

# ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ

Том VI

## СОЕДИНЕНИЯ

№ 4

1964

УДК 661.728+678.01:53

### СТРУКТУРА ЦЕЛЛЮЛОЗЫ, ОБРАБОТАННОЙ ФОСФОРНО- ВОЛЬФРАМОВОЙ КИСЛОТОЙ

*Е. М. Белавцева, Ю. М. Петров, Д. Я. Цванкин*

Применение фосфорно-вольфрамовой кислоты (ФВК) для изучения микроморфологии полимеров связано с тем, что эта кислота может быть использована в качестве контрастирующего вещества при исследовании структуры объектов в электронном микроскопе. В последние годы в электронной микроскопии широкое признание получил метод «негативного контрастирования» или «негативного окрашивания», при котором объект обрабатывается нейтрализованной фосфорно-вольфрамовой кислотой [1]. При помощи метода негативного контрастирования с использованием ФВК могут быть выявлены многие детали строения глобулярных и фибриллярных полимерных структур [2, 3]. В нашей работе для изучения образцов целлюлозы, обработанных ФВК наряду с электронной микроскопией, использованы методы рентгенографии.

Обычные рентгенограммы целлюлозы, полученные в больших углах, могут быть использованы как для определения геометрии расположения атомов и макромолекул, так и для изучения степени упорядоченности в структуре [4]. Помимо дифракции в больших углах, большой интерес представляет изучение рентгеновского рассеяния в малых углах. Известно, что на малоугловых рентгенограммах целлюлозных и гидратцеллюлозных волокон имеется непрерывное рассеяние, распределенное вдоль экватора текстуррентгенограммы. Исследование этого явления посвящено большое число работ, как, например [5—9]. Результаты последних работ [8, 9] показывают, что малоугловое рассеяние у необработанных волокон появляется в результате дифракции на удлиненных порах, вытянутых вдоль оси текстуры. Длина этих пор вдоль оси волокна значительно больше их поперечника и поэтому рассеяние сосредоточено на экваторе рентгенограммы. При различных обработках происходят изменения в распределении интенсивности малоугловой дифракции, так что рентгеновская дифракция в малых углах также может служить источником информации о микроморфологии полимеров.

В настоящей работе обычные и малоугловые рентгенограммы использованы наряду с электронной микроскопией для изучения структуры целлюлозы рами, обработанной ФВК. Мы ставили целью выяснить при помощи этих методов, каким образом ФВК распределена в структуре целлюлозы. Кроме того, сравнение рентгеновских и электронномикроскопических данных представляет самостоятельный интерес для выяснения возможностей этих методов в исследовании структуры полимеров.

#### Экспериментальные данные

Препараты волокон целлюлозы для электронного микроскопа готовили по методике, описанной ранее [2]. Диспергированные волокна целлюлозы, нанесенные на пленку-подложку, обрабатывали фосфорно-вольфрамовой кислотой при  $\text{pH} = 1,7$ .



Рис. 1, а — Рентгенограмма в больших углах образца № 4 (таблица); б — малоугловая рентгенограмма образца № 4; в — малоугловая рентгенограмма образца № 1

Рис. 3. Диспергированные волокна целлюлозы рами:

а — образцы необработанные ( $\times 30\ 000$ ); б — образцы, обработанные ФВК в кислой среде ( $\times 20\ 000$ ); в — образцы, отмытые после обработки ФВК в кислой среде (темное поле) ( $\times 20\ 000$ ); г — образцы, обработанные ФВК в нейтральной среде ( $\times 180\ 000$ )

и 7,2. Для сравнения были приготовлены неконтрастированные препараты волокон целлюлозы. Объекты исследовали в электронном микроскопе JEM-5G.

