

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biofyziky a fyzikální chemie

Interakce tenzidů a barviv v roztocích I

(diplomová práce)

Hradec Králové 2008

Petra Belátková

Čestné prohlášení

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

11.4.2008

.....

Poděkování

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

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá studiem interakcí mezi organickým barvivem fenolovou červení a tensidy cetrimidem a benzethonium chloridem s využitím extrakční spektrofotometrie, UV-VIS spektrofotometrie a fluorimetrie. Ve spektrech fenolové červeně v přítomnosti obou použitých tensidů byly zjištěny změny, které byly připsány tvorbě premicelárních agregátů v důsledku významných interakcí mezi barvivem a tensidy.

ABSTRACT

This diploma thesis deals with study of interactions between organic dye phenol red and tensides cetyltrimethylammoniumbromide and benzethoniumchloride with using extraction photometry, UV–VIS spectrofotometry and fluorimetry. There were detected changes in spectra of phenol red in presence of both used surfactants, which were ascribed to a formation of premicellar aggregates as a consequence of significant interactions between the dye and the tensides.

OBSAH

1. ÚVOD.....	8
2. TEORETICKÁ ČÁST.....	10
2.1. POVRCHOVĚ AKTIVNÍ LÁTKY – TENZIDY (1).....	11
2.1.1. Vlastnosti tenzidů	12
2.1.2. Rozdělení tenzidů	12
2.1.3. Hydrofilně-lipofilní rovnováha tenzidů	13
2.2. METODY MĚŘENÍ.....	13
2.2.1. Extrakční spektrofotometrie	13
2.2.2. UV–VIS spektrofotometrie	14
2.2.3. Fluorimetrie	16
2.3. UŽITÍ TENZIDŮ VE VĚDECKÝCH POZOROVÁNÍCH	17
2.3.1. Interakce tenzidů s DNA, role hydrofóbních vlastností a povrchového náboje na interkalaci a tání DNA.	17
2.3.2. Vliv alkoholu na rozdělovací rovnováhu fenolové červeně v micelárních roztocích a mikroemulzích anionických tenzidů typu o/v.	17
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	19
3.1. POUŽITÉ CHEMIKÁLIE	20
3.2. POUŽITÉ PŘÍSTROJE	21
3.3. SEZNAM POUŽITÝCH ROZTOKŮ	21
3.4. PRACOVNÍ POSTUP	22
3.4.1. Cetrimid.....	22
3.4.1.1. Sledování vlivu pH pufru a doby třepání na absorbanci v extrakční spektrofotometrii.....	22
3.4.1.2. Extrakční spektrofotometrie s použitím pufru o pH=8	24
3.4.1.3. UV-VIS spektrofotometrie a fluorimetrie s použitím pufru o pH=8	24
3.4.1.4. UV-VIS spektrofotometrie a fluorimetrie u řady se stoupající koncentrací tenzidu a pufrem pH=8.....	25
3.4.2. Benzethonium chlorid	26
3.4.2.1. Sledování vlivu pH pufru a doby třepání na absorbanci v extrakční spektrofotometrii.....	26
3.4.2.2. Extrakční spektrofotometrie s použitím pufru o pH=7	28
3.4.2.3. UV-VIS spektrofotometrie a fluorimetrie s použitím pufru o pH=7	29
3.4.2.4. UV-VIS spektrofotometrie a fluorimetrie u řady se stoupající koncentrací tenzidu a pufrem pH=7.....	29
4. VÝSLEDKY	30

