

## Ćwiczenie nr XIX

# OKREŚLANIE MORFOLOGII MONOWARSTW LANGMUIRA NA GRANICY FAZ CIECZ–GAZ

## I. Cel ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest określenie morfologii monowarstw Langmuira utworzonych przez wybrane lipidy błonowe na granicy faz woda-powietrze przy użyciu mikroskopu kąta Brewstera.

## II. Zagadnienia wprowadzające

1. Lipidy błonowe – budowa i klasyfikacja.
2. Metody otrzymywania modelowych błon biologicznych.
3. Monowarstwy Langmuira.
4. Wyznaczanie napięcia i ciśnienia powierzchniowego metodą płytki Wilhelmy’ego.
5. Wyznaczanie izoterm  $\pi - A$ .
6. Współczynnik załamania światła i kąta Brewstera.
7. Zasada działania mikroskopu kąta Brewstera.
8. Zastosowania mikroskopii kąta Brewstera.

### Literatura obowiązuja:

1. Wykład, *Modelowe błony biologiczne. Otrzymywanie, charakterystyka i zastosowania*.
2. A. Chyla, *Warstwy Langmuira-Blodgett i ich zastosowanie w elektronice molekularnej*, Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław, 2004.
3. M. Bryszewska, W. Leyko, *Biofizyka dla biologów*, PWN Warszawa, 1997.
4. E. T. Dutkiewicz, *Fizykochemia powierzchni*, WNT Warszawa, 1998.
5. Ćwiczenie nr XVII, część teoretyczna, rozdz. III.1. <http://www.katedrachf.umcs.lublin.pl>
6. Ćwiczenie nr XVIII, część teoretyczna, <http://www.katedrachf.umcs.lublin.pl>
7. KSV NIMA LB Software Manual v1.6
8. <https://accurion.com/thin-film-characterization/products/nanofilm-ultrabam>

## III. Część teoretyczna

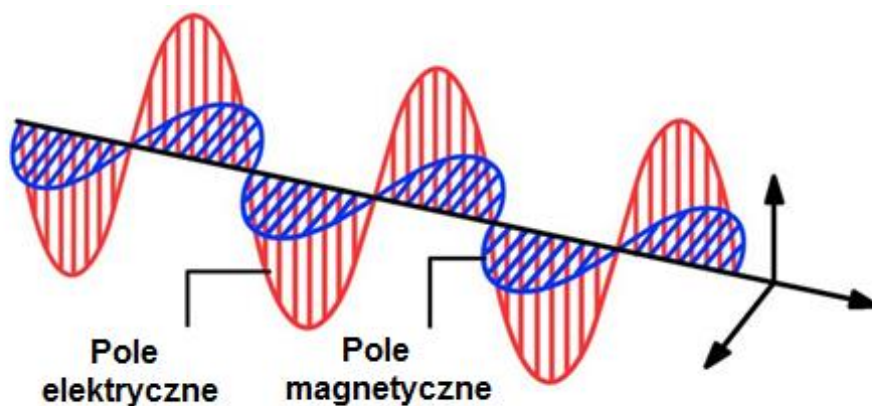
### III. 1. Mikroskopia kąta Brewstera – Wprowadzenie

Zjawisko odbicia światła od różnych powierzchni jest częścią naszego codziennego życia. Jednakże jedną z zaskakujących właściwości optycznych jest możliwość uzyskania takich warunków, w których nie obserwuje się odbicia. Dzieje się tak dla idealnie czystej granicy faz, na którą pada promieniowanie  $p$ -spolaryzowane pod określonym kątem, zwanym **kątem Brewstera**. Każda zmiana właściwości optycznych w obszarze międzyfazowym będzie prowadzić do odbicia promieniowania padającego. Ten fakt stanowi podstawę **mikroskopii kąta Brewstera** (z ang. *Brewster Angle Microscopy*, **BAM**), nowoczesnej techniki służącej do badania nanofilmów na granicy faz woda-powietrze oraz na powierzchni przezroczystych nośników dielektrycznych.

Obecność monowarstwy związku na granicy faz sprawia, że prawo Brewstera nie jest spełnione i pokryta część powierzchni subfazy odbija światło, choć z małą intensywnością. Zwiększając natężenie promieniowania można uwydatnić kontrast pomiędzy pokrytą i niepokrytą powierzchnią za pomocą detektora CCD, uzyskując wysokokontrastowe obrazy morfologii warstwy.

### III. 2. Prawo Brewstera

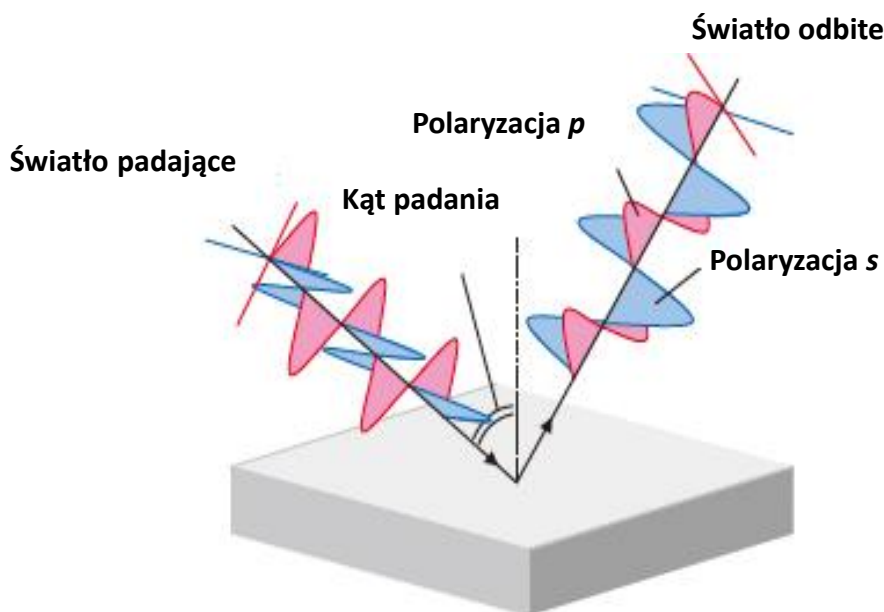
Światło to fala elektromagnetyczna, której źródłem może być Słońce – źródło naturalne, jak i źródła sztuczne (lampa, laser). W czasie rozchodzenia się światła wektory pola elektrycznego i magnetycznego są prostopadłe względem siebie, jak i względem kierunku rozchodzenia się fali (Rys. 1).



**Rys. 1.** Schemat rozchodzenia się fali elektromagnetycznej.

Światło padając na płaską powierzchnię dielektryka (woda, szkło) ulega odbiciu i częściowej polaryzacji (Rys. 2). W przypadku światła o polaryzacji  $p$  wektory pola elektrycznego są równoległe do płaszczyzny padania promieni świetlnych, zaś w przypadku światła

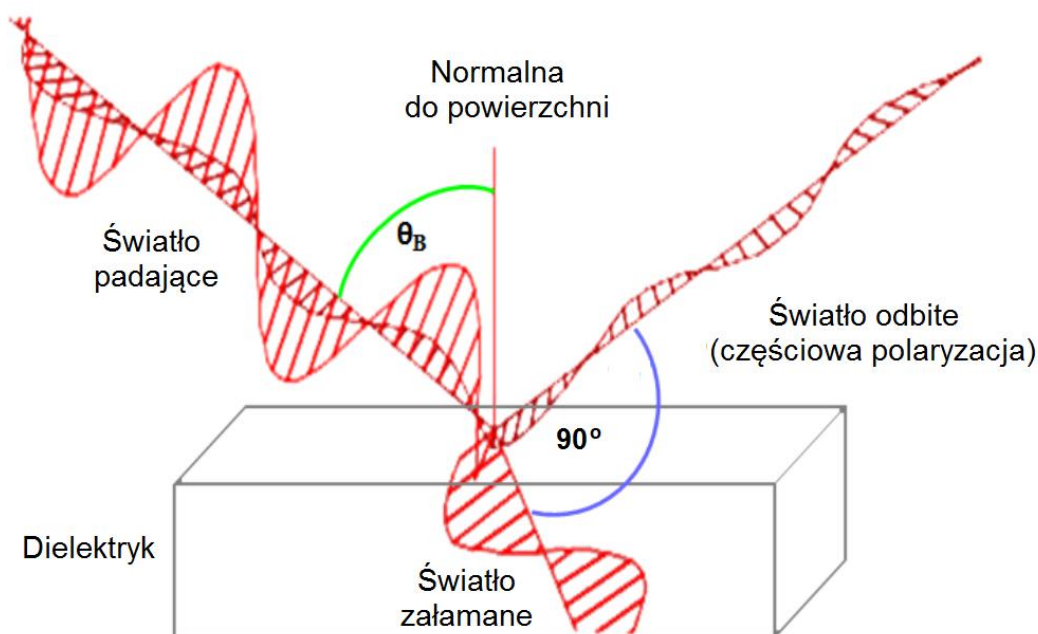
o polaryzacji s wektory pola elektrycznego są prostopadłe do płaszczyzny padania promieni świetlnych.



**Rys. 2.** Polaryzacja światła na skutek odbicia od płaskiej powierzchni dielektryka [[www.global-optosigma.com](http://www.global-optosigma.com)].

Uważa się, że jako pierwszy zjawisko polaryzacji odkrył i opisał w XIX wieku szkocki fizyk, matematyk i astronom Sir **David Brewster**. Dzięki przeprowadzonym doświadczeniom, zauważył, że światło niespolaryzowane, które pada na powierzchnię pod pewnym kątem, tzw. **kątem Brewstera** ulegając odbiciu zostaje spolaryzowane, a kąt zawarty pomiędzy promieniowaniem odbitym i załamanym wynosi  $90^\circ$  (Rys. 3). Ta właściwość światła odbijającego się od powierzchni dielektryków dała początek nieinwazyjnej technice obrazowania zwanej od nazwiska twórcy tej teorii, **mikroskopią kąta Brewstera**.

Na Rysunku 3 zaznaczono kąt Brewstera pomiędzy promieniem światła padającego na powierzchnię, a normalną (linią prostopadłą do powierzchni, od której odbija się promień światła), oraz kąt między promieniowaniem odbitym a załamanym, który wynosi  $90^\circ$ . Zazwyczaj kierunek wektora pola elektrycznego wpływa na kąt, pod jakim światło ulega polaryzacji. Na rysunku widać, że wektory pola elektrycznego promieni odbitych są równoległe do płaszczyzny, od której się odbiły oraz prostopadłe do płaszczyzny padania promieniowania niespolaryzowanego – polaryzacja s. Ze zjawiskiem polaryzacji p mamy do czynienia, gdy wektory pola elektrycznego światła odbitego drgają w płaszczyźnie prostopadłej do powierzchni, od której uległy odbiciu.



