emissiespektrum van *Ph. splendidum*. De opname geschiedde bij een dichtheid van 6 en $18 \text{ mm}^3/\text{cm}^3$ in een laagdikte van 0,5 cm. Het spektrum bij dichtheid 6 is in fig. 34 weergegeven tesamen met spektrum A van *Ph. phosphoreum*. Voor $\lambda > 4500 \text{ \AA}$ was er geen systematische afwijking tussen de spektra bij dichtheid 6 en 18. Bij $4400 \text{ \AA}$ lag het spektrum behorend bij de kleinste dichtheid 5% boven het andere, bij $4300 \text{ \AA}$

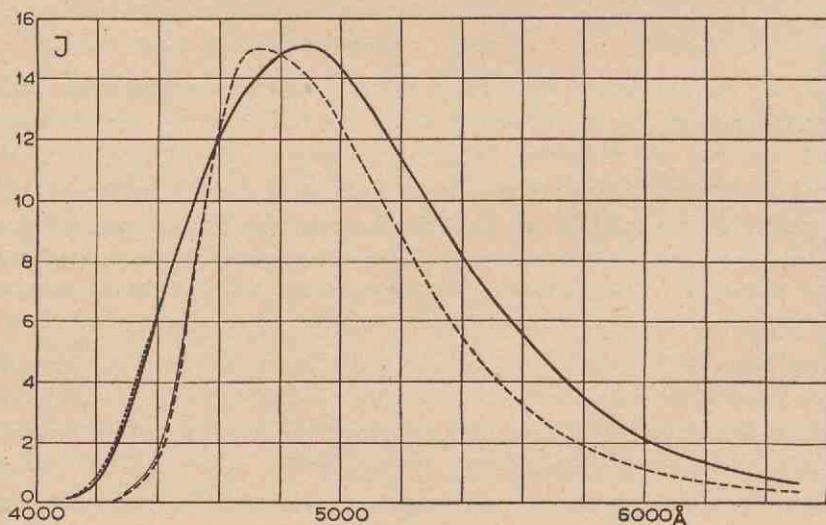


Fig. 34. Emissiespektra lichtbacteriën.

— — — — — *Ph. phosphoreum*
 ————— *Ph. splendidum*

16 % en bij 4200 Å 30 %. Het verschil tussen de beide spektra komt in dit geval overeen met twee keer de absorptie, die nog in het spektrum bij dichtheid 6 aanwezig is. Het emissiespektrum van één bakterie ligt daardoor bij 4400 Å $2\frac{1}{2}$ % boven het in fig. 34 weergegeven spektrum, bij 4300 Å 8 % en bij 4200 Å 15 %. Brengt men in fig. 34 in de spektra van *Ph. phosphoreum* en *Ph. splendidum* de betreffende korrekties aan, dan veranderen deze nauwelijks. De gekorrigeerde gedeelten der spektra zijn door een dun getrokken, resp. gepunte lijn aangegeven.

§ 3. Verband tussen emissie- en inaktiveringsspektra.

In tegenspraak met de waarneming van Eymers en van Schouwenaar⁴⁵⁾, die vermelden, dat de emissiespektra van *Ph. phosphoreum* en *Ph. splendidum* identiek zijn, blijkt uit fig. 34, dat dit niet het geval is: Het emissiespektrum van *Ph. phosphoreum* is smaller en valt naar het violet steiler af, terwijl het maximum 150 Å naar het violet verschoven is ten opzichte van dat van *Ph. splendidum*. Daar we, zoals in de vorige paragrafen gebleken is, de emissiespektra met een hoge mate van waarschijnlijkheid mogen identificeren met de spektra der betreffende chemoluminescente reacties, komen we tot de gevolgtrekking, dat we bij de twee bakteriën met verschillende emitterende molekulen hebben te maken.

Fig. 34 doet ons denken aan fig. 18 op blz. 50, waarin de chemoluminescentiespektra van 3-amino- en 3-aceetamidophtaalzuurhydrazide analoge verschillen vertonen: Het spektrum van 3-amino is smaller dan dat van 3-aceetamido en valt naar het violet steiler af. Het maximum ligt op dezelfde plaats. Bij 3-acetylcarbamido is ook het maximum naar langer golflengte verschoven.

Het is dus zeer goed mogelijk, dat het emitterend molecuul bij *Ph. phosphoreum* en *Ph. splendidum* in hoofdzaak hetzelfde is en het verschil uitsluitend in een zijketen of substituent optreedt. Men treft een dergelijk verschil in structuur bij eenzelfde functie van het molecuul in de biologie meermalen aan. Bijvoorbeeld is dat het geval voor chlorophyl a en b in de groene planten en voor vitamine E bij dieren. De verschillende molekuulvormen komen daar in hetzelfde organisme naast elkaar voor. De mogelijkheid, dat ook bij één lichtbakteriesoort meer dan één vorm van het emitterend molecuul voorkomt, kunnen we daarom niet uitsluiten.

Daarnaast bestaat de mogelijkheid, dat het emitterend molecuul wel hetzelfde is in de twee gevallen en het verschil in spektrum moet worden toegeschreven aan een verschillend dragereiwit, waaraan dit molecuul is gebonden. Een dergelijke invloed op het absorptiespektrum is wel bekend: Bij in de natuur voorkomende kleurstoffen verschuift het absorptiespektrum door de eiwitbinding naar langer golflengte. Uit metingen in de Biophysiese werkgroep verricht door Dr. E. Katz en Dr. E. C.

Wassink, bleek dat bij bacteriochlorophyl een verschuiving van ca. 200 Å optreedt, bij bacterioviridine zelfs van ca. 1000 Å ⁵³⁾).

Nog vóór het bekend was, dat de emissiespektra van *Ph. phosphoreum* en *Ph. splendidum* verschillend zijn, was uit door van der Kerk en mij verrichte metingen gebleken, dat hun inaktiveringsspektra duidelijk verschilden ⁵⁴⁾).

Wanneer lichtbakteriën *uitwendig* bestraald worden door violet of ultraviolet licht wordt de *eigen* emissie der bakteriën ten dele gedoofd. In de loop van enkele uren herstelt zich de eigen emissie weer geleidelijk. De dovende werking hangt af van de golflengte van het gebruikte licht en wordt door van der Kerk ⁵⁴⁾ toegeschreven aan de absorptie door en de ontleding van een voor de lichtemissie noodzakelijke stof. In het inaktiveringsspektrum is nu de dovende werking per ingestraald quant uitgezet tegen de golflengte van het ingestraalde licht en men kan aannemelijk maken, dat dit spektrum het *absorptiespektrum* voorstelt van het lichtgevoelige molecuul, dat tengevolge van de bestraling wordt ontleed.