Объекты для рентгеновского исследования готовили следующим образом. Пучки очищенных волокон рами длиной 15–20 мм и толщиной 1–2 мм обрабатывали ФВК различной концентрации: 2, 10, 20% в течение 5 суток при pH = 1,7 и 7,2. После обработки ФВК объекты высушивали на воздухе в течение суток. Объекты взвешивали до и после обработки ФВК. После получения рентгенограмм от образцов, обработанных ФВК, их отмывали дистиллированной водой в течение 10 суток и высушивали. Затем с них опять снимали рентгенограммы.

Все рентгенограммы были сняты на медном излучении с фильтром. Малоугловые рентгенограммы спяты в камере с двумя точечными диафрагмами (0,2 и 0,4 мм). Расстояние между диафрагмами — 120 мм, расстояние образец — пленка составляет 186 мм. Образцы рентгенограмм приведены на рис. 1.

Список шести образцов, которые исследовались рентгенографически в больших и малых углах, приведен в таблице, в которой указаны условия получения этих образцов.

Характеристика образцов целлюлозы

Образец	Среда	Рас- твор ФВК, %	Количество поглощенной ФВК к весу исходного во- локна, %	Размер частиц, Å
1	Нейтральная	2	0,5	$D'_1=83; D'_3=70$
2	То же	10	0,5	$D''_1=62; D''_3=50$
3	Кислая	2	5	$d_1=53; d_2=32;$ $d_3=40$
4	То же	10	19	$d_1=40; d_2=30;$ $d_3=33$
5	»	20	35	$d_1=50; d_3=43$
6	Образец 4, от- мытый в во- де в течение 10 дней			$d_1=72; d_3=53$

Обработка малоугловых рентгенограмм. На рис. 1, б и в приведены малоугловые рентгенограммы, типичные для образцов целлюлозы, обработанной в кислой и нейтральной среде соответственно. Если волокна целлюлозы обрабатывали ФВК в кислой среде, то на малоугловой рентгенограмме появляется весьма сильное экваториальное рассеяние (рис. 1, б). При обработке в нейтральной среде появляется почти изотропное рассеяние (рис. 1, в). После длительного промывания в воде образцов 1 и 2 восстанавливается малоугловая рентгенограмма исходной целлюлозы. Наоборот, после отмывания образца, обработанного в кислой среде, сохраняется экваториальное рассеяние, но штрих становится короче (образец 6).

Рассмотрим обработку малоугловых рентгенограмм образцов 3, 4, 5, 6. Как мы уже отмечали, распределение интенсивности вдоль экватора показывает, что рассеивающие частицы имеют анизотропную цилиндрическую форму. Длина оси цилиндра значительно больше диаметра и направление оси совпадает с осью волокна. Фотометрирование малоугловых рентгенограмм (рис. 2, а) показывает, что распределение интенсивности вдоль экватора не обладает максимумом. Это, очевидно, является доказательством того, что имеет место дифракция на частицах, рассеивающих рентгеновские лучи независимо друг от друга. В этом случае кривая интенсивности рассеяния вдоль экватора может быть аппроксимирована следующим образом [10, 11]

$$I = c \exp [-4\pi^2 \varepsilon^2 r_c^2 (1/\lambda^2)].$$

Здесь  $c$  — постоянная,  $\varepsilon = 20$  — угол между дифрагированным и падающим пучком лучей,  $\lambda$  — длина волны и  $r_c$  — средний радиус иперции в плоскости, перпендикулярной оси текстуры. Если частица имеет цилин-

дрическую форму, то

$$r_c = d / 4,$$

где  $d$  — диаметр цилиндра. Если форма частицы — эллипсоид вращения, у которого две оси в экваториальной плоскости равны  $d$ , то

$$r_c = d / 4,4.$$

Для трехосного эллипсаода, у которого в экваториальной плоскости оси  $d'$  и  $d''$

$$r_c = \sqrt{d'^2 + d''^2} / 6,4.$$

Очевидно, что при практических вычислениях разница между этими формулами невелика. Поскольку мы не можем выяснить, какой из этих

