

MIKROSKOPIJA PRI BREWSTROVEM KOTU

LUCIJA ČOGA¹, IRENA DREVENŠEK OLENIK^{1,2}

¹Fakulteta za matematiko in fiziko, Univerza v Ljubljani

²Institut Jožef Stefan

PACS: 42.15.Eq, 79.60.Dp

V članku so razloženi osnovni principi delovanja mikroskopije pri Brewstrovem kotu. Nato sledi opis strukturne organizacije v tankih plasteh organskih molekul, ki plavajo na vodni površini. Na koncu je podanih nekaj primerov posnetkov tovrstnih površinskih plasti, dobljenih z opisano tehniko mikroskopiranja.

BREWSTER ANGLE MICROSCOPY

We present basic principles of operation of Brewster angle microscopy. We also describe structural organization in thin films of organic molecules floating on water surface. In the last part we give some examples of images of this kind of surface structures obtained by the presented optical microscopy technique.

Uvod

Svetovno leto svetlobe nas spodbuja k razmišljanju o pomenu, ki ga ima svetloba ne le v našem vsakdanjem življenju, ampak tudi pri tehnološkem razvoju človeštva. Za velik napredek znanja in tehnologije na področjih, kot so biologija, medicina, farmacija, kemija in znanosti o materialih, ter tudi na številnih področjih fizike je v veliki meri zaslužna tehnika optične mikroskopije. Zaradi raznolikosti preiskovanih materialov se je optična mikroskopija razvila v številne različice, ki omogočajo optimalno mikroskopiranje specifičnih vrst vzorcev. Ena od teh je fazna mikroskopija, ki je namenjena opazovanju tankih vzorcev iz prozornih snovi, kot so posamične žive celice ali biološka tkiva. Z običajnim presevnim mikroskopom pri tovrstnih vzorcih namreč naletimo na težave, saj je intenziteta prepuščene svetlobe skozi njih praktično neodvisna od debeline in lomnega količnika opazovanega območja. To pomeni, da nekaterih podrobnosti v strukturi vzorca, kot so variacije gostote in postopne spremembe debeline, ne moremo dobro razločiti. V takih primerih lahko kontrast slike znatno izboljšamo z metodami, ki zaznavajo fazni zamik prepuščenega optičnega polja, kot sta fazno-kontrastna mikroskopija in diferenčno-interferenčna mikroskopija [1, 2]. Osnova delovanja fazno občutljivih tehnik je interferenčno mešanje optičnih žarkov, ki gredo skozi različna območja vzorca ali pa deloma skozi vzorec in deloma mimo

vzorca. Tipična debelina vzorcev pri faznem mikroskopiranju je na območju od 1 do 50 μm .

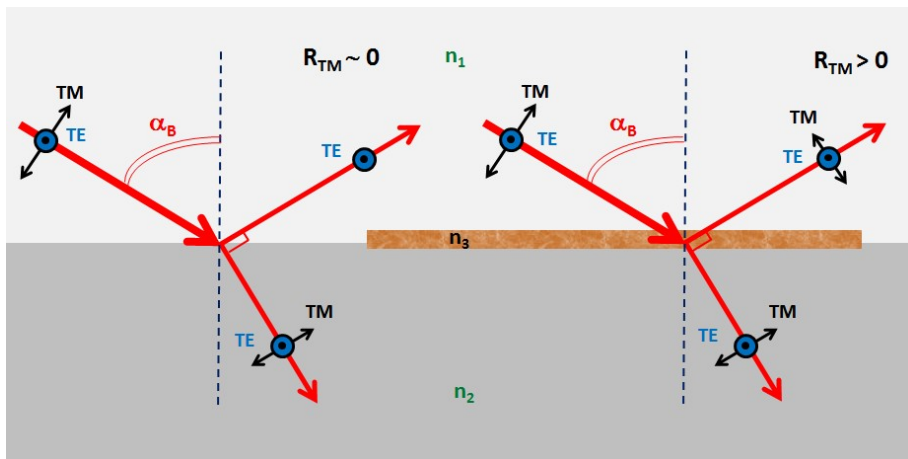
Leta 1991 pa sta dve skupini raziskovalcev neodvisno razvili novo tehniko za mikroskopiranje tankoplastnih struktur, s katero je mogoče opazovati tudi vzorce prozornih snovi z debelino, manjšo od 1 nm. To je mikroskopija pri Brewstrovem kotu, ki jo običajno označujemo z angleško kratico BAM (Brewster Angle Microscopy) [3, 4]. Tehnika BAM je najbolj primerna za opazovanje tankih površinskih nanosov na ravni podlagi iz homogenega materiala, kot je na primer tanka plast nafte na površini vode. Zato so se z razvojem BAM močno razmahnila zlasti raziskave spontane organizacije različnih vrst organskih molekul na vodni površini.