In § 4 zullen we de vraag naar het lichtemitterend en het licht-absorberende molecuul nader onder het oog zien. Hierop vooruit lopende vermelden we nu reeds dat van der Kerk ⁵⁴⁾ op grond van de voorstellingen, die men zich van het bioluminescentieproces maakt, meent dat het lichtgevoelige molecuul nauw verwant is aan het emitterend molecuul. Zelfs kan men zich van het bioluminescentieproces en het fotochemies ontledingsproces een zodanige voorstelling maken, dat het emitterend resp. absorberend molecuul *identiek* zijn (zie blz. 95). Om die redenen zijn in fig. 35 de emissiespektra van *Ph. phosphoreum* en *Ph. splendidum* uitgezet tegen het golfgetal (energie in quanta) en zijn in dezelfde figuur ook de inaktiveringsspektra van deze bakteriën getekend. We hebben hier in één figuur het emissiespektrum van het emitterend molecuul en het absorptiespektrum van het lichtgevoelige molecuul en willen nagaan in hoeverre er spiegelsymmetrie tussen deze spektra optreedt. In deze gedachtengang identificeren we het emissiespektrum stilzwijgend met het fluorescentiespektrum van het betrokken molecuul. We zien nu, dat er inderdaad een zekere mate van spiegelsymmetrie bestaat: Zowel bij *Ph. phosphoreum* als bij *Ph. splendidum* eindigt het emissiespektrum, waar het inaktiveringsspektrum begint. De inaktiveringsspektra der verschillende bakteriesoorten vertonen wat de spektrale ligging betreft, onderling hetzelfde verschil als de emissiespektra. Het einde van het emissiespektrum bij hoog golfgetal en het begin van het inaktiveringsspektrum van *Ph. splendidum* zijn beide naar groter golfgetal verschoven ten opzichte van die van *Ph. phosphoreum*.

Wat de *vorm* der spektra betreft is er evenwel geen volledige symmetrie aanwezig: bij *Ph. phosphoreum* is de helling in het emissiespektrum

groter dan in het inaktiveringsspektrum. Bij *Ph. splendidum* is juist het omgekeerde het geval.

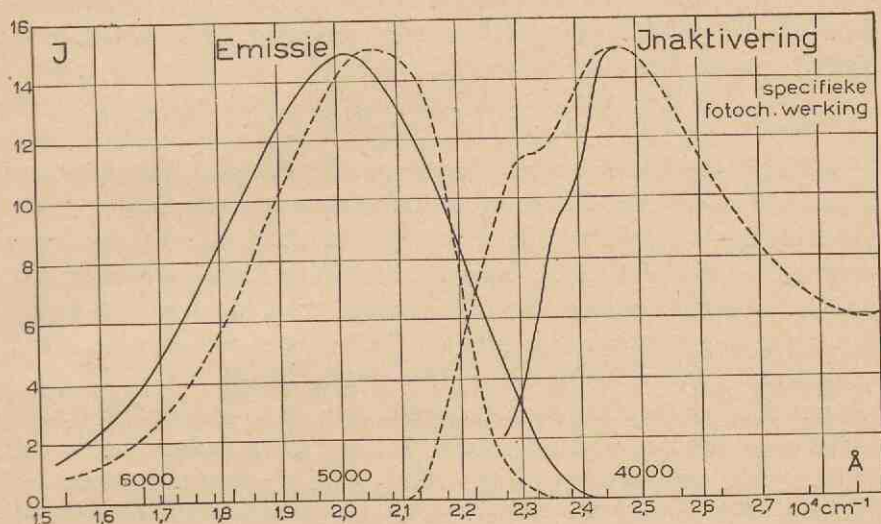


Fig. 35. Toetsing van de wet der spiegelsymmetrie voor emissie- en inaktiveringsspektra der lichtbacteriën.

———— *Ph. phosphoreum* - - - - - *Ph. splendidum*

We mogen dus uit fig. 35 niet zonder meer de gevolgtrekking maken, dat de twee verschillende soorten spektra bij hetzelfde molecuul behoren. Echter kan men de waargenomen kwalitatieve spiegelsymmetrie wel als *argument* gebruiken voor een nauwe verwantschap, zo niet identiteit van het emitterende en het bij de fotochemische ontleding absorberende molecuul.

§ 4. Lichtproces en fotochemies ontledingsproces.

Voor een uitvoerige behandeling van het bioluminescentieproces, voor zover het de chemiese reactie betreft, welke eraan ten grondslag ligt, verwijzen we naar het proefschrift van G. J. M. van der Kerk⁵⁴⁾. Sinds Dubois⁵⁵⁾ (1885) stelt men zich voor, dat bij de lichtreactie twee stoffen zijn betrokken, een laagmoleculaire en een hoogmoleculaire (eiwit), die men de namen *luciferine* en *luciferase* heeft gegeven. Voor sommige organismen o.a. het kreeftje *Cypridina hilgendorffii* kon men deze stoffen in meer of minder zuivere toestand uit de cel isoleren. De reactie, waarbij het licht wordt uitgezonden, is een *oxydatie* van luciferine door zuurstof, waarbij luciferase als katalysator optreedt.

In de loop van de jaren is door de Amerikaanse onderzoekers E. N. Harvey e.m. enerzijds en de medewerkers van de Biophysiese werkgroep anderzijds deze reactie nader gepreciseerd. Bij van der Kerk neemt ze uiteindelijk de volgende gedaante aan:

Luciferine, LH_2 wordt aan het luciferase, A gebonden: ALH_2 . Dit verenigt zich met zuurstof tot het complex ALH_2O , dat een inwendige oxydatie ondergaat. Het aan het luciferase gebonden oxydatieproduct van het luciferine, AL_1 ontstaat daarbij in aangeslagen toestand en zendt het bioluminescentielicht uit:



Deze oxydatie is *irreversibel*. Het oxydatieproduct L_1 diffundeert van de katalysator weg en is verder voor het lichtproces verloren.

Doordat in dit schema het emitterend molecuul aan het luciferase oppervlak is gebonden, is het mogelijk om de zg. kruisingsproeven van H a r v e y ²⁹) te begrijpen. Uit deze proeven volgt nl., dat de kleur van het uitgezonden licht bij nauw verwante lichtende organismen niet wordt bepaald door het luciferine maar door het luciferase.

Naast deze irreversibele oxydatie treedt er in de cel ook een *reversibele* oxydatie van het luciferine op, waarbij het beurtelings geoxydeerd wordt tot L en weer gereduceerd wordt tot LH_2 . Hierbij wordt geen licht uitgezonden. Als zodanig speelt het een rol in het ademhalingsproces als overbrenger van waterstof. In de cel komt dus zowel L als LH_2 voor.

Onder zeker voorbehoud komt van der Kerk tot de gevolgtrekking, dat bij de fotochemische inaktivering het *dehydroluciferine* L het licht absorbeert, waardoor het reversibel wordt ontleed.