4.1. VÝSLEDKY STUDIA INTERAKCÍ FENOLOVÉ ČERVENĚ S CETRIMIDEM.....	31
4.1.1. Extrakční spektrofotometrie s použitím pufru o pH=8.....	31
4.1.2. UV-VIS spektrofotometrie s použitím pufru o pH=8.....	32
4.1.3. Fluorimetrie s použitím pufru o pH=8.....	33
4.1.4. UV-VIS spektrofotometrie u řady se stoupající koncentrací tenzidu a pufrem pH=8	34
4.1.5. Fluorimetrie u řady se stoupající koncentrací tenzidu a pufrem pH=8.....	35
4.2. VÝSLEDKY STUDIA INTERAKCÍ FENOLOVÉ ČERVENĚ S BENZETHONIUM CHLORIDEM.....	36
4.2.1. Extrakční spektrofotometrie s použitím pufru o pH=7.....	36
4.2.2. UV-VIS spektrofotometrie s použitím pufru o pH=7.....	37
4.2.3. Fluorimetrie s použitím pufru o pH=7.....	37
4.2.4. UV-VIS spektrofotometrie u řady se stoupající koncentrací tenzidu a pufrem pH=7	38
4.2.5. Fluorimetrie u řady se stoupající koncentrací tenzidu a pufrem pH=7.....	39
5. DISKUSE	40
5.1. INTERAKCE FENOLOVÉ ČERVENĚ S CETRIMIDEM.....	41
5.2. INTERAKCE FENOLOVÉ ČERVENĚ S BENZETHONIUM CHLORIDEM.....	42
6. ZÁVĚR.....	43
7. LITERATURA.....	45

1. ÚVOD

Interakce mezi různými tensidy a barvivy jsou v současné době předmětem mnoha studií. Bylo zjištěno, že přidáním tenzidu do roztoku barviva může dojít ke změnám v absorpčním spektru barviva. Původ těchto změn je záležitostí mnoha diskusí.

V různých studiích se hovoří o tvorbě nespecifických agregátů a specifických premicelárních agregátů H-typu a J-typu. Tyto specifické agregáty jsou zodpovědné za hypsochromní a bathochromní posuny v absorpčních spektrech barviv.

Literární zdroje se většinou týkají interakcí povrchově aktivních látek a barviv methylovaného, methylčerveného a kyseliny pikrové, proto jsem se ve své diplomové práci zaměřila na fenolovou červen, o jejíchž interakcích s tensidy jsem našla jen málo informací.

Ke sledování interakcí mezi organickým barvivem fenolovou červení a tensidy cetrimidem a benzethonium chloridem jsem použila tři spektrálních metod: extrakční spektrofotometrii, UV-VIS spektrofotometrii a fluorimetrii. Poslední z uvedených metod byla zatím používána k těmto účelům jen velmi řídko.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. POVRCHOVĚ AKTIVNÍ LÁTKY – TENZIDY (1)

Tenzidy (povrchově aktivní látky, surfaktanty) 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. Tenzidy 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 nevázaných 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. Tato difilnost způsobuje, že v roztocích tenzidů se uplatňují vzájemné interakce vanderwalsovského charakteru nejen mezi molekulami tenzidu, ale i mezi jednotlivými molekulami tenzidu a molekulami rozpouštědla. 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 polyetylenglykolové, polyglycerolové, polyglukózové, glukóza, sacharóza, glycerol, glykol, kyselina citronová a další.

2.1.1. 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.

2.1.2. 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 přitom malou rozpustnost ve vodě, na stupnici pH se hovoří o isoelektrické oblasti.

Neiontové tenzidy ve vodě nedisociují.

2.1.3. Hydrofilně-lipofilní rovnováha tenzidů

Hydrofilně-lipofilní rovnováha tenzidu se klasifikuje bezrozměrným číslem HLB (Hydrophilic-Lipophylic 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).

2.2. METODY MĚŘENÍ

2.2.1. Extrakční spektrofotometrie

Extrakčně-fotometrická 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 úměrně stanovované látky, proto lze fotometricky stanovit koncentraci této látky.

