

BEITRÄGE ZUR FRAGE DER SPEKTRALEN WIRKUNG DER SEKUNDÄRFLUORESZENZ

Von A. BUDÓ, J. DOMBI und R. HORVAI

Institut für Experimentalphysik der Universität Szeged

(Eingegangen am 6. September 1957)

Als Verallgemeinerung der in einer neulich erschienenen Arbeit erhaltenen Ergebnisse wird ein Verfahren angegeben, mit dessen Hilfe die (durch die räumliche Verteilung der sekundär angeregten Zentren bedingte) spektrale Wirkung der Sekundärfluoreszenz im Falle verschiedener Erregungs- und Beobachtungsmethoden berechnet und dadurch das wahre Fluoreszenzspektrum einer Lösung zuverlässiger ermittelt werden kann. Die bei einer Fluoresceinlösung unter verschiedenen Versuchsbedingungen und nach entsprechender Auswertung erhaltenen wahren Spektren zeigen in der Tat eine gute Übereinstimmung, insbesondere erweisen sie sich als von der Erregungswellenlänge unabhängig, während dies bei den in der bisher üblichen Weise — ohne Berücksichtigung der Sekundärfluoreszenz — ausgewerteten Spektren im allgemeinen nicht der Fall ist.

§ 1. Einleitung

In einer früheren Arbeit [1] wurde gezeigt, daß das Emissionsspektrum einer fluoreszierenden Lösung durch die von der Reabsorption herrührende Sekundärfluoreszenz beeinflußt werden kann, und es wurde eine Methode angegeben, die durch eine quantitative Berücksichtigung dieses Einflusses die Bestimmung des wahren Emissionsspektrums der Lösung (und die Bestimmung ihrer absoluten Fluoreszenzausbeute [2]) ermöglicht. Die für die dabei zugrunde gelegte „longitudinale Beobachtung auf der Vorderfläche“ [3] abgeleiteten relativ einfachen Endformeln gelten hinreichend genau unter der Bedingung $m^2 \equiv (R/l)^2 \gg 1$, wobei R den Radius des kreisförmigen Querschnittes des erregenden Parallellichtbündels und l die Schichtdicke der Lösung bedeuten.

Das Einhalten dieser Bedingung kann aber in manchen Fällen unbequem sein, ferner ist eine Herabsetzung der Wirkung der Sekundärfluoreszenz gerade mit kleineren m -Werten zu erreichen. Aus diesen Gründen und unter Beachtung der Tatsache, daß auch andere Beobachtungsweisen — die longitudinale Beobachtung auf der Rückfläche und die transversale Beobachtung — häufig verwendet werden, schien es uns angebracht, die Methode für die Berechnung der spektralen Wirkung der Sekundärfluoreszenz entsprechend zu verallgemeinern und dann an einer bestimmten Lösung experimentell nachzuprüfen, inwieweit die bei den genannten drei verschiedenen Beobachtungsmethoden nach entsprechender Auswertung erhaltenen wahren Fluoreszenzspektren übereinstimmen.

§ 2. Zur Berechnung der spektralen Wirkung der Sekundärfluoreszenz

In dieser Arbeit befassen wir uns nur mit Lösungen, deren Fluoreszenzlicht als unpolarisiert und deren wahres Fluoreszenzspektrum als unabhängig von der Erregungswellenlänge angesehen werden kann. Ferner wird stets vorausgesetzt, daß das monochromatische Erregungslicht der Wellenlänge λ in Form eines Parallelbündels senkrecht zu einer ebenen Grenzfläche („Vorderfläche“) der Lösung einfällt. Den Querschnitt des Bündels wollen wir zunächst als kreisförmig mit dem Radius R annehmen, so daß der vom Erregungslicht durchstrahlte Teil der Lösung ein Kreiszyylinder ist, dessen Achse die z -Achse sei und dessen Vorder- und Rückfläche $z=0$ bzw. $z=l$ entsprechen. Wir betrachten innerhalb dieses Zylinders zwei Volumenelemente: dV_0 liege auf der Achse in der Tiefe z_0 , dV habe die Zylinderkoordinaten (r, φ, z) , sein Abstand von dV_0 beträgt also $s = \sqrt{r^2 + (z - z_0)^2}$.

Unter den erwähnten Annahmen läßt sich durch phänomenologische Betrachtungen zeigen (siehe Gl. (5) in [1]), daß das von dV_0 in den gesamten Raumwinkel und im Wellenlängenintervall $d\lambda'$ ausgesandte primäre und sekundäre Fluoreszenzlicht zusammen die Strahlungsleistung (bzw. den Quantenstrom)

$$d^4 \Phi_{P+S} = E_{\lambda_0} k_{\lambda} \eta_{\lambda} f(\lambda') d\lambda' dV_0 [e^{-k_{\lambda} z_0} + \bar{A}(z_0)] \quad (1)$$

erzeugen; dabei sind:

$$\bar{A}(z_0) = \int_0^{\infty} \eta_{\lambda}(\lambda'') f(\lambda'') A(z_0) d\lambda'' \quad \text{mit} \quad A(z_0) = k_{\lambda} \int_{(V)} \frac{e^{-k_{\lambda} z - k_{\lambda}'' s}}{4\pi s^2} dV, \quad (2)$$

E_{λ_0} die vom Erregungslicht hervorgerufene Bestrahlungsstärke (bzw. Quantenstromdichte) auf der Vorderfläche, $f(\lambda')$ das auf Eins normierte wahre Emissionsspektrum (Energie- oder Quantenspektrum), k_{λ} der Absorptionskoeffizient, η_{λ} — oder $\eta(\lambda)$ — die absolute Fluoreszenzausbeute (Energie- oder Quantenausbeute) der Lösung für die Wellenlänge λ , und das Raumintegral ist über das Volumen des Zylinders zu erstrecken.

Die Funktionen

$$N_P = e^{-k_{\lambda} z_0} \quad \text{und} \quad N_S = \bar{A}(z_0) \quad (3)$$

sind für die räumliche Verteilung der primär bzw. sekundär angeregten Zentren (Moleküle) längs der z -Achse charakteristisch, ihr Quotient

$$A_0 = \frac{N_S}{N_P} = e^{-k_{\lambda} z_0} \bar{A}(z_0) \quad (4)$$

ist von anschaulicher Bedeutung: $A_0(z_0)$ gibt das Verhältnis der Zahl der sekundär und primär angeregten Moleküle in der unmittelbaren Umgebung des Punktes z_0 der Achse an. Wir wollen den Wert dieses Verhältnisses auch für jeden anderen Punkt (x_0, y_0, z_0) des vom Erregungslicht durchstrahlten Gebietes bestimmen, da sich aus der entsprechenden Funktion $A(x_0, y_0, z_0)$ die für die eingangs erwähnten drei Beobachtungsweisen erforderlichen Beziehungen leicht ableiten lassen.

