

ÖPTISK SPEKTROMETRI OCH
MIKROSKOPI

013

AVSIKT:

- A. Att bestämma våglängderna för de fem starkaste linjerna i Hg-spektrat med hjälp av optisk spektrometer.
- B. Att studera mikroskopets viktigaste egenskaper och några av de vanligaste mikroskopimetoderna.

A. APPARATUR

Vid bestämningen av våglängderna för de fem starkaste linjerna i Hg-spektrum använder vi en optisk spektrometer och ett gitter. Den optiska spektrometern består väsentligen av en kollimator, en kikare och ett spektrometerbord, där man placerar antingen ett prisma eller ett gitter. Ljuset från kvicksilverlampan faller in i kollimatoren

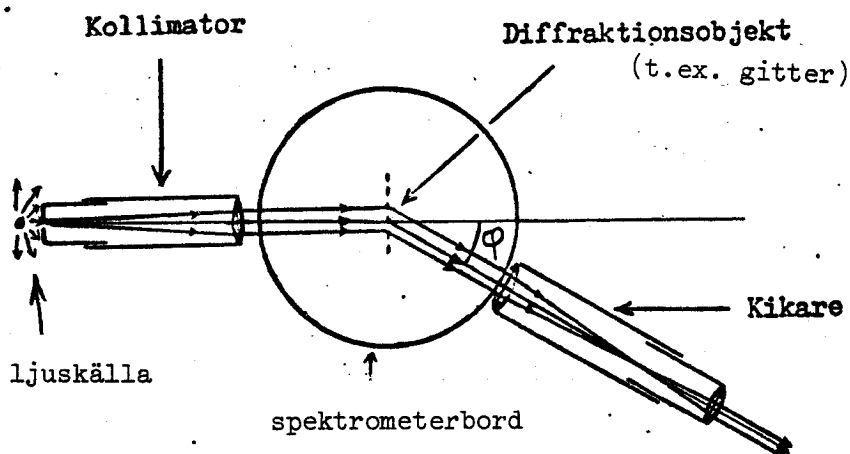


Fig. 1. Optisk spektrometer.

genom en smal spalt som befinner sig i kollimatorlinsens brännplan. De utgående ljusstrålarna blir då parallella (dvs vågfronterna blir plana, sk plana vågor). De får där-
 efter träffa gitterytan under rätt vinkel. Vid passagen av gittret böjs strålarna av (beskrivs i teoriavsnittet!) t ex med en vinkel φ från ursprungsriktningen och vi observerar dem med hjälp av kikaren. Det är vinkeln φ dvs kikarens läge som vi är intresserade av att bestämma. Vinkeln φ avläses med lupp mot en gradskala. Men innan vi börjar mätningarna måste spektrometern justeras så att följande fem villkor blir uppfyllda:

- 1) Kikaren är inställd för parallella strålar dvs plana vågor som kommer in i kikaren skall också komma ut som plana vågor (se figur 1).
- 2) Kikaraxeln är vinkelrät mot spektrometeraxeln (se figur 2) dvs kikaren ligger hela tiden i samma plan oberoende av vinkeln φ .

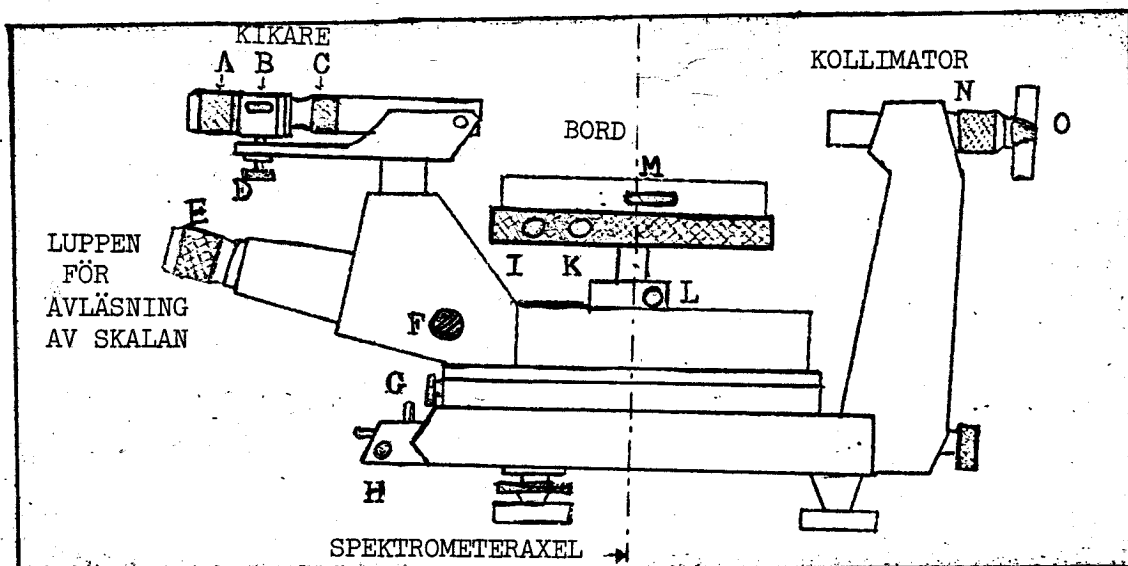
- 3) Kollimatoren är inställd för parallella strålar dvs ljusvågorna blir plana efter passagen genom kollimatoren (se figur 1) innan de träffar gittret.
- 4) Kollimatoraxeln är vinkelrät mot spektrometeraxeln (se figur 2).
- 5) Gitterritsarna är parallella med spalten. Justera nu spektrometern enligt följande instruktion (en bild över spektrometern finns på nästa sida).

