

ÜBER DIE OPTISCHE UNTERSCHIEDUNG DER VERSCHIEDENEN ZELLULOSEARTEN.

Von

A. FREY-WYSSLING.

Pflanzenphysiolog. Institut der Eidg. Techn. Hochschule, Zürich.

(Eingelangt am 4. Juli 1936.)

Das BECKE-Verfahren.

Neben dem chemischen Verhalten können auch physikalische Eigenschaften zur Identifizierung von Stoffen, die in sehr kleinen Mengen zur Verfügung stehen, herangezogen werden. Für die Mikroskopie ist die Berücksichtigung der Lichtbrechung besonders naheliegend, da ja die Erzeugung des mikroskopischen Bildes eines farblosen Gegenstandes auf dem Unterschiede des Brechungsvermögens von Objekt und Einschlußflüssigkeit beruht. Durch geeignete Wahl einer Flüssigkeit, deren Brechungsvermögen mit demjenigen des Objektes übereinstimmt, kann das Bild daher zum Verschwinden gebracht werden. Bei fehlender Übereinstimmung ist an der Grenzlinie zwischen Objekt und Einschlußflüssigkeit beim Bewegen des Mikroskop-Tubus als Folge der Lichtbeugung¹ das sogenannte SCHRÖDER VAN DER KOLK'sche Phänomen oder die BECKE'sche Linie sichtbar. Die Erscheinung besteht darin, daß beim Heben des Tubus eine helle Linie ins höher brechende Medium wandert. Mit Hilfe der BECKE'schen Linie kann man daher entscheiden, ob das Objekt oder die Flüssigkeit stärker lichtbrechend sind. Das Ziel des Verfahrens strebt dahin, den Brechungsindex des Einschlußmediums durch Beimischung von höher oder tiefer brechenden Flüssigkeiten zu heben oder zu senken, bis die BECKE'sche Linie beim Bewegen des Tubus in monochromatischem Lichte vollständig verschwindet. Der Brechungsindex

¹ K. SPANGENBERG, Die Einbettungsmethode. Fortschr. d. Min. 7, 3 (1922).

des verwendeten Gemisches kann leicht mit einem Refraktometer gemessen werden, und so ist indirekt das unbekannte Brechungsvermögen des Objektes bestimmt^{2, 3}.

In der Mineralogie hat diese Methode Triumphe gefeiert, denn sie hat sich heute zum wichtigsten Verfahren zur Bestimmung der Brechungsverhältnisse von Kleinkristallen entwickelt. Geradezu klassisch ist die von BECKE ausgearbeitete Bestimmung der Feldspäte aus der Plagioklas-Mischreihe geworden⁴. Der Natron-Feldspat Albit besitzt ein niedrigeres Brechungsvermögen als der Quarz, während der Kalkfeldspat Anorthit das Licht bedeutend stärker bricht. Da diese Feldspäte in Gesteinsschliffen häufig mit Quarz vergesellschaftet sind, läßt sich an Hand der BECKE'schen Linie überall, wo diese beiden Mineralien aneinander stoßen, leicht entscheiden, ob es sich beim vorhandenen Plagioklas um Albit oder Anorthit handelt. Bei den verschiedenen Stufen der isomorphen Plagioklas-Mischreihe von Albit bis Anorthit, läßt sich nach dem gleichen Prinzip deren chemische Zusammensetzung feststellen, je nachdem ob von den drei Hauptbrechungsindices n_{ω} , n_{β} und n_{γ} des Feldspates jeder einzelne größer, gleich oder kleiner als n_{ϵ} oder n_{ω} des Quarzes ist.

In der Cytologie und Histologie hat das Verfahren von BECKE noch keine nennenswerte Verbreitung erfahren. Bemerkenswert ist der Versuch von O. KOPETZKY-RECHTERG⁵, die Gipskriställchen in den Endbläschen der *Closterium*algen auf diese Weise zu identifizieren. Die aus den Zellen isolierten Kriställchen lieferten aber nicht das Brechungsvermögen des Gipses, das zwischen 1,52 und 1,53 liegt, sondern ein viel höheres zwischen 1,62 und 1,67; diese Werte würden eher dem Strontiumsulfat Coelestin entsprechen (zwischen 1,62 und 1,63). Nach der Veraschung zeigten die Closterien-Kriställchen dagegen Werte zwischen 1,60—1,61, die leid-

² F. RINNE und M. BEREK, Anleitung zu optischen Untersuchungen mit dem Polarisationsmikroskop. Leipzig 1934.

