

**Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

Katedra biofyziky a fyzikální chemie

**Interakce tenzidů a organických barviv v roztocích
II**

(diplomová práce)

Hradec Králové 2007

Hana Žídková

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci zpracovala samostatně a uvedla veškeré použité prameny a použitou literaturu.

17. 4. 2007

Poděkování

Chtěla bych poděkovat Ing. V. Kubíčkoví, CSc. za cenné rady a připomínky při zpracování mé diplomové práce.

OBSAH

OBSAH	4
1. ÚVOD	7
2. TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1. Látky povrchově aktivní – tenzidy	10
2.1.1. Rozdělení tenzidů dle schopnosti disociace	10
2.1.2. Charakteristika tenzidů	11
2.2. Interakce organických barviv s tenzidy	11
2.2.1. Tvorba agregátů	12
2.2.2. Role hydrofobních interakcí v procesu agregace.....	13
2.2.3. Vliv iontové skupiny v molekule barviva na agregaci	13
2.2.4. Role elektrostatických interakcí v procesu agregace.....	13
2.2.5. Premicelární agregáty H-typu a J- typu.....	14
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	16
3.1. Použité chemikálie	17
3.2. Použité přístroje.....	18
3.3. Příprava zásobních roztoků.....	19
3.3.1. Příprava základních vodných roztoků fluoresceinu sodné soli.....	19
3.3.2. Příprava základních vodných roztoků thymolové modři.....	19
3.3.3. Příprava základních vodných roztoků tenzidu.....	20
3.4. Pracovní postup	20
3.4.1. Sledování vlivu pH na extrahovatelnost iontových párů v roztoku.....	20
3.4.2. Vliv doby třepání na extrahovatelnost iontových párů v roztoku barviv	22
3.4.3. Hledání optimální vlnové délky pro následující experimenty	22
3.4.4. Sledování vlivu přebytku FLSS a TM na interakci cetrimidem metodou extrakční spektrofotometrie	23
3.4.5. UV-VIS Spektrofotometrie.....	24
3.4.6. Fluorimetrie	24
4. VÝSLEDKY	26
4.1. Výsledky studia vlivu pH na extrahovatelnost iontových párů.....	27
4.2. Výsledky studia vlivu doby třepání na extrahovatelnost iontových párů	28

4.3. Výsledky hledání optimální vlnové délky	29
4.4. Výsledky sledování vlivu přebytku FLSS a TM na interakci s cetrimidem metodou extrakční spektrofotometrie	31
4.5. Výsledky UV-VIS spektrofotometrie	33
4.6. Výsledky fluorimetrie.....	35
5. DISKUSE.....	40
5.1. Interakce cetrimidu s FLSS.....	41
5.2. Interakce cetrimidu s TM	42
6. ZÁVĚR	44
7. LITERATURA	46

SOUHRN

Tato diplomová práce se zabývá studiem interakce tenzidu (cetrimidu) a organických barviv (thymolové modři a fluoresceinu) metodou UV-VIS spektrofotometrie, extrakční spektrofotometrie a fluorimetrie. Práce navazuje na diplomové práce s obdobným zaměřením, které byly na katedře biofyziky a fyzikální chemie vytvořeny v minulých letech.

1. ÚVOD

Pouze ojediněle si při přípravě léčivého přípravku vystačíme jen s technologickými operacemi tak, aby vznikl přípravek požadované kvality. Ve většině případů je nutné použít pomocnou látku (tj. takovou, jež nemá v použitém množství vlastní léčebný účinek, ale usnadňuje přípravu, výrobu nebo uchování léčivých přípravků). Pomocných látek bychom mohli vyjmenovat celou řadu. Ve své práci se zabývám tenzidy a organickými barvivy.

Označení tenzid je synonymem povrchově aktivní látky, která se rozpuštěná anebo dispergovaná v kapalině přednostně absorbuje na rozhraní s jiným prostředím, což určuje celý soubor dalších fyzikálně-chemických vlastností. Z praktického hlediska jsou důležité především jejich schopnosti v roztocích, kde tenzidy vykazují smáčecí, emulgační, pěnicí, čisticí a hlavně stabilizující funkci.

Důvodem barvení léčivých přípravků je nejen zlepšení estetického vzhledu, ale zejména snížení rizika záměny. Nejpočetnější skupinou mezi používanými barvivy jsou právě syntetická organická barviva.

Bylo zjištěno, že přidáním tenzidu do roztoku organického barviva dochází k interakcím, a to ne vždy žádoucím. V současné době je proto tato problematika předmětem mnoha studií. Svou práci jsem založila na těchto poznatcích:

- Při interakcích tenzidu s roztokem barviva může dojít ke změnám v absorpčním spektru barviva. Často se hovoří jednak o tvorbě specifických agregátů H- a J-typu, které jsou odpovědné za hypsochromní (H-typ agregátů), či bathochromní posuny (J-typ agregátů) v absorpčních spektrech barviv.
- Tenzidy obecně ovlivňují molekuly barviv a mění tak jejich charakteristické fluorescenční parametry (excitační a emisní spektra).

Zaměřila jsem se na studium interakce tenzidu (cetrimidu) a organických barviv (thymolové modři a fluoresceinu) třemi spektrálními metodami: UV-VIS spektrofotometrií, extrakční spektrofotometrií a fluorimetrií.

2.TEORETICKÁ ČÁST

2.1. LÁTKY POVRCHOVĚ AKTIVNÍ – TENZIDY (1)

Tenzidy (povrchově aktivní látky, surfaktanty) jsou látky, které ve své struktuře obsahují vždy dvě části, hydrofobní a hydrofilní, s protikladnou afinitou k danému médiu. Látky s takovou strukturou jsou nazývány amfipatické nebo také amfifilní.

Hydrofobní je nepolární část nebo části molekuly tenzidu, odpuzující vodu. V její přítomnosti se snaží vytvořit prostorovou konfiguraci s ostatními hydrofobními složkami ve vodném prostředí tak, aby jejich vzájemná orientace umožnila tvorbu lipofilních kontaktů, pomocí nevazebných interakcí. Z této oblasti interakcí jsou molekuly vody vytlačovány. Hydrofobní složku tvoří obvykle uhlovodíkové řetězce alkanů, alkenů nebo struktury aromatických sloučenin.

Hydrofilní jsou ty polární části molekuly tenzidu, jež mají afinitu k vodě a ve vodném médiu jsou v různém rozsahu hydratovány. Můžeme říci, že se kolem nich vytvoří solvatační obal z molekul vody vázaných prostřednictvím vodíkových můstků mezi hydratovanou částí tenzidu a molekulami vody. Míra hydratace polární části molekuly tenzidu je přímo úměrná její polaritě. Tato difilnost způsobuje, že v roztocích tenzidů se uplatňují vzájemné interakce vanderwalsovského charakteru nejen mezi molekulami tenzidu, ale i mezi jednotlivými částmi molekuly tenzidu a molekulami rozpouštědla. Hydrofilní části molekuly tenzidu mohou ve vodném roztoku disociovat. Polárními skupinami schopnými disociace, které nalézáme v tenzidech nejčastěji jsou $-\text{COOH}$, $-\text{O}-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{NH}_2$ a kvarterní dusík.

2.1.1. Rozdělení tenzidů dle schopnosti disociace

Podle schopnosti disociace ve vodě se rozlišují tenzidy:

- Iontové
- Neiontové

Skupinu iontových tenzidů dále členíme na tenzidy:

- Anionaktivní
- Kationaktivní
- Amfoterní

Aniontové tenzidy jsou látky, které ve vodném prostředí disociují na negativně nabitý, povrchově aktivní aniont a obvykle menší kationt.

V kationtovém tenzidu povrchově aktivní část nese pozitivní náboj, proti ní stojí malý aniont.

Amfoterní tenzidy obsahují aniontové i kationtové funkční skupiny. Jejich náboj závisí na koncentraci protonů, tj. na pH. Při vysokém pH se chovají jako aniontové, při nízkých hodnotách pH jako kationtové. V určité oblasti pH, v blízkosti neutrální oblasti, existují jako amfionty, což znamená, že se náboj vyrovná. Vykazují malou rozpustnost ve vodě, na stupnici pH se hovoří o isoelektrické oblasti.

Neiontové tenzidy nemají schopnost ve vodě disociovat.

2.1.2. Charakteristika tenzidů

Jsou-li amfipatické látky přítomny v disperzním mediu v nízké koncentraci, existují odděleně a mají velikost částic pod hranicí koloidních dimenzí. Po dosažení tzv. kritické micelární koncentrace (cmc) se molekuly nebo ionty tenzidu spontánně sdružují do větších útvarů označovaných jako micely. Tyto soustavy jsou vratné, protože potřebným zředěním vznikne opět pravý roztok. V oblasti cmc se prudce mění fyzikální vlastnosti soustavy, jako hustota, povrchové napětí, vodivost, osmotický tlak a další, neboť v mikroměřítku se homogenní soustava mění na heterogenní.

Důležitou vlastností je také afinita molekul tenzidů k fázovému rozhraní. Již při nízké koncentraci se mění energetické poměry na fázovém rozhraní, což se projevuje hlavně snížením povrchového napětí. Tyto vlastnosti jsou dány chemickou a fyzikální strukturou jejich molekul, jež mají asymetrický bipolární charakter s výrazným dipólovým momentem.

2.2. INTERAKCE ORGANICKÝCH BARVIV S TENZIDY

Mnohé publikace, např. (2,3), se zabývají interakcemi mezi kationickými barvivými a anionickými proteiny, podobně jako interakcemi mezi anionickými barvivými a kationickými proteiny. Projevem těchto interakcí jsou změny v absorpčních spektrech barviv, které jsou přisuzovány hlavně interakcím elektrostatickým.

Kationické tenzidy způsobují změny v absorpčních spektrech anionických barviv, např. bromfenolové modři nebo methylované (6,7,8). Podobně anionické tenzidy interagují s kationickými barvivými (9). Největší spektrální změny jsou pozorovány právě při koncentracích tenzidů, které se nacházejí pod cmc (10).

Z experimentů ukrajinských autorů (11) vyplývá, že přidavek kationických tenzidů do roztoku barviva má za následek změny v absorpčním spektru barviva.

Také polymery nesoucí náboj nebo polymery neionogenní reagují s azobarvivou, jako např. s methylovanými (4,5). Bylo dokázáno, že mezi methylovanými a kationickými polymery dochází k interakcím, odůvodňujícím změny v absorpčních spektrech azobarviva.