Justering av kikaren

a) Okularet justeras, tills hårkorsset syns skarpt med ögat inställt för seende på stort avstånd. b) En spegel placeras på spektrometerbordet med spegelnormalen sammanfallande med kikäxeln. Kikarens tubutdrag justeras så, att hårkorsets spegelbild syns parallaxfri mot hårkorsset. Kikaren är nu inställd för parallella strålar. c) En av bordets ställskruvar justeras så, att hårkorsset och dess spegelbild sammanfaller. d) Bordet vrids 180° . e) Sammanfaller ej längre hårkorsset och dess spegelbild, bringas dessa ånyo att sammanfalla genom justering av kikarens nivelleringskruv och en av bordets ställskruvar, varvid halva avvikelsen elimineras med vardera ställskruven. f) Punkterna d) och e) upprepas, tills koincidens erhålles med spegeln i vardera läget. Kikarens axel står nu vinkelrätt mot spektrometeraxeln.

Justering av kollimatoren

a) Spegeln avlägsnas, kikaren vrids så, att kikarens och kollimatorns axlar sammanfaller. Kollimatorspalten öppnas något och belyses med Hg-ljus. b) Kollimatorns tubutdrag ändras, tills spalten synes skarp och parallaxfri mot hårkorsset. Spalten ställs vertikalt. c) Kollimatoren vrids med dess nivelleringskruv kring en horisontell axel, tills hårkorsset halverar spalten i höjded. Då är kollimatoren inställd för parallella strålar och står vinkelrätt mot axeln d) Spalten görs mycket smal.



- A Justering av kikarens okular.
- B Avskärmning av hårkorsbelysningen.
- C Justering av kikarens tubutdrag.
- D Nivelleringskruv för kikaren.
- E Inställning av lupp för avläsning av skalan.
- F Fininställning av kikaren.
- G Låsning av kikaren.
- H Strömbrytare för hårkors- och skalbelysning.
- I Fininställning av bordet.
- K Låsning av bordet vid spektrometeraxeln.
- L Låsning av bordet i höjddled.
- M Ställskruv för bordet.
- N Justering av kollimatorns tubutdrag.
- O Justering av spaltvidden.

Fig. 2. BOUTY-spektrometern.

ALLMÄN TEORI

Diffraction är böjning av en våg vid en kant.

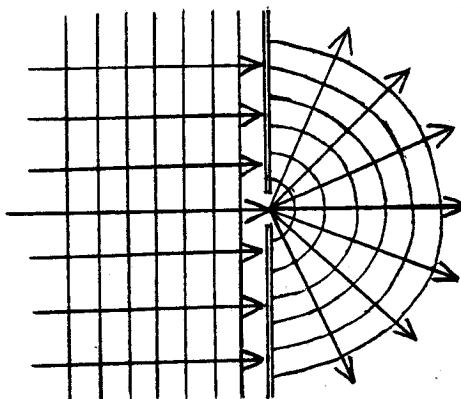


Fig. 3. Diffraction i en spalt.

Interferens är en effekt av superposition av vågor. De kan förstärka varandra (konstruktiv interferens) eller försvaga varandra (destruktiv interferens) beroende på fasskillnaden mellan de interfererande vågorna.

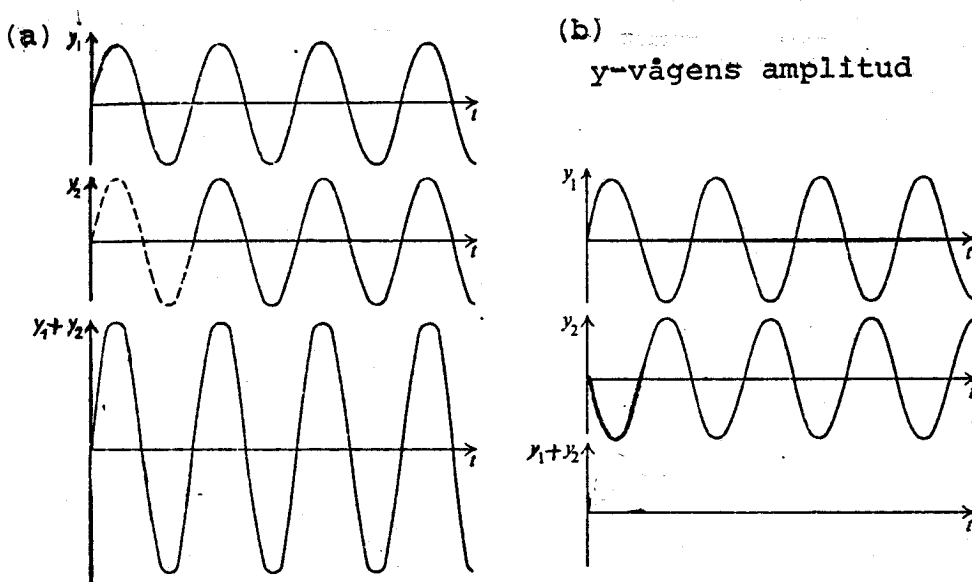


Fig. 4. Exempel på konstruktiv (a) och destruktiv (b) interferens (fasskillnad 2π respektive π).

