

가변 위상지연자 결합형 편광현미경(POLSCOPE)을 통한 고분자 소재의 분자 배향 분석법

Molecular Ordering Analysis of Polymer Materials Using a
Polarizing Microscope and A Precision Universal Compensator

김혜인 · 오광석 · 김영기 | Hyein Kim · Kwang-Suk Oh · Young-Ki Kim

Department of Chemical Engineering, Pohang University of Science and Technology (POSTECH),
77 Cheongam-Ro, Nam-Gu, Pohang, Gyeongbuk 37673, Korea
E-mail: ykkim@postech.ac.kr

1. 서론

분자 배향에 대한 분석은 고분자, 살아있는 세포, 액정 등을 포함한 다양한 분야에 있어서 물질의 형태, 특성 및 형성 메커니즘을 이해하는데 매우 중요하다. 특히, 고분자의 경우 일반적으로 비등방적 분자 구조를 가지기 때문에, 분자의 배향 및 정렬도가 소재의 특성에 막대한 영향을 미친다.

기존에는 고분자 소재의 분자 배향 분석을 위해 X-ray 회절분석법(X-ray diffraction, XRD), 주사전자현미경(scanning electron microscope, SEM), 투과전자현미경(transmission electron microscope, TEM)을 주로 사용해왔다. 하지만 XRD 및 전자현미경 기반 분석법의 경우 1) 제한적인 분석 조건, 2) 제한적인 측정 시료의 종류 및 양, 3) 측정 시료의 파괴, 4) 복잡한 측정 및 시료 준비 과정, 5) 오랜 측정 시간, 6) 실시간 측정의 어려움, 7) 간접적인 정보(2D projection)만 제공하는 등의 여러 단점을 가진다. 따라서, 다양한 분석 조건에서 시료의 파괴 없이 분자의 배향을 실시간 관찰할 수 있는 편광 현미경 기반 분석 기술에 대한 관심이 높아지고 있다.

특히, 고분자와 같이 비등방적 분자 구조를 가지는 소재의 경우 복굴절 특성을 나타내기 때문에, 편광현미경을 이용하여 시료로부터 나오는 투과광 또는 반사광의 편광 변화를 주의 깊게 분석하면 정확한 분자 배향을 알 수 있으며, 이를 정량화 할 수 있다. 즉, 추가적인 염료 및 형광 표지 없이도 측정 시료의 본질적인 광학적 특성을 이용해 비파괴적으로 시료의 분자 배향을 실시간 측정할 수 있다. 이러한 장점으로 인해 편광현미경은 생물학,

Author



김혜인

2017 동아대학교 화학과 (학사)
2019 부산대학교 화학소재학과 (석사)
2020-현재 포항공과대학교 화학공학과 (박사과정)



오광석

2021 경북대학교 고분자공학과 (학사)
2021-현재 포항공과대학교 화학공학과 (석박사 통합과정)



김영기

2015 Kent State University,
Liquid Crystal Institute (박사)
2018 University of Wisconsin-Madison,
Chemical & Biological Engineering (Post-Doc.)
2019 Cornell University, Chemical &
Biomolecular Engineering (Post-Doc.)
2019-현재 포항공과대학교 화학공학과 조교수

광물학, 금속학 및 화학 연구 등 많은 분야에서 분자 배향 분석 장비로 사용되고 있다.¹⁻⁴ 그러나 기존 편광현미경 기반 분석법은 단일 편광 축을 가지는 입사 빛만을 분석에 사용하기 때문에, 한 번의 측정을 통해 얻을 수 있는 정보가 매우 제한적이다. 결국 정밀한 분자 배향 분석을 위해선, 입사 빛의 편광 축 변환에 따른 다수의 측정과 종합적인 광학 분석이 필수적이다. 본 분석 총설에서는 이러한 문제점을 해결하여, 상기한 편광현미경 기반 분석법의 장점을 극대화할 수 있는 일명 POLSCOPE(두 개의 가변 위상지연자(retarder)로 구성된 정밀 범용 보상기(universal compensator)가 결합된 편광 현미경)를 이용한 분자 배향 측정법의 기본적인 원리에 대해 다루고, 활용 사례들을 간단히 소개하는 것으로 마무리하고자 한다.

