

Komentář k prezentaci „Fluorescence“ a motivační demonstrační pokusy

slide 1: úvod

slide 2: Co je fluorescence?

Předpokládám, že žáci odpoví něco ve smyslu „světlo“, „svícení“...

Ve skutečnosti „světlo“ jsou všechny pojmy zmíněné ve schématu a fluorescence je jen malou částí z nich.

slide 3: Incandescence

Podle obrázků žáci mohou hádat, jaká fyzikální veličina kromě světla se uvolňuje u znázorněných procesů.

Incandescenci lze také přeložit jako zářivost, oba pojmy jsou však velice málo používané, proto jsem se přiklonila k zachování anglického výrazu. Navzdory tomu, že pojem je využíván málo, je tento jev velice častý. Jedná se uvolnění energie ze systému produkcí světla a zároveň tepla. Děje se tak například u žárovky, slunce, plamenu nebo u roztavených kovů či hornin - lávy. Demonstrace studentům ve výuce s použitím plamene či žárovky se přímo nabízí.

následující pojem není v prezentaci uveden a shrnuje do sebe všechny následující jevy:

Luminiscence je pojem pocházející z latiny, který byl poprvé použit již v roce 1888 Elhardem Wiedemannem. Soustřeďuje v sobě všechny jevy, při kterých dochází k produkci světla, ale nikoliv tepla. Často je označována jako studené světlo.

slide 4: Triboluminiscence

Triboluminiscence je emise světla vznikající působením mechanických sil na uspořádané krystaly. Jiné jevy využívající ke vzniku světla taktéž mechanickou sílu lze sdružit pod pojem mechanoluminiscence. Sem patří například světlo vznikající natahováním lepidla při rozlepování samolepicí obálky. Zdrojem energie pro excitaci atomů je právě tato mechanická energie (tento pojem ale nebyl zahrnut v převzatém úvodním obrázku v prezentaci, proto jsem pojmy zahrnula do sebe).

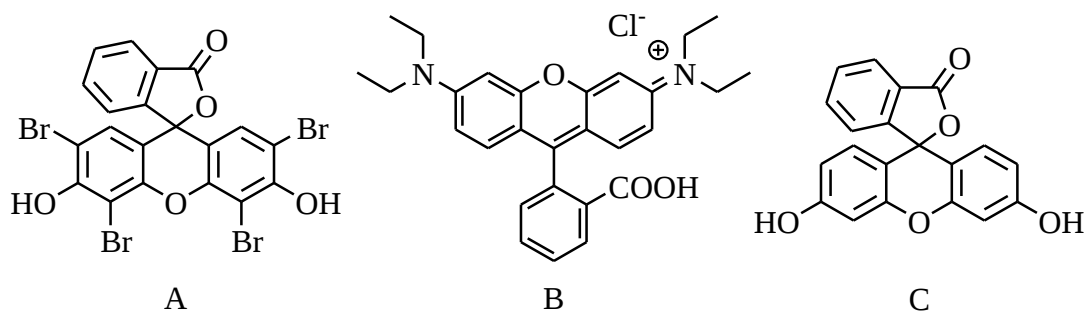
- při rozlepování zalepené samolepicí obálky vzniká světlo (musí být absolutní tma, ve výuce je špatně pozorovatelné; doporučuji zadat za domácí úkol

- světlo při drcení krystalů není v „domácích“ podmínkách pozorovatelné (pravděpodobně kvůli malé síle působící na krystaly a neprůhledné třecí misce

slide 5: Chemiluminiscence

Jak název napovídá, je chemiluminiscence jev, kdy světlo vzniká jako produkt chemické reakce. Respektive chemickou reakcí se uvolňuje energie, která je následně využita k excitaci atomů (absorpce energie). Ty pak přijatou energii vyzáří ve formě světla.

