

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

Katedra biofyziky a fyzikální chemie

**Použití polarizovaného světla ke studiu interakcí
látek v roztocích I**

(rigorózní práce)

Hradec Králové 2008

Mgr. Zuzana Otradovská

Čestné prohlášení

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

2. 11. 2008

Poděkování

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

Abstrakt:

Tato rigorózní práce se zabývá studiem interakcí mezi laurylsíranem sodným a organickým barvivem neutrální červení s využitím fluorescenční spektroskopie.

Cílem této práce bylo navázat na výsledky mé diplomové práce a ověřit interakci tenzidu a organického barviva v roztocích další metodou. Měření má sloužit jako úvodní studie pro eventuální využití fluorescenčních měření s polarizovaným světlem v biomedicínském a gerontologickém výzkumu.

Studium roztoků poskytlo velmi zajímavé výsledky, které nasvědčují tvorbě agregátů. Z výsledků však nelze určit, zda vznikají agregáty vysoce uspořádané či neuspořádané.

Abstract:

This rigorous thesis deals with a study of the interaction between sodium lauryl sulphate and organic dye neutral red utilizing fluorescence spectroscopy.

The aim of this work was to verify interactions of tenside and organic dye in their solutions, which were indicated in my diploma thesis, by a further method. The work serves as the introductory basis for a possible utilization of fluorescence measurement with polarized light in biomedical and gerontological research.

A study of the solutions gave very interesting results that indicate the formation of aggregates. But the question, if the aggregates are of highly arranged type or disarranged type, remains.

SOUHRN

Tato rigorózní práce se zabývá studiem interakcí mezi laurylsíranem sodným a organickým barvivem neutrální červení s využitím fluorescenční spektroskopie. K měření bylo použito polarizovaného světla. Měření je provedeno na relativně jednoduchém systému a má sloužit jako úvodní studie pro eventuální využití fluorescenčních měření s polarizovaným světlem v biomedicínském a gerontologickém výzkumu.

OBSAH

1. ÚVOD	6
2. TEORETICKÁ ČÁST.....	9
2.1 Tenzidy	10
2.1.1 Složení tenzidů	10
2.1.2 Rozdělení tenzidů.....	10
2.1.3 Vlastnosti tenzidů.....	11
2.2 Interakce organických barviv s tenzidy.....	11
2.2.1 Tvorba agregátů.....	11
2.2.2 J- a H-agregáty komplexu porfyrin-čínidlo	11
2.2.3 Elektrostatické interakce při agregaci	12
2.2.4 Proces tvorby agregátů	12
2.3 Fluorescenční spektrometrie.....	12
2.3.1 Struktura látek a fotoluminiscence	13
2.3.2 Luminiscence	13
2.3.3 Charakteristiky fluorescence	16
2.3.4 Fluorescenční polarizace	18
2.3.5 Spektrofluorimetry	20
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	22
3.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE	23
3.2 POUŽITÉ PŘÍSTROJE.....	24
3.3 PŘÍPRAVA ZÁSObNÍCH ROZTOKŮ	24
3.3.1 Příprava roztoků neutrální červeně	24
3.3.2 Příprava roztoků tenzidu	24
3.4 PŘÍPRAVA TLUMIVÝCH ROZTOKŮ	25
3.5 PRACOVNÍ POSTUP.....	25
3.5.1. Měření vzorků při spektrálních pološířkách 4 nm	26
3.5.2. Měření vzorků při spektrálních pološířkách 2 nm a 4 nm.....	26
3.5.3. Měření slepých vzorků při spektrálních pološířkách 4 nm	27
3.5.4. Měření slepých vzorků při spektrálních pološířkách 2 nm a 4 nm	27
4. VÝSLEDKY	28
4.1 Měření vzorků při spektrálních pološířkách 4 nm	29
4.2 Měření vzorků při spektrálních pološířkách 2 nm a 4 nm.....	37
4.3 Měření slepých vzorků při spektrálních pološířkách 4 nm	45
4.4 Měření slepých vzorků při spektrálních pološířkách 2 nm a 4 nm	52
5. DISKUZE.....	59
6. LITERATURA.....	62

1. ÚVOD

Fluorescenční metody [8] se stále více používají nejen v biochemickém a biofyzikálním výzkumu, ale i v klinické chemii, genetických analýzách, monitorování prostředí a dalších oborech. V biomedicíně se jedná především o identifikaci a dělení buněk v průtokové cytometrii, zobrazování buněčných složek ve fluorescenční mikroskopii a analýze obrazu, studium změn konformací a dynamiky buněčných systémů, aplikace v různých testech jako je ELISA a další, kdy fluorescenční metody často nahrazují metody využívající radionuklidové zářiče. Fluorescenční metody mají velké využití i v lékařském výzkumu, jako např. v oboru gerontologie, kde je možné využít měření polarizace fluorescence k poskytnutí informací o molekulární orientaci a pohyblivosti a procesech, které je modulují, např.:

fluidita membrán

interakce ligand-receptor

proteolýza

interakce protein-DNA

kontrakce svalů

aktivita proteinkináz .

Tenzidy [1] (povrchově aktivní látky, surfactanty) jsou v dnešní době hojně užívané látky. Z praktického hlediska jsou důležité především jejich schopnosti emulgační, pěnicí, čistící a hlavně stabilizující. Tenzidy jsou používány nejen ve farmacii, ale také v kosmetice a v potravinářství.

Barviva [7], nebo barvivům podobné molekuly, hrají v lékařských oborech významnou roli. Slouží nejen k diagnostice, analytice a fotochemoterapii, kde "barva" hraje podstatnou roli, ale slouží také jako léčiva, kde vlastní barva sloučeniny není podstatná. Důležité u těchto látek je, že obvykle musí mít velkou planární molekulu (vlastnost podobná barvivům) různě substituovanou tak, aby léčivo mělo afinitu k požadovanému substrátu.

Protože léčiva obsahují jako stabilizátory příslušné tenzidy a současně obsahují i různá barviva, jsou důležité vzájemné interakce mezi těmito složkami v roztocích. Zkoumání interakcí mezi laurylsíranem sodným (LSS) a neutrální červení (NČ), s využitím extrakční spektrofotometrie, UV-VIS absorpční spektrofotometrie a fluorimetrie, bylo předmětem i mé diplomové práce [11]. U vzorků měřených metodou UV-VIS absorpční spektroskopie docházelo k výrazným hypsochromním posunům ve spektrech neutrální červeně, které

ukazují na existenci výrazných interakcí tenzid-barvivo. Tyto interakce mají za následek tvorbu agregátů, které se svou strukturou blíží agregátům typu H. Výsledky u vzorků měřených metodou fluorimetrie ukazují také na tvorbu těchto agregátů. Protože výsledky DP poukazují na velmi výrazné interakce mezi LSS a NČ, stalo se zkoumání těchto interakcí předmětem i mé rigorózní práce a to pomocí fluorescenční spektroskopie.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Tenzidy [1]

2.1.1 Složení tenzidů

Tenzidy jsou někdy také označovány jako povrchově aktivní látky, nebo surfaktanty. Jejich molekuly se skládají ze dvou částí, které mají opačnou afinitu k danému prostředí, a to z části hydrofilní a lipofilní.

Hydrofilní je polární část nebo části molekuly, které mají afinitu k vodě a kolem kterých se vytváří solvatační obal z molekul vody. Hydrofilní části molekuly tenzidu mohou ve vodném roztoku disociovat (např. - COOH, - SO₃H).

Lipofilní jsou nepolární části molekuly tenzidu, které vodu odpuzují. Lipofilní složku mohou vytvářet struktury aromatických sloučenin, uhlovodíkové řetězce alkanů nebo alkenů.

2.1.2 Rozdělení tenzidů

Podle schopnosti disociace ve vodě dělíme tenzidy na:

1. Neiontové
2. Iontové
 - Amfoterní
 - Anionické
 - Kationické

Amfoterní tenzidy obsahují kationtové i aniontové skupiny a mění svůj náboj podle pH prostředí. Při vyšších hodnotách pH se vyskytují jako aniontové a při nižším jako kationtové.

Aniontové tenzidy mají většinou formu soli (karboxylových kyselin, sulfonových kyselin, kyseliny fosforečné, kyseliny sírové). Ve vodě disociují na povrchově aktivní, negativně nabitý aniont a menší kationt.

Kationtový tenzid obsahuje povrchově aktivní část, která nese buď permanentně (quaty) nebo podle pH (aminy) kladný náboj.

2.1.3 Vlastnosti tenzidů

Důležitou vlastností tenzidů je jejich afinita k fázovému rozhraní. Dokáží měnit energetické poměry na fázovém rozhraní už při dosažení nízkých koncentrací, což se projevuje snížením povrchového napětí.

Vedle afinity tenzidů k fázovému rozhraní hraje důležitou roli také schopnost molekul tenzidů, po dosažení určité koncentrace v roztoku (tzv. kritické micelární koncentrace – CMC), spontánně reagovat a vytvářet útvary, které se označují jako micely. Tento děj je vratný, to znamená, že po naředění roztoku micely zanikají a vzniká opět pravý roztok. V oblasti CMC se prudce mění některé parametry soustavy jako osmotický tlak, hustota, vodivost a další.

2.2 Interakce organických barviv s tenzidy

2.2.1 Tvorba agregátů

Autoři publikace [3] zkoumali interakce azobarviv s tenzidy ve vodném prostředí prostřednictvím UV-VIS spektroskopie. Jak uvádějí, nabité polymery a neionogenní polymery mají schopnost působit společně s ionty organických molekul, což vede k utváření agregátů. Agregace je v první řadě umožněna Coulombovským přitahováním iontů tenzidu a opačných nábojů aromatických molekul, což indukuje vznik elektroneutrálních agregátů. Agregace je dále usnadněna hydrofobickým shlukováním alkylových řetězců tenzidu [2]. Studie [3] byla zaměřena na interakce mezi molekulou kationického barviva a anionického proteinu, stejně jako kationického proteinu a anionického barviva.

2.2.2 J- a H-agregáty komplexu porfyrin-činidlo

Indičtí autoři [2] se zabývali interakcemi mezi porfyrinovými barvivými a tenzidy (cetyltrimethylamoniumbromidem, Tritonem X-100, atd.). Zjistili, že se při těchto interakcích tvoří buď nespecifické agregáty, nebo vysoce specifické agregáty (H-typu, J-typu).

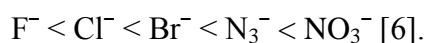
O J-typu nebo H-typu mluvíme u agregátů, které mají molekuly barviva vysoce uspořádané. Někdy může tvorbě H-agregátu předcházet tvorba J-agregátu. Jednotlivé typy agregátů se tvoří při různých koncentracích tenzidu. U porfyrinových barviv se monomer mění v J-agregát tehdy, když se koncentrace tenzidu rovná dvojnásobku koncentrace barviva.

Při dalším zvyšování koncentrace tenzidu je J-agregát nestabilní a jakmile je koncentrace tenzidu oproti koncentraci barviva čtyřnásobná, J-agregát zmizí a vzniká H-agregát.

2.2.3 Elektrostatické interakce při agregaci

R.K. Dutta a S.N. Bhat zjistili, že interakce mezi tenzidem a organickým barvivem jsou jak elektrostatické, tak hydrofobní [4].

Při tvorbě agregátů hrají velkou roli elektrostatické interakce. Elektrolyty mohou zmenšovat elektrostatické interakce mezi barvivem a tenzidem [5]. Některými studiemi [6] bylo zjištěno, že blednutí krystalové violeti je silně inhibováno anionty solí, které se při koncentraci blízké CMC naváží k povrchu micely daného tenzidu elektrostatickými interakcemi a zabrání tak jejich interakci s barvivem. Pořadí efektivity aniontů jako inhibitorů, je dáno jejich relativní schopností snižovat CMC a zvyšovat agregační číslo pro daný tenzid. Efektivita aniontů jako inhibitorů tedy roste v pořadí:



2.2.4 Proces tvorby agregátů

Holandští autoři [3] sledovali vodné roztoky methyloranže a p-methylčerveně s tenzidem, jehož koncentrace byla pod CMC. Zjistili, že v těchto roztocích byla pozorována sraženina, která byla tvořena krystaly obsahujícími ekvimolární množství tenzidu a barviva. Autoři odmítají vysvětlení, že vzniká iontový pár, ale domnívají se, že dochází ke vzniku agregátů azobarviva vázaného na agregáty tenzidu. Naopak R.K. Dutta a S.N. Bhat [4] jsou toho názoru, že vzniká iontový pár, který je tvořen kationtem N-hexadecylpyridiniumchloridu a aniontem methyloranže. Autoři publikace [3] však namítají, že tvorba iontového páru vypadá nepravděpodobně, neboť zde není důvod, aby iontový pár vznikl jen při nízkých koncentracích tenzidu. Z výsledků uvedených v práci [7] rovněž vyplývá, že absorpční pás krátké vlnové délky lze jen těžko přisoudit samotnému iontovému páru.

2.3 Fluorescenční spektrometrie

Fluorescenční metody [8] se stále více používají nejen v biochemickém, biofyzikálním výzkumu, v klinické chemii, genetických analýzách, monitorování prostředí, ale i v lékařském výzkumu, především v oboru neurověd, kdy se využívá:

1. závislosti emisních vlastností fluoroforu na prostředí, v němž se nachází;
2. přenosu elektronové excitační energie mezi donorem a fluoreskujícím akceptorem;
3. polarizované fluorescence.

Fluorescenční spektrometrie je založena na schopnosti molekuly absorbovat energii a tuto energii emitovat ve formě luminiscenčního záření (fluorescence) nebo ji dále předávat při vzájemných kolizích jiným částicím, které následně fluoreskují.

2.3.1 Struktura látek a fotoluminiscence

Při fotoluminiscenci hraje velmi důležitou roli struktura látek. Platí při tom:

1. Podmínkou fotoluminiscence je absorpce záření v UV/VIS oblasti.
2. Luminiscenci pozorujeme u látek s konjugovanými dvojnými vazbami, zejména u aromatických sloučenin s rigidní planární multicyklickou strukturou.
3. Látky obsahující heteroatomy vykazují výraznější fosforescenci (tj. luminiscenční záření doprovázející přechod molekuly z excitovaného tripletního stavu T1 do základního stavu S0 než fluorescence).
4. Skupiny, kde dochází k absorpci a emisi záření, se nazývají fluorofory.
5. Fluorescence bývá ovlivněna hodnotou pH roztoku.

2.3.2 Luminiscence [9]

Luminiscence vzniká excitací atomu působením jiného záření, elektronů apod., a následným návratem atomu do základního stavu, čímž dojde k vyzáření fotonu. Luminiscenci látky lze tedy pozorovat po jejím ozáření jiným zdrojem záření.

