

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

**Katedra biofyziky a fyzikální chemie**

**Studium interakcí fenolové červeně s kationickými  
tenzidy pomocí spektrálních metod I**

**(rigorózní práce)**

Hradec Králové 2011

Petra Belatková

**Čestné prohlášení**

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

1.9.2011

.....

**Poděkování**

Děkuji Ing. V. Kubíčkoví, CSc. za odborné vedení, cenné rady a připomínky při zpracování mé rigorózní práce.

# ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra Biofyziky a fyzikální chemie

Kandidát Mgr. Petra Belatková

Konzultant Ing. Vladimír Kubíček, CSc.

Název rigorózní práce Studium interakcí fenolové červeně s kationickými tensidy pomocí spektrálních metod I

Tato rigorózní práce se zabývá studiem interakcí mezi organickým barvivem fenolovou červení a tensidy cetrimidem, benzethonium chloridem, cetylpyridinium chloridem a carbethopendecinium chloridem s využitím fluorimetrie s polarizovaným světlem a u posledních dvou jmenovaných tensidů i extrakční spektrofotometrie, UV-VIS spektrofotometrie a spektrofluorimetrie. Získané výsledky ukazují na tvorbu premicelárních agregátů, které obsahují barvivo i tensid, v důsledku významných interakcí zmíněných látek v roztocích.

# ABSTRACT

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biophysics and Physical Chemistry

Candidate Mgr. Petra Belatková

Consultant Ing. Vladimír Kubíček, CSc.

Title of Thesis Study of interactions between phenol red and cationic tensides with using spectral methods I

This diploma thesis deals with study of interactions between organic dye phenol red and tensides cetyltrimethylamoniumbromide, benzethoniumchloride, cetylpyridiniumchloride and carbethopendeciniumbromide with using fluorimetry with polarized light. In addition, in the case of the last two surfactants the interactions were studied by using extraction photometry, UV–VIS spectrofotometry and classic spectrofluorimetry. The obtained results show that premicellar aggregates, containing both the dye and the tenside species, are formed in the studied solutions due to the significant mutual interaction of both species.

## OBSAH

1. ÚVOD A ZADÁNÍ PRÁCE.....	9
2. TEORETICKÁ ČÁST .....	11
2.1. ROZTOKY (1).....	12
2.1.1. Typy roztoků.....	12
2.1.1.1. Roztoky plynných látek v kapalinách.....	12
2.1.1.2. Roztoky kapalných látek v kapalinách .....	12
2.1.1.3. Roztoky tuhých látek v kapalinách.....	13
2.1.2. Vyjadřování rozpustnosti.....	13
2.1.3. Klasifikace rozpouštědel.....	13
2.1.3.1. Klasifikace podle schopnosti přijímat nebo uvolňovat protony .....	13
2.1.3.2. Klasifikace podle polaritý.....	14
2.1.3.3. Klasifikace podle afinity k vodě .....	14
2.2. TENZIDY – POVRCHOVĚ AKTIVNÍ LÁTKY (2).....	15
2.2.1. Vlastnosti tenzidů .....	16
2.2.2. Rozdělení tenzidů .....	16
2.2.3. Hydrofilně-lipofilní rovnováha tenzidů.....	17
2.3. METODY MĚŘENÍ.....	17
2.3.1. Extrakční spektrofotometrie .....	17
2.3.2. UV–VIS spektrofotometrie.....	18
2.3.3. Spektrofluorimetrie.....	20
2.3.3.1. Základní charakteristiky fluorescence .....	22
2.3.3.2. Fluorescence s polarizovaným světlem .....	23
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	25
3.1. POUŽITÉ CHEMIKÁLIE.....	26
3.2. POUŽITÉ PŘÍSTROJE .....	28
3.3. SEZNAM POUŽITÝCH ROZTOKŮ .....	28
3.4. PRACOVNÍ POSTUP .....	29
3.4.1. Cetylpyridinium chlorid.....	29
3.4.1.1. Sledování vlivu pH pufru a doby třepání na absorpenci v extrakční spektrofotometrii.....	29
3.4.1.2. Extrakční spektrofotometrie s použitím pufru o pH = 6.....	29
3.4.1.3. UV-VIS spektrofotometrie a fluorimetrie s použitím pufru o pH = 6.....	30
3.4.1.4. UV-VIS spektrofotometrie a fluorimetrie u řady se stoupající koncentrací tenzidu a pufrů pH = 6 .....	31
3.4.1.5. Fluorimetrie s polarizovaným světlem s použitím pufru o pH = 6.....	32
3.4.1.6. Extrakční spektrofotometrie s použitím pufru o pH = 11 .....	32
3.4.1.7. UV-VIS spektrofotometrie a fluorimetrie s použitím pufru o pH = 11.....	32

3.4.1.8. UV-VIS spektrofotometrie a fluorimetrie u řady se stoupající koncentrací tenzidu a pufrům pH = 11 .....	33
3.4.1.9. Fluorimetrie s polarizovaným světlem s použitím pufru o pH = 11 .....	33
3.4.2. Carbethopendecinium bromid.....	33
3.4.2.1. Sledování vlivu pH pufru a doby třepání na absorbanci v extrakční spektrofotometrii.....	33
3.4.2.2. Extrakční spektrofotometrie s použitím pufru o pH = 6.....	34
3.4.2.3. UV-VIS spektrofotometrie a fluorimetrie s použitím pufru o pH = 6.....	34
3.4.2.4. UV-VIS spektrofotometrie a fluorimetrie u řady se stoupající koncentrací tenzidu a pufrům pH = 6 .....	34
3.4.2.5. Fluorimetrie s polarizovaným světlem s použitím pufru o pH = 6.....	35
3.4.3. Cetrimid .....	35
3.4.3.1. Fluorimetrie s polarizovaným světlem s použitím pufru o pH = 8.....	35
3.4.4. Benzethonium chlorid.....	35
3.4.4.1. Fluorimetrie s polarizovaným světlem s použitím pufru o pH = 7.....	36
4. VÝSLEDKY .....	37
4.1. VÝSLEDKY STUDIA INTERAKCÍ FENOLOVÉ ČERVENĚ S CETYLPYRIDINIUM CHLORIDEM.....	38
4.1.1. Extrakční spektrofotometrie s použitím pufru o pH = 6.....	38
4.1.2. UV-VIS spektrofotometrie s použitím pufru o pH = 6.....	41
4.1.3. Fluorimetrie s použitím pufru o pH = 6.....	42
4.1.4. UV-VIS spektrofotometrie u řady se stoupající koncentrací tenzidu a pufrům pH = 6 .....	43
4.1.5. Fluorimetrie u řady se stoupající koncentrací tenzidu a pufrům pH = 6.....	45
4.1.6. Fluorimetrie s polarizovaným světlem s použitím pufru o pH = 6.....	46
4.1.7. Extrakční spektrofotometrie s použitím pufru o pH = 11 .....	48
4.1.8. UV-VIS spektrofotometrie s použitím pufru o pH = 11 .....	49
4.1.9. Fluorimetrie s použitím pufru o pH = 11 .....	49
4.1.10. UV-VIS spektrofotometrie u řady se stoupající koncentrací tenzidu a pufrům pH = 11 .....	50
4.1.11. Fluorimetrie u řady se stoupající koncentrací tenzidu a pufrům pH = 11.....	51
4.1.12. Fluorimetrie s polarizovaným světlem s použitím pufru o pH = 11.....	52
4.2. VÝSLEDKY STUDIA INTERAKCÍ FENOLOVÉ ČERVENĚ S CARBETHOPENDECINIUM BROMIDEM .....	54
4.2.1. Extrakční spektrofotometrie s použitím pufru o pH = 6.....	54
4.2.2. UV-VIS spektrofotometrie s použitím pufru o pH = 6.....	57
4.2.3. Fluorimetrie s použitím pufru o pH = 6.....	58
4.2.4. UV-VIS spektrofotometrie u řady se stoupající koncentrací tenzidu a pufrům pH = 6 .....	59

4.2.5. Fluorimetrie u řady se stoupající koncentrací tenzidu a pufrem pH = 6.....	60
4.2.6. Fluorimetrie s polarizovaným světlem s použitím pufru o pH = 6.....	61
4.3. VÝSLEDKY STUDIA INTERAKCÍ FENOLOVÉ ČERVENĚ S CETRIMIDEM	63
4.3.1. Fluorimetrie s polarizovaným světlem s použitím pufru o pH = 8.....	63
4.4. VÝSLEDKY STUDIA INTERAKCÍ FENOLOVÉ ČERVENĚ S BENZETHONIUM CHLORIDEM.....	65
4.4.1. Fluorimetrie s polarizovaným světlem s použitím pufru o pH = 7.....	65
5. DISKUZE .....	72
5.1. INTERAKCE FENOLOVÉ ČERVENĚ S CETYLPYRIDINIUM CHLORIDEM	73
5.2. INTERAKCE FENOLOVÉ ČERVENĚ S CARBETHOPENDECINIUM BROMIDEM .....	75
6. ZÁVĚR .....	78
7. LITERATURA .....	80



## **1. ÚVOD A ZADÁNÍ PRÁCE**

Gerontofarmacie je obor, který zkoumá stárnutí živých organismů. Podobně jako v řadě jiných oborů zabývá se gerontologický výzkum studiem makroskopických jevů (biomechanika) i jevů buněčné a molekulární úrovně. Na posledně zmiňovaných úrovních se studují změny koncentrací nitrobuněčných iontů, změny pH, polarity okolí, „fluidity“ membrán, membránového potenciálu, nebo přenosu energie mezi molekulami. Významným nástrojem na tomto poli je i fluorescenční spektroskopie.

Tato rigorózní práce navazuje na mou diplomovou práci (21), ve které jsem se zabývala studiem interakcí mezi organickým barvivem fenolovou červení a tenzidy cetridimem a benzethonium chloridem pomocí tří spektrálních metod: extrakční spektrofotometrie, UV-VIS spektrofotometrie a fluorimetrie.

V této rigorózní práci byly stanoveny následující cíle:

Provést studium interakcí fenolové červeně s tenzidy, ale tentokrát s cetylpyridinium chloridem a carbethopendecinium bromidem pomocí stejných metod jako v diplomové práci (21).

Použít metodu fluorimetrie s polarizovaným světlem k vyhodnocení anizotropie roztoků fenolové červeně se všemi čtyřmi tenzidy. Zjistit, zda takto nalezené hodnoty anizotropie souhlasí s výsledky jiných spektrálních metod při studiu interakcí fenolové červeně s tenzidy.

Studované roztoky slouží v této práci jako modelové systémy pro budoucí využití spektrálních metod, zejména fluorescenční spektroskopie při výzkumu systémů biologických.

## **2. TEORETICKÁ ČÁST**

## **2.1. ROZTOKY (1)**

Roztoky můžeme získat mísením kapaliny s jednou nebo několika dalšími látkami. Rozlišujeme pravé roztoky, koloidní roztoky a hrubé disperze. V této kapitole se budu zabývat pouze pravými roztoky.

Obsahuje-li roztok dvě složky, jedná se o tzv. dvousložkovou (binární) soustavu. Její složky se označují jako rozpouštědlo a rozpuštěná látka. Složka přítomná v binárním roztoku ve větším množství je většinou považována za rozpouštědlo, složka přítomná v menším množství za rozpuštěnou látku. Jde-li o disperzi kapalné a tuhé látky, je kapalina obvykle považována za rozpouštědlo a tuhá látka za rozpuštěnou látku.

### **2.1.1. Typy roztoků**

Podle skupenského stavu rozpuštěné látky a rozpouštědla rozlišujeme devět typů roztoků, z nichž jsou nejvýznamnější:

- roztoky plynných látek v kapalinách
- roztoky kapalných látek v kapalinách
- roztoky tuhých látek v kapalinách

#### **2.1.1.1. Roztoky plynných látek v kapalinách**

Rozpustnost plynu v kapalině je dána koncentrací plynu rozpuštěného v roztoku, který je v rovnováze s čistým plynem nad roztokem. Je funkcí teploty, tlaku, koncentrací dalších složek v roztoku, například přítomných solí nebo probíhajících chemických reakcí.

#### **2.1.1.2. Roztoky kapalných látek v kapalinách**

Neomezeně mísitelné kapaliny se mísí ve všech poměrech a jsou to směsi rozpouštědel stejné nebo podobné polarity (benzen – chloroform).

Omezeně mísitelné kapaliny vykazují vzájemnou mísitelnost pouze v určitém rozmezí teplot a koncentrací (n-butanol – voda). Kapaliny prakticky nemísitelné zůstávají vždy ve dvou oddělených fázích a jejich vzájemná rozpustnost je extrémně malá (voda – benzen).

### **2.1.1.3. Roztoky tuhých látek v kapalinách**

Tyto roztoky jsou nejrozšířenějším typem farmaceutických homogenních disperzí. V těchto soustavách se setkáváme s velkým rozsahem rozpustnosti, od téměř nerozpustných látek v daném rozpouštědle až po látky velmi rozpustné, žádná tuhá látka však není neomezeně rozpustná.

Obecně platí, že málo polární tuhé látky se dobře rozpouštějí v málo polárních rozpouštědlech a látky polární v rozpouštědlech polárních.

### **2.1.2. Vyjadřování rozpustnosti**

V chemických tabulkách se většinou uvádí rozpustnost jako procentuální obsah látky v jejím nasyceném roztoku v určitém rozpouštědle při dané teplotě.

V lékopise se udává rozpustnost léčiv jako množství rozpouštědla v gramech potřebné k rozpuštění 1g látky.

Termodynamicky je rozpustnost látky chápána jako koncentrace jejího nasyceného roztoku v daném rozpouštědle za daných podmínek, zejména za dané teploty.

### **2.1.3. Klasifikace rozpouštědel**

#### **2.1.3.1. Klasifikace podle schopnosti přijímat nebo uvolňovat protony**

Rozpouštědla, která mohou při interakci s rozpuštěnou látkou uvolňovat vodíkový ion mají tzv. protogenní charakter (kyselina mravenčí). Rozpouštědla, která mohou přijímat vodíkové ionty jsou protofilní (aceton). Amfiprotní rozpouštědla mohou být jak

akceptory, tak donory protonů (voda, etanol). Rozpouštědla aprotní nevstupují do uvedeného typu interakcí (chloroform).

### **2.1.3.2 Klasifikace podle polarity**

Při hledání vhodného rozpouštědla pro určitou sloučeninu vycházíme z její polarity. Polární látky jsou rozpustné v polárním rozpouštědle nebo v semipolárním rozpouštědle, málo polární látky pak v nepolárních kapalinách.

Polární rozpouštědla velmi dobře rozpouštějí iontové sloučeniny jako anorganické a organické soli a další polární látky. Jedním z rozpouštědel, která patří mezi polární sloučeniny je voda. Významnou vlastností polárních rozpouštědel je jejich schopnost tvořit vodíkové můstky s molekulami rozpuštěné látky, proto se ve vodě velmi dobře rozpouštějí alkoholy, aldehydy, ketony, aminy a jiné kyslíkaté a dusíkaté sloučeniny.

Semipolární rozpouštědla jsou schopna polarizovat nepolární sloučeniny a umožňují tak mísitelnost polárních a málo polárních kapalin. Například aceton zvyšuje rozpustnost etheru ve vodě.

Nepolární rozpouštědla jsou aprotní, netvoří vodíkové můstky s neelektrolyty. Iontové a polární látky jsou v nich nerozpustné nebo jen velmi málo rozpustné, mohou ale rozpouštět látky nepolární, jako mastné kyseliny, tuky, oleje apod.

Kvantitativně vyjadřuje míru polarity rozpouštědla hodnota její relativní permitivity. Čím je tato hodnota větší, tím je rozpouštědlo polárnější.

### **2.1.3.3. Klasifikace podle afinity k vodě**

Tato klasifikace dělí látky na hydrofilní a hydrofobní.

Hydrofilní rozpouštědla se vyznačují velkou afinitou k vodě a polárním látkám a jsou nemísitelná s tuky a oleji. Nejvýznamnějším hydrofilním rozpouštědlem je voda.

Hydrofobní rozpouštědla jsou nemísitelná s vodou a polárními rozpouštědly, mají ale afinitu k nepolárním látkám. Příkladem hydrofobních rozpouštědel jsou přírodní nebo syntetické oleje.

## 2.2. TENZIDY – POVRCHOVĚ AKTIVNÍ LÁTKY (2)

Tenzidy (povrchově aktivní látky) jsou látky, které mají vystupňovanou schopnost snižovat povrchové napětí kapalin, zejména vody a vodných roztoků, snižovat mezipovrchové napětí mezi polární a nepolární kapalinou a zvyšovat smáčení tuhých látek kapalinami. Tyto vlastnosti jsou determinovány chemickou a fyzikální strukturou jejich molekul, které mají asymetrický bipolární charakter s výrazným dipólovým momentem. Částice tenzidů obsahují vždy dvě části – lipofilní a hydrofilní. Látky s touto strukturou molekuly se nazývají amfipatické nebo také amfifilní.

Lipofilní je nepolární část nebo části molekuly tenzidu, odpuzující vodu a v její přítomnosti se snaží vytvořit takovou prostorovou konfiguraci s ostatními lipofilními složkami ve vodném systému, aby jejich vzájemná orientace umožnila tvorbu lipofilních kontaktů prostřednictvím nevazbových interakcí. Z této oblasti interakcí jsou molekuly vody vytlačovány. Lipofilní složku molekuly tvoří zpravidla uhlovodíkové zbytky alifatických řetězců alkanů a alkenů nebo zbytky aromatických sloučenin (alkylbenzeny, alkylfenoly, alkylnaftaleny). Další možností je polymerovaný propylenglykol nebo silikonové řetězce.

Naproti tomu hydrofilní jsou polární části molekuly tenzidu, které mají afinitu k vodě a ve vodném prostředí jsou v různé míře hydratovány. To znamená, že se kolem nich vytvoří solvatační obal z molekul vody vázaných díky vodíkovým můstkům mezi hydrofilní částí molekuly tenzidu a molekulami vody. Míra hydratace polární části molekuly tenzidu je přímo úměrná její polaritě. Jelikož nejběžnějším rozpouštědlem i složkou emulzí je voda, je nejčastěji charakterizováno chování tenzidu v jeho vodném roztoku. Hydrofilní části molekuly tenzidu mohou ve vodném roztoku disociovat, a tehdy je hydrofilní částí molekuly tenzidu kationt, resp. aniont, nebo se chovají jako amfolyt a jejich náboj je závislý na pH prostředí. Jako polární skupinu schopnou disociace nalézáme v tenzidech nejčastěji  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{O}-\text{SO}_3\text{H}$ ,  $-\text{SO}_3\text{H}$ ,  $-\text{NH}_2$  a kvarterní dusík. Pokud polární skupina disociaci nepodléhá, jedná se o neiontogenní tenzid. Příkladem takových skupin jsou např.  $-\text{O}-$ ,  $-\text{COO}-$ ,  $-\text{SO}_2\text{NH}-$ ,  $-\text{CONH}-$ ,  $-\text{OH}$ , dále řetězce polyetylglykolové, polyglycerolové, polyglukózové, glukóza, sacharóza, glycerol, glykol, kyselina citronová a další.

### 2.2.1. Vlastnosti tenzidů

Společnou vlastností tenzidů je schopnost hromadit se na rozhraní fází, kde vytvářejí palisádovitě uspořádaný monomolekulární film neboli monovrstvu. Už při nízké koncentraci mění energetické poměry na fázovém rozhraní a to se projevuje hlavně snížením povrchového napětí. Po dosažení určité koncentrace tzv. kritické micelární koncentrace (cmc) je polární vrstva tenzidem téměř nasycena a molekuly nebo ionty tenzidu spontánně agregují do větších útvarů označovaných jako micely. Ty se skládají z agregátů s velikostí typickou pro koloidní stav. Neasociované molekuly nebo ionty jsou adsorbovány na fázovém rozhraní. Micely se přímo neúčastní tvorby monomolekulární vrstvy na fázovém rozhraní, ale v důsledku dynamické rovnováhy mezi koncentrací micel a neasociovaných molekul tenzidu ovlivňují povrchové napětí na rozhraní fází. V závislosti na koncentraci tenzidu se vytvářejí různé typy micel. Při koncentracích tenzidu, které příliš nepřevyšují jeho cmc, jsou micely nejprve přibližně kulovité (sférické) a pozůstávají z několika desítek amfifilních molekul nebo iontů tenzidu. Při vyšších koncentracích tenzidu se kulovité micely spojují na ještě větší tyčinkovité až vláknité micely. Tyto soustavy jsou vratné, neboť jejich zředěním až na nižší koncentraci, než je příslušná cmc, vznikne opět pravý molekulární roztok. V oblasti cmc se prudce mění řada fyzikálních vlastností soustavy, jako vodivost, povrchové napětí, osmotický tlak, hustota a další, díky tomu, že v mikroměřítku se homogenní soustava změní na heterogenní.

### 2.2.2. Rozdělení tenzidů

Podle schopnosti tenzidů disociovat ve vodě se rozlišují tenzidy:

- ionogenní (iontové)
- neionogenní (neiontové)

Skupina ionogenních se dále člení na tenzidy:

- anionaktivní (aniontové)
- kationaktivní (kationtové)
- amfolytické (amfoterní)

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

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



Amfoterní tenzidy obsahují aniontové i kationtové funkční skupiny. Jejich náboj závisí ve vodném prostředí na koncentraci vodíkových iontů, 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 amfiony, takže se náboj vyrovnává. Vykazují při tom malou rozpustnost ve vodě, na stupnici pH se hovoří o isoelektrické oblasti.

Neiontové tenzidy ve vodě nedisociují.

### **2.2.3. Hydrofilně-lipofilní rovnováha tenzidů**

Hydrofilně-lipofilní rovnováha tenzidu se klasifikuje bezrozměrným číslem HLB (Hydrophilic-Lipophilic Balance). Je to poměr mezi intenzitou manifestace hydrofilních a lipofilních vlastností jednotlivých částí molekuly tenzidu. Při hodnotě HLB do 9 převládá charakter lipofilní, 9 až 11 jsou hodnoty střední, kdy má tenzid vcelku vyrovnané lipofilní a hydrofilní vlastnosti a HLB nad hodnotu 11 znamená, že vlastnosti tenzidu určují převážně hydrofilní složky.

Pro stanovení nebo výpočet HLB tenzidů existuje několik metod. Původně se číslo HLB stanovovalo měřením rozdělovacího koeficientu tenzidu mezi vodou a olejovou (lipoidní) fází. Měření rozdělovacího koeficientu je obtížné a neumožňuje objektivní porovnání neiontových a iontových tenzidů. V současnosti se nejvíce používají hodnoty HLB počítané dohodnutým (konvenčním) způsobem sumace tabulkových hydrofilních a lipofilních příspěvků jednotlivých chemických skupin molekuly (příspěvkovou metodou).

## **2.3. METODY MĚŘENÍ**

### **2.3.1. Extrakční spektrofotometrie**

Extrakčně-spektrofotometrická stanovení se využívají zejména v analýze léčiv, povrchově aktivních látek a při stanovení bílkovin. Stanovení organických kationtů (aniontů) jsou založena na tvorbě jejich asociátů s anionty (kationty) vhodně zvolených kyselých (bazických) barviv ve vodném prostředí. Z této vodné fáze se při optimálním pH

vytřepou do vhodné organické fáze nemísitelné s fází vodnou, např. do chloroformu, benzenu, dichlormethanu apod. Za vhodných podmínek přejde do organické fáze jen množství barevného protiiontu úměrné stanovované látce, proto lze fotometricky stanovit koncentraci této látky.

Při extrakčně-spektrofotometrických měřeních se vlastní extrakce dříve realizovala v dělicích nálevkách a zahrnovala obvykle jedno- až vícenásobné vytřepání, ustátí vrstev podporované velmi často centrifugací, aby došlo k řádné separaci vrstev, a přenesení organické fáze do měrných kyvet, často za použití filtrace, tedy řadu úkonů relativně časově náročných a pracných. Proto se Gasparič a spol. (4) snažili použít jednoduchého a rychlého postupu, který by umožňoval provádět velký počet stanovení současně za stejných podmínek. Místo v dělicích nálevkách prováděli celý pracovní postup jednorázově ve zkumavkách. Po protřepání na laboratorní třepačce ponechali deset minut ustát vrstvy ve svislé poloze a poté zkumavku s oběma vrstvami zasunuli do nástavce spektrofotometru Spekol. Při dodržování určitých parametrů (chemické složení, iontová síla a pH pufru, vhodnost použitého barviva, koncentrace jeho vodného roztoku, čistota chloroformu a teplota, dále vhodný výběr a mytí zkumavek, jejich uzavírání a parametry třepání) získali výsledky s dobrou reprodukovatelností, které vyhovovaly požadavkům jejich orientačních pokusů, při nichž studovali základní vztahy mezi strukturou a fyzikálně-chemickými vlastnostmi stanovovaných organických bází a vhodnost různých typů organických barviv. Navíc se ukázalo, že přesnost těchto výsledků předčí výsledky získané běžnou metodikou v dělicích nálevkách.