Volgens deze voorstelling is het bioluminescentiespektrum het emissiespektrum van het kleurstof-eiwitkomplex AL_1 , het fotochemische inaktiveringsspektrum het absorptiespektrum van dehydroluciferine, L. De spektra in fig. 35 hebben dus betrekking op twee nauw verwante molekulen, L_1 en L, waarvan het eerste aan een eiwit gebonden is, het tweede evenwel niet. Daar een binding aan een eiwit als regel een verschuiving van het spektrum naar groter golflengte met zich brengt, geven we er de voorkeur aan te onderstellen, dat ook *het L aan een eiwit gebonden is* (eventueel aan hetzelfde als L_1). In dat geval kan men namelijk de waargenomen kwalitatieve spiegelsymmetrie beter begrijpen op grond van de nauwe verwantschap tussen de molekulen L en L_1 .

Naar aanleiding van hetgeen in hoofdstuk II werd besproken, kunnen we evenwel het eigenlijke lichtproces ook anders voorstellen. We zagen daar nl., dat aan oppervlakken geadsorbeerde fluorescerende kleurstoffen het verschijnsel der *chemofluorescentie door overdracht* kunnen vertonen. In de cel komen dergelijke systemen veelvuldig voor, nl. als eiwitoppervlakken waaraan kleurstoffen gebonden zijn. We kunnen ons het bioluminescentieproces daarom ook zó voorstellen, dat niet de stof, die aan het luciferase oppervlak geoxydeerd wordt het licht uitzendt, maar dat de reactie-energie overgedragen wordt aan een fluorescerende kleurstof, die aan hetzelfde oppervlak gebonden is en die het als fluorescentielicht emitteert. Het op het ogenblik aanwezige experimentele materiaal

over de bioluminescentie in het algemeen staat het niet toe deze chemofluorescentie door overdracht te onderscheiden van de direkte chemoluminescentie, zoals deze door van der Kerk verdedigd wordt.

In wezen verschilt de eerstgenoemde voorstelling zeer weinig van die van Harvey⁵⁶⁾ en medewerkers, volgens welke het *luciferase* tengevolge van de oxydatie van luciferine in aangeslagen toestand zou geraken en het bioluminescentielicht zou uitzenden. Het enige verschil is, dat in onze voorstelling niet het luciferase zelf, maar een eraan gebonden kleurstof de energie opneemt. In beide gevallen kan men inzien, dat de kleur van het uitgezonden licht weer bepaald wordt door het luciferase. Dit is ook de reden waarom de Amerikaanse onderzoekers steeds vasthouden aan het idee, dat luciferase het emitterend molecuul is.

Wanneer er direkte en indirecte chemoluminescentie naast elkaar in bioluminescente systemen optreedt of wanneer er meer dan één fluorescerende kleurstof aanwezig is, bestaat de mogelijkheid, dat het emissiespektrum voor eenzelfde organisme bij verschillende behandeling verschillend kan zijn, namelijk afhankelijk van de concentratie van de betreffende kleurstoffen. In dit verband merken we evenwel op, dat het emissiespektrum van *Ph. phosphoreum* in de loop van enkele jaren niet veranderde, terwijl Eymers en van Schouwenburg vaststelden, dat het spektrum onafhankelijk was van ouderdom, temperatuur, p_H en zoutgehalte van de cultuur.

Wanneer men de zo juist gegeven voorstelling van het bioluminescentieproces als een chemofluorescentie door overdracht aanvaardt en tevens diepere betekenis toekent aan de kwalitatieve symmetrie van het emissie- en het inaktiveringsspektrum, komt men tot de gevolgtrekking, dat het bij de inaktivatie absorberende molecuul, evenmin als dat bij de lichtemissie het geval is, een *zelf* bij de lichtreactie betrokken molecuul kan zijn. We komen dan tot de door van der Kerk verworpen gedachte van een *gesensibiliseerde fotochemische reactie*. Door hem wordt reeds vermeld, dat de Amerikaanse onderzoekers Chase en Giese⁵⁷⁾ bij *Cypridina*-luciferine konden aantonen, dat de fotochemische ontleding daarvan *wel* op sensibilisatie berust: Het gezuiverde luciferine wordt niet fotochemies ontleed, wel echter na toevoegen van een kleurstof (lactoflavine, eosine e.a.). Hoewel het niet zeker is, dat het inaktiveringsproces bij lichtbakteriën op dezelfde manier verloopt als bij *Cypridina*-luciferine, rechtvaardigt genoemd onderzoek toch om deze mogelijkheid ook bij de lichtbakteriën onder het oog te zien.

De eenvoudigste voorstelling, die we ons dan kunnen maken is, dat de aan het luciferase gebonden kleurstof, welke het bioluminescentielicht uitzendt, ook het fotochemies actieve licht absorbeert en de aanslag-energie overdraagt aan een direkt of indirect bij de lichtreactie betrokken molecuul, dat aan hetzelfde eiwit gebonden is en dat hierdoor wordt ontleed. Wat de inaktivering zelf betreft zou dan kunnen worden vastgehouden aan de door van der Kerk voorgestelde hypothese, nl. dat het dehydroluciferine, L wordt ontleed.

Het bezwaar dat door van der Kerk terecht tegen de hier beschreven sensibilisatie wordt gemaakt is, dat door het tussenschakelen van een overdrachtsmechanisme het moeilijker is in te zien, dat de door hem gedefinieerde fotochemiese werking *evenredig* is met het totale aantal ingestraalde quanten, zoals men dat bij de lichtbakteriën waarneemt. Echter laten zich wel omstandigheden denken, waarbij het verloop van een gesensibiliseerde fotochemiese ontleding hetzelfde is als van een direkte ontleding, zodat genoemd bezwaar niet zo ernstig moet worden opgevat.

Tenslotte vermelden we nog de mogelijkheid, dat de inaktivering op een ontleding van de fluorescerende kleurstof *zelf* berust. De dovende werking van de bestraling op de eigen emissie der bakteriën moet dan worden toegeschreven aan het verdwijnen van de fluorescerende acceptor van de bij de oxydatie van luciferine vrijkomende energie. Deze vorm van inaktivatie treedt bij *Cypridina* niet op, daar ze neer zou komen op een inaktivatie van het *luciferase*, welke men niet heeft gevonden⁵⁷⁾. Daarom zullen we op deze mogelijkheid hier niet verder ingaan.

§ 5. De emissiespektra van enkele lichtende schimmels.

