

МАТЕМАТИЧКА ГИМНАЗИЈА

МАТУРСКИ РАД
ИЗ ФИЗИКЕ

Испитивање карактеристика еванесцентних таласа и њихова примена код снимања танких биолошких узорака

Ученик
Мила ГРУБОВИЋ, IVЦ

Ментор
Алекса ДЕНЧЕВСКИ

Београд, 27.5.2024.

Садржај

1	Увод	1
2	Теоријски увод	2
2.1	Простирање светлости кроз разне средине	2
2.2	Одбијање и преламање светлости	2
2.3	Еванесцентни таласи	4
2.4	Флуоресценција	5
3	Метод и апаратура	6
3.1	Апаратура	6
3.2	Метод	9
4	Резултати	11
5	Дискусија	16
	Литература	16

1

Увод

Еванесцентни таласи представљају таласе који се јављају услед тоталне рефлексије. Ови таласи имају широку примену. Једна од најзначајнијих примена еванесцентних таласа је у флуоресцентној микроскопији. Применом еванесцентних таласа могуће је снимити танак слој узорка са минималном количином зрачења чиме је обезбеђено минимално оштећење узорка (фототоксичност). Такође, еванесцентни таласи обезбеђују бољи однос сигнал шум. Ови таласи се користе за побуђивање диелектричних микросферних резонатора. Могу се користити у фотонским и нанофотонским уређајима као сензори. У овом раду су теоријски обрађене карактеристике еванесцентних таласа као што су зависност интензитета таласа од таласне дужине светлости, зависност дубине продора еванесцентног таласа од упадног угла и зависност опадања интензитета таласа од удаљености границе продора. Затим је развијена експериментална поставка за доказивање постојања еванесцентних таласа и њихову примену за снимање танких биолошких узорака.

2

Теоријски увод

2.1 Простирање светлости кроз разне средине

Брзина светлости у вакууму износи $c = (299792,5 \pm 0,2) \frac{km}{s}$ док је у некој другој средини брзина простирања светлости онолико пута мања колико износи апсолутни индекс преламања (n) за ту средину.

$$v = \frac{c}{n} \quad (2.1)$$

Оптичка густина средине дефинише се као однос брзине простирања светлости кроз вакуум и брзине простирања кроз ту средину.

$$n = \frac{c}{v} \quad (2.2)$$

На основу овога је оптички гушћа средина она у којој је брзина простирања таласа мања, односно индекс преламања већи. Основна карактеристика светлости је фреквенција. Њу одређује стање атома који емитује светлост и она се не може променити. Па тако приликом простирања светлости кроз неку другу средину, долази до промене таласне дужине као и брзине простирања таласа, али фреквенција остаје непромењена.

$$\nu = \frac{v_1}{\lambda_1} = \frac{v_2}{\lambda_2} \quad (2.3)$$

$$n_1 \lambda_1 = n_2 \lambda_2 \quad (2.4)$$

2.2 Одбијање и преламање светлости

Приликом преласка светлости из једне у другу средину на граничној површини, која раздваја те две средине, долази до промене правца кретања. Та појава назива се преламање светлости.

Промена правца кретања светлости из једне у другу средину различите оптичке густине, описана је Декарт-Снелијусовим законом. Угао θ_1 је упадни угао таласа који представља угао између светлосног зрака и нормале на граничну површ, док је угао θ_2 угао преламања који представља угао између преломљеног светлосног зрака и нормале на граничну површ.

$$\frac{\sin\theta_1}{\sin\theta_2} = \frac{\eta_2}{\eta_1} \quad (2.5)$$

Уколико светлост прелази из оптички ређе у оптички гушћу средину, упадни угао је већи од угла преламања. У супротном, ако се светлост креће из оптички гушће у оптички ређу средину, упадни угао ће бити мањи од преломног угла. Светлосни зраци се на граничној површини између две оптички различите средине рефлектују под истим углом у односу на нормалу на граничну површ, под којим на њу и падају.

Када светлосни зрак прелази из оптички гушће у оптички ређу средину, односно из средине са већим у средину са мањим индексом преламања, пропуштени зрак се удаљава од нормале. Уколико светлост падне под одређеним углом, преломни зрак се може налазити под правим углом у односу на нормалу на граничну површ, односно у равни са границом између две средине, такав угао се назива критични (гранични) угао.

$$\theta_c = \arcsin \frac{\eta_2}{\eta_1} \quad (2.6)$$

У случају када је упадни угао већи од критичног угла, упадни зрак се неће преломити већ ће се потпуно рефлектовати од граничне површине. Ова појава назива се тотална рефлексија, где је θ_c гранични угао тоталне рефлексије.