Ve většině chemiluminiscenčních reakcí se energie uvolní reakcí dvou látek, třetí látka zvaná luminofor je schopna energii přijmout a následně vyzářit ve formě světla (například u zábavních „lightstick“ tyčinek). Existují však i látky, které po zreagování mohou energii přijmout a vyzářit samy bez přítomnosti luminoforu (např. luminol). Luminofony (například eosin, rhodamin B, fluorescein - viz obrázek 1) jsou látky s rozsáhlým systémem konjugovaných vazeb, jimi emitované barvy se mohou nacházet v široké části světelného spektra (Tabulka 1).



Obrázek 1: A - eosin, B - rhodamin B, C - fluorescein

Tabulka 1: Fluorescenční barviva (luminofony) a barvy jimi emitovaného světla

Barvivo	Emitovaná barva
fluorescein	zeleno-žlutá
rhodamin B	červená
eosin	žlutá
nilská modř A	červená
kumarin	zelená

Pokusy vhodné k demonstraci:

1. luminol

- oxidace luminolu peroxidem vodíku v zásaditém prostředí s katalyzátorem Fe^{2+}

- světlo vzniká smísením roztoků A a B 1:1 (je možno je připravit předem)

roztok A: V 60 ml destilované vody rozpustíte 0,4 g uhličitanu sodného a 0,1 g luminolu. Po rozpuštění obou látek přidejte 2,4 g hydrogenuhlíčitanu sodného, 5 g uhličitanu amonného a 0,4 g červené krevní soli (hexakvanoželezitan draselný). Po rozpuštění všech látek doplňte vodou na 100 ml.

(někdy uváděný katalyzátor Cu^{2+} není příliš vhodný, neboť ionty jsou peroxidem rychle oxidovány na Cu^{3+} a světlo je pak pozorováno pouze jako velice krátký záblesk)

roztok B: 6 ml 30% peroxidu vodíku doplňte vodou do 100 ml

(roztok A lze připravit i jednodušeji, ale pak je potřeba připravovat si vždy čerstvý před demonstrací:

Jednu pecičku hydroxidu sodného rozpustíme v 60 ml destilované vody, přidáme 0,1 g luminolu. Po rozpuštění doplníme vodou na 100 ml)

- luminol svítí modře, před smísením A a B lze do roztoku A přidat několik krystalků fluorescenčního barviva pro změnu barvy - fluorescein (žlutá), eosin (oranžová), rhodamin (červená)

2. bis(2,4-dinitrofenyl)oxalát (DNPO)

- při oxidaci peroxidem vodíku v aprotickém rozpouštědle a následném rozpadu DNPO vzniká energie; tato energie je pohlcena přidaným fluorescenčním barvivem a vyžářena v podobě viditelného záření

20 mg fluorescenčního barviva (fluorescein, rhodamin, eosin a pod.) rozpustíme v 30 ml ethylacetátu (aprotické rozpouštědlo) a přidáme 0,5 ml 30% peroxidu vodíku. Přidáme asi 50 mg DNPO, roztokem mícháme.

- roztok připravujeme na místě, neboť není stabilní

3. „lightsticks“ (svítící tyčinky)

- tyčinka se skládá ze dvou trubiček vložených do sebe - vnější plastová a vnitřní skleněná

- rozlomením vnitřní tyčinky dojde ke smísení roztoků a uvolnění fotonů

- princip je stejný jako u DNPO - ve vnější vrstvě je peroxid ve směsi tercbutanolu s dibutylftalátem (směs aprotických rozpouštědel), ve vnitřní vrstvě je bis(2,4,6 - trichlorfenyl)oxalát (analog DNPO) s fluorescenčním barvivem