Druhy luminiscence:

- fluorescence
- fosforescence
- chemiluminiscence

vzájemně se liší:

- aktivací elektronu do excitovaného stavu

– způsobem vyzáření energie

□ kvantum světelné energie pohlcené molekulou způsobí přemístění elektronu ze základního singletního stavu do jedné z možných excitovaných pozic (singletních - fluorescence nebo výše tripletních - fosforescence)

□ je-li molekula v excitovaném stavu, je několik cest návratu k původnímu energetickému stavu:

singlet excitovaný → singlet základní (fluorescence 10^{-8} s)

triplet excitovaný → singlet základní (fosforescence 10^{-4} s - 100 s)

A. Fluorescence

□ druh luminiscence, u níž dochází k emisi světla v čase kratším než 10^{-8} s

□ je emise elektromagnetického záření při přechodu mezi dvěma stavy téže multiplicity (obvykle dvěma singlety)

□ molekuly absorbují světlo při jedné vlnové délce (excitační) a reemitují při větší vlnové délce (emisní)

□ klasické fluorofory: fluorescein, rhodamin, methylumbelliferon

B. Fosforescence

□ emise záření při přechodu mezi dvěma stavy rozdílné multiplicity (triplet - singlet)

C. Chemiluminiscence

□ vzniká vyzářením fotonu z molekuly luminoforu po jeho chemické oxidaci

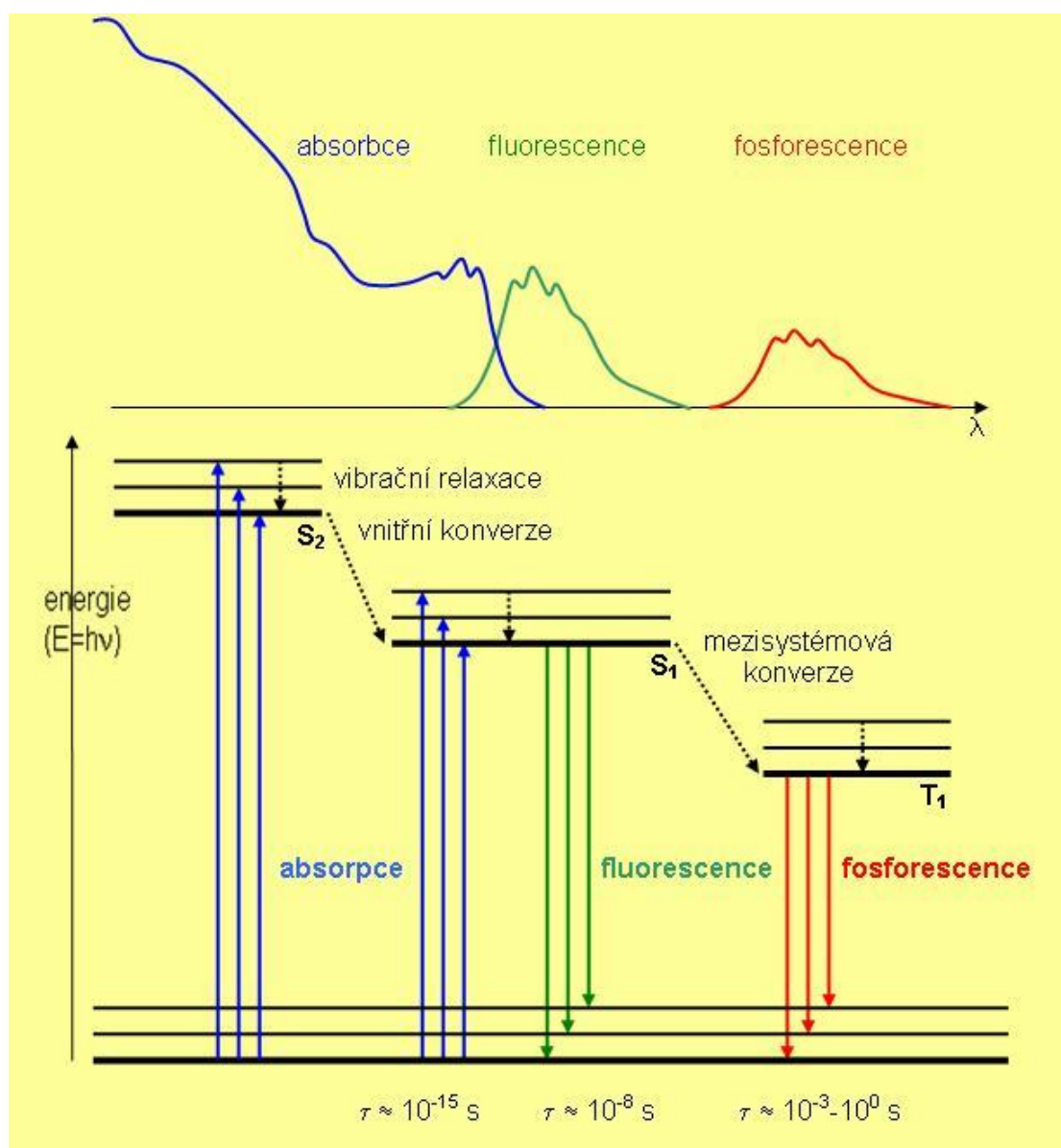
□ světlo emitované vzniká oxidační reakcí organických sloučenin (luminol, isoluminol, luciferin) působením oxidantů (H_2O_2 , O_2 , ClO_4^-)

□ bioluminiscence: zvláštní forma chemiluminiscence - např. enzymy luciferáza, alkalická fosfatáza zvyšují efekt luminiscenční reakce

Na Obr. 1 [8] je zjednodušené schéma zářivých a nezářivých přechodů mezi elektronově vibračními stavy složité molekuly a tvar absorpčních a emisních spekter (λ - vlnová délka). Po absorpci světelného kvanta budícího záření (viz modré šipky) přechází elektrony ze singletního stavu S_0 do excitovaných singletních stavů S_1 , S_2 , ... a tripletních

stavů T1, T2, Molekula obvykle přejde z rovnovážné vibrační hladiny stavu S0 do některé z vibračních hladin excitovaných stavů. K deexcitaci molekuly dochází buď zářivými přechody (luminiscence; viz zelené a červené šipky) nebo nezářivými přechody (vnitřní konverze, mezisystémová konverze, vibrační relaxace; viz černé tečkované šipky). Doba trvání τ jednotlivých procesů je pro absorpci řádově 10^{-15} s, pro fluorescenci 10^{-8} s, pro fosforescenci je mnohem delší než 10^{-8} s (obvykle milisekundy až sekundy), pro vibrační relaxaci 10^{-12} - 10^{-13} s, pro vnitřní konverzi 10^{-6} - 10^{-12} s, pro mezisystémovou konverzi 10^{-4} - 10^{-12} s.

Obr. 1: Schéma zářivých a nezářivých přechodů mezi elektronově vibračními stavy složité molekuly (forma Jablonského diagramu).



2.3.3 Charakteristiky fluorescence [8]

Mezi základní charakteristiky fluorescence patří:

1. intenzita – počet fotonů procházejících v daném směru jednotkovou plochou za jednotku času. Jestliže fluorescenci měříme pod „magickými“ úhly $54^{\circ}44'8''$ nebo $125^{\circ}15'51''$ ke směru excitačního paprsku, potom není její intenzita ovlivněna případnou anizotropií emise systému. Při použití citlivých fotonásobičů pro detekci fluorescenčního záření a při buzení intenzivním světlem lze detekovat koncentrace rozpuštěných látek až 10^{-12} mol/l, což je alespoň o 4 řády vyšší citlivost, než pro absorpční měření.
2. spektrální složení – spektrální hustota fotonového toku na jednotkový interval vlnových délek nebo frekvencí.
3. polarizace – směr kmitání elektrického vektoru elektromagnetické vlny. Měření polarizace fluorescence poskytuje informace o molekulární orientaci a pohyblivosti a procesech, které je modulují, např.: - fluidita membrán; interakce ligand - receptor; proteolýza; interakce protein - DNA; kontrakce svalů; aktivita proteokináz.

Polarizační spektra fluorescence jsou závislosti stupně polarizace nebo anizotropie na vlnové délce při konstantní vlnové délce excitujícího nebo emitovaného záření.
4. doba dohasínání – je dána vnitřní dobou života excitovaného stavu, z něhož dochází k emisi; úzce souvisí s pochody vedoucími k nežádavé deaktivaci tohoto stavu.
5. koherenční vlastnosti – vztahy mezi fázemi světelných vln.

Emisní spektrum je závislost intenzity fluorescence na vlnové délce (nebo energii, vlnočtu, či frekvenci) při konstantní vlnové délce budícího záření.

Excitační spektrum je závislost intenzity fluorescence na vlnové délce (nebo energii, vlnočtu, či frekvenci) při konstantní vlnové délce emitovaného záření.

Kashovo pravidlo:

Před emisí fluorescenčního kvanta dochází obvykle k relaxaci vibrační energie a vnitřní konverzi, takže fluorescenční přechod nastává z nejnižší vibrační hladiny prvního excitovaného stavu S1.

Vavilovův zákon:

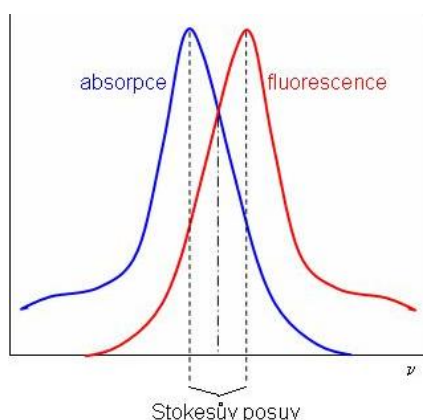
Kvantový výtěžek a doba trvání excitovaného stavu složitých molekul v roztoku nezávisí na vlnové délce budícího záření.

Z toho vyplývá obecná vlastnost fluorescence: Emisní spektra jsou nezávislá na vlnové délce excitace.

Zákon zrcadlové symetrie mezi absorpčním a fluorescenčním pásem:

Zrcadlová symetrie mezi absorpčním a fluorescenčním pásem (Obr. 2) platí pro velké množství organických molekul a je způsobena tím, že absorpce i emise z odpovídajících si vibračních hladin mají stejnou relativní pravděpodobnost. Většina absorbujících i emitujících molekul se nachází v rovnovážném vibračním stavu, přičemž vibrační struktura základního i excitovaného stavu mají stejnou strukturu. Po absorpci přechází elektron z rovnovážné vibrační hladiny stavu S0 na vyšší vibrační hladinu stavu S1, poté dochází k rychlé vibrační relaxaci na rovnovážnou vibrační hladinu excitovaného stavu S1 (v čase 10^{-12} - 10^{-13} s) a teprve poté následuje zářivý přechod na vyšší vibrační hladinu stavu S0 a další vibrační relaxace na rovnovážnou vibrační hladinu stavu S0. Rozdílu v energiích mezi maximy absorpčního a emisního pásu se říká Stokesův posuv. Výjimky z pravidla zrcadlové symetrie jsou obvykle důsledkem rozdílného geometrického uspořádání atomových jader v excitovaném stavu oproti uspořádání ve stavu základním.

Obr. 2 Zrcadlová symetrie absorpčního a fluorescenčního pásu.



2.3.4 Fluorescenční polarizace [9]

- světlo je tvořeno elektrickými a magnetickými vlnami vzájemně kolnými
- polarizované světelné vlny mají vektory elektrického pole orientovány v jedné rovině
- využívá se změny fluorescenční polarizace např. v průběhu imunologických reakcí, lze aplikovat na homogenní reakce nízkomolekulárních analytů (např. léky)

Vztah koncentrace k intenzitě fluorescenční emise

- intenzita fluorescence je úměrná koncentraci fluoroforu a excitační intenzitě
- vztah platí pro zředěné roztoky, kde je absorpce $< 2\%$ excitovaného záření
- při absorpci $> 2\%$ je závislost nelineární, je způsobena tzv. "efektem vnitřního filtru"
- další faktory ovlivňující měření intenzity fluorescence:
 - a) citlivost detektoru
 - b) stupeň rozptylu světla před detekcí (ztráty, pozadí)

Fluorescenční měření

- řádově citlivější než měření absorpce (100 - 1000 \times),
- absorpce v roztoku je určena koncentrací a dráhou světla,
- fluorescence je určena koncentrací, dráhou světla a intenzitou světelného zdroje

Omezení fluorescenčních měření:

- koncentrační efekty (efekt vnitřního filtru, koncentrační zhášení)
- efekty pozadí (Rayleighův rozptyl, Ramanův rozptyl)
- vliv rozpouštědel (interferující nespecifická fluorescence, zhášení rozpouštědla)
- vzorkové efekty (zhášení světla, interferující fluorescence, adsorpce)
- teplotní efekty
- fotodekompozice vzorku

Na obr. 3 [8] je znázorněno uspořádání při měření polarizované fluorescence. Polarizovaná fluorescence roztoků se obvykle měří ve směru kolmém ke směru budícího paprsku, který je polarizován ve svislém směru. Je přitom nutno provádět korekci na vliv emisního monochromátoru spektrofluorimetru na polarizaci jím procházejícího záření. Anizotropie fluorescence se určuje ze vztahu

$$(1.1) \quad r = (I_0 - G I_{90}) / (I_0 + 2 G I_{90}),$$

kde I_0 a I_{90} jsou složky světelné intenzity rovnoběžné nebo kolmé k směru (vertikálnímu) polarizace budícího záření a G je korekční faktor, který lze změřit při excitačním záření polarizovaném vodorovně jako poměr:

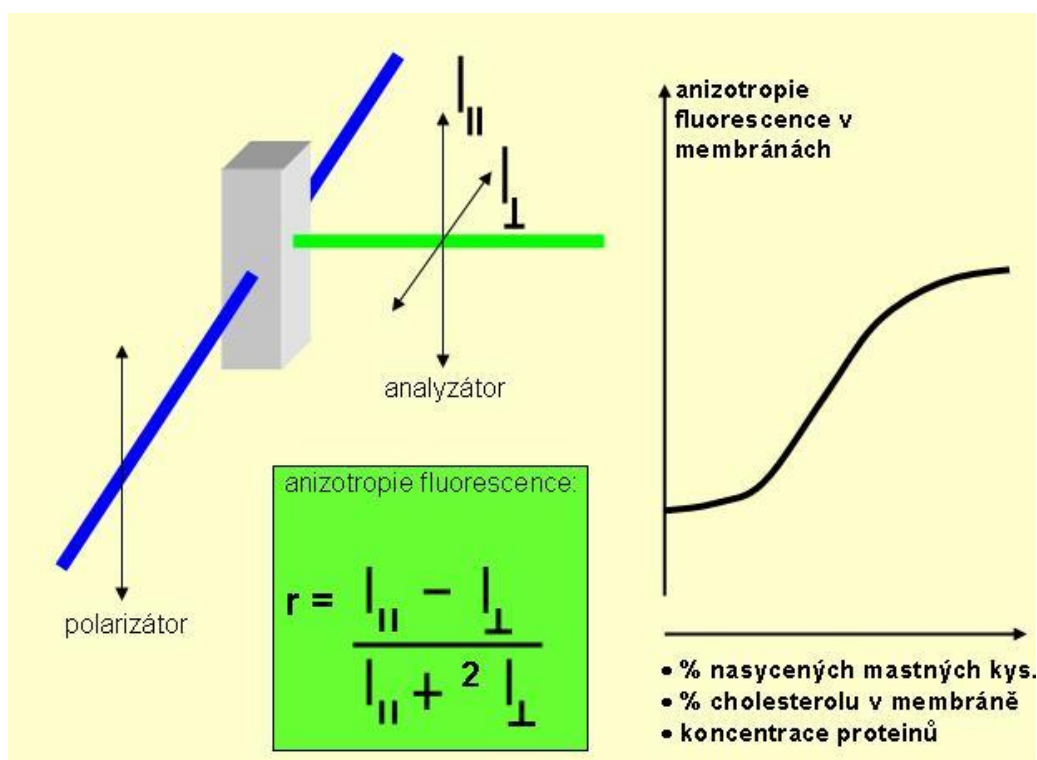
$$(1.2) \quad G = I_{90} / I_0.$$

U fluoroforů s dlouhou dobou života v roztocích o malé viskozitě je faktor G při měření excitačního spektra konstantní.