En plan våg som faller mot ett gitter bestående av N stycken genomskinliga spalter uppdelas i N stycken vågor. Varje sådan våg böjs vid spaltkanterna (diffraction) och interfererar sedan med de andra vågorna. Det visar sig vid observationen av det böjda ljuset att vi bara får ljus (konstruktiv interferens) för vissa vinklar φ och för övrigt är det mörkt (destruktiv interferens). Lägena för konstruktiv

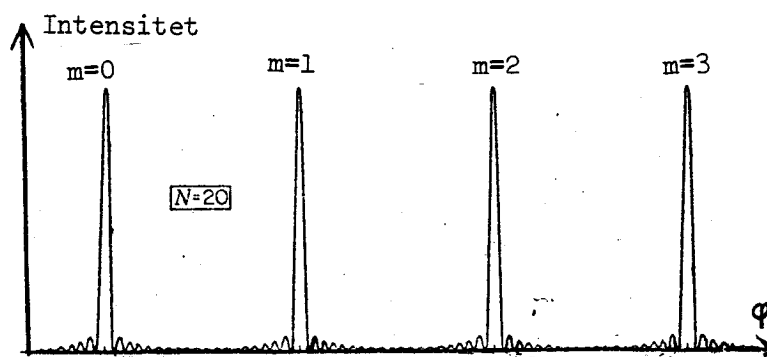


Fig. 5. Diffraktionsmönster från ett gitter med 20 spalter belyst med monokromatiskt ljus (med bara en våglängskomponent).

interferens kan för ett gitter beräknas med hjälp av "gitterekvationen":

$$m \cdot \lambda = g \cdot \sin \varphi \quad (1)$$

där g = avståndet mellan två närläggna spalter (den sk "gitterkonstanten")
 λ = ljusets våglängd
 m = sk ordning (heltal)

För $m = 0$ fås nollte ordningens spektrum ($\varphi = 0^\circ$) som består av det ljus som passerat gittret opåverkat (ej böjt). Ju större m , desto större observationsvinkel. Om vi känner g och φ kan vi bestämma λ , våglängden. Vi utnyttjar det faktum att ljus med olika våglängder uppträder vid olika vinklar (om $m \neq 0$) och kan därigenom bestämma våglängder för de karaktäristiska spektrallinjerna för Hg (spektralanalys) (se figur 6).

Nu återstår det sista injusteringsmomentet, som går ut på att justera gittret så, att ritsarna blir parallella med spalten - annars blir spektrallinjerna sneda och kan t o m hamna utanför kikarens synfält.

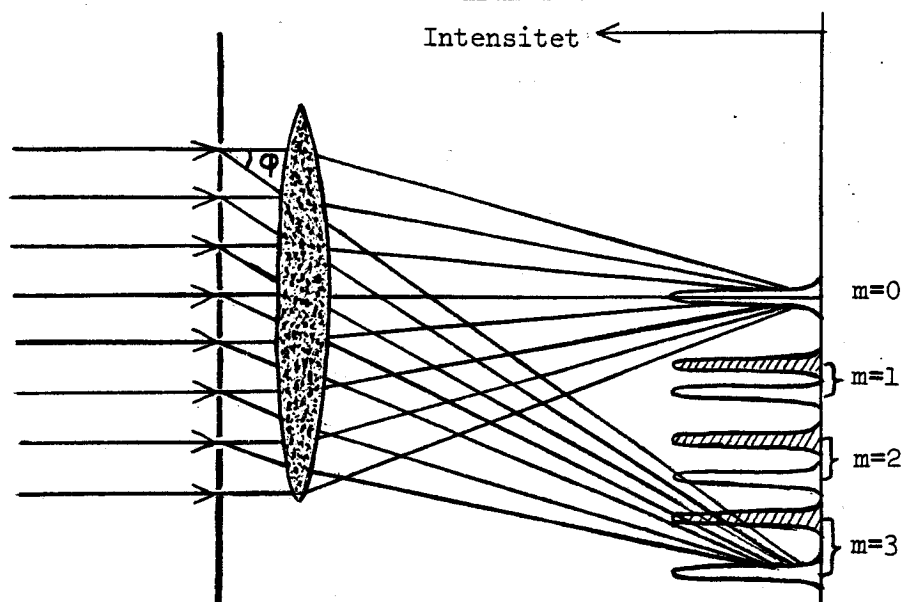


Fig. 6. Innehåller den mot gittret infallande strålningen två våglängdskomponenter (2 spektrallinjer) λ_1 och λ_2 där $\lambda_2 > \lambda_1$, kommer dessa att separeras efter genomgången av gittret. Denna separation ökar med spektralordningen.