Het bekende lichten van dood hout wordt hier te lande doorgaans veroorzaakt door het mycelium van de honingzwam, *Armillaria mellea*. Ook de mycelia van sommige andere zwammen, o.a. *Mycena polygramma*, *Omphalia flava*, *Clitocybe olearia*, kunnen onder daartoe gunstige voorwaarden lichtend zijn. Meestal is het lichten zéér zwak, zodat een goede donkeradaptatie nodig is om het te zien. De kleur van het licht kan men bij deze lage intensiteit evenwel niet vaststellen.

Sedert enkele jaren verzamelt Dr. Wassink voor de Biophysiese werkgroep verschillende lichtende schimmels. Het gelukte hem van de bovengenoemde vier soorten kulturen te kweken, die voldoende lichtsterk waren om de bepaling van het spektrum mogelijk te maken. De voorlopige resultaten van de opname van drie van deze schimmels geven we hier beknopt weer. Binnenkort zal een uitgebreider verslag van dit werk elders worden gepubliceerd.

Het lichtend mycelium van de op kersen- of brood-agar gekweekte schimmels is zuiver *wit* van kleur, zodat een belangrijke vertekening van het spektrum door absorptie niet is te verwachten. De lichtende laag bezit bovendien een geringe dikte.

A. mellea en *M. polygramma* werden opgenomen met de nog onveranderde spektrograaf bij een spleetbreedte van 0,3 mm en een belichtingstijd van 60 uur. *O. flava* werd gedurende 12 dagen opgenomen met de vier keer lichtsterker inrichting van de spektrograaf. Toch was de zwarting van de fotografiese plaat voor de laatste twee schimmels nog gering (10 %—25 %) en zijn de bepaalde spektra daardoor minder

nauwkeurig dan men als regel met de fotografiese intensiteitsmeting kan bereiken.

De resultaten van de drie opnamen zijn in fig. 36 weergegeven.

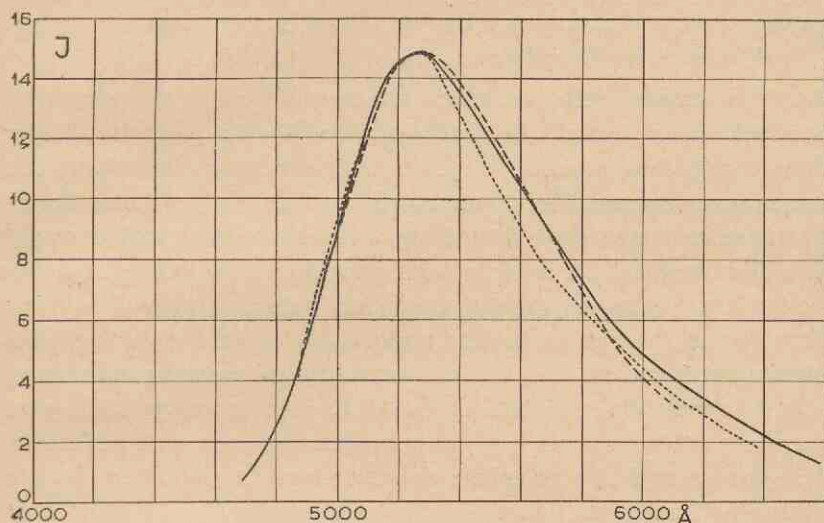


Fig. 36. Emissiespektra van lichtende schimmels.

———— *Armillaria mellea* ———— *Mycena polygramma*
 ----- *Omphalia flavida*

A. mellea. Vergelijken we het spektrum met dat van de lichtbacteriën in fig. 34, dan zien we, dat het bij groter golflengte is gelegen. Het maximum van emissie ligt in het groen, namelijk bij 5250 Å, de violetgrens bij ca. 4700 Å. Waar de kleur van het door de lichtbacteriën uitgezonden licht *blauwgroen* is, zal die van de schimmels *geelgroen* zijn. In vorm vertoont het spektrum de meeste overeenkomst met het spektrum van *Ph. splendidum*, hoewel de halfwaardebreedte geringer is.

Door Coblentz en Hughes⁵⁸⁾ werd eveneens het emissiespektrum van lichtend hout opgenomen. Dit valt in hoofdzaak samen met het door ons bepaalde spektrum (maximale afwijking ca. 10%).

M. polygramma. In het golflengtegebied van 4850 Å tot 5800 Å valt het spektrum binnen 5 % samen met dat van *A. mellea*. Het verschil van 10 %, dat boven 5800 Å optreedt is niet groter dan de onnauwkeurigheid bij de meting. Deze was vrij groot, doordat de zwarting der fotografiese plaat boven 5800 Å slechts 10—15 % bedroeg.

O. flavida. In het golflengtegebied van 4900 Å tot 5300 Å valt het spektrum binnen 5 % samen met dat van de beide andere schimmels. Boven 5300 Å ligt het 15 % lager dan dat van *A. mellea*. Of dit verschil

reëel is zal door een nauwkeuriger bepaling van het emissiespektrum moeten worden uitgemaakt.

We zien dus, dat de spektra van de drie schimmels zeer weinig verschillen en misschien zelfs identiek zijn. Het is dus zeer goed mogelijk, dat we bij alle drie met *hetzelfde* emitterende molecuul te maken hebben.

§ 6. Spektrum en molekuulbouw.

Door Eymers en van Schouwenburg⁴⁰⁾ werden de emissiespektra van enkele lichtende organismen en chemoluminescente reacties tegen de frequentie uitgezet en in twee of drie symmetrische krommen geanalyseerd. Ze gingen daarbij uit van de gedachte, dat deze symmetrische krommen door verbreding uit zogenaamde *grondfrequenties* zouden zijn ontstaan. De op deze wijze voor de verschillende bioluminescentie-spektra verkregen grondfrequenties bleken gelijk of nagenoeg gelijk te zijn, zij het dat zij in deze spektra met verschillende intensiteitsverhoudingen optraden. Een verdere wetmatigheid meenden zij te mogen zien in de omstandigheid, dat de voor deze spektra vastgestelde grondfrequenties eveneens werden aangetroffen bij een overeenkomstige analyse van de spektra van enkele chemoluminescente reacties (3-amino-phtaalzuurhydrazide en dimethyldiacridylumnitraat).

Afgezien van het feit, dat de door hen voor de analyse gebruikte spektra later voor een deel onjuist zijn gebleken, maakt de hieronder volgende overweging het hoogst onwaarschijnlijk, dat een dergelijke wetmatigheid zou optreden.