Zuerst wollen wir A_0 berechnen bzw. auf eine andere Form bringen. Für die Größe A in (2) ergibt die Integration nach φ und r (wegen $dV = r dr d\varphi dz = s ds d\varphi dz$) den Ausdruck

$$A = \frac{k_{\lambda''}}{2} \int_0^l e^{-k_{\lambda''} z} \{ \text{Ei}(-k_{\lambda''} \sqrt{R^2 + (z-z_0)^2}) - \text{Ei}(-k_{\lambda''} |z-z_0|) \} dz, \quad (5)$$

der nach Einführung der dimensionslosen Größen

$$w = \frac{z}{l}, \quad w_0 = \frac{z_0}{l}, \quad \tau = w - w_0, \quad m = \frac{R}{l} \quad (6)$$

und

$$\alpha = k_{\lambda} l, \quad \beta = k_{\lambda'} l, \quad \gamma = k_{\lambda''} l \quad (7)$$

(β wird später benötigt) in

$$A = \frac{1}{2} e^{-\alpha w_0} \int_{-w_0}^{1-w_0} e^{-\alpha \tau} \{ \gamma \text{Ei}(-\gamma \sqrt{m^2 + \tau^2}) - \gamma \text{Ei}(-\gamma |\tau|) \} d\tau \quad (8)$$

übergeht. Somit nimmt A_0 nach (4) und (2) die Form

$$A_0 = \frac{1}{2} \int_{-w_0}^{1-w_0} e^{-\alpha \tau} \{ \overline{\gamma \text{Ei}(-\gamma \sqrt{m^2 + \tau^2})} - \overline{\gamma \text{Ei}(-\gamma |\tau|)} \} d\tau \quad (9)$$

an.

Wir bezeichnen nun mit γ_{\max} den größten Wert, den $\gamma = lk(\lambda'')$ in dem Wellenlängenbereich — zwischen λ_1 und λ_2 — annimmt, in dem das Emissionsspektrum $f(\lambda'')$ von Null verschieden ist. Das Verhältnis $\gamma/\gamma_{\max} \equiv \gamma_1$ hängt für eine bestimmte Lösung nur von der Wellenlänge ab (γ_1 ist von der Schichtdicke und bei Gültigkeit des BEERSCHEN Gesetzes auch von der Konzentration c unabhängig, denn es ist $\gamma_1 = \varepsilon/\varepsilon_{\max}$, wobei ε den dekadischen molaren Extinktionskoeffizienten bedeutet; $\gamma_{\max} = 2,303 cl \varepsilon_{\max}$). Somit kann die Größe $-\overline{\gamma \text{Ei}(-\gamma)}/2\gamma_{\max}$, die nach der in (2) definierten Bedeutung des Querstriches durch

$$-\frac{\overline{\gamma \text{Ei}(-\gamma)}}{2\gamma_{\max}} = -\frac{1}{2} \int_{\lambda_1}^{\lambda_2} \eta(\lambda'') f(\lambda'') \gamma_1(\lambda'') \text{Ei}(-\gamma_{\max}(\gamma_1(\lambda''))) d\lambda'' \quad (10)$$

gegeben ist, als Funktion von γ_{\max} aufgefaßt werden. Wir können daher schreiben, indem wir γ_{\max} für den Augenblick mit ξ bezeichnen und $\eta = \eta_{\max} \eta_1$ setzen¹:

$$-\frac{\overline{\gamma \text{Ei}(-\gamma)}}{2\gamma_{\max}} = \eta_{\max} \Phi(\xi)$$

¹ Dadurch geht nämlich der absolute Wert der Quantenausbeute in die Funktion $\Phi(\xi)$ nicht ein. Die Indizes 1 in γ_1 und η_1 sollen darauf hinweisen, daß diese Funktionen im Intervall (λ_1, λ_2) den Höchstwert 1 besitzen.

mit

$$\Phi(\xi) = -\frac{1}{2} \int_{\lambda_1}^{\lambda_2} \eta_1(\lambda'') f(\lambda'') \gamma_1(\lambda'') \text{Ei}(-\xi \gamma_1(\lambda'')) d\lambda'' \quad (11)$$

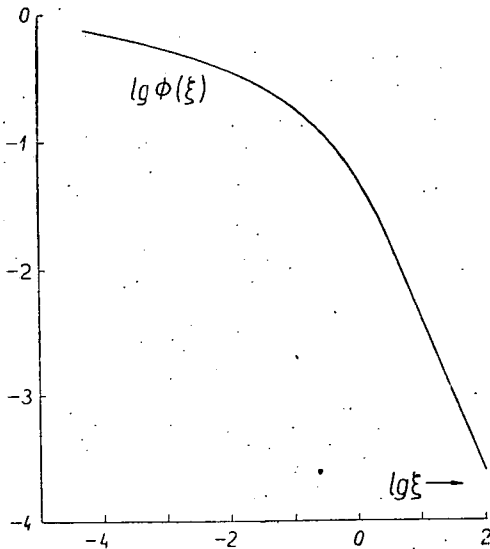


Fig. 1

Kennt man also das Absorptionsspektrum und — mit gewisser Annäherung — das wahre Emissionsspektrum der Lösung sowie die relative Quantenausbeute im Bereich (λ_1, λ_2) als Funktion der Erregungswellenlänge, so kann die Funktion $\Phi(\xi)$ (mit entsprechender Annäherung) berechnet werden; für die in [1], [2] und [4] untersuchten alkalisch-wässrigen Fluoresceinlösungen wird sie in Fig. 1 dargestellt. Im Besitz von $\Phi(\xi)$ läßt sich die uns jetzt interessierende Größe A_0 in (9) auf Grund von

$$A_0 = \eta_{\max} \gamma_{\max} \int_{-\tau_0}^{1-\tau_0} e^{-\alpha t} [\Phi(\gamma_{\max} |\tau|) - \Phi(\gamma_{\max} \sqrt{m^2 + \tau^2})] d\tau \equiv \eta_{\max} A_0^* \quad (12)$$