Osnove delovanja mikroskopije pri Brewstrovem kotu

Tehnika BAM je osnovana na pojavu, da pri vpadu svetlobe na mejo dveh snovi pri Brewstrovem kotu α_B dobimo svetlobo, ki je linearno polarizirana v smeri pravokotno na vpadno ravnino. Tej polarizaciji rečemo transverzalno električna (TE), polarizaciji, ki je pravokotna nanjo, pa transverzalno magnetna (TM) polarizacija (slika 1 levo). Opisani fenomen lahko razložimo preko načina, kako se električni dipoli atomov v bližini meje dveh snovi odzivajo na TM polarizirano svetlobo. Znano je, da električni dipoli ne oddajajo nobenega sevanja v smeri svojega nihanja. Pri vpadu svetlobe pri Brewstrovem kotu pa postane smer nihanja svetlobe v snovi 2 (tj. smer nihanja električnih dipolov) vzporedna s smerjo odbite svetlobe in posledično ni odboja za TM polarizacijo. Iz slike 1 je razvidno, da sta pri tem lomljeni in odbiti žarek med seboj pravokotna ($\alpha + \beta = 90^\circ$, kot β označuje nagib lomljenega žarka glede na vpadno pravokotnico). Iz tega lahko z uporabo lomnega zakona, $n_1 \sin \alpha = n_2 \sin \beta$, dobimo zvezo za Brewstrov kot α_B

$$\alpha_B = \arctg(n_2/n_1), \quad (1)$$

pri čemer sta n_1 in n_2 lomna količnika snovi nad mejno ploskvijo in pod njo. Pri vpadu svetlobe iz zraka na površino vode ($n_1 = 1,00$, $n_2 = 1,33$) se polarizirani odboj zgodi pri $\alpha_B = 53,1^\circ$. V realnosti lomni količnik na mejni ploskvi ne preskoči diskretno iz ene vrednosti v drugo, ampak je sprememba zvezna, zaradi česar odbita svetloba tudi pri Brewstrovem kotu ni povsem linearno polarizirana. Na meji zrak-voda je tako na območju $\alpha \sim \alpha_B$ najmanjša dosegljiva odbojnost za TM polarizirano svetlobo $R_{TM} \sim 10^{-8}$ [5], medtem ko ima odbojnost za TE polarizirano svetlobo na tem območju vrednost $R_{TE} \sim 0,08$. Če pri $\alpha \sim \alpha_B$ površino vode opazujemo skozi polarizator (polarizacijski filter), katerega prepustna smer sovпада s smerjo TM



Slika 1. Shema loma in odboja svetlobe pri Brewstrovem kotu α_B brez vmesne tanke plasti (levo) in z vmesno tanko plastjo (desno).

polarizacije, je površina videti temna oz. nerefektivna, saj je intenziteta odbite svetlobe s TM polarizacijo izredno šibka. Navedeni učinek polarizacijskih filtrov izkoriščamo, kadar se pri fotografiranju ali pa pri gledanju v objekte, napolnjene z vodo, želimo znebiti odboja svetlobe od vodne površine.