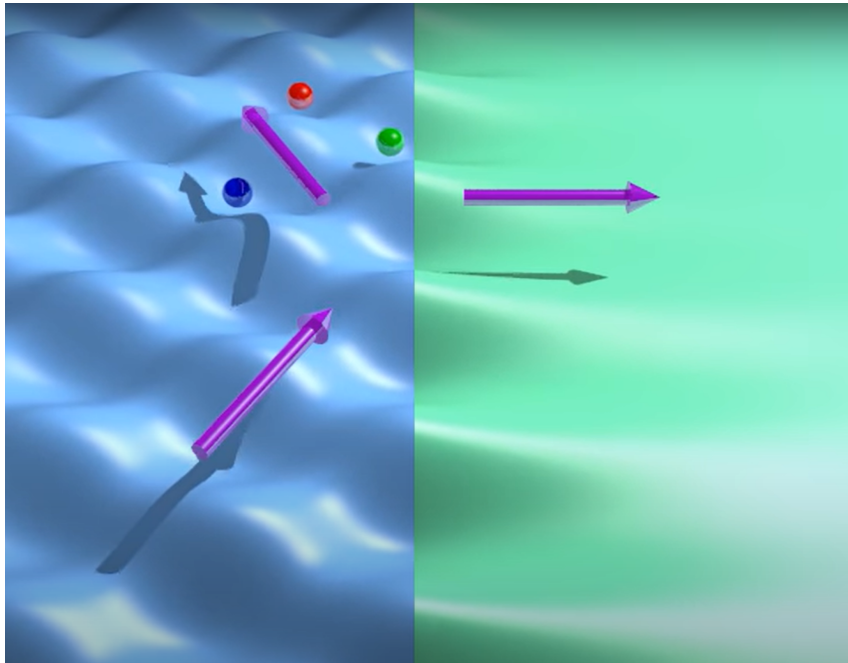
2.3 Еванесцентни таласи

Када светлосни зрак прелази из оптички гушће у оптички ређу средину, односно појавом тоталне рефлексije, пропуштени зрак ће се кретати паралелно са површином оптички ређе средине. Такав талас се назива еванесцентни талас. На слици 2.1 приказан је начин простирања еванесцентног таласа. Његов интензитет ће експоненцијално опадати при удаљавању од тачке продора. Та зависност представљена је једначином 2.7 где z представља удаљеност од тачке продора, а d дубину продора еванесцентног таласа.

$$\frac{I}{I_0} = e^{-\frac{z}{d}} \quad (2.7)$$

Дубина продора еванесцентног таласа, као и интензитет таласа зависе и од индекса преламања средине на коју светлост наилази n_2 , критични угао $\sin\theta_c$, и од самих карактеристика светлости као што су таласна дужина λ , њен упадни угао $\sin\theta_i$. Ова зависност описана је следећом једначином.

$$d = \frac{\lambda}{4\pi n_2} \left(\frac{\sin^2\theta_i}{\sin^2\theta_c} - 1 \right)^{-\frac{1}{2}} \quad (2.8)$$



Слика 2.1. Простирање еванесцентног таласа на граници две средине

2.4 Флуоресценција

У стандардним условима већина молекула заузима најнижи вибрациони ниво, односно енергије вибрационог кретања око њиховог равнотежног стања. Када светлост интерагује са молекулом, молекул може апсорбовати квант светлости и тиме постати побуђен. Један од начина преласка молекула са вишег на нижи енергетски ниво је радијациони прелаз, када се апсорбована енергија емитује у облику светлости која се одликује већим таласним дужинама тј. мањим енергијама него апсорбована светлост. Ова појава назива се фотолуминесценција. Према времену које протекне од побуђивања до емисије светлости, фотолуминесценција дели се на флуоресценцију и фосфоресценцију. Уколико се радијациони прелаз дешава тренутно никако непрекидно у питању је флуоресценција. Флуоресценција процес код ког се зрачење емитује у свим правцима што је у супротности са ласерским зрачењем које је усмерено. За постизање флуоресценције се најчешће користе ласери из видљивог и ултраљубичастог дела спектра. Са повећањем снаге ласерског зрачења повећава се интензитет флуоресценције. Након неке критичне снаге долази до сатурације. Сатурација је стање у ком молекули емитују максималан број фотона. Повећањем снаге побудног зрачења може да дође до фототоксичности и фотоизбељивања узорака. На флуоресценцију утичу температура, концентрација узорка, pH вредност као и присуство других супстанци.