**Rys. 3.** Schemat polaryzacji światła odbitego od powierzchni dielektryka.

Kiedy wiązka światła przechodzi przez granicę pomiędzy dwoma ośrodkami różniącymi się współczynnikiem załamania światła, część promieniowania ulega odbiciu. Na Rysunku 4 pokazano zależność wartości współczynnika odbicia –  $R$ , światła o polaryzacji  $p$  i  $s$  od kąta padania światła –  $\theta_i$ , na granicy Fresnela między powietrzem a wodą. Granica Fresnela występuje pomiędzy dwoma dielektrykami, np.: powietrzem i wodą, które charakteryzują się różnym współczynnikiem załamania światła –  $n$ , odpowiednio  $n_1 = 1$  i  $n_2 = 1,33$ , gwałtownie zmieniającym się w zakresie od  $n_1$  do  $n_2$ .

Współczynnik odbicia światła  $p$ - i  $s$ -spolaryzowanego oblicza się wg równań Fresnela (1) i (2):

$$R_p = \left( \frac{\tan(\theta_i - \theta_r)}{\tan(\theta_i + \theta_r)} \right)^2 \quad (1)$$

$$R_s = \left( \frac{\sin(\theta_i - \theta_r)}{\sin(\theta_i + \theta_r)} \right)^2 \quad (2)$$

oraz Snella (3):

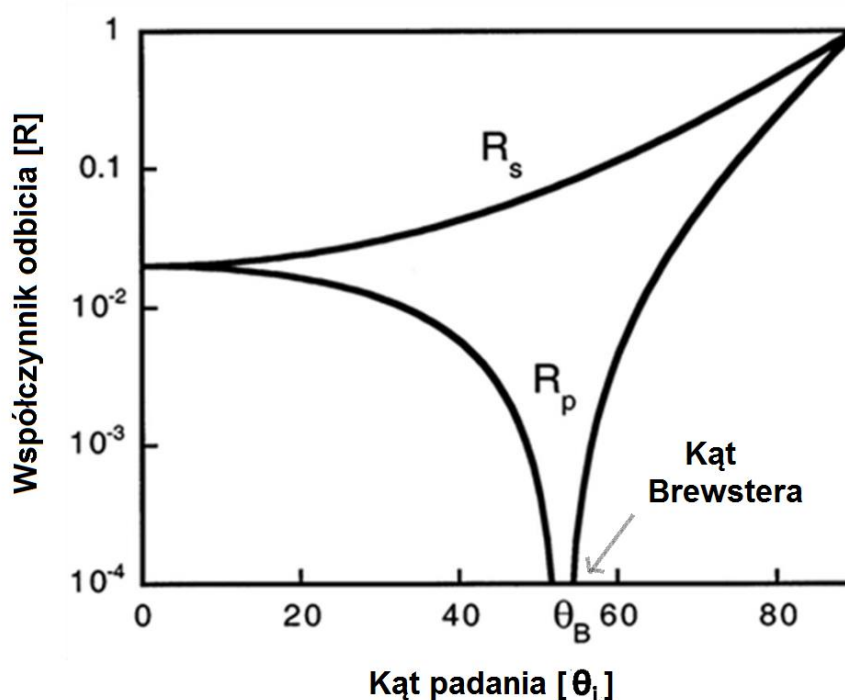
$$n_1 \sin \theta_i = n_2 \sin \theta_r \quad (3)$$

gdzie:  $\theta_i$  – kąt padania promieni świetlnych,

$\theta_r$  – kąt załamania promieni świetlnych,

$n_1$  – współczynnik załamania światła ośrodka 1-szego (zazwyczaj powietrza,  $n_1 = 1$ ),

$n_2$  – współczynnik załamania światła ośrodka 2-giego (np.: wody,  $n_2 = 1,33$ ).



**Rys. 4.** Współczynnik odbicia ( $R$ ) od ostrej granicy międzyfazowej w funkcji kąta padania dla światła o polaryzacji  $p$  (w płaszczyźnie padania) oraz  $s$  (prostopadle do płaszczyzny padania) [Colloid Surf. A 171, 2000, 33-40].

Na Rysunku 4 można zauważyć, że w przypadku światła o polaryzacji  $s$  wraz ze zwiększaniem wartości kąta padania –  $\theta_i$  wzrasta wartość  $R_s$  do wartości 1. Natomiast światło  $p$ -spolaryzowane zachowuje się odmiennie, ponieważ początkowo zwiększaniu kąta padania promieni świetlnych towarzyszy spadek wartości  $R_p$  do 0. Dalsze zwiększanie kąta padania promieni powoduje wzrost  $R_p$  do wartości 1. Kąt padania, dla którego nie obserwuje się zjawiska odbicia promieni świetlnych  $p$ -spolaryzowanych to **kąt Brewstera**. Dzieje się tak, gdy wiązka promieni odbitych jest prostopadła do wiązki promieni załamanych na granicy dwóch ośrodków dielektrycznych (powietrze/woda).

Teoretycznie w przypadku, gdy światło  $p$ -spolaryzowane pada pod kątem Brewstera na granicę Fresnela między badanymi dielektrykami, nie obserwuje się zjawiska odbicia promieni świetlnych, a więc promieniowanie odbite od ostrej (tzw. *fresnelowskiej*) granicy międzyfazowej jest całkowicie wygaszane (Rys. 4). Sytuacja ta odnosi się do idealnie ostrej, pozbawionej chropowatości granicy pomiędzy dwoma przezroczystymi ośrodkami, pomiędzy którymi współczynnik załamania światła zmienia się skokowo. Natomiast w rzeczywistości zjawisko odbicia nie zanika, ale jest obserwowane w minimalnym stopniu, czyli intensywność promieniowania odbitego nie jest wygaszona całkowicie, lecz osiąga minimum ( $1,2 \cdot 10^{-8}$ ). Zanik bądź też ograniczenie występowania tego zjawiska zależy od właściwości strefy międzyfazowej, mianowicie od grubości i nierówności granicy (wywołanej fluktuacjami termicznymi) oraz anizotropii monowarstwy.

Dokonując odpowiednich przekształceń podanych powyżej wzorów oraz wykorzystując zależność:

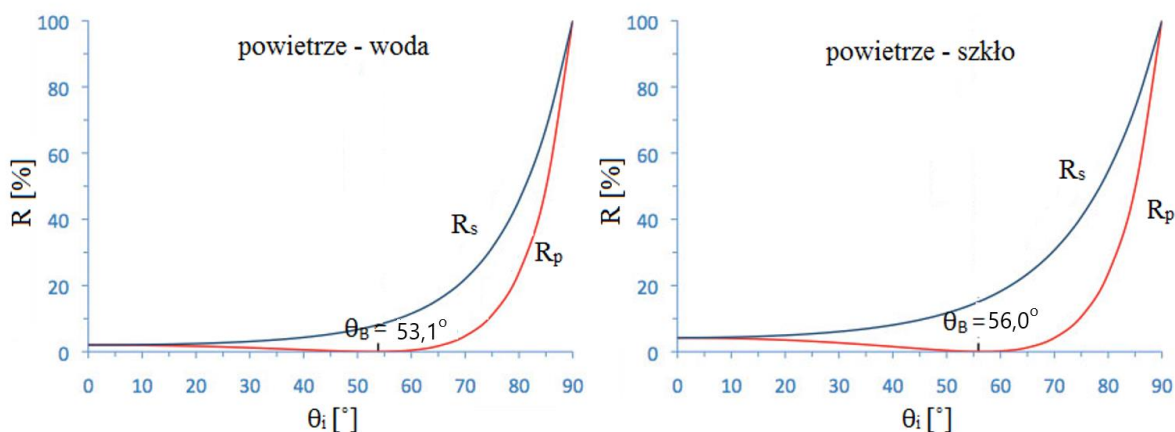
$$\theta_i + \theta_r = 90^\circ \quad (4)$$

kąt Brewstera ( $\theta_i = \theta_B$ ) można wyznaczyć znając współczynniki załamania światła ośrodków, na które pada wiązka promieni świetlnych wg równań (5) i (6):

$$\tan\theta_B = \frac{n_2}{n_1} \quad (5)$$

$$\theta_B = \arctan \frac{n_2}{n_1} \quad (6)$$

Kąt Brewstera przyjmuje inną wartość na granicach między różnymi ośrodkami. Wynika to z odmiennych wartości współczynnika załamania światła  $n$  w tych ośrodkach. W związku z tym, inaczej rozkładają się wartości współczynnika odbicia  $R$ , w zależności od kąta padania światła  $\theta_i$ , co przedstawiono na wykresach obrazujących tę zależność na granicy powietrze/woda i powietrze/szkło (Rys. 5).

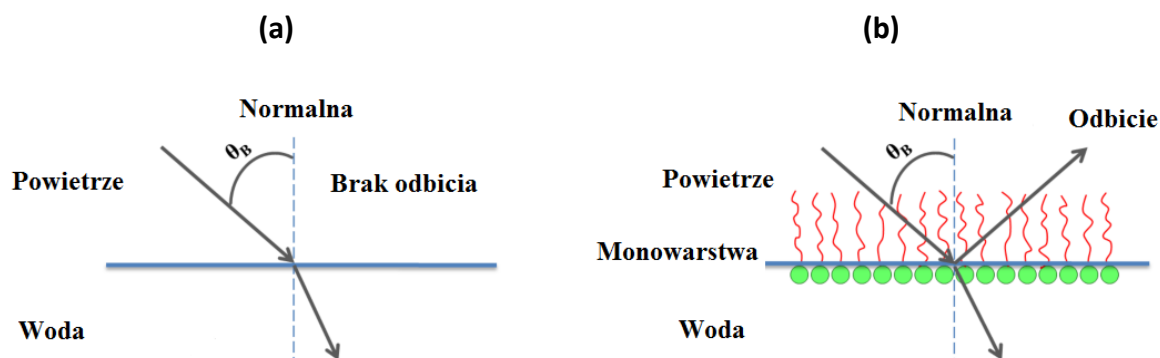


**Rys. 5.** Wartość kąta Brewstera dla granic Fresnela między różnymi ośrodkami [[www.cameratechnica.com](http://www.cameratechnica.com)].