Bude-li analyzátor otočen o „magický“, úhel $54,74^\circ$, potom je:

$$(1.3) \quad I_{54,7} = I_0 + 2I_{90}$$

Obr. 3: Uspořádání při měření polarizované fluorescence



Veličiny charakterizující polarizaci fluorescence:

- Stupeň polarizace
- Anizotropie fluorescence
- Depolarizační faktor

2.3.5 Spektrofluorimetry [9]

Základní části fluorimetru:

- xenonový zdroj
- zdroj napětí
- monochromátor excitačního záření
- kyveta (průtoková cela) se vzorkem
- monochromátor emitovaného záření
- detektory
- zesilovače
- malá část paprsku (10%) je srovnávací (přes fotonásobič)
- emisní optika je téměř vždy kolmá na excitační
- používá se pro koncentrační měření předem definovaných podmínek (fixní vlnová délka excitačního záření, fixní vlnová délka emitovaného záření)

Excitační zdroj (abs.spektra fluoreskujících látek - 300 - 550 nm)

- xenonová lampa zajišťující kontinuum energie pro 250-800 nm, záblesková - 2500 pulsů/sec., 200-1100 nm
- křemenná halogenová lampa
- rtuťová lampa
- laserový zdroj

Používá se uspořádání [8] s jedním emisním monochromátorem (uspořádání „L“) nebo se dvěma protilehlými emisními monochromátory (uspořádání „T“). Při měření polarizované fluorescence jsou za excitační monochromátor a před emisní monochromátor zařazeny polarizátory, které jsou otočné kolem osy paprsku jimi procházejícího.

Při měření emisních spekter fluorescence je excitační monochromátor nastaven na pevnou vlnovou délku budícího záření. Při měření excitačních spekter je pevně nastavena vlnová délka na emisním monochromátoru. Kromě vlnových délek excitace a emise se běžně nastavují ještě šířky štěrbin obou monochromátorů, které ovlivňují citlivost a spektrální rozlišení daného měření.

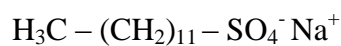
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE

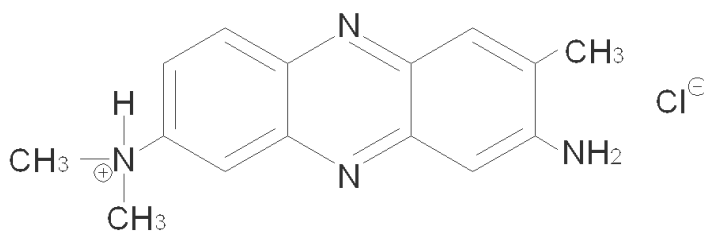
Při svých pokusech jsem použila dané chemikálie:

- Destilovaná voda – FaF UK
- Hydroxid sodný – Lachema s.p. Brno, o.z. Neratovice
- Kyselina boritá – Lachema n.p. Brno (krystalická)
- Kyselina chlorovodíková – Lachema n.p. Brno, o.z. Neratovice
- Kyselina fosforečná – Lachema n.p. Brno, o.z. Neratovice
- Kyselina octová – Lachema a.s. Neratovice
- Laurylsíran sodný (viz vzorec č.1) – Lachema a.s. Neratovice, použitá zkratka LSS
- Lihometanol – FaF UK
- Neutrální červeň (viz vzorec č.2) – Lachema n.p. Brno, použitá zkratka NČ

Vzorec č.1: Laurylsíran sodný (Mr = 288,38)



Vzorec č.2: Neutrální červeň (Mr = 252,3)



3.2 POUŽITÉ PŘÍSTROJE

Při své práci jsem používala tyto přístroje:

- Digitální analytické váhy – Sartorius
- Luminiscenční spektrometr AMINCO-BOWMAN SERIES 2
- pH-metr PerpHect 350 – ORION

3.3 PŘÍPRAVA ZÁSOBNÍCH ROZTOKŮ

3.3.1 Příprava roztoků neutrální červeně

Na analytických vahách jsem si navážila 0,0631g NČ ($M_r = 252,3$), toto množství jsem kvantitativně převedla do odměrné baňky na 50ml, rozpustila a doplnila destilovanou vodou po rysku. Takto jsem získala základní roztok NČ o koncentraci $5 \cdot 10^{-3}$ mol/l. Protože NČ byla k dispozici ve formě baze, byla rozpouštěna v ekvimolárním množství roztoku kyseliny chlorovodíkové (0,2mol/l).

Dále jsem pro svá měření používala roztoky NČ o koncentracích $5 \cdot 10^{-4}$ mol/l a $2,5 \cdot 10^{-4}$ mol/l. Tyto roztoky jsem získala příslušným ředěním základního roztoku NČ destilovanou vodou.

3.3.2 Příprava roztoků tenzidu

Základní roztok LSS ($M_r = 288,38$) o koncentraci $5 \cdot 10^{-2}$ mol/l jsem připravila navážením 0,7209g LSS na analytických vahách, toto množství jsem kvantitativně převedla do odměrné baňky na 50ml, rozpustila a doplnila destilovanou vodou po rysku.

Roztok LSS o koncentraci $1 \cdot 10^{-4}$ mol/l jsem získala ze základního roztoku LSS o koncentraci $5 \cdot 10^{-2}$ mol/l příslušným ředěním destilovanou vodou.

3.4 PŘÍPRAVA TLUMIVÝCH ROZTOKŮ

Příprava univerzálního pufru podle H.T.S. Brittona a R.A. Robinsona

Podle literatury [10] jsem připravila Britton-Robinsonův pufr (BR) smísením dvou roztoků v určitém poměru. K přípravě jsem potřebovala roztok hydroxidu sodného o koncentraci 0,2mol/l, jehož potřebné množství jsem přidávala k 25ml roztoku kyseliny borité, kyseliny fosforečné a kyseliny octové o koncentraci 0,04mol/l. Objemy obou roztoků pro přípravu Britton-Robinsonova pufru o pH 5,02 udává tabulka č.1.

Tabulka č.1: Příprava univerzálního Britton-Robinsonova pufru o pH 5,02

Objem 0,04 mol/l roztoku kyselin (ml)	Objem 0,2 mol/l NaOH (ml)	pH
25	8,75	5,02

3.5 PRACOVNÍ POSTUP

Do třinácti kádinek jsem odpipetovala 0,8ml zásobního roztoku LSS o koncentraci $1 \cdot 10^{-4}$ mol/l, potřebná množství pufru o pH 5,02 a zásobního roztoku NČ o odpovídající koncentraci podle tabulky č.2. Podle této tabulky jsem si připravila i příslušné slepé vzorky, které odpovídaly roztokům NČ o různé koncentraci, tenzid byl ve slepých roztocích nahrazen vodou.

Tabulka č.2: Složení vzorků s nadbytkem barviva

Vzorek			Slepý roztok		
Koncentrace zás. roztoku NČ (mol/l)	Objem zásobního roztoku NČ (ml)	Objem pufru (ml)	Koncentrace NČ ve vzorku (mol/l)	Objeme zás. roztoku NČ (ml)	Objem pufru (ml)
$2,5 \cdot 10^{-4}$	0,32	2,88	$2,00 \cdot 10^{-5}$	0,00	3,20
$2,5 \cdot 10^{-4}$	0,35	2,85	$2,19 \cdot 10^{-5}$	0,03	3,17
$2,5 \cdot 10^{-4}$	0,38	2,82	$2,38 \cdot 10^{-5}$	0,06	3,14
$2,5 \cdot 10^{-4}$	0,41	2,79	$2,56 \cdot 10^{-5}$	0,09	3,11
$2,5 \cdot 10^{-4}$	0,45	2,75	$2,81 \cdot 10^{-5}$	0,13	3,07
$2,5 \cdot 10^{-4}$	0,48	2,72	$3,00 \cdot 10^{-5}$	0,16	3,04
$2,5 \cdot 10^{-4}$	0,64	2,56	$4,00 \cdot 10^{-5}$	0,32	2,88
$2,5 \cdot 10^{-4}$	0,80	2,40	$5,00 \cdot 10^{-5}$	0,48	2,72
$2,5 \cdot 10^{-4}$	0,96	2,24	$6,00 \cdot 10^{-5}$	0,64	2,56
$2,5 \cdot 10^{-4}$	1,12	2,08	$7,00 \cdot 10^{-5}$	0,80	2,40
$2,5 \cdot 10^{-4}$	1,28	1,92	$8,00 \cdot 10^{-5}$	0,96	2,24
$5,0 \cdot 10^{-4}$	0,80	2,40	$1,00 \cdot 10^{-4}$	0,64	2,56
$5,0 \cdot 10^{-4}$	0,96	2,24	$1,20 \cdot 10^{-4}$	0,80	2,40

3.5.1. Měření vzorků při spektrálních pološířkách 4 nm

U vzorků, které jsem připravila podle tabulky 2, jsem proměřila emisní spektra při nastavení spektrálních pološířek na hodnoty 4 nm (spektrální pološířka před polarizátorem) a 4 nm (spektrální pološířka za analyzátozem). Citlivost přístroje byla u vzorků 1-11 nastavena na slepý vzorek č.6 a pro vzorky 12 a 13 jsem musela citlivost přístroje nastavit na slepém vzorku č. 7, který obsahoval vyšší koncentraci barviva.

Nejprve jsem měřila emisní spektra vzorků při excitaci nepolarizovaným paprskem (open) a emisi paprskem dopadajícím na analyzátor pod tzv. magickým úhlem ($54,7^\circ$), dále při emisi vertikálně polarizovaným (0°) a horizontálně polarizovaným paprskem (90°). U každého proměřeného emisního spektra jsem odečetla hodnoty emisních maxim (EM) a hodnoty intenzit fluorescence (IF).

Měření jsem zopakovala u všech vzorků ještě dvakrát. Nejprve se stejným nastavením analyzátoru jako v předchozím případě, polarizátor byl nastaven tak, že jím procházel vertikálně polarizovaný excitační paprsek (0°). Další měření jsem provedla při excitaci horizontálně polarizovaným paprskem (90°) a při emisi vertikálně (0°) a horizontálně polarizovaným paprskem (90°). I u těchto naměřených emisních spekter jsem odečetla hodnoty emisních maxim a hodnoty intenzit fluorescence.

U emisních spekter, která byla naměřena při excitaci nepolarizovaným, vertikálně polarizovaným a horizontálně polarizovaným paprskem a emisi horizontálně polarizovaným paprskem, jsem odečetla hodnoty IF při takových EM, které odpovídaly EM při emisi vertikálně polarizovaným paprskem. Tyto hodnoty IF jsem použila pro výpočet hodnot $I_{54,7}$ (viz 1.1), G (korekční faktor) a r (Anizotropie) (1.2).

3.5.2. Měření vzorků při spektrálních pološířkách 2 nm a 4 nm

U vzorků, které jsem připravila postupem viz kapitola 3.5, jsem proměřila emisní spektra při nastavení spektrálních pološířek na hodnoty 2 nm (spektrální pološířka před polarizátorem) a 4 nm (spektrální pološířka za analyzátozem). Postup měření je totožný s postupem popsáním v kapitole 3.5.1. Citlivost přístroje byla nastavena na slepý vzorek č. 13.

3.5.3. Měření slepých vzorků při spektrálních pološířkách 4 nm

Emisní spektra slepých vzorků jsem proměřila stejným postupem popsaným viz kapitola 3.5.1. U slepých vzorků jsem však proměřila pouze vzorky 2-13, protože slepý vzorek č.1 neobsahoval barvivo. U prvních šesti vzorků jsem citlivost přístroje nastavila na slepý vzorek č.6, u ostatních na slepý vzorek s vyšší koncentrací barviva (č.13).

3.5.4. Měření slepých vzorků při spektrálních pološířkách 2 nm a 4 nm

Emisní spektra všech slepých vzorků jsem proměřila stejným postupem jako u vzorků (viz kapitola 3.5.2). I v tomto případě jsem proměřila pouze vzorky 2-13, důvod je stejný jako při měření viz kapitola 3.5.3. Citlivost přístroje jsem nastavila na slepý vzorek s vyšší koncentrací barviva (slepý vzorek č 13).

4. VÝSLEDKY

4.1 Měření vzorků při spektrálních pološířkách 4 nm

Postupem popsaným v kapitole 3.5.1 jsem proměřila nejprve emisní spektra všech vzorků při nastavení polarizátoru do polohy open (nepolarizované světlo) a analyzátor byl otočen o úhel $54,7^\circ$, dále byl nastaven do polohy 0° (vertikálně polarizovaný paprsek) a do polohy 90° (horizontálně polarizovaný paprsek). U všech emisních spekter jsem odečetla hodnoty emisních maxim (EM) a hodnoty intenzit fluorescence (IF) (viz tab. 3).

Dále jsem z emisních spekter získaných při měření vzorků, kdy byl analyzátor nastaven do polohy 90° , odečetla hodnoty IF a to při takových vlnových délkách, které odpovídaly EM odečteným z emisních spekter při nastavení téhož analyzátoru do polohy 0° . Pak jsem dopočetla hodnoty intenzity fluorescence $I_{54,7}$ (1.3) viz tab. 4. Obrázek 4 znázorňuje závislost hodnot $I_{54,7}$ na koncentracích barviva (c).

Daná měření a odečtení hodnot EM a IF jsem zopakovala u všech vzorků ještě dvakrát. Nejprve se stejným nastavením analyzátoru jako v předchozím případě, ale polarizátor byl nastaven do polohy 0° (viz tab. 5). I v tomto případě jsem odečetla hodnoty IF u emisních spekter získaných při nastavení analyzátoru do polohy 90° při vlnových délkách, které odpovídaly EM při nastavení stejného analyzátoru do polohy 0° a dopočetla jsem hodnoty $I_{54,7}$ (1.3) viz tab. 6. Závislost těchto hodnot $I_{54,7}$ na koncentracích barviva jsou znázorněny na obr. 5.

Další měření proběhla při nastavení polarizátoru do polohy 90° a analyzátoru do poloh 0° a 90° (viz tab.7). Hodnoty IF odečtené z emisních spekter při nastavení analyzátoru do polohy 90° , které jsme odečetla při vlnových délkách, které odpovídaly EM odečteným z emisních spekter při nastavení analyzátoru do polohy 0° , jsou znázorněny v tab. 8. Pomocí těchto intenzit jsem dopočetla hodnoty G (korekční faktor) (1.2) viz tab. 8. Obrázek 6 znázorňuje závislost hodnot G na koncentracích barviva.

Z hodnot G (tab. 8) a příslušných hodnot IF (tab. 6) jsem dopočetla hodnoty anizotropie r (1.1) pro příslušná měření (tab. 9). Závislost hodnot anizotropie (r) na koncentracích barviva (c) jsou znázorněny na obrázku 7.

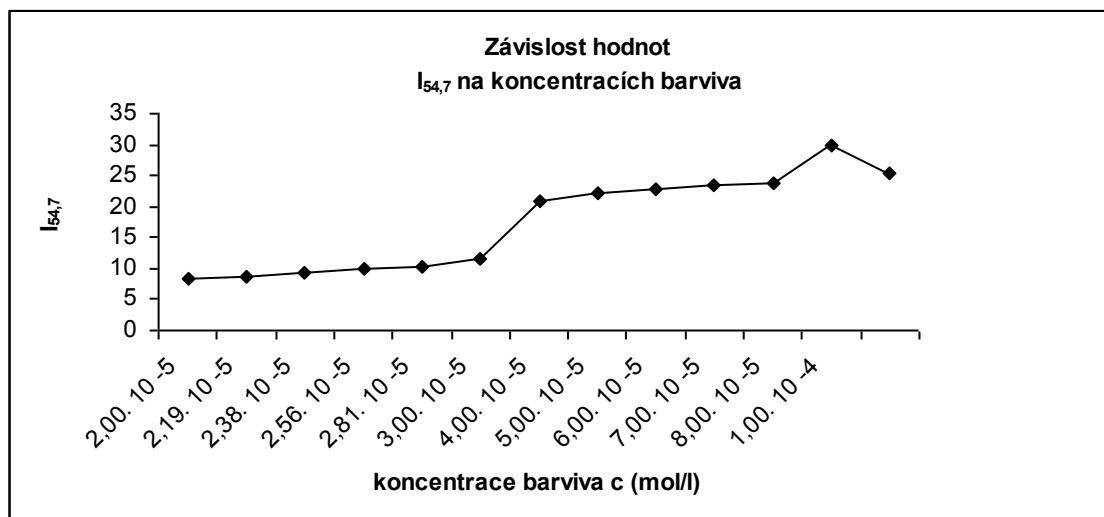
Tab.3: Hodnoty EM a IF odečtené z emisních spekter při nastavení polarizátoru do polohy open a analyzátor byl otočen o úhel 54,7°, dále byl nastaven do poloh 0° a 90° .