Vlastní fotometrická měření se obecně dříve realizovala v dělicích nálevkách a zahrnují obvykle jedno- až vícenásobné vytřepání, ustátí vrstev podporované velmi často centrifugací, vlastní separaci vrstev a přenesení organické fáze do měrných kyvet spektofotometru, často za použití filtrace, tedy řada úkonů relativně časově náročných a pracných. Proto se prof. Gasparič a spolupracovníci (5) 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 třepače ponechali deset minut ustát vrstvy ve svislé poloze a poté zkumavku s oběma vrstvami zasunuli do nástavce spektofotometru Spekol. Při dodržování určitých parametrů (druh, 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.

2.2.2. 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 π - elektronů ve vazebných molekulových orbitalech a nepárových elektronů v nevazebných molekulových orbitalech.

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:

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

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

ϵ – 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 struktuře látky. Souvislost struktury látky s průběhem 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

- a) bathochromní posun – posun směrem k vyšší vlnové délce maxima
- b) hypsochromní posun – posun při snižování vlnové délky maxima
- posun se změnou intenzity absorpčního maxima (tj. změnou molárního absorpčního koeficientu)
 - a) hyperchromní posun – provázen zvýšením intenzity maxima absorpčního pásu
 - b) hypochromní posun – provázen poklesem absorbance

2.2.3. Fluorimetrie

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 stabilnějšího stavu o nižší energii 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.

Rozeznáváme dva typy fotoluminiscence:

- Fluorescence je druh fotoluminiscence, u níž dochází k emisi světla s dobou dosvitu 10^{-6} až 10^{-9} s
- Fosforescence je charakterizována obvyklou dobou dosvitu 10^{-2} až 10^{-3} s

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

Fluorescenci charakterizují dvě spektra: emisní a excitační. Excitační spektrum vyjadřuje závislost emisního signálu tj. intenzity fluorescence na vlnové délce primárního záření s konstantní intenzitou. Emisní spektrum udává závislost intenzity fluorescence na vlnové délce sekundárního záření při konstantních podmínkách primárního záření.

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 délka excitačního záření.

2.3. UŽITÍ TENZIDŮ VE VĚDECKÝCH POZOROVÁNÍCH

Fenolová červeň je předmětem jen mála vědeckých prací, proto se zde spíše zaměřuji na užití tenzidů ve vědeckých pozorováních.

2.3.1. Interakce tenzidů s DNA, role hydrofóbních vlastností a povrchového náboje na interkalaci a tání DNA.

Autoři práce (2) se zabývali vlivem povrchově aktivních látek na DNA. Jejich pokusy byly založeny na navázání 9-(anthrylmethyl)trimethylammonium chloridu (dále sonda) na DNA telecího brzlíku. Tento komplex použili pro sledování účinků různých tenzidů, jako přísad k DNA. Tenzidy se lišily svým elektrickým nábojem a délkou řetězce. Vlivy přidaných tenzidů byly srovnávány s vlivy malých organických kationtů nebo solí. Tyto pokusy vedly k následujícím závěrům. Kationické tenzidy nebo soli způsobovaly strukturální změny v DNA a vedly k uvolnění sondy, nicméně kationické tenzidy způsobují uvolňování v mnohem nižší koncentraci než soli. Naopak přísady anionických tenzidů v destabilizaci komplexu sondy s DNA selhaly. Během výzkumu byly použity různé metody zkoumání, např. fluorescenční spektroskopie.

Výsledkem těchto rozsáhlých pokusů je důkaz vlivu tenzidů nebo jiných přísad na DNA, což obecně zvyšuje teplotu tání DNA o několik stupňů Celsia.

2.3.2. Vliv alkoholu na rozdělovací rovnováhu fenolové červeně v micelárních roztocích a mikroemulzích anionických tenzidů typu o/v.