Ačkoli je tento popisovaný postup experimentálně mnohem jednodušší a méně pracný, přináší dobré výsledky všude tam, kde se extrakčně-fotometrických stanovení používá rutinně, například (5). Postup však selhává, je-li analytem ionogenní tenzid.

### 2.3.2. UV–VIS spektrofotometrie

UV-VIS spektrofotometrie patří mezi optické metody a je založena na absorpci elektromagnetického záření při průchodu hmotou (vzorkem v kyvetě). Část intenzity procházejícího světelného paprsku se absorbuje, část prochází kyvetou a měří se jeho intenzita. Podmínkou, aby sledovaná látka absorbovala v ultrafialové nebo viditelné oblasti záření, je přítomnost vazebných  $\pi$  - elektronů ve vazebných molekulových orbitalech a nepárových elektronů v nevazebných molekulových orbitalech. UV záření sice může absorbovat i alifatický uhlovdík, ale bude to při vlnových délkách pod 190 nm, v tzv. vakuové oblasti, která je pro běžná měření experimentálně nedostupná.

Prochází-li světelný paprsek prostředím, které je schopno absorbovat, je intenzita paprsku vstupujícího vyšší než intenzita paprsku prošlého tímto prostředím. Tento jev byl v roce 1729 poprvé formulován P. Bouguerem a později ještě jednou objeven Lambertem.

Lze jej vyjádřit rovnicí:

$$I = I_0 \cdot e^{-bd}$$

kde:

$I_0$  – intenzita vstupujícího paprsku

$I$  – intenzita paprsku po průchodu absorbujícím prostředím

$d$  – tloušťka vrstvy absorbujícího prostředí

$b$  – absorpční (Napierovský) koeficient

Převedením vztahu na dekadické logaritmy dostaneme:

$$\log I / I_0 = \log T = -a \cdot d$$

kde:

$T$  – transmitance (propustnost)

$a$  – absorpční koeficient (dekadický)

V roce 1852 ukázal Beer, že u mnoha roztoků vzniklých rozpuštěním látek, jež absorbují světlo, je koeficient  $a$  přímo úměrný koncentraci  $c$  rozpuštěné látky. Spojením Lambertova vztahu a Beerových poznatků je popsán základní vztah pro spektrofotometrické metody chemické analýzy, Lambert-Beerův zákon platný pro monochromatické světlo:

$$A = \epsilon \cdot c \cdot d = -\log T = \log I_0/I$$

kde:

$A$  – absorbance

$c$  – molární koncentrace rozpuštěné látky

$d$  – tloušťka absorbující vrstvy

$\epsilon$  – molární absorpční koeficient

Závislost transmitance nebo absorbance na vlnové délce záření nazýváme absorpční spektrum. Absorpční spektrum je tvořeno absorpčními pásy. Vlnové délky maxim a minim v absorpčním spektru, jeho tvar a velikosti absorpčních koeficientů jsou závislé na

strukturu látky. Souvislost struktury látky s tvarem absorpčního spektra se významně uplatňuje při identifikaci látek.

Vlivem chemických změn, např. zavedením další charakteristické skupiny do molekuly nebo změnou použitého rozpouštědla nastává posun absorpčního maxima:

Posun se změnou vlnové délky absorpčního maxima může být:

bathochromní posun – posun směrem k vyšší vlnové délce maxima

hypsochromní posun – posun při snižování vlnové délky maxima

Podle změny intenzity absorpčního maxima (tj. změny molárního absorpčního koeficientu) rozlišujeme:

hyperchromní posun – provázen zvýšením intenzity maxima absorpčního pásu

hypochromní posun – provázen poklesem absorbance

### 2.3.3. Spektrofluorimetrie

Některé látky mají schopnost za určitých podmínek vysílat (emitovat) luminiscenční záření. Fotoluminiscenční záření přitom vysílají molekuly excitované ultrafialovým nebo viditelným zářením při návratu do nižšího energetického stavu. Při fotoluminiscenci látka nejdříve absorbuje elektromagnetické záření (primární záření), molekuly se dostávají do excitovaného stavu, při přechodu do stabilnějších nižších energetických stavů uvolňují energii ve formě emise záření (sekundární záření). Emitované záření má menší energii počítanou na foton než primární (budící) záření a tedy delší vlnovou délku.

Fotoluminiscence se dělí na:

- fluorescenci
- fosforescenci
- zpožděnou fluorescenci

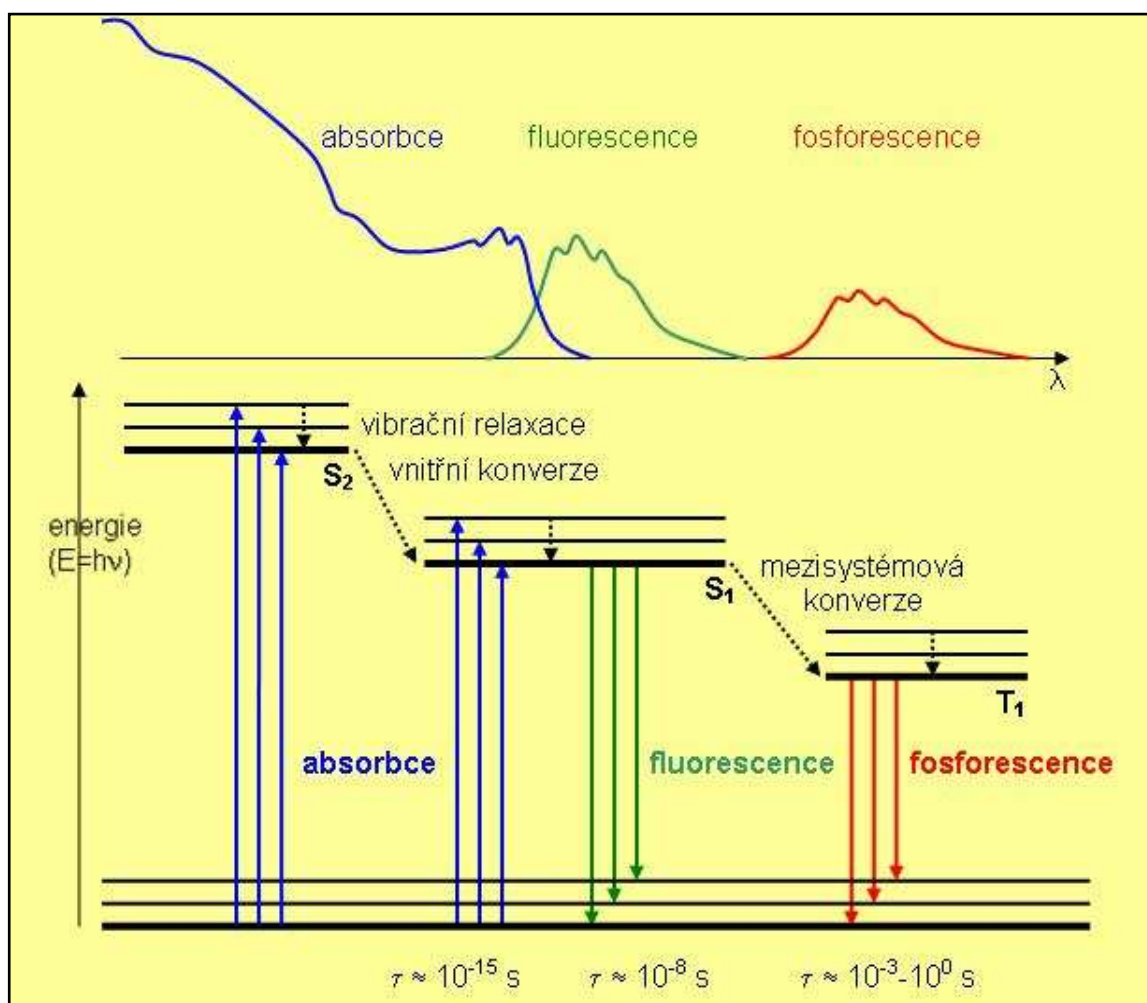
Nastane-li emise záření z excitovaného singletního elektronového stavu jedním či více spontánními energetickými přechody jedná se o fluorescenci. U fluorescenci dochází k emisi světla s dobou dosvitu  $10^{-6}$  až  $10^{-9}$  s.

Dochází-li k emisi záření z tripletního excitovaného elektronového stavu, jedná se o fosforescenci. Fosforescence je charakterizována obvyklou dobou dosvitu  $10^{-2}$  až  $10^{-3}$  s.

Zpožděná fluorescence je zářivý přechod z téhož singletního stavu (S1) jako při fluorescenci, ale s delší dobou dohasínání danou časem, po který je molekula v metastabilním tripletovém stavu.

Na Obr. 1.1 je zjednodušené schéma zářivých a nezářivých přechodů mezi elektronově vibračními stavy molekuly a tvar absorpčních a emisních spekter ( $\lambda$  - vlnová délka). Po absorpci světelného kvanta budícího záření (modré šipky) přechází elektrony ze singletního stavu  $S_0$  do excitovaných singletních stavů  $S_1$ ,  $S_2$ , atd. a tripletních stavů  $T_1$ ,  $T_2$ , atd. Molekula obvykle přejde z rovnovážné vibrační hladiny stavu  $S_0$  do některé z vibračních hladin excitovaných stavů. K deexcitaci molekuly dochází buď zářivými přechody (luminiscence; zelené a červené šipky) nebo nezářivými přechody (vnitřní konverze, mezisystémová konverze, vibrační relaxace; černé tečkované šipky). Doba trvání  $\tau$  jednotlivých procesů je pro absorpci řádově  $10^{-15}$  s, pro fluorescenci cca  $10^{-8}$  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. 1.1 Schéma zářivých a nezářivých přechodů mezi elektronově vibračními stavy složité molekuly (forma Jablonského diagramu).



### 2.3.3.1. Základní charakteristiky fluorescence

Hlavní charakteristiky fluorescence jsou:

- intenzita – počet fotonů procházejících v daném směru jednotkovou plochou za jednotku času
- spektrální složení – spektrální hustota fotonového toku na jednotkový interval vlnových délek nebo frekvencí
- polarizace – směr kmitání elektrického vektoru elektromagnetické vlny
- doba dohasínání – je dána vnitřní dobou života excitovaného stavu, z něhož dochází k emisi
- koherentní vlastnosti – vztahy mezi fázemi světelných vln

Fluorescenci charakterizují dvě spektra: emisní a excitační.

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

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

Efekt vnitřního filtru je chyba vznikající při měření intenzity fluorescence v důsledku skutečnosti, že vrstvy vzorku vzdálenější od roviny dopadu budícího záření na vzorek jsou excitovány nižší intenzitou světla, neboť část budícího záření je absorbována povrchovými vrstvami. Tato chyba se projevuje jen u silněji absorbujících roztoků, ale při přesném měření kvantových výtěžků je nutno ji vždy uvažovat a korigovat.

Z organických sloučenin fluoreskují aromatické sloučeniny s volnými  $\pi$  - elektrony, zejména takové, které mohou tvořit tautomerii, isomerii, mají konjugovaný systém, kondenzované heterocykly (antrachinon).

Výhodou fluorimetrie je vysoká selektivnost a citlivost. Selektivnost vyplývá ze skutečnosti, že pouze omezený počet látek vykazuje fluorescenci a že vedle vlnové délky emise je v určitém rozmezí volitelná i vlastní vlnová délka excitačního záření. Proces fluorescence je cyklický. Pokud není fluorofor nevratně zničen v excitovaném stavu (jev fotovybělování), potom tentýž fluorofor může být opakovaně excitován a emitovat fluorescenční záření. To je základ vysoké citlivosti fluorescenčních technik.

### 2.3.3.2. Fluorescence s polarizovaným světlem

Je-li roztok fluoroforů (tj. látek vykazujících fluorescenci) excitován lineárně polarizovaným zářením, potom budou excitovány pouze ty molekuly, které mají nenulový průmět svého absorpčního přechodového momentu do směru polarizace (fotoselekce). Je-li průměrná rotační relaxační doba mnohem delší než doba dohasínání fluorescence, potom také výsledná fluorescence bude polarizována. Bude-li naopak průměrná rotační relaxační doba mnohem kratší než doba dohasínání fluorescence, potom anizotropie systému klesne ještě před emisí na limitní hodnotu (v izotropním systému o malé viskozitě až na nulu). Pokud jsou doba dohasínání fluorescence a rychlost molekulární reorientace srovnatelné, potom bude polarizace fluorescence modulována molekulárním pohybem a analýza časové závislosti emisní anizotropie bude poskytovat informaci o anizotropii systému, v němž se fluorofor nachází. Měření polarizace fluorescence poskytuje informace o molekulární orientaci a pohyblivosti a procesech, které je moduluje, např. fluidita membrán, interakce ligand-receptor, proteolýza, interakce protein-DNA a aktivita proteinkináz.

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:

$$r = \frac{(I_0 - G \cdot I_{90})}{(I_0 + 2 \cdot G \cdot I_{90})}$$

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

$$G = \frac{I_{90}}{I_0}$$

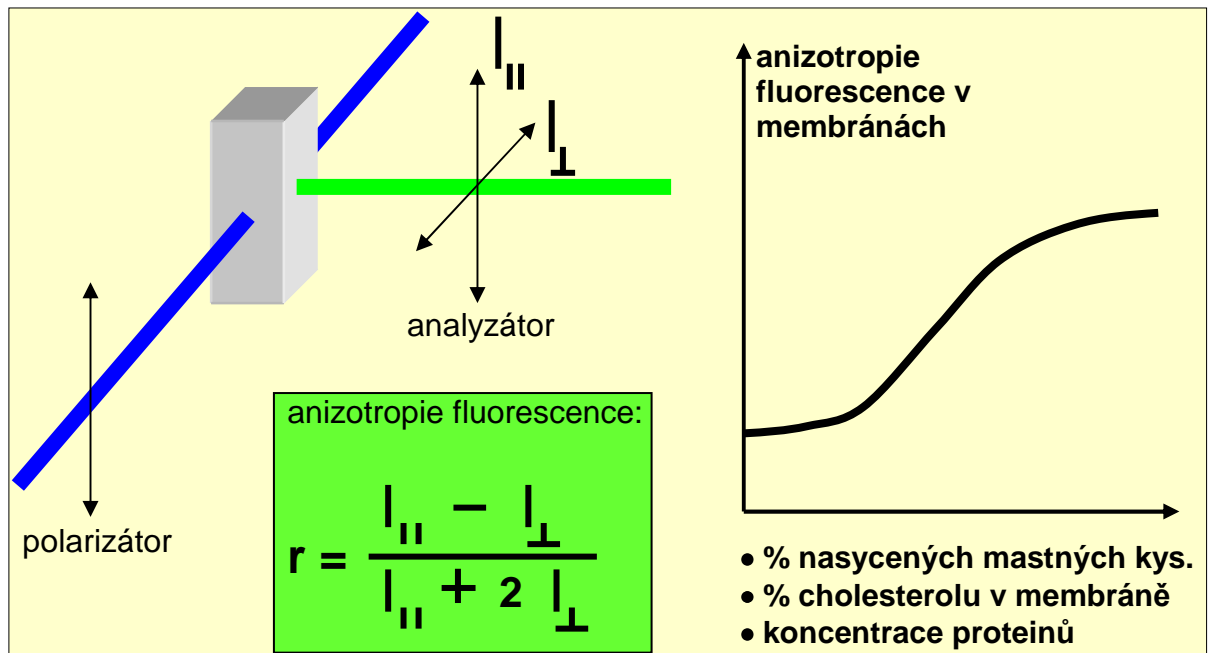
Pro intenzitu fluorescence při obecném úhlu  $\alpha$ , o který je otočen analyzátor, platí:

$$I_\alpha = (\cos^2 \alpha)I_0 + (\sin^2 \alpha)I_{90}$$

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

$$I_{54,74} = \frac{1}{3}I_0 + \frac{2}{3}I_{90} = \frac{1}{3}(I_0 + 2I_{90})$$

Obr. 1.2 Uspořádání při měření polarizované fluorescence





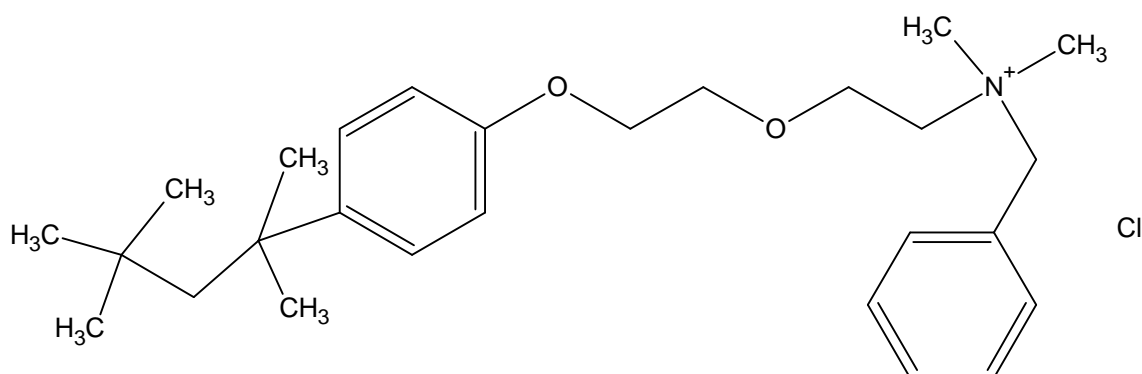
### **3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

### 3.1. POUŽITÉ CHEMIKÁLIE

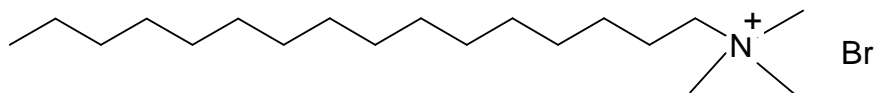
Při svých pokusech jsem používala následující chemikálie:

- Benzethoniumchlorid (viz vzorec č. 1) – SIGMA,
- Cetrimid – cetyltrimethylamoniumbromid (viz vzorec č. 2) – MERCK (for cosmetics)
- Cetylpyridiniumchlorid (viz vzorec č. 3) - SIGMA
- Carbethopendeciniumchlorid (viz vzorec č. 4) - Slovakofarma Hlohovec
- Fenolová červeň (viz vzorec č. 5) – Lachema n.p. Brno, použitá zkratka FČ
- Hydroxid sodný – Lachema n.p. Brno, závod Neratovice
- Chloroform – Lachema n.p. Brno, o.z. Neratovice
- Kyselina boritá – Lachema a.s. Neratovice
- Kyselina fosforečná – Lachema n.p. Brno, o.z. Neratovice
- Kyselina octová – Lachema a.s. Neratovice
- Deionizovaná voda připravená reverzní osmózou

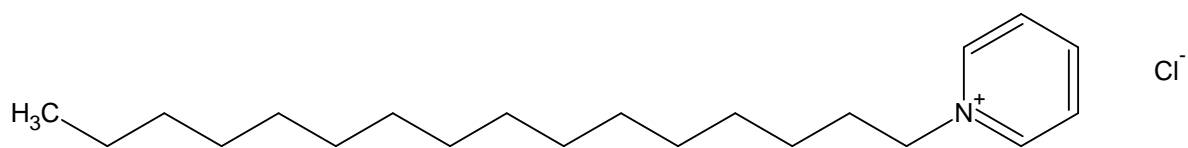
**Vzorec č. 1:** Benzethoniumchlorid ( $M_r = 448,1$ )



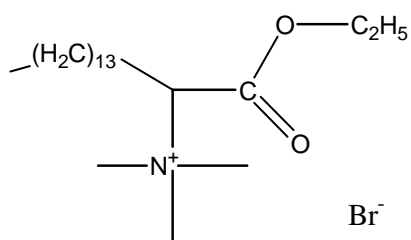
**Vzorec č. 2:** Cetrimid ( $M_r = 364,46$ )



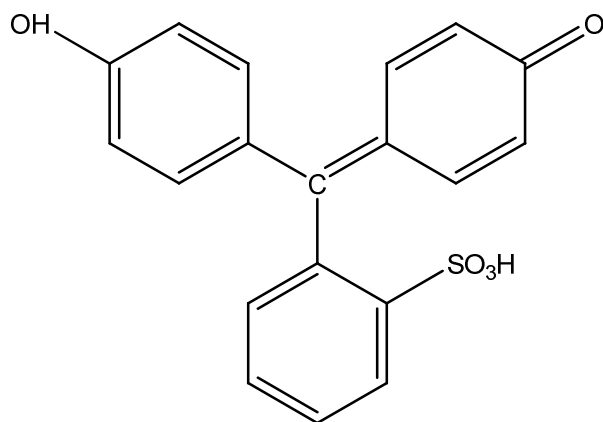
**Vzorec č. 3:** Cetylpyridiniumchlorid ( $M_r = 340,0$ )



**Vzorec č. 4:** Carbethopendeciniumbromid ( $M_r = 422,49$ )



**Vzorec č.5:** Fenolová červeň ( $M_r = 354,44$ )



### 3.2. POUŽITÉ PŘÍSTROJE

Během své práce jsem používala tyto přístroje:

- Digitální analytické váhy – Sartorius
- Mechanická laboratorní třepačka LT-2 – Kavalier Sázava
- pH metr PerpHect 350 – ORION
- Spektrofotometr SPEKOL – Carl Zeiss, Jena
- Spektrofotometr HP 8453 – Hewlet-Packard (Agilent Technologies)
- Spektrofluorimetr Aminco Bowman Series 2 – Thermo Spectronic

### 3.3. SEZNAM POUŽITÝCH ROZTOKŮ

Při svých měřeních jsem používala následující roztoky:

- Základní vodné roztoky fenolové červeně o koncentracích  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$  a  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ .
- Vodné roztoky tenzidů (cetrimid, benzethonium chlorid, cetylpyridinium chlorid a carbethopendecinium bromid) o koncentracích  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$  a  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ .
- Univerzální pufr podle H.T.S. Brittona a R.A. Robinsona (9) o pH 2,09 – 11,98.

### 3.4. PRACOVNÍ POSTUP

#### 3.4.1. Cetylpyridinium chlorid

##### 3.4.1.1. Sledování vlivu pH pufru a doby třepání na absorbanci v extrakční spektrofotometrii

Do zkumavek jsem odpipetovala 1 ml tenzidu cetylpyridinium chloridu, 3 ml Britton-Robinsonova pufru o potřebném pH, 5 ml chloroformu a 1 ml fenolové červeně o koncentraci  $4 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ . Tento roztok jsem připravila smísením 0,4 ml zásobního roztoku FČ o koncentraci  $10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$  a 0,6 ml vody. Do slepých vzorků jsem napipetovala místo tenzidu 1 ml vody. Po deseti minutách třepání na třepačce jsem měřila absorpční maximum u jednoho vybraného vzorku proti slepému vzorku.

Dále jsem měřila absorbanci všech vzorků proti slepým vzorkům při 400 a 420 nm po deseti, dvaceti a třiceti minutách třepání.

##### 3.4.1.2. Extrakční spektrofotometrie s použitím pufru o pH = 6

Do zkumavek jsem odpipetovala 1 ml tenzidu cetylpyridinium chloridu, 3 ml Britton-Robinsonova pufru o pH = 6, 5 ml chloroformu a 1 ml fenolové červeně o potřebné koncentraci. Tím jsem vytvořila řadu vzorků o stoupající koncentraci fenolové červeně (viz tabulka č.1). Příprava slepých vzorků se lišila tím, že jsem napipetovala místo tenzidu 1 ml vody. Po dvaceti minutách třepání jsem měřila absorbanci při 400 a 420 nm.