Vzorek	Emisní maximum, intenzita fluorescence	Open		
		54,7°	0°	90°
1	EM	621,2	624	619,2
	IF	2,6690	4,5044	1,9638
2	EM	619,2	624	614,4
	IF	2,8347	4,7473	2,0916
3	EM	616	621	624
	IF	2,9806	4,9030	2,1771
4	EM	619,2	624	619,2
	IF	3,2373	5,3015	2,3220
5	EM	619,2	626,4	612
	IF	3,3984	5,6466	2,4484
6	EM	624	624	616,8
	IF	3,7292	6,1679	2,7307
7	EM	623	621	619
	IF	7,4298	9,6511	5,7925
8	EM	619	624	621
	IF	8,0294	9,8617	6,2954
9	EM	618	629	619
	IF	8,3218	9,9264	6,6555
10	EM	621	626	617
	IF	8,4970	9,9465	6,8124
11	EM	626	627	620
	IF	8,6090	9,9636	6,9909
12	EM	627	620	630
	IF	9,0298	9,9487	9,9517
13	EM	619	630	617
	IF	8,7838	9,9005	7,8552

Tab.4: Hodnoty IF při nastavení analyzátoru do polohy 90°, odečtené při vlnových délkách, které odpovídaly EM při nastavení stejného analyzátoru do polohy 0° a dopočítané hodnoty $I_{54,7}$ (1.3)

Vzorek	Emisní maximum, intenzita fluorescence	Open		
		0°	90°	$I_{54,7} = I_0 + 2 I_{90}$
1	EM	624	624	
	IF	$I_0=4,5044$	$I_{90}=1,9180$	8,3405
2	EM	624	624	
	IF	$I_0=4,7473$	$I_{90}=2,0156$	8,7786
3	EM	621	621	
	IF	$I_0=4,9030$	$I_{90}=2,1267$	9,1565
4	EM	624	624	
	IF	$I_0=5,3015$	$I_{90}=2,2653$	9,8321
5	EM	626,4	626,4	
	IF	$I_0=5,6466$	$I_{90}=2,3916$	10,4299
6	EM	624	624	
	IF	$I_0=6,1679$	$I_{90}=2,6812$	11,5304
7	EM	621	621	
	IF	$I_0=9,6511$	$I_{90}=5,6164$	20,8841
8	EM	624	624	
	IF	$I_0=9,8617$	$I_{90}=6,1328$	22,1273
9	EM	629	629	
	IF	$I_0=9,9264$	$I_{90}=6,4013$	22,7291
10	EM	626	626	
	IF	$I_0=9,9465$	$I_{90}=6,7007$	23,3480
11	EM	627	627	
	IF	$I_0=9,9636$	$I_{90}=6,8304$	23,6245
12	EM	620	620	
	IF	$I_0=9,9487$	$I_{90}=9,9462$	29,8413
13	EM	630	630	
	IF	$I_0=9,9005$	$I_{90}=7,7066$	25,3137

Obr.4: Závislost dopočítaných hodnot $I_{54,7}$ na koncentracích barviva (hodnoty viz tab. 4).



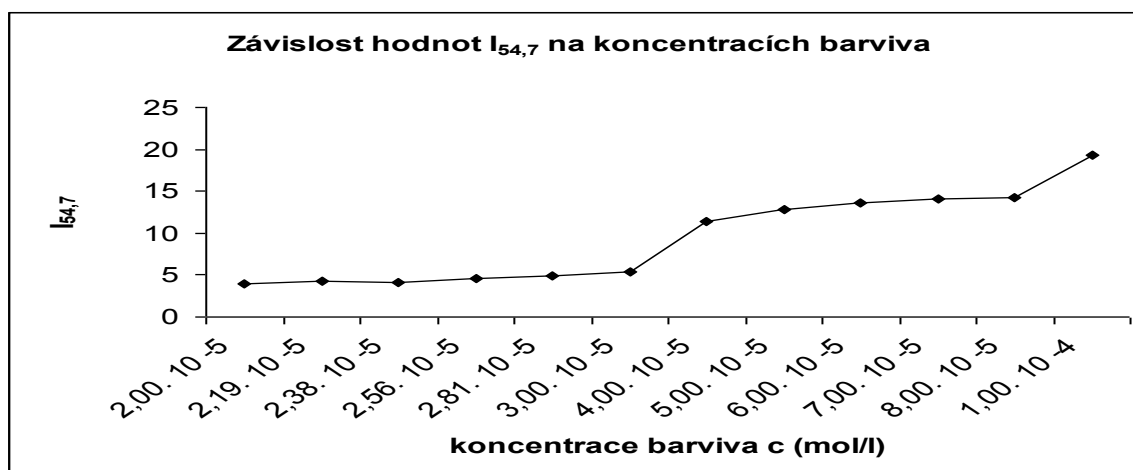
Tab.5: Hodnoty IF a EM odečtené z emisních spekter při nastavení polarizátoru do polohy 0° a analyzátor byl otočen o úhel 54,7°, dále byl nastaven do poloh 0° a 90°

Vzorek	Emisní maximum, intenzita fluorescence	0°		
		54,7°	0°	90°
1	EM	619,2	624	616,8
	IF	1,2707	2,1685	0,9066
2	EM	616,8	619,2	619,2
	IF	1,3409	2,3141	0,9686
3	EM	622	626	612
	IF	1,3742	2,3471	0,9713
4	EM	616,8	621,6	619,2
	IF	1,4990	2,5631	1,0440
5	EM	616,8	621,6	614,4
	IF	1,5698	2,7200	1,1193
6	EM	624	624	616,8
	IF	1,7215	3,0032	1,2325
7	EM	616	627	614
	IF	3,8565	6,3214	2,7114
8	EM	619	622	625
	IF	4,2300	6,8975	3,0246
9	EM	624	622	618
	IF	4,5730	7,2534	3,2571
10	EM	625	625	615
	IF	4,7055	7,4420	3,4198
11	EM	619	624	622
	IF	4,8910	7,5579	3,4759
12	EM	628	627	622
	IF	6,6140	8,4634	5,5011
13	EM	623	627	626
	IF	6,3568	8,1994	5,2093

Tab.6: Hodnoty IF při nastavení analyzátoru do polohy 90° odečtené z emisních spekter při vlnových délkách, které odpovídaly EM při nastavení téhož analyzátoru do polohy 0° a dopočítané hodnoty $I_{54,7}$ (1.3)

Vzorek	Emisní maximum, intenzita fluorescence	0°		
		0°	90°	$I_{54,7} = I_0 + 2 I_{90}$
1	EM	624	624	
	IF	$I_0 = 2,1685$	$I_{90} = 0,8892$	3,9471
2	EM	619,2	619,2	
	IF	$I_0 = 2,3141$	$I_{90} = 0,9686$	4,2514
3	EM	626	626	
	IF	$I_0 = 2,3471$	$I_{90} = 0,9228$	4,1928
4	EM	621,6	621,6	
	IF	$I_0 = 2,5631$	$I_{90} = 1,0357$	4,6347
5	EM	621,6	621,6	
	IF	$I_0 = 2,7200$	$I_{90} = 1,0952$	4,9105
6	EM	624	624	
	IF	$I_0 = 3,0032$	$I_{90} = 1,2060$	5,4153
7	EM	627	627	
	IF	$I_0 = 6,3214$	$I_{90} = 2,5036$	11,3287
8	EM	622	622	
	IF	$I_0 = 6,8975$	$I_{90} = 2,9650$	12,8277
9	EM	622	622	
	IF	$I_0 = 7,2534$	$I_{90} = 3,1546$	13,5626
10	EM	625	625	
	IF	$I_0 = 7,4420$	$I_{90} = 3,3215$	14,0850
11	EM	624	624	
	IF	$I_0 = 7,5579$	$I_{90} = 3,3709$	14,2999
12	EM	627	627	
	IF	$I_0 = 8,4634$	$I_{90} = 5,4019$	19,2672
13	EM	627	627	
	IF	$I_0 = 8,1994$	$I_{90} = 5,1181$	18,4356

Obr.5: Závislost dopočítaných hodnot $I_{54,7}$ na koncentracích barviva (viz hodnoty tab. 6)



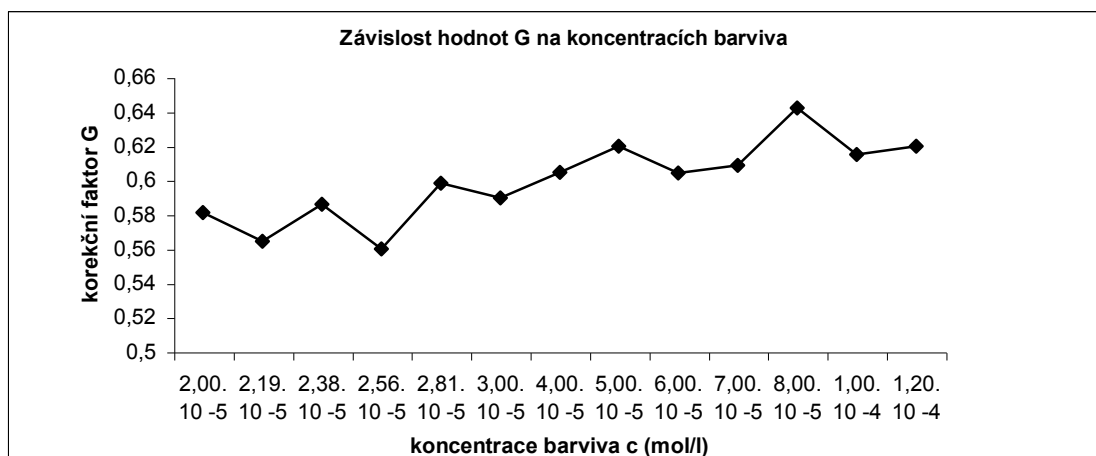
Tab.7: Hodnoty EM a IF odečtené z emisních spekter při nastavení polarizátoru do polohy 90° a analyzátoru do poloh 0° a 90°

Vzorek	Emisní maximum, intenzita fluorescence	90°	
		0°	90°
1	EM	616	616
	IF	3,5308	2,0520
2	EM	621	607
	IF	3,7139	2,1420
3	EM	618	611
	IF	4,1214	2,4804
4	EM	621	625
	IF	4,2324	2,5329
5	EM	620	616
	IF	4,4809	2,7105
6	EM	619	617
	IF	4,6713	2,8842
7	EM	622	618
	IF	5,4110	3,3786
8	EM	623	610
	IF	5,7479	3,3584
9	EM	622	619
	IF	5,8828	3,7713
10	EM	620	623
	IF	5,7998	3,6657
11	EM	616	621
	IF	6,1761	4,0585
12	EM	626	624
	IF	5,9140	3,7753
13	EM	627	613
	IF	5,8490	3,7493

Tab.8: Hodnoty IF při nastavení analyzátoru do polohy 90° odečtené z emisních spekter při vlnových délkách, které odpovídaly EM při nastavení stejného analyzátoru do polohy 0° a dopočítané hodnoty G (1.2)

Vzorek	Emisní maximum, intenzita fluorescence	90°		G = I ₉₀ ^H /I ₀ ^H
		0°	90°	
1	EM	616	616	
	IF	I ₀ ^H =3,5308	I ₉₀ ^H =2,0520	0,5811
2	EM	621	621	
	IF	I ₀ ^H =3,7139	I ₉₀ ^H =2,0956	0,5642
3	EM	618	618	
	IF	I ₀ ^H =4,1214	I ₉₀ ^H =2,4154	0,5860
4	EM	621	621	
	IF	I ₀ ^H =4,2324	I ₉₀ ^H =2,3703	0,5600
5	EM	620	620	
	IF	I ₀ ^H =4,4809	I ₉₀ ^H =2,6812	0,5983
6	EM	619	619	
	IF	I ₀ ^H =4,6713	I ₉₀ ^H =2,7539	0,5895
7	EM	622	622	
	IF	I ₀ ^H =5,4110	I ₉₀ ^H =3,2711	0,6045
8	EM	623	623	
	IF	I ₀ ^H =5,7479	I ₉₀ ^H =3,5623	0,6197
9	EM	622	622	
	IF	I ₀ ^H =5,8828	I ₉₀ ^H =3,5543	0,6041
10	EM	620	620	
	IF	I ₀ ^H =5,7998	I ₉₀ ^H =3,5299	0,6086
11	EM	616	616	
	IF	I ₀ ^H =6,1761	I ₉₀ ^H =3,9660	0,6421
12	EM	626	626	
	IF	I ₀ ^H =5,9140	I ₉₀ ^H =3,6361	0,6148
13	EM	627	627	
	IF	I ₀ ^H =5,8490	I ₉₀ ^H =3,6261	0,6199

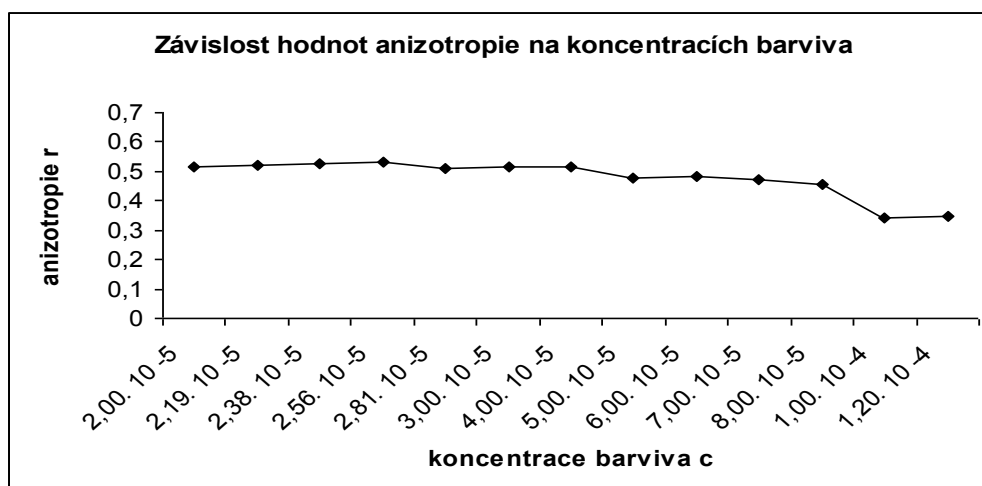
Obr.6: Závislost dopočítaných hodnot G na koncentracích barviva (c) (hodnoty viz tab. 8)



Tab.9: Hodnoty anizotropie r (1.1) dopočítané z hodnot G (viz tab. 8) a naměřených intenzit fluorescence (viz tab. č. 6)

Vzorek	Emisní maximum, intenzita fluorescence	0°		
		0°	90°	$r = (I_0 - G I_{90}) / (I_0 + 2 G I_{90})$
1	EM	624	624	
	IF	$I_0 = 2,1685$	$I_{90} = 0,8892$	0,5158
2	EM	619,2	619,2	
	IF	$I_0 = 2,3141$	$I_{90} = 0,9686$	0,5187
3	EM	626	626	
	IF	$I_0 = 2,3471$	$I_{90} = 0,9228$	0,5267
4	EM	621,6	621,6	
	IF	$I_0 = 2,5631$	$I_{90} = 1,0357$	0,5326
5	EM	621,6	621,6	
	IF	$I_0 = 2,7200$	$I_{90} = 1,0952$	0,5122
6	EM	624	624	
	IF	$I_0 = 3,0032$	$I_{90} = 1,2060$	0,5179
7	EM	627	627	
	IF	$I_0 = 6,3214$	$I_{90} = 2,5036$	0,5142
8	EM	622	622	
	IF	$I_0 = 6,8975$	$I_{90} = 2,9650$	0,4785
9	EM	622	622	
	IF	$I_0 = 7,2534$	$I_{90} = 3,1546$	0,4832
10	EM	625	625	
	IF	$I_0 = 7,4420$	$I_{90} = 3,3215$	0,4719
11	EM	624	624	
	IF	$I_0 = 7,5579$	$I_{90} = 3,3709$	0,4536
12	EM	627	627	
	IF	$I_0 = 8,4634$	$I_{90} = 5,4019$	0,3404
13	EM	627	627	
	IF	$I_0 = 8,1994$	$I_{90} = 5,1181$	0,3455

Obr.7 : Závislost hodnot anizotropie (r) na koncentracích barviva (c) (viz.tab. 9)



4.2 Měření vzorků při spektrálních pološířkách 2 nm a 4 nm

Hodnoty EM a IF, které jsem odečetla z emisních spekter při nastavení polarizátoru do polohy open, přičemž analyzátor byl otočený pod úhlem $54,7^\circ$, dále byl nastaven do poloh 0° a 90° , jsou znázorněny v tab.10.