³ W. J. SCHIMDT, Einige Verfahren zur mikroskopischen Bestimmung der Brechzahlen von Zellen und Geweben. Hdb. biol. Arbeitsmethoden Abt. V, Teil 10, S. 852 (1935).

⁴ P. NIGGLI, Lehrbuch der Mineralogie. Berlin 1920, S. 244/45.

⁵ Über die Kristalle in den Zellen der Gattung *Closterium*. Beih. bot. Centralbl. 47, I, 291 (1931).

lich mit denen des wasserfreien Kalziumsulfat Anhydrid (1,57 bis 1,61) übereinstimmen. Die Methode hat also hier keine einwandfreien Ergebnisse geliefert. Dagegen soll im folgenden gezeigt werden, wie sie für die Unterscheidung der verschiedenen Zellulosearten mit Vorteil verwendet werden kann.

Native Zellulose und Hydratzellulose.

Bei der Herstellung von Kunstseide verhält sich die aus Lösungen der verschiedensten Art regenerierte Zellulose nicht mehr in jeder Beziehung wie native Zellulose. Die Röntgenanalyse zeigt, daß der umgefällten Zellulose (Viskose, Kupferseide, Cellophan usw.) gegenüber dem nativen Ausgangsmaterial ein etwas ausgeweitetes Kristallgitter zukommt. Es ist dasselbe Gitter, das man erhält, wenn man Zellulosefasern, um ihnen einen besonderen Glanz zu verleihen, nach dem Verfahren von MERCER mit konzentrierter Natronlauge behandelt und nachher wieder auswäscht. Die mercerisierte Zellulose wird der nativen Zellulose als Hydratzellulose gegenübergestellt, obschon eigentlich kein Hydrat vorliegt. Das Kristallgitter der beiden Zellulosearten ist monoklin und die Elementarzellen besitzen folgende Dimensionen⁶:

native Zellulose	Hydratzellulose
$a:b:c = 8,3:10,3:7,9 \text{ \AA}; \beta = 84^\circ$	$a:b:c = 8,1:10,3:9,1 \text{ \AA}; \beta = 62^\circ$

Ein weiterer wichtiger Unterschied zwischen diesen beiden Zellulosearten besteht darin, daß der Polymerisationsgrad der Zelluloseketten bei der Umwandlung in Hydratzellulose abnimmt. Nach den Viskositätsmessungen von H. STAUDINGER und Mitarbeitern⁷ sind in Baumwollzellulose 1200 Glykoseringe zu einer Kette vereinigt, bei Kunstseide dagegen nur etwa 200. Eine Rückverwandlung von Hydratzellulose in native Zellulose ist daher unmöglich; außerdem soll nach MEYER und MARK die Anordnung der Glukosanketten im Gitter der Hydratzellulose etwas stabiler sein als bei der nativen Zellulose. Die gewachsene Zellulose würde also in einer metastabilen Form vorliegen, die nur vom Leben aufgebaut werden kann, in den Händen des Chemikers aber bei den

⁶ K. H. MEYER und H. MARK, Der Aufbau der hochpolymeren Naturstoffe. Leipzig 1930.

⁷ Über hochpolymere Verbindungen. 140. Mitt. B. 69, 1168 (1936).

verschiedensten Eingriffen in die stabile Form der Hydratzellulose übergeht.