Barviva lze rovněž považovat za amfifilní látky, neboť obsahují objemnou neiontovou část, připojenou k iontovým skupinám. Jelikož však postrádají dlouhé alkylové řetězce, jsou pouze slabě povrchově aktivní a netvoří micely ve vodném prostředí. Zvyšování koncentrace barviva může směřovat k postupné agregaci (vytváření dimerů, trimerů, polymerů a nakonec koloidů). V případě že je tenzid přidán do roztoku agregovaného barviva v koncentraci nižší než cmc, monomer tenzidu a agregáty barviva mohou interagovat za tvorby speciálního typu agregátu – tzv. smíšeného agregátu. Přiblíží-li se koncentrace tenzidu k cmc a nebo ji převyšuje, je barvivo nakonec inkorporováno do micel tenzidu (12).

Interakce tenzidu a barviva závisí na různých faktorech (13), a to především na délce alkylového řetězce tenzidu, na typu a poloze substituentu v aromatickém řetězci barviva. Uvádí se také, že pro agregaci je nezbytný dialkyloamino substituent v molekule barviva.

2.2.1. Tvorba agregátů

Tvorba agregátů je poměrně běžná pro barvivo a tenzid, jenž nesou opačný náboj (12,14). R.K. Dutta a S.N. Bhat (14) dále ověřili, že tvorba agregátů je možná i pro barvivo a neionogenní tenzid. Tito autoři sledovali změny v absorpčním spektru MO po přidání Tritonu X-100 (neionogenní tenzid).

R.K. Dutta a S.N. Bhat (14) ve své studii došli k závěru, že interakce mezi organickými barvivou a tenzidy jsou jak povahy elektrostatické, tak hydrofobní. Rovněž indičtí autoři (16) uvádějí, že při interakci mezi porfyrinovými barvivou tenzidy hraje důležitou roli, vedle elektrostatických přitažlivých sil, hydrofobní přiléhání alkylových řetězců tenzidů.

V procesu agregace jsou důležité elektrostatické přitažlivé síly, což ukazuje i skutečnost, že žádné změny v absorpčních spektrech barviv nebyly pozorovány v přítomnosti souhlasně nabitých tenzidů (14,15,16).

2.2.2. Role hydrofobních interakcí v procesu agregace

Pro tvorbu agregátů jsou velmi důležité hydrofobní interakce mezi částicemi rozpuštěných látek, což bylo dokázáno tím, že v etanolovém prostředí nedošlo k interakcím mezi MO a dodecyltrimethylamoniumbromidem (10). Závislost procesu tvorby agregátů na délce uhlíkatého řetězce tenzidů rovněž nasvědčuje, že hydrofobní interakce jsou významné. V případě použití decyltrimethylamoniumbromidu chybí interakce s MO, která se při použití tenzidů s delším uhlíkatým řetězcem (např. dodecyltrimethylamoniumbromidu) projeví vznikem nového absorpčního pásu v oblasti 380 nm, což bylo prezentováno v práci (10).

2.2.3. Vliv iontové skupiny v molekule barviva na agregaci

Na tvorbu agregátu má také vliv poloha a typ iontové skupiny v molekule barviva. Významnější roli při interakci mezi azobarvivem a tenzidem hraje poloha tohoto iontu v molekule než jeho typ. Sledováním spektrálních posunů (10) u barviva, kde je iontová skupina v poloze para (methyloranž), bylo zjištěno, že spektrální posuny jsou výraznější, než v případě, kdy se vyskytuje iontová skupina v poloze ortho (methylčerveně) nebo kde iontová skupina zcela chybí (methylžlutě). V těchto případech se totiž poloha absorpčního maxima posunuje od vlnové délky absorpčního maxima methylčerveně a methylžlutě pouze k vlnové délce absorpčního maxima, kdy je dané azobarvivo vázáno na micely tenzidu (10).

2.2.4. Role elektrostatických interakcí v procesu agregace

Vliv iontové síly na absorpční spektrum barviva ve vodném roztoku tenzidu byl zkoumán (10) prostřednictvím měnících se koncentrací chloridu sodného, který byl přidáván do soustavy tenzidu (cetyltrimethylamoniumbromid) a azobarviva (MO) ve vodném prostředí a bylo zjištěno, že čím je vyšší koncentrace přidávaného chloridu (roste iontová síla v soustavě), tím se zmenšuje absorpční pás v oblasti vlnové délky 380 nm. Toto v podstatě odráží důležitost elektrostatických interakcí při tvorbě agregátů.

Autoři práce (10) zjistili, že v případě methylčerveně (karboxylová skupina je zde přítomna v poloze ortho vůči azoskupině) a methylžlutě (iontová skupina zcela chybí) nedochází k výrazným spektrálním posunům v absorpčních spektrech azobarviv při nízkých koncentracích tenzidů.

2.2.5. Premicelární agregáty H-typu a J-typu

Indičtí autoři (16), kteří se zabývali interakcemi mezi porfyrinovými barvivy a tenzidy (cetyltrimethylamoniumbromidem, tetradecyltrimethylamoniumbromidem, dodecyltrimethylamoniumbromidem, sodiumdodecylsulfátem a Tritonem X-100), popisují tvorbu premicelárních agregátů při koncentraci tenzidu pod cmc. Při těchto interakcích se mohou tvořit buď nespecifické agregáty, nebo vysoce uspořádané agregáty (H-typu, J-typu). V případě, že se koncentrace tenzidu přiblíží cmc, dochází k rozpadu premicelárních agregátů a inkorporaci molekul barviva do micel tenzidu.

Tito autoři popisují, že při interakcích mezi jimi studovanými porfyrinovými barvivy a tenzidy může docházet k následujícím jevům:

- Inkorporaci molekul barviva do micel tenzidu předchází tvorba jednoho nebo více premicelárních agregátů. Jasným důkazem tvorby jednoho či více premicelárních agregátů je výskyt dvou nebo více isosbestických bodů v absorpčním spektru.
 - Pokud tvorba agregátů není ve spektru zřetelná, tedy posun absorpčního pásu je nepatrný, hovoří se o tvorbě nespecifického agregátu. U tohoto agregátu nemůže být jasně určeno, zda se jedná o J- či H- typ.
 - Když se tvoří agregáty, ve kterých jsou molekuly barviva vysoce uspořádané, hovoří se o agregátech H- nebo J- typu. Tyto agregáty mají specifické spektroskopické vlastnosti.
- Výstavba H agregátu se v absorpčním spektru projeví hypsochromním posunem absorpčního pásu vzhledem k pásu monometrického barviva (10, 13, 16). Nově vytvořený absorpční pás je navíc užší v porovnání s absorpčním pásem samotného barviva (17).
- V některých případech může tvorbě H-agregátu předcházet tvorba J-agregátu. Jednotlivé typy premicelárních agregátů (H-typu, J-typu) se tvoří při rozdílných koncentracích tenzidu. U porfyrinových barviv (16) přeměna monomeru barviva v J-agregát je dokončena, jakmile je koncentrace tenzidu

asi dvojnásobná vůči koncentraci barviva. J-agregát obsahuje tudíž barvivo a tenzid v poměru 1:2. Ve spektru je tvorba J-agregátu indikována bathochromním posunem absorpčního pásu. Dalším zvyšováním koncentrace tenzidu se J-agregát stává nestabilním, jestliže je koncentrace tenzidu oproti koncentraci porphyrinového barviva čtyřnásobná, J-agregát mizí. Vzniká nová forma, H-agregát.

- Při koncentraci tenzidu pod cmc molekuly porphyrinového barviva netvoří premicelární agregáty, ale jakmile se koncentrace tenzidu přiblíží cmc, dochází k inkorporaci molekul barviva do micel tenzidu, což se projeví vznikem nového absorpčního pásu. Na absorpčním spektru je zaznamenán jeden isosbestický bod.

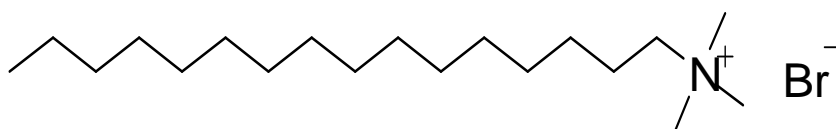
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. POUŽITÉ CHEMIKÁLIE

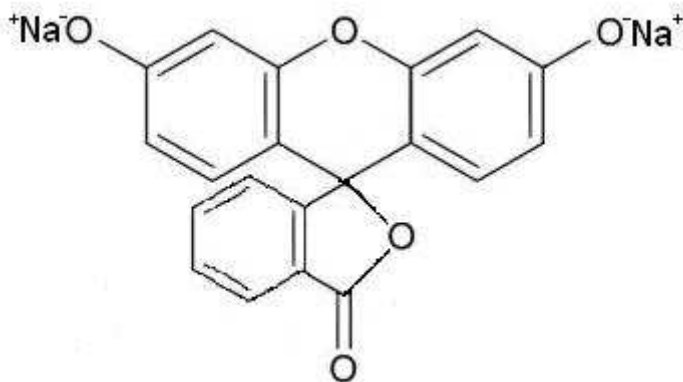
Během svých experimentů jsem použila níže uvedené chemikálie:

- Cetrimid – cetyltrimethylamoniumbromid (viz vzorec č. 1), MERCK (for cosmetics), použitá zkratka CTAB
- Hydroxid sodný, Lachema s. p. Brno, o. z. Neratovice
- Lihomethanol, FaF UK
- Destilovaná voda, FaF UK
- Fluorescein sodná sůl (viz vzorec č. 2), Spolek pro chemickou a hutní výrobu, n. p. Praha, použitá zkratka FLSS
- Thymolová modř (viz vzorec č. 3), Spolek pro chemickou a hutní výrobu, n. p. Praha, použitá zkratka TM
- Kyselina octová, Lachema a. s. , Neratovice
- Kyselina fosforečná, Lachema s. p. Brno, o. z. Neratovice
- Kyselina boritá, Lachema s. p. Brno

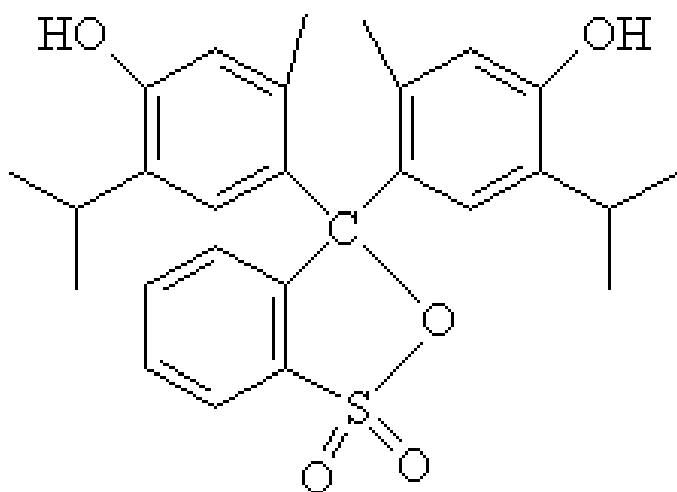
Vzorec č. 1: Cetrimid (Mr = 364,46)



Vzorec č. 2: Fluorescein sodná sůl (Mr = 376,28)



Vzorec č. 3: Thymolová modř (Mr = 466,60)



3.2. POUŽITÉ PŘÍSTROJE

V průběhu své práce jsem užívala tyto přístroje:

- digitální analytické váhy – Sartorius
- spektrofotometr HP 8453 – Hewlet Packard
- fluorimetr AMINCO- Bowman Series 2
- spektrofotometr Spekol – Carl Zeiss Jena
- mechanická třepačka LT - 2 – Kavalier Sázava
- pH-metr PerpHect 350 - ORION

3.3. PŘÍPRAVA ZÁSOBNÍCH ROZTOKŮ

3.3.1. Příprava základních vodných roztoků fluoresceinu sodné soli

Na analytických váhách jsem navážila 0,09407 g barviva FLSS, toto množství jsem kvantitativně přenesla do odměrné baňky, rozpustila a doplnila na 50 ml destilovanou vodou. Získala jsem tak roztok FLSS o koncentraci $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$.