Z naměřených emisních spekter při nastavení analyzátoru do polohy 90° jsem odečetla hodnoty IF při vlnových délkách, které odpovídaly EM při nastavení téhož analyzátoru do polohy 0° a dopočetla jsem hodnoty $I_{54,7}$ (1.3) (viz tab. 11). Závislost hodnot $I_{54,7}$ na koncentracích barviva jsou znázorněny na obr. 8.

Hodnoty EM a IF odečtené z emisních spekter při stejném nastavení analyzátoru jako v předchozím případě, ale nastavení polarizátoru bylo do polohy 0° , jsou v tab.12. Tab.13 znázorňuje hodnoty IF emisních spekter při nastavení analyzátoru do polohy 90° odečtené při vlnových délkách, které odpovídaly EM při nastavení téhož analyzátoru do polohy 0° a dopočítané hodnoty $I_{54,7}$ (1.3). Obrázek 9 znázorňuje závislost dopočítaných hodnot $I_{54,7}$ na koncentracích barviva.

Další měření jsem provedla při nastavení polarizátoru do polohy 90° a nastavením analyzátoru do poloh 0° a 90° (viz tab. 14). Tab. 15 znázorňuje hodnoty IF odečtené z emisních spekter při nastavení analyzátoru do polohy 90° při takových vlnových délkách, které odpovídaly EM při nastavení téhož analyzátoru do polohy 0° . Pomocí těchto intenzit jsem dopočetla hodnoty G (1.2) viz tab. 15. Obrázek 10 znázorňuje závislost dopočítaných hodnot G na koncentracích barviva.

Z hodnot G (tab. 15) a příslušných hodnot intenzit (tab. 13) jsem dopočetla hodnoty anizotropie r (1.1) pro příslušná měření (tab. 16). Závislost hodnot r na koncentracích barviva pro daná měření jsou znázorněna na obr. č. 11.

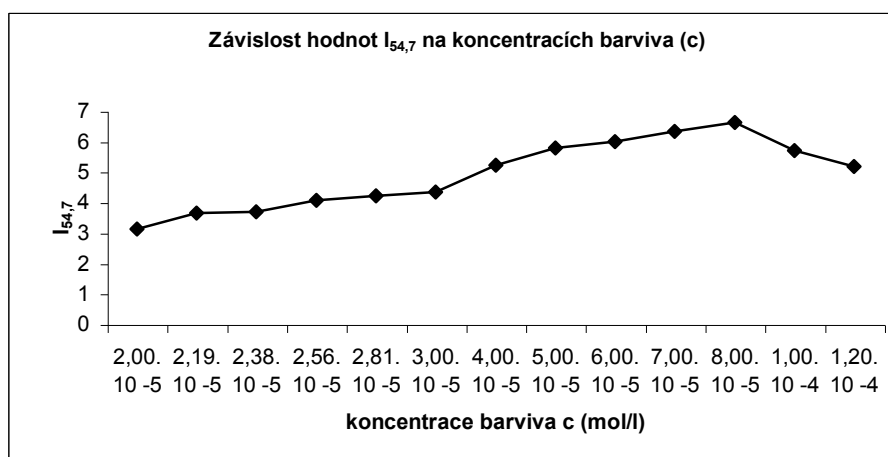
Tab.10: Hodnoty EM a IF získané z emisních spekter při nastavení polarizátoru do polohy open a analyzátor byl otočen o úhel 54,7°, dále byl nastaven do poloh 0° a 90°

Vzorek	Emisní maximum, intenzita fluorescence	Open		
		54,7°	0°	90°
1	EM	624	621	611
	IF	1,0064	1,6793	0,7418
2	EM	618	621	622
	IF	1,1926	1,9610	0,8773
3	EM	618	625	616
	IF	1,1871	2,0269	0,8969
4	EM	620	617	617
	IF	1,2866	2,1536	0,9561
5	EM	624	624	622
	IF	1,3552	2,2522	1,0397
6	EM	624	624	622
	IF	1,4209	2,3590	1,0595
7	EM	619	625	618
	IF	1,6626	2,7731	1,2698
8	EM	622	622	623
	IF	1,8145	3,0789	1,3751
9	EM	621	626	624
	IF	1,8914	3,2186	1,4526
10	EM	617	622	619
	IF	1,9812	3,3758	1,5380
11	EM	618	621	617
	IF	2,0788	3,4826	1,5737
12	EM	624	629	625
	IF	1,8048	3,0490	1,4178
13	EM	627	630	621
	IF	1,6336	2,7691	1,2606

Tab.11: Hodnoty IF z emisních spekter při nastavení analyzátoru do polohy 90° odečtené při stejných vlnových délkách, které odpovídaly EM při nastavení stejného analyzátoru do polohy 0° a dopočítané hodnoty $I_{54,7}$ (1.3)

Vzorek	Emisní maximum, intenzita fluorescence	Open		
		0°	90°	$I_{54,7} = I_0 + 2 I_{90}$
1	EM	621	621	
	IF	$I_0 = 1,6793$	$I_{90} = 0,7250$	3,1295
2	EM	621	621	
	IF	$I_0 = 1,9610$	$I_{90} = 0,8459$	3,6529
3	EM	625	625	
	IF	$I_0 = 2,0269$	$I_{90} = 0,8258$	3,6785
4	EM	617	617	
	IF	$I_0 = 2,1536$	$I_{90} = 0,9561$	4,0658
5	EM	624	624	
	IF	$I_0 = 2,2522$	$I_{90} = 0,9783$	4,2089
6	EM	624	624	
	IF	$I_0 = 2,3590$	$I_{90} = 0,9902$	4,3396
7	EM	625	625	
	IF	$I_0 = 2,7731$	$I_{90} = 1,2188$	5,2108
8	EM	622	622	
	IF	$I_0 = 3,0789$	$I_{90} = 1,3577$	5,7943
9	EM	626	626	
	IF	$I_0 = 3,2186$	$I_{90} = 1,3848$	5,9884
10	EM	622	622	
	IF	$I_0 = 3,3758$	$I_{90} = 1,4746$	6,3250
11	EM	621	621	
	IF	$I_0 = 3,4826$	$I_{90} = 1,5726$	6,6278
12	EM	629	629	
	IF	$I_0 = 3,0490$	$I_{90} = 1,3262$	5,7015
13	EM	630	630	
	IF	$I_0 = 2,7691$	$I_{90} = 1,2088$	5,1867

Obr.8: Závislost hodnot $I_{54,7}$ na koncentracích barviva (c) (viz text k tab. č.11).



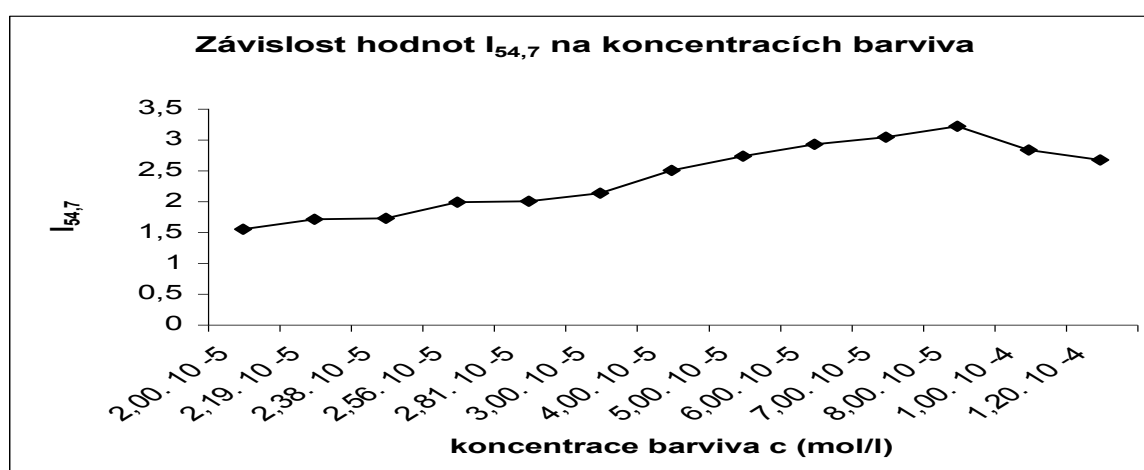
Tab.12: Hodnoty IF a EM odečtené z emisních spekter při nastavení polarizátoru do polohy 0° a otočení analyzátoru o úhel 54,7°, dále při nastavení do poloh 0° a 90°

Vzorek	Emisní maximum, intenzita fluorescence	0°		
		54,7°	0°	90°
1	EM	621	617	621
	IF	0,4937	0,8364	0,3594
2	EM	629	623	621
	IF	0,5517	0,9627	0,4171
3	EM	619	623	615
	IF	0,5532	0,9298	0,4064
4	EM	618	621	617
	IF	0,6054	1,0565	0,4699
5	EM	626	625	626
	IF	0,6619	1,1212	0,4898
6	EM	618	622	623
	IF	0,6716	1,1468	0,5029
7	EM	616	622	617
	IF	0,7913	1,3479	0,5801
8	EM	619	624	619
	IF	0,8804	1,4920	0,6433
9	EM	627	621	620
	IF	0,9280	1,5536	0,6906
10	EM	627	629	625
	IF	0,9747	1,6595	0,7394
11	EM	620	623	619
	IF	1,0073	1,7111	0,7479
12	EM	616	626	616
	IF	0,8874	1,5423	0,6768
13	EM	623	626	626
	IF	0,8203	1,4028	0,6274

Tab.13: Hodnoty IF při nastavení analyzátoru do polohy 90° odečtené při stejných vlnových délkách, které odpovídaly EM při nastavení téhož analyzátoru do polohy 0° a dopočítané hodnoty $I_{54,7}(1.3)$

Vzorek	Emisní maximum, intenzita fluorescence	0°		
		0°	90°	$I_{54,7} = I_0 + 2 I_{90}$
1	EM	617	617	
	IF	$I_0 = 0,8364$	$I_{90} = 0,3506$	1,5377
2	EM	623	623	
	IF	$I_0 = 0,9627$	$I_{90} = 0,3701$	1,7030
3	EM	623	623	
	IF	$I_0 = 0,9298$	$I_{90} = 0,3918$	1,7135
4	EM	621	621	
	IF	$I_0 = 1,0565$	$I_{90} = 0,4605$	1,9775
5	EM	625	625	
	IF	$I_0 = 1,1212$	$I_{90} = 0,4337$	1,9886
6	EM	622	622	
	IF	$I_0 = 1,1468$	$I_{90} = 0,4870$	2,1209
7	EM	622	622	
	IF	$I_0 = 1,3479$	$I_{90} = 0,5715$	2,4911
8	EM	624	624	
	IF	$I_0 = 1,4920$	$I_{90} = 0,6164$	2,7249
9	EM	621	621	
	IF	$I_0 = 1,5536$	$I_{90} = 0,6802$	2,9141
10	EM	629	629	
	IF	$I_0 = 1,6595$	$I_{90} = 0,6872$	3,0340
11	EM	623	623	
	IF	$I_0 = 1,7111$	$I_{90} = 0,7496$	3,2104
12	EM	626	626	
	IF	$I_0 = 1,5423$	$I_{90} = 0,6396$	2,8216
13	EM	626	626	
	IF	$I_0 = 1,4028$	$I_{90} = 0,6274$	2,6577

Obr. 9: Závislost hodnot $I_{54,7}$ na koncentracích barviva (viz text k tab.13)



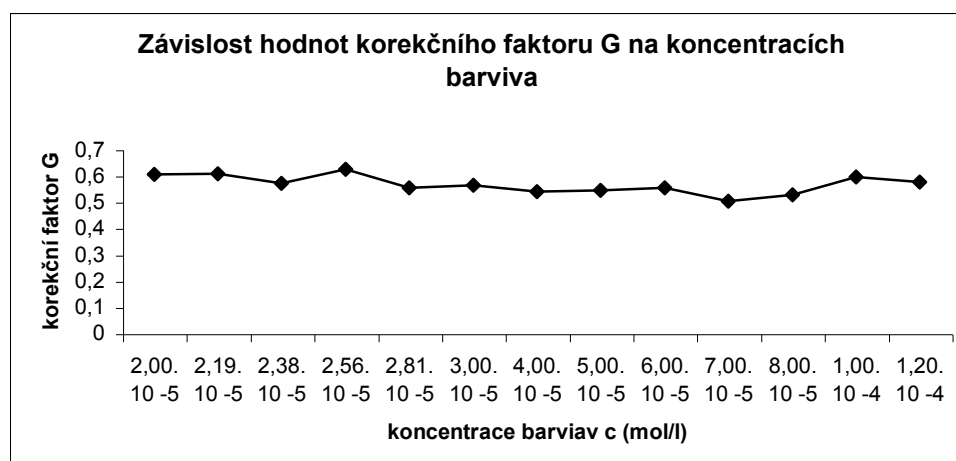
Tab.14: Hodnoty EM a IF odečtené z emisních spekter při nastavení polarizátoru do polohy 90° a analyzátoru do poloh 0° a 90°

Vzorek	Emisní maximum, intenzita fluorescence	90°	
		0°	90°
1	EM	618	632
	IF	0,3445	0,2316
2	EM	624	605
	IF	0,3942	0,2529
3	EM	624	619
	IF	0,4458	0,2713
4	EM	623	623
	IF	0,4623	0,2883
5	EM	625	611
	IF	0,4995	0,2856
6	EM	624	614
	IF	0,5313	0,3179
7	EM	623	617
	IF	0,6109	0,3625
8	EM	625	614
	IF	0,6958	0,4010
9	EM	612	620
	IF	0,7031	0,4037
10	EM	616	625
	IF	0,7275	0,4095
11	EM	625	625
	IF	0,7550	0,3979
12	EM	616	616
	IF	0,7699	0,4583
13	EM	625	625
	IF	0,7492	0,4315

Tab.15: Hodnoty IF odečtené z emisních spekter při nastavení analyzátoru do polohy 90° při stejných vlnových délkách, které odpovídaly EM při nastavení téhož analyzátoru do polohy 0° a dopočítané hodnoty G