Trotz dieser theoretisch und praktisch hochwertigen Verschiedenheit der beiden Zellulosearten gibt es zur Zeit keine einwandfreie Methode, eine merzerisierte Faser von einer nativen mikrochemisch zu unterscheiden. Wohl zeigt die Hydratzellulose erhöhte Quellbarkeit und vor allem eine größere Färbbarkeit, die von der Technik besonders geschätzt wird; aber prinzipiell verhält sie sich gegenüber den bekannten Zellulose-Reagenzien (s. H. MOLISCH⁸): Chlorzinkjod, Benzidinfarbstoffen wie Kongorot usw., sowie gegenüber allen anderen substantiven Farbstoffen und den Lösungsmitteln: Schweizerreagens, konzentrierte Schwefelsäure, übersättigte Salzsäure, hochkonzentrierte Phosphorsäure usw., gleich wie native Zellulose. Es gibt allerdings quantitative Unterschiede, die jedoch für diagnostische Zwecke nicht leicht zu verwerten sind. Sie beruhen vornehmlich darauf, daß das Micellargefüge der Hydratzellulose, verglichen mit dem des nativen Ausgangsmaterials, weniger dicht gebaut ist, und je nach der Auflockerung werden auch die erwähnten Unterschiede graduell verschieden ausfallen, sodaß es kaum möglich ist, eine sichere Bestimmung hierauf zu begründen. Im allgemeinen lassen sich allerdings Produkte aus Hydratzellulose wie Kunstseidefäden und dergleichen leicht morphologisch von nativen Fasern unterscheiden; wenn es sich aber darum handelt, ob eine gegebene Faserprobe merzerisiert worden sei oder nicht, dann ist man gezwungen, eine mikrochemische Entscheidung zu treffen.

Es ist daher in hohem Maße wertvoll, daß sich die Hydratzellulose optisch von der nativen Zellulose unterscheidet. Kunstseide besitzt, nach den Messungen von A. HERZOG⁹ verglichen, mit nativer Zellulose¹⁰ viel tiefere Brechungsindices. Wenn man mit n_a den Brechungsindex parallel (außerordentlicher Strahl) und mit n_o denjenigen senkrecht (ordentlicher Strahl) zur Faser bezeichnet, gelten für Na-Licht aufgerundet folgende Werte:

⁸ Mikrochemie der Pflanze. Jena 1923.

⁹ Untersuchung der natürlichen und künstlichen Seiden. Dresden 1910.

¹⁰ A. FREY, Das Brechungsvermögen der Zellulosefasern. AMBRONN-Festschrift, Koll. Beih. 23, 40 (1926).

	n_a	n_o	Δn
Ramie-Zellulose	1,60	1,53	0,07
Viskose Seide	1,55	1,52	0,03

Man könnte vermuten, daß die kleine Doppelbrechung (Δn) der Kunstseide auf einer geringeren Parallelrichtung der Zelluloseketten beruhe, denn bei Desorientierung sinkt die Doppelbrechung rasch, um bei vollständiger Unordnung Null zu werden. Dabei müßte aber nicht nur der große Index n_a sinken, sondern gleichzeitig auch der kleine Index n_o steigen. Dies ist aber nicht der Fall, denn n_o der Kunstseide fällt ebenfalls kleiner aus als n_o der nativen Zellulose. J. M. PRESTON¹¹ hat hieraus den Schluß gezogen, daß die Hauptbrechungsindices der Hydratzellulose kleiner sein müssen als bei der natürlichen Faser, und er hat hierfür den Beweis geliefert, indem er gespannte Flachs- und Ramiefasern merzerisierte, wobei Desorientierung so gut wie möglich verhindert wird, und nachher die Lichtbrechung maß. Der Versuch von PRESTON ist mit Fasern von einem Ramiakammzug der ersten Deutschen Ramiengesellschaft Emmendingen (Baden) wiederholt worden. In Abb. 1 ist das Ergebnis graphisch dargestellt. Auf der linken Ordinate sind die Brechungsindizes für n_a und n_o der nativen Ramie-Zellulose aufgetragen, auf der rechten dagegen diejenigen für die in gedehntem Zustande merzerisierte Ramie. Zum Vergleich sind die Daten von PRESTON ebenfalls eingetragen. Unser Ausgangsmaterial weist ein etwas höheres Brechungsvermögen auf, das vermutlich auf einen etwas größeren Oxyzellulosegehalt zurückzuführen ist. Verbindet man die entsprechenden Punkte durch eine Gerade, erkennt man deutlich, wie stark das Brechungsvermögen bei der Merzerisierung absinkt. Die obere Linie gilt für den eigenen Befund, die untere dagegen für die Angaben von PRESTON. Trotz der sich ergebenden beträchtlichen Streuung läßt sich auf Grund dieses Schemas gut orientierte Hydratzellulose leicht von nativer Zellulose unterscheiden. Man legt die Fasern in eine Testflüssigkeit mit einem Brechungsvermögen von ungefähr 1,585, z. B. Anilin $n_D = 1,587$, oder Gemische von Nelkenöl/Amylalkohol oder Chinolin/Glycerin, deren