Преласком са са првог побуђеног синглетног стања на основно стање долази до појаве зване флуоресценција. Доминантан прелаз за флуоресценцију је увек исти, без обзира на стање на које прелази побуђни електрон услед енергије фотона који побуђује молекул. Када се електрон налази у вибрационом стању, њега можемо описати вибраторним таласном функцијом. Таласне функције ће бити преклопљеније ако су стања блиских енергија. У случају великих преклапања вибрационих таласних функција, доћи ће до брзих прелаза на нижа вибрациона стања. Када систем дође у вибрационо стање најближе доминантном побуђеном стању он ће на исти начин прећи на електронско стање због блискости енергије електронског и првог вибрационог стања. Такође, показано је да интензитет флуоресценције тј. емисија фотона зависи од таласне дужине фотона који су побудили молекул. Једна од физичких величина која је повезана са флуоресценцијом је квантни принос. Када је квантни принос мали значи да се већина апсорбоване енергије емитује кроз термалну релаксацију. Уколико је квантна ефикасност велика тада флуоресценција преовлађује у односу на ослобађање топлоте.

Постоје два типа флуоресцентних спектра, емисиони и апсорпциони. Емисиони спектар је померен ка већим таласним дужинама у односу на апсорпциони спектар због губитка у енергији који настаје услед вибрационе релаксације.

3

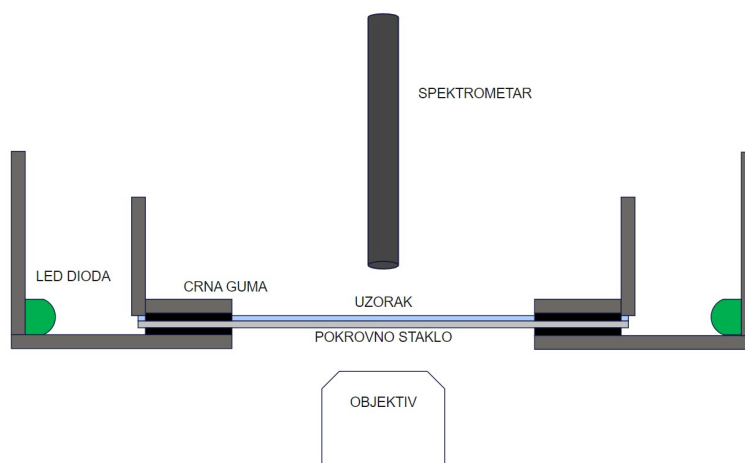
Метод и апаратура

3.1 Апаратура

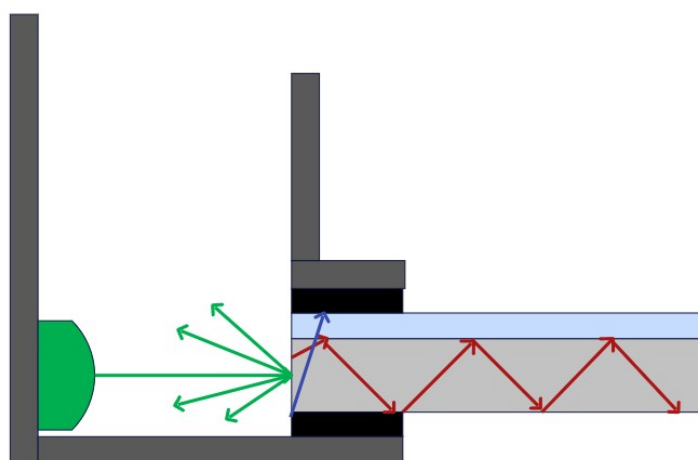
Направљена је апаратура са циљем да се докаже постојање еванесцентних таласа као и да се омогући снимање обојених биолошких узорака који су побуђени еванесцентним таласима. За апаратуру је коришћено следеће:

1. Метална шупља посуда у облику ваљка
2. Метална шупља посуда у облику ваљка мањег пречника
3. Метално дно за посуде
4. Црна гума
5. Покровно стакло
6. Три лед диоде таласних дужина 465 nm
7. Три лед диоде таласних дужина 565 nm
8. Три лед диоде таласних дужина 625 nm
9. Инвертовани микроскоп
10. Пропидијум јодид

Апаратура је састављена као што је приказано на слици 3.1. У посуду облика ваљка већег пречника стављена је друга посуда мањег пречника. Испод мање посуде постављено је покровно стакло које се налази између две црне гуме које ће апсорбовати сво зрачење изузев еванесцентних таласа. На покровно стакло додат је танак слој воде. За зидове веће посуде залепљене су по три диоде различите таласне дужине. Лед диоде исте боје повезане су на