V této studii (3) indiští autoři zkoumali vliv alkoholu na rozdělovací rovnováhu organického barviva fenolové červeně v mikroemulzích typu o/v. Byl zkoumán vliv alkoholu na rozdělovací rovnováhu barviva v micelárních roztocích. Mikroemulze byly stabilizovány užitím dvou anionických tenzidů dodecylsulfátu sodného (SDS) a dodecylbenzensulfonátu sodného (SDBS) a užitím různých alkoholů propan-1-olu, propan-2-olu, butan-1-olu, butan-2-olu, pentan-1-olu, pentan-2-olu a pentan-3-olu jako kotenzidů. Fenolová červeň byla pro tuto studii vybrána, protože se nesráží v přítomnosti anionických tenzidů a vykazuje barevné změny v mírném rozsahu pH.

Výsledky ukazují na možnost vstupu alkoholu do různých částí micel a do fázového rozhraní olej-voda. V mikroemulzních systémech rozdělovací konstanta K_p vzrůstá se zvyšováním objemu olejové fáze v důsledku připojování barviva do palisádové vrstvy fázového rozhraní. V daném objemu olejové fáze rozdělovací konstanta stoupá s výměnou alkoholů v pořadí: propan-2-ol < propan-1-ol < butan-2-ol < butan-1-ol < pentan-3-ol < pentan-2-ol < pentan-1-ol. Tento trend je přisuzovaný synergické povrchové aktivitě mezi tenzidem a alkoholem. Rozdělování barviva do micel nebo fázového rozhraní olej-voda bylo vyšší v případě SDBS než SDS.

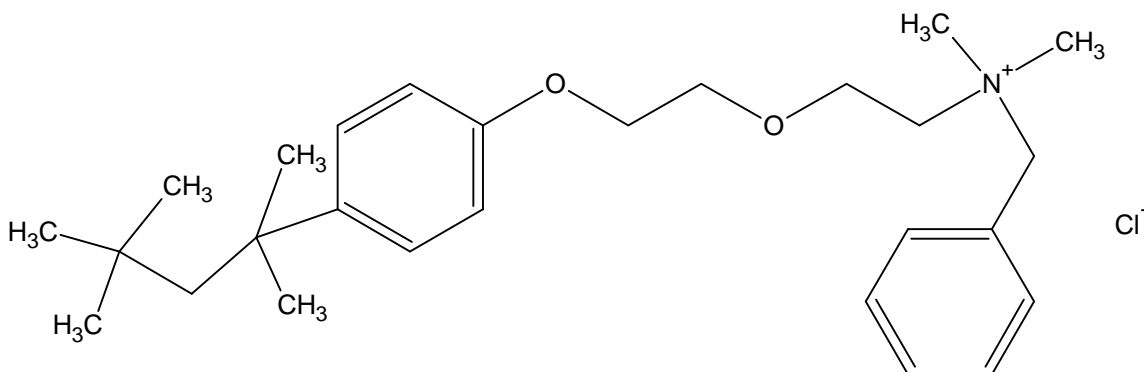
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. POUŽITÉ CHEMIKÁLIE

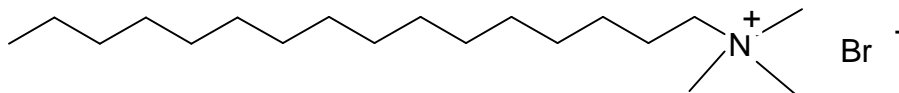
Při svých pokusech jsem používala následující chemikálie:

- Benzethoniumchlorid (viz vzorec č. 1) – SIGMA,
- Cetrimid – cetyltrimethylamoniumbromid (viz vzorec č. 2) – MERCK (for cosmetics)
- Fenolová červeň (viz vzorec č. 3) – 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