Justering av gittret

a) Gittret placeras i sin hållare på spektrometerbordet, (assistenten instruerar hur man gör detta) och med gitterytan vänd mot kikaren. b) Kikaren ställs i linje med kollimatoren. c) Kikaren vrids, så att en spektrallinje kan iakttas. Om hårkorset ej halverar denna i höjddled, vrids gittret i sitt eget plan, tills detta blir fallet. Då är gitterritsarna parallella med spalten. d) Kontrollera med kikaren inställd i det symmetriska läget på andra sidan centralbilden. Om hårkorset ej halverar spektrallinjen i höjddled upprepa justeringarna fr o m moment c.

Mätningar utföres endast i 1:a ordningens spektrum ($m = 1$) alltså det som ligger närmast på ömse sidor av centralbilden (nollte ordningen). Gitterekvationen kan för detta fall skrivas: $\lambda = g \sin\varphi$ där $\lambda =$ våglängden och $\varphi =$ avböjningsvinkeln i första ordningens spektrum.

Mätningar: Kikaren ställs in på en och samma spektrallinje i höger- respektive vänsterläge. Kikarens läge avläses. Ur de två avläsningarna (vänster och högerläge) erhålles avböjningsvinkeln enligt:

$$\varphi = \frac{\alpha_{\text{höger}} - \alpha_{\text{vänster}}}{2} \quad (2)$$

där α = avläsningarna.

λ för de fem starkaste linjerna i Hg-spektrum beräknas med hjälp av gitterekvationen (ekv.1)

Gitterkonstanten $g =$ _____

Linjens färg	$\alpha_{\text{höger}}$	$\alpha_{\text{vänster}}$	φ	λ
Gul A				
Gul B				
Grön				
Blåviolett				
Violett				

B. MIKROSKOPI

HISTORIK

Om vi med mikroskop menar ett sammansatt instrument, bestående av minst två linser - objektiv och okular -, så är dess historia relativt ung. Holländarna Janssens, far och son, räknas tillsammans med Galilei som mikroskopets upphovsmän. Tid omkring 1600. Robert Hookes sammansatta mikroskop torde dock ha varit det första som i någon mån kunde jämföras med föregångaren luppen, den enkla förstörande linsen. Mikroskopet beskrevs i "Micrographia", utgiven 1665 och innehållande beskrivningar av ett stort antal biologiska preparat.

Det enkla "mikroskopet", luppen, ursprungligen ofta i form av en vattenfylld glob, omnämndes av Plinius (1:a århundradet e Kr) men förmodas på goda grunder ha varit känt och använt 500 år tidigare. Konsten att slipa lupper med kort brännvidd nådde sin höjdpunkt hos holländaren van Leeuwenhoek som kunde åstadkomma en praktisk förstoring av över 200x (!!!) och vars instrument i flera avseenden förblev de sammansatta mikroskopen överlägsna ända in på 1800-talets början. Vad var då svårigheten att konstruera goda mikroskop? Svaret är linsfelen, och då i första hand färgfelet - den kromatiska aberrationen. Trots att Huygens och Newton ägnade mikroskopet mycket intresse kunde de inte finna lösning på det kromatiska problemet. Först efter teoretiska arbeten av framförallt Leonhard Euler kunde akromatiska linskombinationer framställas mot slutet av 1700-talet, varigenom vägen mot instrument med större effektiv förstoring öppnades.

Åran att ha skapat det moderna mikroskopet tillkommer Ernst Abbe (1840-1905). Denna uppställde en avbildningsteori som betonar diffraktionens betydelse och demonstrerar de geometriska avbildningsvillkorens otillräcklighet. Vidare genomförde han beräkningar av komplicerade linssystem som kunnat förbättras något endast tack vare dagens beräkningar med hjälp av datamaskin. Än idag är det förnämsta mikroskopobjektivet den ursprungligen av Abbe konstruerade apokromaten,

där det kromatiska felet är korrigerat för tre våglängder medan det sfäriska felet samtidigt är korrigerat för två våglängder.

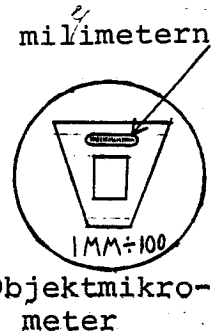
Det väsentligaste bidraget till mikroskopins utveckling efter Abbe gavs 1931 av Zernike, vars faskontrastmetod (belönad med Nobelpris 1953) möjliggör studium av objekt som inte eller endast obetydligt påverkar det passerande ljusets amplitud men däremot ändrar fasen.