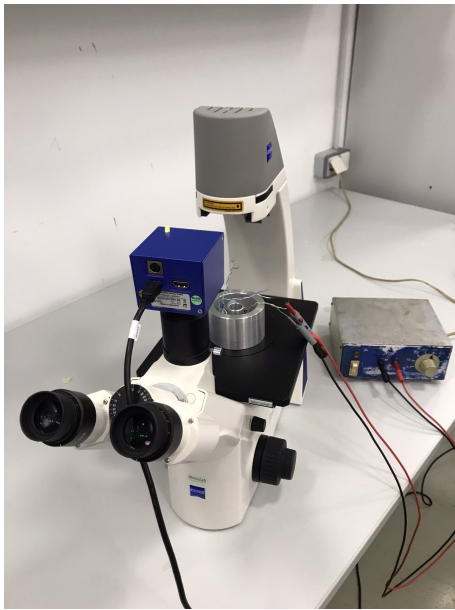
Слика 3.1. Скица састављене апаратуре



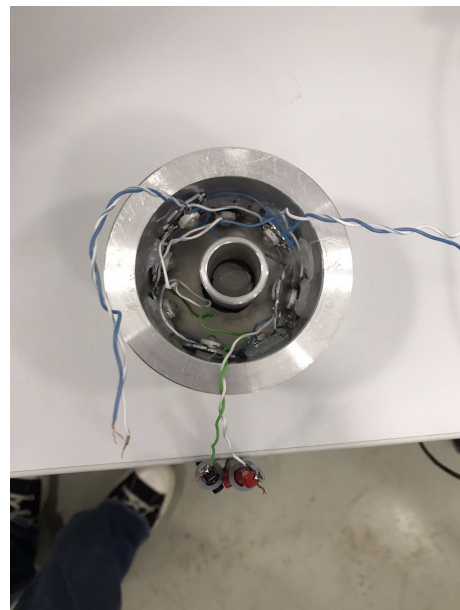
Слика 3.2. Скица простирања светлосних зрака кроз састављену апаратуру

извор константе струје, при чему је опсег струје између 5 mA и 500 mA Тако састављена апаратура је постављена на инвертовани микроскоп. На сликама 3.3 и 3.4 је приказна поставка апаратуре.

Како светлост лед диоде путује под свим угловима, зидови мање посуде спречавају продор директне светлости ка узорку. При преласку из ваздуха у стакло, углови већи од критичног доводиће до тоталне рефлексије при чему ће светлост кренути да путује кроз стакло. Таласи чији је упадни угао мањи од критичног ће наићи на црну гуму која ће их апсорбовати. Када светлост наиђе на воду чији је индекс преламања мањи од индекса преламања стакла доћи до појаве еванесцентних таласа, који ће се простирати кроз воду.



Слика 3.3. Инвертовани микроскоп са апаратом за доказивање еванесцентних таласа.