Zoals we in hoofdstuk I gezien hebben, moeten we het emissiespektrum inderdaad opvatten als te zijn opgebouwd uit meer of minder symmetrische *trillingsbanden*. De spektrale ligging van het trillingsbandensysteem hangt af van de grootte van de elektronenovergang. Deze kan, zoals we ook in hoofdstuk V bij de phtaalzuurhydraziden zagen, met kleine bedragen veranderen, wanneer men kleine veranderingen in het emitterend molecuul aanbrengt. Het optreden van dezelfde frequenties met verschillende intensiteitsverhoudingen in verschillende spektra zou betekenen, dat bij verwante molekulen de grootte van de elektronenovergang niet veranderde, wel de intensiteitsverdeling over de trillingsbanden. Hoewel dit niet uitgesloten is, moeten we toch verwachten, dat als regel ook de elektronenovergang zal veranderen en dus eveneens de frequenties der trillingsbanden. Gelijke grondfrequenties zal men dus wanneer men te maken heeft met één emitterend molecuul, in het algemeen niet kunnen verwachten.

Verder kan men als regel de bandenstructuur niet meer in het spektrum terugvinden en zal een analyse niet mogelijk zijn.

Intussen is het niet mogelijk om voor de theorie der symmetrische grondfrequenties een andere in de plaats te stellen en kan voorlopig tussen spektrum en molekuulbouw nog geen verband worden gelegd. Enerzijds

vindt dit zijn oorzaak in het weinig karakteristieke der emissiespektra, anderzijds in het ook in hoofdstuk V duidelijk naar voren gekomen feit, dat naverwante molekulen vrij sterk uiteenlopende spektra kunnen bezitten.

Slechts wanneer de bouw van het molekuul in grote trekken bekend is, zal het nu reeds mogelijk zijn om uit het spektrum nadere bijzonderheden aangaande die bouw te voorspellen.

Daarnaast blijft altijd de mogelijkheid bestaan, dat men in een bepaald geval het emissiespektrum herkent als het fluorescentiespektrum van een bekend molekuul en een directe identifikatie van het emitterend molekuul mogelijk is. Naarmate van meer stoffen de fluorescentiespektra nauwkeurig bepaald worden, zal de mogelijkheid van een identifikatie langs deze weg worden vergroot.

SAMENVATTING.

De processen van absorptie- en fluorescentie worden behandeld aan de hand van in de literatuur voorkomende gegevens.

Het *absorptiespektrum* van een onverzadigd organies molecuul in oplossing moet i.h.a. worden toegeschreven aan een beperkt aantal elektronenovergangen in het molecuul als geheel of in een gedeelte van dit molecuul. De voornaamste oorzaken voor de verbreding van de afzonderlijke trillingsbanden, behorend bij één elektronenovergang worden aangegeven.

Het *fluorescentiespektrum* van een organies molecuul in oplossing moet als regel aan slechts één elektronenovergang worden toegeschreven en is, voor zover bekend, onafhankelijk van de golflengte van het ingestraalde licht. Hieruit volgt, dat de door de absorptie toegevoerde trillingsenergie verdwenen is in een tijd, die kort is t.o.v. de levensduur van de aangeslagen toestand. Naast de fluorescentie kunnen verschillende stralingsloze processen optreden. Een hoog fluorescentierendement wordt toegeschreven aan een kleine waarschijnlijkheid voor deze processen.

Wanneer men absorptie- en fluorescentiespektra uitzet tegen de frequentie van het licht en de fluorescentieintensiteit uitdrukt in quanten/sek. zijn deze spektra in vele gevallen ongeveer spiegelsymmetries, in sommige gevallen zelfs geheel (*Wet der spiegelsymmetrie*). De voorwaarden waaraan het molecuul moet voldoen, wil deze symmetrie optreden, worden behandeld (Hfdst. I).

De chemoluminescentieprocessen, die kunnen voorkomen worden onderscheiden in *direkte* en *indirekte*. De direkte chemoluminescentie wordt opgevat als een *fluorescentie* van het molecuul, dat bij de reactie in aangeslagen toestand is ontstaan. Van indirecte chemoluminescentie of chemofluorescentie door overdracht zijn bij oplossingen geen voorbeelden gevonden. Er wordt aangetoond, dat de waarschijnlijkheid voor dit proces in een oplossing gering is.

Daarnaast kan een *sekundair* verschijnsel, chemofluorescentie door absorptie een rol spelen (Hfdst. II).

Bij het bepalen van emissiespektra wordt de nadruk gelegd op de noodzakelijkheid deze op absorptie te corrigeren.

De oxydatie van dimethyldiacridylumnitraat met peroxyd bij kamer-

temperatuur is een *direkte* chemoluminescentie. Het emissiespektrum hiervan werd bepaald (fig. 15).

Het bestaan van twee chemoluminescente reacties bij de oxydatie van „dimethyl” wordt aannemelijk gemaakt uit het feit, dat bij hoge temperatuur de kleur van het licht blauw, bij kamertemperatuur groenblauw is. Het emissiespektrum bij lage temperatuur wordt geanalyseerd in een groene en in een blauwe komponent (fig. 15). De groene komponent is identiek met het fluorescentiespektrum van „dimethyl”. De mogelijkheid wordt aangegeven, dat deze analyse de spektra weergeeft van de afzonderlijke reacties, waarbij twee verschillende molekulen in aangeslagen toestand ontstaan, o.a. het „dimethyl” zelf.

Absorptie- en fluorescentiespektrum van „dimethyl” en van methylacridon voldoen tot op grote hoogte aan de wet der spiegelsymmetrie (fig. 11 en 14). Het fluorescentiespektrum van „dimethyl” is onafhankelijk van de golflengte van het ingestraalde licht. Voorts komen bij de chemoluminescente oxydatie van „dimethyl” als enige fluorescerende stoffen „dimethyl” en methylacridon in het reaktiemengsel voor (Hfdst. IV).

De chemoluminescentiespektra van tien gesubstitueerde phtaalzuurhydraziden en van pyromellietzuurhydrazide werden bepaald m.b.v. de elektrolysemethode (fig. 16—19).

Het spektrum van 3-aminophtaalz.hydr. werd eveneens bepaald bij oxydatie met peroxyd en haemine en blijkt onafhankelijk te zijn van de wijze, waarop de reactie wordt uitgevoerd. Het spektrum van pyromellietzuurhydrazide wordt geanalyseerd in dat van het hydrazide zelf en van een op de 4- en 5-plaats gesubstitueerd phtaalzuurhydrazide.

Voor de phtaalzuurhydraziden blijkt, dat de grootte van de elektronenovergang, die plaats heeft bij de chemoluminescentie, toeneemt bij toenemende neiging van de substituent om aan het verdere molekuul een elektronenpaar af te geven.

Bij de van NH_2 afgeleide substituenten zijn de spektra als regel breder dan bij de andere, welke verbreding aan elektromere verschijnselen in de substituent wordt toegeschreven. Ook het spektrum van pyromellietzuurhydrazide kan in dit verband worden begrepen.

Het chemoluminescentierendement bedraagt voor het sterkst chemoluminescente hydrazide, 3-amino, nog geen promille. Ook in dit verband wordt er op gewezen, dat er geen redenen zijn om aan te nemen, dat bij de chemoluminescente reactie het oorspronkelijke molekuul wordt teruggevormd.