Roztok FLSS o koncentraci $2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ jsem připravila odpipetováním 2,5 ml roztoku o koncentraci $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$ a doplněním destilovanou vodou v odměrné baňce do 50 ml.

3.3.2. Příprava základních vodných roztoků thymolové modři

Na analytických váhách jsem navážila 0,11665 g barviva TM, toto množství jsem kvantitativně přenesla do odměrné baňky. Aby došlo ke kvantitativnímu rozpuštění TM, bylo do roztoku přidáno ekvimolární množství roztoku hydroxidu sodného o koncentraci $0,2 \text{ mol.l}^{-1}$, tj. 1,25 ml a celý objem byl doplněn na 50 ml destilovanou vodou. Získala jsem tak základní roztok TM o koncentraci $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$.

Dále jsem připravila roztok barviva TM o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$ odpipetováním 10 ml předchozího roztoku a doplněním destilovanou vodou v odměrné baňce do 50 ml.

Roztok TM o koncentraci $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ jsem připravila odpipetováním 5 ml základního roztoku TM o koncentraci $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$ a doplněním destilovanou vodou na objem 50 ml v odměrné baňce.

Roztok TM o koncentraci $2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ jsem připravila odpipetováním 2,5 ml roztoku o koncentraci $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$ a doplněním destilovanou vodou v odměrné baňce do 50 ml.

3.3.3. Příprava základních vodných roztoků tenzidu

Základní roztok tenzidu o koncentraci $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$ jsem připravila navážením 0,091115 g cetrimidu na analytických vahách, rozpuštěním a následným doplněním destilovanou vodou na objem 50 ml v odměrné baňce.

Dále jsem potřebovala roztok o koncentraci $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$, který jsem připravila odpipetováním 5 ml základního roztoku a doplněním destilovanou vodou na objem 50 ml v odměrné baňce.

Roztok tenzidu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ jsem připravila odpipetováním 1 ml roztoku tenzidu o koncentraci $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$ a doplněním destilovanou vodou na objem 50 ml v odměrné baňce.

3.4. PRACOVNÍ POSTUP

3.4.1. Sledování vlivu pH na extrahovatelnost iontových párů v roztoku

FLSS

Nejprve jsem připravila řadu Brittonových-Robinsonových pufrů (BR-pufrů) o různých hodnotách pH v rozmezí 5,02 až 9,91. Ke 100 ml základního roztoku kyselin o koncentraci $0,04 \text{ mol.l}^{-1}$, který jsem připravila dle publikace (1), jsem přidávala patřičná množství hydroxidu sodného, a to dle tabulky číslo 1.

Do sedmi zkumavek jsem napipetovala vždy 3 ml BR pufru o daném pH, přidala 1 ml cetrimidu o koncentraci $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$, 1 ml FLSS o koncentraci $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$ a 5 ml chloroformu. Poté jsem zkumavky uzavřela parafilmem, 10 minut ponechala třepat na třepačce a dalších 10 minut stály zkumavky v klidu.

Absorpční spektra vzorků jsem měřila proti slepým vzorkům, které představovaly roztoky FLSS připravené stejným způsobem, jako bylo popsáno výše, pouze roztok cetrimidu byl nahrazen vodou.

Absorbanci vzorků jsem měřila při vlnové délce 420 nm.

Tabulka č. 1 : Příprava univerzálních pufrů dle H.T.S. Brittona a R.A. Robinsona

pH	V(NaOH 0,2 mol.l⁻¹) [ml]	V (základní roztok BR) [ml]
5,02	17,50	50,00
6,09	21,25	
6,59	23,75	
7,00	26,25	
7,96	30,00	
8,95	33,75	
9,91	38,75	

TM

Nejprve jsem připravila řadu základních pufrů o různých hodnotách pH v rozmezí 3,78 až 6,09 dle tabulky č. 2. Do pěti zkumavek jsem napipetovala vždy 3 ml BR pufru o daném pH, přidala 1 ml cetrimidu o koncentraci $5 \cdot 10^{-4}$ mol.l⁻¹, 1 ml TM o koncentraci $5 \cdot 10^{-4}$ mol.l⁻¹ a 5 ml chloroformu. Poté jsem zkumavky uzavřela parafilmem, 10 minut ponechala třepat na třepačce a dalších 10 minut byly ponechány zkumavky v klidu.

Absorpční spektra vzorků jsem měřila proti slepým vzorkům, které představovaly roztoky TM připravené stejným způsobem, jako bylo popsáno výše, pouze roztok cetrimidu byl nahrazen vodou.

Absorbanci vzorků jsem měřila při vlnové délce 400 nm.

Tabulka č. 2.: Příprava univerzálních pufrů dle H.T.S. Brittona a R.A. Robinsona

pH	V(NaOH 0,2 mol.l ⁻¹) [ml]	V (základní roztok BR) [ml]
3,78	11,25	50 ml
4,35	13,75	
4,78	16,25	
5,33	18,75	
6,09	21,25	

3.4.2. Vliv doby třepání na extrahovatelnost iontových párů v roztoku barviv

Zkumavku se vzorkem, ve kterém bylo určeno optimální pH, jsem nechala dalších 10 minut třepat na třepačce a 10 minut ponechala stát v klidu. Absorpční spektrum vzorku jsem měřila proti odpovídajícímu slepému vzorku z předchozího pokusu.

Absorbance vzorků jsem znovu proměřila při vlnové délce 420 nm u barviva FLSS a 400 nm u barviva TM.

3.4.3. Hledání optimální vlnové délky pro následující experimenty

FLSS

Znovu jsem připravila vzorek, který obsahoval 3 ml BR pufru o pH 7,96, 1 ml cetrimidu o koncentraci $5 \cdot 10^{-3}$ mol.l⁻¹, 1 ml FLSS o koncentraci $5 \cdot 10^{-3}$ mol.l⁻¹ a 5 ml chloroformu. Zkumavku jsem nechala 20 minut třepat na třepačce a 10 minut ponechala stát v klidu. Absorpční spektrum vzorku jsem měřila proti odpovídajícímu slepému vzorku, připravenému stejným postupem, jen roztok cetrimidu jsem nahradila vodou.

Absorbanci vzorku jsem měřila při různých vlnových délkách od 400 nm až po 520 nm.

TM

Pro toto barvivo jsem připravila vzorek, který obsahoval 3 ml pufru o pH 6,09, 1 ml cetrimidu o koncentraci $5 \cdot 10^{-4}$ mol.l⁻¹, 1 ml TM o koncentraci $5 \cdot 10^{-4}$ mol.l⁻¹ a 5 ml chloroformu. Zkumavku jsem nechala 10 minut třepat na třepačce a 10 minut ponechala stát v klidu. Absorpční spektrum vzorku jsem měřila proti odpovídajícímu slepému vzorku.

Absorbanci vzorku jsem měřila při různých vlnových délkách od 400 nm až po 440 nm.

3.4.4. Sledování vlivu přebytku FLSS a TM na interakci s cetrimidem metodou extrakční spektrofotometrie

K pokusu jsem si připravila 12 zkumavek (pro každé barvivo 6), do kterých jsem odpipetovala vždy 3 ml BR pufru o pH 7,96 pro FLSS a 6,09 pro TM. Dále 1ml cetrimidu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$, 1 ml FLSS nebo TM o různých koncentracích uvedených v tabulce č. 3 a 5 ml chloroformu. Zkumavky jsem nechala 20 (pro TM pouze 10) minut třepat na třepačce a 10 minut ponechala stát v klidu.

Absorbance vzorků jsem měřila proti slepým vzorkům, které představovaly roztoky FLSS nebo TM připravené stejným způsobem, jako bylo popsáno výše, pouze roztok cetrimidu byl nahrazen vodou.

Absorbance vzorků jsem měřila při vlnové délce 490 nm u FLSS, u vzorků barviva TM při vlnové délce 420 nm (tyto vlnové délky byly v předchozím experimentu určeny jako optimální).

Tabulka č. 3 : Koncentrace barviv FLSS a TM

Číslo vzorku	Koncentrace barviva [mol.l^{-1}]
1	$1 \cdot 10^{-4}$
2	$2 \cdot 10^{-4}$
3	$4 \cdot 10^{-4}$
4	$6 \cdot 10^{-4}$
5	$8 \cdot 10^{-4}$
6	$1 \cdot 10^{-3}$

3.4.5. UV-VIS spektrofotometrie

K přípravě roztoků jsem použila pro každé barvivo třináct kádinek, do kterých jsem odpipetovala 0,8 ml roztoku tenzidu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$, potřebné množství roztoku FLSS či TM o koncentracích dle rozpisu tabulky (viz tabulka č. 4). Objem jsem doplnila BR pufrům o pH 7,96 u FLSS (pufrům o pH 6,09 u TM) na 4 ml. Potom jsem vzorky promíchala a ponechala 10 minut stát.

Absorpční spektra jsem měřila proti příslušným slepým vzorkům, které odpovídaly roztokům FLSS či TM o různé koncentraci. Tyto slepé vzorky jsem připravila odpipetováním potřebného množství zásobního roztoku FLSS (TM) o koncentracích odpovídajících rozpisu tabulky (viz tabulka č. 4), potřebné množství tenzidu bylo nahrazeno vodou a doplněno BR pufrů daných pH na objem 4 ml.

3.4.6. Fluorimetrie

Pro tuto experimentální metodu jsem použila stejný postup přípravy všech vzorků jako u spektrofotometrie (viz tabulka č. 4).

Byla měřena excitační spektra, aby bylo možno určit vhodnou excitační vlnovou délku, a následně byla u všech vzorků i slepých vzorků snímána spektra emisní.