### III. 3. Zasada działania mikroskopu kąta Brewstera

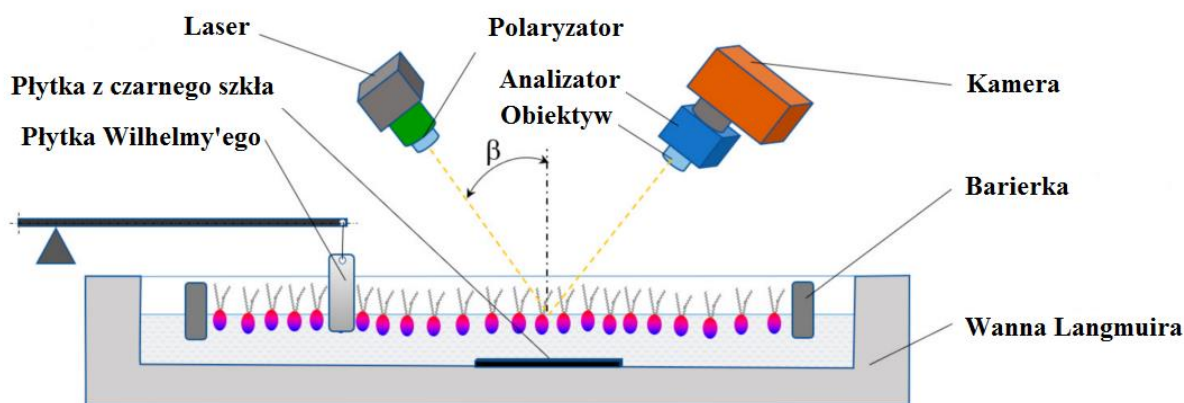
Podstawą mikroskopii BAM jest wykorzystanie kąta Brewstera oraz właściwości światła  $p$ -spolaryzowanego padającego na granicę między dwoma ośrodkami pod tym kątem. Ponieważ nie obserwuje się wtedy zjawiska odbicia promieni świetlnych, bądź też zjawisko to jest ograniczone, jako obraz uzyskuje się pole zaciemnione (Rys. 6 a). Gdy na granicy faz umieści się film będący jedną warstwą cząsteczek, zmienia się współczynnik refrakcji i część padających promieni ulega odbiciu (Rys. 6 b).

Utworzenie monowarstwy substancji amfifilowej na powierzchni wody powoduje niewielką zmianę wartości kąta Brewstera wskutek pojawienia się dodatkowej cienkiej warstwy o współczynniku załamania światła innym niż dla powietrza i wody, co prowadzi do zwiększenia intensywności promieniowania odbitego. Na przykład, obecność na granicy faz woda/powietrze monowarstwy o grubości  $10 \text{ \AA}$  i współczynniku załamania światła 1,4, przyczynia się do około 35-krotnego zwiększenia współczynnika odbicia. Intensywność promieniowania odbitego jest zatem wysoce zależna od właściwości granicy międzyfazowej.



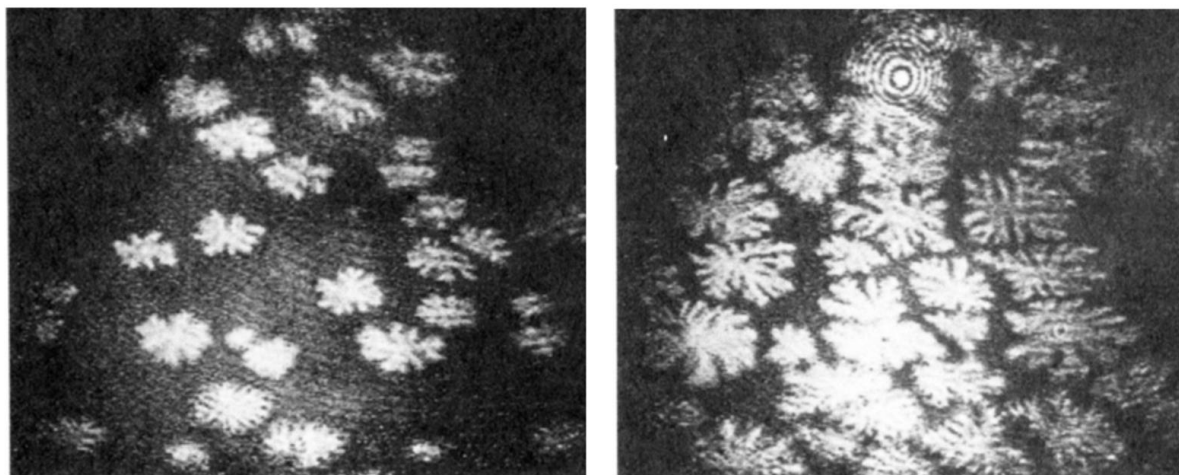
**Rys. 6.** Schemat zasady działania mikroskopu kąta Brewstera.

Na Rysunku 7 zobrazowano schematycznie zasadę działania mikroskopu BAM wraz z wyszczególnieniem podstawowych elementów optycznych przyrządu. Typowy zestaw do mikroskopii BAM składa się ze źródła światła, polaryzatora, obiektywu, analizatora i detektora. Jako źródło światła można użyć laser helowo - neonowy bądź argonowy. W większości mikroskopów BAM źródłem promieniowania świetlnego jest laser o długości fali 532 nm. Typowym detektorem jest kamera CCD, którą stanowi światłoczuła płytka krzemowa.



**Rys. 7.** Schemat prezentujący podstawowe elementy budowy mikroskopu oraz zasadę jego działania [Int. J. Mol. Sci. 22, 2021, 4729].

W celu uzyskania obrazu monowarstwy oświetla się ją z dużą intensywnością pod kątem Brewstera (który dla granicy faz woda-powietrze wynosi  $53^\circ$ ), za pomocą wiązki promieni laserowych o polaryzacji  $p$ . Odbite od filmu powierzchniowego promieniowanie kierowane jest poprzez obiektyw do czułej kamery, z której obraz jest przekazywany do komputera i na ekran monitora. Za pomocą współcześnie używanych mikroskopów BAM można obserwować fragment monowarstwy o wymiarach ok.  $0,5 \times 0,5 \text{ mm}^2$  z wysoką rozdzielczością  $2 \mu\text{m}$  w czasie rzeczywistym. Obserwowany obraz przedstawia obszary o różnej jasności, co jest wynikiem obecności poszczególnych molekuł oraz stopnia ich upakowania w analizowanym filmie. Pierwsze zdjęcia monowarstw Langmuira wykonane przy użyciu mikroskopu BAM przedstawiono na Rysunku 8.



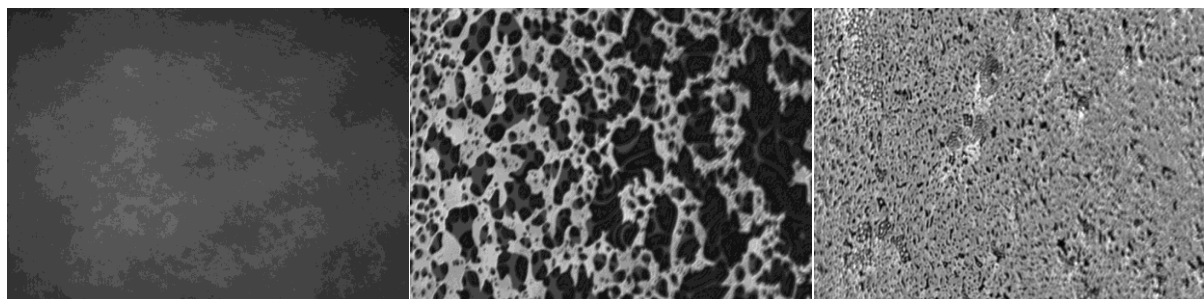
**Rys. 8.** Pierwsze obrazy fosfolipidowych monowarstw Langmuira wykonane przez Höniga i Möbiusa w 1991 roku [*J. Phys. Chem.* 95, 1991, 4590].



### III. 4. Zastosowanie mikroskopii kąta Brewstera

Mikroskopia BAM stanowi doskonałe narzędzie do obserwacji:

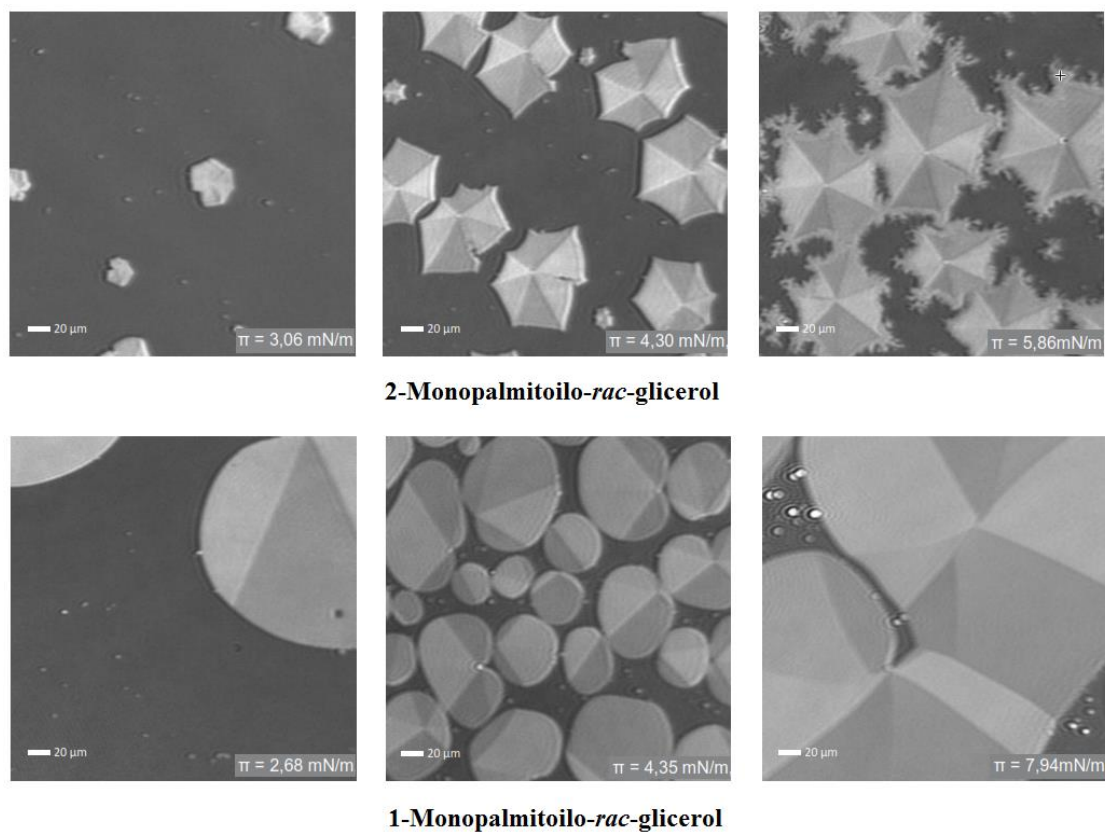
- stanu fizycznego monowarstw dwuwymiarowych (Rys. 9)