slide 6: Bioluminescence

Bioluminescence je produkce světla živým organismem a to buď přímo jeho vlastní metabolickou drahou nebo s pomocí symbiotických organismů. V současné době známe bioluminiscenční bakterie, prokaryota, houby, živočišné houby, koryše, hmyz a ryby. Mnoho organismů se vyvinulo v hlubokomořských ekosystémech, kde přirozeně přetrvává tma. Světlo tam organismy využívají k lákání zvědavé kořisti, anebo partnerů k rozmnožování. *Noctiluca* žije v příbojových zónách, rozsvěcuje se při nárazu vln na pobřeží. Medúza *Aequorea victoria* posloužila jako zdrojový organismus pro izolaci genu pro GFP (green fluorescent protein), zeleně světélkující protein, který se dnes používá ke značení preparátů v biologii. V našich podmínkách se lze setkat se světluškou, na které se dříve prováděly bioluminiscenční pokusy. Dnes je však světluška chráněná, pokusy s ní nemohou být prováděny.

Princip bioluminescence byl zkoumán už od 17. století, ale odhalil ho až v 19. století Raphael Dubois. Pomocí světelných orgánů světlušek a teplé a studené vody zjistil, že pro vznik světla je potřeba kyslík a substance, kterou nazval luciferin (lux = světlo, feró = nesu). Enzym, který reakci spouští pak nazval luciferáza.

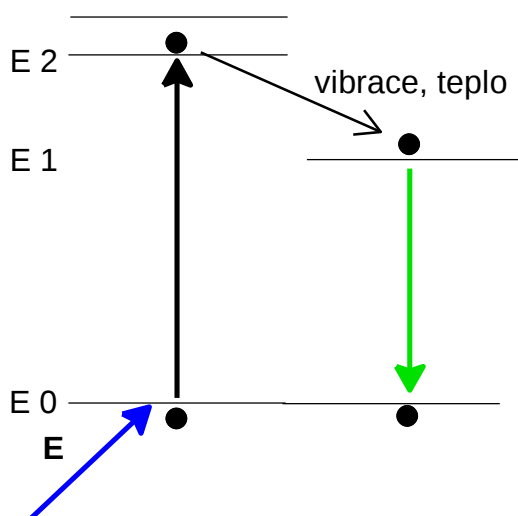
slide 7: Atom

Tento snímek slouží jako opakovací pro učivo chemie a fyziky o stavbě atomu. Důležitý je poznatek o elektronovém obalu - uspořádání elektronů ve vrstvách o různých energiích, které se směrem od

středu zvyšují. Hodí se i znalost znázorňování elektronových orbitalů pomocí „rámečků“ (Hundovo pravidlo).

Slide 8: Fluorescence

Při fluorescenci světlo vzniká tak, že atom či molekula nejprve přijme energii fotonu (excituje se) a následně dojde k emisi této energie opět ve formě světla. Mezi excitací a emisí dochází navíc ke ztrátě části energie kvůli zvýšeným vibracím atomů nebo molekul (tzv. vnitřní přeměna). Z toho důvodu má emitované světlo vždy delší vlnovou délku než světlo excitační, a s tím spojenou nižší energii. Tento jev je označován jako Stokesův posun. K produkci světla dochází pouze v době osvětlení excitačním paprskem, protože fluorescence je krátkodobý jev ($\sim 10^{-9} - 10^{-7}$ s). Princip je popsán na schématu, které zobrazuje obrázek 2.