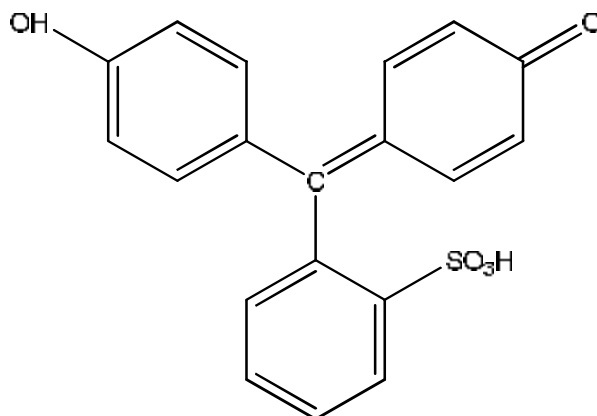
Vzorec č. 1: Benzethoniumchlorid ($M_r = 448,1$)



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



Vzorec č. 3: 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
- Fluorimetr – Aminco Bowman Series 2 – Thermo Spectronic

3.3. SEZNAM POUŽITÝCH ROZTOKŮ

Při svých měřeních jsem používala následující roztoky:

- Základní vodné roztoky fenolové červeň o koncentracích $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$ a $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$
- Vodné roztoky tenzidů (cetrimid a benzethonium chlorid) 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 (4) o pH 2,09 – 11,98

3.4. PRACOVNÍ POSTUP

3.4.1. Cetrimid

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

Do zkumavek jsem odpipetovala 1 ml tenzidu (cetrimidu), 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 (viz tabulka č.1).

Tabulka č.1: Měření absorpčního maxima

λ [nm]	A
395	0,190
400	0,195
405	0,190
410	0,185
420	0,165
430	0,135

V tabulce č.1 je λ vlnová délka a A je absorbance.

Nejvyšší absorbance byla naměřena při vlnové délce 400 nm. V odborné literatuře bylo uvedeno absorpční maximum při 420 nm, proto jsem další měření prováděla při těchto dvou vlnových délkách.

Dále jsem měřila absorbanci všech vzorků proti slepým vzorkům při 400 a 420 nm po deseti, dvaceti a třiceti minutách třepání (viz tabulky č.2, č.3, č.4).

Tabulka č.2: Měření po deseti minutách třepání

měření při 400 nm

pH	A
5	0,100
6	0,195
7	0,195
8	0,180
9	0,145
10	0,100
11	0,135
12	0,075

měření při 420 nm

pH	A
5	0,120
6	0,185
7	0,175
8	0,175
9	0,140
10	0,095
11	0,125
12	0,065

Tabulka č.3: Měření po dvaceti minutách třepání

měření při 400 nm

pH	A
5	0,205
6	0,245
7	0,225
8	0,255
9	0,220
10	0,135
11	0,180
12	0,060

měření při 420 nm

pH	A
5	0,165
6	0,215
7	0,205
8	0,220
9	0,195
10	0,125
11	0,160
12	0,055

Tabulka č.4: Měření po třiceti minutách třepání

měření při 400 nm

pH	A
5	0,235
6	0,270
7	0,250
8	0,265
9	0,240
10	0,135
11	0,175
12	0,055

měření při 420 nm

pH	A
5	0,185
6	0,175
7	0,210
8	0,225
9	0,200
10	0,120
11	0,155
12	0,045

Nejvyšší absorbance jsem naměřila u vzorků o pH=8 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 měření postačí doba třepání dvacet minut.

3.4.1.2. Extrakční spektrofotometrie s použitím pufru o pH=8

Do zkumavek jsem odpipetovala 1 ml tenzidu (cetrimidu), 3 ml Britton-Robinsonova pufru o pH=8, 5 ml chloroformu a 1 ml fenolové červeně o potřebné koncentraci. Tím jsem vytvořila řadu vzorků o stoupající koncentraci fenolové červeně (viz tabulka č.5). 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.5: Příprava vzorků o stoupající koncentraci

Koncentrace FČ [mol.l⁻¹]	1.10 ⁻⁴	2.10 ⁻⁴	4.10 ⁻⁴	6.10 ⁻⁴	8.10 ⁻⁴	1.10 ⁻³
Objem FČ [ml]	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1
Objem vody [ml]	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=8

Vzorky jsem připravila v kádinkách odpipetováním 0,8 ml tenzidu o koncentraci 1.10⁻⁴ mol.l⁻¹, potřebného množství zásobního roztoku fenolové červeně o příslušné koncentraci, 1,6 ml Britton-Robinsonova pufru o pH=8 a doplněním do 4 ml vodou (viz tabulka č.6). 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=8 a doplněné vodou do 4 ml (viz tabulka č. 7).