Vzorek	Emisní maximum, intenzita fluorescence	90°		
		0°	90°	$G = I_{90}^H / I_0^H$
1	EM	618	618	
	IF	$I_0^H = 0,3445$	$I_{90}^H = 0,2081$	0,6040
2	EM	624	624	
	IF	$I_0^H = 0,3942$	$I_{90}^H = 0,2398$	0,6083
3	EM	624	624	
	IF	$I_0^H = 0,4458$	$I_{90}^H = 0,2551$	0,5722
4	EM	623	623	
	IF	$I_0^H = 0,4623$	$I_{90}^H = 0,2883$	0,6237
5	EM	625	625	
	IF	$I_0^H = 0,4995$	$I_{90}^H = 0,2774$	0,5552
6	EM	624	624	
	IF	$I_0^H = 0,5313$	$I_{90}^H = 0,2999$	0,5646
7	EM	623	623	
	IF	$I_0^H = 0,6109$	$I_{90}^H = 0,3302$	0,5404
8	EM	625	625	
	IF	$I_0^H = 0,6958$	$I_{90}^H = 0,3784$	0,5438
9	EM	612	612	
	IF	$I_0^H = 0,7031$	$I_{90}^H = 0,3897$	0,5542
10	EM	616	616	
	IF	$I_0^H = 0,7275$	$I_{90}^H = 0,3652$	0,5020
11	EM	625	625	
	IF	$I_0^H = 0,7550$	$I_{90}^H = 0,3979$	0,5270
12	EM	616	616	
	IF	$I_0^H = 0,7699$	$I_{90}^H = 0,4583$	0,5953
13	EM	625	625	
	IF	$I_0^H = 0,7492$	$I_{90}^H = 0,4315$	0,5759

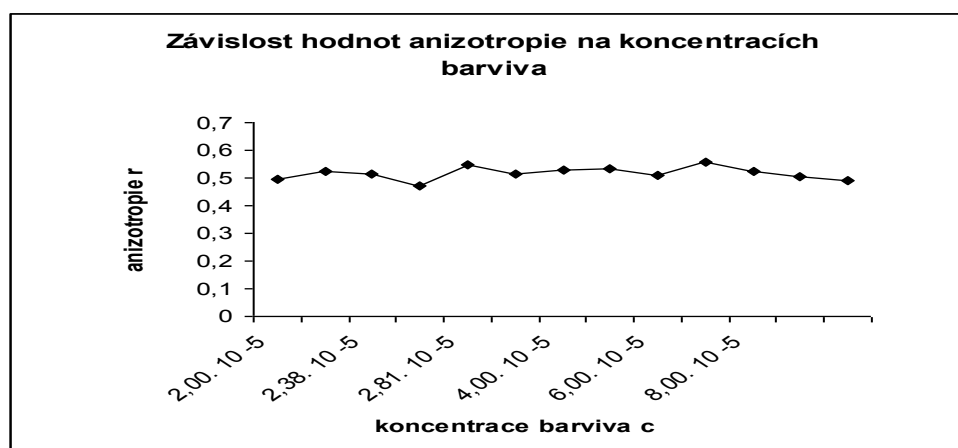
Obr.10: Závislost hodnot G na koncentracích barviva (viz tab. č. 15)



Tab.16: Hodnoty anizotropie r (1.2) dopočítané z hodnot G (tab.15) a z naměřených hodnot intenzit fluorescence (viz tab. 13)

Vzorek	Emisní maximum, intenzita fluorescence	0°		
		0°	90°	$r = (I_0 - G I_{90}) / (I_0 + 2 G I_{90})$
1	EM	617	617	
	IF	$I_0 = 0,8364$	$I_{90} = 0,3506$	0,4957
2	EM	623	623	
	IF	$I_0 = 0,9627$	$I_{90} = 0,3701$	0,5219
3	EM	623	623	
	IF	$I_0 = 0,9298$	$I_{90} = 0,3918$	0,5119
4	EM	621	621	
	IF	$I_0 = 1,0565$	$I_{90} = 0,4605$	0,4716
5	EM	625	625	
	IF	$I_0 = 1,1212$	$I_{90} = 0,4337$	0,5492
6	EM	622	622	
	IF	$I_0 = 1,1468$	$I_{90} = 0,4870$	0,5138
7	EM	622	622	
	IF	$I_0 = 1,3479$	$I_{90} = 0,5715$	0,5285
8	EM	624	624	
	IF	$I_0 = 1,4920$	$I_{90} = 0,6164$	0,5348
9	EM	621	621	
	IF	$I_0 = 1,5536$	$I_{90} = 0,6802$	0,5098
10	EM	629	629	
	IF	$I_0 = 1,6595$	$I_{90} = 0,6872$	0,5594
11	EM	623	623	
	IF	$I_0 = 1,7111$	$I_{90} = 0,7496$	0,5261
12	EM	626	626	
	IF	$I_0 = 1,5423$	$I_{90} = 0,6396$	0,5041
13	EM	626	626	
	IF	$I_0 = 1,4028$	$I_{90} = 0,6274$	0,4899

Obr.11: Závislost hodnot anizotropie na koncentracích barviva (hodnoty viz tab.16)



4.3 Měření slepých vzorků při spektrálních pološířkách 4 nm

Postupem popsaným v kapitole 4.1 jsem proměřila slepé vzorky.

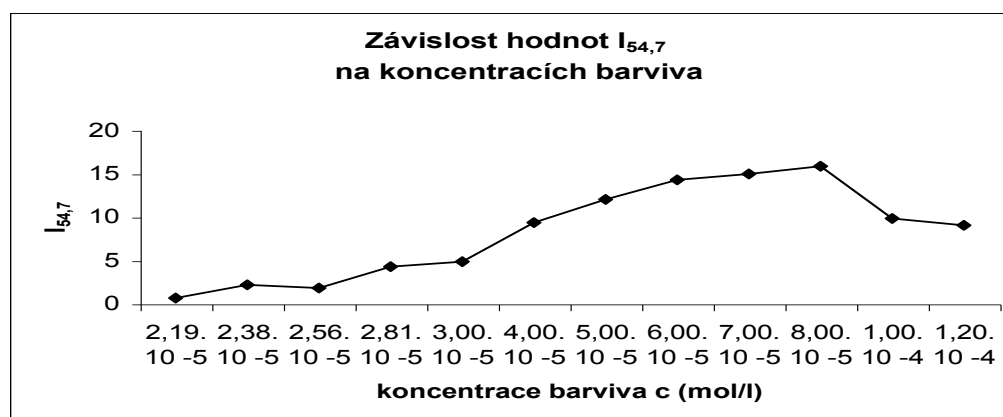
Tab.17: Hodnoty EM a IF odečtené z emisních spekter při nastavení polarizátoru do polohy open a analyzátor byl otočen o úhel 54,7° , dále byl nastaven do poloh 0° a 90°

Vzorek	Emisní maximum, intenzita fluorescence	Open		
		54,7°	0°	90°
1	EM	-	-	-
	IF	-	-	-
2	EM	615	626	625
	IF	0,3836	0,6192	0,0282
3	EM	621	621	618
	IF	0,6735	1,1526	0,5212
4	EM	617	619	618
	IF	0,8245	1,4074	0,6774
5	EM	623	625	615
	IF	1,3931	2,2641	1,0733
6	EM	619	616	614
	IF	1,5466	2,5906	1,1737
7	EM	626	624	619
	IF	2,8921	4,9566	2,2738
8	EM	621	625	615
	IF	3,7927	6,3940	2,9351
9	EM	619	622	621
	IF	4,5004	7,3980	3,4893
10	EM	621	626	619
	IF	4,6701	7,7121	3,6526
11	EM	623	624	618
	IF	5,0351	8,1689	3,9569
12	EM	624	623	624
	IF	3,0029	5,1373	2,3855
13	EM	621	629	623
	IF	2,7822	4,7851	2,2021

Tab. 18: Hodnoty IF odečtené z emisních spekter při nastavení analyzátoru do polohy 90° odečtené při stejných vlnových délkách, které odpovídaly EM při nastavení téhož analyzátoru do polohy 0° a dopočítané hodnoty $I_{54,7}$ (1.3)

Vzorek	Emisní maximum, intenzita fluorescence	Open		
		0°	90°	$I_{54,7} = I_0 + 2 I_{90}$
1	EM	-	-	-
	IF	-	-	-
2	EM	626	626	
	IF	$I_0 = 0,6192$	$I_{90} = 0,0271$	0,6735
3	EM	621	621	
	IF	$I_0 = 1,1526$	$I_{90} = 0,5172$	2,1871
4	EM	619	619	
	IF	$I_0 = 1,4074$	$I_{90} = 0,2225$	1,8525
5	EM	625	625	
	IF	$I_0 = 2,2641$	$I_{90} = 1,0119$	4,2880
6	EM	616	616	
	IF	$I_0 = 2,5906$	$I_{90} = 1,1319$	4,8544
7	EM	624	624	
	IF	$I_0 = 4,9566$	$I_{90} = 2,1981$	9,3530
8	EM	625	625	
	IF	$I_0 = 6,3940$	$I_{90} = 2,8183$	12,0306
9	EM	622	622	
	IF	$I_0 = 7,3980$	$I_{90} = 3,4552$	14,3084
10	EM	626	626	
	IF	$I_0 = 7,7121$	$I_{90} = 3,6273$	14,9667
11	EM	624	624	
	IF	$I_0 = 8,1689$	$I_{90} = 3,8491$	15,8673
12	EM	623	623	
	IF	$I_0 = 5,1373$	$I_{90} = 2,3480$	9,8333
13	EM	629	629	
	IF	$I_0 = 4,7851$	$I_{90} = 2,1429$	9,0710

Obr. 12: Závislost hodnot $I_{54,7}$ na koncentracích barviva (viz tab. 18)



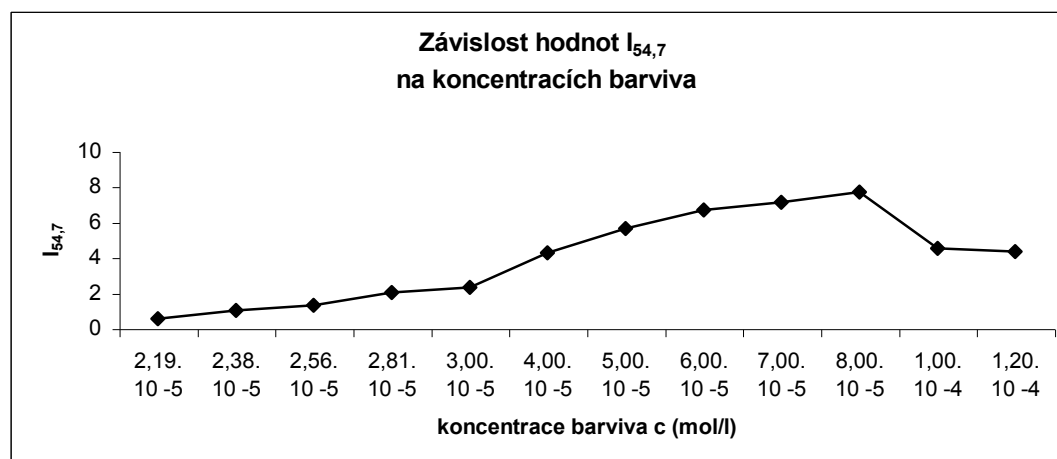
Tab. 19: Hodnoty IF a EM odečtené z emisních spekter při nastavení polarizátoru do polohy 0° a otočení analyzátoru o úhel 54,7° ,dále při jeho nastavení do poloh 0° a 90°

Vzorek	Emisní maximum, intenzita fluorescence	0°		
		54,7°	0°	90°
1	EM	-	-	-
	IF	-	-	-
2	EM	620	626	620
	IF	0,1785	0,3002	0,1495
3	EM	620	620	618
	IF	0,3323	0,5578	0,2575
4	EM	617	617	623
	IF	0,4177	0,6808	0,3152
5	EM	625	617	612
	IF	0,6472	1,0949	0,4904
6	EM	611	620	626
	IF	0,7150	1,2268	0,5487
7	EM	617	622	619
	IF	1,3385	2,3400	1,0028
8	EM	616	620	619
	IF	1,7370	3,0566	1,3296
9	EM	617	620	617
	IF	2,0770	3,6120	1,5542
10	EM	617	624	618
	IF	2,1533	3,8717	1,6574
11	EM	624	622	619
	IF	2,3428	4,1513	1,7715
12	EM	619	631	619
	IF	1,4077	2,4816	1,0745
13	EM	621	625	623
	IF	1,2945	2,3208	0,9979

Tab. 20: Hodnoty IF při nastavení analyzátoru do polohy 90° odečtené při vlnových délkách, které odpovídaly EM při nastavení stejného analyzátoru do polohy 0° a dopočítané hodnoty $I_{54,7}$

Vzorek	Emisní maximum, intenzita fluorescence	0°		
		0°	90°	$I_{54,7} = I_0 + 2 I_{90}$
1	EM	-	-	-
	IF	-	-	-
2	EM	626	626	
	IF	$I_0 = 0,3002$	$I_{90} = 0,1211$	0,5426
3	EM	620	620	
	IF	$I_0 = 0,5578$	$I_{90} = 0,2340$	1,0260
4	EM	617	617	
	IF	$I_0 = 0,6808$	$I_{90} = 0,3079$	1,2966
5	EM	617	617	
	IF	$I_0 = 1,0949$	$I_{90} = 0,4669$	2,0288
6	EM	620	620	
	IF	$I_0 = 1,2268$	$I_{90} = 0,5374$	2,3016
7	EM	622	622	
	IF	$I_0 = 2,3400$	$I_{90} = 0,9558$	4,2517
8	EM	620	620	
	IF	$I_0 = 3,0566$	$I_{90} = 1,2838$	5,6243
9	EM	620	620	
	IF	$I_0 = 3,6120$	$I_{90} = 1,5261$	6,6644
10	EM	624	624	
	IF	$I_0 = 3,8717$	$I_{90} = 1,6186$	7,1090
11	EM	622	622	
	IF	$I_0 = 4,1513$	$I_{90} = 1,7700$	7,6913
12	EM	631	631	
	IF	$I_0 = 2,4816$	$I_{90} = 1,0073$	4,4964
13	EM	625	625	
	IF	$I_0 = 2,3208$	$I_{90} = 0,9979$	4,3167

Obr. 13: Závislost hodnot $I_{54,7}$ na koncentracích barviva (viz hodnoty tab. 20).