Ett mikroskop består i princip av fyra linser (i verkligheten är de komplicerade linssystem) (se på fig.7 sid.10):

- 1) Kollektorn som samlar upp ljuset från den belysande ljuskällan.
- 2) Kondensorn som bryter ihop ljuset i preparatet.
- 3) Objektivet som samlar ihop det ljus som har passerat preparatet, och formar en förstörd bild av detta.
- 4) Okularet som används som lupp för att betrakta den av objektivet formade bilden.

Samtliga mikroskoplinser är försedda med bländare som ligger i sina linsers fokalplan. Som vanligt börjar vi med injustering enligt en vid varje laborationsplats befintlig instruktion. Först kommer vi att använda Beckmikroskopet. Läs igenom instruktionen och justera mikroskopet enligt punkt 1-5 (6 och 7 struntar vi i). Du kanske möter några fackord där som kräver en förklaring. Hjälpkikare (eller faskikare) är en kikare som används i stället för okularet (ta bort okularet). Den består av två linser, den närmast ögat kallad för ögonlins. Avståndet mellan linserna kan ändras genom att man drar ut ögonlinsen.

Objektmikrometer används för kalibreringsändamål och består av en skala med 1 mm delad i hundradelar. OBSERVERA, att för att undvika skador på preparat/konsensor/objektiv görs grovfokusering ALLTID så att objektivet förs mot preparatet (vilket aldrig får komma i direkt kontakt med objektivet) medan man observerar det krympande avståndet från sidan. Därefter ökas avståndet mellan preparat och objektiv med grovjusteringsratten medan man observerar via okularet.



Objektmikrometer

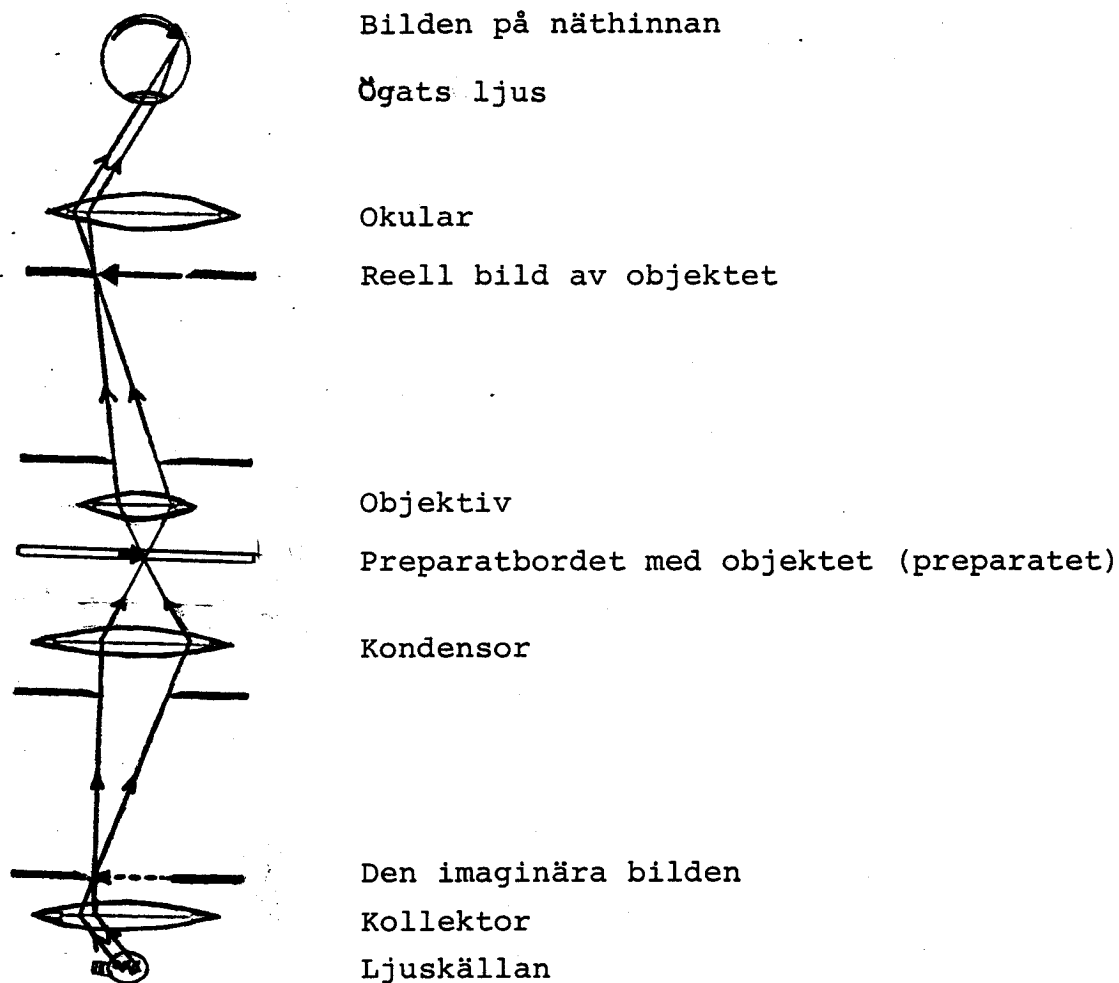


Fig. 7. Mikroskopets uppbyggnad.