**gaz → ciecz rozprężona/ciecz skondensowana → faza stała**

**Rys. 9.** Monowarstwy 1,2-dipalmitoilo-*sn*-glicero-3-fosfoglicerolu (DPPG).

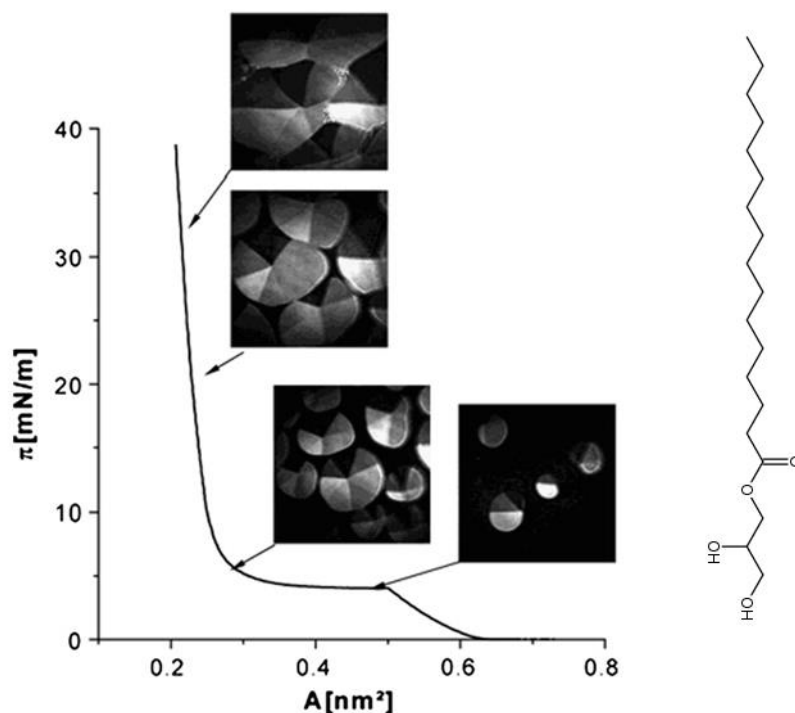
- stopnia uporządkowania i upakowania filmu w poszczególnych fazach kompresji, przy różnych ciśnieniach powierzchniowych (Rys. 10)



**Rys. 10.** Monowarstwy 2-monopalmitoilo-*rac*-glicerolu oraz 1-monopalmitoilo-*rac*-glicerolu przy różnych ciśnieniach powierzchniowych [[www accurion.com](http://www accurion.com)].

- cech morfologicznych monowarstw podczas kompresji/dekompresji, np. powstawania i wzrostu domen (Rys. 11)

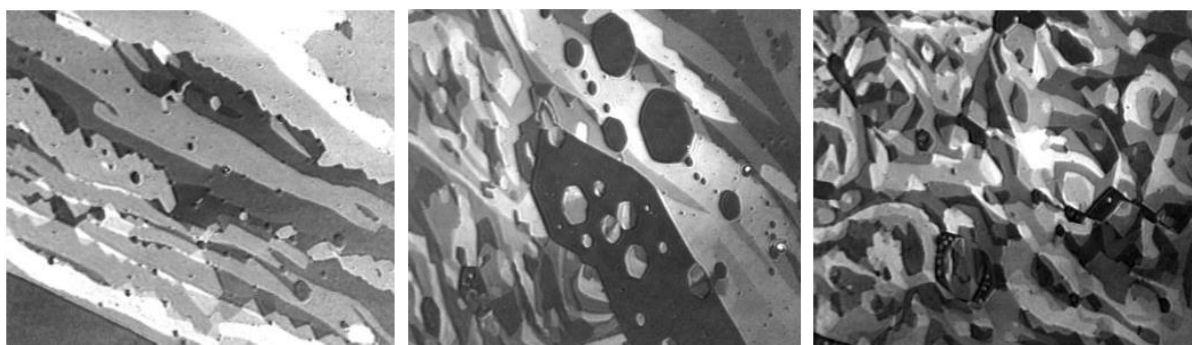
Badania morfologii monowarstw prowadzą do głębszego zrozumienia dwuwymiarowej struktury ich fazy skondensowanej. Dużą zaletą jest możliwość bezpośredniej obserwacji w czasie rzeczywistym, bez dodatku barwników i bez konieczności przenoszenia filmów na stały nośnik. W wielu publikacjach obrazy BAM są zestawiane bezpośrednio z izotermą  $\pi - A$  (Rys. 11). Do tego typu badań konieczne jest zintegrowanie oprogramowania mikroskopu i wanny Langmuira.



**Rys. 11.** Wzrost domen w miarę kompresji monowarstwy 1-monopalmitoilo-*rac*-glicerolu w 23°C [*Curr. Opinion Colloid Interface Sci.* 19, 2014, 183-197].

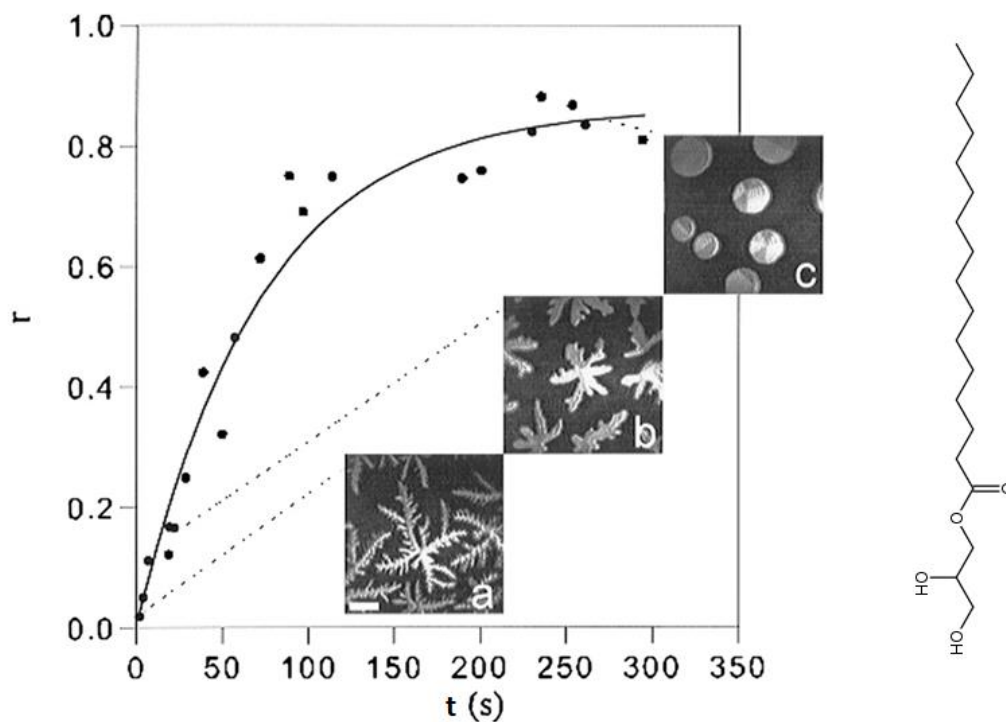
- wewnętrznej struktury dwuwymiarowych domen fazy skondensowanej (Rys. 12)

Mikroskopia kąta Brewstera jest efektywną metodą do wizualizowania anizotropii optycznej monowarstw indukowanej przez obszary o różnej orientacji łańcuchów alkilowych. Przykładem może być monomolekularny film stearynianu etylu pokazany na Rysunku 12.



**Rys. 12.** Monowarstwa stearynianu etylu przy  $\pi < 1$  mN/m. Pole widzenia  $600 \mu\text{m}^2$   
[\[www.accurion.com\]](http://www.accurion.com).

– zmiany kształtu domen w czasie (Rys. 13)

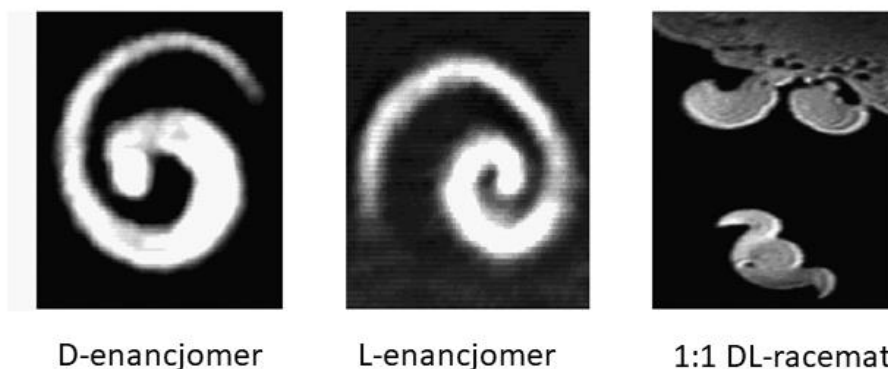


**Rys. 13.** Diagram prezentujący zmianę kulistości domen ( $r$ ) w funkcji czasu ( $t$ ) w monowarstwach 1-monopalmitoil-3-*sn*-glicerolu. Po zatrzymaniu kompresji monowarstwy w obszarze *plateau* na izotermie  $\pi$ -A ( $A=0,38 \text{ nm}^2/\text{cząsteczkę}$ ,  $T = 23^\circ\text{C}$ ) obecne są trzy typy relaksacyjnych domen [\[Curr. Opinion Colloid Interface Sci. 19, 2014, 183-197\]](#).

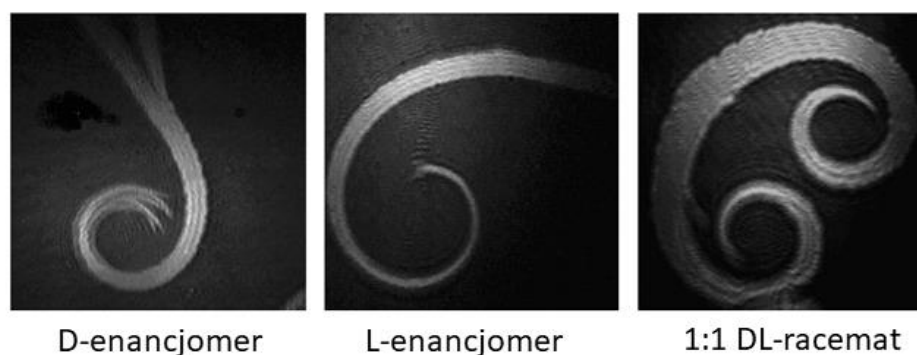
- chiralnego zróżnicowania domen fazy skondensowanej (Rys. 14 i 15)

Monowarstwy enancjomerów cząsteczek amfifilowych różnią się. W zależności od rodzaju enancjomeru wyróżnia się domeny lewo- lub prawoskrętne.