2. 본론

2.1 POLSCOPE 기반 분자 배향 측정 원리

2.1.1 POLSCOPE의 광학 구성

시료의 분자 배향을 실시간으로 측정 가능한 POLSCOPE는 그림 1과 같이 범용 보상기(universal compensator)가 결합된 편광현미경이다.⁵ 구체적으로 범용 보상기는 하나의 편광판과 느린 광축(slow axis)이 45도, 0도로 고정된 두 개의 액정 기반 가변 위상지연자로 구성되어, 단일 파장의 광원과 시료 사이에 위치하게 된다.

시료 분석 시, 가변 위상지연자에 전압이 인가되면서 광원으로부터 나오는 단일파장의 선편광 상태의 빛을 3개 이상의 편광 상태로 변화시켜 시료로 입사시킨다. 변환된 서로 다른 편광 상태의 빛은 시료를 통과하면서, 시료의 분자 배향(즉 광축의 배향)에 따라 추가적으로 편광 상태의 변화가

일어나게 된다. 이후, 빛은 상부 원편광판을 통과하게 되고 CCD(charge coupled device) 카메라를 통해 시료로 입사되는 각 편광 상태에 따른 광도를 픽셀 단위로 검출한다.

최종적으로 다음 장에서 상세히 설명될 광학 이론을 통해 측정된 광도를 기반으로 시료의 픽셀별 위상지연 크기(optical retardation)와 느린 광축 방향을 산출할 수 있다. 고분자의 경우 일반적으로 분자의 장축과 느린 광축 방향은 동일하다. 이 계산은 Image J 기반 프리웨어(<https://openpolscope.org>)를 통해 빠르고(1초 이내) 자동적으로 수행이 가능하다. 또한 상기 프로그램을 통해 측정된 시료의 현미경 사진에 계산된 위상지연 크기와 분자 배향의 도식화도 가능하다(2.2 참조). 이때 사용하는 대물 렌즈에 따라 0.2 μm 이상의 공간 분해능 및 최소 0.02 nm의 위상지연 크기의 측정이 가능하다. 여기서, 위상지연은 복굴절(Δn) 시료에 입사되는 편광된 빛 사이의 상대적인 위상 변화를 나타내며, 거리로 표현되는 위상지연 크기(Γ)는 시료를 통과하는 경로 길이(d)와 복굴절을 곱한 값이다($\Gamma = \Delta n d$).

따라서, POLSCOPE를 이용하면, 단 한 번의 측정으로 시료에 대한 다수의 광학 정보를 종합적으로 획득할 수 있으며, 이를 통해 실시간으로 시료의 분자 배향을 정량적, 시각적으로 알 수 있다.

2.1.2 광도를 통한 위상지연 크기와 분자 배향 측정 원리

이 장에서는 그림 1과 같은 광학 구성을 가지는 POLSCOPE를 이용해 측정된 시료의 픽셀별 광도를 통해 위상지연 크기 및 분자 배향을 계산하는 이론에 대해 설명하고자 한다.

시료에서 검출되는 위치별 광도는 식(1)과 같이 Jones matrices를 통해 우리가 측정하고자 하는 1) 시료의 위치별 위상지연 크기 $\Gamma(x, y)$ 와 2) 시료의 위치별 느린 광축의 방위각 $\phi(x, y)$ 의 함수로 나타낼 수 있다.⁸

$$I(a, \beta, x, y) = \frac{1}{2} \tau(x, y) I_{\max}(x, y) [1 + \sin a \cos \beta \cos \Gamma(x, y) - \sin a \sin \beta \cos 2\phi] \quad (1)$$

여기서, a 와 β 는 가변 위상 지연자의 위상지연 크기, $0^\circ < \Gamma(x, y) < 180^\circ$, $0^\circ < \phi(x, y) < 180^\circ$, $I_{\max}(x, y)$ 는 시료를 통과한 빛이 CCD에서 검출되는 광도의 최대값, 그리고 $\tau(x, y)$ 와 $I_{\min}(x, y)$ 는 측정 시료의 background(용매, 유리 기판 등)로 인한 광변화를 보정하기 위해 시료가 없이 background로부터 측정된 투명도와 최소 광도이다.

시료의 $\Gamma(x, y)$ 와 $\phi(x, y)$ 를 구하기 위해서는 다양한 편광 상태의 입사 빛을 이용하여 측정된 다수의 광도 데이터 $I(a, \beta, x, y)$ 를 분석하여야 한다. 대표적인 분석법으로는 다음과 같은 5개의 다른 a 와 β 조합으로 분석하는 5-프레임 알고리즘이 있다.