¹¹ Relations between the refractive indices and the behaviour of Cellulose Fibres. Trans. FARADAY Soc. **29**, 65 (1933).

Index durch geeignete Mischung auf diesen Wert gebracht wird, und stellt das Faserbündel parallel zur Schwingungsrichtung des Analysators, sodaß das linear polarisierte Licht die Faser mit der n_a entsprechenden Lichtgeschwindigkeit passiert. Wandert dann beim Heben des Tubus die BECKE'sche Linie in die Faser hinein, so handelt es sich um eine native, wandert sie dagegen heraus, um eine merzerisierte Faser.

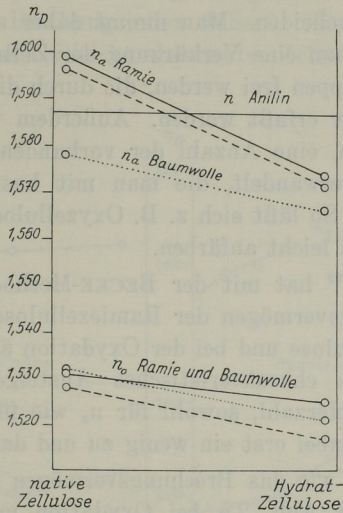


Abb. 1. Brechungsvermögen von Fasern aus nativer und Hydratzellulose.
 Ordinate: Brechungsindices für Na-Licht n_D

Abszisse, links: native Zellulose; rechts: Hydrat-Zellulose.

- Ramiefaser nach ¹².
- Ramiefaser nach PRESTON ¹¹.
- Baumwollhaare nach PRESTON ¹¹.

Für Baumwolle gestaltet sich der Test etwas anders, da ihre Schraubenstruktur den Wert von n_a herabsetzt ¹². Die beiden punktierten Linien in Abb. 1 geben die Verhältnisse für Baumwolle nach PRESTON wieder. Hier benützt man als Testflüssigkeit Benzylbenzoat ($n_D = 1,569$), in welcher native Baumwollhaare mit positivem, merzerisierte dagegen mit negativem Relief erscheinen.

¹² A. FREY-WYSSLING, Über die Dispersion von nativer und Hydrat-Zellulose. Helv. chim. Acta 19, 900 (1936).

Oxy- und Hydrozellulose.

Ähnlich wichtig wie die Erkennung, ob technisches Fasermaterial merzerisiert worden ist oder nicht, ist der Entscheid, ob es bei der Reinigung und Bleichung unbeschädigt geblieben ist. Durch hydrolysierende Agenzien (HCl und dgl.) entsteht leicht Hydrozellulose und durch oxydierende (z. B. Na-Hypochlorit) Oxyzellulose. Chemisch lassen sich diese beiden Zellulosearten nicht unterscheiden. Man nimmt daher an, daß es sich bei beiden Eingriffen um eine Verkürzung der Zelluloseketten handle, wobei Aldehydgruppen frei werden, die durch die sogenannte Kupferzahl quantitativ erfaßt werden. Außerdem werden, namentlich bei der Oxydation, eine Anzahl der vorhandenen OH-Gruppen in COOH-Gruppen verwandelt, die man mit basischen Farbstoffen nachweisen kann. So läßt sich z. B. Oxyzellulose wie Pektinstoffe mit Rutheniumrot leicht anfärben.