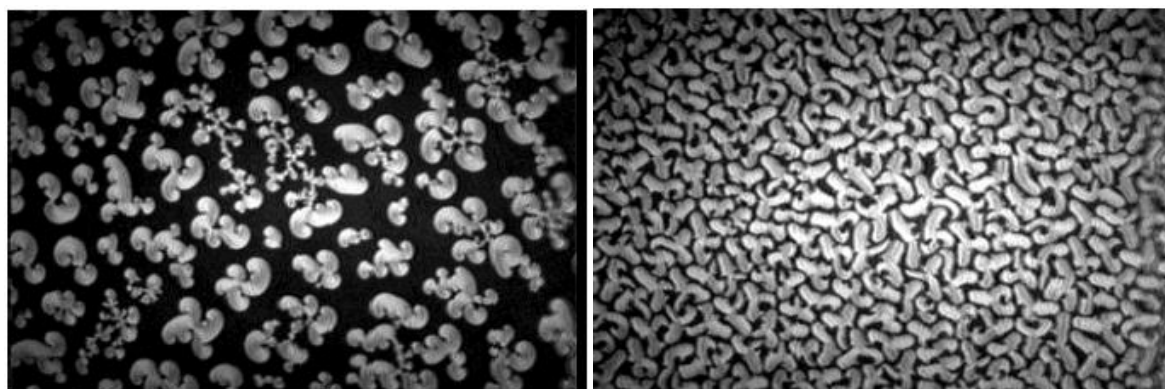
#### Ester metylowy N-stearoiloseryny



#### N- $\alpha$ -palmitoilotreonina

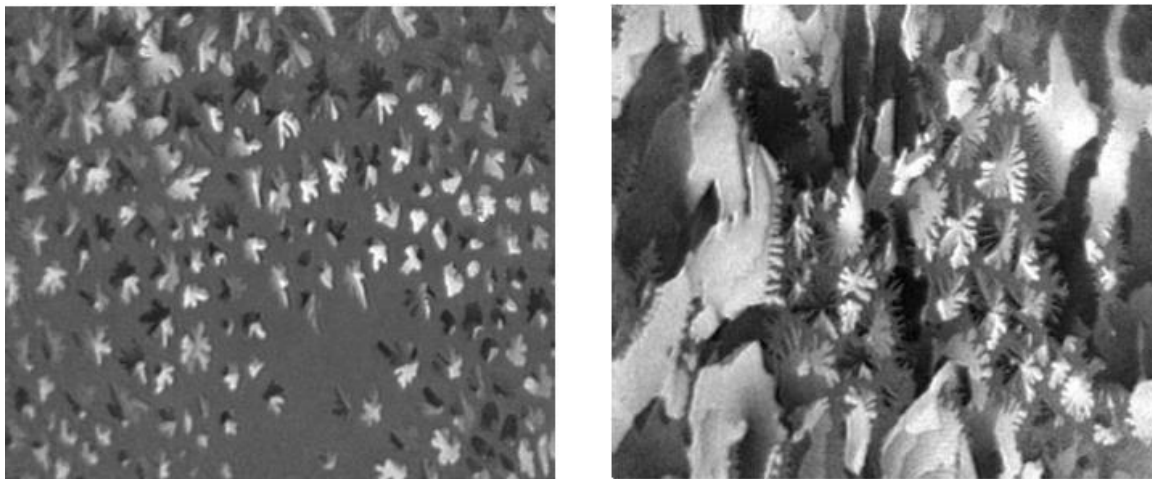


**Rys. 14.** Chiralne zróżnicowanie domen fazy skondensowanej amfifilowych aminokwasów. Rozmiar obrazu 60x60  $\mu\text{m}$  (góra) oraz 300x300  $\mu\text{m}$  (dół) [*Phys. Chem. Chem. Phys.* 13, 2011, 4812-4829].



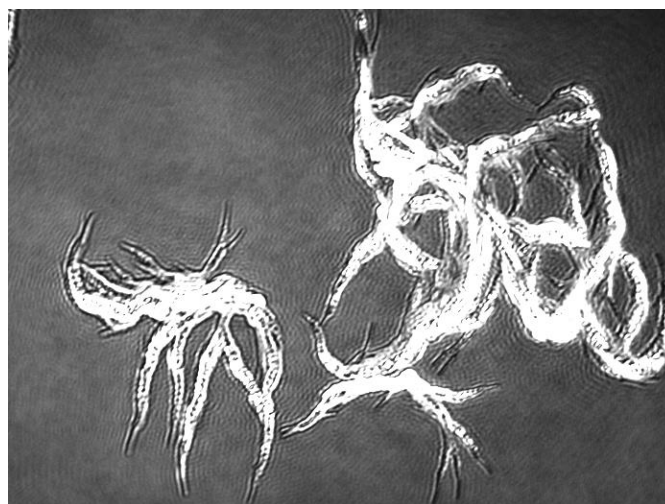
**Rys. 15.** Chiralne zróżnicowanie domen fazy skondensowanej D-dipalmitoilo-*sn*-glicero-3-fosfocholiny (D-DPPC) i racematu (DL-DPPC) [[www.accurion.com](http://www.accurion.com)].

- przebieg fazy, wykrywania przemian fazowych (Rys. 16)



**Rys. 16.** Monowarstwa 1,2-dimyristoilo-*sn*-glicero-3-fosfoetanolaminy (DMPE) podczas przejścia fazowego I rzędu (LE-LC) [[www.accurion.com](http://www.accurion.com)].

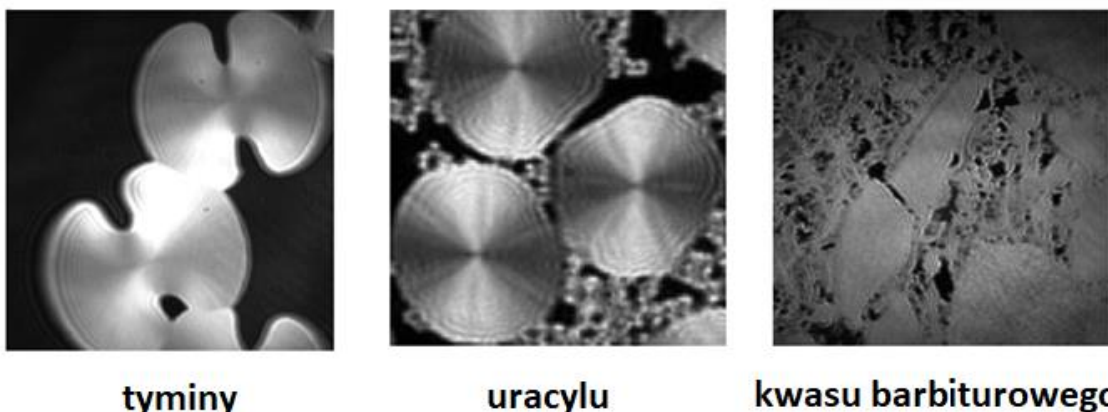
- transformacji monowarstw w struktury wielowarstwowe (Rys. 17)



**Rys. 17.** Monowarstwa galusanu laurylu (LG) po załamaniu.

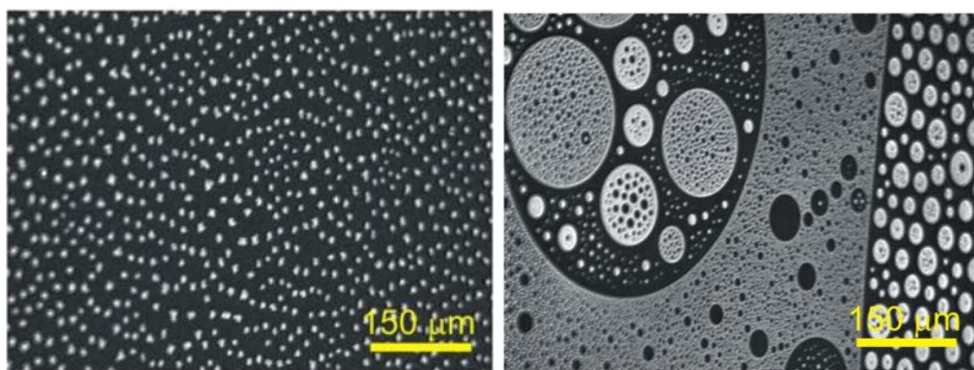
- wpływu jonów/substancji, w tym związków powierzchniowo czynnych, zawartych w fazie wodnej na właściwości filmów powierzchniowych (Rys. 18)

### Struktura domenowa monowarstw melaminy na wodnych roztworach:



**Rys. 18.** Supramolekularne struktury domenowe melaminy na wodnych roztworach tyminy, uracylu i kwasu barbiturowego [*Phys. Chem. Chem. Phys.* 13, 2011, 4812-4829].

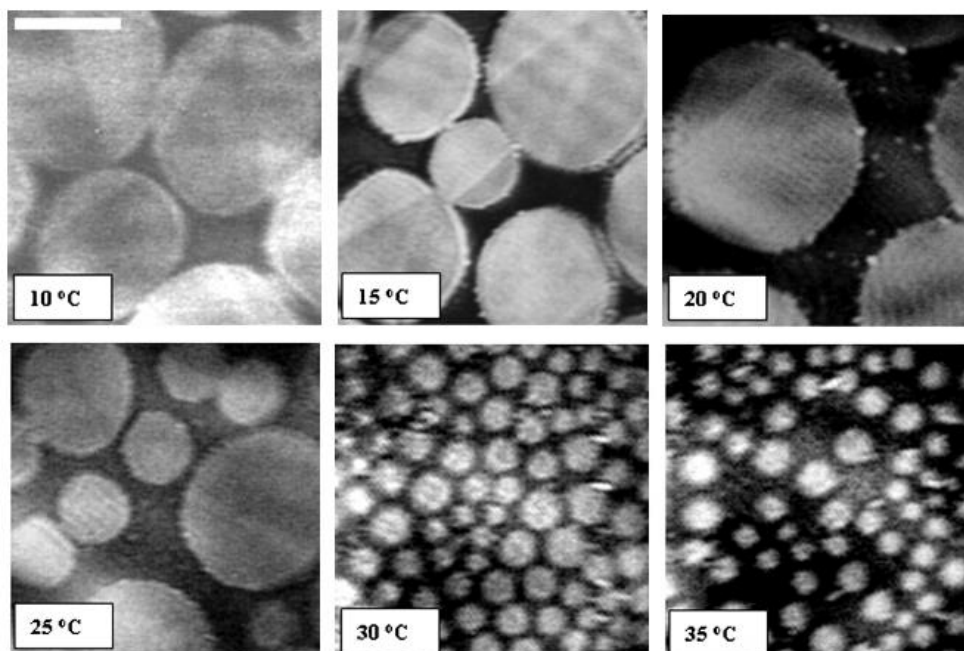
- separacji faz lub częściowej mieszalności w monowarstwach i cienkich filmach (Rys. 19)



**Rys. 19.** Częściowa mieszalność w monowarstwie DPPC-DOPC (po lewej) i DPPC-DOPC-Chol (po prawej), gdzie: DPPC – 1,2-dipalmitoilo-*sn*-glicero-3-fosfocholina, DOPC – 1,2-dioleilo-*sn*-glicero-3-fosfocholina, Chol – cholesterol [*J. Membrane Biol.* 251, 2018, 277-294].