Tabulka č. 4: Koncentrační řada barviv FLSS a TM

Vzorek			Slepý roztok		
Koncentrace zás. roztoku barviv [mol.l ⁻¹]	Objem zásobního roztoku barviv	Objem BR pufru [ml]	Koncentrace barviv v vzorku [mol.l ⁻¹ l]	Koncentrace zás. roztoku barviv [mol.l ⁻¹]	Objem BR pufru [ml]
2,5. 10 ⁻⁴	0,32	2,88	2,00. 10 ⁻⁵	0,00	3,20
2,5. 10 ⁻⁴	0,35	2,85	2,19. 10 ⁻⁵	0,03	3,17
2,5. 10 ⁻⁴	0,38	2,82	2,38. 10 ⁻⁵	0,06	3,14
2,5. 10 ⁻⁴	0,41	2,79	2,56. 10 ⁻⁵	0,09	3,11
2,5. 10 ⁻⁴	0,45	2,75	2,81. 10 ⁻⁵	0,13	3,07
2,5. 10 ⁻⁴	0,48	2,72	3,00. 10 ⁻⁵	0,16	3,04
2,5. 10 ⁻⁴	0,64	2,56	4,00. 10 ⁻⁵	0,32	2,88
2,5. 10 ⁻⁴	0,80	2,40	5,00. 10 ⁻⁵	0,48	2,72
2,5. 10 ⁻⁴	0,96	2,24	6,00. 10 ⁻⁵	0,64	1,60
2,5. 10 ⁻⁴	1,12	2,08	7,00. 10 ⁻⁵	0,80	2,40
2,5. 10 ⁻⁴	1,28	1,92	8,00. 10 ⁻⁵	0,96	2,24
5,00. 10 ⁻⁴	0,80	2,40	1,00. 10 ⁻⁴	0,64	2,56
5,00. 10 ⁻⁴	0,96	2,24	1,20. 10 ⁻⁴	0,80	2,40

4.VÝSLEDKY

4.1. Výsledky studia vlivu pH na extrahovatelnost iontových párů

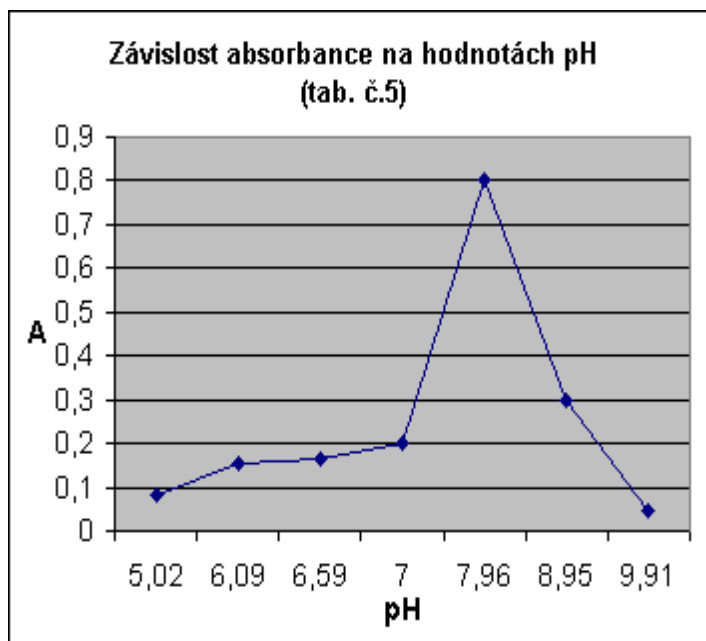
FLSS

Tabulka č. 5 znázorňuje absorbance vodných roztoků barviva FLSS o různých hodnotách pH, měřených proti slepým vzorkům při vlnové délce 420 nm (viz. kap. 3.4.1.). Nejvyšší hodnotu absorbance (0,800) jsem naměřila u vzorku, který obsahoval BR pufr s hodnotou pH 7,96. Tento BR pufr jsem zvolila jako optimální prostředí pro další experimenty.

Tabulka č. 5: Absorbance roztoku FLSS a cetrimidu v závislosti na pH

pH	A
5,02	0,080
6,09	0,155
6,59	0,165
7,00	0,200
7,96	0,800
8,95	0,300
9,91	0,045

Obrázek č. 1: Graf k tabulce č. 5



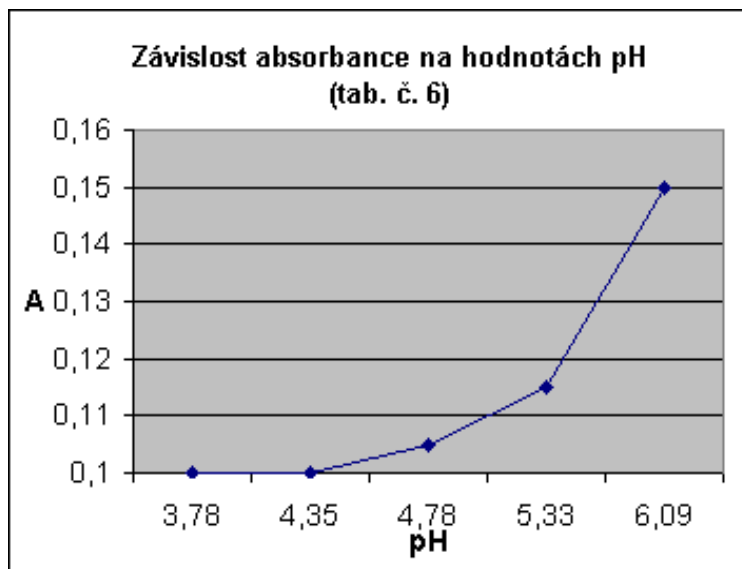
TM

Měření dle kapitoly 3.4.1. jsem provedla také pro barvivo TM. Výsledky jsou prezentovány v tabulce č. 6, kde je patrná nejvyšší dosažená hodnota absorbance v prostředí BR pufru s hodnotou pH 6,09, proto v dalších pokusech pokračuji v prostředí tohoto pufru. Směrem k zásaditějšímu pH jsem již v pokusech nepokračovala, a to vzhledem k žádoucím disociačním vlastnostem barviva, které se projevují právě v prostředí kyselém.

Tabulka č. 6: Absorbance roztoku TM a cetrimidu v závislosti na pH

pH	A
3,78	0,100
4,35	0,100
4,78	0,105
5,33	0,115
6,09	0,150

Obrázek č. 2: Graf k tabulce č. 6



4.2. Výsledky studia vlivu doby třepání na extrahovatelnost iontových párů

Dle kapitoly 3.4.2. jsem provedla měření, kterými jsem stanovila optimální dobu třepání vzorků.

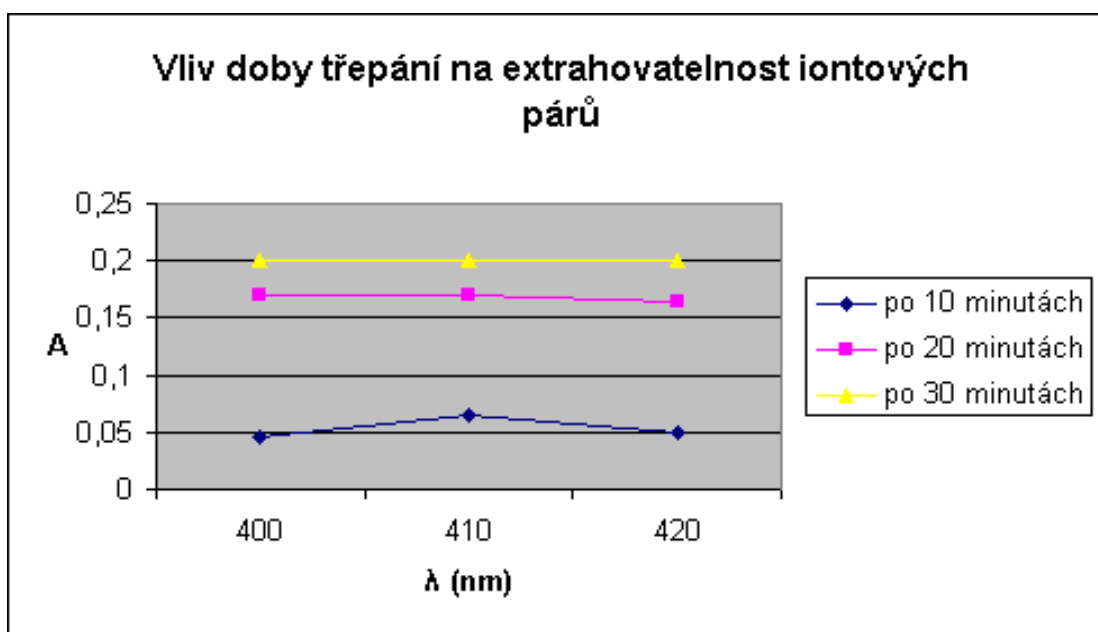
Pro barvivo FLSS jsem optimální dobu třepání určila na 10 min. Po delší době byla koncentrace barviva v chloroformové vrstvě natolik vysoká, že pro měření absorbance nestačil rozsah přístroje. Později byla stanovena doba třepání 20 minut v souvislosti s úpravou používaných koncentrací barviva (viz kap. 4.4.).

U barviva TM jsem po zvýšení doby třepání na 20 minut zaznamenala viditelný nárůst hodnoty absorbance. Následně po dalších 10 minutách třepání již takový rozdíl patrný nebyl. Proto jsem určila optimální dobu třepání pro barvivo TM 20 minut. Výsledky měření pro barvivo TM uvádím v tabulce číslo 7.

Tabulka č. 7: Vliv doby třepání na extrahovatelnost iontových párů barviva TM

po 10 minutách			po 20 minutách			po 30 minutách	
λ [nm]	A		λ [nm]	A		λ [nm]	A
400	0,045		400	0,170		400	0,200
410	0,065		410	0,170		410	0,200
420	0,050		420	0,165		420	0,200

Obrázek č. 3: Graf k tabulce č. 7



4.3. Výsledky hledání optimální vlnové délky

Při hledání ideální vlnové délky jsem postupovala dle pracovního postupu kapitoly 3.4.3.