K. KANAMARU¹³ hat mit der BECKE-Methode untersucht, wie sich das Brechungsvermögen der Ramiezellulose bei der Verwandlung in Hydrozellulose und bei der Oxydation ändert. Er findet in beiden Fällen ein charakteristisches Ansteigen der Indices in Funktion der Kupferzahl, sowohl für n_a wie für n_o . Die Doppelbrechung nimmt dabei erst ein wenig zu und dann wieder ab.

Abb. 2 b zeigt, wie das Brechungsvermögen bei Hydrolyse mit Schwefelsäure und Abb. 2 a bei Oxydation mit Na-Hypochlorit ansteigt. Die Kupferzahlen geben ein Maß für den Abbaugrad der untersuchten Faserproben. Auffallend ist das schnelle Ansteigen des Brechungsvermögens bei der Einwirkung von unterchlorigsaurem Natrium. Geringe Mengen Oxyzellulose, die einer Kupferzahl von weniger als 1 entsprechen, haben schon eine starke Verschiebung der Indices nach oben zur Folge. Ein prinzipieller Unterschied zwischen Oxy- und Hydrozellulose besteht nicht, was erneut auf die nahe Verwandtschaft dieser beiden Zellulosearten hinweist.

Die beschriebenen optischen Verhältnisse von chemisch mißhandelten Fasern sind bis dahin diagnostisch noch nicht ausgewertet worden; doch sollte es möglich sein, durch den Nachweis eines Brechungsvermögens von über 1,600 für n_a die Gegenwart angegriffener

¹³ Über das Lichtbrechungsvermögen der Zellulose und ihrer Derivate. II. *Helv. Chim. Acta* **17**, 1066 (1934).

Zellulose (Hydro- oder Oxyzellulose; Kupferzahl über 1) zu beweisen, wenn sich das in Abb. 2 dargestellte Verhalten allgemein bestätigt.

Die Senkung des Brechungsvermögens bei der Hydratzellulose ist leicht verständlich, da ja ihr Kristallgitter weniger dicht ist als dasjenige der nativen Zellulose. Dadurch wird die Lichtgeschwindigkeit im Hydratzellulosegitter größer, was sich in einem Kleinerwerden des Brechungsindex äußert. Für den Anstieg des Brechungsvermögens bei leicht abgebauter Zellulose ist es dagegen

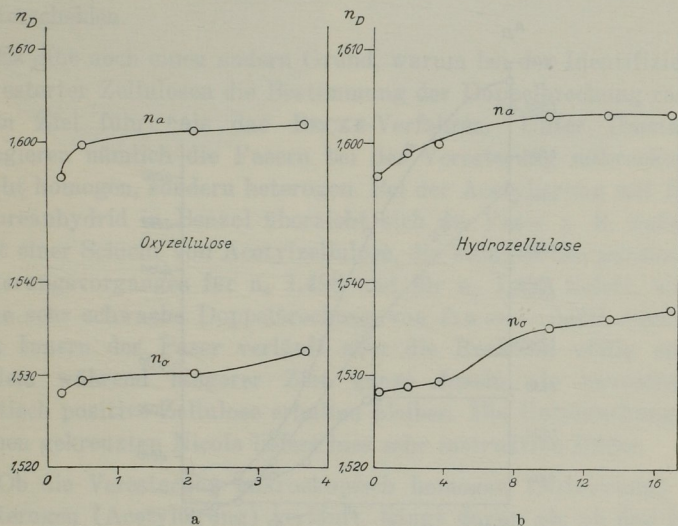


Abb. 2. Brechungsvermögen von angegriffener Zellulose.

a) Oxyzellulose und b) Hydratzellulose (nach KANAMARU¹³).

Ordinate: n_D . Abszisse: Kupferzahl.

schwieriger, eine Erklärung zu finden. Möglicherweise ruft die Umwandlung von OH-Gruppen in COOH-Gruppen einen solchen Effekt hervor, denn die Seitengruppen spielen eine sehr wichtige Rolle für das Brechungsvermögen der verschiedenen Zellulosearten. Dies zeigt sich namentlich, wenn man die OH-Gruppen verestert.

Veresterte Zellulosen.