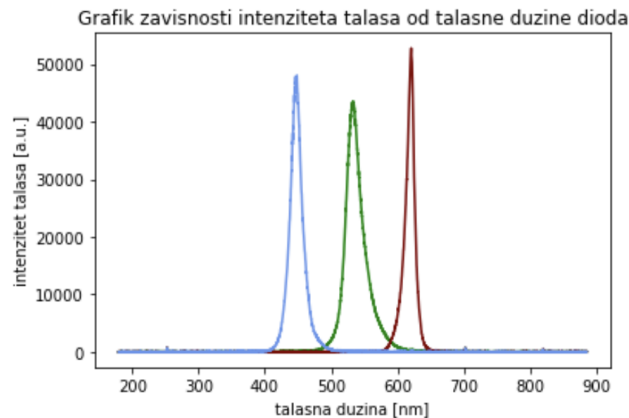
Слика 3.4. Саставни део апаратуре

3.2 Метод

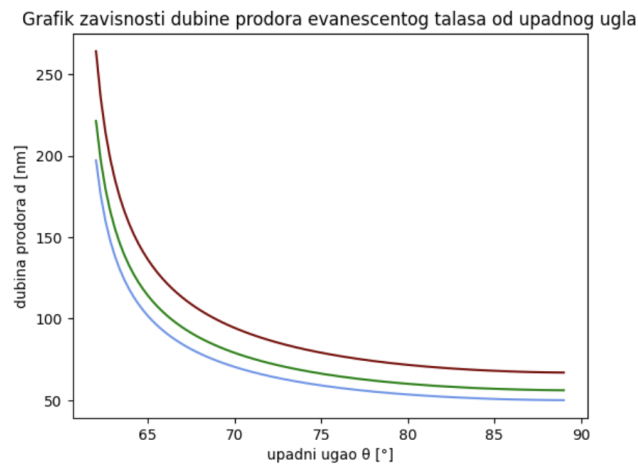
Првобитно су испитане карактеристике за таласне дужине све три лед диоде. Најпре су употребљене таласне дужине диода дате од стране произвођача, чиме је одређен интензитет таласа у зависности од таласне дужине, дубина продора еванесцентног таласа у зависности од упадног угла, као и зависност опадања интензитета таласа од растојања границе две површине.

Прво је испитана зависност интензитета таласа од таласне дужине (слика 3.6). Добијено је да је интензитет највећи за таласну дужину 465 nm у случају плаве диоде, 565 nm у случају зелене диоде и 625 nm у случају црвене диоде (респективно). Затим је испитивана зависност дубине продора еванесцентног таласа од упадног угла (слика 3.7). Примећено је да еванесцентни таласи веће таласне дужине имају већи продор што показује и формула 2.8. Из овог графика је уочено да дубина продора еванесцентног таласа експоненцијално опада са порастом упадног угла таласа. И на послетку, са графика зависност опадања интензитета таласа од растојања границе две површине (слика 3.8), уочава се експоненцијални пад интензитета таласа са порастом удаљености од границе две средине као што је и очекивано на основу формуле 2.7.

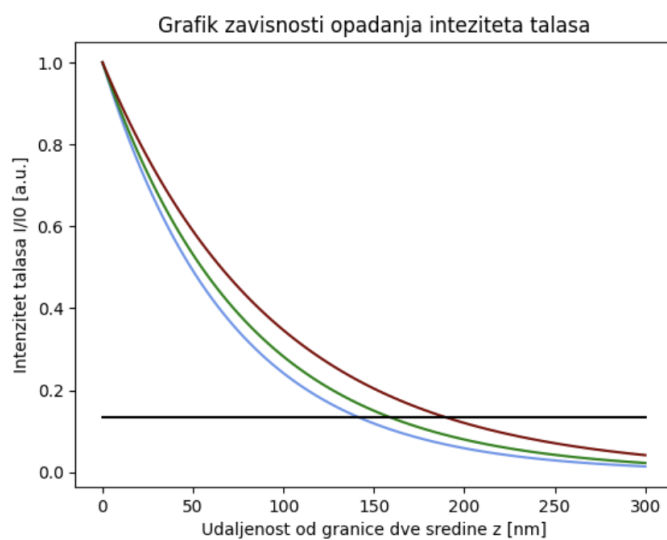
Потом су спектрометром измерене таласне дужине диода па су са добијеним вредностима опет испитане све наведене карактеристике. На графику 3.5 приказни су видљиви спектри коришћених диода, док је на графику 3.6 приказана зависност дубине продора еванесцентног таласа од упадног угла.



Слика 3.5. Спектар лед диода различите таласне дужине



Слика 3.6. График зависности дубине продора еванесцентног таласа од упадног угла

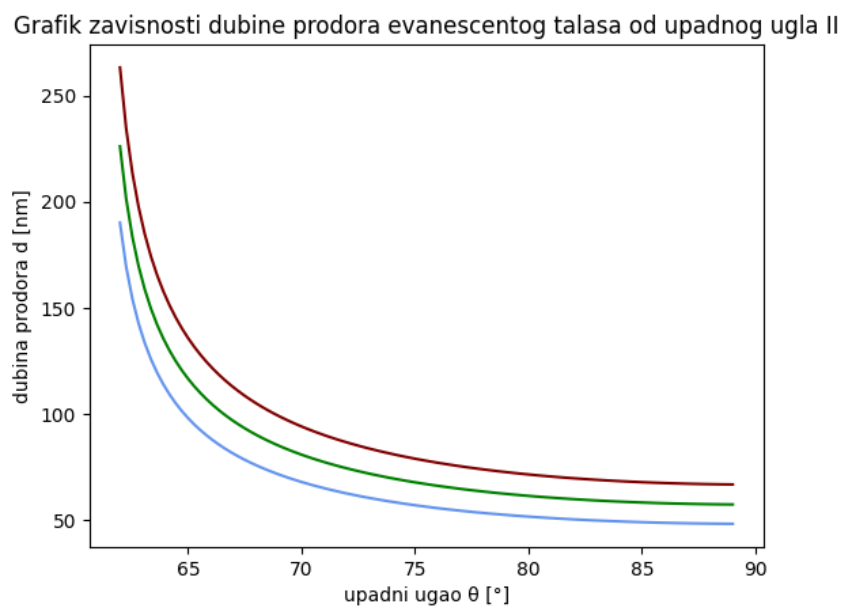


Слика 3.7. График зависности опадања интензитета таласа од удаљености од границе две средине