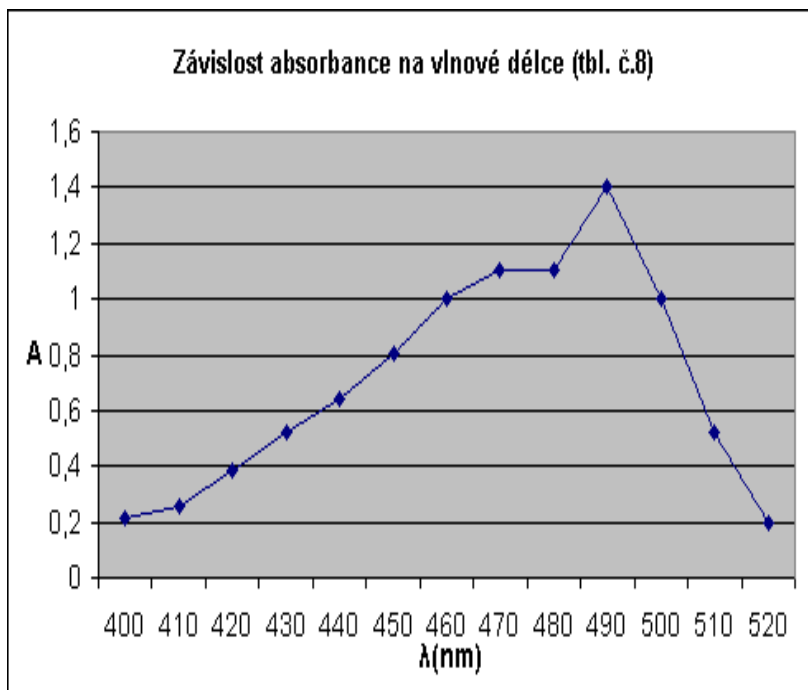
FLSS

Z měření absorbancí chloroformové vrstvy s použitím barviva FLSS při různých vlnových délkách vyplynulo, že vhodnou vlnovou délkou pro další pokusy bude vlnová délka 490 nm, při níž dosáhla absorbance po desetiminutovém třepání nejvyšší hodnoty 1,400. Veškeré výsledky uvádím v tabulce č. 8.

Tabulka č. 8: Absorbance roztoku FLSS a cetrimidu v závislosti na vlnové délce

Vlnová délka λ [nm]	A
400	0,210
410	0,255
420	0,385
430	0,520
440	0,640
450	0,805
460	1,000
470	1,100
480	1,100
490	1,400
500	1,000
510	0,520
520	0,200

Obrázek č. 4: Graf k tabulce č. 8



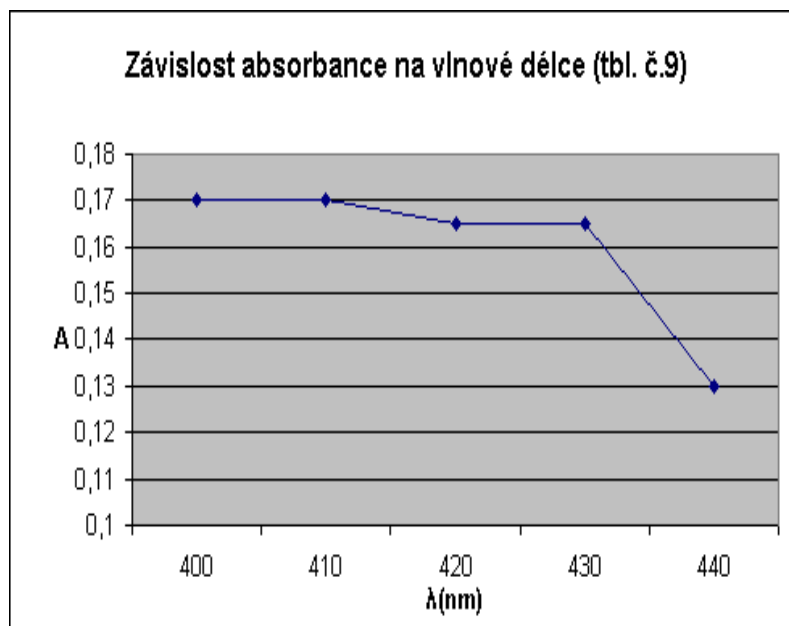
TM

Výsledky měření vzorků barviva TM jsou prezentovány v tabulce číslo 9. Pro další měření jsem zvolila jako optimální vlnovou délku 420 nm, a to s ohledem na přesnost použitého spektrofotometru. Předchozí měření se stejným přístrojem provedená ve stejné laboratoři (18) totiž ukazují, že při vlnových délkách pod 420 nm jsou výsledky značně nepřesné.

Tabulka č. 9 : Absorbance roztoku TM a cetrimidu v závislosti na vlnové délce

Vlnová délka λ [nm]	A
400	0,170
410	0,170
420	0,165
430	0,165
440	0,130

Obrázek č. 5: Graf k tabulce č. 9



4.4. Výsledky sledování vlivu přebytku FLSS a TM na interakci s cetrimidem metodou extrakční spektrofotometrie

Sledování vlivu přebytku barviv na interakci s cetrimidem jsem provedla podle kapitoly 3.4.4. U barviva FLSS jsem však byla nucena pracovní postup změnit. Vzorky barviva jsem měřila při zjištěné ideální vlnové délce 490 nm. Když jsem použila koncentrační řadu barviva uvedenou v postupu, nebylo možné absorbanci vůbec naměřit, neboť nedošlo k dostatečnému vytřepání barviva do chloroformové vrstvy.

Následně jsem se pokusila koncentraci barviva zvednout o jeden řád, ovšem při měření absorbance nestačilo rozmezí přístroje. Proto jsem koncentrační řadu upravila dle následující tabulky (tab. č. 10) a dobu třepání jsem zvýšila na 20 minut.

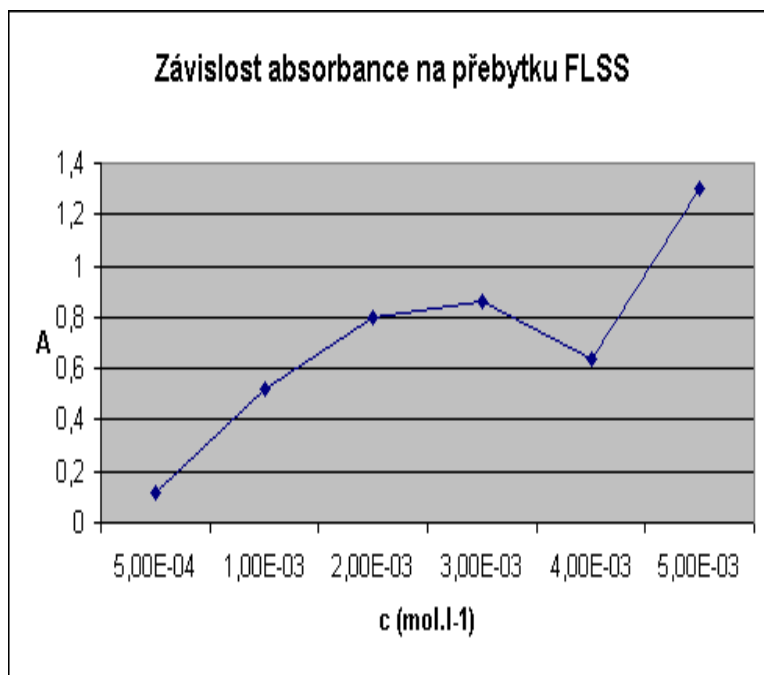
Výsledky měření pro jednotlivá barviva uvádím v tabulce číslo 10 a 11.

FLSS

Tabulka č. 10 : Absorbance
v závislosti na přebytku FLSS

Koncentrace FLSS [mol.l ⁻¹]	A
5. 10 ⁻⁴	0,115
1. 10 ⁻³	0,520
2. 10 ⁻³	0,800
3. 10 ⁻³	0,860
4. 10 ⁻³	0,640
5. 10 ⁻³	1,300

Obrázek č. 6: Graf k tabulce č. 10

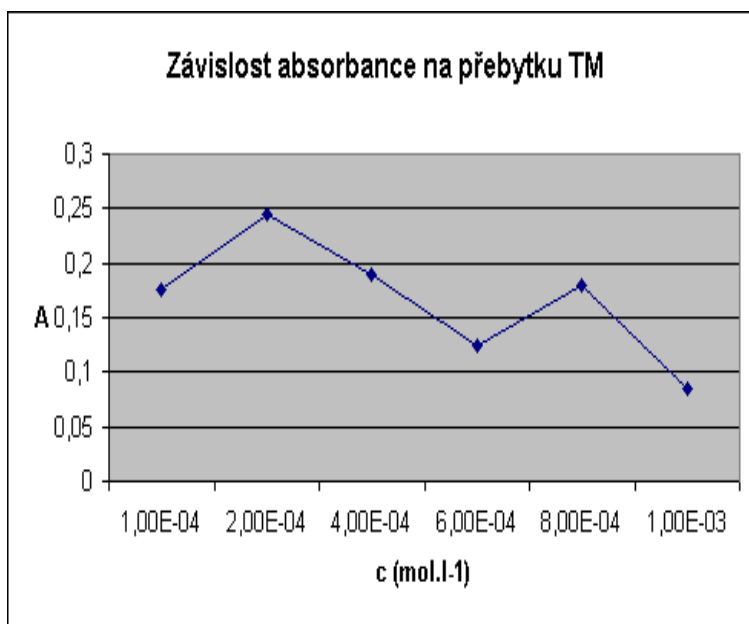


TM

Tabulka č. 11: Absorbance
v závislosti na přebytku TM

Koncentrace TM [mol.l ⁻¹]	A
1. 10 ⁻⁴	0,175
2. 10 ⁻⁴	0,245
4. 10 ⁻⁴	0,190
6. 10 ⁻⁴	0,125
8. 10 ⁻⁴	0,180
1. 10 ⁻³	0,085

Obrázek č. 7: Graf k tabulce č. 11



4.5. Výsledky UV-VIS spektrofotometrie

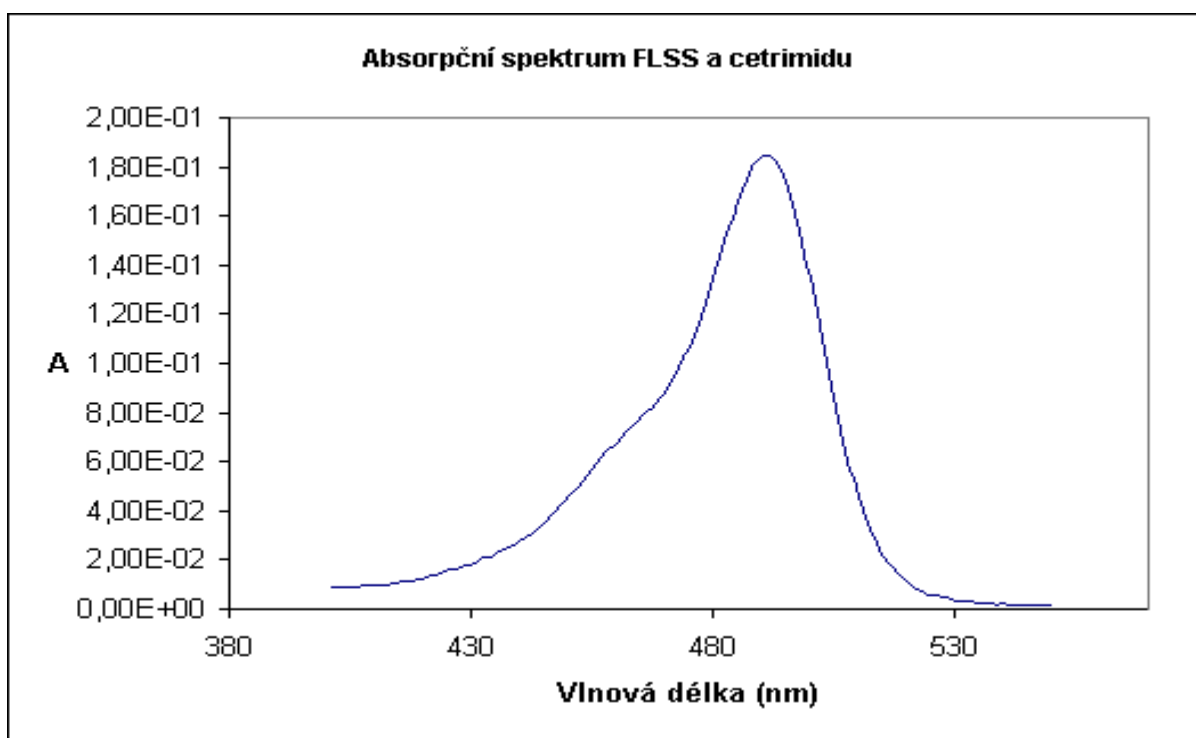
Vzorky, které jsem připravila postupem popsaným v kapitole 3.4.5, jsem proměřila proti příslušným slepým vzorkům.