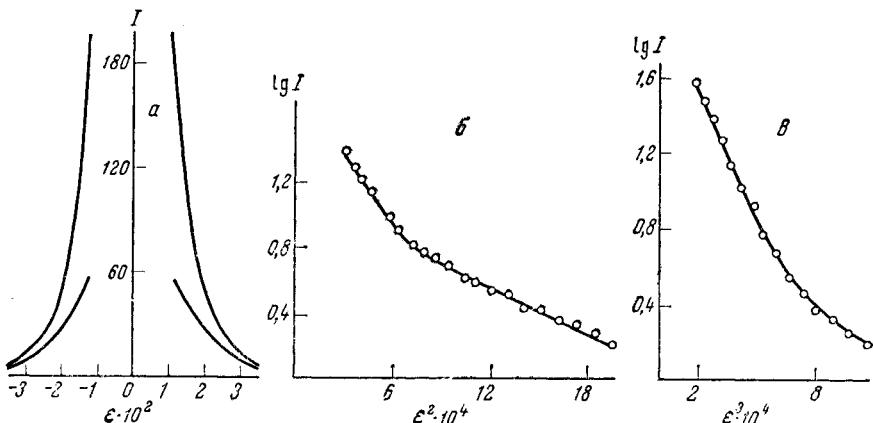


Рис. 2. а — Интенсивность  $I_1$  и  $I_2$  для образца 4; б, в —  $\lg I = f(\epsilon^2)$  для образцов 3 и 6

трех случаев осуществляется, мы определяем диаметр по формуле  $d = 4 r_c$ , считая, что частица имеет цилиндрическую форму.

На малоугловой рентгенограмме помимо экваториального рассеяния имеется весьма сильный диффузный изотропный фон ( $I_2$ ), который накладывается на рассеяние вдоль экватора. Поэтому определение  $r_c$  проводили следующим образом. Малоугловую рентгенограмму фотометрировали вдоль экватора ( $I_1$ ) и по меридиану ( $I_2$ ). Затем вычисляли истинное малоугловое рассеяние  $I : I = I_1 - I_2$  (рис. 2, а). Очевидно, если не учитывать  $I_2$ , то можно исказить кривую интенсивности. После вычисления  $I$  строили зависимость  $\lg I = f(\epsilon^2)$ . Эти зависимости для образцов 3 и 6 приведены в качестве примера на рис. 2, б и в. Далее определяли угол наклона прямолинейных отрезков этих кривых и вычисляли величины  $r_c$ . В тех случаях, когда на кривой четко выделялись два прямолинейных участка, определяли две величины  $r_c$  и два диаметра  $d_1$  и  $d_2$ .

Обработку малоугловых рентгенограмм образцов 1 и 2 проводили аналогично. Поскольку интенсивность в этом случае распределена почти изотропно, мы считаем, что рассеивающие частицы имеют форму эллипсоида вращения, и определяем  $D'$  и  $D''$ , где  $D'$  — ось в плоскости, перпендикулярной оси текстуры и  $D''$  — ось, параллельная оси текстуры. Вычисления в этом случае менее точны, так как было невозможно вычесть изотропный фон  $I_2$ .

При малых  $\epsilon^2$  на всех кривых образуются прямолинейные участки. При увеличении  $\epsilon^2$  прямые с другим наклоном могут быть выделены у образцов 3, 4. У остальных образцов при больших  $\epsilon^2$  зависимость  $\lg I$  от  $\epsilon^2$  не является прямолинейной (рис. 2, в). Такой характер функции  $\lg I = f(\epsilon^2)$  показывает, что в структуре образуется набор цилиндров различного радиуса. Полная интерпретация эксперимента в этом случае становится

сложной [11]. Не вдаваясь в подробности, отметим, что по прямолинейному участку кривой при малых  $\varepsilon^2$  мы определяем преобладающий размер цилиндров, имеющих максимальный диаметр  $d_1$ . Если образуется прямая и при больших  $\varepsilon^2$ , то это означает, что среди цилиндров меньшего размера также преобладают частицы определенного диаметра  $d_2$ .