4

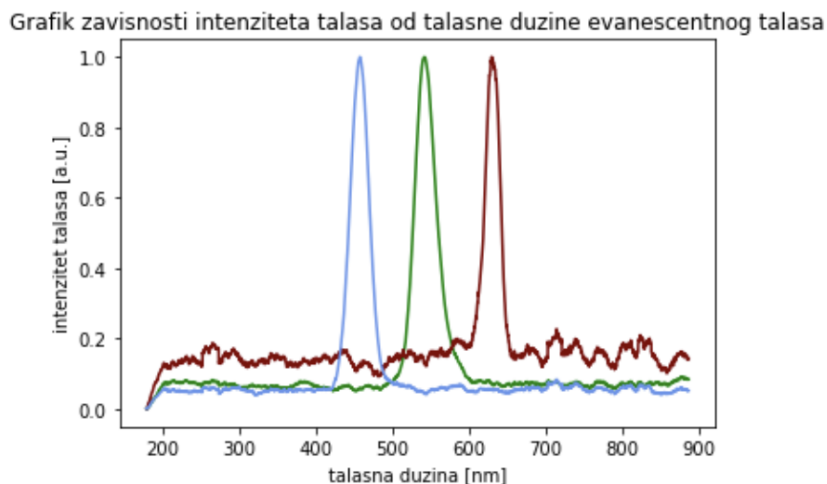
Резултати

Спектрометром је измерена емисија лед диода, након чега је нацртан график зависности дубине продора еванесцентног таласа од упадног угла. График, са слике 4.1, приказује како ће дубина продора еванесцентног таласа опадати са повћањем упадног угла. Са поменутог графика су очитане и вредности дубине продора еванесцентног таласа за све три различите таласне дужине при упадном углу од 70° . Добијене су следеће вредности. Дубина продора еванесцентног таласа за плаву диоду $70,4 \text{ nm}$, за зелену диоду $79,1 \text{ nm}$ и за црвену диоду $94,4 \text{ nm}$.



Слика 4.1. График зависности дубине продора еванесцентног таласа од упадног угла, где су коришћене измерене таласне дужине

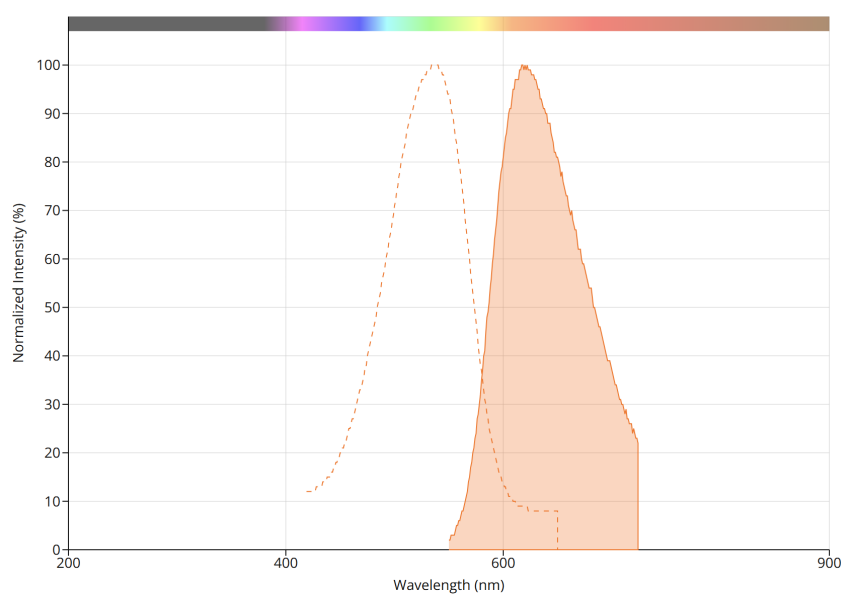
Након поставке апаратуре је спектрометром је одређен и нормиран график зависности интензитета еванесцентног таласа од његове таласне дужине. Са споменутог графика (слика 4.2) уочавају се спектри коришћених диода.