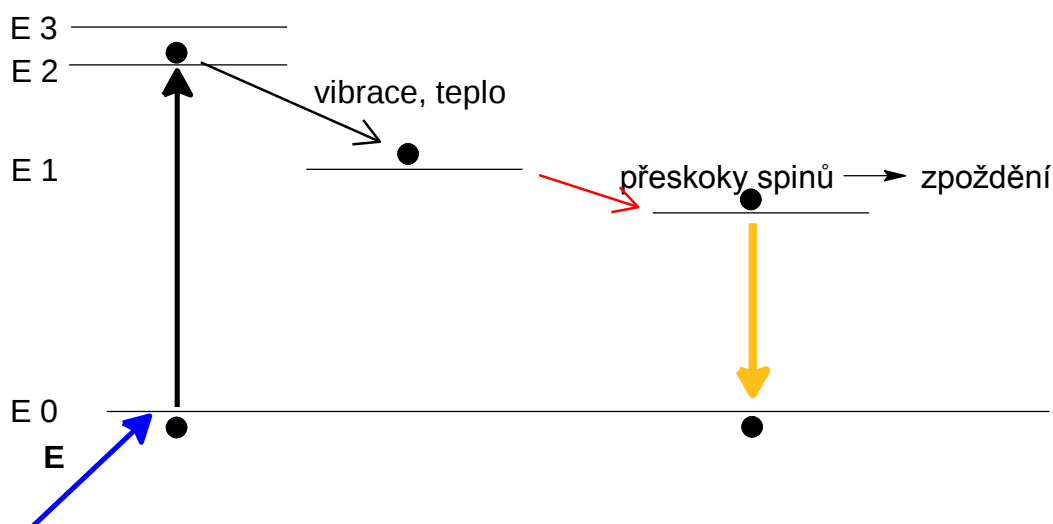
Obrázek 2: Energetické změny v atomech/molekulách během fluorescence. Částice přijme energii E ve formě světelného záření, její energie se zvýší ze základní hladiny E0 na hladinu E2. Vibracemi a vyzařováním tepla dochází ke ztrátě energie, částice se dostává na energetickou hladinu E1. Poté dochází k emisi světla a částice se opět dostává do základního stavu E0. Emitované světlo má nižší energii (zelená šipka) než excitační světlo (modrá šipka).

Slide 9: Fosforescence

Tento jev je v hlavních rysech velice podobný fluorescenci. I zde dochází k excitaci částic světlem a následné emisi energie v podobě světelného záření. Hlavní rozdíl spočívá v délce trvání. Různé zdroje uvádí různá časová rozmezí, $\sim 10^{-5} - 10$ s nebo minuty až hodiny. Důvodem tohoto zpoždění jsou změny uvnitř atomů a molekul, takzvané mezisystémové přechody spojené se změnou spinu.

Pokud má atom či molekula ve svém základním stavu v jednom orbitalu dva elektrony, musí se podle Hundova pravidla lišit spinem (znázorňuje se šipkami). Pokud jeden z elektronů přijme energii, excituje se a „přeskočí“ do vyšší energetické hladiny. Následně vyzařuje malá množství energie, nejčastěji vibracemi ve formě tepla, a jeho energie zvolna klesá. Při tomto vyzařování energie, tzv. vnitřní přeměně, se může stát, že elektron přeskočí mezi orbitály na stejné energetické hladině a

změní při tom spin. Tento jev, který není příliš častý, se nazývá mezisystémový přechod. Při dalším výdeji energie teplem a klesání v energetických hladinách dojde k tomu, že s následujícím poklesem energie by musely v jednom orbitalu být dva elektrony se stejným spinem, což není možné - přechod je spinově zakázaný. V tomto okamžiku dochází k časové prodlevě, kdy elektron musí nejprve při přeskoku do orbitalu o stejné energii změnit spin a až poté může vydat energii ve formě světla a obsadit základní hladinu. Schéma je znázorněno na obrázku 3.



Obrázek 3: Energetické změny v atomech/molekulách během fosforescence. Částice přijme energii E ve formě světelného záření, její energie se zvýší ze základní hladiny E_0 na hladinu E_2 . Vibracemi a vyzařováním tepla dochází ke ztrátě energie, částice se dostává na energetickou hladinu E_1 . Při mezisystémových přeskokoch dochází ke změně spinu. V této fázi nemůže dojít k přechodu do základního stavu E_0 , protože přechod je spinově zakázaný. Nejprve musí dojít pomocí přeskoků k návratu původního spinu a až potom může být vyzářena energie ve formě světla a částice se opět dostává do základního stavu E_0 . Emitované světlo má nižší energii (oranžová šipka) než excitační světlo (modrá šipka).