De wijze waarop de chemoluminescentie-intensiteit afhangt van de concentratie aan peroxyd en voorts de verandering van het absorptiespektrum bij toevoegen van deze stof aan de oplossing van het hydrazide, steunen de opvatting van Drew, dat zich primair een peroxyd van het hydrazide vormt.

De fluorescentie- en absorptie-eigenschappen van de hydraziden worden bestudeerd (fig. 22—32). Bij enkele der phtaalzuurhydraziden valt het maximum van het fluorescentiespektrum van de zure oplossing samen met dat van het chemoluminescentiespektrum. Bij andere is dat niet het geval. Voorts is met uitzondering van 4-aminophtz.hydr. het chemoluminescentiespektrum *breder* dan het fluorescentiespektrum van de zure oplossing. Uit deze feiten wordt de gevolgtrekking gemaakt, dat het in de zure oplossing fluorescerende molecuul essentieel anders van bouw is dan het molecuul, dat het chemoluminescentielicht uitzendt.

Bij de meeste hydraziden voldoen absorptie- en fluorescentiespektrum niet aan de wet der spiegelsymmetrie (Hfdst. V).

De emissiespektra van twee soorten lichtbakteriën *Ph. phosphoreum* en *Ph. splendidum* werden bepaald waarbij de absorptie van het licht door andere cellen werd geëlimineerd (fig. 34). Aannemelijk wordt gemaakt, dat de absorptie binnen de cel die het licht uitzendt, te verwaarlozen is en dat de gemeten spektra de spektra zijn van de betreffende chemoluminescente reacties. Voor de twee soorten bakteriën blijken de spektra verschillend te zijn. In fig. 35 worden ze vergeleken met de overeenkomstige inaktiveringsspektra, waarbij er een gedeeltelijke symmetrie blijkt op te treden.

Naast het door van der Kerk opgestelde schema, waarbij aan het luciferase gebonden, irriversibel geoxydeerde luciferine, AL_1 het bioluminescentielicht uitzendt, het dehydroluciferine, L het fotochemies aktieve licht absorbeert, wordt de mogelijkheid naar voren gebracht, dat de bioluminescentie een chemofluorescentie is door overdracht van reactie-energie aan een kleurstof, die aan het luciferase gebonden is en die tevens als sensibilisator optreedt bij de fotochemiese inaktivatie.

De emissiespektra van drie lichtende schimmels, *Armillaria mellea*, *Omphalia flavida* en *Mycena polygramma* werden bepaald en blijken nagenoeg identiek te zijn (fig. 36). Het spektrum ligt bij langer golflengte dan de spektra der lichtbakteriën (Hfdst. VI).

LITERATUROPGAVE.

1. Mohler, H., Das Absorptionsspektrum der chemischen Bindung. Jena, 1943.
2. Förster, Th., Die Lichtabsorption aromatischer Kohlenwasserstoffe. Zs. f. Phys. Chem. B, **41**, 287, 1938.
3. Eistert, B., Tautomerie und Mesomerie. Stuttgart, 1938.
4. Lewis, G. N. and Calvin, M., The color of organic substances. Chem. Rev. **25**, 273, 1939.
5. Kuhn, R. und Winterstein, A., Ueber konjugierte Doppelbindungen I—IV. Helv. Chim. Acta **11**, 87, 116, 123, 144, 1928.
6. Sponer, H., Molekülspektren. Berlin, 1935.
7. Ley, H. und Specker, H., Fluoreszenz- und Absorptionsmessungen bei Benzol-derivaten insbesondere bei kondensierten Systemen. Zs. f. Wiss. Phot. **38**, 13 en 96, 1939.
8. Condon, E. U., Nuclear motions associated with electron transitions in diatomic molecules. Phys. Rev. **32**, 858, 1928.
9. Franck, J., Elementary processes of photochemical reactions. Trans. Far. Soc. **21**, 536, 1925.
10. Kirkbride, F. W. and Norrish, R. G. W., The photochemical properties of the carbonyl group. Trans. Far. Soc. **27**, 404, 1931.
11. Terenin, A., La photoluminescence des molecules organiques à l'état gazeux. Acta Phys. Pol. **5**, 229, 1936.
12. Szczeniowski, S., Sur le rendement de la fluorescence des solutions. Bull. Acad. Pol. A, 1927, pg. 127.
13. Photochemical Processes. A general discussion. Part I. Molecular spectra in relation to photochemical change. Trans. Far. Soc. **27**, 359, 1931.
14. Lewschin, W. L., Das Gesetz der Spiegelkorrespondenz der Absorptions- und Fluoreszenzspektren, I en II. Zs. f. Phys. **72**, 368 en 382, 1931.
15. Lewschin, W. L., An attempt at a quantum interpretation of the mirror-symmetry of absorption- and luminescence spectra. Acta Phys. chim. U.R.S.S. **6**, 213, 1937.
16. Nichols, E. L. and Merritt, E., Studies on luminescence, II. Phys. Rev. **18**, 403, 1904.
17. Jablonski, A., Sur la repartition de l'intensité dans le spectre de fluorescence excité par la lumière de différentes longueurs d'onde. C. R. Soc. Pol. de Phys. **7**, 1, 1926.
18. Starkiewicz, J., l'Influence de la longueur d'onde du rayonnement exciteur sur le spectre de fluorescence des solutions visqueuses et solides. C. R. Soc. Pol. de Phys. **4**, 73, 1929.
19. Gaviola, E., Die Abklingungszeiten der Fluoreszenz von Farbstofflösungen. Ann. d. Phys. **81**, 681, 1926.
20. Wawilow, S. I., Die Auslöschung der Fluoreszenz in flüssigen Lösungen. Acta Phys. Pol. **5**, 417, 1936.
21. Jablonski, A., Ueber einige optische Eigenschaften der in festen und flüssigen Medien eingebetteten Moleküle. Acta Phys. Pol. **5**, 271, 1936.