Opisane razmere pa se močno spremenijo, če na površino nanese močno tanko plast neke tretje snovi z lomnim količnikom n_3 (slika 1 desno). Poskušajmo dobiti oceno za spremembo odbojnosti za TM polarizirano svetlobo pri $\alpha = \alpha_B$ na meji zrak-voda, če nanjo nanese močno tanko plast snovi z lomnim količnikom $n_3 = 1,5$ in debelino $d = 1$ nm. Odbojnosti na mejnih ploskvah zrak-vmesna plast in vmesna plast-voda podajata Fresnelovi enačbi [6]

$$R_{13} = \left(\frac{\operatorname{tg}(\alpha - \gamma)}{\operatorname{tg}(\alpha + \gamma)} \right)^2, \quad R_{32} = \left(\frac{\operatorname{tg}(\gamma - \beta)}{\operatorname{tg}(\gamma + \beta)} \right)^2, \quad (2)$$

pri čemer velja $n_1 \sin \alpha = n_2 \sin \beta = n_3 \sin \gamma$. S kotom γ smo označili nagib žarkov glede na vpadno pravokotnico v vmesni plasti. Vrednosti R_{13} in R_{32} sta si pri izbranih podatkih med seboj zelo podobni in z mirno vestjo lahko vzamemo $R_{13} \sim R_{32} = R_0 \sim 10^{-3}$. V okviru tega približka lahko za izračun celostne odbojnosti R_{TM} , ki jo dobimo z upoštevanjem večkratnih odbojev na obeh mejah, uporabimo znano zvezo, podano z Airyjevo funkcijo [6]:

$$R_{TM} = 1 - T_{TM} = 1 - \left(\frac{1}{1 + F \cdot \sin^2 \frac{\phi}{2}} \right), \quad (3)$$

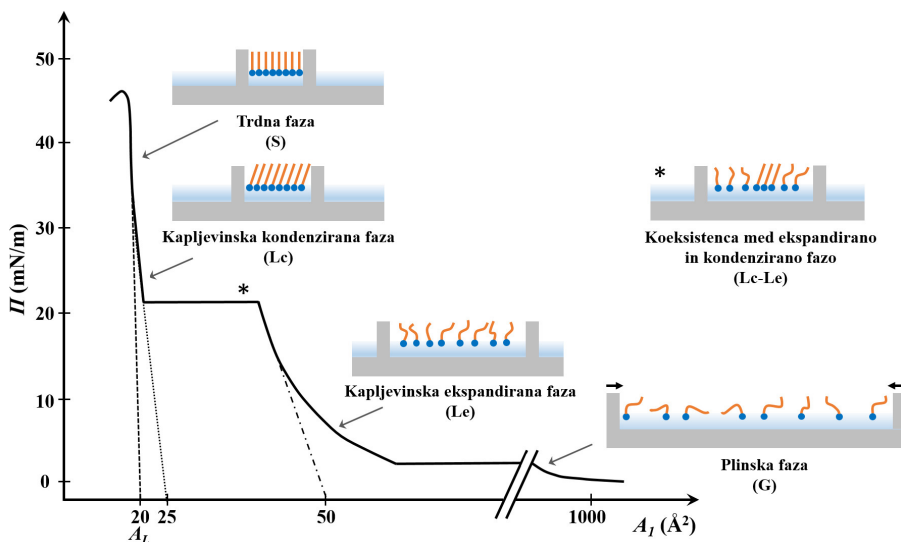
kjer T_{TM} označuje prepustnost, $F = 4R_0/(1 - R_0)^2$ kontrast meje, $\phi = 4\pi dn_3 \cos \gamma/\lambda$ pa fazni zamik med zaporednimi odbitimi žarki. Za nadaljnji izračun bomo vzeli še $\lambda = 658$ nm, kar ustreza valovni dolžini laserja v BAM sistemu, ki ga uporabljamo pri naših eksperimentih, ki so podrobneje opisani v nadaljevanju. Pri navedenih podatkih potem dobimo $\phi \sim 8\pi \cdot 10^{-3}$. Ker velja $R_0 \ll 1$ in tudi $\phi \ll 1$, izraze v enačbi (3) razvijemo do prvega člena v Taylorjevi vrsti in pridemo do zelo preprosto zveze