U barviva FLSS byla naměřená absorpční spektra pro různé koncentrace barviva prakticky stejná, neměnila se vlnová délka maxim. Proto uvádím jako ukázkou pouze jedno (vzorové) spektrum s maximem 491 nm (viz obrázek č. 8).

Vlnové délky maxim pro dané koncentrace TM se pohybují v rozmezí 430 až 448 nm, a jsou znázorněny v tabulce č. 12 (s náležejícím obrázkem č. 9). Absorpční spektra TM jsou znázorněna na obrázku číslo 10, kde je uvedeno pro ilustraci pět spekter, větší počet by snižoval přehlednost.

FLSS

Obrázek č. 8 : Vzorové absorpční spektrum FLSS a cetrimidu s maximem 491 nm

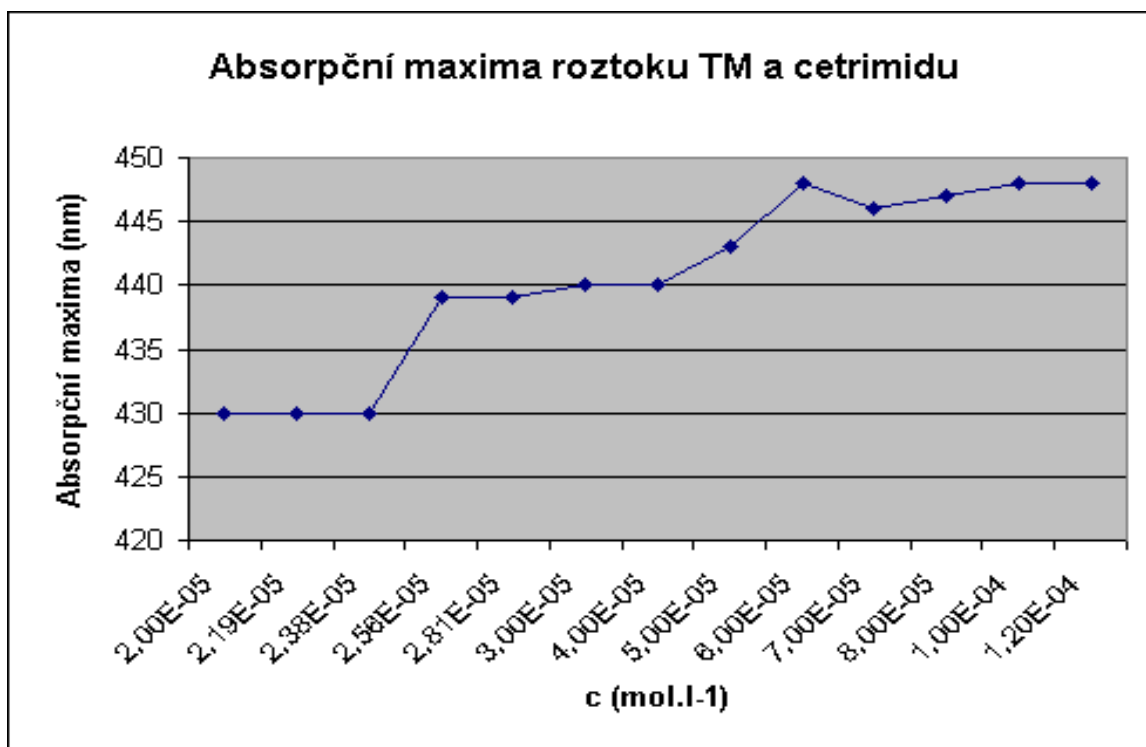


TM

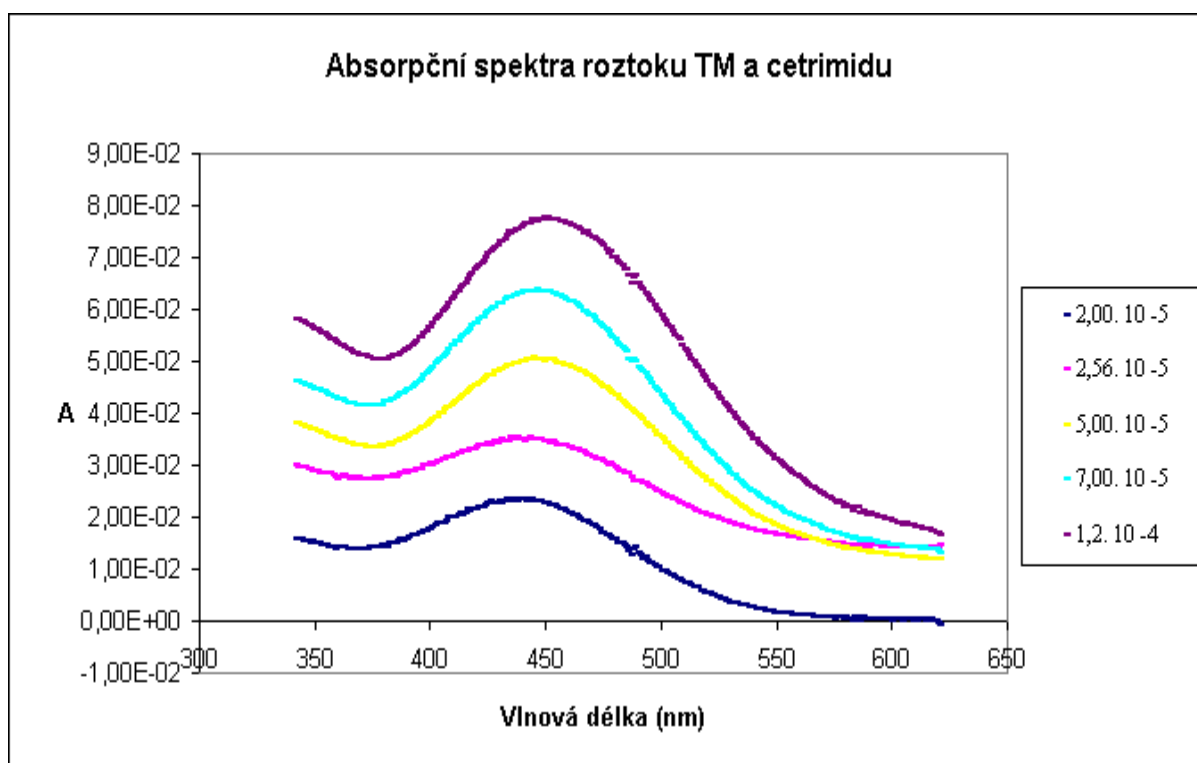
Tabulka č. 12: Absorpční maxima roztoku TM a cetrimidu

Vzorek číslo	Koncentrace barviva TM [mol.l ⁻¹]	Absorpční maximum λ_{\max} (nm)
1	2,00. 10 ⁻⁵	430
2	2,19. 10 ⁻⁵	430
3	2,38. 10 ⁻⁵	430
4	2,56. 10 ⁻⁵	439
5	2,81. 10 ⁻⁵	439
6	3,00. 10 ⁻⁵	440
7	4,00. 10 ⁻⁵	440
8	5,00. 10 ⁻⁵	443
9	6,00. 10 ⁻⁵	448
10	7,00. 10 ⁻⁵	446
11	8,00. 10 ⁻⁵	447
12	1,00. 10 ⁻⁴	448
13	1,20. 10 ⁻⁴	448

Obrázek č. 9: Graf k tabulce č. 12



Obrázek č. 10: Absorpční spektra roztoku TM a cetrimidu



4.6. Výsledky fluorimetrie

Pro tuto experimentální metodu jsem použila postup přípravy uvedený v kapitole 3.4.6. U jednoho vzorku byla měřena excitační spektra (viz obrázek č. 11), aby bylo možno určit vhodnou excitační vlnovou délku, a následně byla u všech vzorků i slepých vzorků snímána spektra emisní. Vzhledem k tomu, že se tvar spekter obou barviv při různých koncentracích prakticky nemění, uvádím pro ilustrační účely jen jedno vzorové spektrum pro každé barvivo (viz obrázek č. 12 a č. 13).

Odečtené hodnoty emisních maxim uvádím v tabulkách č. 13 a č. 14.