Для того чтобы оценить приближенно минимальные размеры диаметров цилиндров мы поступали следующим образом. Интенсивность экваториального рассеяния от частиц цилиндрической формы, строго говоря, пропорциональна

$$\left[ I_1 \left( \frac{\pi \varepsilon d}{\lambda} \right) / \frac{\pi \varepsilon d}{\lambda} \right]^2.$$

Здесь  $I_1$  — функция Бесселя первого порядка. Считая, что спадение интенсивности до нуля соответствует первому нулю функции Бесселя, мы можем определить  $d_3$  из формулы,

$$d_3 = 1,2 \lambda / \varepsilon_m,$$

где  $\varepsilon_m$  соответствует спадению экваториальной интенсивности до нуля.  $d_3$  и  $D_3$  соответствуют минимальным диаметрам цилиндров, поскольку цилиндры больших диаметров соответствуют спаданию интенсивности до нуля при меньших значениях  $\varepsilon$ .

Для образцов 3, 4, 5, 6 мы провели также приближенную оценку высоты цилиндров, считая, что спад интенсивности до нуля соответствует первому нулю функции:

$$\left[ \left( \sin \frac{\pi \varepsilon S}{\lambda} \right) / \frac{\pi \varepsilon S}{\lambda} \right]^2.$$

Здесь  $S$  — высота цилиндра. Если  $\varepsilon_0$  — точка, где интенсивность спадает до нуля, то  $S = 2\varepsilon_0 / \lambda$ . Приближенные оценки показывают, что  $S \sim 300-500$  Å. Все величины  $d_1$ ,  $d_2$ ,  $d_3$  и  $D'_1$ ,  $D''_1$  приведены в таблице. Малоугловое рассеяние у образцов 1 и 2 одинаково, и поэтому величины  $D'_1$ ,  $D'_3$ ,  $D''_1$  и  $D''_3$  в таблице относятся к обоим образцам.

### Обсуждение результатов

1. Рассмотрим сначала электронномикроскопические снимки. На рис. 3, а представлена микрофотография необработанного волокна целлюлозы. Она не представляет интереса ввиду слабого контраста, благодаря чему внутренняя структура волокна не выявляется. Если препарат обработан ФВК в кислой среде, то контраст объекта по отношению к пленке-подложке сильно возрастает, однако, отдельные элементы структуры неразличимы (рис. 3, б).

Иная картина наблюдается при обработке ФВК в нейтральной среде. На рис. 3, г хорошо видна внутренняя структура отдельного участка волокна, состоящего из фибрилл. На микрофотографии светлые участки соответствуют фибриллам целлюлозы, темные участки — занятые ФВК. Следовательно, при обработке волокна ФВК в нейтральной среде происходит негативное контрастирование, т. е. молекулы ФВК в этом случае проникают в глубь структуры целлюлозы и располагаются между отдельными фибриллами. Благодаря большой разнице в рассеивающей способности между ФВК и фибриллами целлюлозы появляется возможность наблюдать элементы структуры на электронномикроскопическом снимке. Измерения показывают, что средний диаметр фибриллы составляет приблизительно 70 Å. Длина фибрилл колеблется в пределах от 500—600 Å до нескольких тысяч ангстрем.

Участки, занятые ФВК, имеют в поперечнике те же размеры, что и фибриллы. Эти участки имеют форму глобул, вытянутых вдоль оси волокна, причем их длина несколько больше поперечника. Глобулы уложены

одна за другой, так что они образуют нечто вроде фибрillы, неоднородной по форме.

После отмывания дистиллированной водой образцов, обработанных в нейтральной среде, восстанавливается прежняя картина необработанного препарата. После отмывания образцов, обработанных в кислой среде, часть кислоты остается в волокне. На микрофотографии, которую мы не приводим, видны оставшиеся небольшие участки, занятые ФВК. При получении темнопольного изображения на месте этих темных частиц видны интерференционные максимумы (белые точки и штрихи на рис. 3, в). Это показывает, что в отмытом образце ФВК остается в виде кристаллитов, а не в аморфном состоянии, как это было в неотмытом образце.