Tabulka č.1: Příprava vzorků o stoupající koncentraci fenolové červeně

<b>Koncentrace FČ [mol.l<sup>-1</sup>]</b>	$1 \cdot 10^{-4}$	$2 \cdot 10^{-4}$	$4 \cdot 10^{-4}$	$6 \cdot 10^{-4}$	$8 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-3}$
<b>Objem FČ [ml]</b>	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1
<b>Objem vody [ml]</b>	0,9	0,8	0,6	0,4	0,2	0

### 3.4.1.3. UV-VIS spektrofotometrie a fluorimetrie s použitím pufru o pH = 6

Vzorky jsem připravila v kádinkách odpipetováním 0,8 ml tenzidu o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ , potřebného množství zásobního roztoku fenolové červeně o příslušné koncentraci, 1,6 ml Britton-Robinsonova pufru o pH = 6 a doplněním do 4 ml vodou (viz tabulka č.2). Vzorky jsem promíchala a nechala 10 minut stát. Absorpční spektra jsem měřila proti slepým vzorkům, které představovaly roztoky fenolové červeně o dané koncentraci, 1,6 ml pufru o pH = 6 a doplněné vodou do 4 ml (viz tabulka č. 3).

Tabulka č.2: Příprava vzorků při koncentraci cetylpyridinium chloridu  $2 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$

č. vz.	$c_1 [\text{mol.l}^{-1}]$	$V_{\text{FČ}} [\text{ml}]$	$c_2 [\text{mol.l}^{-1}]$	$V_t [\text{ml}]$	$V_p [\text{ml}]$	$V_v [\text{ml}]$
1	$10^{-4}$	0,8	$2 \cdot 10^{-5}$	0,8	1,6	0,8
2	$10^{-4}$	1,6	$4 \cdot 10^{-5}$	0,8	1,6	0
3	$10^{-3}$	0,24	$6 \cdot 10^{-5}$	0,8	1,6	1,36
4	$10^{-3}$	0,32	$8 \cdot 10^{-5}$	0,8	1,6	1,28
5	$10^{-3}$	0,4	$10^{-4}$	0,8	1,6	1,2
6	$10^{-3}$	0,8	$2 \cdot 10^{-4}$	0,8	1,6	0,8
7	$10^{-3}$	1,2	$3 \cdot 10^{-4}$	0,8	1,6	0,4

V tabulce č.2 je  $c_1$  koncentrace zásobního roztoku fenolové červeně,  $V_{\text{FČ}}$  je objem zásobního roztoku fenolové červeně a  $c_2$  je koncentrace fenolové červeně ve vzorku,  $V_t$  objem zásobního roztoku tenzidu,  $V_p$  objem pufru a  $V_v$  objem vody.

Tabulka č. 3: Příprava slepých vzorků

č. sl. vz.	$c_1 [\text{mol.l}^{-1}]$	$V_{\text{FČ}} [\text{ml}]$	$c_2 [\text{mol.l}^{-1}]$	$V_p [\text{ml}]$	$V_v [\text{ml}]$
1	0	0	0	1,6	2,4
2	$10^{-4}$	0,8	$2 \cdot 10^{-5}$	1,6	1,6
3	$10^{-4}$	1,6	$4 \cdot 10^{-5}$	1,6	0,8
4	$10^{-3}$	0,24	$6 \cdot 10^{-5}$	1,6	2,16
5	$10^{-3}$	0,32	$8 \cdot 10^{-5}$	1,6	2,08
6	$10^{-3}$	0,4	$10^{-4}$	1,6	2,0
7	$10^{-3}$	0,8	$2 \cdot 10^{-4}$	1,6	1,6

V tabulce č.3 je  $c_1$  koncentrace zásobního roztoku fenolové červeně,  $V_{\text{FČ}}$  je objem zásobního roztoku fenolové červeně,  $c_2$  je koncentrace fenolové červeně ve slepém vzorku,  $V_p$  objem pufru a  $V_v$  objem vody.

### 3.4.1.4. UV-VIS spektrofotometrie a fluorimetrie u řady se stoupající koncentrací tenzidu a pufrům pH =6

Vzorky jsem připravila v kádinkách odpipetováním potřebného množství tenzidu o příslušné koncentraci, 0,8 ml zásobního roztoku fenolové červeně o koncentraci  $2 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ , 1,6 ml Britton-Robinsonova pufru o pH = 6 a doplněním do 4ml vodou (viz tabulka č.4). Vzorky jsem promíchala a nechala 10 minut stát. Absorpční spektra jsem měřila proti slepému vzorku, který představoval roztok 0,8 ml tenzidu o koncentraci  $2 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ ,

1,6 ml pufru o pH = 6 a doplněné vodou do 4 ml (viz tabulka č.5).

Tabulka č.4: Příprava vzorků při koncentraci fenolové červeně  $2 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$

č. vz.	$c_3$ [mol.l <sup>-1</sup> ]	$V_t$ [ml]	$c_4$ [mol.l <sup>-1</sup> ]	$V_{FČ}$ [ml]	$V_p$ [ml]	$V_v$ [ml]
1	$10^{-4}$	0,8	$2 \cdot 10^{-5}$	0,8	1,6	0,8
2	$10^{-4}$	1,6	$4 \cdot 10^{-5}$	0,8	1,6	0
3	$10^{-3}$	0,24	$6 \cdot 10^{-5}$	0,8	1,6	1,36
4	$10^{-3}$	0,32	$8 \cdot 10^{-5}$	0,8	1,6	1,28
5	$10^{-3}$	0,4	$10^{-4}$	0,8	1,6	1,2
6	$10^{-3}$	0,8	$2 \cdot 10^{-4}$	0,8	1,6	0,8
7	$10^{-3}$	1,2	$3 \cdot 10^{-4}$	0,8	1,6	0,4

V tabulce č.4 je  $c_3$  koncentrace zásobního roztoku tenzidu,  $V_t$  je objem zásobního roztoku tenzidu,  $c_4$  je koncentrace tenzidu ve vzorku,  $V_{FČ}$  objem zásobního roztoku fenolové červeně,  $V_p$  objem pufru a  $V_v$  objem vody.

Tabulka č.5: Příprava slepého vzorku při koncentraci fenolové červeně  $2 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$

č. sl. vz.	$c_3$ [mol.l <sup>-1</sup> ]	$V_t$ [ml]	$c_4$ [mol.l <sup>-1</sup> ]	$V_{FČ}$ [ml]	$V_p$ [ml]	$V_v$ [ml]
1	$10^{-4}$	0,8	$2 \cdot 10^{-5}$	0	1,6	1,6

V tabulce č.5 je  $c_3$  koncentrace zásobního roztoku tenzidu,  $V_t$  je objem zásobního roztoku tenzidu,  $c_4$  je koncentrace tenzidu ve slepém vzorku,  $V_{FČ}$  objem zásobního roztoku fenolové červeně,  $V_p$  objem pufru a  $V_v$  objem vody.

### **3.4.1.5. Fluorimetrie s polarizovaným světlem s použitím pufru o pH = 6**

Vzorky jsem připravila dle stejného postupu jako v kapitole 3.4.1.3. ( podrobný rozpis viz tabulka č.2), promíchala a nechala 10 minut stát. Příprava slepých vzorků byla také stejná jako u UV-VIS spektrofotometrie a fluorimetrie (viz tabulka č.3). Vzorky i slepé vzorky jsem měřila na spektrofluorimetru s použitím těchto různých filtrů: filtr 0°/0°, filtr 0°/90°, filtr 0°/54,7°, filtr 90°/0°, filtr 90°/90°, kde hodnoty stupňů udávají úhel otočení analyzátoru ke směru polarizace budícího záření.

### **3.4.1.6. Extrakční spektrofotometrie s použitím pufru o pH = 11**

Do zkumavek jsem odpipetovala 1 ml tenzidu (cetylpyridinium chloridu), 3 ml Britton-Robinsonova pufru o pH = 11, 5 ml chloroformu a 1 ml fenolové červeně o potřebné koncentraci. Tím jsem vytvořila řadu vzorků o stoupající koncentraci fenolové červeně (viz tabulka č.1). Příprava slepých vzorků se lišila tím, že jsem napipetovala místo tenzidu 1 ml vody. Po dvaceti minutách třepání jsem měřila absorbanci při 400 a 420 nm.

### **3.4.1.7. UV-VIS spektrofotometrie a fluorimetrie s použitím pufru o pH = 11**

Vzorky jsem připravila v kádinkách odpipetováním 0,8 ml tenzidu o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ , potřebného množství zásobního roztoku fenolové červeně o příslušné koncentraci, 1,6 ml Britton-Robinsonova pufru o pH = 11 a doplněním do 4 ml vodou (viz tabulka č.2). Vzorky jsem promíchala a nechala 10 minut stát. Absorpční spektra jsem měřila proti slepým vzorkům, které představovaly roztoky fenolové červeně o dané koncentraci, 1,6 ml pufru o pH = 11 a doplněné vodou do 4 ml (viz tabulka č.3).



### **3.4.1.8. UV-VIS spektrofotometrie a fluorimetrie u řady se stoupající koncentrací tenzidu a pufrům pH = 11**

Vzorky jsem připravila v kádinkách odpipetováním potřebného množství tenzidu o příslušné koncentraci, 0,8 ml zásobního roztoku fenolové červeně o koncentraci  $2 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ , 1,6 ml Britton-Robinsonova pufru o pH = 11 a doplněním do 4 ml vodou (viz tabulka č.4). Vzorky jsem promíchala a nechala 10 minut stát. Absorpční spektra jsem měřila proti slepému vzorku, který představoval roztok 0,8 ml tenzidu o koncentraci  $2 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ , 1,6 ml pufru o pH = 11 a doplněné vodou do 4 ml (viz tabulka č.5).

### **3.4.1.9. Fluorimetrie s polarizovaným světlem s použitím pufru o pH = 11**

Vzorky jsem připravila dle stejného postupu jako v kapitole 3.4.1.7. (podrobný rozpis viz tabulka č.2), promíchala a nechala 10 minut stát. Příprava slepých vzorků byla také stejná jako u UV-VIS spektrofotometrie a fluorimetrie (viz tabulka č.3). Vzorky i slepé vzorky jsem měřila na spektrofluorimetru s použitím těchto různých filtrů: filtr  $0^{\circ}/0^{\circ}$ , filtr  $0^{\circ}/90^{\circ}$ , filtr  $0^{\circ}/54,7^{\circ}$ , filtr  $90^{\circ}/0^{\circ}$ , filtr  $90^{\circ}/90^{\circ}$ .

## **3.4.2. Carbethopendecinium bromid**

### **3.4.2.1. Sledování vlivu pH pufru a doby třepání na absorbanci v extrakční spektrofotometrii**

Do zkumavek jsem odpipetovala 1 ml tenzidu carbethopendecinium bromidu, 3 ml Britton-Robinsonova pufru o potřebném pH, 5 ml chloroformu a 1 ml fenolové červeně o koncentraci  $4 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ . Tento roztok jsem připravila smísením 0,4 ml zásobního roztoku FČ o koncentraci  $10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$  a 0,6 ml vody. Do slepých vzorků jsem napipetovala místo tenzidu 1 ml vody. Po deseti minutách třepání na třepačce jsem měřila absorpční maximum u jednoho vybraného vzorku proti slepému vzorku.

Dále jsem měřila absorbanci všech vzorků proti slepým vzorkům při 400 a 420 nm po deseti, dvaceti a třiceti minutách třepání.

#### **3.4.2.2. Extrakční spektrofotometrie s použitím pufru o pH = 6**

Do zkumavek jsem odpipetovala 1 ml tenzidu carbethopendecinium bromidu, 3 ml Britton-Robinsonova pufru o pH = 6, 5 ml chloroformu a 1 ml fenolové červeně o potřebné koncentraci. Tím jsem vytvořila řadu vzorků o stoupající koncentraci fenolové červeně (viz tabulka č.1). Příprava slepých vzorků se lišila tím, že jsem napipetovala místo tenzidu 1 ml vody. Po dvaceti minutách třepání jsem měřila absorbanci při 400 a 420 nm.

#### **3.4.2.3. UV-VIS spektrofotometrie a fluorimetrie s použitím pufru o pH = 6**

Vzorky jsem připravila v kádinkách odpipetováním 0,8 ml tenzidu o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ , potřebného množství zásobního roztoku fenolové červeně o příslušné koncentraci, 1,6 ml Britton-Robinsonova pufru o pH = 6 a doplněním do 4 ml vodou (viz tabulka č.2). Vzorky jsem promíchala a nechala 10 minut stát. Absorpční spektra jsem měřila proti slepým vzorkům, které představovaly roztoky fenolové červeně o dané koncentraci, 1,6 ml pufru o pH = 6 a doplněné vodou do 4 ml (viz tabulka č. 3).

#### **3.4.2.4. UV-VIS spektrofotometrie a fluorimetrie u řady se stoupající koncentrací tenzidu a pufrem pH =6**

Vzorky jsem připravila v kádinkách odpipetováním potřebného množství tenzidu o příslušné koncentraci, 0,8 ml zásobního roztoku fenolové červeně o koncentraci  $2 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ , 1,6 ml Britton-Robinsonova pufru o pH = 6 a doplněním do 4ml vodou (viz tabulka č.4). Vzorky jsem promíchala a nechala 10 minut stát. Absorpční spektra jsem měřila proti slepému vzorku, který představoval roztok 0,8 ml tenzidu o koncentraci  $2 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ , 1,6 ml pufru o pH = 6 a doplněné vodou do 4 ml (viz tabulka č.5).

### **3.4.2.5. Fluorimetrie s polarizovaným světlem s použitím pufru o pH = 6**

Vzorky jsem připravila dle stejného postupu jako v kapitole 3.4.2.3. (podrobný rozpis viz tabulka č.2), promíchala a nechala 10 minut stát. Příprava slepých vzorků byla také stejná jako u UV-VIS spektrofotometrie a fluorimetrie (viz tabulka č.3). Vzorky i slepé vzorky jsem měřila na spektrofluorimetru s použitím těchto různých filtrů: filtr 0°/0°, filtr 0°/90°, filtr 0°/54,7°, filtr 90°/0°, filtr 90°/90°.

### **3.4.3. Cetrimid**

Pracovní postup měření interakcí fenolové červeně s tenzidem cetrimidem pomocí extrakční spektrofotometrie, UV-VIS spektrofotometrie a fluorimetrie jsem již popsala ve své diplomové práci (21).

#### **3.4.3.1. Fluorimetrie s polarizovaným světlem s použitím pufru o pH = 8**

Vzorky jsem připravila dle stejného postupu jako v kapitole 3.4.2.3. (podrobný rozpis viz tabulka č.2), promíchala a nechala 10 minut stát. Příprava slepých vzorků byla také stejná jako u UV-VIS spektrofotometrie a fluorimetrie (viz tabulka č.3). Vzorky i slepé vzorky jsem měřila na spektrofluorimetru s použitím těchto různých filtrů: filtr 0°/0°, filtr 0°/90°, filtr 0°/54,7°, filtr 90°/0°, filtr 90°/90°.

### **3.4.4. Benzethonium chlorid**

Pracovní postup měření interakcí fenolové červeně s tenzidem benzethonium chloridem pomocí extrakční spektrofotometrie, UV-VIS spektrofotometrie a fluorimetrie jsem již popsala ve své diplomové práci (21).

#### **3.4.4.1. Fluorimetrie s polarizovaným světlem s použitím pufru o pH = 7**

Vzorky jsem připravila dle stejného postupu jako v kapitole 3.4.2.3. (podrobný rozpis viz tabulka č.2), promíchala a nechala 10 minut stát. Příprava slepých vzorků byla také stejná jako u UV-VIS spektrofotometrie a fluorimetrie (viz tabulka č.3). Vzorky i slepé vzorky jsem měřila na spektrofluorimetru s použitím těchto různých filtrů: filtr  $0^{\circ}/0^{\circ}$ , filtr  $0^{\circ}/90^{\circ}$ , filtr  $0^{\circ}/54,7^{\circ}$ , filtr  $90^{\circ}/0^{\circ}$ , filtr  $90^{\circ}/90^{\circ}$ .

## **4. VÝSLEDKY**

## 4.1. VÝSLEDKY STUDIA INTERAKCÍ FENOLOVÉ ČERVENĚ S CETYLPYRIDINIUM CHLORIDEM

### 4.1.1. Extrakční spektrofotometrie s použitím pufru o pH = 6

Nejprve jsem měřila absorpční maximum jednoho vybraného chloroformového výtřepku roztoku fenolové červeně s cetylpyridinium chloridem proti slepému vzorku a výsledky zpracovala do tabulky č.6. Nejvyšší absorbance byla naměřena při vlnové délce 400 nm. V odborné literatuře (12) bylo uvedeno absorpční maximum při 420 nm, proto jsem další měření prováděla při těchto dvou vlnových délkách.

Tabulka č.6: Měření absorpčního maxima chloroformového výtřepku roztoku fenolové červeně s cetylpyridinium chloridem

$\lambda$ [nm]	A
395	0,230
<b>400</b>	<b>0,235</b>
405	0,230
410	0,230
420	0,200
430	0,195

V tabulce č.6 je  $\lambda$  vlnová délka a A je absorbance.

Dále jsem měřila absorbanci všech vzorků proti slepým vzorkům při 400 a 420 nm po deseti, dvaceti a třiceti minutách třepání při pH = 5-12 (viz tabulky č.7, č.8, č.9). Nejvyšší absorbance jsem naměřila u vzorků o pH = 6 a pH = 11 s dobou třepání třicet minut. U doby deset minut jsou nejnižší, po dvaceti minutách následuje větší skok v hodnotách absorbancí, ale při třiceti minutách není nárůst tak významný. Při dalších měřeních postačí doba třepání dvacet minut. Závislost absorbance na pH při 400 nm jsem zpracovala do grafu č. 1.

Tabulky č.7: Měření absorbancí chloroformových výtřepků roztoků fenolové červeně s cetylpyridinium chloridem o pH = 5-12 po deseti minutách třepání při vlnových délkách 400 nm a 420 nm

měření při 400 nm

pH	A
5	0,260
<b>6</b>	<b>0,330</b>
7	0,270
8	0,225
9	0,235
10	0,120
<b>11</b>	<b>0,230</b>
12	0,130

měření při 420 nm

pH	A
5	0,250
<b>6</b>	<b>0,320</b>
7	0,255
8	0,230
9	0,230
10	0,120
<b>11</b>	<b>0,220</b>
12	0,120

Tabulka č.8: Měření absorbancí chloroformových výtřepků roztoků fenolové červeně s cetylpyridinium chloridem o pH = 5-12 po dvaceti minutách třepání při vlnových délkách 400 nm a 420 nm

měření při 400 nm

pH	A
5	0,360
<b>6</b>	<b>0,375</b>
7	0,345
8	0,325
9	0,330
10	0,200
<b>11</b>	<b>0,280</b>
12	0,135

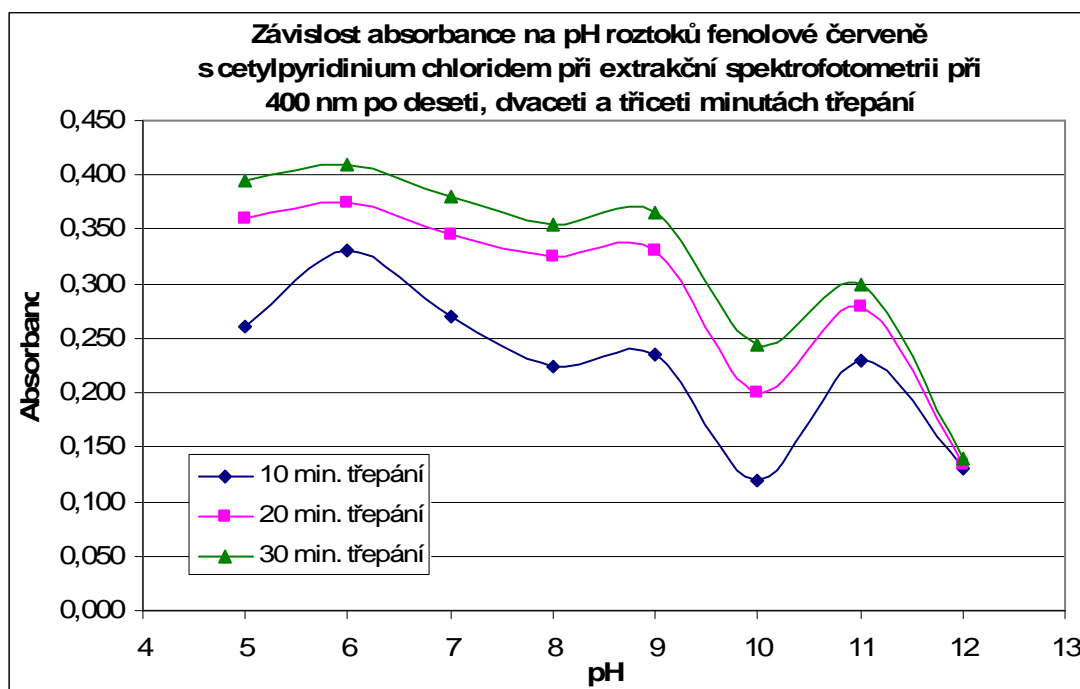
měření při 420 nm

pH	A
5	0,310
<b>6</b>	<b>0,330</b>
7	0,310
8	0,290
9	0,300
10	0,180
<b>11</b>	<b>0,260</b>
12	0,125

Tabulka č.9: Měření absorbancí chloroformových výtřepků roztoků fenolové červeně s cetylpyridinium chloridem o pH = 5-12 po třiceti minutách třepání při vlnových délkách 400 nm a 420 nm

měření při 400 nm		měření při 420 nm	
pH	A	pH	A
5	0,395	5	0,345
<b>6</b>	<b>0,410</b>	<b>6</b>	<b>0,355</b>
7	0,380	7	0,330
8	0,355	8	0,310
9	0,365	9	0,325
10	0,245	10	0,220
<b>11</b>	<b>0,300</b>	<b>11</b>	<b>0,265</b>
12	0,140	12	0,125

Graf č.1



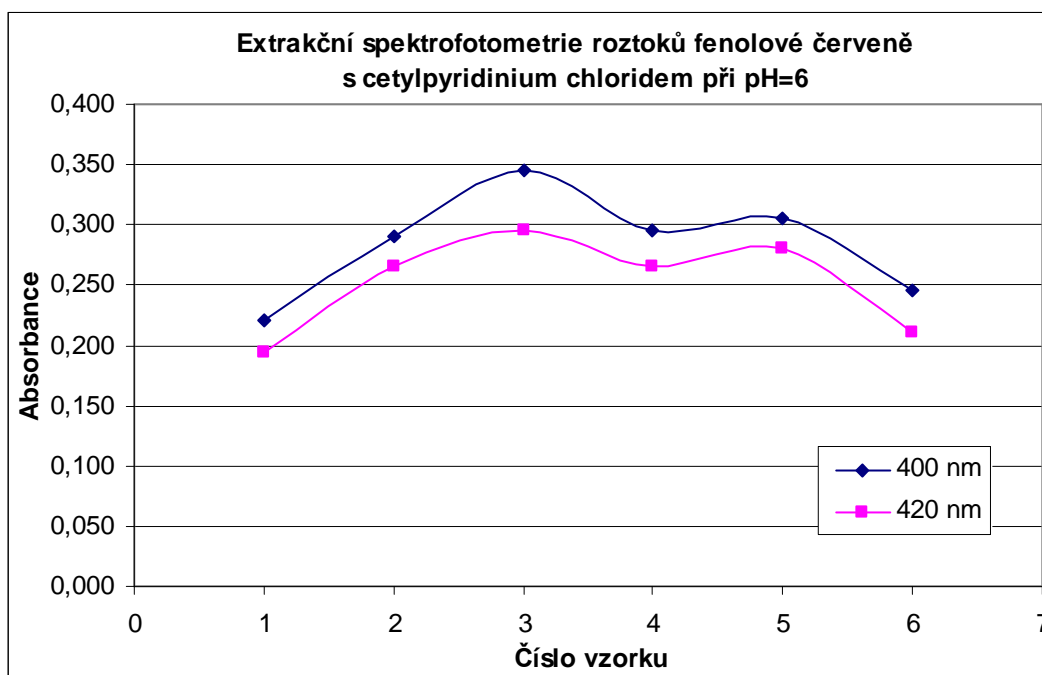
Absorbanci chloroformových výtřepků jsem získala měřením roztoků fenolové červeně s cetylpyridinium chloridem při pH = 6 (viz kapitola 3.4.1.2.) po dvaceti minutách třepání při vlnových délkách 400 a 420 nm (viz tabulka č.10) a hodnoty z této tabulky jsem zpracovala do grafu č.2.