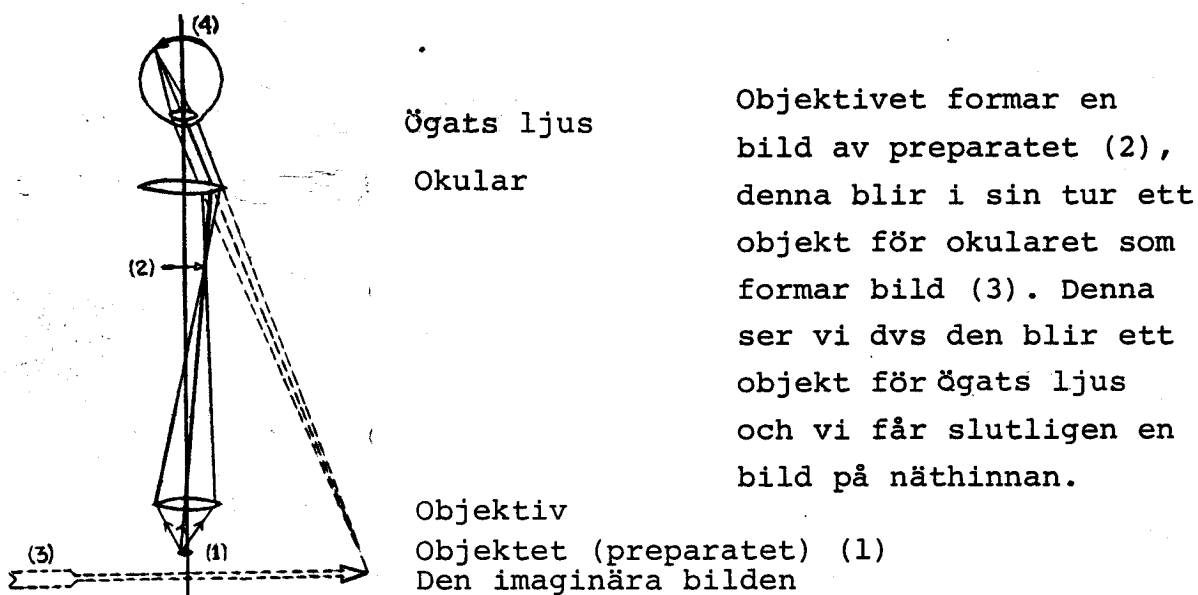


Fig. 8. Principen för mikroskopets verkningssätt.

Försök 1: Mörkfältmikroskopi

Vid starkt spridande objekt finns möjligheten att öka kontrasten drastiskt om man istället för att observera mörka föremål mot ljus bakgrund (ordinär ljusfältmikroskopi) låter ljuset från kondensorn träffa preparatet under så stor vinkel att det inte kommer in i objektivet. Då kommer endast det av objektet spridda ljuset att passera vidare till okularet, medan det onödiga belysningsljuset ("bruset") försvinner ut. Genom denna manöver kommer det av det lilla objektet spridda ljuset att framträda på mörk bakgrund och inte längre dränkas av belysningsljuset. Oftast görs detta med speciella mörkfältkondensorer, men även en enkel avskärmning av det centrala ljuset som i figur 9 ger motsvarande effekt. Mörkfältmetoden möjliggör observation av submikroskopiska partiklar varför man vid speciella utföranden talar om ultramikroskopi.

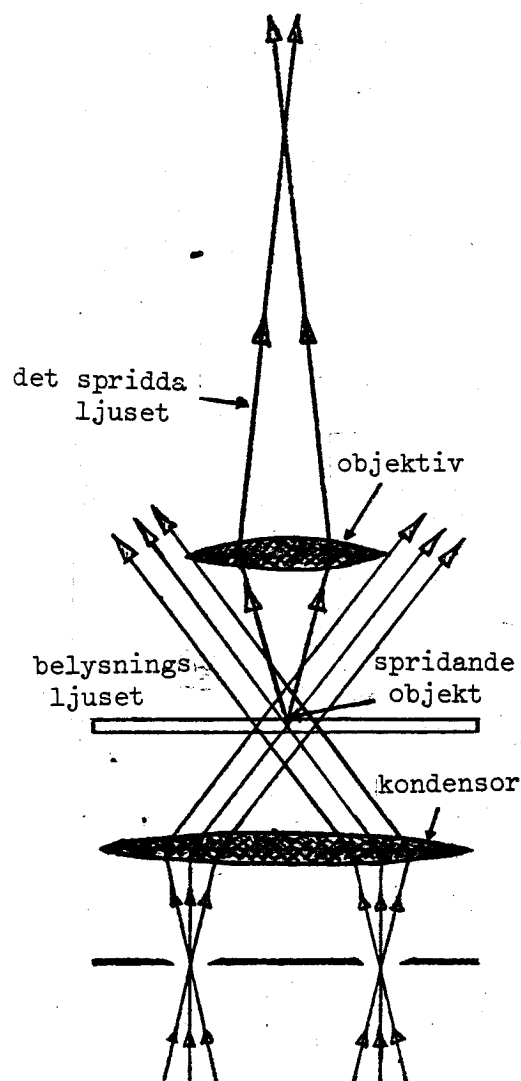


Fig. 9. Mörkfält - mikroskopi.