2. Обратимся теперь к результатам рентгеновского исследования. Рентгенограмма, снятая в больших углах при обработке образца в нейтральной среде, практически не меняется. Это связано, очевидно, с тем, что количество поглощенной в волокне ФВК в этом случае невелико (таблица). Если же производится обработка в кислой среде, то на рентгенограмме появляется сильный фон газового типа (рис. 2, а). Измерения контуров линий показывают, что после такой обработки ширины рефлексов остались прежними. Положение рефлексов и текстура также остались без изменения.

После промывания водой образца восстанавливается прежняя рентгенограмма, на которую накладывается ряд дебаевских колец, принадлежащих кристаллитам ФВК. Все эти факты говорят о том, что при обработке как в нейтральной, так и в кислой среде, молекулы ФВК не проникают в упорядоченные участки структуры, а располагаются между ними в порах волокна.

Результаты изучения малоугловой дифракции показывают, что в обработанных образцах появляется сильное малоугловое рассеяние, которое происходит в результате дифракции на частицах со средними поперечными размерами в пределах до ста ангстрем (таблица). Очевидно, что за это рассеяние ответственны области, занятые ФВК, которая благодаря большой плотности может давать столь сильное рассеяние.

При обработке в нейтральной среде, небольшое количество поглощенной ФВК располагается в волокне в виде глобул, которые имеют форму эллипсоидов с размерами  $D'$  и  $D''$  (таблица). В случае кислой среды, когда в волокне содержится большое количество ФВК (привес до 35%, таблица), молекулы кислоты собираются в вытянутые цилиндры. Поперечные размеры большинства цилиндров составляют от 30 до 50 Å и длина  $\sim 400$  Å. После промывания образца, обработанного в кислой среде, малоугловое рассеяние сохраняется; отсюда можно сделать вывод, что оставшаяся кислота, по-прежнему собирается в цилиндры, которые имеют несколько большие размеры  $d \sim 50-70$  Å (таблица).

Таким образом, если в исходной целлюлозе малоугловое рассеяние появляется за счет того, что поры обладают меньшей плотностью, чем оставленное волокно, то в образце, обработанном ФВК, поры, заполненные ФВК, обладают значительно большей плотностью, чем волокно. Поэтому на малоугловой рентгенограмме появляется столь сильное рассеяние, за которое ответственны области, занятые ФВК.

3. Сравним результаты, полученные при помощи рентгенографии и электронной микроскопии. Мы уже отмечали, что на электронномикроскопических снимках образцов, обработанных в нейтральной среде, четкая картина фибрillлярной структуры получена благодаря тому, что между отдельными фибрillлами внедрились молекулы ФВК, образовавшие цепочки из глобул. Существование глобул типа эллипсоидов с размерами осей приблизительно 60 и 80 Å подтверждается анализом малоугловых рентгенограмм. Поскольку рентгенограммы в больших углах не изменились, то, очевидно, ФВК, заняв поры, не затронула упорядоченные области в структуре.

Таким образом, изучение рентгенограмм и электронных микрофотографий образцов, обработанных в нейтральной среде, приводит к одинаковым результатам. Помимо этого, рентгенограммы в дополнение к электронно-микроскопическим снимкам подтверждают, что при проникновении ФВК структура целлюлозных фибрилл осталась без изменения. С другой стороны, из электронных микрофотографий видно, что глобулы уложены в цепочки вдоль фибрилл. Такого результата нельзя получить из малоугловых снимков, поскольку на них мы получали независимое рассеяние от отдельных глобул.