Tabulka č.10: Absorbance chloroformových výtřepků roztoků fenolové červeně s cetylpyridinium chloridem naměřené při pH = 6 po dvaceti minutách třepání při vlnových délkách 400 nm a 420 nm

měření při 400 nm		měření při 420 nm	
č.vzorku	A	č.vzorku	A
1.	0,220	1.	0,195
2.	0,290	2.	0,265
3.	0,345	3.	0,295
4.	0,295	4.	0,265
5.	0,305	5.	0,280
6.	0,245	6.	0,210

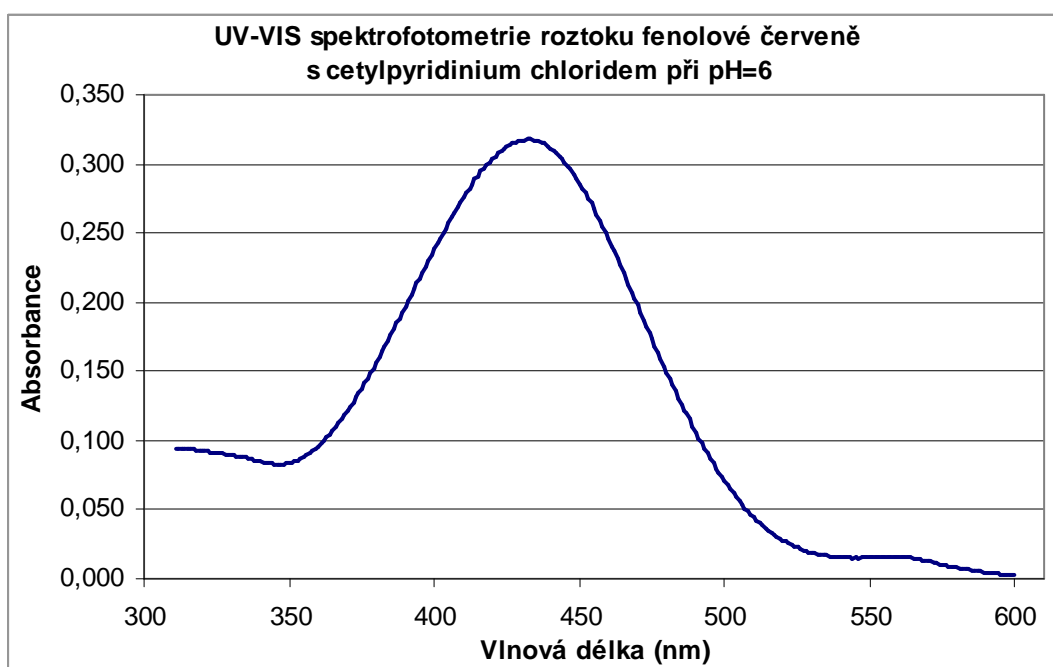
Graf č.2



#### 4.1.2. UV-VIS spektrofotometrie s použitím pufru o pH = 6

Absorpční spektra vzorků, obsahujících konstantní koncentraci tenzidu cetylpyridinium chloridu  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  a různé koncentrace fenolové červeně, jsem získala z měření na UV-VIS spektrofotometru proti příslušným slepým vzorkům (viz kapitola 3.4.1.3.). Vzorové spektrum znázorňuje graf č.3. Absorpční maximum je 432 nm..

Graf č.3



#### 4.1.3. Fluorimetrie s použitím pufru o pH = 6

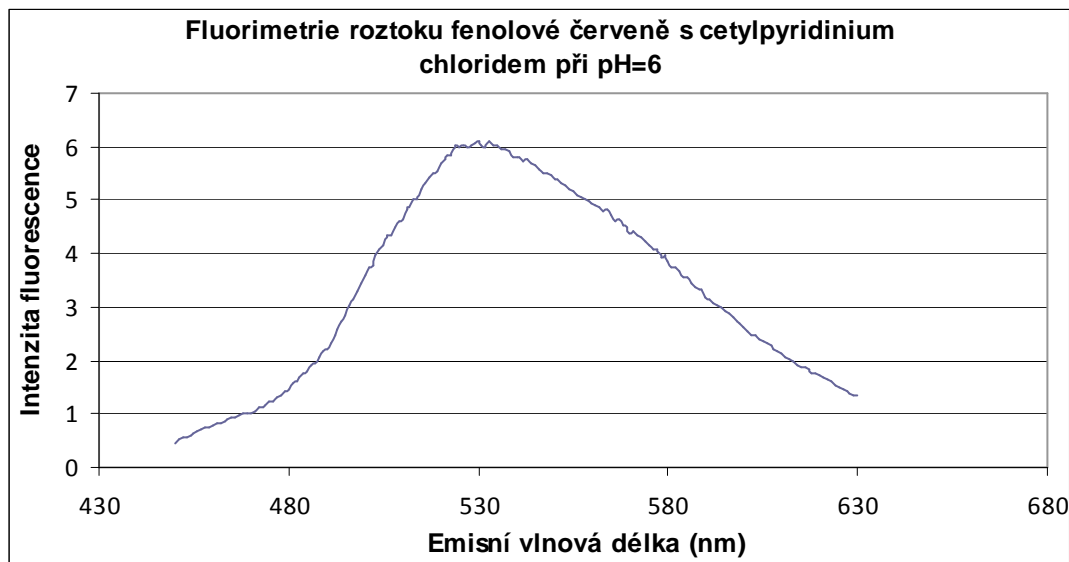
Na fluorimetru jsem měřila spektra vzorků i slepých vzorků (viz kapitola 3.4.1.3.). Citlivost jsem nastavila na nejméně koncentrovaný vzorek resp. slepý vzorek. Excitační vlnová délka ( $\lambda_{ex}$ ) 430 nm byla u všech vzorků stejná. Ze spekter jsem odečetla vlnovou délku, při níž byla fluorescence maximální a intenzitu fluorescence v emisním maximu u jednotlivých vzorků a slepých vzorků a uspořádala do tabulky č. 11. Graf č. 4 znázorňuje emisní fluorescenční spektrum slepého vzorku č. 5.

Tabulka č.11: Vlnové délky a intenzity fluorescence vzorků a slepých vzorků roztoků fenolové červeně s cetylpyridinium chloridem naměřené při pH = 6 v emisním maximu

č. vzorku	$\lambda_{em}$ [nm]	I	č. slep. vzorku	$\lambda_{em}$ [nm]	I
1	526	9,889	-	-	-
2	525	9,969	2	504	6,604
3	529	9,961	3	528	8,066
4	532	9,699	4	529	7,933
5	532	9,061	5	533	6,111
6	534	3,809	6	533	5,208
7	535	1,036	7	530	1,357

V tabulce č.11 je  $\lambda$  vlnová délka, při níž byla fluorescence maximální a I intenzita fluorescence.

Graf č.4



#### 4.1.4. UV-VIS spektrofotometrie u řady se stoupající koncentrací tenzidu a pufrem pH = 6

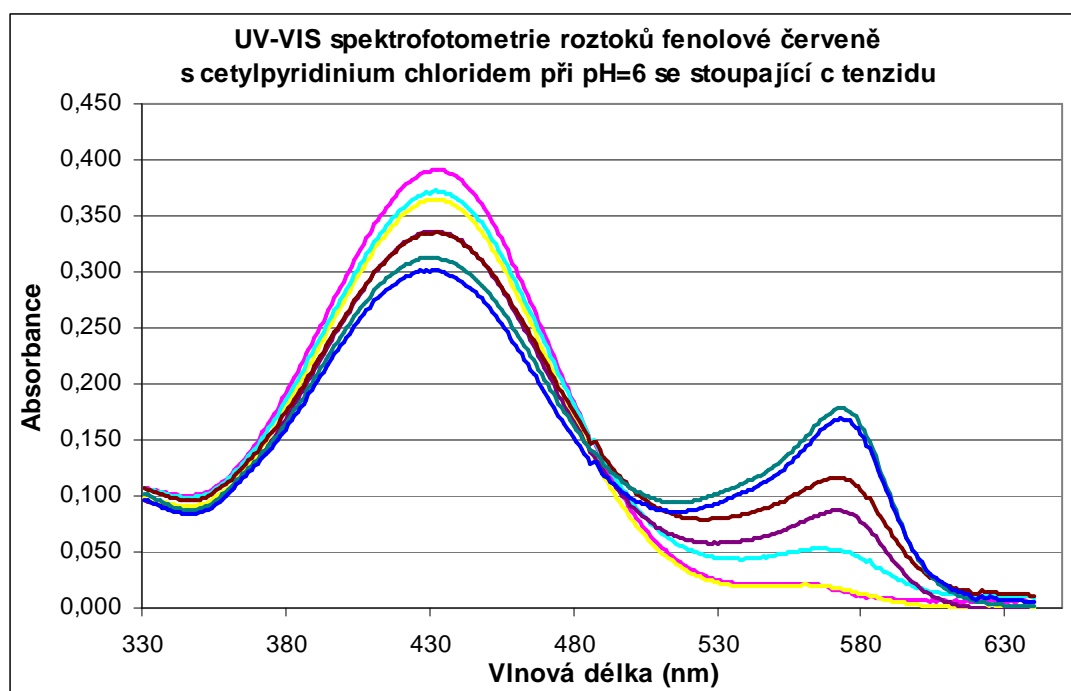
Měřením na UV-VIS spektrofotometru proti slepému vzorku jsem získala absorpční spektra vzorků obsahujících konstantní koncentraci fenolové červeně  $2 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$  a lišících se koncentrací tenzidu cetylpyridinium chloridu (viz kapitola 3.4.1.4.). Tabulka č. 12 vyjadřuje změny absorpčních maxim v závislosti na koncentraci tenzidu. Graf č. 5 zobrazuje spektra všech měřených vzorků.

Tabulka č.12: Změny absorpčních maxim roztoků fenolové červeně s cetylpyridinium chloridem naměřené při pH = 6 v závislosti na koncentraci tenzidu

$c_4$ [mol.l <sup>-1</sup> ]	$\lambda_{\max 1}$ [nm]	$\lambda_{\max 2}$ [nm]
$2 \cdot 10^{-5}$	432	557
$4 \cdot 10^{-5}$	434	560
$6 \cdot 10^{-5}$	432	566
$8 \cdot 10^{-5}$	433	570
$1 \cdot 10^{-4}$	433	570
$2 \cdot 10^{-4}$	430	573
$3 \cdot 10^{-4}$	432	573

V tabulce č.12 je  $c_4$  koncentrace tenzidu ve vzorku a  $\lambda_{\max 1}$  a  $\lambda_{\max 2}$  jsou absorpční maxima při dané koncentraci tenzidu.

Graf č.5



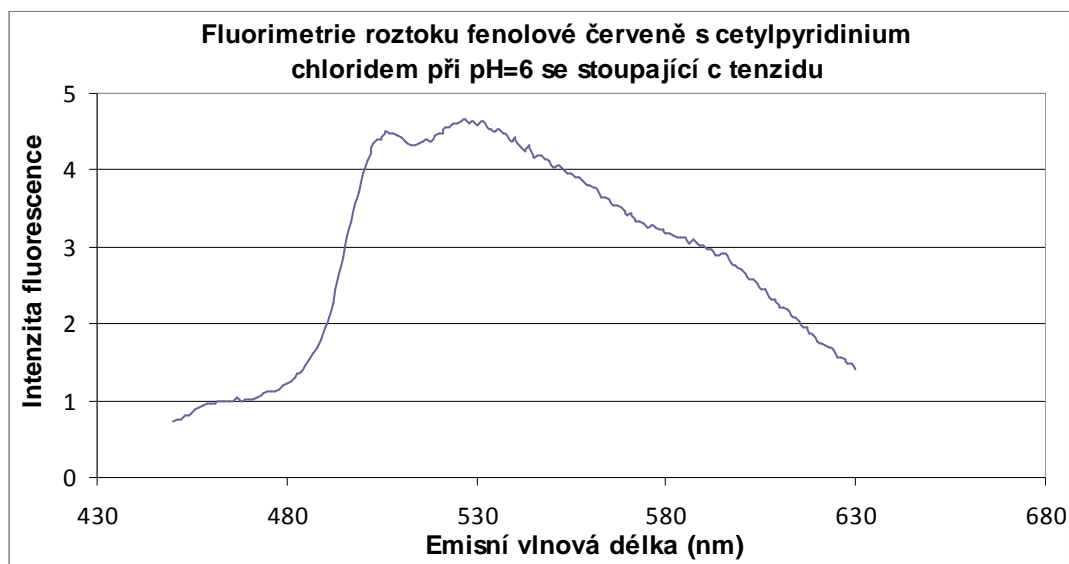
#### 4.1.5. Fluorimetrie u řady se stoupající koncentrací tenzidu a pufrem pH = 6

Fluorimetricky jsem měřila spektra vzorků.(viz kapitola 3.4.1.4.). Citlivost byla nastavena na nejméně koncentrovaný vzorek. Emisní vlnové délky, při nichž byla naměřena maximální fluorescence a intenzity fluorescence jsem uspořádala do tabulky č.13. Graf č. 6 znázorňuje emisní fluorescenční spektrum vzorku č.4.

Tabulka č.13: Vlnové délky a intenzity fluorescence roztoků fenolové červeně s cetylpyridinium chloridem naměřené při pH = 6 se stoupající koncentrací tenzidu v emisním maximu

č. vzorku	$\lambda_{em}$ [nm]	I
1	531	6,047
2	529	5,854
3	531	5,349
4	527	4,658
5	507	4,076
6	504	2,947
7	504	2,747

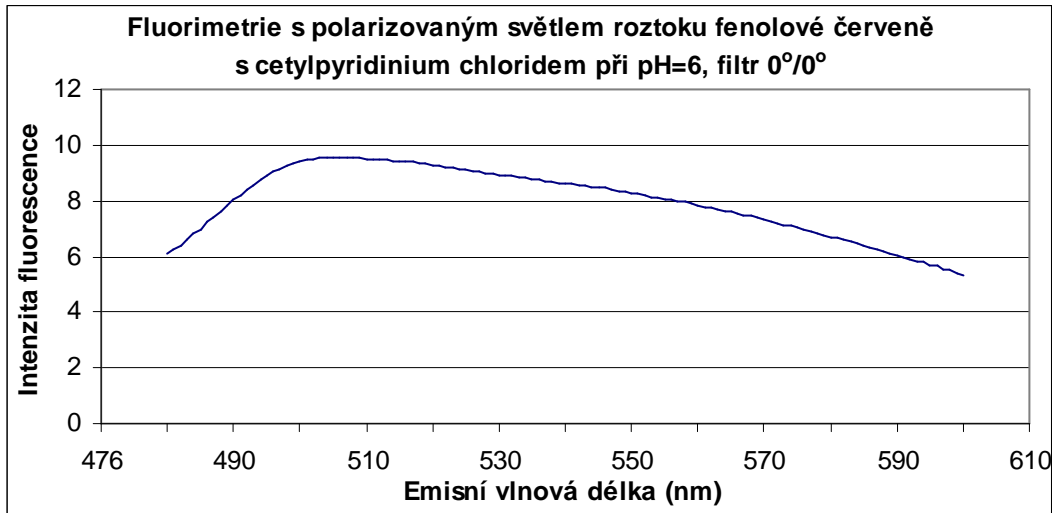
Graf č.6



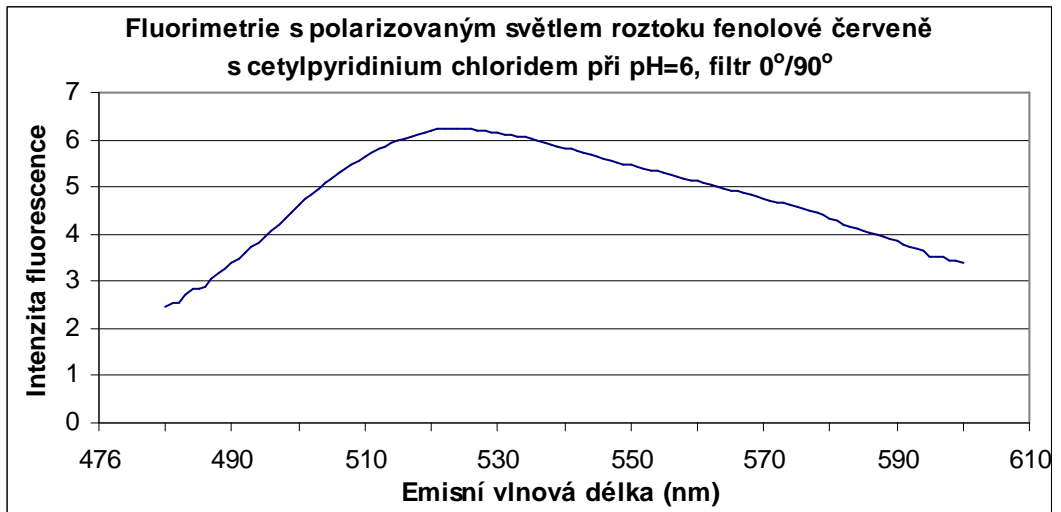
#### 4.1.6. Fluorimetrie s polarizovaným světlem s použitím pufru o pH = 6

Vzorky i slepé vzorky jsem měřila na spektrofluorimetru s použitím těchto různých filtrů: filtr  $0^\circ/0^\circ$ , filtr  $0^\circ/90^\circ$ , filtr  $0^\circ/54,7^\circ$ , filtr  $90^\circ/0^\circ$ , filtr  $90^\circ/90^\circ$ , kde hodnoty stupňů udávají úhel otočení analyzátoru ke směru polarizace budícího záření. Citlivost jsem nastavila na co nejméně koncentrovaný vzorek resp. slepý vzorek. Excitační vlnová délka ( $\lambda_{ex}$ ) 430 nm byla u všech vzorků stejná. Ze spekter jsem odečetla vlnovou délku, při níž byla fluorescence maximální a intenzitu fluorescence v emisním maximu u jednotlivých vzorků a slepých vzorků a hodnoty uspořádala do tabulek podle typu použitého filtru (viz tabulka č.25 na konci kapitoly 4). Z těchto hodnot jsem vypočítala podle vzorců v kapitole 2.3.3.2. anizotropii fluorescence ( $r$ ), korekční faktor ( $G$ ) a hodnotu intenzity fluorescence v magickém úhlu ( $I_{54,7}$ ). Graf č.7 znázorňuje emisní fluorescenční spektrum vzorku č.1 s použitím filtru  $0^\circ/0^\circ$ , graf č.8 spektrum vzorku č.4 s filtrem  $0^\circ/90^\circ$  a graf č.9 spektrum vzorku č.5 s filtrem  $0^\circ/54,7^\circ$ .

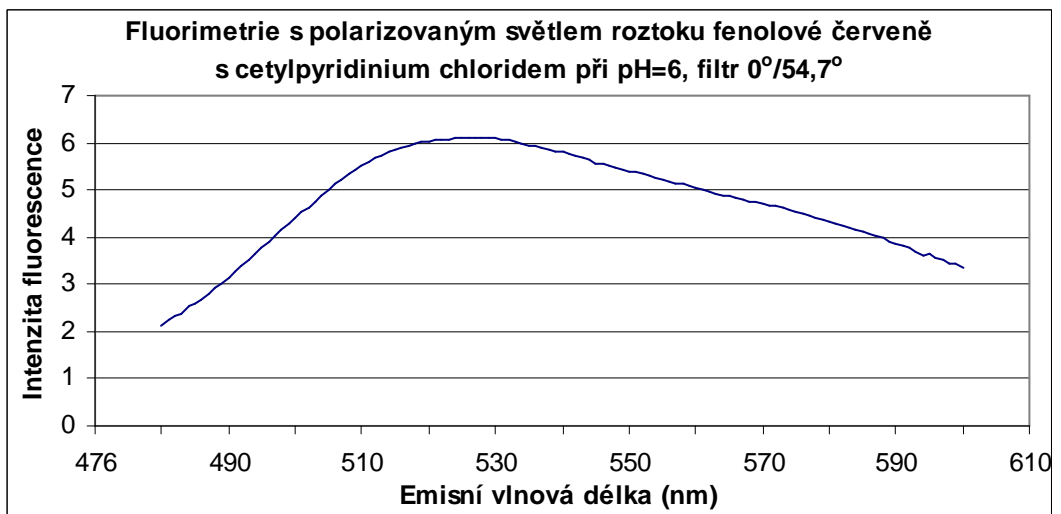
Graf č.7



Graf č.8



Graf č.9



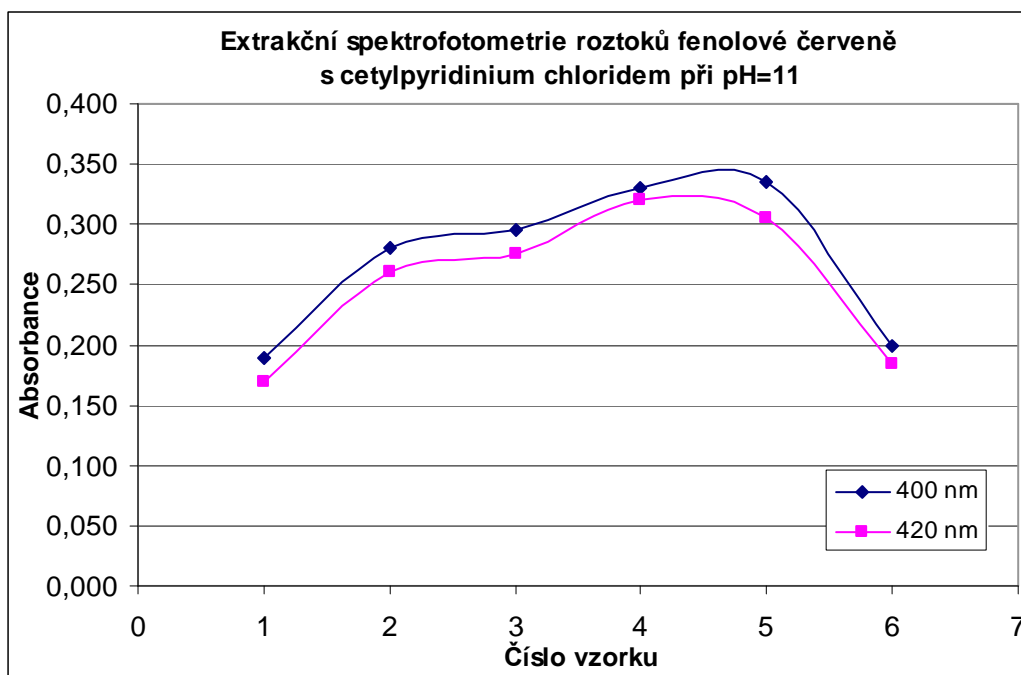
#### 4.1.7. Extrakční spektrofotometrie s použitím pufru o pH = 11

Podle kapitoly 3.4.1.6. jsem měřila absorbanci chloroformových výtřepků proti slepým vzorkům po dvaceti minutách třepání při vlnových délkách 400 a 420 nm (viz tabulka č.14) a naměřené hodnoty jsem zpracovala do grafu č.10.