durch numerische oder graphische Integration bestimmen². A_0^* , das bis auf den Faktor η_{\max} das Verhältnis der Dichten der sekundär und primär angeregten Moleküle längs der Achse des Kreiszyinders angibt, hängt ersichtlich außer der Variablen $w_0 = z_0/l$ noch von den Parametern γ_{\max} ($= 2,303 c l \epsilon_{\max}$), $m = R/l$ und $\alpha = l k_\lambda$ ab:

$$A_0^* = A_0^*(w_0; \gamma_{\max}, m, \alpha). \quad (13)$$

Die für die erwähnten alkalisch-wässrigen Fluoresceinlösungen berechnete Funktion $A_0^*(w_0)$ wurde für verschiedene Werte von γ_{\max} , m und α in Fig. 2a-d dargestellt. Zu jedem (die Konzentration der Lösung und die Abmessungen der kreiszylindrischen Küvette charakterisierenden) Wertepaar γ_{\max} , m wurden drei α -Werte gewählt: $\alpha = \gamma_{\max}$ und $\alpha = 0,1 \gamma_{\max}$ entsprechen — im sichtbaren Spektralgebiet — den Erregungswellenlängen $\lambda \approx 490 \text{ m}\mu$ bzw.

² Der Umstand, daß $\Phi(\gamma_{\max} |\tau|)$ für $\tau \rightarrow 0$ gegen Unendlich geht, macht keine Schwierigkeit, denn der Flächeninhalt des zu einem kleinen Abszissenintervall $(-\tau_0, +\tau_0)$ gehörenden Flächenstückes kann für $\gamma_{\max} |\tau_0| \ll 1$ mit Hilfe der Reihenentwicklung von $\Phi(\gamma_{\max} |\tau|)$ leicht berechnet werden.

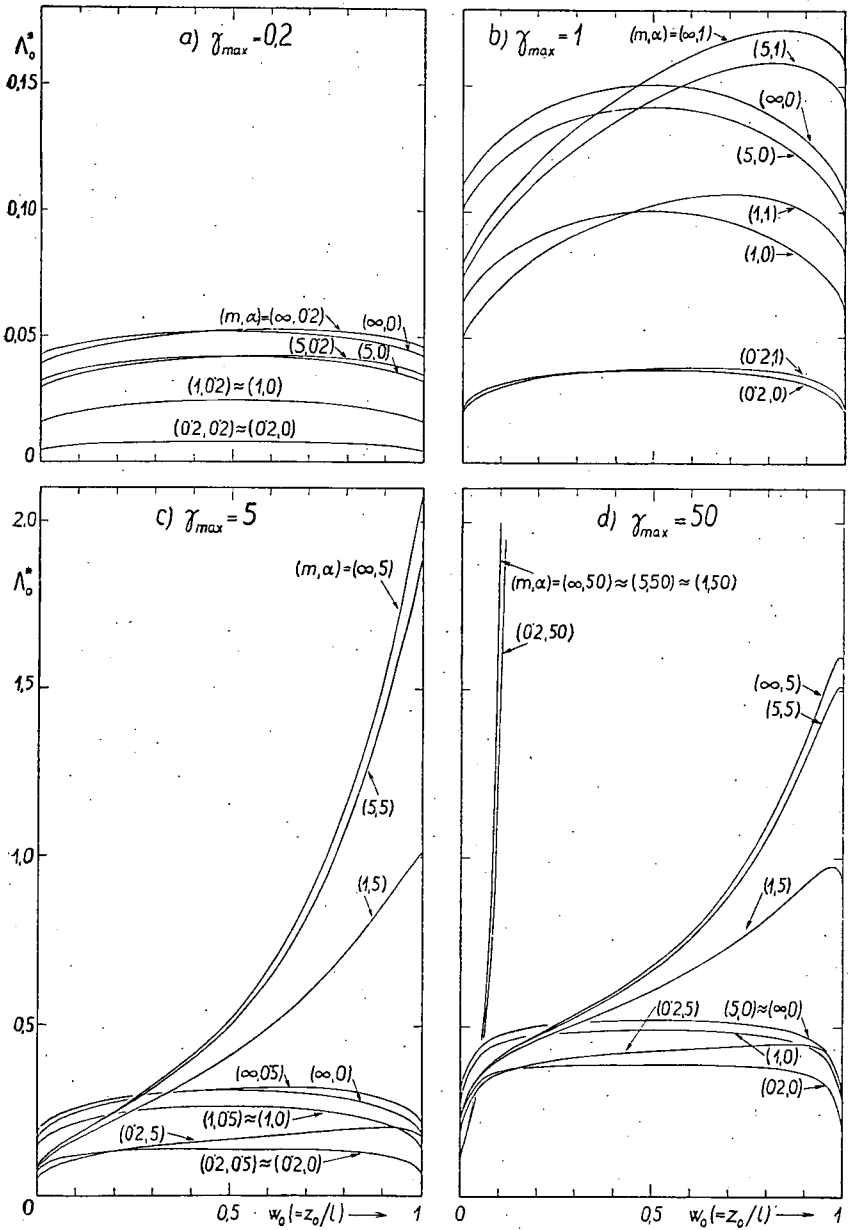


Fig. 2. Verteilungen des Verhältnisses Λ_0^* ($= N_s/N_p$ für $\eta_{max} = 1$) der Dichten der sekundär und primär angeregten Fluoresceinmolekeln längs der Achse einer kreiszylindrischen Küvette

$\lambda \approx 436$ oder $514 \text{ m}\mu$, während $\alpha = 0$ einer Erregungswellenlänge entspricht, für die der Absorptionskoeffizient der Lösung verschwindend klein ist³.