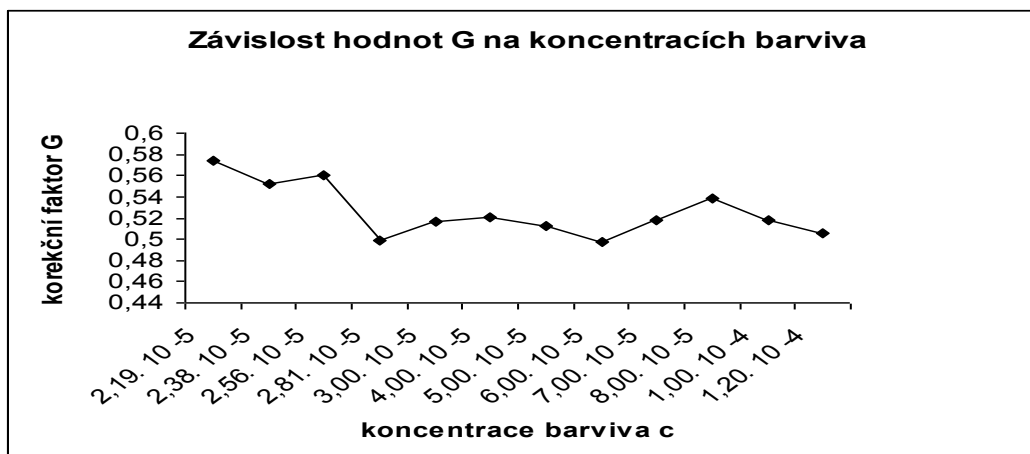
Tab. 21: Hodnoty EM a IF odečtené z emisních spekter při nastavení polarizátoru do polohy 90° a analyzátoru do poloh 0° a 90°

Vzorek	Emisní maximum, intenzita fluorescence	90°	
		0°	90°
1	EM	-	-
	IF	-	-
2	EM	627	623
	IF	0,1620	0,1058
3	EM	622	617
	IF	0,2905	0,1663
4	EM	625	610
	IF	0,3622	0,2175
5	EM	627	614
	IF	0,5645	0,3186
6	EM	617	609
	IF	0,6381	0,3567
7	EM	620	610
	IF	1,1856	0,6289
8	EM	620	622
	IF	1,5484	0,8239
9	EM	623	617
	IF	1,8515	0,9643
10	EM	621	612
	IF	1,9451	1,0348
11	EM	621	621
	IF	2,0889	1,1251
12	EM	625	624
	IF	1,2622	0,6744
13	EM	625	621
	IF	1,1877	0,6314

Tab. 22: Hodnoty IF emisních spekter při nastavení analyzátoru do polohy 90° odečtené při vlnových délkách, které odpovídaly EM při nastavení téhož analyzátoru do polohy 0° a dopočítané hodnoty korekčního faktoru G

Vzorek	Emisní maximum, intenzita fluorescence	90°		
		0°	90°	$G = I_{90}^H / I_0^H$
1	EM	-	-	-
	IF	-	-	-
2	EM	627	627	
	IF	$I_0^H = 0,1620$	$I_{90}^H = 0,0930$	0,5743
3	EM	622	622	
	IF	$I_0^H = 0,2905$	$I_{90}^H = 0,1605$	0,5525
4	EM	625	625	
	IF	$I_0^H = 0,3622$	$I_{90}^H = 0,2029$	0,5602
5	EM	627	627	
	IF	$I_0^H = 0,5645$	$I_{90}^H = 0,2813$	0,4983
6	EM	617	617	
	IF	$I_0^H = 0,6381$	$I_{90}^H = 0,3295$	0,5164
7	EM	620	620	
	IF	$I_0^H = 1,1856$	$I_{90}^H = 0,6170$	0,5204
8	EM	620	620	
	IF	$I_0^H = 1,5484$	$I_{90}^H = 0,7943$	0,5130
9	EM	623	623	
	IF	$I_0^H = 1,8515$	$I_{90}^H = 0,9201$	0,4969
10	EM	621	621	
	IF	$I_0^H = 1,9451$	$I_{90}^H = 1,0073$	0,5178
11	EM	621	621	
	IF	$I_0^H = 2,0889$	$I_{90}^H = 1,1251$	0,5386
12	EM	625	625	
	IF	$I_0^H = 1,2622$	$I_{90}^H = 0,6546$	0,5186
13	EM	625	625	
	IF	$I_0^H = 1,1877$	$I_{90}^H = 0,6002$	0,5053

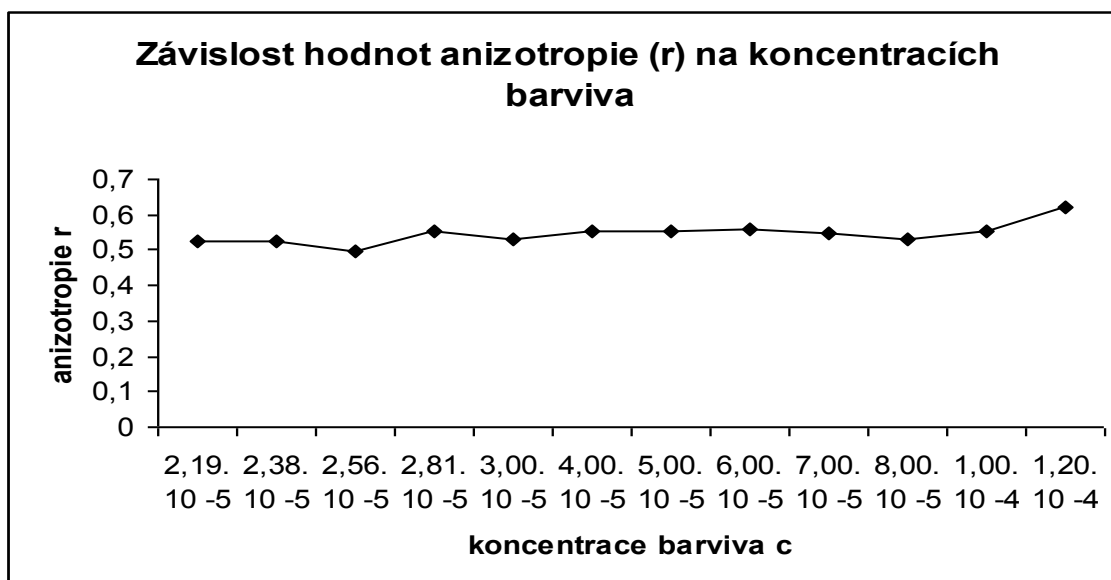
Obr.14: Závislost G na koncentracích barviva (viz hodnoty tab. 22)



Tab. 23: Hodnoty anizotropie r dopočítané z hodnot G (viz tab.22) a intenzit fluorescence znázorněných v tab. 20

Vzorek	Emisní maximum, intenzita fluorescence	0		
		0°	90°	$r = (I_0 - G I_{90}) / (I_0 + 2 G I_{90})$
1	EM	-	-	-
	IF	-	-	-
2	EM	626	626	
	IF	$I_0 = 0,3002$	$I_{90} = 0,1211$	0,5250
3	EM	620	620	
	IF	$I_0 = 0,5578$	$I_{90} = 0,2340$	0,5248
4	EM	617	617	
	IF	$I_0 = 0,6808$	$I_{90} = 0,3079$	0,4955
5	EM	617	617	
	IF	$I_0 = 1,0949$	$I_{90} = 0,4669$	0,5526
6	EM	620	620	
	IF	$I_0 = 1,2268$	$I_{90} = 0,5374$	0,5326
7	EM	622	622	
	IF	$I_0 = 2,3400$	$I_{90} = 0,9558$	0,5525
8	EM	620	620	
	IF	$I_0 = 3,0566$	$I_{90} = 1,2838$	0,5525
9	EM	620	620	
	IF	$I_0 = 3,6120$	$I_{90} = 1,5261$	0,5563
10	EM	624	624	
	IF	$I_0 = 3,8717$	$I_{90} = 1,6186$	0,5467
11	EM	622	622	
	IF	$I_0 = 4,1513$	$I_{90} = 1,7700$	0,5278
12	EM	631	631	
	IF	$I_0 = 2,4816$	$I_{90} = 1,0074$	0,5555
13	EM	625	625	
	IF	$I_0 = 2,3208$	$I_{90} = 0,9979$	0,6215

Obr. 15: Závislost hodnot anizotropie r na koncentracích barviva (viz tab.23)



4.4 Měření slepých vzorků při spektrálních pološířkách 2 nm a 4 nm

Postupem popsáním v kapitole 4.2 jsem proměřila slepé vzorky.

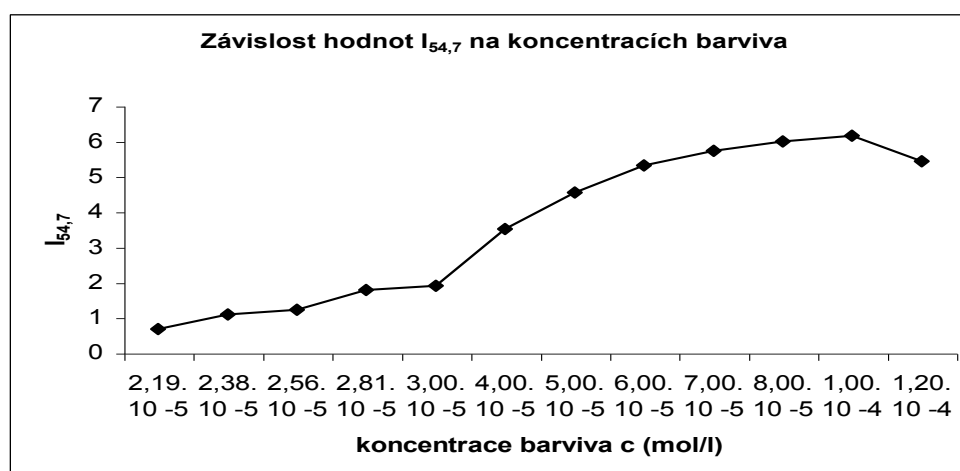
Tab.24: Hodnoty EM a IM odečtené z emisních spekter při nastavení polarizátoru do polohy open a při otočení analyzátoru o úhel 54,7°, dále při nastavení do poloh 0° a 90°

Vzorek	Emisní maximum, intenzita fluorescence	Open		
		54,7°	0°	90°
1	EM	-	-	-
	IF	-	-	-
2	EM	620	610	618
	IF	0,2389	0,3164	0,2148
3	EM	611	628	621
	IF	0,3503	0,5200	0,3115
4	EM	605	618	601
	IF	0,3948	0,5969	0,3274
5	EM	614	622	607
	IF	0,5725	0,8706	0,4599
6	EM	613	620	616
	IF	0,5987	0,9454	0,5050
7	EM	617	627	622
	IF	1,0836	1,8338	0,8404
8	EM	620	620	621
	IF	1,4288	2,3974	1,0955
9	EM	621	621	616
	IF	1,6543	2,7871	1,2832
10	EM	617	624	620
	IF	1,7749	3,0270	1,3998
11	EM	618	622	619
	IF	1,8884	3,1680	1,4663
12	EM	623	621	625
	IF	1,8536	3,2019	1,2785
13	EM	617	626	619
	IF	1,7437	2,9101	1,3913

Tab. 25: Hodnoty IF při nastavení analyzátoru do polohy 90° odečtené při vlnových délkách, které odpovídaly EM při nastavení téhož analyzátoru do polohy 0° a dopočítané hodnoty $I_{54,7}$

Vzorek	Emisní maximum, intenzita fluorescence	Open		
		0°	90°	$I_{54,7} = I_0 + 2 I_{90}$
1	EM	-	-	-
	IF	-	-	-
2	EM	610	610	
	IF	$I_0 = 0,3164$	$I_{90} = 0,1824$	0,6814
3	EM	628	628	
	IF	$I_0 = 0,5200$	$I_{90} = 0,2868$	1,0937
4	EM	618	618	
	IF	$I_0 = 0,5969$	$I_{90} = 0,3176$	1,2323
5	EM	622	622	
	IF	$I_0 = 0,8706$	$I_{90} = 0,4556$	1,7819
6	EM	620	620	
	IF	$I_0 = 0,9454$	$I_{90} = 0,4782$	1,9018
7	EM	627	627	
	IF	$I_0 = 1,8338$	$I_{90} = 0,8386$	3,5110
8	EM	620	620	
	IF	$I_0 = 2,3974$	$I_{90} = 1,0772$	4,5520
9	EM	621	621	
	IF	$I_0 = 2,7871$	$I_{90} = 1,2667$	5,3207
10	EM	624	624	
	IF	$I_0 = 3,0270$	$I_{90} = 1,3525$	5,7321
11	EM	622	622	
	IF	$I_0 = 3,1680$	$I_{90} = 1,4147$	5,9976
12	EM	621	621	
	IF	$I_0 = 3,2019$	$I_{90} = 1,4770$	6,1560
13	EM	626	626	
	IF	$I_0 = 2,9101$	$I_{90} = 1,2597$	5,4297

Obr. 16: Závislost hodnot $I_{54,7}$ na koncentracích barviva (hodnoty viz tab.25)



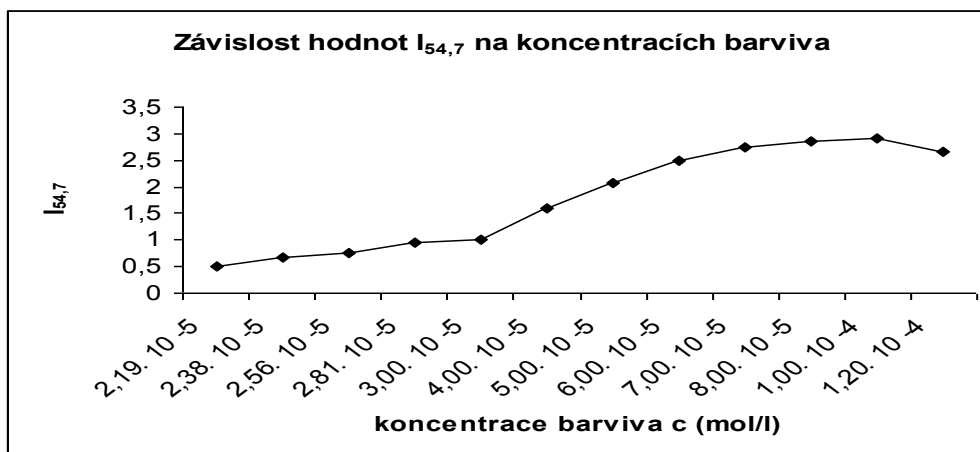
Tab. 26: Hodnoty IF a EM odečtené z emisních spekter při nastavení polarizátoru do polohy 0° a analyzátor je otočený o úhel 54,7° , dále při nastavení do polohy 0° a 90°

Vzorek	Emisní maximum, intenzita fluorescence	0°		
		54,7°	0°	90°
1	EM	-	-	-
	IF	-	-	-
2	EM	639	608	619
	IF	0,1770	0,2270	0,1739
3	EM	618	622	597
	IF	0,2365	0,3198	0,2014
4	EM	621	619	608
	IF	0,2502	0,3417	0,2209
5	EM	620	637	622
	IF	0,3250	0,4568	0,2941
6	EM	622	618	606
	IF	0,3320	0,4968	0,2877
7	EM	621	632	620
	IF	0,5133	0,8828	0,3933
8	EM	627	625	623
	IF	0,6555	1,1587	0,5123
9	EM	616	620	618
	IF	0,7797	1,3320	0,6042
10	EM	621	621	622
	IF	0,8633	1,4657	0,6741
11	EM	620	626	620
	IF	0,8898	1,5304	0,6906
12	EM	621	625	623
	IF	0,9109	1,5631	0,7040
13	EM	631	625	618
	IF	0,8471	1,4398	0,6735

Tab. 27: Hodnoty IF při nastavení analyzátoru do polohy 90° odečtené při vlnových délkách, které odpovídaly EM při nastavení téhož analyzátoru do polohy 0° a dopočítané hodnoty $I_{54,7}$

Vzorek	Emisní maximum, intenzita fluorescence	0°		
		0°	90°	$I_{54,7} = I_0 + 2 I_{90}$
1	EM	-	-	-
	IF	-	-	-
2	EM	608	608	
	IF	$I_0 = 0,2270$	$I_{90} = 0,1385$	0,5041
3	EM	622	622	
	IF	$I_0 = 0,3198$	$I_{90} = 0,1818$	0,6835
4	EM	619	619	
	IF	$I_0 = 0,3417$	$I_{90} = 0,2059$	0,7537
5	EM	637	637	
	IF	$I_0 = 0,4568$	$I_{90} = 0,2511$	0,9591
6	EM	618	618	
	IF	$I_0 = 0,4968$	$I_{90} = 0,2581$	1,0131
7	EM	632	632	
	IF	$I_0 = 0,8828$	$I_{90} = 0,3515$	1,5860
8	EM	625	625	
	IF	$I_0 = 1,1587$	$I_{90} = 0,4516$	2,0620
9	EM	620	620	
	IF	$I_0 = 1,3320$	$I_{90} = 0,5731$	2,4783
10	EM	621	621	
	IF	$I_0 = 1,4657$	$I_{90} = 0,6356$	2,7371
11	EM	626	626	
	IF	$I_0 = 1,5304$	$I_{90} = 0,6652$	2,8610
12	EM	625	625	
	IF	$I_0 = 1,5631$	$I_{90} = 0,6695$	2,9022
13	EM	625	625	
	IF	$I_0 = 1,4398$	$I_{90} = 0,6140$	2,6678

Obr. 17: Závislost hodnot $I_{54,7}$ na koncentracích barviva (hodnoty viz tab.27)