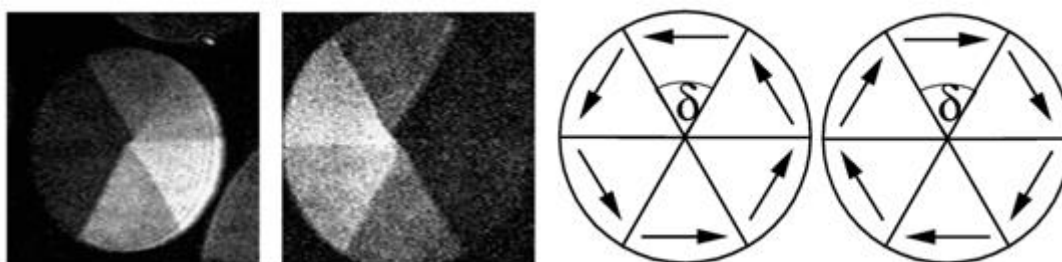
- struktur powierzchniowych w filmach adsorpcyjnych
- monowarstw utworzonych przez takie, jak: fulereny, etery koronowe, polimery czy związki metaloorganiczne nieposiadające właściwości amfifilowych

- obserwacja mikroskopowa zmian struktury monowarstw w funkcji temperatury (Rys. 20) pozwala na stworzenie diagramów fazowych substancji amfifilowych



**Rys. 20.** Wpływ temperatury na zachowanie monowarstw mirystynianu 2-hydroksyetylu. Skala 100  $\mu\text{m}$  [*Appl. Surf. Sci.* 257, 2010, 1129-1133].

- w połączeniu z innymi technikami może również służyć do oszacowania kątów nachylenia cząsteczek w poszczególnych fazach monowarstwy (Rys. 21)



**Rys. 21.** Domeny palmitynianu etylu podzielone na 6 segmentów. Obok schemat kierunku nachylenia łańcuchów alkilowych prostopadle do dwusiecznych domen [*Curr. Opinion Colloid Interface Sci.* 19, 2014, 183-197].

- daje możliwość pomiaru grubości monowarstw, jak również obserwacji rozdziału mikrofaz oraz zachowania się mono- i multiwarstw podczas ich rozpadu

## IV. Część doświadczalna

### A. Aparatura i odczynniki

#### 1. Sprzęt:

- wanna Langmuira-Blodgett KSV NIMA o powierzchni 780 cm<sup>2</sup>, wyposażona w dwie bariery i platynową płytkę Wilhelmy'ego (obwód 39,24 mm) do pomiaru ciśnienia powierzchniowego, sprzężona z komputerem,
- mikroskop kąta Brewstera Nanofilm-UltraBAM, rozdzielczość 2 μm, pole widzenia 720x400 μm<sup>2</sup>, źródło światła: laser o długości fali 658 nm i mocy 50 mW.
- stolik antywibracyjny,
- termostat Lauda,
- pompka wodna Air Liquide,
- palnik gazowy Bunsena, Labrant,
- czarna płytkę szklaną o wymiarach 40 x 30 x 4 mm<sup>3</sup>,
- buteleczki z ciemnego szkła z zakrętkami o pojemności 5 cm<sup>3</sup> – 3 szt.,
- zlewki o pojemności 50 cm<sup>3</sup> – 3 szt.,
- pipeta automatyczna z końcówką o pojemności 1 cm<sup>3</sup> – 1 szt.,
- mikrostrzykawka firmy Hamilton o pojemności 100 μL – 1 szt.,
- pęseta – 1 szt.,
- łyżeczko-szpatułka – 3 szt.

#### 2. Odczynniki:

- 1,2-dipalmitoilo-*sn*-glicero-3-fosfocholina (DPPC), ≥ 99 %,
- 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfocholina (DOPC), ≥ 99 %,
- cholesterol (Chol), ≥ 99 %,
- aceton cz.d.a.,
- metanol cz.d.a.,
- chloroform cz.d.a.,
- woda dejonizowana i demineralizowana z systemu Milli-Q o oporności 18,2 MΩcm i pH 5,6.

#### 3. Akcesoria:

- chusteczki bezpyłowe,
- rękawiczki bezpyłowe nitrylowe,
- bibuła filtracyjna,
- parafilm.

### B. Program ćwiczenia

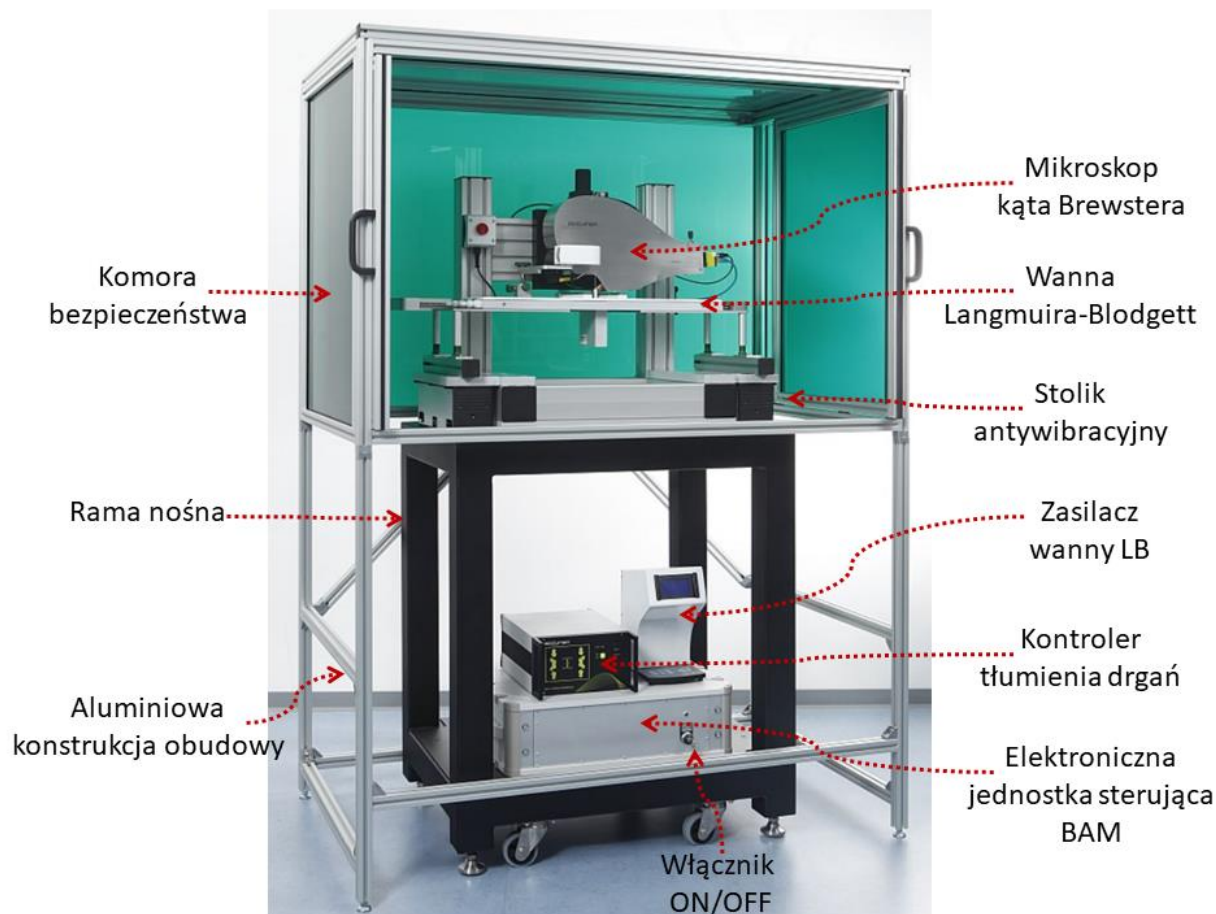
1. Sporządzenie roztworów lipidów w chloroformie.
2. Przygotowanie wanny Langmuira i mikroskopu kąta Brewstera do pomiarów.
3. Utworzenie monowarstw Langmuira badanych lipidów.
4. Obserwacja morfologii monowarstw z równoczesnym wyznaczeniem izoterm  $\pi - A$  podczas procesu kompresji symetrycznej.



5. Wykonanie zdjęć przy różnych wartościach ciśnienia powierzchniowego.

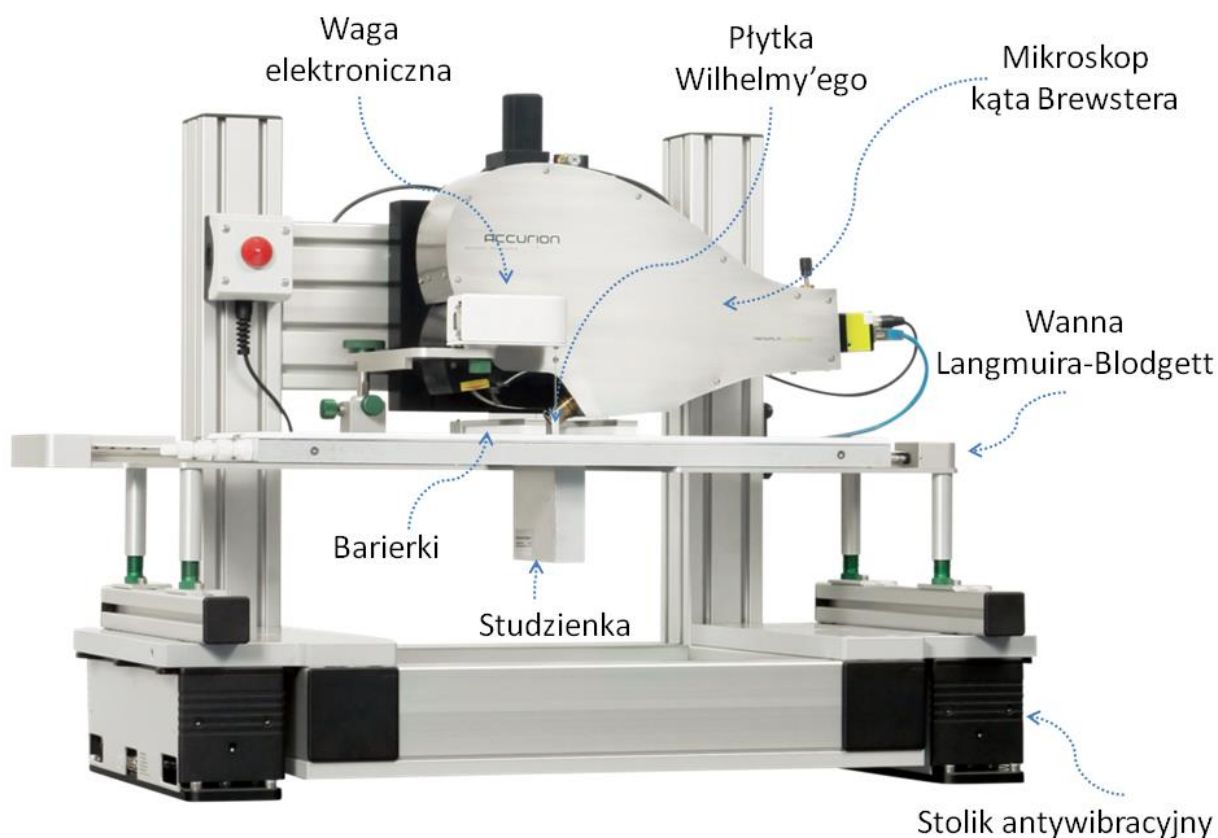
### C. Obsługa przyrządów i oprogramowania

**Mikroskop kąta Brewstera**, UltraBAM firmy ACCURION (Rys. 22 i 23), jest przyrządem sprzężonym z wanną Langmuira-Blodgett (LB) KSV NIMA i komputerem, sterowanym przy użyciu oprogramowania Nanofilm-UltraBAM. Obsługa wanny LB oraz oprogramowania KSV NIMA LB została omówiona w skrypcie do ćwiczenia **XVIII**.