Die Bestimmung des Verhältnisses $A = N_S/N_P = \eta_{\max} A^*$ für einen außerhalb der Achse des Kreiszyinders liegenden Punkt $Q(x_0, y_0, z_0)$ — oder allgemeiner für einen beliebigen Punkt $Q(x_0, y_0, z_0)$ innerhalb eines zylindrischen oder stabförmigen Küvette mit überall gleichem Querschnitt und der Länge l — läßt sich auf A_0^* zurückführen, wenn A_0^* als Funktion von m bekannt ist. Führt man nämlich in der Ebene von Q Polarkoordinaten r', φ mit dem Anfangspunkt Q ein, und ist $r' = r'(\varphi)$ die Gleichung der Randkurve des Querschnittes, so findet man nach einer einfachen Überlegung das Resultat

$$A^*(x_0, y_0, z_0; \gamma_{\max}, \alpha) = \frac{1}{2\pi} \int_0^{2\pi} A_0^*\left(\frac{z_0}{l}; \gamma_{\max}, m(\varphi), \alpha\right) d\varphi \quad (14)$$

mit

$$m(\varphi) = \frac{r'(\varphi)}{l}. \quad (15)$$

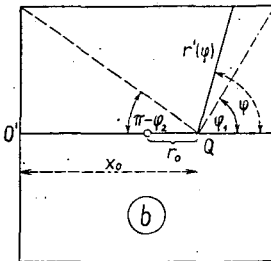
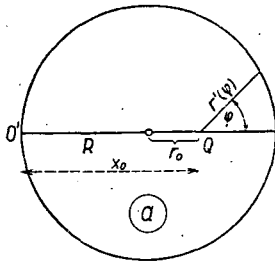
Wir geben die explizite Form von $m(\varphi)$ für zwei spezielle Fälle an. a) Für einen kreisförmigen Querschnitt (Fig. 3a) gilt

$$\begin{aligned} m(\varphi) &= \frac{1}{l} (\sqrt{R^2 - r_0^2 \sin^2 \varphi} - r_0 \cos \varphi) = \\ &= \frac{R}{l} \left[\sqrt{1 - \left(\frac{r_0}{R}\right)^2 \sin^2 \varphi} - \frac{r_0}{R} \cos \varphi \right]. \end{aligned} \quad (16)$$

b) Im Falle eines quadratischen Querschnitts (für die in Fig. 3b dargestellte Lage von Q und mit der halben Seitenlänge $R = a/2$) erhält man:

$$\begin{aligned} m(\varphi) &= \frac{R}{l} \frac{1 - \frac{r_0}{R}}{\cos \varphi} \quad \text{für } 0 \leq \varphi \leq \varphi_1 \quad \left(\text{ctg } \varphi_1 = 1 - \frac{r_0}{R} \right), \\ m(\varphi) &= \frac{R}{l} \frac{1}{\sin \varphi} \quad \text{für } \varphi_1 \leq \varphi \leq \varphi_2 \quad \left(\text{ctg } (\pi - \varphi_2) = 1 + \frac{r_0}{R} \right), \end{aligned} \quad (17)$$

$$\begin{aligned} m(\varphi) &= \frac{R}{l} \frac{1 + \frac{r_0}{R}}{\cos(\pi - \varphi)} \quad \text{für } \varphi_2 \leq \varphi \leq \pi, \quad \text{und } m(\varphi) = \\ &= m(2\pi - \varphi) \quad \text{für } \pi \leq \varphi \leq 2\pi. \end{aligned}$$



$a = 2R$

Fig. 3

³ In den Figuren 2a und 2b wurden je vier Kurven mit $\alpha = 0,1$ ($\gamma_{\max} = 0,02$ bzw. $0,1$) nicht gezeichnet, da sie sich von den entsprechenden Kurven mit $\alpha = 0$ kaum unterscheiden lassen; ebenso fehlen in Fig. 2c die Kurven $(5, 0,5)$ und $(5, 0)$, die nur um 4–6% unterhalb der Kurven $(\infty, 0,5)$ bzw. $(\infty, 0)$ verlaufen würden. Die Kurven $(\infty, 50)$ bzw. $(0,2, 50)$ der Fig. 2d hätten für $w = 0,25, 0,50, 0,75$ und 1 der Reihe nach die Ordinaten $2,3 \cdot 10^3, 9,1 \cdot 10^7, 1,4 \cdot 10^{13}$ und $2,6 \cdot 10^{18}$, bzw. $2,7 \cdot 10^2, 8,9 \cdot 10^6, 6,5 \cdot 10^{11}$ und $6,9 \cdot 10^{16}$.

Fig. 4 zeigt als Beispiel die auf Grund von (14) und (17) berechnete Verteilung der Größe $A^* = A^*(u_0, w_0; 5, 0.5)$ — mit $R/l = 0.9$ — längs fünf, zur Erregungsrichtung senkrechten Geraden (x_0 -Achsen, vgl. Fig. 3b), die von der Vorderfläche der Reihe nach die Abstände $z_0 = 0, \frac{1}{4}l, \frac{1}{2}l, \frac{3}{4}l$ und l haben. Die angegebenen Werte der Parameter ($\gamma_{\max} = 5, \alpha = 0.5, R/l = 0.9$) entsprechen etwa dem Fall, in dem sich eine Fluoresceinlösung der Konzentration $c = 2.5 \cdot 10^{-5}$ Mol/l in einer quaderförmigen Küvette der Länge $l = 1$ cm, der Breite (und Höhe) 1,8 cm befindet, und die Erregungswellenlänge $\lambda \approx 436$ m μ ist.

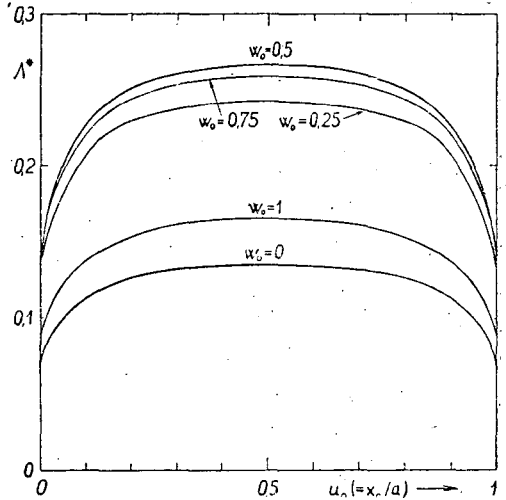


Fig. 4. Verteilung des Verhältnisses A_0^* ($= N_s/N_p$ für $\eta_{\max} = 1$) der Dichten der sekundär und primär angeregten Fluoresceinmolekeln längs zur Erregungsrichtung senkrechten Geraden. (Näheres siehe im Text)

Nachdem wir die Berechnung der relativen Verteilung der sekundär angeregten Zentren (d. h. die Berechnung der Funktionen A_0 und A) besprochen haben, können wir die Formeln leicht angeben, die sich auf die unter bestimmten Bedingungen beobachtbare spektrale Fluoreszenzstrahlendichte (Quantenstromdichte) $B_\lambda d\lambda'$ beziehen. Wir nehmen an, daß von dem Fluoreszenzlicht jeweils ein mit genügender Annäherung paralleles Bündel beobachtet wird⁴, dessen Querschnitt hinreichend klein gegen die Austrittsfläche ist. (Sonst hätte man eine mittlere Strahlendichte zu berechnen, was eine weitere Integration — die Integration über den Querschnitt des Bündels — mit sich bringen würde.) Die Achse des zu beobachtenden Bündels soll im Falle einer longitudinalen Beobachtung mit der z_0 -Achse, und im Falle einer transversalen Beobachtung mit der (im Abstand z_0 von der Vorderfläche gelegten) x_0 -Achse zusammenfallen.