Tabulka č.14: Absorbance chloroformových výtřepků roztoků fenolové červeně s cetylpyridinium chloridem naměřené při pH = 11 po dvaceti minutách třepání při vlnových délkách 400 nm a 420 nm

měření při 400 nm		měření při 420 nm	
č.vzorku	A	č.vzorku	A
1.	0,190	1.	0,170
2.	0,280	2.	0,260
3.	0,295	3.	0,275
4.	0,330	4.	0,320
5.	0,335	5.	0,305
6.	0,200	6.	0,185

Graf č.10

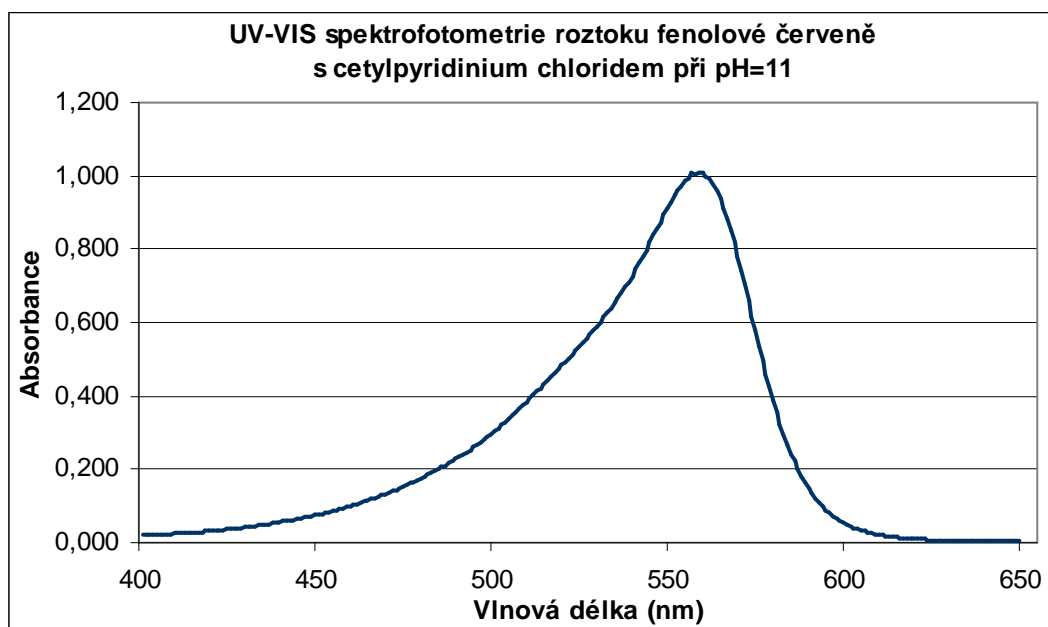




#### 4.1.8. UV-VIS spektrofotometrie s použitím pufru o pH = 11

Absorpční spektra vzorků, obsahujících konstantní koncentraci tenzidu cetylpyridinium chloridu  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$  a různé koncentrace fenolové červeně, jsem získala z měření na UV-VIS spektrofotometru proti příslušným slepým vzorkům (viz kapitola 3.4.1.7.). Vzorové spektrum znázorňuje graf č.11. Absorpční maximum je 559 nm.

Graf č.11



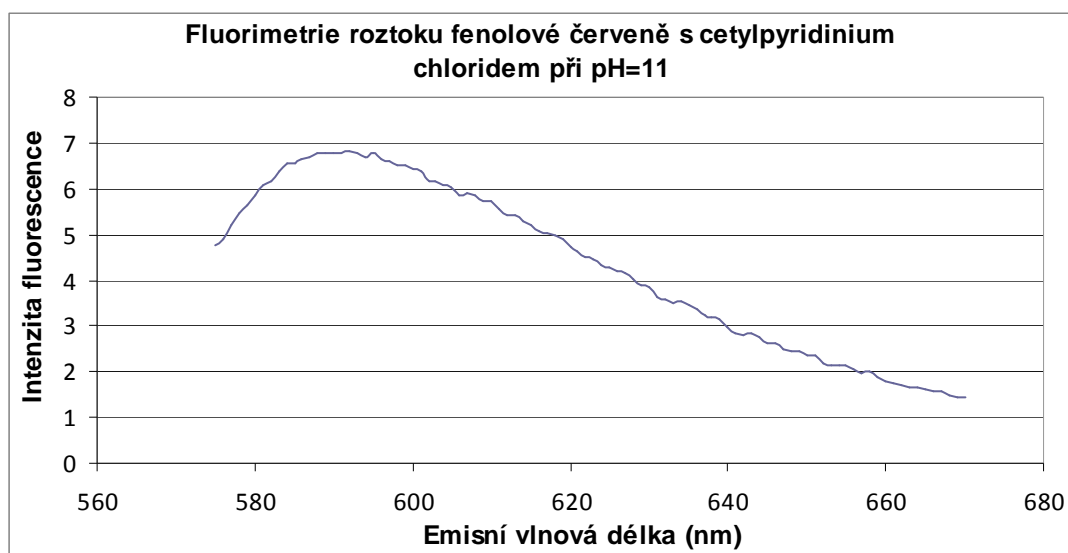
#### 4.1.9. Fluorimetrie s použitím pufru o pH = 11

Na fluorimetru jsem měřila spektra vzorků i slepých vzorků (viz kapitola 3.4.1.7.). Citlivost jsem nastavila na nejméně koncentrovaný vzorek resp. slepý vzorek. Excitační vlnová délka ( $\lambda_{ex}$ ) 559 nm byla u všech vzorků stejná. Ze spekter jsem odečetla vlnovou délku, při níž byla fluorescence maximální a intenzitu fluorescence v emisním maximu u jednotlivých vzorků a slepých vzorků a uspořádala do tabulky č.15. Graf č.12 znázorňuje emisní fluorescenční spektrum vzorku č.2.

Tabulka č.15: Vlnové délky a intenzity fluorescence vzorků a slepých vzorků roztoků fenolové červeně s cetylpyridinium chloridem naměřené při pH = 11 v emisním maximu

č. vzorku	$\lambda$ [nm]	I	č. slep. vzorku	$\lambda$ [nm]	I
1	588	8,322	-	-	-
2	592	6,810	2	585	6,142
3	595	4,112	3	591	4,092
4	597	2,124	4	596	1,407
5	603	1,943	5	596	0,853
6	608	0,633	6	598	0,750
7	613	0,605	7	606	0,222

Graf č.12



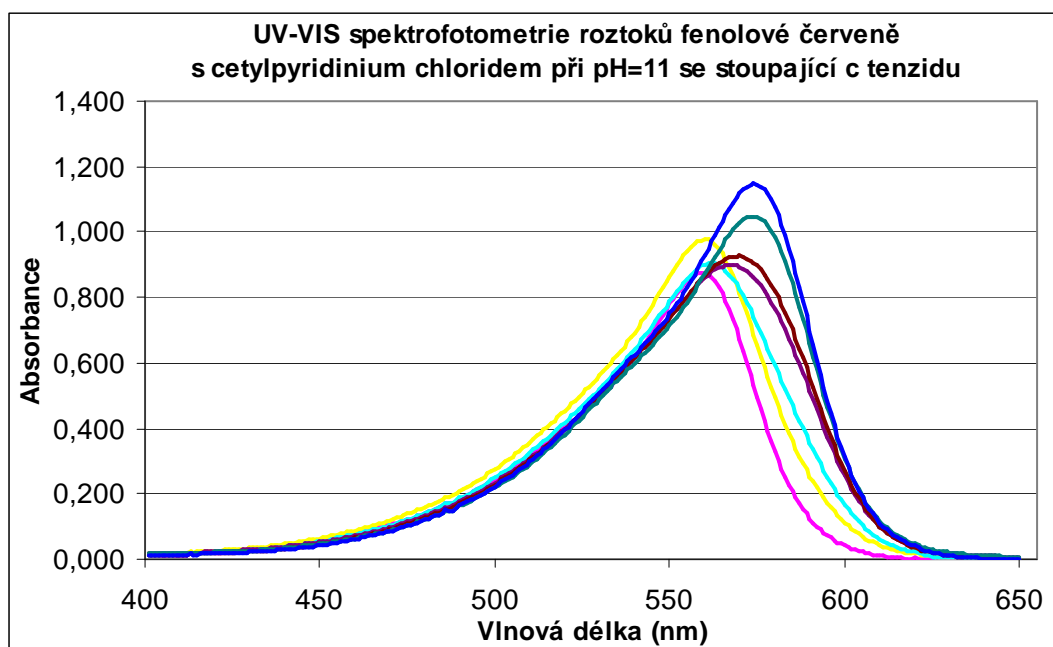
#### 4.1.10. UV-VIS spektrofotometrie u řady se stoupající koncentrací tenzidu a pufrům pH = 11

Měřením na UV-VIS spektrofotometru proti slepému vzorku jsem získala absorpční spektra vzorků obsahujících konstantní koncentraci fenolové červeně  $2 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$  a lišících se koncentrací tenzidu cetylpyridinium chloridu (viz kapitola 3.4.1.8.). Tabulka č.16 vyjadřuje změny absorpčního maxima v závislosti na koncentraci tenzidu. Graf č.13 zobrazuje spektra všech měřených vzorků.

Tabulka č.16: Změny absorpčního maxima roztoků fenolové červeně s cetylpyridinium chloridem naměřené při pH = 11 v závislosti na koncentraci tenzidu

$c_4$ [mol.l <sup>-1</sup> ]	$\lambda_{\max}$ [nm]
$2 \cdot 10^{-5}$	559
$4 \cdot 10^{-5}$	560
$6 \cdot 10^{-5}$	561
$8 \cdot 10^{-5}$	568
$10^{-4}$	570
$2 \cdot 10^{-4}$	574
$3 \cdot 10^{-4}$	574

Graf č.13



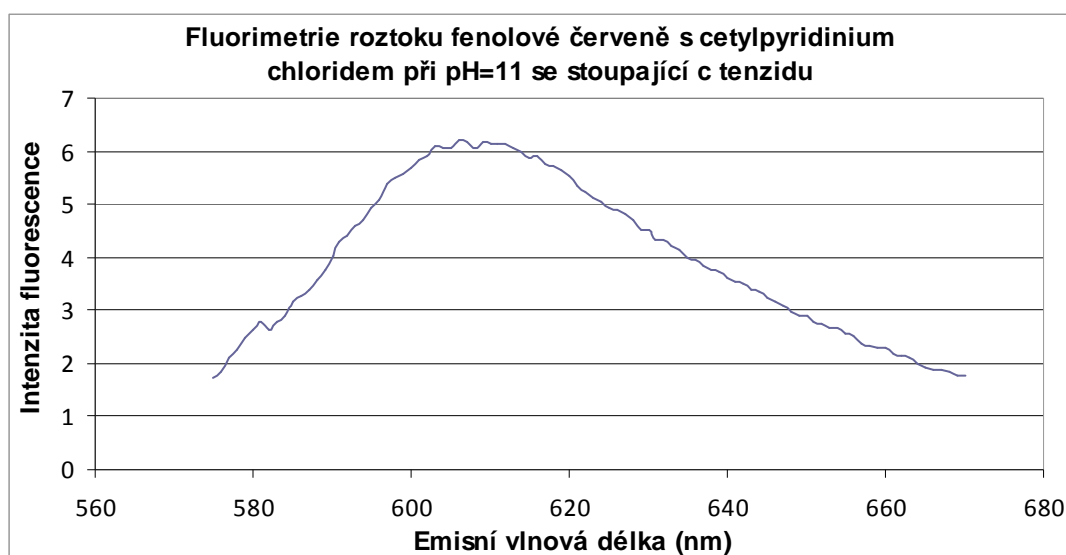
#### 4.1.11. Fluorimetrie u řady se stoupající koncentrací tenzidu a pufrem pH = 11

Fluorimetricky jsem měřila spektra vzorků.(viz kapitola 3.4.1.8.). Citlivost byla nastavena na nejméně koncentrovaný vzorek. Emisní vlnové délky, při nichž byla naměřena maximální fluorescence a intenzity fluorescence jsem uspořádala do tabulky č.17. Graf č.14 znázorňuje emisní fluorescenční spektrum vzorku č.5.

Tabulka č.17: Vlnové délky a intenzity fluorescence roztoků fenolové červeně s cetylpyridinium chloridem naměřené při pH = 11 se stoupající koncentrací tenzidu v emisním maximu

č. vzorku	$\lambda$ [nm]	I
1	592	6,090
2	595	5,654
3	599	5,710
4	607	5,851
5	606	6,228
6	610	6,174
7	611	6,430

Graf č.14

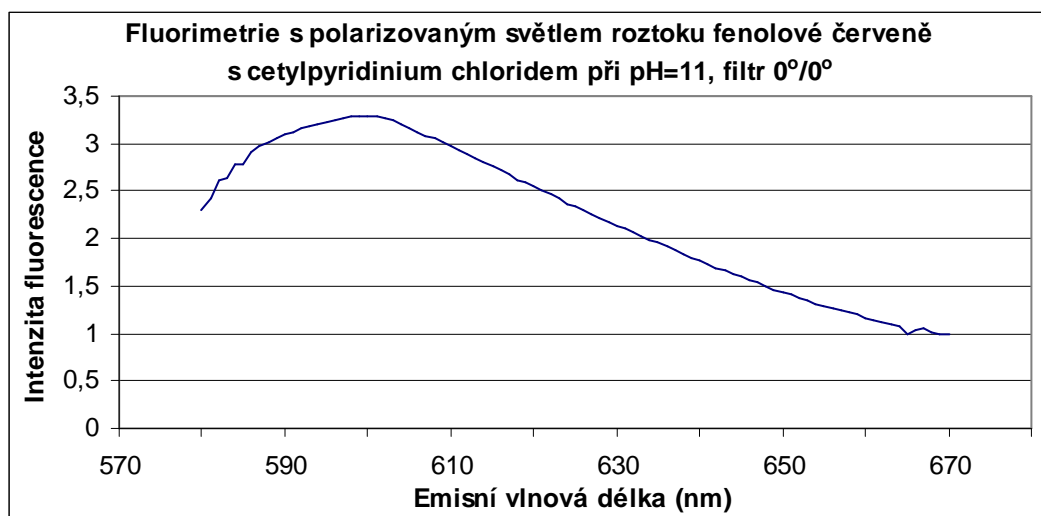


#### 4.1.12. Fluorimetrie s polarizovaným světlem s použitím pufru o pH = 11

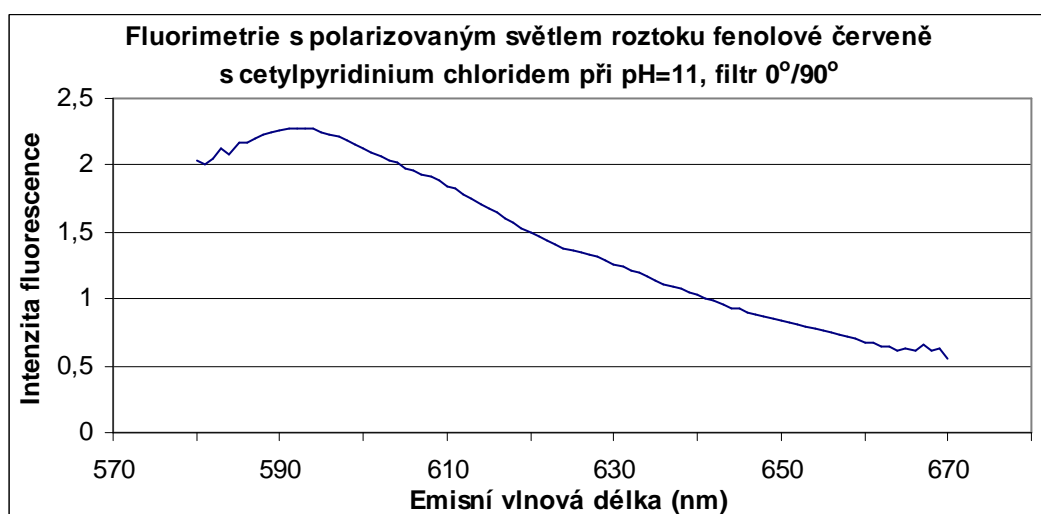
Na spektrofluorimetru jsem měřila vzorky i slepé vzorky s použitím těchto různých filtrů: filtr 0°/0°, filtr 0°/90°, filtr 0°/54,7°, filtr 90°/0°, filtr 90°/90°. Citlivost jsem nastavila na co nejméně koncentrovaný vzorek resp. slepý vzorek. Excitační vlnová délka ( $\lambda_{ex}$ ) 559 nm byla u všech vzorků stejná. Ze spekter jsem odečetla vlnovou délku, při níž byla fluorescence maximální a intenzitu fluorescence v emisním maximu u jednotlivých vzorků a slepých vzorků a hodnoty uspořádala do tabulek podle typu použitého filtru (viz tabulka č.26 na konci kapitoly 4). Z těchto hodnot jsem vypočítala podle vzorců v kapitole 2.3.3.2. anizotropii fluorescence ( $r$ ), korekční faktor ( $G$ ) a hodnotu intenzity fluorescence

v magickém úhlu ( $I_{54,7}$ ). Graf č.15 znázorňuje emisní fluorescenční spektrum vzorku č.3 s použitím filtru  $0^\circ/0^\circ$ , graf č.16 spektrum vzorku č.2 s filtrem  $0^\circ/90^\circ$  a graf č.17 spektrum vzorku č.3 s filtrem  $0^\circ/54,7^\circ$ .

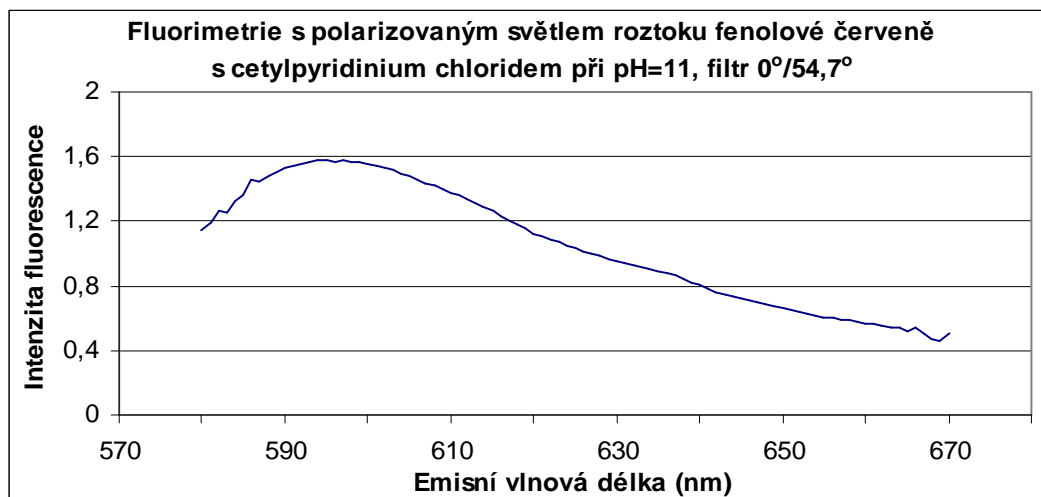
Graf č.15



Graf č.16



Graf č.17



## 4.2. VÝSLEDKY STUDIA INTERAKCÍ FENOLOVÉ ČERVENĚ S CARBETHOPENDECINIUM BROMIDEM

### 4.2.1. Extrakční spektrofotometrie s použitím pufru o pH = 6

Nejprve jsem měřila absorpční maximum jednoho vybraného chloroformového výtřepku roztoku fenolové červeně s carbethopendecinium bromidem proti slepému vzorku a výsledky zpracovala do tabulky č.18. Nejvyšší absorbance byla naměřena při vlnové délce 400 nm. V odborné literatuře (12) bylo uvedeno absorpční maximum při 420 nm, proto jsem další měření prováděla při těchto dvou vlnových délkách

Tabulka č.18: Měření absorpčního maxima chloroformového výtřepku roztoku fenolové červeně s carbethopendecinium bromidem

$\lambda$ [nm]	A
390	0,395
<b>400</b>	<b>0,410</b>
405	0,400
410	0,390
420	0,365
430	0,290

V tabulce č.18 je  $\lambda$  vlnová délka a A je absorbance.

Dále jsem měřila absorbanci všech vzorků proti slepým vzorkům při 400 a 420 nm po deseti, dvaceti a třiceti minutách třepání při pH = 3-12 (viz tabulky č.19, č.20, č.21). Nejvyšší absorbance jsem naměřila u vzorků o pH = 6 s dobou třepání třicet minut. U doby deset minut byly absorbance nejvyšší u pH = 7, po dvaceti a třiceti minutách třepání následuje větší skok v hodnotách absorbancí a zde jsem naměřila maximum u pH = 6. Toto pH budu používat v dalších měřeních a jako doba třepání postačí dvacet minut. Závislost absorbance na pH při 400 nm jsem zpracovala do grafu č. 18.

Tabulka č.19: Měření absorbancí chloroformových výtřepků roztoků fenolové červeně s carbethopendecinium bromidem o pH = 3-12 po deseti minutách třepání při vlnových délkách 400 nm a 420 nm

měření při 400 nm

pH	A
3	0,400
4	0,270
5	0,315
6	0,330
<b>7</b>	<b>0,360</b>
8	0,220
9	0,140
10	0,130
11	0,080
12	0,070

měření při 420 nm

pH	A
3	0,365
4	0,250
5	0,280
6	0,295
<b>7</b>	<b>0,320</b>
8	0,190
9	0,120
10	0,110
11	0,065
12	0,060

Tabulka č.20: Měření absorbancí chloroformových výtřepků roztoků fenolové červeně s carbethopendecinium bromidem o pH = 3-12 po dvaceti minutách třepání při vlnových délkách 400 nm a 420 nm

měření při 400 nm

pH	A
3	0,485
4	0,365
5	0,390
<b>6</b>	<b>0,410</b>
7	0,390
8	0,280
9	0,160
10	0,075
11	0,080
12	0,030

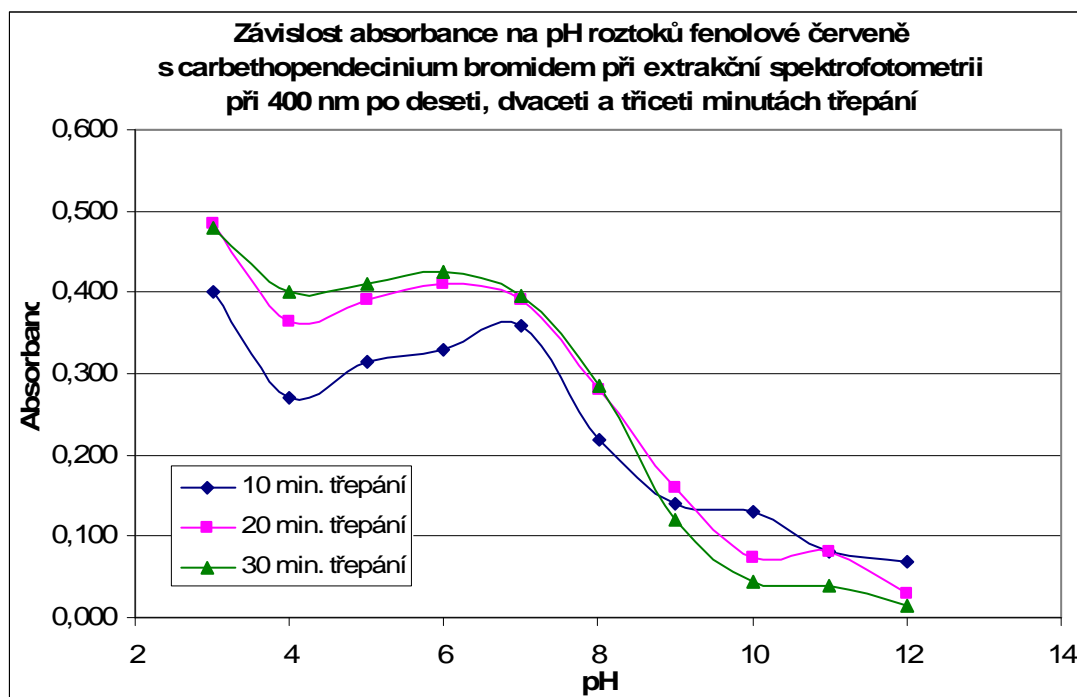
měření při 420 nm

pH	A
3	0,435
4	0,325
5	0,345
<b>6</b>	<b>0,355</b>
7	0,350
8	0,245
9	0,135
10	0,060
11	0,070
12	0,020

Tabulka č.21: Měření absorbancí chloroformových výtřepků roztoků fenolové červeně s carbethopendecinium bromidem o pH = 3-12 po třiceti minutách třepání při vlnových délkách 400 nm a 420 nm

měření při 400 nm		měření při 420 nm	
pH	A	pH	A
3	0,480	3	0,420
4	0,400	4	0,350
5	0,410	5	0,350
<b>6</b>	<b>0,425</b>	<b>6</b>	<b>0,355</b>
7	0,395	7	0,335
8	0,285	8	0,245
9	0,120	9	0,245
10	0,045	10	0,105
11	0,040	11	0,050
12	0,015	12	0,045

Graf č.18



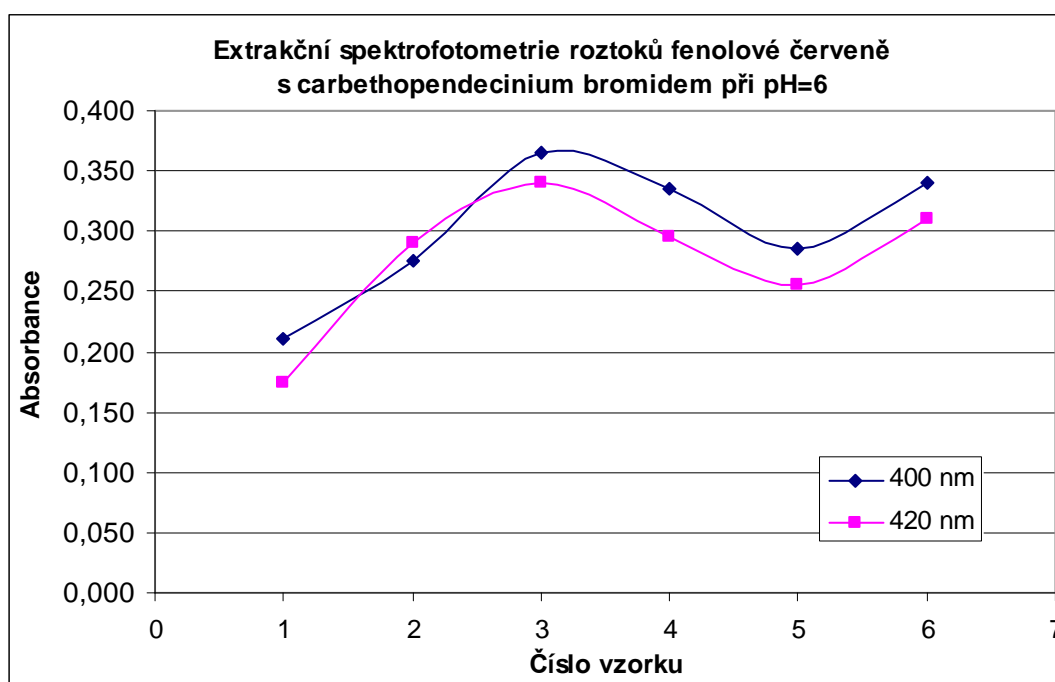
Poté jsem měřila absorbančí chloroformových výtřepků proti slepým vzorkům (viz kapitola 3.4.2.2.) po dvaceti minutách třepání při vlnových délkách 400 a 420 nm (viz tabulka č.22) a hodnoty z této tabulky jsem zpracovala do grafu č.19.