Рассмотрим теперь образцы, обработанные в кислой среде. При этой обработке в волокно впитывается значительно большее количество ФВК (до 35 %, таблица). Судя по рентгеновским данным, ФВК в этом случае располагается в порах в виде длинных цилиндров, длина которых в 8—10 раз больше их диаметра. Структура целлюлозных фибрилл при этом также остается незатронутой, что следует из измерений ширины рефлексов, а также из того факта, что после удаления ФВК полностью восстанавливается текстуррентгенограмма исходного целлюлозного волокна. На электронномикроскопических снимках в этом случае не выявляется структура, очевидно, из-за того, что большое количество кислоты заливает весь образец. После промывания такого образца ФВК кристаллизуется и задерживается в порах в виде кристалликов. Этот факт опять-таки подтверждается и рентгеновски и при помощи темнопольных электронномикроскопических снимков.

### Выводы

1. Изучение образцов целлюлозы рами, обработанных ФВК в кислой и нейтральной среде, показывает, что результаты, полученные рентгенографическим и электронномикроскопическим методом, согласуются между собой, а также в ряде случаев дополняют друг друга.

2. При обработке целлюлозы молекулы ФВК не разрушают упорядоченных участков структуры. Негативный контраст появляется при обработке волокон целлюлозы нейтрализованной ФВК, так как в этом случае поглощается небольшое количество ФВК, которая располагается, очевидно, в порах волокна в виде глобул размером  $\sim 100 \text{ \AA}$  и выявляет таким образом фибрillлярную структуру. При обработке в кислой среде ФВК располагается в порах в виде длинных цилиндров. Фибрillлы целлюлозы имеют диаметр  $\sim 70 \text{ \AA}$  и различную длину от 500  $\text{\AA}$  до нескольких тысяч ангстрем.

Институт элементоорганических  
соединений АН СССР

Поступила в редакцию  
28 IV 1963

### ЛИТЕРАТУРА

1. E. Brenner, R. Hogen, Biochim. et biophys. acta, **34**, 103, 1959.
2. Е. М. Белавцева, Высокомолек. соед., **5**, 1847, 1963.
3. K. Hess, E. Cüttler, H. Mahl, Kolloid. Z., **168**, 37, 1960.
4. А. И. Китайгородский, Д. Я. Цванкин, Высокомолек. соед., **1**, 269, 279, 1959.
5. R. Hosemann, Z. Phys., **113**, 751, 1939; **114**, 133, 1939.
6. A. N. J. Heuyn, J. Amer. Chem. Soc., **71**, 1873, 1949.
7. A. N. J. Heuyn, J. Appl. Phys., **26**, 519, 1955.
8. D. Heikens, J. Polymer Sci., **35**, 139, 1959.
9. P. H. Hermans, D. Heinen, A. Weidinger, J. Polymer Sci., **35**, 145, 1959.
10. А. Гинье, Рентгенография кристаллов, Физматгиз, 1961.
11. A. Guinier, G. Fournet, Small Angle Scattering of X-rays, New York, 1954.

THE STRUCTURE OF CELLULOSE TREATED WITH PHOSPHOTUNGSTIC  
ACID

*E. M. Belavseva, Yu. M. Petrov, D. Ya. Tsvankin*

Summary

Specimens of ramie cellulose treated with phosphotungstic acid (PTA) in neutral or acid medium have been subjected to  $x$ -ray and electron microscopic investigation. It follows from the ordinary  $x$ -ray diagrams that in all cases the structure of the ordered parts of the fiber remains unchanged after the treatment. Low angle  $x$ -ray diagrams show that in the case of neutral medium the PTA arranges itself in the form of stretched globules whose long axis is oriented along the fiber axis (the lengths of the globule axes are approximately 60 and 80 Å. On treatment in acid medium cylinders of PTA are formed in the fibers, the diameter being  $\sim 40$  Å and the length  $\sim 400$  Å. Electron photomicrographs showed that negative contrasting occurs only on treatment with neutralized PTA, which enters in small amount into the interfibrillar pores with diameter 70 Å. The  $x$ -ray and electron microscopic data are in good agreement with each other.