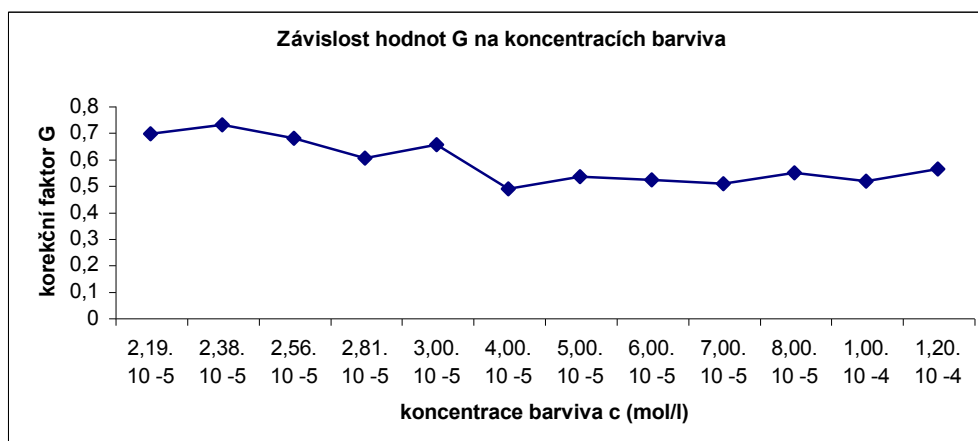
Tab.28: Hodnoty EM a IF při nastavení polarizátoru do polohy 90° a analyzátoru do poloh 0° a 90°

Vzorek	Emisní maximum, intenzita fluorescence	90°	
		0°	90°
1	EM	-	-
	IF	-	-
2	EM	612	629
	IF	0,1834	0,1538
3	EM	612	625
	IF	0,2221	0,1800
4	EM	62	613
	IF	0,2349	0,1953
5	EM	624	610
	IF	0,3009	0,2145
6	EM	621	618
	IF	0,3198	0,2343
7	EM	629	623
	IF	0,4531	0,2465
8	EM	620	618
	IF	0,5865	0,3305
9	EM	621	624
	IF	0,6872	0,3903
10	EM	623	619
	IF	0,7476	0,4235
11	EM	622	624
	IF	0,8139	0,4595
12	EM	619	617
	IF	0,8331	0,4870
13	EM	621	625
	IF	0,7644	0,4565

Tab. 29: Hodnoty IF při nastavení analyzátoru do polohy 90° odečtené při vlnových délkách, které odpovídaly EM při nastavení stejného analyzátoru do polohy 0° a dopočítané hodnoty G (1.2)

Vzorek	Emisní maximum, intenzita fluorescence	90°		
		0°	90°	$G = I_{90}^H / I_0^H$
1	EM	-	-	-
	IF	-	-	-
2	EM	612	612	
	IF	$I_0^H = 0,1834$	$I_{90}^H = 0,1272$	0,6938
3	EM	612	612	
	IF	$I_0^H = 0,2221$	$I_{90}^H = 0,1617$	0,7280
4	EM	622	622	
	IF	$I_0^H = 0,2349$	$I_{90}^H = 0,1589$	0,6766
5	EM	624	624	
	IF	$I_0^H = 0,3009$	$I_{90}^H = 0,1809$	0,6014
6	EM	621	621	
	IF	$I_0^H = 0,3198$	$I_{90}^H = 0,2084$	0,6517
7	EM	629	629	
	IF	$I_0^H = 0,4531$	$I_{90}^H = 0,2197$	0,4848
8	EM	620	620	
	IF	$I_0^H = 0,5865$	$I_{90}^H = 0,3125$	0,5327
9	EM	621	621	
	IF	$I_0^H = 0,6872$	$I_{90}^H = 0,3573$	0,5199
10	EM	623	623	
	IF	$I_0^H = 0,7476$	$I_{90}^H = 0,3775$	0,5048
11	EM	622	622	
	IF	$I_0^H = 0,8139$	$I_{90}^H = 0,4446$	0,5463
12	EM	619	619	
	IF	$I_0^H = 0,8331$	$I_{90}^H = 0,4290$	0,5150
13	EM	621	621	
	IF	$I_0^H = 0,7644$	$I_{90}^H = 0,4281$	0,5600

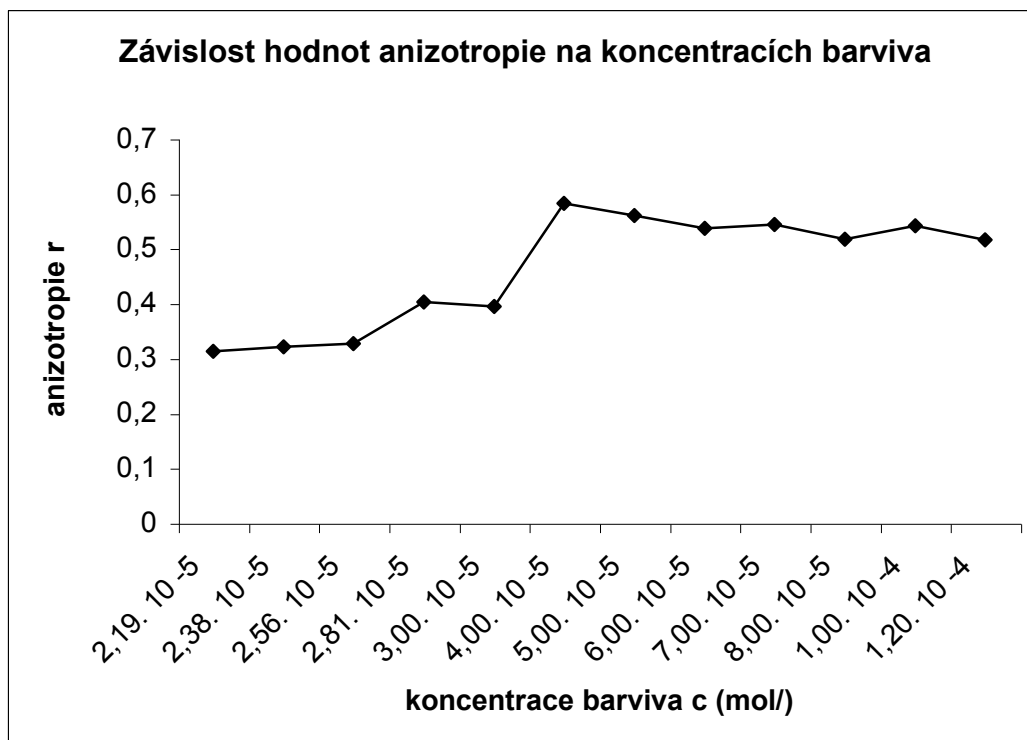
Obr. 18: Závislost hodnot G na koncentracích barviva (hodnoty viz tab.29)



Tab.30: Hodnoty anizotropie r vypočítané z hodnot G (tab. 29) a IF (viz tab. 27)

Vzorek	Emisní maximum, intenzita fluorescence	0°		
		0°	90°	$r = (I_0 - G I_{90}) / (I_0 + 2 G I_{90})$
1	EM	-	-	-
	IF	-	-	-
2	EM	608	608	
	IF	$I_0 = 0,2270$	$I_{90} = 0,1385$	0,3122
3	EM	622	622	
	IF	$I_0 = 0,3198$	$I_{90} = 0,1818$	0,3205
4	EM	619	619	
	IF	$I_0 = 0,3417$	$I_{90} = 0,2059$	0,3261
5	EM	637	637	
	IF	$I_0 = 0,4568$	$I_{90} = 0,2511$	0,4029
6	EM	618	618	
	IF	$I_0 = 0,4968$	$I_{90} = 0,2581$	0,3942
7	EM	632	632	
	IF	$I_0 = 0,8828$	$I_{90} = 0,3515$	0,5821
8	EM	625	625	
	IF	$I_0 = 1,1587$	$I_{90} = 0,4516$	0,5598
9	EM	620	620	
	IF	$I_0 = 1,3320$	$I_{90} = 0,5731$	0,5363
10	EM	621	621	
	IF	$I_0 = 1,4657$	$I_{90} = 0,6356$	0,5431
11	EM	626	626	
	IF	$I_0 = 1,5304$	$I_{90} = 0,6652$	0,5169
12	EM	625	625	
	IF	$I_0 = 1,5631$	$I_{90} = 0,6695$	0,5407
13	EM	625	625	
	IF	$I_0 = 1,4398$	$I_{90} = 0,6140$	0,5150

Obr.19: Závislost hodnot anizotropie (r) na koncentracích barviva (hodnoty viz tab.34)



5. DISKUZE

Tato rigorózní práce se zabývá měřením intenzit fluorescence v roztocích NČ a LSS s využitím polarizovaného světla. Měření intenzity fluorescence u anizotropních vzorků bez použití polarizačních filtrů může způsobit chybu až 20 %, což uvádí literatura [12]. U některých pokusů nebyl excitační paprsek polarizován, kdežto u emitovaného paprsku byly vždy použity polarizační filtry. Protože bylo nutné provádět z experimentálních důvodů měření provedené bez polarizace excitačního záření a měření, kdy byl excitační paprsek vertikálně polarizován, při různých citlivostech, nelze na základě porovnání výsledků případnou chybu měření intenzity fluorescence kvantifikovat. Je pouze možné konstatovat, že pokud použití nepolarizovaného excitačního paprsku nějakou chybu způsobuje, je tato chyba nezávislá na koncentraci měřených vzorků.

Porovnáním naměřených hodnot $I_{54,7}$ s hodnotami vypočítanými jsem zjistila, že se tyto hodnoty od sebe výrazně liší. Hodnoty $I_{54,7}$ jsem vypočítala u vzorků i slepých vzorků z hodnot IF, které jsem odečetla z emisních spekter získaných při měření vzorků, kdy byl analyzátor nastaven do polohy 90° a to při takových vlnových délkách, které odpovídaly EM odečteným z emisních spekter při nastavení téhož analyzátoru do polohy 0° . Z tabulek příslušných výsledků vyplývá, že vypočítaná hodnota je vždy přibližně trojnásobkem hodnoty naměřené. Tato nesrovnalost je způsobena různým nastavením citlivosti při měření intenzity vertikálně polarizovaného emisního záření, intenzity horizontálně polarizovaného emisního záření a intenzity emisního záření polarizovaného v magickém úhlu. Provést všechna měření se stejnou citlivostí při všech třech orientacích analyzátoru se mi nepodařilo.

Měření anizotropie vzorků bylo měřeno jednak při nastavení spektrálních pološířek polarizátoru i analyzátoru na 4 nm, jednak při spektrální pološířce polarizátoru 2 nm a spektrální pološířce analyzátoru 4 nm. Z průběhu grafu závislosti anizotropie na koncentracích barviva u vzorků (obr.7) při spektrálních pološířkách 4nm je patrné, že u prvních čtyř vzorků se zvyšujícími se koncentracemi barviva ve vzorcích zvyšují i hodnoty vypočítaných anizotropií s maximem u vzorku č.4. U dalších vzorků potom dochází se zvyšující se koncentrací barviva ve vzorcích nejprve k mírnému poklesu hodnot anizotropií, u posledních dvou vzorků je pokles anizotropie markantní. U slepých vzorků při stejném nastavení spektrálních pološířek není z grafu závislosti anizotropie na koncentracích barviva (obr.15) patrná žádná závislost. Se zvyšujícími se hodnotami koncentrací ve vzorcích dochází ke kolísání hodnot anizotropie. Podobný průběh můžeme pozorovat z grafu závislosti anizotropie na koncentracích barviva u vzorků (obr.11) při spektrálních pološířkách 2nm a 4nm. U slepých vzorků potom dochází se zvyšující se koncentrací barviva (při stejném

nastavení pološířek) k vzrůstu hodnot anizotropie s maximem u vzorku 7 a u dalších vzorků dochází se zvyšujícími se hodnotami koncentrací k mírnému kolísání hodnot anizotropie (obr.19). Při nastavení spektrálních pološířek na 2 nm a 4 nm se hodnoty anizotropií vzorků a slepých vzorků významně liší. Hodnoty anizotropií v případě vzorků jsou dost vysoké. To by bylo možné vysvětlit tím, že naměřené hodnoty anizotropie jsou součtem příspěvku samotného barviva a agregátu barviva s tenzidem, neboť anizotropie je aditivní veličina. Razantní vzestup hodnoty anizotropie pak svědčí o agregaci. Z průběhu koncentrační závislosti anizotropie ovšem nelze usuzovat na míru uspořádanosti vznikajícího agregátu.

Z průběhu závislosti korekčního faktoru G na koncentraci barviva (obr. 6, 10, 14, 18) je vidět, že hodnota G není konstantní, což by mohlo svědčit o relativně krátké době života excitovaného stavu barviva i agregátu barviva s tenzidem. Tento závěr nebylo možno s dostupným experimentálním zařízením ověřit. Jiným vysvětlením je změna viskozity roztoku provázející agregaci, ale tato možnost je málo pravděpodobná. Při měření nebyly žádné zásadní změny viskozity měřených vzorků vizuálně pozorovány a významnou změnu viskozity patrně ani nelze při použitých nízkých koncentracích barviva i tenzidu ve studovaných vzorcích očekávat.

Závěr: Tato rigorózní práce navazuje na mou diplomovou práci [11], v níž byly rovněž studovány interakce NČ a LSS pomocí extrakční spektrofotometrie, UV-VIS absorpční spektrofotometrie, fluorimetrie. V závěru mé diplomové práce [11] se konstatuje, že její výsledky nasvědčují tvorbě vysoce uspořádaných agregátů NČ s LSS, a to agregátů typu H. Tato rigorózní práce potvrzuje uvedený závěr v tom smyslu, že její výsledky rovněž hovoří ve prospěch tvorby agregátů v roztocích NČ a LSS. Nelze ovšem žádným způsobem interpretovat tyto výsledky jako potvrzení vysoké uspořádanosti částic ve vznikajících agregátech. Struktura těchto agregátů zůstává i nadále otázkou a k jejímu objasnění by bylo potřeba použít náročné rentgenografické metody.

6. LITERATURA

- [1] Chalabala M. et al.: Technologie léků, nakladatelství Galén, Praha 2001.
- [2] Maiti C. Nakul, Mazumdar S., Periasamy N.: J- and H-Aggregates of Porphyrin-Surfactant Complexes: Time-Resolved Fluorescence and Other Spectroscopic Studies, *Journal of Physical Chemistry B* 102 (1998), 1528-1538.
- [3] 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
- [4] 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.
- [5] 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 quaternary ammonium surfactants, *Talanta* 45 (1997), 167-180.
- [6] Albrizzio J., Archila J., Rodulfo T., Cordes E.H.: Secondary Valence Force Catalysis. XIII. Kinetics of the Alkaline Fading of Crystal Violet in the Presence of Cationic Surfactants, *Journal of Organic Chemistry* 37 (1972), 871-874.
- [7] Kubíček V., Němcová K.: Study of the Interaction Phenomena of Cetyl-trimethyl-ammonium 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.
- [8] <http://psych.lf1.cuni.cz/fluorescence/soubory/principy.htm>
- [9] <http://www.mzcr.cz/data/c764/lib/jvaah.htm>
- [10] Čihák J., Dvořák J., Suk V.: Příručka měření pH, SNTL, Praha 1975.
- [11] Otrádovská Z.: Interakce tenzidů a barviv v roztocích I. (diplomová práce), FaF UK v Hradci králové, 2007.
- [12] Resch-Genger U., Pfeifer D., Monte C., Pilz W., Hoffmann A., Spieles M., Rurack K., Hollandt J., Taubert D., Schönenberger B. and Nording P.: Traceability in Fluorometry: Part II. Spectral Fluorescence Standards, *J. Fluorescence* 15 (2005), 315-336.