Aus (1) und (3) ergibt sich (siehe z. B. Gl. (7) in [1]) die bei der Longitudinalbeobachtung in der Mitte der Vorderfläche beobachtbare Fluoreszenzstrahlendichte nach

$$B_\lambda d\lambda' = \frac{\rho}{n^2} \int_{z_0=0}^l \frac{d^4 \Phi_{P+S} e^{-k_\lambda z_0}}{4 \pi d x_0 dy_0} = C_{\lambda, \lambda'} \frac{1}{l} \int_0^l e^{-(k_\lambda + k_\lambda') z_0} \left[1 + A_0 \left(\frac{z_0}{l} \right) \right] dz_0, \quad (18)$$

⁴ Diesbezüglich wird es z. B. im Falle einer longitudinalen Beobachtung vorausgesetzt, daß die zur Beobachtung gelangenden Fluoreszenzstrahlen höchstens einen Winkel θ mit der Küvettenachse bilden, für den $\text{tg } \theta \ll m$ gilt, und daß das zu beobachtende Oberflächenstück der Lösung klein gegen $R^2 \pi$ ist.



wobei durch den Faktor ϱ/n^2 die Reflexionsverluste und die Vergrößerung des Raumwinkels beim Lichtaustritt berücksichtigt werden, und $C_{\lambda,\lambda'}$ als Abkürzung für $(\varrho/4\pi n^2) E_{\lambda 0} k_{\lambda'} l \eta_{\lambda'} f(\lambda')$ steht. Die Fluoreszenzstrahlendichte in der Mitte der Rückfläche ergibt sich, indem man $e^{-k_{\lambda'}(l-z_0)}$ an Stelle von $e^{-k_{\lambda'}z_0}$ setzt, und im Falle der Transversalbeobachtung (in Richtung QO' , vgl. Fig. 3a—b) hat man $e^{-k_{\lambda'}z_0}$ durch $e^{-k_{\lambda'}z_0}$, ferner A_0 durch A zu ersetzen und nach x_0 (statt nach z_0) von 0 bis $a=2R$ zu integrieren.

Die Formeln für $B_{\lambda'}$ enthalten in allen drei Fällen einen Faktor der Form $1+z$, wobei $z = \eta_{\max} z^{(1)}$ das Intensitätsverhältnis des zur Messung gelangenden sekundären und primären Fluoreszenzlichtes bedeutet. Wenn diese Größe kleiner als Eins aber nicht sehr klein ist, so kann der dann zu erwartende Einfluß der tertiären, quaternären usw. Fluoreszenzstrahlungen näherungsweise dadurch berücksichtigt werden, daß man $1+z$ durch $1/(1-z)$ ersetzt, was der Annahme entspricht, daß die Intensitäten der primären, sekundären, tertiären usw. Fluoreszenzstrahlungen eine geometrische Reihe mit dem Quotienten z bilden.

Wir fassen die auf diese Weise gefundenen Resultate — in denen die Abstände z_0 und x_0 in Bruchteilen der Länge l bzw. der Breite $a=2R$ der Küvette gemessen, also $z_0 = w_0 l$, $x_0 = u_0 a$, ferner $\alpha = k_{\lambda} l$, $\beta = k_{\lambda'} l$, $\beta^* = k_{\lambda'} a$ gesetzt werden — nachstehend zusammen.

Unter den erwähnten Annahmen gilt für die monochromatische Fluoreszenzstrahlendichte (Quantenstromdichte) $B_{\lambda'}$:

1) bei longitudinaler Beobachtung, in der Mitte der Vorderfläche:

$$B_{\lambda'} = \frac{\varrho}{4\pi n^2} E_{\lambda 0} \eta_{\lambda'} f(\lambda') \alpha \frac{1 - e^{-(\alpha+\beta)}}{\alpha + \beta} \cdot \frac{1}{1 - z_V} \quad (19)$$

mit

$$z_V = \eta_{\max} \frac{\alpha + \beta}{1 - e^{-(\alpha+\beta)}} \int_0^1 e^{-(\alpha+\beta)w_0} A_0^*(w_0) dw_0; \quad (19a)$$

2) bei longitudinaler Beobachtung, in der Mitte der Rückfläche:

$$B_{\lambda'} = \frac{\varrho}{4\pi n^2} E_{\lambda 0} \eta_{\lambda'} f(\lambda') \alpha \frac{e^{-\beta} - e^{-\alpha}}{\alpha - \beta} \cdot \frac{1}{1 - z_R} \quad (20)$$

mit

$$z_R = \eta_{\max} \frac{\alpha - \beta}{1 - e^{-(\alpha-\beta)}} \int_0^1 e^{-(\alpha-\beta)w_0} A_0^*(w_0) dw_0; \quad (20a)$$

3) bei transversaler Beobachtung (im Abstand $z_0 = l w_0$ von der Vorderfläche):

$$B_{\lambda'} = \frac{\varrho}{4\pi n^2} E_{\lambda 0} \eta_{\lambda'} f(\lambda') \alpha e^{-\alpha w_0} \frac{1 - e^{-\beta^*}}{\beta^*} \cdot \frac{1}{1 - z_{tr}} \quad (21)$$

mit

$$z_{tr} = \eta_{\max} \frac{\beta^*}{1 - e^{-\beta^*}} \int_0^1 e^{-\beta^* u_0} A^*(u_0, w_0) du_0. \quad (21a)$$

Hier bedeuten $A_0^*(w_0)$ und $A^*(u_0, w_0)$ im Falle eines kreisförmigen Querschnitts (Fig. 3a) die in (12) angegebene bzw. die nach (14) und (16) zu berechnende Funktion, im Falle eines quadratischen Querschnitts (Fig. 3b) dagegen die Funktionen, die man aus (14) und (17) für $r_0 = 0$ bzw. für $r_0 = |x_0 - R|$ erhält.