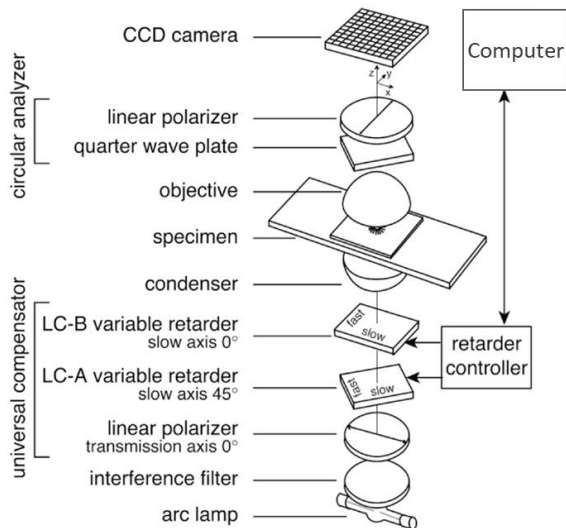


그림 1. 편광현미경과 범용 보상기로 구성된 POLSCOPE의 모식도.⁵

$$\begin{aligned}\Sigma_0 &: (\alpha = 90^\circ, \beta = 180^\circ) \\ \Sigma_1 &: (\alpha = 90^\circ - \chi, \beta = 180^\circ) \\ \Sigma_2 &: (\alpha = 90^\circ + \chi, \beta = 180^\circ) \\ \Sigma_3 &: (\alpha = 90^\circ, \beta = 180^\circ - \chi) \\ \Sigma_4 &: (\alpha = 90^\circ, \beta = 180^\circ + \chi)\end{aligned}$$

여기서 χ 값은 위상지연 크기에 편차를 주는 스윙 각도(swing angle)이다.

푸앵카레 구(Poincaré sphere)를 사용해 5-프레임 알고리즘의 5개 분석 조건에 따라 시료로 입사하는 빛의 편광 상태를 표현하면 그림 2와 같다.⁶ 각 조건에서 측정된 시료는 그림 2 하단의 현미경 이미지와 같이 상이한 위치별 광도 결과를 보인다. 각각의 조건에서 측정되는 위치별 광도(I_0, I_1, I_2, I_3, I_4)는 아래 식(2)로 표현된다.⁷

$$\begin{aligned}I_0(x, y) &= \frac{1}{2} \tau(x, y) I_{\max} [1 - \cos \Gamma(x, y)] + I_{\min}(x, y) \\ I_1(x, y) &= \frac{1}{2} \tau(x, y) I_{\max} [1 - \cos \chi \cos \Gamma(x, y)] + \sin \chi \sin 2\phi \\ I_2(x, y) &= \frac{1}{2} \tau(x, y) I_{\max} [1 - \cos \chi \cos \Gamma(x, y)] - \sin \chi \sin 2\phi \quad (2) \\ I_3(x, y) &= \frac{1}{2} \tau(x, y) I_{\max} [1 - \cos \chi \cos \Gamma(x, y)] - \sin \chi \cos 2\phi \\ I_4(x, y) &= \frac{1}{2} \tau(x, y) I_{\max} [1 - \cos \chi \cos \Gamma(x, y)] + \sin \chi \cos 2\phi\end{aligned}$$

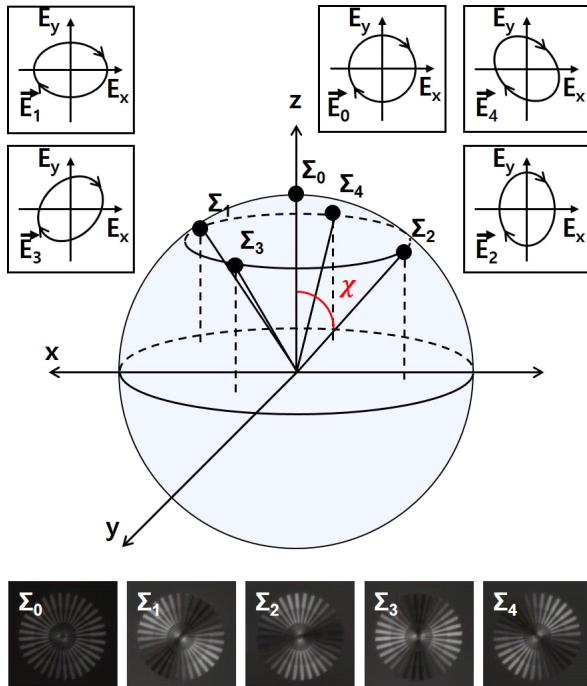


그림 2. (위) 푸앵카레 구에서 5-프레임 알고리즘의 5개의 (α, β) 조건에 따른 입사 빛의 편광 상태 표현. (아래) 각 조건에 해당하는 입사 빛으로 측정된 시료 사진.⁷