Tabulka č.22: Absorbance chloroformových výtřepků roztoků fenolové červeně s carbethopendecinium bromidem naměřené při pH = 6 po dvaceti minutách třepání při vlnových délkách 400 nm a 420 nm.

měření při 400 nm		měření při 420 nm	
č.vzorku	A	č.vzorku	A
1.	0,210	1.	0,175
2.	0,275	2.	0,290
3.	0,365	3.	0,340
4.	0,335	4.	0,295
5.	0,285	5.	0,255
6.	0,340	6.	0,310

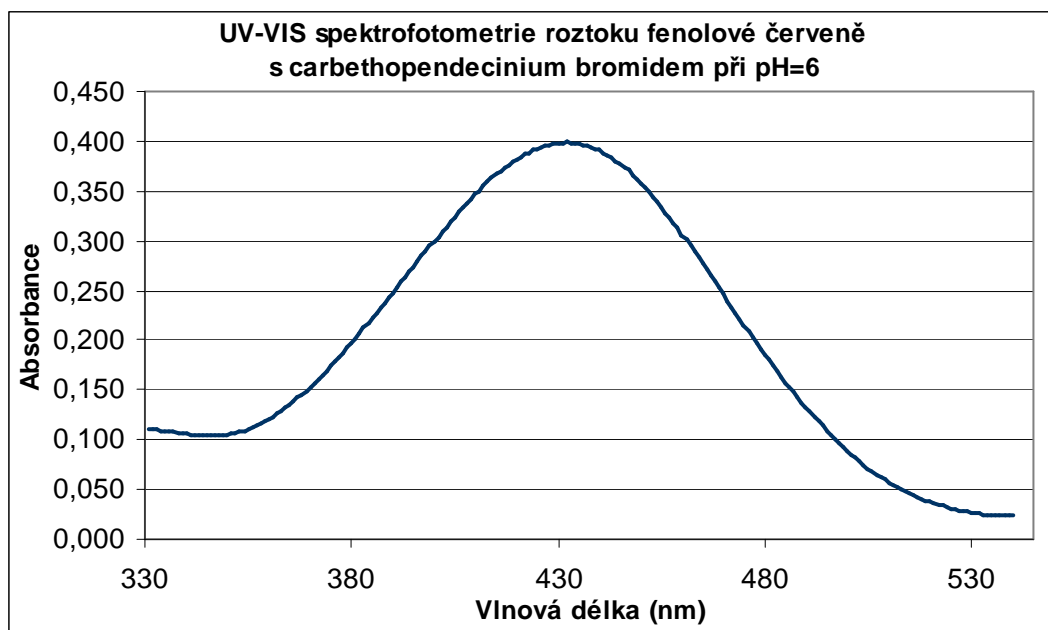
Graf č.19



#### 4.2.2. UV-VIS spektrofotometrie s použitím pufru o pH = 6

Absorpční spektra vzorků, obsahujících konstantní koncentraci tenzidu carbethopendecinium bromidu  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$  a různé koncentrace fenolové červeně, jsem získala z měření na UV-VIS spektrofotometru proti příslušným slepým vzorkům (viz kapitola 3.4.2.3.). Vzorové spektrum znázorňuje graf č.20. Absorpční maximum je 432 nm.

Graf č.20



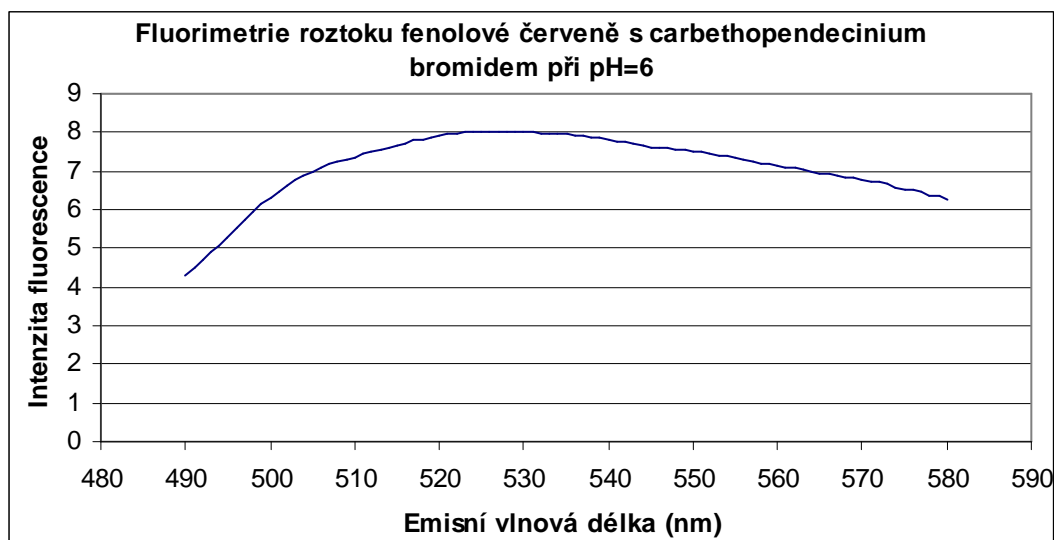
#### 4.2.3. Fluorimetrie s použitím pufru o pH = 6

Na fluorimetru jsem měřila spektra vzorků i slepých vzorků (viz kapitola 3.4.2.3.). Citlivost jsem nastavila na nejméně koncentrovaný vzorek resp. slepý vzorek. Excitační vlnová délka ( $\lambda_{\text{ex}}$ ) 430 nm byla u všech vzorků stejná. Ze spekter jsem odečetla vlnovou délku, při níž byla fluorescence maximální a intenzitu fluorescence v emisním maximu u jednotlivých vzorků a slepých vzorků a uspořádala do tabulky č.23. Graf č.21 znázorňuje emisní fluorescenční spektrum vzorku č.4.

Tabulka č.23: Vlnové délky a intenzity fluorescence vzorků a slepých vzorků roztoků fenolové červeně s carbethopendecinium bromidem naměřené při pH = 6 v emisním maximu

č. vzorku	$\lambda$ [nm]	I	č. slep. vzorku	$\lambda$ [nm]	I
1	505	8,728	-	-	-
2	525	9,059	2	503	8,486
3	528	8,757	3	528	8,665
4	528	8,038	4	530	8,242
5	532	7,236	5	531	7,300
6	533	2,525	6	527	6,286
7	535	0,609	7	531	1,819

Graf č.21



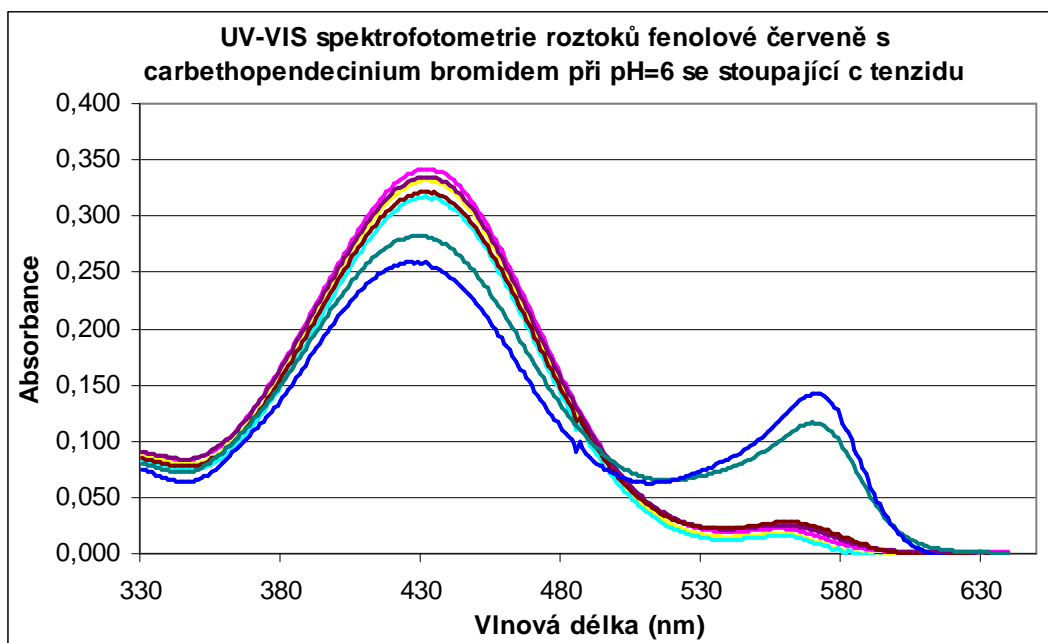
#### 4.2.4. UV-VIS spektrofotometrie u řady se stoupající koncentrací tenzidu a pufrem pH = 6

Měřením na UV-VIS spektrofotometru proti slepému vzorku jsem získala absorpční spektra vzorků obsahujících konstantní koncentraci fenolové červeně  $2 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$  a lišících se koncentrací tenzidu carbethopendecinium bromidu (viz kapitola 3.4.2.4.). Tabulka č.24 vyjadřuje změny absorpčních maxim v závislosti na koncentraci tenzidu. Graf č.22 zobrazuje spektra všech měřených vzorků.

Tabulka č.24: Změny absorpčních maxim roztoků fenolové červeně s carbethopendecinium bromidem naměřené při pH = 6 v závislosti na koncentraci tenzidu

$c_4$ [mol.l <sup>-1</sup> ]	$\lambda_{\text{max1}}$ [nm]	$\lambda_{\text{max2}}$ [nm]
$2 \cdot 10^{-5}$	433	558
$4 \cdot 10^{-5}$	432	559
$6 \cdot 10^{-5}$	432	559
$8 \cdot 10^{-5}$	432	559
$1 \cdot 10^{-4}$	432	561
$2 \cdot 10^{-4}$	431	570
$3 \cdot 10^{-4}$	432	573

Graf č.22



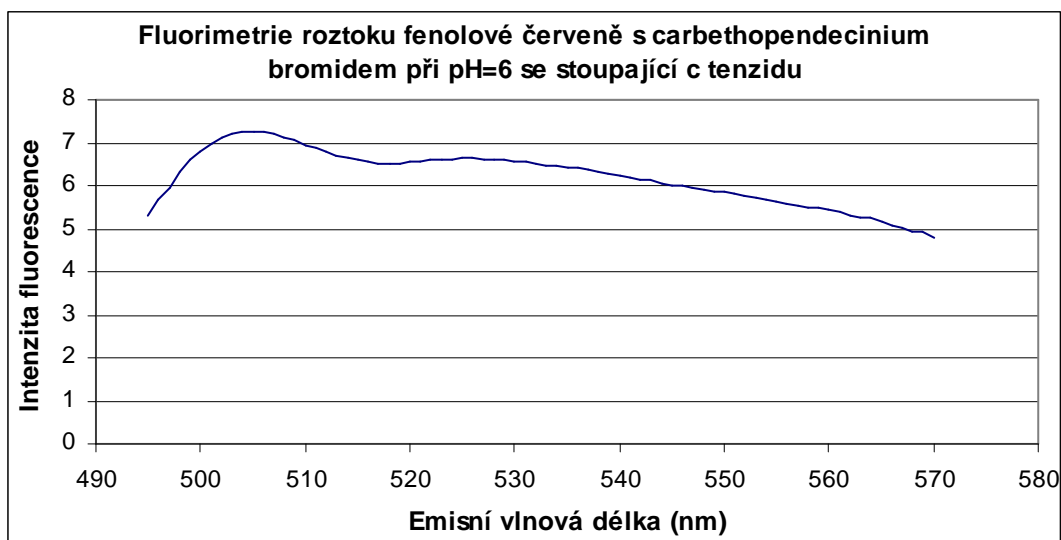
#### 4.2.5. Fluorimetrie u řady se stoupající koncentrací tenzidu a pufrům pH = 6

Fluorimetricky jsem měřila spektra vzorků.(viz kapitola 3.4.2.4.). Citlivost byla nastavena na nejméně koncentrovaný vzorek. Emisní vlnové délky, při nichž byla naměřena maximální fluorescence a intenzity fluorescence jsem uspořádala do tabulky č.25. Graf č.23 znázorňuje emisní fluorescenční spektrum vzorku č.1.

Tabulka č.25: Vlnové délky a intenzity fluorescence roztoků fenolové červeně s carbethopendecinium bromidem naměřené při pH = 6 se stoupající koncentrací tenzidu v emisním maximu

č. vzorku	$\lambda$ [nm]	I
1	505	7,261
2	506	7,211
3	505	7,209
4	506	7,157
5	505	7,129
6	505	6,088
7	503	5,514

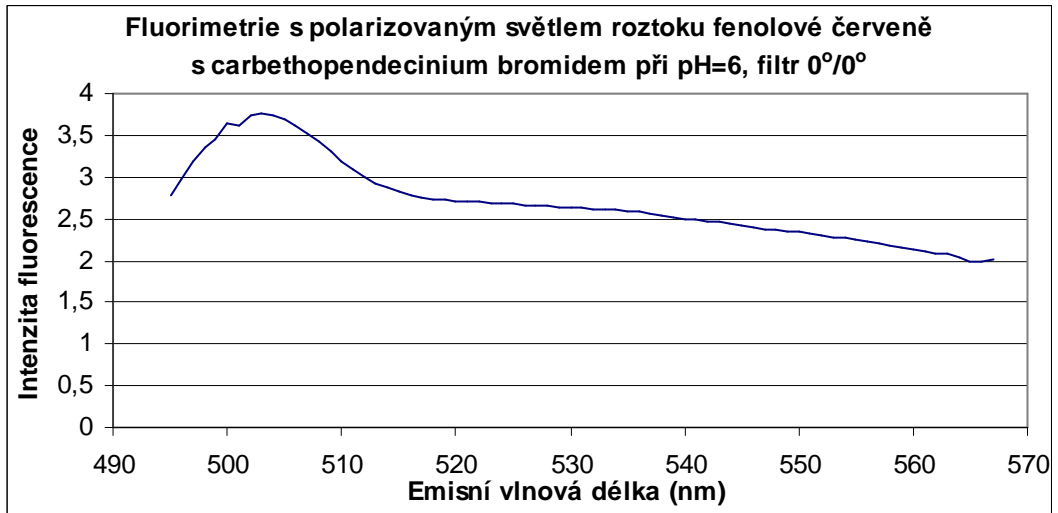
Graf č.23



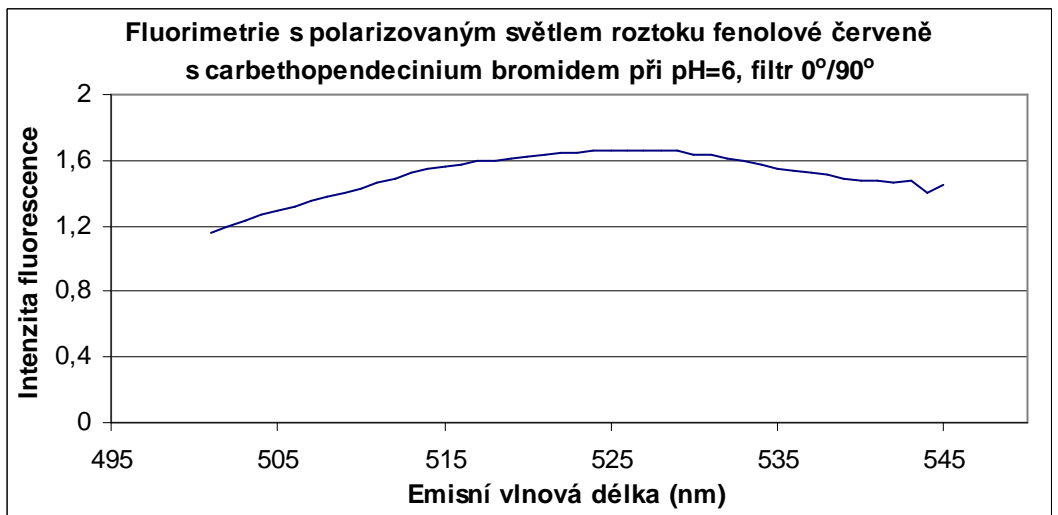
#### 4.2.6. Fluorimetrie s polarizovaným světlem s použitím pufru o pH = 6

Vzorky i slepé vzorky jsem měřila na spektrofluorimetru s použitím těchto různých filtrů: filtr  $0^{\circ}/0^{\circ}$ , filtr  $0^{\circ}/90^{\circ}$ , filtr  $0^{\circ}/54,7^{\circ}$ , filtr  $90^{\circ}/0^{\circ}$ , filtr  $90^{\circ}/90^{\circ}$ . Citlivost jsem nastavila na co nejméně koncentrovaný vzorek resp. slepý vzorek. Excitační vlnová délka ( $\lambda_{ex}$ ) 430 nm byla u všech vzorků stejná. Ze spekter jsem odečetla vlnovou délku, při níž byla fluorescence maximální a intenzitu fluorescence v emisním maximu u jednotlivých vzorků a slepých vzorků a hodnoty uspořádala do tabulek podle typu použitého filtru (viz. tabulka č.27 na konci kapitoly 4). Z těchto hodnot jsem vypočítala podle vzorců v kapitole 2.3.3.2. anizotropii fluorescence ( $r$ ), korekční faktor ( $G$ ) a hodnotu intenzity fluorescence v magickém úhlu ( $I_{54,7}$ ). Graf č.24 znázorňuje emisní fluorescenční spektrum vzorku č.1 s použitím filtru  $0^{\circ}/0^{\circ}$ , graf č.25 spektrum vzorku č.3 s filtrem  $0^{\circ}/90^{\circ}$  a graf č.26 spektrum vzorku č.1 s filtrem  $0^{\circ}/54,7^{\circ}$ .

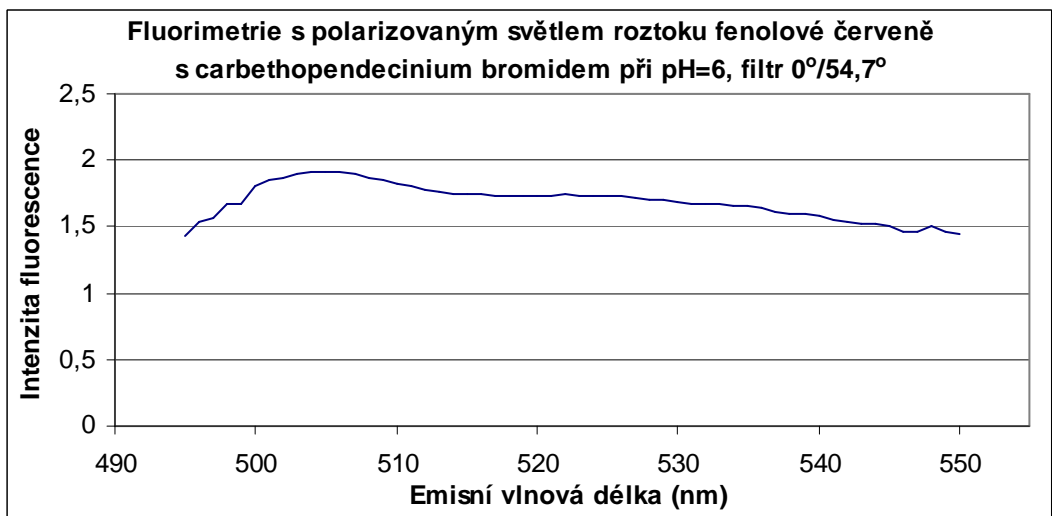
Graf č.24



Graf č.25



Graf č.26



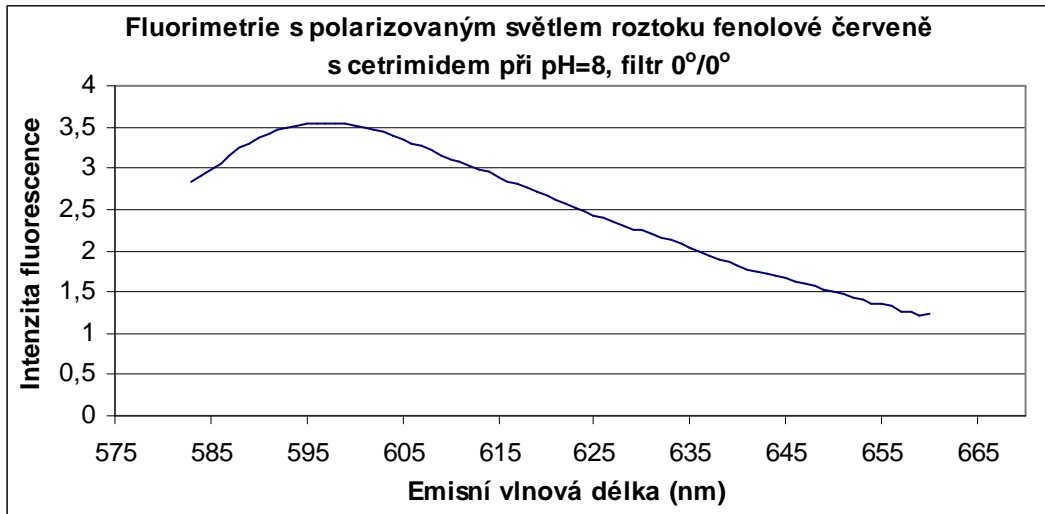
### **4.3. VÝSLEDKY STUDIA INTERAKCÍ FENOLOVÉ ČERVENĚ S CETRIMIDEM**

Výsledky měření interakcí fenolové červeně s tenzidem cetrimidem pomocí extrakční spektrofotometrie, UV-VIS spektrofotometrie a fluorimetrie jsem již popsala ve své diplomové práci (21).