**Rys. 22.** Zestaw: mikroskop kąta Brewstera Nanofilm-UltraBAM sprzężony z wanną Langmuira-Blodgett KSV NIMA, w obudowie chroniącej przed szkodliwym promieniowaniem laserowym, stabilny stół + system aktywnej izolacji wibracji, zasilacz wanny LB, elektroniczna jednostka sterująca BAM.

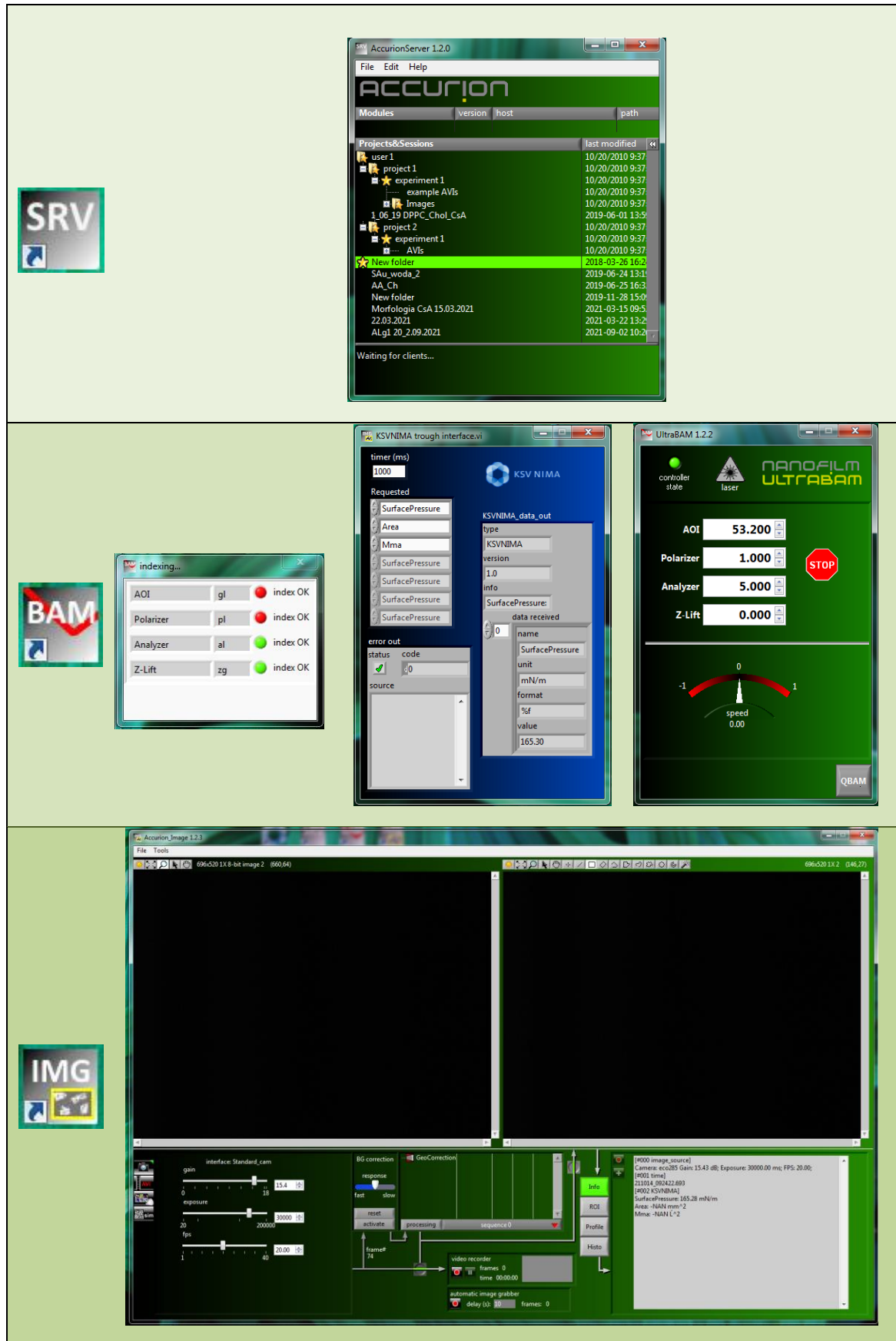
Komora spełnia funkcję ochronną przed kurzem i ruchami powietrza, jak również przed rozproszonym światłem laserowym. Długość fali promieniowania lasera mieści się w zakresie barwy czerwonej (658 nm), a kolor zielony ścianek stanowi barwę komplementarną.



**Rys. 23.** Mikroskop kąta Brewstera Nanofilm-UltraBAM sprzężony z wanną Langmuira-Blodgett KSV NIMA.

Poniżej podano poszczególne czynności, które należy wykonać:

- uruchomić komputer,
- włączyć termostat ustawiając żadaną temperaturę,
- włączyć kontroler tłumienia drgań,
- włączyć zasilacz i oprogramowanie wanny LB,
- przygotować wannę do pomiarów według wskazówek zawartych w skrypcie **XVIII**,
- włączyć elektroniczną jednostkę kontrolną BAM przekręcając włącznik (kluczyk) w pozycję ON,
- uruchomić oprogramowanie Nanofilm-UltraBAM klikając po kolei trzy ikonki, równocześnie otworzą się okna (Rys. 24):



Rys. 24. Ikony i okna oprogramowania Nanofilm-UltraBAM.



Ikonka uruchamia okno Accurion Server. Służy ono do gromadzenia danych, które są zapisywane domyślnie w aktywnym (podświetlonym na zielono) folderze.



Ikonka uruchamia okno UltraBAM, które służy do sterowania pracą poszczególnych elementów mikroskopu:

- zainicjowanie pracy lasera umożliwia kliknięcie ikony , która zostaje pod-





świetlona, etap aktywacji trwa kilka sekund,

- dobór wartości kąta padania (Brewstera, AOI), polaryzatora, analizatora oraz wysokości głowicy (z ang. *Z-lift*) od powierzchni cieczy. Wartości należy wpisać ręcznie lub ustawić przy użyciu kontrolki prędkości (z ang. *Speed control*). W drugim przypadku należy umieścić kursor myszki na wartości i przeciągnąć w lewo lub w prawo.



Ikonka uruchamia okno obrazowania Accurion Image, które pozwala na obserwację monowarstwy na granicy faz ciec-z-gaz oraz wykonywanie zdjęć powierzchni. Przed pomiarem należy dostosować parametry ekspozycji i wzmocnienia obrazu oraz liczbę klatek na sekundę względem oczyszczonej powierzchni subfazy. →→→

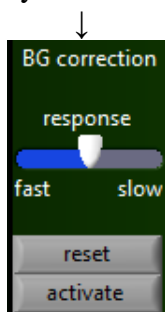
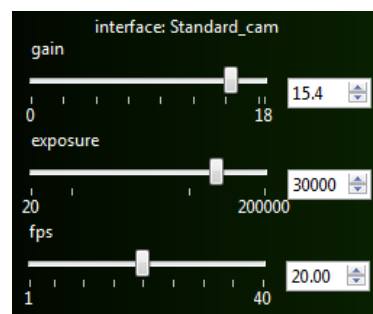
Obrazy wykonuje się przez kliknięcie , można je podej-

rzyć stosując opcję , i powrócić do trybu robienia zdjęć

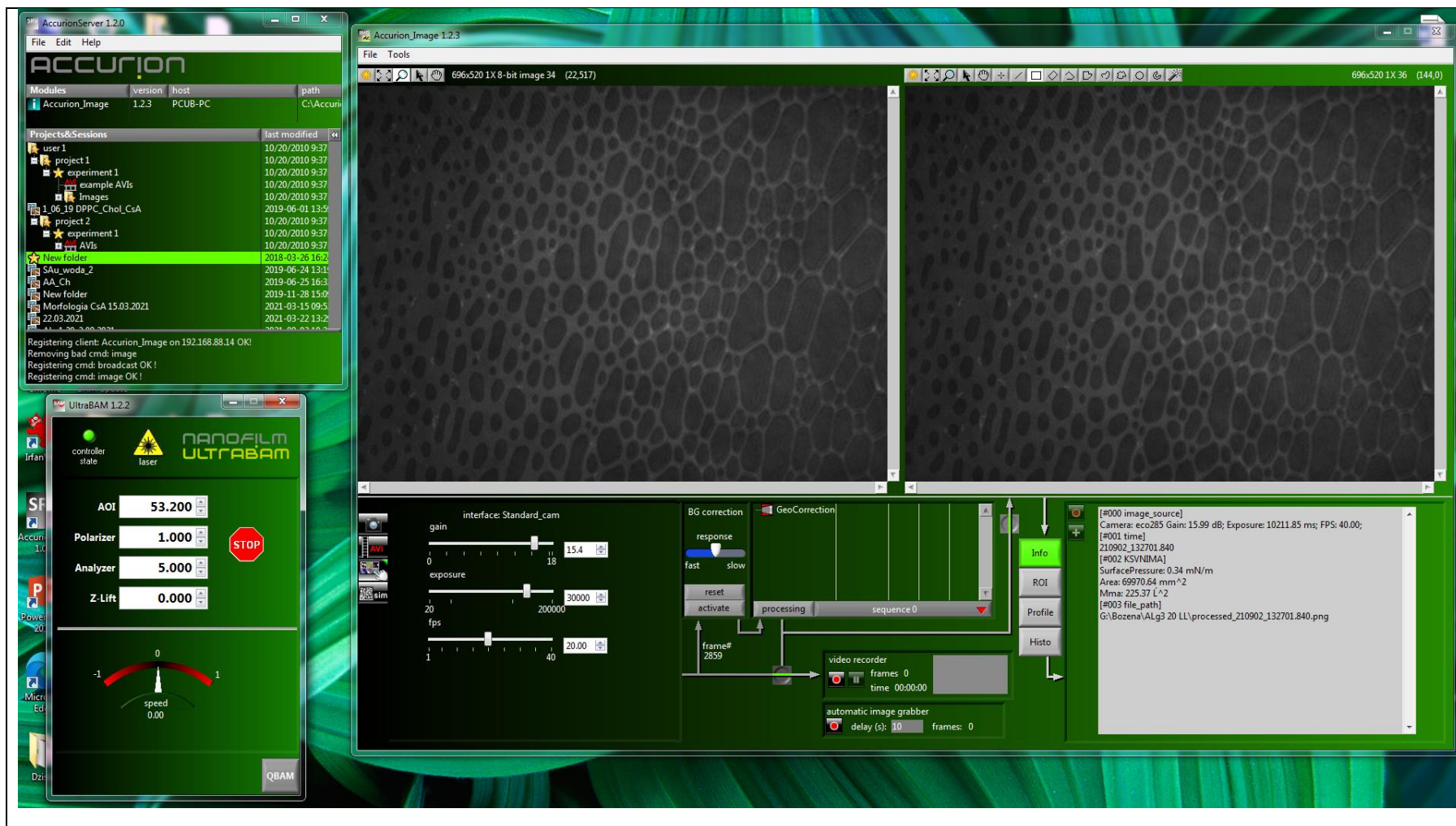


Zdjęcia można wykonywać z korektą lub bez korekty tła.