그리고 식(2)의 조건별 광도의 조합 값 A와 B는 식(3)으로 표현된다.

$$\begin{aligned}A &= \frac{I_1 - I_2}{I_1 + I_2 - 2I_0} \tan \frac{\chi}{2} = \sin 2\phi \tan \Gamma \\ B &= \frac{I_4 - I_3}{I_4 + I_3 - 2I_0} \tan \frac{\chi}{2} = \cos 2\phi \tan \Gamma\end{aligned} \quad (3)$$

따라서 A, B 값을 통해 아래 식(4)와 같이 시료의 위상지연 크기 Γ 와 느린 광축의 방위각 ϕ (즉 분자 배향)을 계산할 수 있다.⁸

$$\begin{aligned}\Gamma &= \arctan \left[(A^2 + B^2)^{\frac{1}{2}} \right] \text{ for } I_1 + I_2 - 2I_0 \geq 0 \\ \Gamma &= 180^\circ - \arctan \left[(A^2 + B^2)^{\frac{1}{2}} \right] \text{ for } I_1 + I_2 - 2I_0 < 0 \quad (4) \\ \phi &= \frac{1}{2} \arctan \left(\frac{A}{B} \right)\end{aligned}$$

2.2 POLSCOPE 측정 예시 및 활용 분야

앞서 소개한 바와 같이 POLSCOPE를 이용하면 한 번의 측정으로 시료의 분자 배향과 위상지연 크기를 높은 공간 분해능(최대 resolution $\sim 0.2 \mu\text{m}$)과 높은 정확도($\Gamma > 0.02 \text{ nm}$)로 빠르게 시각화 할 수 있다.

이번 장에서는 POLSCOPE를 이용한 고분자 시료의 측정 예시 및 활용 분야를 논의하고자 한다.

그림 3a와 3c는 고분자 fiber의 측면과 단면 현미경 사진이다. 해당 샘플을 POLSCOPE를 통해 측정하면 i) 현미경 사진(그림 3a, c)과 함께 ii) 위치별 분자 배향(즉 고분자 장축 방향, 그림 3b, d), iii) 위치별 위상지연 크기(그림 3e)를 정량적으로 또는 시각적으로 표시할 수 있다. 또한, 측정 시간이 1초 이내로 이루어지기 때문에 온도, 습도와 같은 실험 환경 인자에 따라 변화하는 고분자 분자 배향을 실시간으로 분석할 수 있다.

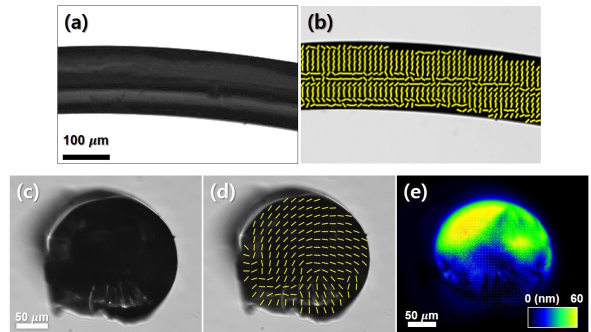


그림 3. POLSCOPE로 측정된 고분자 fiber의 (a,b) 측면과 (c-e)단면의 (a,c) 현미경 이미지, (b,d) 분자 배향 및 (e) 위상지연 크기 구배 이미지.