Wie man aus den Gleichungen (19)–(21) unmittelbar ersieht, ruft die Sekundärfluoreszenz dann eine spektrale Wirkung hervor, wenn die Größe z von der Wellenlänge λ' des Fluoreszenzlichtes abhängt. Diese Wellenlängenabhängigkeit und somit die spektrale Wirkung der Sekundärfluoreszenz kommt dadurch zustande, daß im allgemeinen die räumliche Verteilung der sekundär angeregten Zentren von der der primär angeregten verschieden ist (d. h. die Funktionen A_0^* und A^* räumlich nicht konstant sind, s. als Beispiele die Figuren. 2 und 4), und daher liefert das durch die von λ' abhängige Reabsorption geschwächte sekundäre Fluoreszenzlicht für zwei Wellenlängen λ'_1 und λ'_2 zu der beobachtbaren Intensität solche Beiträge $B_{\lambda'_1}^{(2)}$ und $B_{\lambda'_2}^{(2)}$, deren Verhältnis von dem der entsprechenden primären Größen $B_{\lambda'_1}^{(1)}$ und $B_{\lambda'_2}^{(1)}$ im allgemeinen abweicht. Ein von λ' unabhängiges z kann bei der Bestimmung der absoluten Quantenausbeute η_λ eine wesentliche Rolle spielen [2], bei der Bestimmung des wahren Spektrums $f(\lambda')$ hat es aber keinen Einfluß.

Wird die Sekundärfluoreszenz bei der Bestimmung des wahren Emissionsspektrums $f(\lambda')$ der Lösung nicht berücksichtigt, so erhält man an Stelle von $f(\lambda')$ eine Näherungsfunktion $f_0(\lambda')$, die bei den in (19)–(21) betrachteten Beobachtungsweisen — bis auf einen von λ' praktisch unabhängigen Faktor — der Reihe nach durch die folgenden Ausdrücke bestimmt ist:

$$f_0(\lambda') \sim \frac{\alpha + \beta}{1 - e^{-(\alpha + \beta)}} B_{\lambda'}, \quad \frac{\alpha - \beta}{e^{-\beta} - e^{-\alpha}} B_{\lambda'}, \quad \frac{\beta^*}{1 - e^{-\beta^*}} B_{\lambda'}. \quad (22a-c)$$

Das wahre Spektrum ergibt sich dann unter Berücksichtigung der Sekundärfluoreszenz zu

$$f(\lambda') = \text{const} \cdot (1 - z) f_0(\lambda') \quad (23)$$

mit $z = z_v$, z_R oder z_{tr} , vgl. (19a)–(21a).

Nach Gl. (23) läßt sich der größte spektrale Einfluß, der bei einer bestimmten und unter den angegebenen Versuchsbedingungen untersuchten Lösung der Sekundärfluoreszenz zugeschrieben werden kann, zahlenmäßig durch den Faktor

$$\sigma_{\max} = \frac{1 - z(\lambda'_{\max})}{1 - z(\lambda'_{\min})} \quad (24)$$

charakterisieren, wobei λ'_{\max} und λ'_{\min} die Wellenlängen bedeuten, für welche die Größe $\beta = l k_{\lambda'}$ im untersuchten Wellenlängenbereich des Emissionsspektrums ihren größten bzw. kleinsten Wert annimmt.

§ 3. Meßergebnisse und Diskussion

Wir haben uns die Aufgabe gestellt, die spektrale Wirkung der Sekundärfluoreszenz an einer alkalisch-wässrigen Fluoresceinlösung unter Anwendung jeder der erwähnten drei Beobachtungsmethoden zu untersuchen und damit nachzuprüfen, inwieweit die nach der oben festgelegten Auswertung erhaltenen wahren Spektren miteinander übereinstimmen. Ein weiteres Ziel war, festzustellen, in welchem Maß die theoretisch zu erwartende Unabhängigkeit des Fluoreszenzspektrums von der Erregungswellenlänge erfüllt ist.

Bei den Messungen, die im wesentlichen mit der gleichen Apparatur wie in [1] und [4] ausgeführt wurden (hinter der Erregungslichtquelle stand ein Monochromator an Stelle des Interferenzfilters), haben wir ein großes Gewicht auf die möglichst saubere Einhaltung der bei der Herleitung der theoretischen Zusammenhänge verwendeten Bedingungen — Parallelität und richtige Querschnitte der Lichtbündel, gleichmäßige Beleuchtung bei der Erregung, usw. — gelegt.

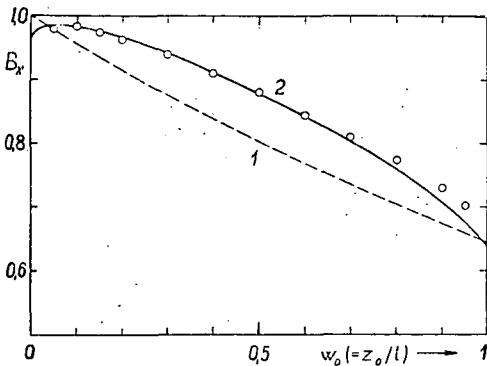


Fig. 5. Abnahme der Fluoreszenzintensität (der monochromatischen Fluoreszenzstrahlendichte B_λ) mit dem Abstand $z_0 = w_0 l$ des beobachteten Flächenstückes von der beleuchteten Vorderfläche bei transversaler Beobachtung, im Falle einer Fluoresceinlösung. \circ : gemessene Werte, 1 und 2: theoretischer Verlauf ohne bzw. mit Berücksichtigung der Sekundärfluoreszenz. (Weiteres siehe im Text)

fluoreszenz ergibt aber $B_\lambda \sim e^{-\alpha w_0} / (1 - z_{tr})$. Wenn man z_{tr} nach (21a) mit den in [2] bestimmten Wert $\eta_{\max} = 0,86$ berechnet (z. B. gehören zu $w_0 = 0, 1/4, 1/2, 3/4, 1$ der Reihe nach die Werte $z = 0,106, 0,191, 0,210, 0,205, 0,129$), erhält man für die letztere Verteilung die von der Kurve 1 merklich verschiedene Kurve 2, mit der die Messungen ziemlich gut übereinstimmen.