W pierwszym przypadku należy aktywować opcję klikając przycisk *activate*.



Podgląd ekranu monitora po kompleksowym uruchomieniu oprogramowania pokazano na Rysunku 25.



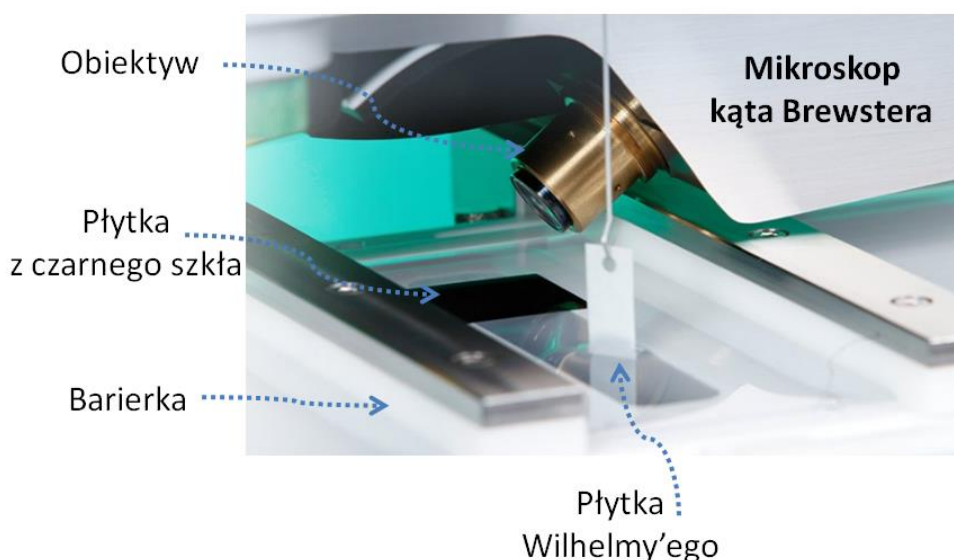
Rys. 25. Podgląd ekranu monitora po kompleksowym uruchomieniu oprogramowania Nanofilm-UltraBAM.

## D. Sposób wykonania ćwiczenia

**Przygotowanie roztworów.** Sporządzić roztwory lipidów w chloroformie. W tym celu w buteleczkach o pojemności 5 cm<sup>3</sup>, wykonanych z ciemnego szkła, odważyć za pomocą wagi analitycznej (Sartorius) ok. 1 mg danego lipidu, a następnie rozpuścić naważkę w takiej ilości chloroformu, aby uzyskać roztwór o stężeniu 1 mg/mL. W analogiczny sposób przygotować wszystkie roztwory lipidów. Buteleczki z roztworami zamknąć szczelnie zakrętkami i zabezpieczyć przed parowaniem rozpuszczalnika okładając je parafilmem, a następnie przechowywać pod przykryciem w atmosferze chloroformu.

**Przygotowanie wanny LB do pomiarów.** Uruchomić termostat połączony z wanną Langmuira, ustawiając temperaturę na 20°C. Przed pomiarami wannę teflonową wraz z barierkami wykonanymi z poliacetalu oczyścić bezpyłowymi chusteczkami nasączonymi acetonem, a po odparowaniu rozpuszczalnika (ok. 10 minut) chusteczkami nasączonymi metanolem, używając bezpyłowych rękawiczek nitrylowych oraz pęsety. Po upływie 10 minut wannę i barierki przepłukać kilkakrotnie ultraczystą wodą, którą należy usunąć z wanny przy pomocy pompki wodnej zaopatrzonej w plastikową, wymiennalną końcówkę. Następnie wlać wodę tak, aby utworzył się menisk wypukły i doczyścić powierzchnię subfazy odsysając ewentualne zanieczyszczenia, podczas ruchu barierki w kierunku środka wanny. Poziom wody po doczyszczeniu powinien być równy z krawędziami wanny.

**Przygotowanie mikroskopu BAM do pomiarów.** Uruchomić mikroskop kąta Brewstera oraz oprogramowanie Nanofilm-UltraBAM zgodnie z opisem w punkcie C. Następnie zdjąć osłonkę ochronną obiektywu. Czarną płytkę szklaną umieścić płasko nad studzienką wanny, bezpośrednio pod obiektywem (Rys. 26), aby nachylona (klinowa), gładka jej część była zwrócona w stronę soczewki obiektywu. W ten sposób ustawiona płytka pochłania załamana wiązkę promieniowania laserowego zapobiegając dostaniu się jej do układu optycznego oraz minimalizuje rozproszenie światła na korzyść jakości obrazowania.



**Rys. 26.** Sposób ułożenia czarnej płytki szklanej pod obiektywem mikroskopu.

**Sprawdzanie czystości powierzchni.** W celu sprawdzenia czystości subfazy, należy platynową płytkę Wilhelmy'ego o wymiarach  $10 \times 19,62 \text{ mm}^2$ , opłukać w metanolu i wodzie, trzykrotnie wyprażyć w płomieniu palnika i zawiesić na haczyku wagi w taki sposób, aby 1/3 płytki była zanurzona w subfazie. Następnie wyzerować wagę i bariereki w pozycji *Open*, po czym rozpocząć kompresję. Pomiar ciśnienia powierzchniowego polega na ważeniu platynowej płytki zanurzonej w fazie nośnej. Jeśli zmiany napięcia powierzchniowego podczas ruchu barierki w kierunku środka wanny nie przekraczają wartości  $0,3 \text{ mN/m}$ , powierzchnię fazy nośnej uznaje się za czystą i po otworzeniu barierki przystępuje się do pomiaru głównego. W przeciwnym wypadku czyszczenie należy powtórzyć.

**Pomiar główny.** Otworzyć przesłonę obiektywu przekręcając pokrętkę w pozycję O. Zamknąć drzwi komory bezpieczeństwa i zainicjować pracę lasera. Obniżyć głowicę, aby plamka lasera skupiała się na nachylonej części czarnej płytki. Następnie dobrać parametry AOI ( $53,2^\circ$ ), polaryzatora i analizatora oraz kamery, aby uzyskać ostry obraz powierzchni subfazy (pole zaciemnione). Wykonać zdjęcie. Wyłączyć laser lub zamknąć przesłonę przekręcając pokrętkę w pozycję C. Następnie na powierzchnię fazy nośnej, po wyzerowaniu ciśnienia powierzchniowego i pozycji barierki, nanosić kroplami odpowiednią objętość roztworu lipidu używając mikrostrzykawki Hamiltona z teflonowym zakończeniem tłoczka. Dozowaną objętość należy dobrać w programie KSV NIMA LB w oparciu o masę molową związku i stężenie roztworu. Zazwyczaj objętość mieści się w przedziale od 50 do  $100 \mu\text{L}$ . Po naniesieniu roztworu chloroformowego na powierzchnię wody należy odczekać 10 minut w celu odparowania rozpuszczalnika, po czym włączyć laser i/lub otworzyć przesłonę i rozpocząć kompresję z szybkością  $10 \text{ mm/min}$ . Po dostosowaniu ostrości wykonać zdjęcia powierzchni monowarstw na różnych etapach ściskania (minimum 10 zdjęć). Jeśli morfologia zmienia się szybko fotografować częściej. Równocześnie proces będzie rejestrowany w postaci zależności ciśnienia powierzchniowego od powierzchni subfazy przypadającej na pojedynczą cząsteczkę w monowarstwie (**izoterm  $\pi - A$** ), widocznej na ekranie komputera połączonego z wanną. Po zakończeniu pomiaru należy laser wyłączyć i odsunąć głowicę mikroskopu od powierzchni subfazy, a następnie usunąć zawartość wanny i oczyścić ją według procedury opisanej powyżej. Czynności powtórzyć dla kolejnych lipidów.

Zarejestrowane obrazy morfologii monowarstw zapisać na komputerze wraz z wartościami odpowiadających im ciśnień powierzchniowych. **Niezapisanie obrazów grozi ich utratą przy zamknięciu okna Accurion Image!**

Roztwory organiczne pozostałe po pomiarach wylać do butelki z napisem „**ZLEWKI chloroformu**”. Buteleczki z zakrętkami przepłukać trzykrotnie świeżymi porcjami chloroformu i pozostawić do wyschnięcia.

## E. Opracowanie wyników i wnioski

Otrzymane dane doświadczalne opracować według zestawionych punktów:

1. Sporządzić wykresy izoterm  $\pi - A$ , odkładając na osi odciętych powierzchnię przypadającą na cząsteczkę,  $A$ , wyrażoną w  $\text{\AA}^2$ , a na osi rzędnych odpowiadające wartości ciśnienia powierzchniowego,  $\pi$ .

2. Pod wykresem dla danego związku zestawić obrazy morfologii monowarstwy z informacją o ciśnieniu powierzchniowym i powierzchni na cząsteczkę, przy których zostały zarejestrowane. W razie potrzeby obrazy przyciąć. Podać wielkość powierzchni obrazowania w  $\mu\text{m}$ .
3. Przypisać zmiany morfologii monowarstwy do konkretnych odcinków izotermy (Rys. 11).
4. Porównać i opisać obrazy morfologii poszczególnych monowarstw w aspekcie homogeniczności filmów, kształtu i wielkości tworzących się domen, przejść fazowych, chiralności, rodzaju struktur wielowarstwowych po załamaniu filmu.