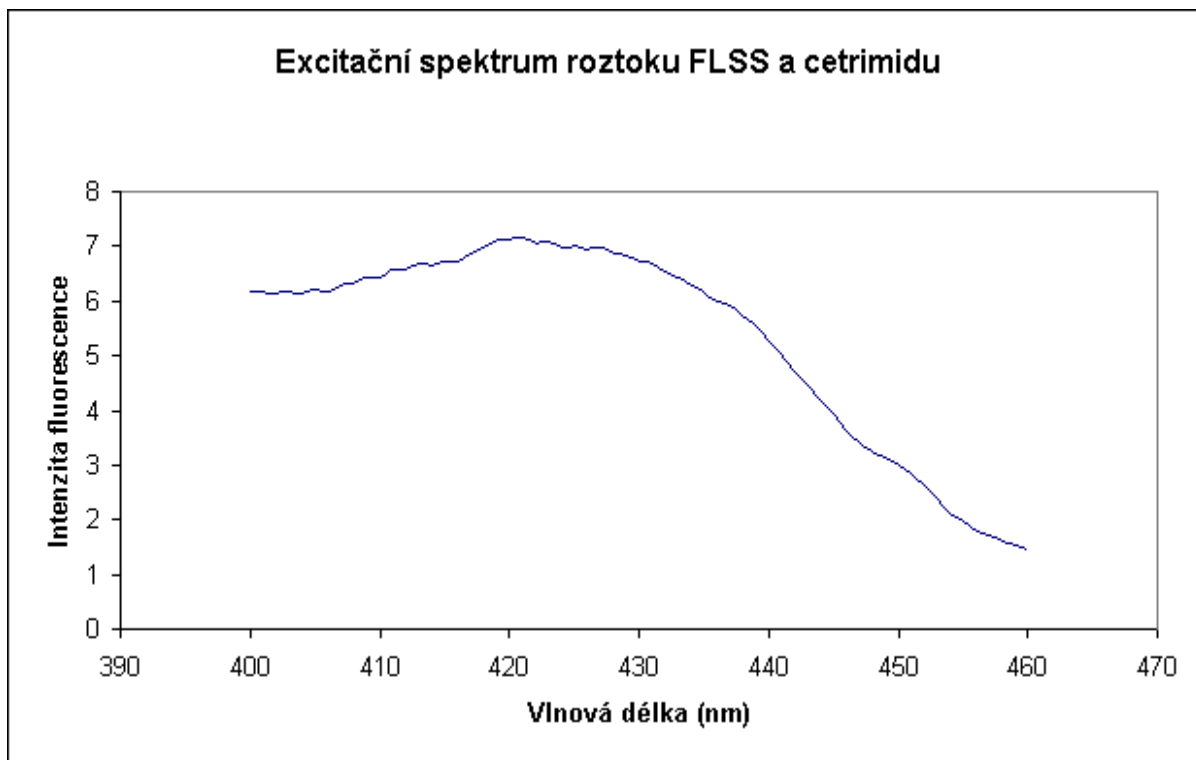
Tabulka č. 13: Hodnoty emisních maxim roztoku FLSS a cetrimidu

Koncentrace barviva v vzorku [mol.l⁻¹ l]	Vzorek číslo	Vlnová délka emisního maxima λ_{\max} [nm]	Slepý vzorek číslo	Vlnová délka emisního maxima λ_{\max} [nm]
2,00. 10 ⁻⁵	1	517	1	514
2,19. 10 ⁻⁵	2	518	2	514
2,38. 10 ⁻⁵	3	517	3	514
2,56. 10 ⁻⁵	4	518	4	515
2,81. 10 ⁻⁵	5	519	5	517
3,00. 10 ⁻⁵	6	518	6	516
4,00. 10 ⁻⁵	7	519	7	517
5,00. 10 ⁻⁵	8	520	8	518
6,00. 10 ⁻⁵	9	521	9	520
7,00. 10 ⁻⁵	10	521	10	520
8,00. 10 ⁻⁵	11	522	11	521
1,00. 10 ⁻⁴	12	523	12	523
1,20. 10 ⁻⁴	13	524	13	523

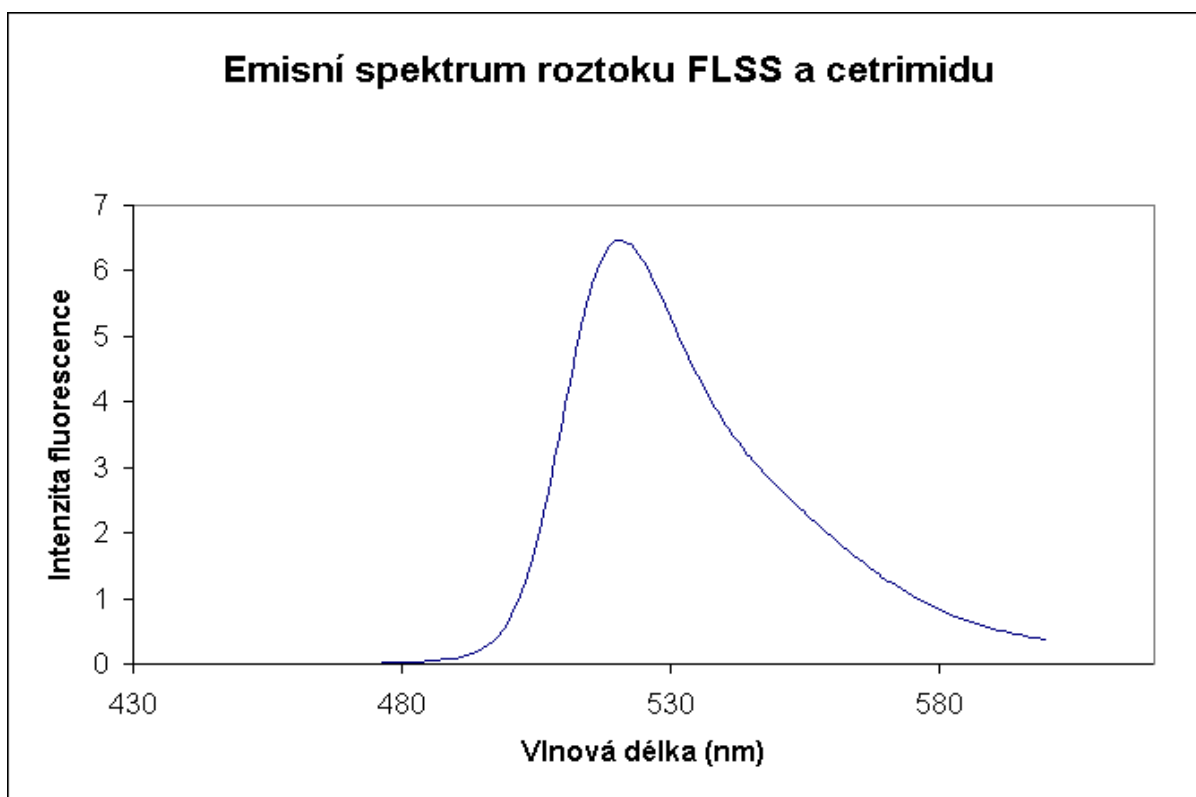
Tabulka č. 14: Hodnoty emisních maxim roztoku TM a cetrimidu

Koncentrace barviva v vzorku [mol.l⁻¹ l]	Vzorek číslo	Vlnová délka emisního maxima λ_{\max} [nm]	Slepý vzorek číslo	Vlnová délka emisního maxima λ_{\max} [nm]
2,00. 10 ⁻⁵	1	529	1	531
2,19. 10 ⁻⁵	2	529	2	532
2,38. 10 ⁻⁵	3	530	3	530
2,56. 10 ⁻⁵	4	531	4	531
2,81. 10 ⁻⁵	5	529	5	529
3,00. 10 ⁻⁵	6	513	6	531
4,00. 10 ⁻⁵	7	530	7	530
5,00. 10 ⁻⁵	8	529	8	530
6,00. 10 ⁻⁵	9	527	9	531
7,00. 10 ⁻⁵	10	529	10	532
8,00. 10 ⁻⁵	11	529	11	531
1,00. 10 ⁻⁴	12	532	12	517
1,20. 10 ⁻⁴	13	554	13	574

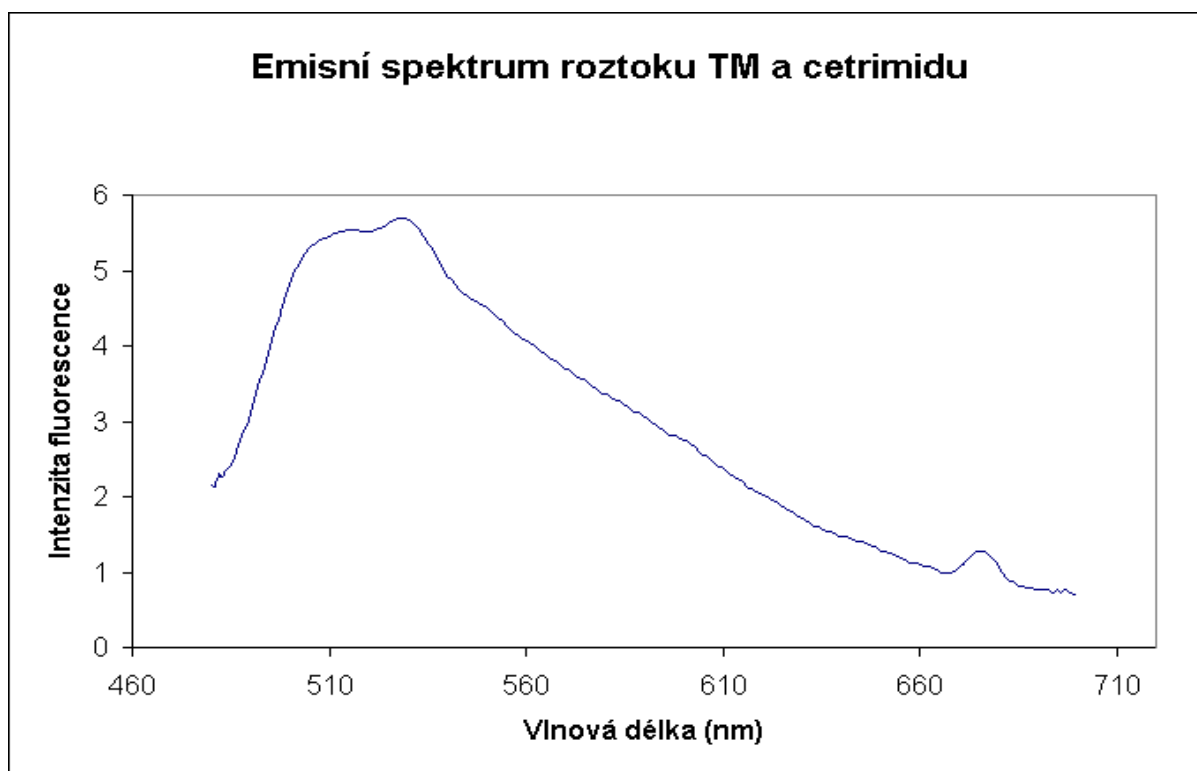
Obrázek č. 11: Excitační spektrum roztoku FLSS a cetrimidu



Obrázek č. 12: Vzorové emisní spektrum roztoku FLSS a cetrimidu



Obrázek č. 13: Vzorové emisní spektrum roztoku TM a cetrimidu



5. DISKUSE

5.1. Interakce cetrimidu s FLSS

Při studiu vlivu hodnot pH na extrahovatelnost iontových párů v roztoku barviva FLSS a cetrimidu se ukázalo jako jednoznačně nejvýhodnější pH 7,96. To je v soulase s údajem z literatury (21), která uvádí hodnotu disociační konstanty do prvního disociačního stupně barviva FLSS $pK_a = 4,5$. Dále jsem sledovala trend poklesu extrahovatelnosti iontových párů směrem k zásaditějšímu pH, což můžeme vysvětlit pokračující disociací do druhého stupně. Závislost absorbance chloroformového výtřepku na přebytku barviva ve vodné fázi má v tomto případě zcela neobvyklý průběh. Na rozdíl od obvyklých pozorování, například v práci (22), kde docházelo k hypochromnímu posunu, naměřila jsem pro FLSS posun hyperchromní. Je obtížné najít příčinu této anomálie z dat naměřených v mé diplomové práci. Lze však konstatovat, že i zmíněný hyperchromní posun svědčí o existenci určitých interakcí tenzidu a barviva ve studovaných roztocích.