Försökets utförande:

Mikroskop: Beck

Objektiv: 10 x

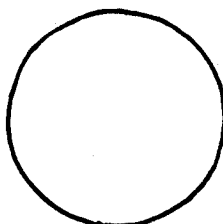
Okular: 10 x

Objekt (preparat): Diatomé

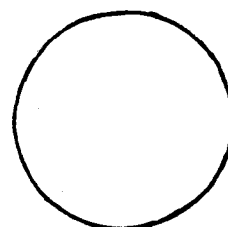
Filter: Blåfilter

För att avskärma det centrala ljuset används en fem- eller tvåöring. Diatomén är ett slags kiselalg (pleurosigma angulatum) som uppvisar en periodisk struktur. Fokusera i vanlig ordning i ljusfält. Placera och centrera myntet på blåfiltret. Nu är allt mörker, såvida inte ett objekt sprider eller böjer ljuset så att något därav faller inom objektivöppningen. (Ev behöver kondensorn justeras något i höjddled). Kondensorbländaren måste vara helt öppen! Observation:

Ljusfält:



Mörkfält:



Försök 2: Polarisationsmikroskopi

En elektromagnetisk våg är en transversell vågrörelse där den elektriska (och magnetiska) fältvektorn svänger med tiden. En ljusvåg som når våra ögon består vanligtvis av många vågor vars elektriska vektorer svänger samtidigt

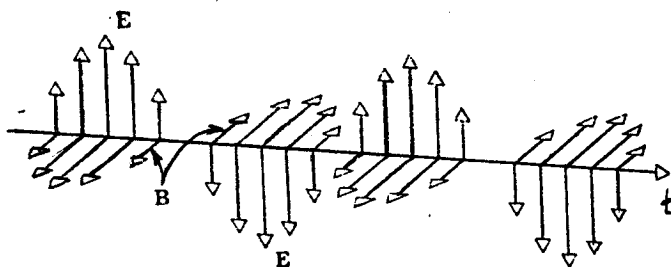


Fig. 10.

åt alla möjliga håll. En sådan våg kallas opolariserad. Man kan med hjälp av så kallade polaroider filtrera bort alla polarisationsriktningar förutom en. En våg som passerat en sådan polarisator kallas planpolariserad dvs elektriska

vektorn svänger i ett plan (se fig. 10). Om nu det polariserade ljuset faller mot en annan polaroid, analysator, vars polarisationsriktning är vinkelrät mot den förra, så kommer inget ljus att släppas igenom. Med andra ord det opolariserade ljuset släcks av två korsade polaroider. Det finns dock anisotropa material som vrider polarisationsriktningen hos ljus som passerar genom dem. Om vi placerar ett sådant material efter polarisatorn (dvs belyser det med planpolariserat ljus) så kommer nu det ljus som har gått igenom materialet att kunna passera genom analysatorn också. Ljusets polarisationsplan bildar inte längre 90° med analysatorns genomsläppsriktning och kan därför gå igenom den. Dessa anisotropa material är ofta svåra att studera med vanlig ljusfältmikroskopi, eftersom de är mer eller mindre genomskinliga. Men om vi placerar två korsade polaroider, en före och en efter preparatet, kommer det ljus som inte har gått igenom det att helt släckas ut. Preparatet kommer då att framträda mot mörk bakgrund pga vridning av polarisationsplanet.

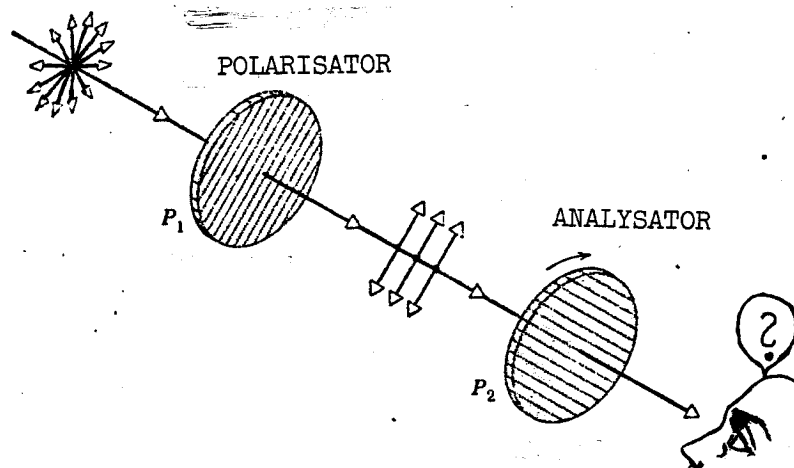


Fig. 11. Opolariserat ljus går inte igenom två korsade polaroider.