Bezüglich der spektralen Wirkung der Reabsorption und der Sekundärfluoreszenz haben wir mehrere Messungen durchgeführt, von deren Resultaten hier die folgenden wiedergegeben werden mögen. Die Fluoreszenzspektren einer alkalisch-wässrigen Fluoresceinlösung der Konzentration $c = 5 \cdot 10^{-5}$ Mol/l wurden unter sechs verschiedenen Erregungs- und Beobach-

Vor der Besprechung der für die spektrale Wirkung erhaltenen Resultate geben wir in Fig. 5 ein Meßbeispiel dafür, wie die Fluoreszenzintensität — genauer B_λ — bei einer transversalen Beobachtung mit dem Abstand $z_0 = w_0 l$ des beobachteten Flächenstückes von der beleuchteten Vorderfläche abnimmt. (Es waren: die Konzentration der Fluoresceinlösung $c = 2,5 \cdot 10^{-5}$ Mol/l, $l = 1$ cm, der beleuchtete Querschnitt $1,8 \times 1,8$ cm², $\lambda' = 520$ m μ , und nach unseren Absorptionsmessungen $\alpha = I k_\lambda = I k_{436} = 0,440$.) Bei Abwesenheit der Sekundärfluoreszenz wäre diese Abnahme nach Gl. (21) eine exponentielle: $B_\lambda \sim e^{-\alpha w_0}$ (Kurve 1), die Berücksichtigung der Sekundär-

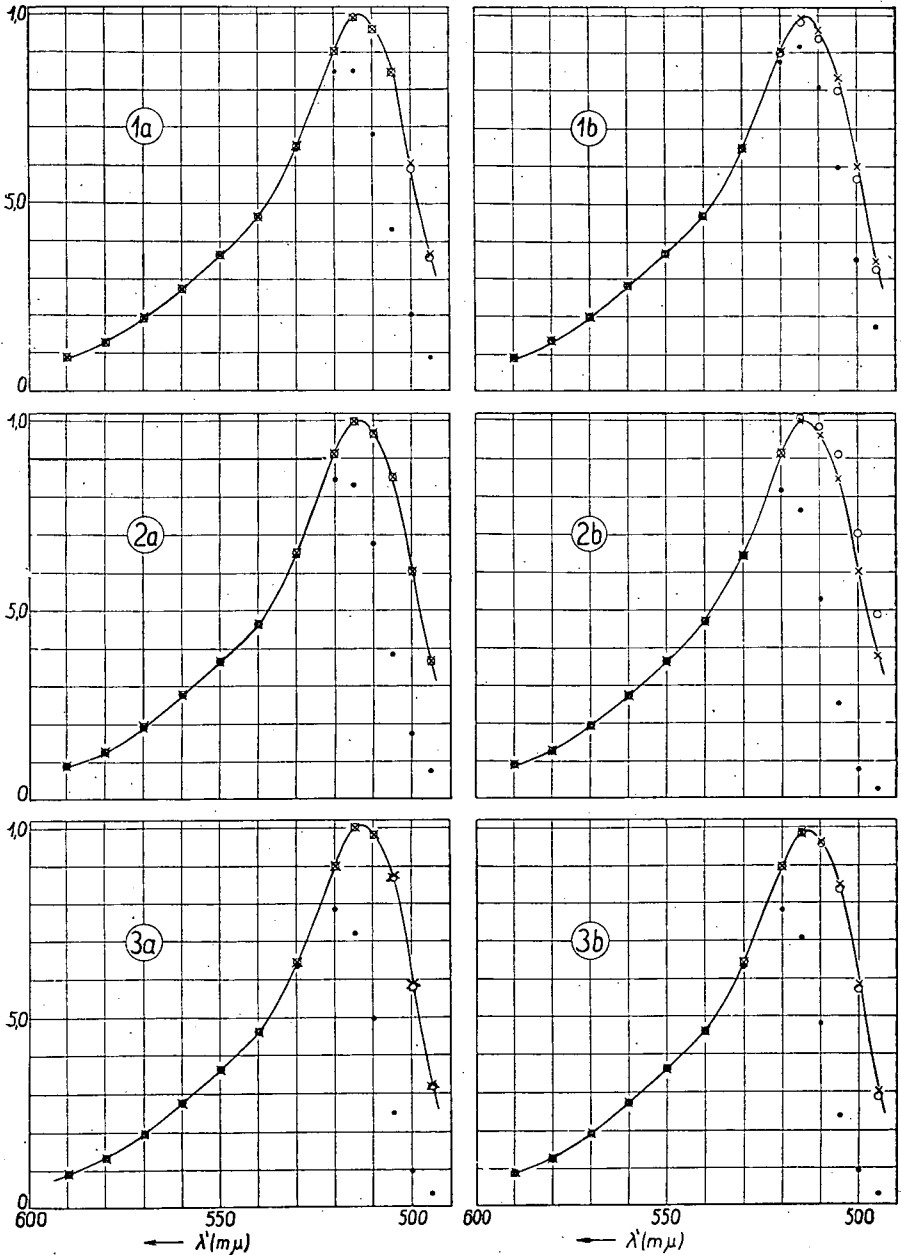


Fig. 6. Die unter verschiedenen Erregungs- und Beobachtungsbedingungen aufgenommenen Fluoreszenzspektren einer Fluoresceinlösung. Erregungswellenlänge bei 1a, 2a, 3a: $\lambda = 436 m\mu$, bei 1b, 2b, 3b: $\lambda = 490 m\mu$. 1a und 1b bzw. 2a und 2b beziehen sich auf longitudinale Beobachtung auf der Vorder- bzw. Rückfläche, 3a und 3b dagegen auf eine transversale Beobachtung. ● ● ●: unmittelbar gemessene, ○ ○ ○: nur für Reabsorption korrigierte, × × ×: auch für Sekundärfluoreszenz korrigierte Quantenspektren. (Weiteres siehe im Text)

tungsbedingungen aufgenommen (Fig. 6). Die Fälle 1a und 1b beziehen sich auf longitudinale Beobachtungen in der Mitte der Vorderfläche, 2a und 2b auf diejenigen in der Mitte der Rückfläche, 3a und 3b auf transversale Beobachtungen; a und b entsprechen dabei der Erregungswellenlänge $\lambda = 436 \text{ m}\mu$ bzw. $490 \text{ m}\mu$. Bei jeder der vier longitudinalen Beobachtungen waren: Schichtdicke $l = 0,5 \text{ cm}$, Radius der beleuchteten kreisrunden Fläche $R = 0,5 \text{ cm}$, also $m = R/l = 1$. Bei den transversalen Beobachtungen befand sich die Lösung in einer quaderförmigen Küvette der Länge $l = 1,8 \text{ cm}$ und der Breite $a = 1 \text{ cm}$, die beleuchtete quadratische Vorderfläche hatte den Querschnitt $a^2 = 1 \text{ cm}^2$, das beobachtete Stück der Seitenfläche war im Abstand $z_0 = 0,5 \text{ cm}$ von der Vorderfläche. (Das beobachtete Flächenstück von der Größe $0,2 \text{ cm} \times 0,04 \text{ cm}$ entsprach dem Bild, das die vor dem Spalt des Spektralphotometers befindliche Linse von dem Spalt in der Ebene der betreffenden Seitenfläche entwirft.)