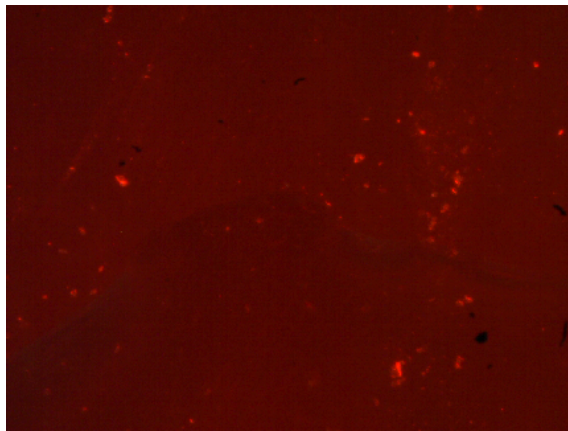
Слика 4.2. График зависности интензитета таласа од таласне дужине еванесцентног таласа

Директном светлошћу је побуђен раствор пропидијум-јодида. Спектар пропидијум јодида флуоресцира у црвеном делу спектра. Тиме је добијен снимак његове флуоресценције. Сlike 4.5 и 4.6 показују побуђен пропидијум-јодид који флуоресцира у црвеном делу спектра, док на слици 4.4 видимо да не долази до побуде пропидијум-јодида. Пропидијум јодид је једињење са флуоресцентним својствима. Апсорбциони спектар пропидијум јодида се налази између 480 nm и 550 nm , са максималним пиком на таласној дужини од 539 nm . Емисиони спектар пропидијум јодида се налази између 600 nm и 640 nm , са максималним пиком на таласној дужини од 619 nm . Апсорпциони и емисиони спектар пропидијум јодида можемо видети на слици 4.3. Пропидијум јодид не може да се побуди црвеном светлошћу због тога што према његовом апсорпционом спектру он не апсробује црвене фотоне.

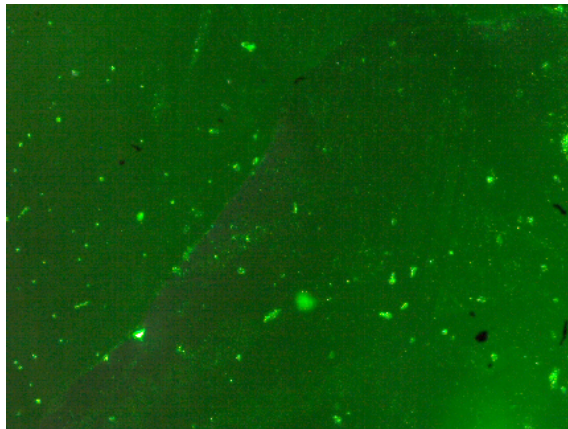
Испитане флуоресцентне карактеристике пропидијум јодида искоришћене су за доказивање еванесцентног таласа. Еванесцентним таласом успешно је побуђен пропидијум јодид. Доказ еванесцентног таласа представља јасно присуство црвене боје, односно флуоресценције. Слика 4.7 приказује како као и са директном светлошћу, у црвеном делу спектра побуде нема. Доказ присуства еванесцентног таласа се може видети на сликама 4.8 и 4.9.



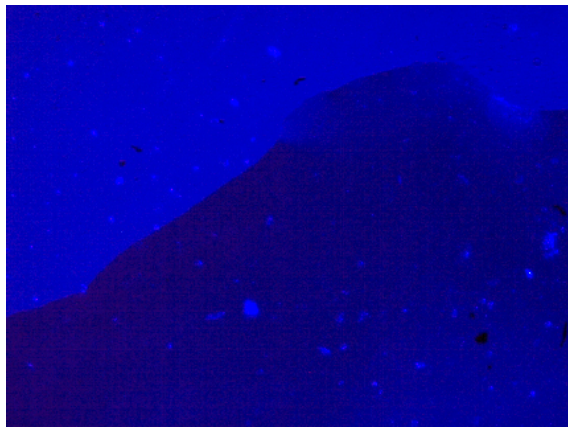
Слика 4.3. Апсорпциони и емисиони спектар пропидијум јодида