$$R_{TM} \sim R_0\phi^2, \quad (4)$$

iz katere sledi $R_{TM} \sim 60 \cdot 10^{-8}$. Z opisanim računom smo ugotovili, da le 1 nm debela površinska plast z lomnim količnikom $n_3 = 1,5$ v območju $\alpha \sim \alpha_B$ povzroči povečanje odbojnosti za TM polarizirano svetlobo kar za faktor 60 glede na čisto vodno površino. To povečanje odbojnosti posledično povzroči znatno povečanje intenzitete odbite svetlobe, ki ga z modernimi videokamerami brez težav zaznamo. Če med polarizator in videokamero dodamo še objektiv za običajno optično mikroskopijo, lahko z opisanim sistemom opazujemo mikroskopske podrobnosti pri nastanku, strukturiranju in faznih transformacijah površinske plasti. Pri tem, podobno kot pri drugih vrstah optične mikroskopije, lahko dosežemo lateralno ločljivost do okoli $0,5 \mu\text{m}$. Za osvetljevanje opazovanega območja namesto običajne žarnice uporabimo lasersko svetlobo, saj nam njena monokromatičnost zagotavlja dobro definirane vrednosti lomnega količnika oz. Brewstrovega kota α_B in s tem tudi dober kontrast slike. Pojavi pa se manjša težava. Zaradi naklona optične osi objektiva pod kotom $(\pi/2 - \alpha_B)$ glede na opazovano površino je slika ostra le za izbrani pas površinskega sloja, ki leži na ustrezni razdalji pred objektivom. Pri mikroskopiranju večjih območij zato objektiv postopno premikamo v smeri odbitega žarka in na koncu posnetke posamičnih pasov združimo v enotno sliko. BAM se običajno uporablja za kvalitativno analizo strukture filma. Za kvantitativno analizo pa ga po navadi kombiniramo z drugimi tehnikami, na primer optično elipsometrijo.

Enomolekulske plasti na meji zrak-voda

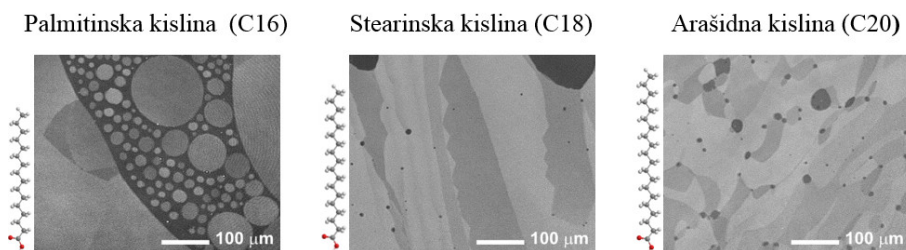
Surfaktanti oz. površinsko aktivne snovi zmanjšujejo površinsko napetost vode. Najpogosteje gre za amfifilne molekule, sestavljene iz hidrofilne (polarne) »glave« in hidrofobnega (nepolarnega) »repa«. Tipičen predstavnik tovrstnih molekul so maščobne kisline, katerih glavo tvori karboksilna skupina, rep pa alifatska veriga. Za amfifilne molekule je lega na gladini vode (meja zrak-voda) energijsko zelo ugodna, saj se hidrofilna glava lahko potopi



Slika 2. Fazni diagram in sheme različnih faz, ki se pojavljajo pri spreminjanju površine Langmuirjevega filma.

v vodo, hidrofobni rep pa ostane v zraku. Enomolekulske plasti amfifilnih molekul na vodni površini imenujemo Langmuirjevi filmi, po Nobelovem nagrajencu za kemijo Irvingu Langmuirju, ki se je poleg Agnes Pockelsove prvi ukvarjal z znanstvenimi raziskavami na tem področju.