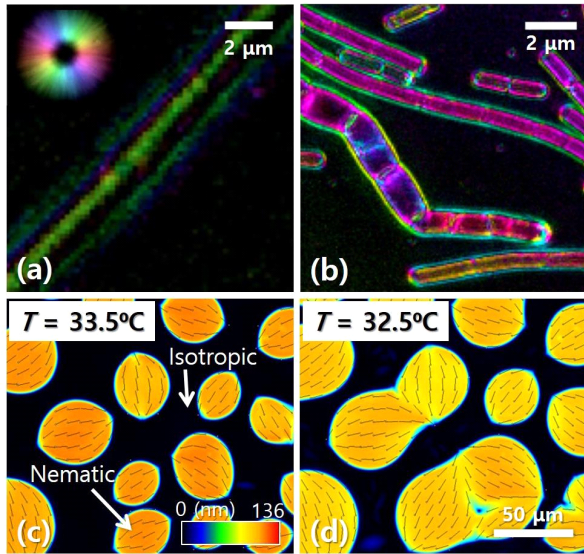


그림 4. POLSCOPE를 통해 측정된 (a,b) 원핵 세포와 (c,d) 액정의 위치별 분자 배향 및 위상지연 크기.^{9,10}

앞서 소개된 측정 이론에 따라, 고분자뿐만 아니라 복굴절을 가지는 어떠한 소재에도 POLSCOPE의 활용이 가능하다.

예를 들어, 원핵 세포벽의 주성분인 펩티도글라이칸(peptidoglycan, PPG)은 복굴절을 가지는 물질이기 때문에, PPG의 합성량 및 분포와 세포벽 성장 간의 상관관계를 POLSCOPE를 통해 분석할 수 있다.⁹ PPG는 서로 다른 복굴절을 가지는 펩타이드 가교결합과 글라이칸(glycan)으로 구성된다(펩타이드 가교결합의 복굴절이 글라이칸보다 크다). 따라서, POLSCOPE를 이용해 그림 4a, 4b와 같이 원핵 세포의 위치별 위상지연의 크기(명도)와 느린 광축의 방향(색상)을 측정할 수 있고, 이를 통해 펩타이드 가교결합은 원핵 세포의 장축 방향을 따라 주로 배향되고, 글라이칸은 단축 방향으로 배향됨을 알 수 있다.

뿐만 아니라, 복굴절을 가지는 대표적 연성 물질인 액정의 특성 분석에서도 유용하게 사용될 수 있다. 그림 4c, 4d와 같이 POLSCOPE를 이용해 액정의 상변이(isotropic-to-nematic) 과정에서 액정 도메인들의 성장과 결합에 따른 분자 배향의 변화를 실시간으로 측정할 수 있다.¹⁰ 이를 통해, 분자 배향과

액정 도메인의 형태 간의 상관 관계 및 위상결합(topological defect)의 형태발생학적 메커니즘의 분석이 가능하였다.

3. 결론

본 총설에서는 일명 POLSCOPE라 불리는 가변 위상지연자 결합형 편광현미경을 통한 고분자 소재의 분자 배향 분석법에 대해 소개하였다. POLSCOPE의 광학 구성 소개를 시작으로, 시료의 위치별 분자 배향 및 위상지연 크기 측정 원리와 고분자/바이오/액정과 같은 다양한 분야에서의 활용 사례를 다루었다.

기존 분석법 대비 여러 장점을 가지는 POLSCOPE 기반 분석법은 고분자 시료의 구조 및 형태에 대한 단순 분석에서 더 나아가 근본적인 물리적/화학적 메커니즘을 이해하는데 있어서 핵심적인 역할을 할 것으로 기대된다.

참고문헌

1. E. M. Chamot, and C. W. Mason, *Handbook of Chemical Microscopy*, 2nd ed., John Wiley, New York, 1958.
2. N. H. Hartshorne, and A. Stuart, *Crystals and the Polarising Microscope: A Handbook for Chemists and Others*, 3rd ed., Arnold, London, 1960.
3. S. Inoue, *Video Microscopy*, Plenum, New York, 1986.
4. W. C. Mccrone, in *Light Microscopy. Physical Methods of Chemistry*, B. W. Rossiter and J. F. Hamilton, Eds., John Wiley, New York, pp. 343-443 (1991).
5. R. Oldenbourg, *Nature*, **381**, 811 (1996).
6. R. A. Meyers, in *Encyclopedia of Physical Science and Technology*, 3rd ed., Academic Press Inc., San Diego, pp. 521-538 (2002).
7. G. Mei and R. Oldenbourg, *SPIE*, **2265**, 29 (1994).
8. M. Shribak and R. Oldenbourg, *Appl. Opt.*, **42**, 3009 (2003).
9. M. F. Dion, M. Kapoor, Y. Sun, S. Wilson, J. Ryan, A. Vigouroux, S. V. Teeffelen, R. Oldenbourg, and E. C. Garner, *Nat. Microbiol.*, **4**, 1294 (2019).
10. Y.-K. Kim, S. V. Shiyankovskii, and O. D. Lavrentovich, *J. Phys. Condens. Matter*, **25**, 404202 (2013).