Tabulka č.6: Příprava vzorků při koncentraci tenzidu $2 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$

č. vz.	$c_1 [\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}]$	$V_{\text{FČ}} [\text{ml}]$	$c_2 [\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}]$	$V_t [\text{ml}]$	$V_p [\text{ml}]$	$V_v [\text{ml}]$
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.6 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. 7: Příprava slepých vzorků

č. sl. vz.	$c_1 [\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}]$	$V_{\text{FČ}} [\text{ml}]$	$c_2 [\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}]$	$V_p [\text{ml}]$	$V_v [\text{ml}]$
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.7 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 pufru pH=8

Vzorky jsem připravila v kádinkách odpipetováním potřebného množství tenzidu o příslušné koncentraci, 0,8 ml zásobního roztoku fenolové červeně o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, 1,6 ml Britton-Robinsonova pufru o pH=8 a doplněním do 4ml vodou (viz tabulka č.8). 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=8 a doplněné vodou do 4 ml (viz tabulka č.9).

Tabulka č.8: Příprava vzorků při koncentraci fenolové červeně $2 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$

č. vz.	c_3 [mol.l ⁻¹]	V_t [ml]	c_4 [mol.l ⁻¹]	$V_{FČ}$ [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.8 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.9: Příprava slepého vzorku při koncentraci fenolové červeně $2 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$

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

V tabulce č.9 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.

3.4.2. Benzethonium chlorid

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

Do zkumavek jsem odpipetovala 1 ml tenzidu (benzethonium 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 (viz tabulka č.10).

Tabulka č.10: Měření absorpčního maxima

l [nm]	A
395	0,250
400	0,250
405	0,240
410	0,230
420	0,200
430	0,165

Nejvyšší absorpce byla naměřena při vlnové délce 400 nm. V odborné literatuře bylo uvedeno absorpční maximum při 420 nm, proto jsem další měření prováděla při těchto dvou vlnových délkách.

Dále jsem měřila absorpenci všech vzorků proti slepým vzorkům při 400 a 420 nm po deseti, dvaceti a třiceti minutách třepání (viz tabulky č.11, č.12, č.13).

Tabulka č.11: Měření po deseti minutách třepání

měření při 400 nm		měření při 420 nm	
pH	A	pH	A
5	0,260	5	0,230
6	0,280	6	0,280
7	0,325	7	0,300
8	0,240	8	0,220
9	0,260	9	0,235
10	0,225	10	0,200
11	0,130	11	0,145
12	0,180	12	0,180

Tabulka č.12: Měření po dvaceti minutách třepání

měření při 400 nm		měření při 420 nm	
pH	A	pH	A
5	0,345	5	0,290
6	0,360	6	0,320
7	0,410	7	0,330
8	0,390	8	0,300
9	0,275	9	0,285
10	0,295	10	0,255
11	0,195	11	0,155
12	0,205	12	0,170

Tabulka č.13: Měření po třiceti minutách třepání

měření při 400 nm		měření při 420 nm	
pH	A	pH	A
5	0,410	5	0,355
6	0,420	6	0,355
7	0,440	7	0,380
8	0,380	8	0,345
9	0,390	9	0,350
10	0,285	10	0,310
11	0,210	11	0,170
12	0,215	12	0,190

Nejvyšší absorbance jsem naměřila u vzorků o pH=7 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 měření postačí doba třepání dvacet minut.