Bei der vollständigen Umwandlung von Zellulose in Nitro- oder Acetylzellulose kehrt sich das Vorzeichen der Doppelbrechung Δn der Faser um; das heißt n_a wird im Verlaufe der Veresterung kleiner als n_o , sodaß $\Delta n = n_a - n_o$ negativ ausfällt¹⁴. Wie Abb. 3 zeigt, sinken dabei die absoluten Werte beider Indices in Funktion des aufgenommenen Stickstoffes in Form von S-Kurven beträchtlich und erreichen bei vollständiger Nitrierung (13,7% N) Werte von ungefähr 1,510. Durch Messung der Indices nach der BECKE-schen Methode können daher Rückschlüsse auf den Nitrierungsgrad

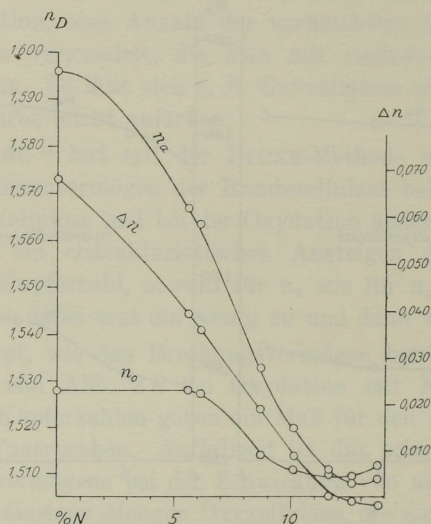


Abb. 3. Brechungsvermögen von nitrierter Zellulose (nach KANAMARU¹⁵).
 Ordinate, links: n_D für n_a und n_o ; rechts: Doppelbrechung $\Delta n = n_a - n_o$.
 Abszisse: Stickstoffgehalt der Faser in %.

einer Faser gezogen werden. Eine genaue Stickstoffbestimmung ist auf diese Weise allerdings nicht möglich, da nach KANAMARU¹⁴ die Kurven etwas verschieden verlaufen, je nachdem man mit

¹⁴ AMBRONN und FREY, Das Polarisationsmikroskop. Leipzig 1926.

¹⁵ Die Brechungsindices von Nitrocellulose und Acetylzellulose. Helv. Chim. Acta 17, 1429 (1934).

Nitrierungsgemischen steigender Konzentration bis zum Gleichgewicht verestert oder in einem bestimmten Gemische die Nitrierung nach verschiedenen Zeitintervallen unterbricht. Es ist daher leichter, nach der Stärke der Doppelbrechung Δn den Stickstoffgehalt der Fasern abzuschätzen. Diese sinkt als schwach geschweifte S-Kurve fast linear ab und wird je nach dem eingeschlagenen Verfahren in der Nähe von 10 bis 11% N Null. Höher nitrierte Zellulose ist dann optisch negativ. Da der Charakter der Doppelbrechung im Polarisationsmikroskop mit Hilfe eines vergleichenden Gipsplättchens rasch erkannt werden kann, gelingt es sehr leicht, hochnitrierte von niedrig nitrierten Produkten zu unterscheiden.

Es gibt noch einen andern Grund, warum bei der Identifizierung veresterter Zellulosen die Bestimmung der Doppelbrechung rascher zum Ziel führt als das BECKE-Verfahren. Unter Umständen reagieren nämlich die Fasern bei der Veresterung mikroskopisch nicht homogen, sondern heterogen. Bei der Acetylierung mit Essigsäureanhydrid in Benzol überzieht sich die Faser z. B. äußerlich mit einer Schicht von Acetylzellulose, die während des ganzen Veresterungsvorganges für n_a 1,498 und für n_o 1,499 liefert, woraus eine sehr schwache Doppelbrechung von $\Delta n = -0,001$ resultiert. Im Innern der Faser verläuft aber die Reaktion völlig anders, indem während längerer Zeit ganze Inseln als unveränderte, optisch positive Zellulose erhalten bleiben. Die Untersuchung zwischen gekreuzten Nicols liefert hier sehr instruktive Bilder.