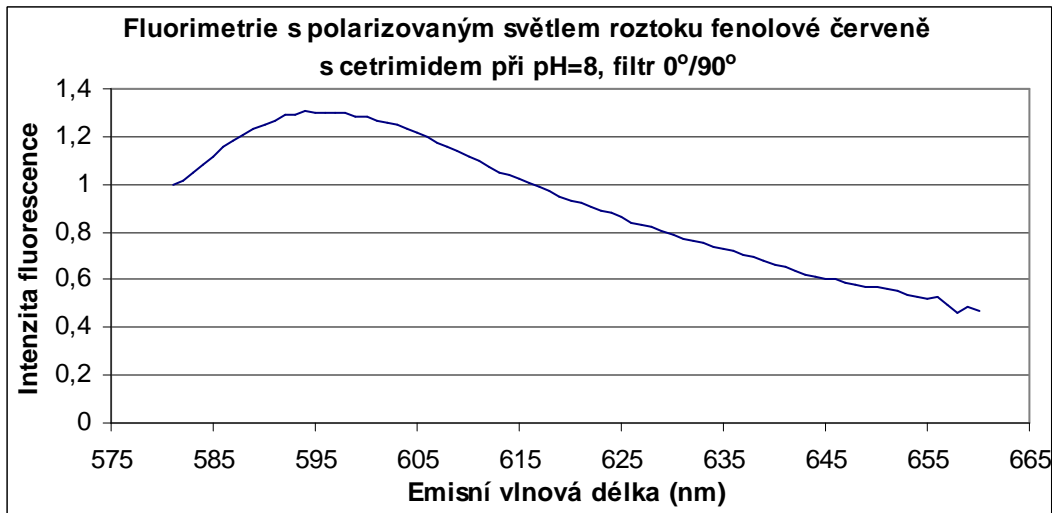
#### **4.3.1. Fluorimetrie s polarizovaným světlem s použitím pufru o pH = 8**

Vzorky i slepé vzorky jsem měřila na spektrofluorimetru s použitím těchto různých filtrů: filtr  $0^{\circ}/0^{\circ}$ , filtr  $0^{\circ}/90^{\circ}$ , filtr  $0^{\circ}/54,7^{\circ}$ , filtr  $90^{\circ}/0^{\circ}$ , filtr  $90^{\circ}/90^{\circ}$ . Citlivost jsem nastavila na co nejméně koncentrovaný vzorek resp. slepý vzorek. Excitační vlnová délka ( $\lambda_{ex}$ ) 560 nm byla u všech vzorků stejná. Ze spekter jsem odečetla vlnovou délku, při níž byla fluorescence maximální a intenzitu fluorescence v emisním maximu u jednotlivých vzorků a slepých vzorků a hodnoty uspořádala do tabulek podle typu použitého filtru (viz tabulka č.28 na konci kapitoly 4). Z těchto hodnot jsem vypočítala podle vzorců v kapitole 2.3.3.2. anizotropii fluorescence ( $r$ ), korekční faktor ( $G$ ) a hodnotu intenzity fluorescence v magickém úhlu ( $I_{54,7}$ ). Graf č.27 znázorňuje emisní fluorescenční spektrum vzorku č.5 s použitím filtru  $0^{\circ}/0^{\circ}$ , graf č.28 spektrum vzorku č.5 s filtrem  $0^{\circ}/90^{\circ}$  a graf č.29 spektrum vzorku č.4 s filtrem  $0^{\circ}/54,7^{\circ}$ .

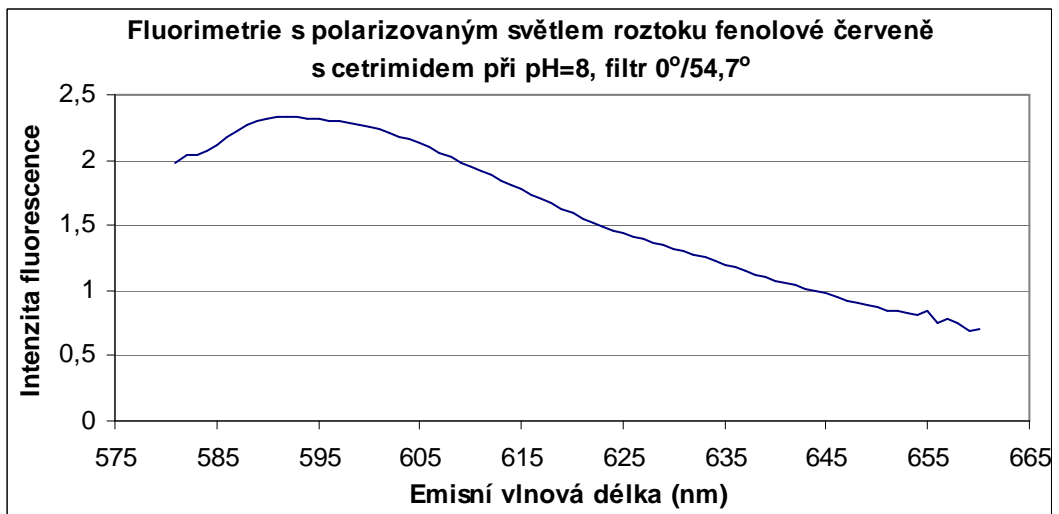
Graf č.27



Graf č.28



Graf č.29





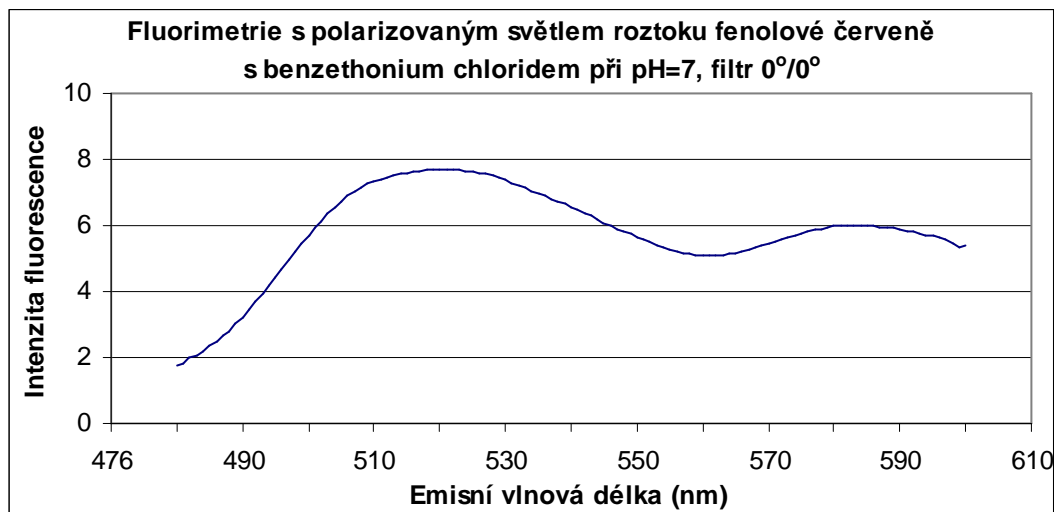
#### 4.4. VÝSLEDKY STUDIA INTERAKCÍ FENOLOVÉ ČERVENĚ S BENZETHONIUM CHLORIDEM

Výsledky měření interakcí fenolové červeně s tenzidem benzethonium chloridem pomocí extrakční spektrofotometrie, UV-VIS spektrofotometrie a fluorimetrie jsem již popsala ve své diplomové práci (21).

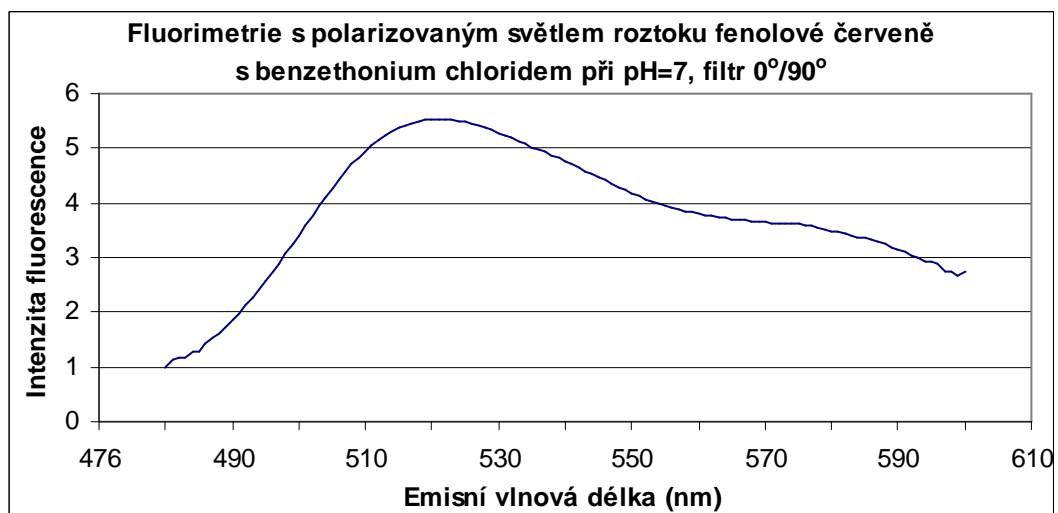
##### 4.4.1. Fluorimetrie s polarizovaným světlem s použitím pufru o pH = 7

Na spektrofluorimetru jsem měřila vzorky i slepé vzorky s použitím těchto různých filtrů: filtr  $0^{\circ}/0^{\circ}$ , filtr  $0^{\circ}/90^{\circ}$ , filtr  $0^{\circ}/54,7^{\circ}$ , filtr  $90^{\circ}/0^{\circ}$ , filtr  $90^{\circ}/90^{\circ}$ . Citlivost jsem nastavila na co nejméně koncentrovaný vzorek resp. slepý vzorek. Excitační vlnová délka ( $\lambda_{ex}$ ) 435 nm byla u všech vzorků stejná. Ze spekter jsem odečetla vlnovou délku, při níž byla fluorescence maximální a intenzitu fluorescence v emisním maximu u jednotlivých vzorků a slepých vzorků a hodnoty uspořádala do tabulek podle typu použitého filtru (viz tabulka č.29 na konci kapitoly 4). Z těchto hodnot jsem vypočítala podle vzorců v kapitole 2.3.3.2. anizotropii fluorescence ( $r$ ), korekční faktor ( $G$ ) a hodnotu intenzity fluorescence v magickém úhlu ( $I_{54,7}$ ). Graf č.30 znázorňuje emisní fluorescenční spektrum vzorku č.4 s použitím filtru  $0^{\circ}/0^{\circ}$ , graf č.31 spektrum vzorku č.2 s filtrem  $0^{\circ}/90^{\circ}$  a graf č.32 spektrum vzorku č.4 s filtrem  $0^{\circ}/54,7^{\circ}$ .

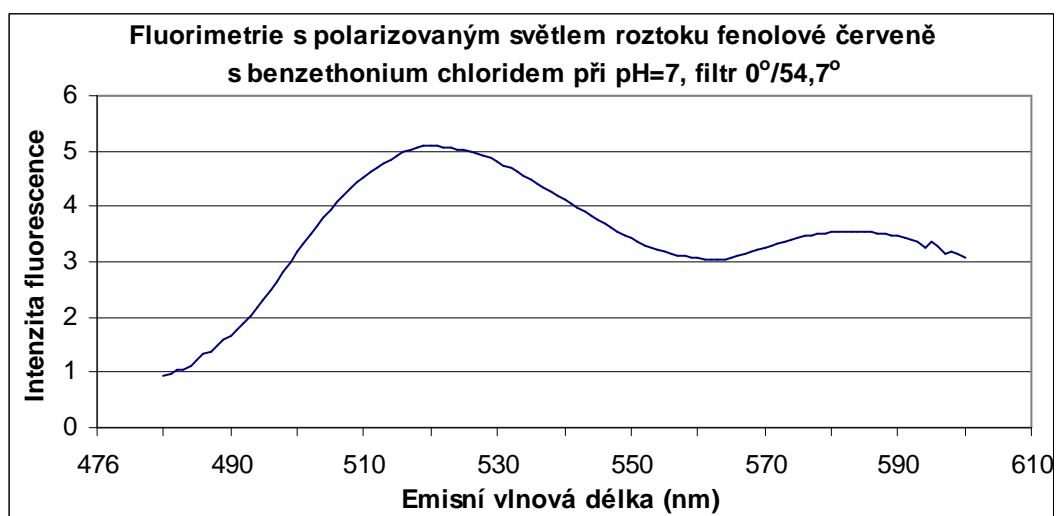
Graf č.30



Graf č.31



Graf č.32



V tabulkách č.26–30 jsou přehledně uvedeny všechny výsledky měření fluorescence s polarizovaným světlem. V těchto tabulkách značí  $r$ –anizotropii fluorescence,  $G$ –korekční faktor a  $I_{54,7}$ –intenzitu fluorescence v magickém úhlu. Části tabulek uprostřed stránek obsahují naměřené hodnoty, vypočítané hodnoty jsou uvedeny v krajních částech.

Tabulka č.26: Přehled výsledků měření fluorescence s polarizovaným světlem pro roztoky obsahující tenzid cetylpyridinium chlorid při pH = 6.

FILTR 0°/0°			FILTR 0°/0°		
č. vzorku	$\lambda$ [nm]	I	č. slep. vzorku	$\lambda$ [nm]	I
1	506	9,569	-	-	-
2	517	9,817	2	508	9,662
3	523	9,709	3	517	9,828
4	523	9,199	4	520	9,689
5	526	8,333	5	528	8,733
6	526	4,302	6	526	8,329
7	530	1,718	7	528	3,710

FILTR 0°/90°			FILTR 0°/90°		
č. vzorku	$\lambda$ [nm]	I	č. slep. vzorku	$\lambda$ [nm]	I
1	520	6,267	-	-	-
2	527	7,100	2	519	6,387
3	524	6,907	3	519	7,164
4	523	6,250	4	522	6,955
5	521	5,450	5	524	5,844
6	524	2,302	6	521	5,498
7	533	0,723	7	525	2,105

FILTR 0°/54,7°			FILTR 0°/54,7°		
č. vzorku	$\lambda$ [nm]	I	č. slep. vzorku	$\lambda$ [nm]	I
1	511	7,191	-	-	-
2	524	7,919	2	517	7,259
3	522	7,760	3	525	8,069
4	521	7,058	4	524	7,778
5	529	6,112	5	525	6,604
6	524	2,726	6	527	6,180
7	529	0,938	7	532	2,518

Výpočet ze vzorků		Výpočet ze slepých vzorků	
$I_{54,7}$		$I_{54,7}$	
7,367		-	
8,005		7,479	
7,841		8,052	
7,233		7,866	
6,411		6,807	
2,969		6,442	
1,055		2,640	

FILTR 90°/0°			FILTR 90°/0°		
č. vzorku	$\lambda$ [nm]	I	č. slep. vzorku	$\lambda$ [nm]	I
1	516	6,608	-	-	-
2	521	7,518	2	517	6,768
3	523	7,359	3	521	7,668
4	526	6,635	4	524	7,521
5	527	5,886	5	526	6,262
6	531	2,404	6	525	5,899
7	531	0,736	7	531	2,339

Výpočet ze vzorků		Výpočet ze slepých vzorků	
G	r	G	r
0,781	0,241	-	-
0,785	0,203	0,786	0,236
0,774	0,214	0,783	0,200
0,785	0,226	0,772	0,211
0,752	0,256	0,767	0,240
0,715	0,350	0,759	0,249
0,851	0,374	0,695	0,338

FILTR 90°/90°			FILTR 90°/90°		
č. vzorku	$\lambda$ [nm]	I	č. slep. vzorku	$\lambda$ [nm]	I
1	522	5,161	-	-	-
2	523	5,898	2	522	5,319
3	523	5,699	3	524	6,006
4	525	5,210	4	525	5,809
5	526	4,428	5	519	4,802
6	531	1,719	6	524	4,480
7	540	0,627	7	531	1,627

Tabulka č.27: Přehled výsledků měření fluorescence s polarizovaným světlem pro roztoky obsahující tenzid cetylpyridinium chlorid při pH = 11.

FILTR 0°/0°			FILTR 0°/0°		
č. vzorku	$\lambda$ [nm]	I	č. slep. vzorku	$\lambda$ [nm]	I
1	584	7,918	-	-	-
2	592	5,755	2	587	7,915
3	600	3,287	3	591	5,814
4	602	1,936	4	596	3,449
5	603	1,311	5	600	2,065
6	610	0,941	6	599	1,241
7	621	0,975	7	610	0,493

FILTR 0°/90°			FILTR 0°/90°		
č. vzorku	$\lambda$ [nm]	I	č. slep. vzorku	$\lambda$ [nm]	I
1	584	3,479	-	-	-
2	589	2,278	2	584	3,541
3	599	1,271	3	588	2,389
4	595	0,732	4	596	1,305
5	606	0,508	5	598	0,784
6	605	0,320	6	602	0,522
7	608	0,349	7	615	0,291

Výpočet ze vzorků

$I_{54,7}$
4,959
3,437
1,943
1,133
0,775
0,527
0,558

FILTR 0°/54,7°			FILTR 0°/54,7°		
č. vzorku	$\lambda$ [nm]	I	č. slep. vzorku	$\lambda$ [nm]	I
1	587	4,431	-	-	-
2	591	2,988	2	587	4,494
3	599	1,576	3	595	3,046
4	597	0,935	4	594	1,691
5	601	0,615	5	597	1,017
6	611	0,393	6	602	0,602
7	612	0,461	7	608	0,339

Výpočet ze slepých vzorků

$I_{54,7}$
-
4,999
3,530
2,020
1,211
0,761
0,358

FILTR 90°/0°			FILTR 90°/0°		
č. vzorku	$\lambda$ [nm]	I	č. slep. vzorku	$\lambda$ [nm]	I
1	584	2,930	-	-	-
2	591	1,928	2	589	2,994
3	601	1,058	3	595	1,967
4	595	0,652	4	595	1,095
5	599	0,463	5	606	0,706
6	603	0,299	6	602	0,472
7	619	0,307	7	608	0,307

Výpočet ze vzorků

G	r
0,676	0,441
0,667	0,482
0,695	0,476
0,722	0,471
0,821	0,417
0,965	0,405
1,012	0,370

FILTR 90°/0°			FILTR 90°/90°		
č. vzorku	$\lambda$ [nm]	I	č. slep. vzorku	$\lambda$ [nm]	I
1	584	1,981	-	-	-
2	593	1,286	2	582	1,985
3	598	0,735	3	587	1,312
4	600	0,471	4	597	0,777
5	599	0,380	5	601	0,522
6	618	0,289	6	598	0,387
7	617	0,311	7	616	0,280

Výpočet ze slepých vzorků

G	r
-	-
0,663	0,442
0,667	0,469
0,710	0,476
0,740	0,460
0,821	0,388
0,914	0,222

Tabulka č.28: Přehled výsledků měření fluorescence s polarizovaným světlem pro roztoky obsahující tenzid carbethopendecinium bromid při pH = 6

FILTR 0°/0°			FILTR 0°/0°		
č. vzorku	$\lambda$ [nm]	I	č. slep. vzorku	$\lambda$ [nm]	I
1	503	3,753	-	-	-
2	506	3,629	2	503	3,480
3	526	3,050	3	506	3,274
4	524	2,572	4	527	2,797
5	527	2,161	5	525	2,323
6	528	0,670	6	524	1,891
7	525	0,271	7	535	0,513

FILTR 0°/90°			FILTR 0°/90°		
č. vzorku	$\lambda$ [nm]	I	č. slep. vzorku	$\lambda$ [nm]	I
1	526	1,545	-	-	-
2	519	1,828	2	524	1,501
3	525	1,664	3	528	1,705
4	525	1,420	4	525	1,562
5	523	1,166	5	529	1,299
6	526	0,427	6	525	1,052
7	526	0,208	7	534	0,338

Výpočet ze vzorků

$I_{54,7}$
2,281
2,428
2,126
1,804
1,498
0,508
0,229

FILTR 0°/54,7°			FILTR 0°/54,7°		
č. vzorku	$\lambda$ [nm]	I	č. slep. vzorku	$\lambda$ [nm]	I
1	505	1,917	-	-	-
2	527	2,175	2	505	1,869
3	525	1,978	3	520	2,036
4	527	1,629	4	530	1,856
5	527	1,402	5	530	1,526
6	527	0,444	6	527	1,251
7	523	0,227	7	530	0,392

Výpočet ze slepých vzorků

$I_{54,7}$
-
2,161
2,228
1,973
1,641
1,332
0,396

FILTR 90°/0°			FILTR 90°/0°		
č. vzorku	$\lambda$ [nm]	I	č. slep. vzorku	$\lambda$ [nm]	I
1	507	1,698	-	-	-
2	525	2,028	2	506	1,718
3	529	1,888	3	527	1,909
4	526	1,542	4	533	1,719
5	524	1,261	5	523	1,407
6	527	0,395	6	527	1,184
7	540	0,208	7	525	0,380

Výpočet ze vzorků

G	r
0,677	0,463
0,680	0,390
0,676	0,363
0,687	0,353
0,705	0,352
0,803	0,241
0,965	0,105

FILTR 90°/90°			FILTR 90°/90°		
č. vzorku	$\lambda$ [nm]	I	č. slep. vzorku	$\lambda$ [nm]	I
1	519	1,149	-	-	-
2	527	1,379	2	525	1,165
3	527	1,276	3	525	1,365
4	523	1,059	4	525	1,269
5	525	0,889	5	529	1,068
6	529	0,317	6	523	0,847
7	547	0,200	7	543	0,333

Výpočet ze slepých vzorků

G	r
-	-
0,678	0,446
0,715	0,360
0,738	0,322
0,759	0,311
0,715	0,335
0,877	0,196

Tabulka č.29: Přehled výsledků měření fluorescence s polarizovaným světlem pro roztoky obsahující tenzid cetrimid při pH = 8.

FILTR 0°/0°			FILTR 0°/0°		
č. vzorku	$\lambda$ [nm]	I	č. slep. vzorku	$\lambda$ [nm]	I
1	585	8,089	-	-	-
2	587	7,729	2	583	8,229
3	589	6,117	3	586	7,613
4	592	4,736	4	593	6,093
5	596	3,548	5	592	4,769
6	606	1,093	6	602	3,340
7	614	0,691	7	602	0,830

FILTR 0°/90°			FILTR 0°/90°		
č. vzorku	$\lambda$ [nm]	I	č. slep. vzorku	$\lambda$ [nm]	I
1	584	3,801	-	-	-
2	588	3,484	2	581	3,794
3	591	2,568	3	586	3,433
4	589	1,849	4	588	2,569
5	598	1,304	5	595	1,974
6	599	0,440	6	595	1,267
7	634	0,315	7	595	0,428

Výpočet ze vzorků

$I_{54,7}$
5,231
4,899
3,751
2,811
2,052
0,658
0,440

FILTR 0°/54,7°			FILTR 0°/54,7°		
č. vzorku	$\lambda$ [nm]	I	č. slep. vzorku	$\lambda$ [nm]	I
1	583	4,810	-	-	-
2	587	4,464	2	586	4,679
3	590	3,264	3	590	4,429
4	591	2,329	4	590	3,346
5	595	1,738	5	592	2,513
6	609	0,530	6	597	1,605
7	605	0,392	7	602	0,489

Výpočet ze slepých vzorků

$I_{54,7}$
-
5,272
4,826
3,744
2,906
1,958
0,562

FILTR 90°/0°			FILTR 90°/0°		
č. vzorku	$\lambda$ [nm]	I	č. slep. vzorku	$\lambda$ [nm]	I
1	582	3,221	-	-	-
2	589	2,979	2	586	3,235
3	593	2,166	3	590	3,006
4	590	1,547	4	591	2,282
5	597	1,169	5	596	1,664
6	606	0,394	6	597	1,143
7	619	0,316	7	600	0,438

Výpočet ze vzorků

G	r
0,672	0,419
0,661	0,440
0,658	0,466
0,710	0,465
0,692	0,494
0,859	0,387
0,923	0,315

FILTR 90°/90°			FILTR 90°/90°		
č. vzorku	$\lambda$ [nm]	I	č. slep. vzorku	$\lambda$ [nm]	I
1	582	2,163	-	-	-
2	590	1,969	2	580	2,194
3	590	1,425	3	585	1,999
4	591	1,098	4	588	1,479
5	590	0,809	5	592	1,139
6	609	0,338	6	594	0,764
7	615	0,292	7	596	0,357

Výpočet ze slepých vzorků

G	r
-	-
0,678	0,423
0,665	0,438
0,648	0,470
0,685	0,457
0,669	0,495
0,815	0,315

Tabulka č.30: Přehled výsledků měření fluorescence s polarizovaným světlem pro roztoky obsahující tenzid benzethonium chlorid při pH = 7.