Za manipulacijo Langmuirjevih filmov se uporablja plitvo korito iz teflona. Korito napolnimo s tekočo »podfazo«, ki je najpogosteje čista voda, vodna raztopina soli ali pa izbran pufer. Na površino podfaze nato po kapljicah nanese majhen volumen (tj. nekaj mikrolitrov) raztopine izbranega amfifila. Na začetku je gostota molekul v filmu tako majhna, da sta pozicija hidrofilnih glav in orientacija hidrofobnih repov naključni. Takemu stanju rečemo plinsko stanje oz. plinska faza Langmuirjevega filma. Ko pa začnemo molekule stiskati na manjše območje vodne gladine, medmolekulske interakcije postajajo vedno bolj izrazite, kar vodi do nastanka novih faz in faznih prehodov med njimi. Stiskanje izvedemo s pomikanjem zapornic, ki omejujejo področje površinskega nanosa. Slika 2 prikazuje shemo tipičnega faznega diagrama. Na horizontalni osi je podana površina območja vodne gladine, ki odpade na posamično amfifilno molekulo. Izračunamo jo po zvezi $A_1 = A/N$, pri čemer je A površina celotnega območja filma, N pa število amfifilnih molekul v filmu. Na vertikalni osi pa je podan površinski tlak Π , ki označuje razliko med površinsko napetostjo čiste vode γ_0 (72,8 mN/m pri



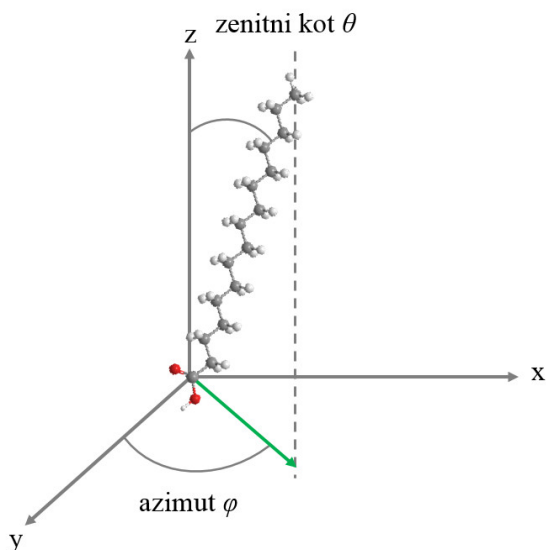
Slika 3. BAM posnetki Langmuirjevih filmov treh maščobnih kislin v kapljevinski kondenzirani fazi [7].

25 °C) in površinsko napetostjo vode, na kateri obstaja Langmuirjev film: $\Pi = \gamma_0 - \gamma$. Površinsko napetost merimo s preprosto napravo, ki je sestavljena iz občutljive tehtnice in tanke ploščice, ki je obešena na tehtnico ter potopljena skozi mejo podfaza-zrak (Wilhelmyjeva metoda). Rezultanto sil, ki deluje na ploščico (odčitek na tehtnici), pretvorimo v površinsko napetost preko znanih dimenzij ploščice.

Pri stiskanju filma, ki je v specifični fazi, površinski tlak Π narašča s padajočo vrednostjo A_1 , na območjih koeksistence dveh faz pa je konstanten. Detajli krivulje $\Pi(A_1)$, ki jo imenujemo izoterma Langmuirjevega filma, so določeni s kemijsko sestavo amfilnih molekul, z lastnostmi vodne podfaze (čista voda, voda z dodatkom soli, itd.) in s temperaturo sistema. Karakteristični značilnosti izbrane faze sta njena stisljivost $C = -((dA_1/d\Pi)/A_1)_{\max}$ in limitna površina A_L , ki jo dobimo z ekstrapolacijo najstrmejšega dela krivulje $\Pi(A_1)$ na horizontalno os. Minimalna površina, na katero lahko stisnemo eno alifatsko verigo, je okoli 20 Å² (kvadratni angstromi), kar ustreza vrednosti A_L za trdno fazo (S), v kateri so hidrofobni repi orientirani pravokotno na gladino vode.

Primeri posnetkov enomolekulskih plasti

Za slikanje z BAM sistemom so ustrezne faze, katerih morfološke lastnosti se s časom le malo spreminjajo, saj za posnetek posamične slike, zaradi v prejšnjem poglavju omenjene potrebe po postopnem premikanju objektiva preko opazovane površine, potrebujemo okoli 10 sekund. Opazovana struktura se v tem času ne sme preveč premakniti oz. odplavati iz območja opazovanja. Zato sta za BAM analizo najbolj primerni območji kapljevinske kondenzirane faze (Lc) in trdne faze (S) (slika 2). Na sliki 3 so prikazani BAM posnetki Lc faze Lagmuirjevih filmov treh maščobnih kislin z različno