Sledováním vlivu cetrimidu na absorpční spektrum FLSS jsem zjistila, že na hladině cetrimidu $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ nedochází se zvyšujícím se přebytkem FLSS k posunům absorpčních spekter barviva FLSS. Vlnová délka absorpčních maxim se pohybovala vždy okolo hodnoty 490 nm.

Naproti tomu v experimentech provedených metodou fluorimetrie na stejné koncentrační hladině cetrimidu se ukázalo, že dochází k posunům emisních maxim směrem k oblasti vyšších vlnových délek. V tabulce č. 13 je provedeno porovnání vlnových délek emisních maxim vzorků a příslušných slepých vzorků. Z porovnání plyne, že při nízkých koncentracích barviva (tedy v oblasti, kde jsou koncentrace barviva a tenzidu srovnatelné) se fluorescenční maximum vzorku nachází při vyšší vlnové délce než je vlnová délka fluorescenčního maxima příslušného slepého vzorku. Avšak při vyšších koncentracích barviva jsou vlnové délky fluorescenčních maxim vzorků a slepých vzorků prakticky stejné (rozdíl nejvýše 1 nm). Z toho je vidět, že cetrimid ovlivňuje polohu fluorescenčního maxima FLSS, ale pouze tehdy, je-li jeho koncentrace dostatečně vysoká ve srovnání s koncentrací barviva. Odečtení fluorescenčních spekter slepých vzorků od fluorescenčních spekter vzorků nezměnilo polohu vlnových délek fluorescenčních maxim vzorků. Na základě uvedených výsledků je možno konstatovat, že v roztocích obsahujících cetrimid a FLSS dochází k interakcím obou látek za vzniku agregátů, pokud jsou jejich koncentrace dostatečně blízké. Zda k určité agregaci dochází i mimo oblast srovnatelných koncentrací obou látek, nelze z mých výsledků soudit.

5.2. Interakce cetrimidu s TM

V kapitole 4.1. uvádím, že při hledání optimálního prostředí pro pokusy s TM jsem již v pokusech směrem k zásaditějšímu pH nepokračovala, a to vzhledem k žádoucím disociačním vlastnostem barviva, které se projevují právě v prostředí kyselém. Disociaci do prvního stupně TM odpovídají hodnoty pH 1,2 – 2,8 (pKa přibližně 2). Svá měření jsem tedy ukončila dvě jednotky pH pod hodnotou pKa do druhého disociačního stupně, neboť se dá předpokládat, že další disociace by měla na měření rušivý účinek, jak plyne z předchozích pozorování (23). Závislost absorbance chloroformového výtřepku na přebytku barviva ve vodné fázi u TM již vykazuje běžný průběh charakterizovaný hypochromním posunem.

Studiem vlivu cetrimidu na absorpční spektrum TM jsem stanovila, že na hladině cetrimidu $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ došlo se zvyšujícím se přebytkem TM k posunům absorpčních maxim barviva TM do oblasti vyšších vlnových délek. Tento bathochromní posun je na studovaném koncentračním rozsahu poměrně značný (430 – 448 nm) a svědčí patrně o agregaci částic TM v roztoku, což je ve shodě s výsledky extrakční spektrofotometrie (viz výše zmíněný hypochromní posun). Takovýto posun může svědčit buď o agregaci spojené se zvýšením konjugace π -elektronových systémů, nebo o tvorbě vysoce uspořádaných agregátů typu J. Proti druhé možnosti ovšem hovoří fakt, že bathochromní posun nebyl spojen s výrazným zúžením absorpčního pásu, který je charakteristickým znakem vzniku uspořádaných struktur. Proto se domnívám, že ve studovaných roztocích došlo zřejmě k interakcím vedoucím k tvorbě strukturně nespecifikovaných agregátů, tvořených částicemi barviva a tenzidu.

Pokusy provedenými metodou fluorimetrie se vzorky obsahujícími přebytky TM na hladině cetrimidu $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ jsem zjistila, že k posunům emisních maxim nedochází. Výjimku tvoří výsledky u posledních dvou vzorků, uvedené v tabulce č. 14 (kapitola 4.6.), které považuji za anomálii. K vysvětlení tohoto stavu by bylo potřeba dalšího zkoumání.

Situaci, kdy dochází vlivem agregace k posunům v absorpčních spektrech, zatímco spektra fluorescenční zůstávají beze změn, pozorovala rovněž Otradovská (24) v případě roztoků neutrální červeni a laurylsíranu sodného. V jejím případě šlo však o hypochromní posuny v absorpčních spektrech, z čehož autorka usoudila, že je indikován vznik tzv. H-agregátů. V tomto ohledu je chování soustavy TM-cetrimid odlišné.

Fluorescenční spektra měřená v této diplomové práci byla skenována s krokem 2 nm. Pokud v případě nižších koncentrací mělo spektrum natolik nevyhlazený tvar, že bylo obtížné

vyhodnotit fluorescenční maxima, popřípadě provést odečítání spekter vzorku a příslušného slepého vzorku, byla surová spektrální data vyhlazena Savitzky-Golayovým algoritmem (25), který je součástí vyhodnocovacího softwaru luminiscenčního spektrometru AMINCO-BOWMAN SERIES 2 a takto vyhlazená spektra byla dále zpracována.

6. ZÁVĚR

Tato diplomová práce se zabývá studiem interakcí mezi kationickým tenzidem cetrimidem a dvěma organickými barvivy (fluoresceinem a thymolovou modří) s využitím extrakční spektrofotometrie, UV-VIS absorpční spektrofotometrie a fluorimetrie. Spektrální data naměřená v roztocích obou barviv se zdají být protichůdná. Při extrakční spektrofotometrii roztoků fluoresceinu byl zjištěn hyperchromní posun při různých přebytečných barviva, v případě thymolové modří se při analogických pokusech jednalo o posun hypochromní. Zatímco roztoky fluoresceinu zachovávaly stejná absorpční spektra, ale v jejich spektrech fluorescenčních byly zaznamenány výrazné posuny, bylo tomu u roztoků thymolové modří přesně naopak. Byly zaznamenány značné posuny ve spektrech absorpčních, ale fluorescenční spektra se neměnila. To lze interpretovat tak, že agregace částic v roztocích fluoresceinu výrazně ovlivňuje jeho elektronovou konfiguraci v excitovaném stavu, ale nikoli ve stavu základním. V případě roztoků thymolové modří je tomu naopak. Agregace má zásadní vliv na elektronovou konfiguraci základního stavu, avšak ve stavu excitovaném ne. Je ovšem také možné, že v případě thymolové modří dochází při excitaci k uvolnění významného počtu částic barviva z agregátů a jeho fluorescence proto není agregací ovlivněna.

7. LITERATURA

- (1) Chalabala M. et al.: Technologie léků, nakladatelství Galén, Praha 2001.
- (2) Klotz I.M., Marian Walker F., Pivan R.B., J. Am. Chem. Soc. 68 (1946), 1486.
- (3) Michaelis L., Granick S., J. Am. Chem. Soc. 68 (1946), 1486.
- (4) Klotz I.M., Royer G.P., Sloniewsky A.R., Biochemistry 8 (1969), 4752.
- (5) Yamamoto H., Nakazawa A., Biopolymers 23 (1984), 1367.
- (6) Amire O.A., Burrows H.D., Surfactants in Solution, Mittal K.L., Bothorel P., (eds.), Plenum Press: New York, 1986, Vol. 4.
- (7) Colichman E.L., J. Am. Chem. Soc. 94 (1972), 5089.
- (8) Quadrifoglio F., Crezenzi V., J. Colloid Interface Sci. 135 (1990), 209.
- (9) Neumann M.G., Gehlen M.H., J. Colloid Interface Sci. 35 (1971), 447.
- (10) Buwalda R.T., Jonker J.M., Engberts J.B.F.N, Aggregation of Azo Dyes with Cationic Amphiphiles at Low Concentrations in Aqueous Solution, Langmuir 15 (1999), 1083-1089.
- (11) Malyukin Y.V., Efimova S.L., Kemnitz K., Spectroscopy of intermolecular interaction in the system: Dye- sodium dodecylsulphate micelles, J. Lumin, 94-95 (2001), 239-242.
- (12) Casero I., Sicilia D., Rubio S., Pérez-Bendito D., Study of the formation of dye-induced premicellar aggregates and its application to the determination of quarternary ammonium surfactants, Talanta 45 (1997), 167-180.
- (13) Buwalda R.T., Molecular aggregation in water: the interplay of hydrophobic and electrostatic interactions, www.ub.rug.nl/eldoc/dis/science/r.t.buwalda.
- (14) Dutta R.K., Bhat S.N., Interaction of phenazinium dyes and methyl orange with micelles of various charge types, Colloids and Surfaces A: Physicochemical and engineering aspects 106 (1996), 127-134
- (15) Gehlen M.H., Ferreira M., Neumann M.G., Interactions of methylorange with cationic micelles and its effect on dye photochemistry, J. Photochem. And Photobiol. A.: Chemistry 87 (1995), 55-60.
- (16) Maiti N.C., Muzumdar S., Periasamy N., J- and H- Aggregates of Porphyrin-Surfactants Complexes: Time-Resolved Fluorescence and Other Specroscopic Studies, J. Phys. Chem. B. 102 (1998), 3705.
- (17) Everaars M.D., Marcelli A.T.M., Kuijpers A.J., Laverdure E., Korona J., Koudijs A., Sudholter E.J.R., Lagmuir 11 (1995), 1528-1538
- (18) Kubíček V.: Osobní sdělení
- (19) Číhalík J., Dvořák J., Suk V.: Příručka měření pH, SNTL, Praha 1975.

- (20) Farkašová D., Interakce povrchově aktivních látek a organických barviv v roztocích, diplomová práce, Katedra biofyziky a fyzikální chemie, FaF UK v Hradci Králové, 2003.
- (21) Bishop E.: Indicators, Pergamon Press, Oxford, New York, Toronto 1972.
- (22) Kubíček V., Němcová K.: Study of the Interaction Phenomena of Cetyl-trimethylammonium Bromide, Cetylpyridinium Chloride and Benzethonium Chloride with C.I Acid Orange 52 and Picric Acid by Two Spectral Methods, *Dyes and Pigments* 68 (2006), 183-189.
- (23) Voděrka J.: Povrchově aktivní látky II, diplomová práce, Katedra biofyziky a fyzikální chemie, FaF UK v Hradci Králové, 1999.
- (24) Otradovská Z.: Interakce tenzidů a organických barviv v roztocích I, diplomová práce, Katedra biofyziky a fyzikální chemie, FaF UK v Hradci Králové, 2007.
- (25) Savitzky A., Golay M. J. E.: Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures. *Analytical Chemistry* 36 (1964), 1627-1639.
DOI:10.1021/ac60214a047