FILTR 0°/0°			FILTR 0°/0°		
č. vzorku	$\lambda$ [nm]	I	č. slep. vzorku	$\lambda$ [nm]	I
1	513	9,027	-	-	-
2	516	9,308	2	513	8,841
3	518	8,743	3	518	9,235
4	521	7,712	4	523	8,429
5	523	6,271	5	519	7,389
6	519	1,576	6	520	6,011
7	519	0,395	7	522	1,489

FILTR 0°/90°			FILTR 0°/90°		
č. vzorku	$\lambda$ [nm]	I	č. slep. vzorku	$\lambda$ [nm]	I
1	521	4,875	-	-	-
2	521	5,535	2	520	4,569
3	523	5,088	3	523	5,390
4	522	4,227	4	524	4,756
5	523	3,231	5	522	3,989
6	526	0,760	6	524	3,068
7	522	0,269	7	519	0,758

Výpočet ze vzorků

$I_{54,7}$
6,259
6,793
6,306
5,389
4,244
1,032
0,311

FILTR 0°/54,7°			FILTR 0°/54,7°		
č. vzorku	$\lambda$ [nm]	I	č. slep. vzorku	$\lambda$ [nm]	I
1	518	6,027	-	-	-
2	519	6,659	2	517	5,735
3	521	6,042	3	522	6,508
4	521	5,082	4	520	5,697
5	522	3,994	5	523	4,758
6	522	0,945	6	517	3,697
7	518	0,278	7	519	0,870

Výpočet ze slepých vzorků

$I_{54,7}$
-
5,993
6,672
5,980
5,122
4,049
1,002

FILTR 90°/0°			FILTR 90°/0°		
č. vzorku	$\lambda$ [nm]	I	č. slep. vzorku	$\lambda$ [nm]	I
1	521	5,212	-	-	-
2	521	6,014	2	521	5,015
3	522	5,545	3	519	5,854
4	522	4,637	4	523	5,265
5	521	3,521	5	523	4,363
6	522	0,868	6	523	3,340
7	523	0,262	7	521	0,793

Výpočet ze vzorků

G	r
0,679	0,365
0,697	0,320
0,674	0,341
0,664	0,368
0,681	0,382
0,667	0,413
0,798	0,219

FILTR 90°/90°			FILTR 90°/90°		
č. vzorku	$\lambda$ [nm]	I	č. slep. vzorku	$\lambda$ [nm]	I
1	519	3,540	-	-	-
2	519	4,191	2	523	3,342
3	523	3,737	3	522	3,985
4	517	3,077	4	523	3,511
5	522	2,397	5	518	2,887
6	522	0,579	6	524	2,178
7	514	0,209	7	517	0,547

Výpočet ze slepých vzorků

G	r
-	-
0,666	0,388
0,681	0,336
0,667	0,356
0,662	0,375
0,652	0,401
0,690	0,381

## **5. DISKUZE**



## 5.1. INTERAKCE FENOLOVÉ ČERVENĚ S CETYLPYRIDINIUM CHLORIDEM

Pokusy provedené extrakční spektrofotometrií s roztoky obsahujícími cetylpyridinium chlorid a fenolovou červeně ukázaly absorpční maxima při pH=6 a pH=11. Existence dvou maxim na A-pH křivce není jevem běžným, ale spíše výjimečným. Literatura (12) uvádí, že funkční oblast (přechodový interval) fenolové červeně ve vodném roztoku je při 20 °C 6,4 – 8,2. To znamená, že první maximum se nachází těsně pod touto oblastí, druhé maximum vysoko nad touto oblastí. Přitom je ovšem třeba mít na paměti možnost ovlivnění pK, a následně funkční oblasti, tenzidem přítomným v roztoku. Je ale možné předpokládat, že interakce tenzid-barvivo se budou při obou hodnotách lišit. Při nižší hodnotě (pH = 6) totiž nebude fenolová červeně disociována a mezi molekulami budou při vzniku asociátů převládat spíše hydrofobní nebo  $\pi$ - $\pi$  interakce. Při vyšší hodnotě (pH = 11) naopak bude prvotním typem interakce tvorba iontového páru. Třetí maximum se na A-pH křivce objevuje ještě při pH=9. Vzhledem k tomu, že jde o maximum velmi nevýrazné, nebyly při pH=9 žádné další experimenty prováděny. Dále byla měřena závislost absorbance chloroformových výtřepků na přebytku fenolové červeně ve vodné fázi. Zde je zajímavé porovnání těchto závislostí při pH=6 (graf č. 2) a pH=11 (graf č. 10). Při pH=6 nacházíme jasné maximum u třetího roztoku a nevýrazné maximum u roztoku pátého. Při pH=11 je absorbance u roztoků č. 2 a č. 3 prakticky stejná a podobně je tomu u roztoků č. 4 a č. 5, ale u roztoků č. 4 a č. 5 je absorbance vyšší. Křivky na grafech 2 a 10 pak vypadají jako zrcadlové obrazy, pokud je osou souměrnosti svislice mezi roztoky č. 3 a č. 4. Z toho je možné soudit, že množství (koncentrace) asociátů vytřepatelných do chloroformu závisí na tom, zda v roztoku díky hodnotě pH převládají iontové nebo neiontové interakce. Na základě pokusů s extrakční spektrofotometrií ovšem nelze říci, zda se asociáty, které způsobují maxima na obou křivkách (graf č. 2 a graf č. 10), svým složením shodují. Pokud je správný předpoklad, že do chloroformu lze vytřepat pouze iontový pár (14), znamená to, že koncentrace vzniklých iontových párů závisí na několika faktorech, z nichž jeden, a sice poměr množství činidla (barviva) a analytu (tenzidu), zcela vylučuje použití zkumavkové metody při extrakční spektrofotometrii tenzidů. Navíc může mít tato skutečnost velmi významné dopady na správnost výsledků pokusů s polymery, proteiny a lipidovými membránami, kde se předpokládá jednoduchý stechiometrický poměr, v dalších oborech (15, 16). Na druhou stranu se lze na základě výsledků pokusů při pH=6 domnívat, že mohou vznikat rovněž vytřepatelné asociáty jiného složení, než odpovídá iontovému páru. To na předchozích pochybnostech o správnosti výsledků některých experimentů nic nemění, pouze je třeba tuto domněnku vzít v úvahu při snahách o vysvětlení hypochromního posunu při pokusech provedených zkumavkovou metodou extrakční spektrofotometrie.

UV-VIS absorpční spektrofotometrie roztoků, v nichž stoupá koncentrace barviva, nepřinesla žádné výsledky, neboť v těchto spektrech nebyly zaznamenány žádné posuny. To ještě neznamená, že se struktura částic ve studovaných roztocích nemění, ale zřejmě není touto metodou zjistitelná. Řečené se ovšem netýká výsledků UV-VIS absorpční spektrofotometrie roztoků, v nichž stoupá koncentrace tenzidu. Při obou sledovaných hodnotách pH (6 a 11) byly zaznamenány zajímavé jevy. V případě pH = 6 (graf č.5) se objevuje obrazec tvořený absorpčními křivkami, který připomíná obrazec, jaký bývá zjištěn při měření indikátorové konstanty spektrofotometricky. To je jen potvrzením faktu (12), že koncentrace tenzidu může mít na míru disociace barviva, tedy i na absorpční křivky barviva, kvalitativně stejný vliv jako změna pH. Při hodnotě pH = 11 je ovšem situace jiná. Při takto vysokém pH je oprávněné předpokládat, že barvivo je zcela disociováno, proto je vliv měnící se koncentrace tenzidu na absorpční křivky barviva odlišný (graf č. 13). Se stoupající koncentrací tenzidu je zřejmý bathochromní posun, který svědčí o schopnosti barviva, přesněji řečeno vzniklého agregátu, absorbovat záření o nižší energii. Tento jev by bylo možné vysvětlit konjugací dvojných vazeb ve vznikajícím agregátu barviva, což by předpokládalo vznik jakýchsi dimerů barviva (přesněji dimerů iontových párů barviva s tenzidem), obklopených částicemi tenzidu. S postupně stoupající koncentrací tenzidu je tato konjugace výraznější až k určité mezi, která je dána limitním počtem molekul tenzidu, které se mohou tvorby takového agregátu zúčastnit. Tomu nasvědčují i hodnoty obsažené v Tab. 16, podle kterých je zmíněného limitního počtu molekul tenzidu v agregátu dosaženo při jeho koncentraci v roztoku  $2 \cdot 10^{-4}$  mol/l.

Výsledky získané měřením fluorescence ve studovaných roztocích odpovídají výsledkům UV-VIS absorpční spektrofotometrie, avšak v některých případech přinášejí některé zajímavé hodnoty. Při pH = 6 v řadě se stoupající koncentrací barviva lze pozorovat jednak bathochromní posun emisní vlnové délky (při konstantní excitační vlnové délce), jednak prudký pokles intenzity fluorescence u dvou nejkonzentrovanejších vzorků (Tab. 11). Nelze říci, zda je zmíněný pokles intenzity fluorescence způsoben vysokou koncentrací barviva v těchto vzorcích, tedy působením vnitřního filtru, nebo nějakým agregačním jevem. Ovšem zvyšování emisní vlnové délky svědčí o změnách ve struktuře roztoku. Tyto změny ovlivňují elektronové energetické hladiny fluoroforů, proto se můžeme domnívat, že jde o určitou formu agregace. U řady se stoupající koncentrací tenzidu (Tab. 13) lze pozorovat změnu vlnové délky emisního maxima (hypsochromní posun) a postupný pokles intenzity fluorescence (hypochromní posun) se stoupající koncentrací tenzidu. Vzhledem k tomu, že koncentrace barviva, tedy fluoroforu, byla ve všech roztocích stejná, nelze zde uvažovat o snížení intenzity fluorescence vlivem vnitřního filtru. Oba posuny v emisním spektru (hypsochromní i hypochromní) proto patrně svědčí o agregaci. Je ovšem třeba poznamenat, že v případě řady se stoupající koncentrací barviva bude zřejmě složení vzniklých agregátů odlišné od složení agregátů u řady se stoupající koncentrací tenzidu. V této souvislosti se jeví logickým, že v řadě se

stoupající koncentrací barviva dochází k bathochromnímu posunu, zatímco v řadě se stoupající koncentrací tenzidu k posunu hypsochromnímu. Z obou těchto faktů vyplývá, že stoupající poměr koncentrací tenzid/barvivo vede ke snižování emisní vlnové délky. Výsledky fluorescenčních měření při  $\text{pH} = 11$  lze opět interpretovat jako hodnoty, které potvrzují závěry učiněné na základě naměřených UV-VIS spekter. Porovnáním hodnot v Tab. 15 a v Tab. 17 vidíme, že v případě řady se stoupající koncentrací barviva dochází k poklesu intenzity fluorescence, zatímco v případě řady se stoupající koncentrací tenzidu osciluje intenzita fluorescence kolem nějaké střední hodnoty. Z toho je možné usuzovat na významný vliv vnitřního filtru v měřených roztocích, ale nelze říci, zda za pokles intenzity fluorescence je zodpovědný pouze tento filtr sám nebo jde o spolupůsobení s jiným faktorem. Naproti tomu posuny emisních maxim patrné z obou tabulek lze interpretovat jako výsledek agregace. Vzhledem k tomu, že na rozdíl od situace v roztocích při  $\text{pH} = 6$  jde v obou případech o posuny bathochromní, lze předpokládat, že při agregaci patrně hrají významnou roli  $\pi$ - $\pi$  interakce a může docházet ke konjugaci násobných vazeb.

## 5.2. INTERAKCE FENOLOVÉ ČERVENĚ S CARBETHOPENDECINIUM BROMIDEM

Extrakční spektrofotometrií byly získány nejvyšší absorbance při  $\text{pH} = 6$ . Proto byly všechny experimenty s tímto barvivem prováděny při  $\text{pH} = 6$ . Stejně jako v případě roztoků fenolové červeně s cetylpyridinium chloridem bude proto i zde nutné brát v potaz různé typy možných interakcí, neboť při  $\text{pH} = 6$  patrně není fenolová červeně zcela disociována. Průběh závislosti na grafu č. 19 vykazuje zajímavou anomálii, kterou je vzestup absorbance chloroformového výtřepku při nejvyšší koncentraci. Je možné, že při této koncentraci dochází k dalšímu shlukování nedisociovaných částic barviva do útvarů, které mohou přecházet do chloroformu. Nelze ovšem říci, zda takto vzniklé agregáty obsahují částice tenzidu nebo ne.

Výsledky UV-VIS absorpční spektrofotometrie jsou v tomto případě v obecných rysech velmi podobné výsledkům získaným touto metodou u roztoků s cetylpyridinium chloridem. U řady se stoupající koncentrací barviva nebyly zjištěny žádné změny spekter v závislosti na koncentraci barviva, zatímco u řady se stoupající koncentrací tenzidu se opět objevil obrazec, který se podobá obrazci pozorovanému při měření indikátorové konstanty spektrofotometricky (graf č. 22). Jeho interpretace opět spočívá v úvaze o vlivu tenzidu na disociační konstantu barviva, který se ovšem projeví až při překročení koncentrace tenzidu  $2 \cdot 10^{-4}$  mol/l.

Výsledky fluorimetrie v tomto případě také zajímavě doplňují výsledky UV-VIS absorpční spektrofotometrie. U řady se stoupající koncentrací barviva dochází k mírnému bathochromnímu posunu emisních vlnových délek, zatímco intenzita fluorescence se významně mění až u posledních dvou roztoků. To je ve shodě s výsledky extrakční spektrofotometrie, kdy při nejvyšší koncentraci došlo ke vzestupu naměřené absorbance u nejvyšší koncentrace barviva. Zde je možné interpretovat pokles intenzity fluorescence zesílením vlivu vnitřního filtru po druhotné agregaci molekul barviva, o níž je uvažováno v prvním odstavci této kapitoly. U řady se stoupající koncentrací tenzidu nebyly zaznamenány žádné významné změny vlnových délek emisních maxim. Zpočátku mírný pokles intenzity fluorescence se stoupající koncentrací tenzidu je zesílen v případě posledních dvou vzorků. Tento pokles nelze přičíst na vrub vnitřnímu filtru, ale mohl by souviset se změnou hodnoty disociační konstanty barviva, o níž je uvažováno v předchozím odstavci.

### 5.3. MĚŘENÍ FLUORESCENCE S POLARIZOVANÝM SVĚTLEM

Fluorescenční měření prováděná s polarizovaným světlem byla vyhodnocena výpočtem hodnot  $I_{54,7}$  a hodnot anizotropie. Porovnáním naměřených a vypočtených hodnot  $I_{54,7}$  byla ověřována schopnost použitého spektrofluorimetru pro měření s polarizovaným světlem. Použitý spektrofluorimetr Aminco Bowman Series 2 totiž nemá instalovány polarizační hranoly, ale k polarizaci světla používá polarizační filtry. Ze získaných výsledků plyne dobrá shoda naměřených a vypočtených hodnot  $I_{54,7}$ . Odchyly jsou většinou malé, v řádu procent, u části hodnot se naměřené a vypočtené hodnoty  $I_{54,7}$  liší o cca 10 až 15 procent, výjimečně i více. Relativní odchylka se dle očekávání zvyšuje tehdy, je-li intenzita fluorescence nízká. Protože se intenzita fluorescence snižuje se stoupající koncentrací barviva, je třeba uvažovat o významném vlivu vnitřního filtru. Tento vliv se většinou projeví až při fluorescenci dvou nejkonzentrovanejších vzorků. Výjimku ovšem představují roztoky fenolové červeně s cetylpyridinium chloridem při  $\text{pH} = 11$  a fenolové červeně s cetrimidem, kdy intenzita fluorescence  $I_{54,7}$  klesá významně v průběhu celého koncentračního intervalu. Celkově je však shoda naměřených a vypočítaných hodnot  $I_{54,7}$  natolik dobrá, že spektrofluorimetr Aminco Bowman Series 2 s polarizačními filtry lze považovat za přístroj vhodný k měřením v této práci.

Hodnoty anizotropie ve studovaných roztocích by měly ukázat, zda v těchto roztocích dochází k tvorbě uspořádaných struktur, či nikoli. Závislost zjištěných hodnot této veličiny na koncentraci fenolové červeně se liší podle použitého tenzidu, případně podle hodnoty  $\text{pH}$  roztoku. Ve třech případech, v roztocích s cetylpyridinium chloridem při

pH = 6, cetrimidem a benzethonium chloridem, anizotropie s koncentrací barviva stoupá. To ukazuje na tvorbu agregátů typu lyotropních kapalných krystalů, jejichž uspořádanost stoupá s koncentrací barviva. U roztoků s cetylpyridinium chloridem při pH = 6 a benzethonium chloridem se tomuto trendu vymyká první hodnota pro nejnižší koncentraci. V dalších dvou případech, v roztocích s cetylpyridinium chloridem při pH = 11 a carbethopendecinium bromidem anizotropie klesá s koncentrací barviva a o zvyšující se uspořádanosti agregátů nelze hovořit. Ve všech pěti případech však nelze považovat za spolehlivé poslední dvě hodnoty, tedy hodnoty odpovídající nejvyšším koncentracím. Tyto hodnoty se již významně odlišují od hodnot ostatních, což je pravděpodobně způsobeno silným vlivem vnitřního filtru v těchto roztocích. O tom svědčí i hodnoty faktoru G. Zatímco při pěti nejnižších koncentracích barviva se faktor G chová podle očekávání přibližně konstantně, u posledních dvou koncentrací jsou jeho hodnoty extrémně odlišné. Z tohoto pravidla se vymyká pouze roztok s cetylpyridinium chloridem při pH = 11, kdy je zcela odlišná již pátá hodnota G, a roztok s benzethonium chloridem, u něhož je šestá hodnota naopak ve velmi dobré shodě s předchozími pěti.

K vývodům uvedeným v předchozím odstavci je ovšem třeba přistupovat obezřetně s ohledem na velikost zjištěných hodnot anizotropie. V experimentálním uspořádání použitém v této práci je horní limit hodnoty anizotropie 0,4 (17), (18). Výjimkou z toho může být tzv. vícefototnová excitace (19), (20), která je ovšem dosažitelná pouze za použití laserové techniky. Z toho plyne, že velká část hodnot anizotropie je zatížena významnou chybou. Bez výhrad se jeví seriózními pouze hodnoty zjištěné pro roztoky fenolové červeni s cetylpyridinium chloridem při pH = 6 a benzethonium chloridem. V případě roztoků s carbethopendecinium bromidem je většina hodnot pod uvedeným limitem kromě prvních dvou. Protože již bylo řečeno, že poslední dvě hodnoty nejsou věrohodné z jiných důvodů, zbývají pouze tři hodnoty, které je možné vzít v úvahu. To je však příliš malý počet na spolehlivé hodnocení. V ostatních čtyřech případech je zřejmé, že hodnota anizotropie se mění s měnící se koncentrací barviva. To naznačuje, že lze předpokládat určitou míru uspořádanosti agregátů barviva a jednotlivých tenzidů. V některých případech tato uspořádanost klesá se stoupající koncentrací barviva (roztoky s cetrimidem a roztoky s cetylpyridinium chloridem při pH = 11), jindy uspořádanost se stoupající koncentrací barviva stoupá (roztoky s cetylpyridinium chloridem při pH = 6 a roztoky s benzethonium chloridem). V závislosti na koncentraci barviva se tedy mění uspořádanost a zřejmě i velikost vzniklých agregátů. Taková skutečnost by pak byla v soulase s interpretací hypochromních posunů při extrakční spektrofotometrii podle publikace (14).

## **6. ZÁVĚR**

Tato rigorózní práce se zabývala studiem interakcí organického barviva fenolové červeně s tenzidy cetylpyridinium chloridem, carbethopendecinium bromidem prostřednictvím extrakční spektrofotometrie, UV-VIS spektrofotometrie a klasické i fluorimetrie s polarizovaným světlem a dále s tenzidy cetrimidem a benzethonium chloridem s použitím pouze polarizované fluorimetrie.

V roztocích, které obsahovaly fenolovou červeně a cetylpyridinium chlorid, byla metodou extrakční spektrofotometrie nalezena dvě absorpční maxima na A – pH křivce při hodnotách pH 6 a 11. Při obou hodnotách pH bylo provedeno studium příslušných roztoků dalšími spektrálními metodami (UV-VIS absorpční spektrofotometrie, fluorimetrie), jejichž výsledky ukazují na agregaci částic ve studovaných roztocích.

V roztocích fenolové červeně s carbethopendecinium bromidem byly všemi třemi uvedenými metodami získány výsledky, které rovněž ukazují na významnou tvorbu agregátů v těchto roztocích. Experimenty byly prováděny při pH = 6, což je hodnota získaná jako maximum na A – pH křivce naměřené extrakční spektrofotometrií. Je pozoruhodné, že v případě obou tenzidů (cetylpyridinium chlorid, carbethopendecinium bromid) byly zaznamenány takovéto výsledky při hodnotě pH = 6, tedy v oblasti, kde nelze patrně předpokládat úplnou disociaci barviva. To vede k závěru, že při tvorbě agregátů se uplatňují elektrostatické síly i další typy interakcí ( $\pi$ - $\pi$  interakce, hydrofobní interakce).

Hodnoty anizotropie naměřené v roztocích fenolové červeně se všemi čtyřmi tenzidy při příslušných hodnotách pH vedou v kvalitativní rovině k závěru, že míra agregace závisí na koncentraci barviva, neboť hodnoty anizotropie se s koncentrací barviva mění, přičemž v některých případech stoupají, v jiných klesají. Z pohledu kvantitativního je ovšem třeba konstatovat, že zjištěné hodnoty anizotropie jsou z neznámých důvodů v některých případech nereálné.

## **7. LITERATURA**



- (1) Lázníčková A., Ďoubal S., Gasparič J., Dittrich M.: Fyzikální chemie pro posluchače farmacie II. díl, II. vydání, Karolinum 2000.
- (2) Chalabala M. et al.: Technologie léků, nakladatelství Galén, Praha 2001.
- (3) Lázníčková A., Kubíček V.: Základy fyzikální chemie, vybrané kapitoly pro posluchače farmaceutické fakulty, I. vydání, Karolinum 2001.
- (4) Gasparič J., Barcuchová A., Horká I.: Zjednodušený postup pro extrakčně-fotometrická stanovení organických látek, Farmaceutická fakulta UK v Hradci Králové, 1985.
- (5) Kubíček V., Kučová D., Císař P., Burešová V.: Determination of Low Contents of Fenpiverine Bromide by Extraction Spectrophotometry, *Microchim. Acta* 142, 273 (2003).
- (6) Maiti N.C., Mazumdar S., Periasamy N.: J- and H- Aggregates of Porphyrin-Surfactant Complexes: Time-Resolved Fluorescence and Other Spectroscopic Studies, *J. Phys. Chem. B* 102 (1998), 1528-1538.
- (7) Karlíček R., a kol.: Analytická chemie pro farmaceuty, Karolinum, Praha 2005.
- (8) Klimeš J., a kol.: Kontrola léčiv I, Karolinum, Praha 2002.
- (9) Čihálík J., Dvořák J., Suk V.: Příručka měření pH, SNTL, Praha 1975.
- (10) Němcová K.: Iontové páry v extrakční spektrofotometrii II (diplomová práce), Farmaceutická fakulta UK v Hradci Králové, 2002.
- (11) Farkašová D.: Interakce povrchově aktivních látek a organických barviv v roztocích (diplomová práce), Farmaceutická fakulta UK v Hradci Králové, 2003.
- (12) Bishop E.: Indicators, Pergamon Press, Oxford, New York, Toronto, 1972.
- (13) Český lékopis 1997, Grada Publishing, Praha, 1997.
- (14) 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.

(15) Guilherme M.R., Silva R., Girotto E.M., Rubira A.F., Muniz E.C.: Hydrogels based on PAAm network with PNIPAAm included: hydrophilic-hydrophobic transition measured by the partition of Orange II and Methylene Blue in water, *Polymer* 44 (2003), 4213-4219.

(16) Muniz E.C., Geuskens G.: Influence of temperature on the permeability of polyacrylamide hydrogels and semi-IPNs with poly(N-isopropylacrylamide), *Journal of Membrane Sci.* 172, (2000), 287-293.

(17) Gibault GG (ed): *Practical Fluorescence*. Marcel Dekker, New York, Basel, Hong Kong 1990.

(18) Valeur B.: *Molecular Fluorescence, Principles and Applications*. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, New York, Chichester, Brisbane, Singapore, Toronto, 2001.

(19) Lakowicz J. P.: *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Springer Science Business Media LLC, New York, 2006.

(20) Birks J. B.: *Photophysics of Aromatic Molecules*. Wiley-Interscience, London, New York, Sydney, Toronto, 1970.

(21) Belatková P.: *Interakce tenzidů a barviv v roztocích I (diplomová práce)*, Farmaceutická fakulta UK v Hradci Králové, 2008.