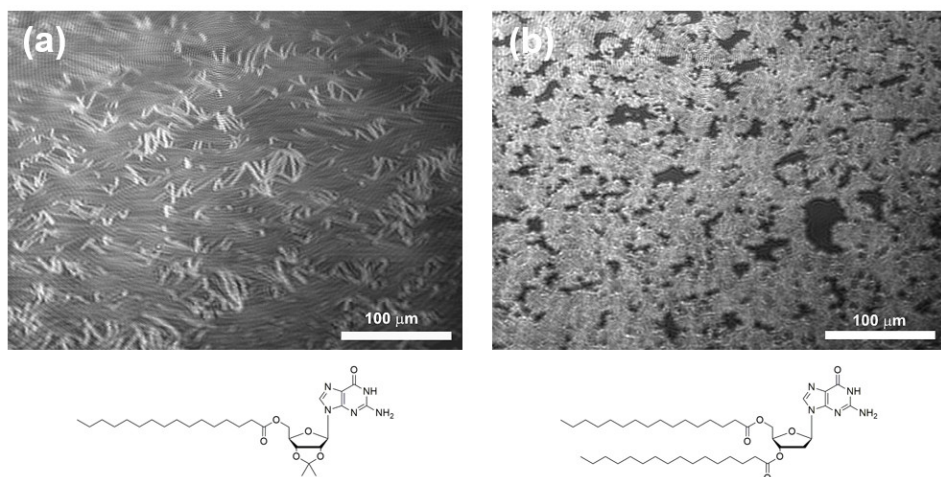


Slika 4. Shema orientacije alifatskega repa glede na vodno gladino. Vodna gladina je vzporedna z ravnino xy .

dolgimi alifatskimi verigami: palmitinske, stearinske in arašidne. Čeprav je debelina filmov le okoli 2 nm, je kontrast slike izjemno dober. Črna oz. najtemnejša območja ustrezajo vodni površini praktično brez površinskega nanosa, svetlejša območja pa domenam kondenziranega površinskega sloja. Že majhna sprememba v strukturi amfifilne molekule lahko vodi do vidnih sprememb v morfologiji filma. Iz slike 3 je razvidno, da se z daljšanjem alkilne verige spreminja oblika domen in mej med njimi. Tako dobimo bolj ukrivljene domene pri palmitinski kislini, ravne in žagaste domene pri stearinski kislini ter meandrične domene pri arašidni kislini.

Domenska struktura, ki se kaže v različnih odtenkih sive barve, je posledica nehomogene orientacije hidrofobnih repov. Medtem ko je zenitni kot Θ za vse domene bolj ali manj enak, pa se azimutni kot φ od domene do domene močno spreminja (slika 4). Zaradi tega se od domene do domene spreminja tudi orientacija optičnih osi in s tem vrednost efektivnega lomnega količnika za TM polarizirano svetlobo. Posledično nekatere domene odbijajo več, druge pa manj svetlobe.

Za pripravo Langmuirjevih filmov lahko poleg maščobnih kislin uporabimo tudi številne druge molekule. Zanimiv primer so nukleozidi DNK, pri katerih amfifilno naravo dosežemo tako, da na sladkorno skupino (deoksiri-



Slika 5. BAM posnetka Langmuirjevih filmov gvanozinskih derivatov z eno (a) in z dvema (b) alifatskima verigama. Posnetek (a) je narejen na območju fazne koeksistence med kapljevinsko ekspanzirano in kapljevinsko kondenzirano fazo, posnetek (b) pa na območju kapljevinske ekspanzirane faze.

boza) pripravimo eno ali več alifatskih verig. Na sliki 5 sta prikazana BAM posnetka Langmuirjevih filmov derivatov gvanozina z dodatkom ene in dveh alifatskih verig s 16 ogljikovimi atomi. Razberemo lahko, da je molekulska organizacija derivata z eno verigo povsem drugačna kot pri derivatu z dvema verigama, kar je posledica različnega razmerja med hidrofilno (nukleinska baza) in hidrofobno izrazitostjo molekule (ena ali dve hidrofobni verigi) [8].