Försökets utförande:

Mikroskop: Beck

Objektiv: 40 x

Okular: 10 x, med polaroid påsatt

Objekt (preparat):

Filter: inget

Den andra polaroiden placeras i kondensorns svängbara filterhållar

Försök 3: Faskontrastmikroskopi

Genomskinliga preparat ställer oss inför ett stort problem, ty vi kan inte skilja mellan områden med olika struktur (olika brytningsindex n m).

Biologiska preparat t ex är vanligen genomskinliga och ljuset passerar preparatet både i cellområden och vattenområden, med samma intensitet. Ögat kan bara detektera intensitetsvariationer och märker inte att områdena är olika. Låt cellmaterialet ha ett annat brytningsindex (n_2) än det omgivande vattnets (n_1), se fig. 12. Att cellen har ett brytningsindex som är större än vattnets betyder, att det tar längre tid för ljusvågen att passera cellen än ett lika tjockt lager vatten. Man kan uttrycka detta också som att våglängden blir mindre under passagen genom cellen. Ljusvågorna som har gått genom

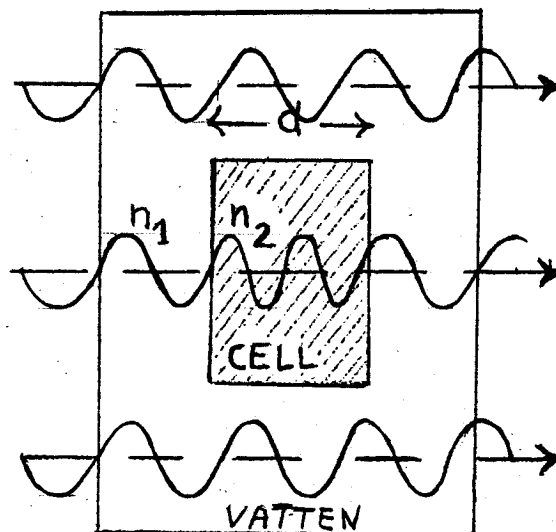


Fig. 12.

cellen kommer då att få sin fas förändrad gentemot det ljus som passerat enbart vatten. Men ljusvågans amplitud förändras inte. Det ögat ser är bara intensiteten (proportionell mot amplituden i kvadrat), vi kan inte skilja på vatten och cell. Ett faskontrastmikroskop omvandlar dock faskillnaden till en intensitetsskillnad, så att cellen syns. Teorin för hur detta går till skall vi inte gå in på, utan nöja oss med att studera hur faskontrastmikroskopi utnyttjas praktiskt.

För att studera faskontrastmikroskopi använder vi ett Vickers-mikroskop. Som alltid börjar vi med att justera instrumentet, så läs först igenom instruktionsbladet, baksidan också, (finns vid varje laborationsplats). I instruktionen förekommer ett nytt ord, apertur, som betyder öppning. Denna regleras med hjälp av respektive linsers bländare. Injusteringsarbetet underlättas om du hela tiden har bilden (fig. 8) på mikroskopets uppbyggnad framför dig. Hoppas att du kommer ihåg, att faskikare och hjälpkikare är två namn på samma sak.

Undersökning av tape med olika kontrastmetoder

Mikroskop: Vickers

Objektiv: 10 x

Objekt: Vanlig genomskinlig tape, klistrad på objektglas

Filter: Grönfilter

- a) Observation i ljusfält (kondensorbländare nr 0)
- b) Observation i faskontrast (kondensor-ringbländare nr 1)

Vad kan man se i faskontrast som man inte kan se i ljusfält?

Svar:

- c) Observation i mörkfält (kondensor-ringbländare nr 3)
- Kombinationen objektiv 10 x och ringbländare nr 3 ger samma möjlighet till mörkfältsmikroskopi som i försök 5.

Injustering:

Sedan ringbländare nr 3 valts: öka belysningen.

Öppna kondensorbländaren tills maximal kontrast erhålls.

Vad kan man se nu som man inte kan se i ljusfält?

Svar:

Studium av ett genomskinligt gitter med olika kontrastmetoder.

trastmetoder.

Mikroskop och filter som ovan.

Objektiv : 40 x

Objekt: Spektroskopgitter (assistenten tillhandahåller det).

Lägg gittret på preparatbordet med etsningen uppåt.

a) Observation i ljusfält (kondensorbländare nr 0)

b) Observation i faskontrast (ringbländare nr 2)

Hur ser gittret ut i a) och i b)?

Vad är skillnaden?

Svar:

Försök 5: Reflektionsmikroskopi

Högabsorberande material m fl kan inte studera i transmission varför man är hänvisad till i huvudsak två vägar för ytstudier. Dels kan - som vi skall göra - lämplig belysning av ytan arrangeras, för direkta observationer i reflekterat ljus, dels kan en transparent kopia av ytan framställas, varefter kopian undersöks i transmissionen.

Vid försöket studeras

- a) ytan av en blybit
- b) ytan av en mässingbit
- c) eggen hos ett rakblad
- d) utseendet hos en integrerad krets

Andra förslag välkomnas!

OBS! Det är assistenten som justerar in mikroskopet.