Ob die Veresterung mikroskopisch homogen (Nitrierung) oder heterogen (Acetylierung) verläuft, hängt davon ab, ob das Reaktionsbad die Faser zu quellen vermag oder nicht. Dies kann sehr schön bei der Denitrierung von Nitro-Ramie mit Ammoniumsulfid gezeigt werden¹⁶. Nimmt man die Verseifung im wässriger Lösung vor, verläuft sie homogen, indem die Umwandlung der optisch negativen Nitrozellulose in optisch positive denitrierte Zellulose gleichmäßig erfolgt (Abb. 4a). Benützt man dagegen ein alkoholisches Bad, dringt das Reagens durch Risse, der die Faser umhüllenden Primärhaut unregelmäßig ein und verseift die Nitro-

¹⁶ A. FREY-WYSSLING, Über die mikroskopisch heterogene Reaktionsweise von Fasern. *Protoplasma* **26**, 45 (1936).

fasern zonenweise, wie dies in Abb. 4 b dargestellt ist. Das Polarisationsmikroskop kann hier also in selten schöner Weise die Stellen lokalisieren, wo veresterte und unveresterte Zellulose vorliegt.

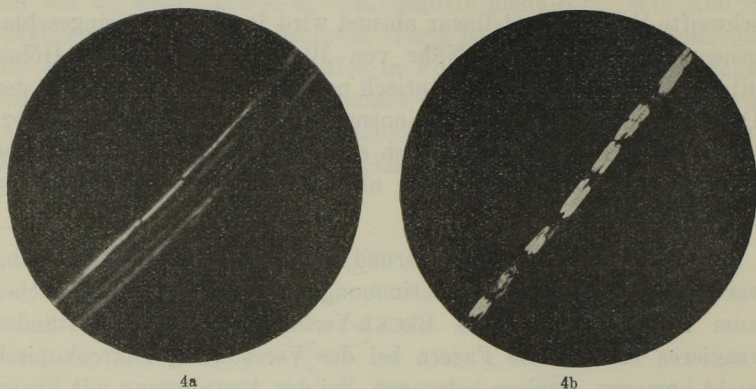


Abb. 4. Denitrierung von Nitro-Ramie¹⁶.

- a) mit wässrigem Ammonsulfid: äußere Faserschicht optisch positiv = denitrierte Zellulose; innere Faserschicht optisch negativ = Nitrozellulose; dazwischen optisch neutrale Zone.
- b) mit alkoholischem Ammonsulfid: Inseln von optisch negativer Nitrozellulose rings umschlossen von optisch positiver, denitrierter Zellulose mit sehr schwacher Doppelbrechung, da die Denitrierung noch nicht weit fortgeschritten ist.

Z u s a m m e n f a s s u n g .

1. Hydratzellulose besitzt ein bedeutend tieferes Brechungsvermögen als native Zellulose. Diese beiden Zellulosearten können mit Hilfe des BECKE-Verfahrens einwandfrei unterschieden werden.

2. Schwach abgebaute Zellulose (Hydro-, bzw. Oxyzellulose) ist etwas höher lichtbrechend als native Zellulose. Das BECKE-Verfahren könnte daher zur Erkennung solcher Eingriffe herangezogen werden.

3. Nitro- und Acetylzellulose sind bedeutend schwächer lichtbrechend als native Zellulose. Trotzdem eignet sich hier das BECKE-Verfahren weniger zur Diagnose, da es auf einem Oberflächeneffekt beruht, sodaß Heterogenitäten, die bei der Veresterung im

Innern der Faserwandung auftreten, nicht erfaßt werden können. Dagegen gestattet die negative Doppelbrechung dieser Ester, die Reaktionsweise der Zellulosefasern mikrochemisch genau zu verfolgen.

Zueignung.

In kurzen Worten skizziert Altmeister MOLISCH in seiner „Mikrochemie der Pflanze“ die Bedeutung des Polarisationsmikroskops für seine Wissenschaft. Möge die vorliegende Studie zeigen, mit wie großem Rechte er dieses wichtige Instrument als Hilfsmittel für mikrochemische Untersuchungen empfohlen hat. Sie sei ihm deshalb mit den besten Wünschen zugedacht!