Fosforescence i přes složitost své podstaty je studentům známá díky fosforeskujícím hračkám, přívěškům na klíče a podobně. Na nich lze fosforescenci také s úspěchem demonstrovat. "Nasvícení objektu je lépe provádět s UV diodou, je to rychlejší a intenzivnější než s klasickou žárovkou.

Slide 10: Světlo

opakovací snímek znázorňující viditelné spektrum a vztah vlnové délky s energií záření - důkaz nepřímé úměry „čím kratší vlnová délka, tím vyšší energie“.

Odůvodnění toho, proč se ztrátou energie částic tepelnými vibracemi dochází ke změně barvy emitovaného světla směrem od modré k červené. Vzhledem k tomuto jevu je v putovním mikroskopu použita dioda emitující modré světlo (s relativně vysokou energií), tak je možno pozorovat větší počet barev, neboť zbytek viditelného spektra má nižší energii.

E – energie

h – Planckova konstanta – energie jednoho kvanta záření = 1 foton o frekvenci ν

ν – frekvence

c – rychlost světla

λ – vlnová délka

posun = Stokesův posun

Slide 11: Fluorescenční mikroskop

Světlo z modré diody (modrá šipka) osvětluje preparát, kde excituje částice. Ty následně emitují záření o nižší energii (zelená šipka). Obě záření postupují optickou soustavou vzhůru. Kdyby v tomto okamžiku dorazily až do okulárů, viděli bychom pouze intenzivní excitační modrou, UV navíc poškozuje zrak. Z tohoto důvodu je paprskům do cesty postaven filtr, který odfiltruje právě modré excitační světlo. Ostatní paprsky projdou do okuláru.

Z tohoto důvodu můžeme v putovním mikroskopu pozorovat vícebarevné obrázky.

Slide 12 - parožnatka (*Platyseria*), výtrusnice

Slide 13 - ostřice - list

Slide 14: Fotografie z profesionálního fluorescenčního mikroskopu

Tyto mikroskopy mají filtry, které obvykle propouští jen úzké spektrum barev, filtrů mají několik. Najednou můžeme v preparátu excitovat více barev, přes filtr však vidíme právě jednu. Filtry se mohou střídat.

Na obrázku jsou dvě fotografie lidských fibroblastů (HeLa buňky) téhož místa na preparátu pozorované se dvěma různými filtry. Každé z barviv barví jinou strukturu v buňce a má jinou barvu.

DAPI - DNA, modrá a phalloidin – aktin, červená

Slide 15: snímky zhotovené pozorováním se dvěma různými filtry se pak skládají dodatečně na počítači za vzniku vícebarevných obrázků (barev je možno tolik, kolik různých barviv je v preparátu použito)

Slide 16: Využití fluorescence

Fluorescenci lze využívat v mnoha oborech například biologii, chemii, medicíně, ale i v běžném životě - rozjasňovače v pracích prášcích, zvýrazňovací fixy, bankovky s vyšší nominální hodnotou, doklady, jízdenky hromadné dopravy (např. v Praze), tonic (obsahuje chinin) nebo koření kari (kumarin) a jiné.

TBC - tuberkulóza - značení auraminem

chlorofyl, porfyriny, vitamíny - mají také fluorescenci

luminol reaguje s krví - hem obsahuje železo - známo z televize

Fluorescein se používá k obarvování vodních toků např. při monitorování podzemních řek. I malé množství je ve vodě detekovatelné a během několika dní se přirozeně odbourává.

Některé GMO organismy byly navrhovány tak, aby v sobě obsahovaly GFP, ten by se aktivoval až v určitém prostředí. Tak by se například mohla spouštět luminiscence při znečištění okolí organismu.

Zářivky: Elektrickým výbojem uvnitř zářivky dochází ke vzniku UV záření. To excituje barvu na povrchu zářivkové trubice a dochází ke vzniku světla.