22. Klarner, B. und Woszczerowicz, S., Ueber die Absorptions- und Fluoreszenzspektren des Dekacyklens und des Tribenzildekacyklens. *Acta Phys. Pol.* 2, 1, 1933.
23. Wawilow, S. I., The dependency of the intensity of the fluorescence of dyes upon the wavelength of the exciting light. *Phil. Mag.* 43, 307, 1922.
24. Nichols, E. L. and Merritt, E., The specific exciting power of different wavelength of the visible spectrum in the case of the fluorescence of eosin and resorufin. *Phys. Rev.* 31, 381, 1910.
25. Jablonski, A., Ueber die Fluoreszenzausbeute in wässrigen Fluoresceinlösungen bei antistokesscher Erregung. *Acta Phys. Pol.* 2, 97, 1933.
26. Wawilow, S. I., Die Fluoreszenzausbeute von Farbstofflösungen als Funktion der Wellenlänge des anregenden Lichtes. *Zs. f. Phys.* 42, 311, 1927.
27. Rideal, E. K., Chemiluminescence. *Nature* 123, 417, 1929.
28. Drew, H. D. K., Chemiluminescence in the oxidation of certain organic substances. *Trans. Far. Soc.* 35, 207, 1939.
29. Harvey, E. N., The nature of animal light. Philadelphia, 1920.
30. Kautsky, H. und Müller, G. O., Chemilumineszenz adsorbierter Farbstoffe. *Naturw.* 30, 315, 1942.
31. Kautsky, H. und Neitzke, O., Spektren emissionsfähiger Stoffe bei Erregung durch Licht und chemische Reaktionen. *Zs. f. Phys.* 31, 60, 1925.
32. Lifschitz, J., Moderne opvattingen der chemoluminescentie en verwante phenomenon (vert.). *Chem. Weekbl.* 1924, pag. 157.
33. Evans, M. G. and Polanyi, M., Notes on the luminescence of sodium vapour in highly dilute flames. *Trans. Far. Soc.* 35, 178, 1939.
34. Tamamushi, B., Ueber sensibilisierte Chemilumineszenz in Lösungen. *Naturw.* 28, 722, 1940.
35. Schales, O., Versuche zur Beeinflussung der Lumineszenz des Luzigenins. *Ber. d. D. Chem. Ges.* 72 II, 1155, 1939.
36. Milatz, J. M. W., De aanslagfunctie van het metastabiele S₅-niveau van neon. *Ac. Proefschrift. Utrecht*, 1937.
37. Radulescu, D. und Ostrogovich, G., Die Struktur der Gemeinschaftsresonatoren im Anthracen, Acridin, Phenazin, Phenanthren, Pyren. *Ber. d. D. Chem. Ges.* 64, 2233, 1931.
38. Gleu, K. und Schaarschmidt, R., Weitere Diacridene und Diacridyliumsalze. *Ber. d. D. Chem. Ges.* 73, 909, 1940.
39. Gleu, K. und Petsch, W., Die Chemilumineszenz der Dimethyldiacridyliumsalze. *Zs. f. Angew. Chem.* 48, 57, 1935.
40. Eymers, J. G. and van Schouwenburg, K. L., On the luminescence of bacteria I. A quantitative study of the spectrum of the light emitted by *Ph. phosphoreum* and by some chemiluminescent reactions. *Enzymologia* 1, 107, 1936.
41. Drew, H. D. K. and Pearman, F. H., Amino- and hydrazino-cyclo-phtalhydrazides and their relative luminescent power. *J. Chem. Soc.* 26, 586, 1937.
42. Zellner, C. N. and Dougherty, G., The chemiluminescence of phtalhydrazide derivatives. *J. Am. Chem. Soc.* 59, 2580, 1937.
43. Witte, A. M. M., Luminescence phenomena with benzhydrazides and benzenesulphonhydrazides. *Rec. Trav. Chim. des P. B.* 54, 471, 1935.
44. Wegler, R., Chemilumineszenz cyclischer Hydrazide. *J. Prakt. Chem.* 148, 135, 1937.
45. Eymers, J. G. and van Schouwenburg, K. L., On the luminescence of bacteria III. Further quantitative data regarding spectra connected with bioluminescence. *Enzymologia* 3, 235, 1937.

46. Harris, L. and Parker, A. S., The chemiluminescence of 3-aminophthalhydrazide. J. Am. Chem. Soc. **57**, 1939, 1935.
 47. Albrecht, H. O., Ueber die Chemiluminescenz des Aminophthalsäurehydrazides. Zs. f. Phys. Chem. B, **136**, 321, 1928.
 48. Svesnikov, B. J., On the mechanism of the chemiluminescence of 3-aminophthalichydrazide, I. Acta Phys. chim. U.R.S.S. **8**, 441, 1938.
 49. Harvey, E. N., Luminescence during electrolysis. J. Phys. Chem. **33**, 1456, 1929.
 50. Tamamushi, B. and Akiyama, H., Notes on the chemiluminescence of dimethyldiacridylum-nitrate. Trans. Far. Soc. **35**, 491, 1939.
 51. Kautsky, H. und Kaiser, K. H., Ueber den Mechanismus der Chemiluminescenz des 3-Aminophthalsäurehydrazids. Naturw. **30**, 148, 1942.
 52. Rottier, P. B., Fluorometrische und spectrofotometrische bepaling van lactoflavine in micro-organismen. Ac. Proefschrift. Delft, 1942.
 53. Katz, E. and Wassink, E. C., Infrared absorptionspectra of chlorophyllous pigments in living cells and in extra-cellular states. Enzymologia **7**, 97, 1939.
 54. Kerk, G. J. M. van der, Onderzoekingen over de bioluminescentie der lichtbacteriën. Ac. Proefschrift. Utrecht, 1942.
 55. Dubois, R., Note sur la fonction photogénique chez les *Pholades*. C. R. Biol. **4**, Ser. 8, 564, 1887.
 56. Chance, B., Harvey, E. N., Johnson, F. H. and Millikan, G., The kinetics of bioluminescent flashes. J. Cell. and Comp. Physiol. **15**, 195, 1940.
 57. Chase, A. M. and Giese, A. C., Effects of ultraviolet radiation on *Cypridina*-luciferin and luciferase. J. Cell. and Comp. Physiol. **16**, 323, 1940.
 58. Coblenz, W. W. and Hughes, C. W., Spectral energy distribution of the light emitted by plants and animals. Sc. Pap. Bur. of Stand. **21**, 521, 1926, Nr. 538.
-

INHOUD.

Bladz.

Inleiding	1
---------------------	---

HOOFDSTUK I

Algemene beschouwingen over absorptie- en fluorescentieprocessen door organiese molekulen in oplossing.

§ 1. Gebruik van golflengte- en frequentieschaal	3
§ 2. Het absorptieproces als elektronenovergang	4
§ 3. Trillingsstructuur van het absorptiespektrum	7
§ 4. Ontstaan van absorptiebanden door verbreding	9
§ 5. Het proces der fluorescentie	11
§ 6. De wet der spiegelsymmetrie	13
§ 7. Fluorescentierendement in afhankelijkheid van de golflengte van het ingestraalde licht	16

HOOFDSTUK II

Algemene beschouwingen over chemoluminescentie.

§ 1. Voorkomen van chemoluminescentie	19
§ 2. Het chemoluminescente proces	20
§ 3. Chemofluorescentie door overdracht en chemofluorescentie door absorptie	22

HOOFDSTUK III

Experimentele methoden.