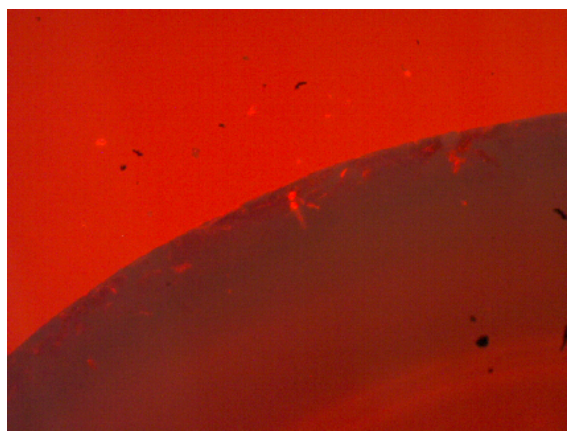
Слика 4.4. У црвеном делу спектра не долази до побуде пропидиум јодида



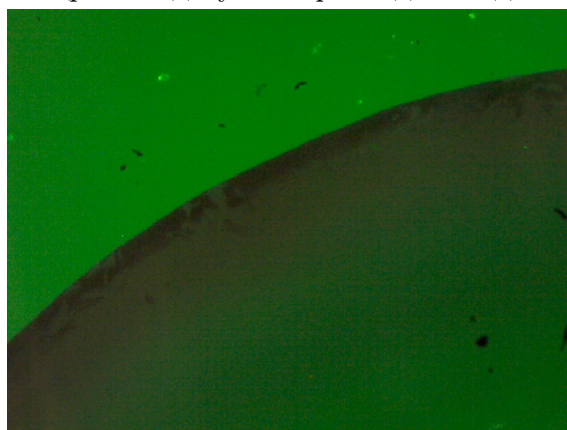
Слика 4.5. Побуда пропидиум јодида директно оствељном зеленом лед диодом 565 nm



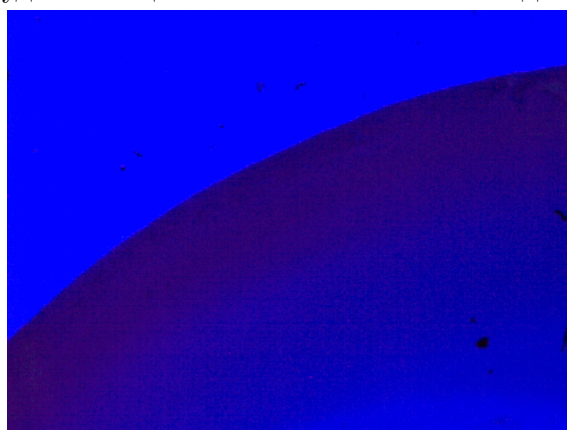
Слика 4.6. Побуда пропидиум јодида директно оствељном плавом лед диодом 465 nm



Слика 4.7. У црвеном делу спектра не долази до побуде 625 nm



Слика 4.8. Побуда еванесцентним таласом из зеленог дела спектра 565 nm



Слика 4.9. Побуда еванесцентним таласом из плавог дела спектра 465 nm

5

Дискусија

Успешно су испитане карактеристике еванесцентних таласа и доказано је њихово постојање. Испитана је зависност дубине продора еванесцентног таласа од упадног угла, чиме је показано да дубина продора еванесцентног таласа експоненцијално опада са порастом упадног угла. Показана је и зависност интензитета таласа у зависности од удаљености од границе две средине, одакле је закључено да интензитет експоненцијално опада са порастом удаљености од границе две средине. Након испитивања самих карактеристика еванесцентних таласа, снимљен је узорак пропиридијум-јодида побуђен еванесцентним таласом. Услед појаве црвене боје, при осветљавању зеленом и плавом лед диодом, доказано је и присуство еванесцентног таласа. Како је дубина продора еванесцентних таласа јако мала (око 200-250 nm) узорак је био превише велик како би га талас побудио. Коришћење праха хитина би требало да покаже успешније резултате.

Литература

- [1] Ramachandran, S., Cohen, D. A., Quist, A. P., & Lal, R. (2013). High performance, LED powered waveguide based total internal reflection microscopy. *Scientific reports*, 3(1), 2133.
- [2] Milosevic, Milan. "On the nature of the evanescent wave." *Applied spectroscopy* 67.2 (2013): 126-131.
- [3] Jameson, David M. *Introduction to fluorescence*. Taylor Francis, 2014.
- [4] Axelrod, Daniel. "Total internal reflection fluorescence microscopy in cell biology." *Traffic* 2.11 (2001): 764-774.
- [5] Oreopoulos, John, and Christopher M. Yip. Combined scanning probe and total internal reflection fluorescence microscopy. *Methods* 46.1 (2008): 2-10.
- [6] Ramachandran, Srinivasan, et al. "High performance, LED powered, waveguide based total internal reflection microscopy." *Scientific reports* 3.1 (2013): 2133.