Fig. 6 zeigt für jeden der sechs Fälle drei Spektren, nämlich das unmittelbar gemessene ($B_{\lambda'}$), das nur für die Reabsorption korrigierte [$f_0(\lambda')$, s. (22a—c)] und schließlich das mit Berücksichtigung der Sekundärfluoreszenz erhaltene Quantenspektrum [$f(\lambda')$, s. (23)]. Die Spektren — bei denen es hier nur auf Relativwerte ankommt — wurden so dargestellt, daß die unmittelbar gemessenen Werte $B_{\lambda'}$ für $\lambda' = 550 \text{ m}\mu$ die gleiche Ordinate haben, und die dem Einfluß der Reabsorption und der Sekundärfluoreszenz entsprechenden Korrekturfaktoren wurden so normiert, daß sie alle für $\lambda' = 550 \text{ m}\mu$ gleich Eins seien; dann sind sie auch für $\lambda' > 550 \text{ m}\mu$ mit großer Annäherung gleich Eins, denn in diesem Wellenlängenbereich üben weder Reabsorption noch Sekundärfluoreszenz einen merklichen Einfluß auf den spektralen Verlauf aus. Von den zur Sekundärfluoreszenz-Korrektur notwendigen z -Werten — die nach (19a) bis (21a), unter Zugrundelegung des von uns aufgenommenen Absorptionsspektrums, des für $\eta(\lambda')$ geltenden WAWIŁOWSchen Gesetzes und des schon erwähnten Wertes $\eta_{\max} = 0,86$ berechnet wurden — geben wir, mit Rücksicht auf (24), die Werte $z(\lambda'_{\min}) = z(590 \text{ m}\mu)$ und $z(\lambda'_{\max}) = z(495 \text{ m}\mu)$, ferner die den größten spektralen Einfluß der Sekundärfluoreszenz charakterisierenden Faktoren σ_{\max} für die sechs Fälle 1a, ..., 3b an:

Fall	1a	1b	2a	2b	3a	3b
$z(590 \text{ m}\mu)$	0,205	0,191	0,204	0,190	0,195	0,260
$z(495 \text{ m}\mu)$	0,184	0,141	0,202	0,375	0,170	0,224
σ_{\max}	1,028	1,062	1,003	0,778	1,031	1,049

Der genaue Vergleich der entsprechenden Spektren der Fig. 6 ergibt folgendes. Sieht man von den Meßpunkten für $\lambda' = 495 \text{ m}\mu$ — wobei die Messungen infolge der kleinen Intensität nicht hinreichend genau waren — ab, so betragen die maximalen Abweichungen der sechs unmittelbar gemessenen Quantenspektren voneinander für $\lambda' = 520, 515, 510, 505$ und $500 \text{ m}\mu$ der Reihe nach 11%, 34%, 66%, 150% und 350%; bei den nur für Reab-

sorption korrigierten Spektren betragen die entsprechenden Abweichungen 1,9%, 3,1%, 5,5%, 14% und 25%, bei den auch für die Sekundärfluoreszenz korrigierten Spektren aber nur 1,4%, 1,6%, 3,0%, 5,0% und 3,9%, d. h. die letzteren Abweichungen liegen innerhalb der Fehlergrenze von etwa $\pm 3\%$ unserer Messungen.

Bei einigen weiteren Messungen, die an Lösungen durchgeführt wurden, für welche das Produkt aus der Konzentration und der Schichtdicke größer als in den obigen Fällen war, war die Übereinstimmung weniger gut, was wahrscheinlich durch die bei den größeren z -Werten zu erwartende Unzulänglichkeit der hinsichtlich der tertiären, quaternären, ... Fluoreszenzen verwendeten Annahme $[1+z \rightarrow 1/(1-z)]$ bedingt ist⁵. Immerhin war, in allen Fällen, die Übereinstimmung zwischen den mit Berücksichtigung der Sekundärfluoreszenz erhaltenen Spektren merklich besser als zwischen denjenigen, bei den nur der Einfluß der Reabsorption (des primären Fluoreszenzlichtes) in Betracht gezogen wurde.

Auf Grund der obigen und der früheren Untersuchungen [1], [4], die sich auf den Einfluß der Schichtdicke und der Konzentration bezogen, scheint uns als berechtigt, wenigstens für Fluoresceinlösungen folgendes auszusagen zu dürfen: *Die Unterschiede, die bei den nur mit Rücksichtnahme der Reabsorption erhaltenen Fluoreszenzspektren von Lösungen je nach der Beobachtungsweise, der Schichtdicke, der Konzentration und der Erregungswellenlänge auftreten können, scheinen bei den nach der quantitativen Berücksichtigung der Sekundärfluoreszenz gewonnenen Spektren — bei den wahren Fluoreszenzspektren — nicht vorhanden zu sein.*

Literatur

- [1] Budó, A., I. Ketskeméty: J. Chem. Phys. 25, 595 (1956); Acta Phys. Hung. 7, 207 (1957).
 [2] Budó, A., J. Dombi, L. Szöllösy: Acta Phys. et Chem. Szeged 2, 18 (1956).
 [3] Förster, Th.: Fluoreszenz organischer Verbindungen (Vandenhoeck & Ruprecht, Göttingen, 1951).
 [4] Dombi, J., R. Horvai: Acta Phys. et Chem. Szeged 2, 9 (1956).

⁵ Es kann der Fall eintreten, in dem $z \geq 1$ ist (und für den natürlich unsere Formeln ihre Gültigkeit verlieren); z. B. erhält man im Falle 2b bei doppelter Schichtdicke ($l = 1$ cm): $z(590 \text{ m}\mu) = 0.199$, $z(495 \text{ m}\mu) = 2.60$. Hier weicht das nur für die Reabsorption korrigierte Spektrum $f_0(\lambda')$ von dem wahren $f(\lambda')$ (d. h. von der ausgezogenen Kurve in Fig. 6, 2b) sehr bedeutend ab; der Unterschied vermindert sich wesentlich, wenn man die Sekundärfluoreszenz — unter Verzicht auf die Wirkung der tertiären usw. Fluoreszenzen — durch den Faktor $1/(1+z)$ an Stelle von $(1-z)$ berücksichtigt, vgl. (23).