§ 1. De absorptiemeting	27
§ 2. Bepaling der emissiespektra	28
§ 3. Korrekctie der emissiespektra op absorptie	30

HOOFDSTUK IV

De chemoluminescentie van dimethyldiacridylumnitraat.

§ 1. Inleiding	32
§ 2. Fluorescentie- en absorptieeigenschappen van dimethyldiacridylumnitraat	33
§ 3. Fluorescentie- en absorptieeigenschappen van methylacridon en van het reaktiemengsel	37
§ 4. Chemoluminescentiespektrum van „dimethyl” bij lage temperatuur	39
§ 5. Het bestaan van twee chemoluminescente processen bij de oxydatie van „dimethyl”	42
§ 6. Reaktiemechanisme en emitterend molekuul	43

HOOFDSTUK V

De chemoluminescentie der phtaalzuurhydraziden en van pyromellietzuurhydrazide.

Experimenteel gedeelte.

§ 1. Inleiding	45
§ 2. De chemoluminescente reactie in homogeen milieu	46
§ 3. De chemoluminescente reactie bij de elektrolysemethode	47
§ 4. Het opnemen van het chemoluminescentiespektrum	48
§ 5. Chemoluminescentiespektra der phtaalzuurhydraziden	49
§ 6. Vorm en nauwkeurigheid der spektra	52
§ 7. Chemoluminescentiespektrum van 3-aminophtaalzuurhydrazide	54
§ 8. Chemoluminescentiespektrum van pyromellietzuurhydrazide	55
§ 9. Fluorescentie- en absorptiespektra van 3-amino- en 3-methylamino-phtaalzuurhydrazide	58
§ 10. Fluorescentie- en absorptiespektra van 4-aminophtaalzuurhydrazide. Beperkte geldigheid van de wet der spiegelsymmetrie	61
§ 11. Fluorescentie- en absorptiespektra der overige phtaalzuurhydraziden en van pyromellietzuurhydrazide	63
§ 12. Samenvatting der experimentele resultaten	67

Theoreties gedeelte.

§ 13. Algemene opmerkingen	68
§ 14. Invloed van de substituent op de elektronenverdeling van het grondmolekuul in verband met het chemoluminescentiespektrum	69
§ 15. Vergelijking van de invloed van de substituent op het fluorescerend en chemoluminescerend molekuul	77
§ 16. De absorptiespektra	79
§ 17. Intensiteit der chemoluminescente reactie en relatief rendement van de fluorescentie van de zure oplossing.	80
§ 18. Het emitterend molekuul	81
§ 19. Het reaktiemechanisme	82

HOOFDSTUK VI

Bioluminescentie.

§ 1. Storende omstandigheden bij het bepalen van bioluminescentiespektra	85
§ 2. Bepaling van de emissiespektra van <i>Ph. phosphoreum</i> en <i>Ph. splendidum</i>	88
§ 3. Verband tussen emissie- en inaktiveringsspektra	91
§ 4. Lichtproces en fotochemies ontledingsproces.	93
§ 5. De emissiespektra van enkele lichtende schimmels	96
§ 6. Spektrum en molekuulbouw	98

Samenvatting	100
------------------------	-----

Literatuuropgave	103
----------------------------	-----

STELLINGEN.

I.

Chemoluminescentie is een fluorescentie van het bij de reactie emitterende molecuul en kan spektraal daarvan niet worden onderscheiden.

II.

De proeven van Gaffron leveren een fraaie bevestiging van de opvatting, dat een sensibilisatie van fotochemische reacties in vloeibaar milieu slechts kan optreden, wanneer er tussen sensibilisator en fotogevoelig systeem (acceptor) complexvorming plaats heeft. Het rendement van de reactie wordt bij deze proeven bepaald door het aantal molekulen van de acceptor, dat zich aan één molecuul van de sensibilisator hecht.

H. Gaffron, Ber. d. D. Chem. Ges. 60, 755, 1927.

III.

Uit de afwijking van de $I \times t$ -wet bij de fotochemische inaktivering van lichtbacteriën, is het mogelijk een bovenste grens aan te geven van de inhomogeniteit van het licht in de bacteriecellen, welke het gevolg is van de optredende verstrooiing en absorptie.

G. J. M. van der Kerk, Ac. Proefschrift. Utrecht, 1942.

IV.

In de door Hellmann weergegeven „differentiaalvergelijkingen van Fock” voor een atoom met N elektronen, zijn een aantal termen ten onrechte weggelaten.

H. Hellmann, Quantenchemie, blz. 104/105.

V. Fock, Zs. f. Phys. 61, 126, 1930.

V.

De methode van aarding door middel van een opgerolde koperen plaat is onvoordelig. Met een buis, waarvan de diameter gelijk is aan de buitendiameter van de opgerolde plaat, bereikt men hetzelfde resultaat. De aarding kan nog aanmerkelijk worden verbeterd door het slaan van een tweede pijp op een voor de bepaalde grondsoort voldoende grote afstand.

VI.

De verhouding, waarin bij het evenwicht de beide isomeren in een keto-enolmengsel aanwezig zijn, wordt niet alleen bepaald door de verblijftijd van het proton in elk van deze isomeren, maar tevens door de eigenschappen van het mesomere ion.

B. Eistert, *Tautomerie und Mesomerie*, blz. 55.

VII.

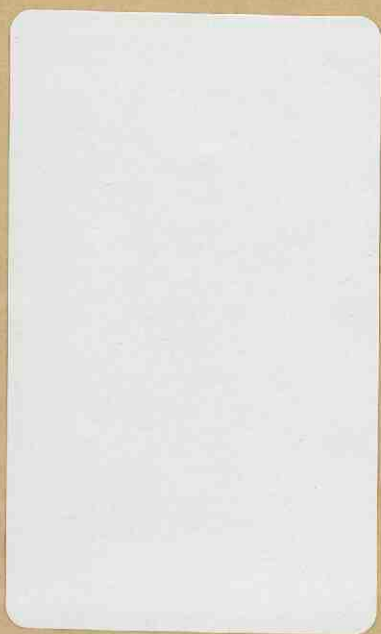
De sterke toename van de oplossnelheid van zuurstof in water bij verhogen van de temperatuur, zoals deze door Miyamoto gevonden werd, is niet reëel en moet worden toegeschreven aan een groter snelheid van de reactie tussen natriumsulfiet en zuurstof.

S. Miyamoto en T. Kaya, *Bull. Chem. Soc. Japan* 6, 9, 1931.

VIII.

De gevolgtrekking van Montfort, dat het quantenrendement van de fotosynthetische koolzuurassimilatie bij bruinwieren voor groen licht groter is dan voor rood, wordt door zijn proeven niet gerechtvaardigd.

C. Montfort, *Planta* 32, 118, 1941.



U
18