Tanke plasti nukleozidov DNK so zanimive predvsem zaradi njihove sposobnosti selektivne vezave na različne biološko pomembne molekule. Če vodni podfazi, na površini katere je Langmuirjev film zgoraj opisanih derivatov gvanozina, dodamo vodotopni derivat citozina, se zaradi specifične interakcije med nukleozidoma medsebojna organizacija molekul v filmu in s tem tudi oblika izoterme $\Pi(A_1)$ lahko močno spremeni. Langmuirjeve filme modificiranih nukleozidov DNK zato lahko uporabimo kot zelo občutljive senzorje za zaznavanje komplementarnega nukleozida v vodni raztopini [9].

Sklep

Zaradi razcveta nanotehnologije, ki smo mu priča v zadnjih desetletjih, se uporaba tehnike BAM širi na vedno bolj raznolika področja. Vzporedno s tem se razvijajo tudi novi načini mikroskopiranja, ki zmogljivosti BAM še

povečujejo. Nedavne raziskave so pokazale, da je kontrast BAM posnetkov možno znatno povečati, če Langmuirjevemu filmu dodamo molekule, ki absorbirajo svetlobo pri valovni dolžini laserskega sevanja, ki ga uporabljamo za osvetljevanje filma [10]. Pred kratkim so se pojavile tudi komercialne BAM naprave z alternativnim sistemom osvetljevanja, pri katerem je objektiv orientiran pravokotno na površino, zaradi česar ni več treba slikati po pasovih, ampak lahko celotno sliko v običajni video-resoluciji (20–35 posnetkov na sekundo) zajamemo naenkrat [11, 12]. To odpira nove možnosti za analizo dinamičnih pojavov v Langmuirjevih filmih, kot so na primer procesi, povezani s kemičnimi reakcijami, ali pa svetlobno-inducirani strukturni prehodi. Zato boste o BAM zelo verjetno slišali tudi še kdaj potem, ko bo svetovno leto svetlobe že za nami.

LITERATURA

- [1] M. Spencer, *Fundamentals of Light Microscopy*, Cambridge University Press, UK, 1982.
- [2] J. Mertz, *Introduction to Optical Microscopy*, Roberts and Company Publishers, Boulder, USA, 2010.
- [3] S. Hénon in J. Meunier, *Microscope at the Brewster angle: Direct observation of first-order phase transitions in monolayers*, Rev. Sci. Instrum. **62** (1991), 936–939.
- [4] D. Hömig in D. Möbius, *Direct visualization of monolayers at the air-water interface by Brewster angle microscopy*, J. Phys. Chem. **95** (1991), 4590–4592.
- [5] J. Meunier, *Why a Brewster angle microscope?*, Colloids Surf. A **171** (2000), 33–40.
- [6] R. Guenther, *Modern Optics*, John Wiley & Sons, New York, 1990, str. 72 in str. 109.
- [7] A. Marin, *BAM slike monoslojev maščobnih kislin*, magistrsko delo, Univerza v Ljubljani, 2015.
- [8] L. Čoga, S. Masiero in I. Drevenšek-Olenik, *Lamellar versus compact self-assembly of lipopoguanosine derivatives in thin surface films*, Colloids Surf. B **121** (2014), 114–121.
- [9] W. Miao, X. Du in Y. Liang, *Molecular recognition of 1-(2-Octadecyloxyethyl) cytosine monolayers to guanosine at the air-water interface investigated by infrared reflection-absorption spectroscopy*, J. Phys. Chem. B **107** (2003), 13636–13642.
- [10] J. J. Giner-Casares in G. Brezesinski, *Current microscopy contributions to advances in science and technology*, Vol. 2, ur. A. Méndez-Vilas, Formatex Research Center, Badajoz, Spain, 2012.
- [11] C. Lhevender, S. Hénon, R. Mercier, G. Tissot, P. Fournet in J. Meunier, *A new Brewster angle microscope*, Rev. Sci. Instrum. **69** (1998), 1446–1450.
- [12] http://accurion.com/thin-film-characterization-imaging-ellipsometry/nanofilm_ultrabam, ogled 25. 5. 2015.