3.4.2.2. Extrakční spektrofotometrie s použitím pufru o pH=7

Do zkumavek jsem odpipetovala 1 ml tenzidu (benzethonium chloridu), 3 ml Britton-Robinsonova pufru o pH=7, 5 ml chloroformu a 1 ml fenolové červeně o potřebné koncentraci. Tím jsem vytvořila řadu vzorků o stoupající koncentraci fenolové červeně (viz

tabulka č.5). 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=7

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=7 a doplněním do 4 ml vodou (viz tabulka č.6). 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=7 a doplněné vodou do 4 ml (viz tabulka č. 7).

3.4.2.4. UV-VIS spektrofotometrie a fluorimetrie u řady se stoupající koncentrací tenzidu a pufrům pH=7

Vzorky jsem připravila v kádinkách odpipetováním potřebného množství tenzidu o příslušné koncentraci, 0,8 ml zásobního roztoku fenolové červeně o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$, 1,6 ml Britton-Robinsonova pufru o pH=7 a doplněním do 4ml vodou (viz tabulka č.8). 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=7 a doplněné vodou do 4 ml (viz tabulka č.9).

4. VÝSLEDKY

4.1. VÝSLEDKY STUDIA INTERAKCÍ FENOLOVÉ ČERVENĚ S CETRIMIDEM

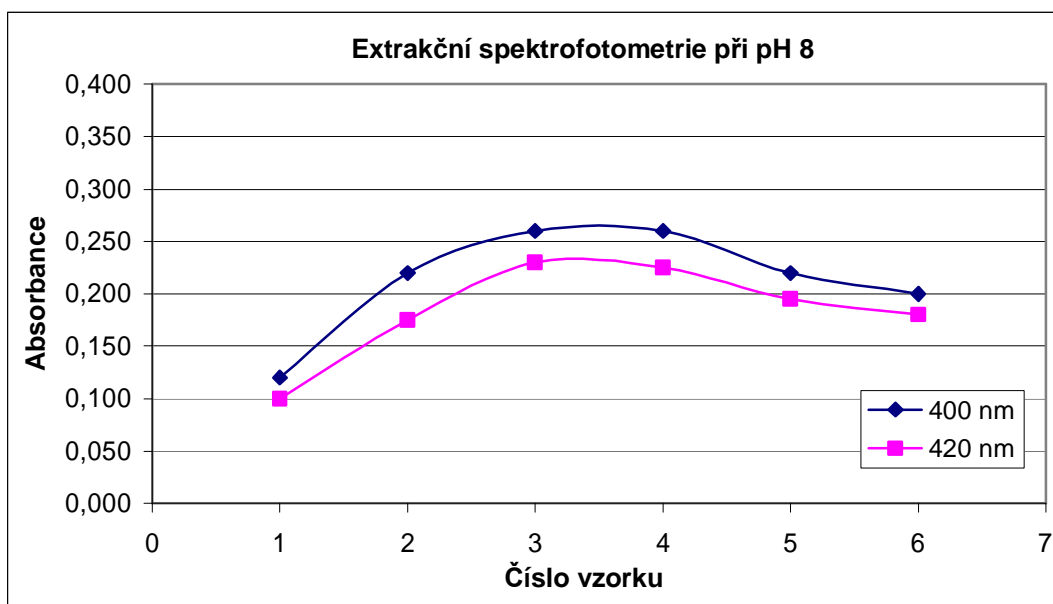
4.1.1. Extrakční spektrofotometrie s použitím pufru o pH=8

Podle kapitoly 3.4.1.2. 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.1.

Tabulka č.14: Měření po dvaceti minutách třepání

měření při 400 nm		měření při 420 nm	
č.vzorku	A	č.vzorku	A
1.	0,120	1.	0,100
2.	0,220	2.	0,175
3.	0,260	3.	0,230
4.	0,260	4.	0,225
5.	0,220	5.	0,195
6.	0,200	6.	0,180

Graf č.1



4.1.2. UV-VIS spektrofotometrie s použitím pufru o pH=8

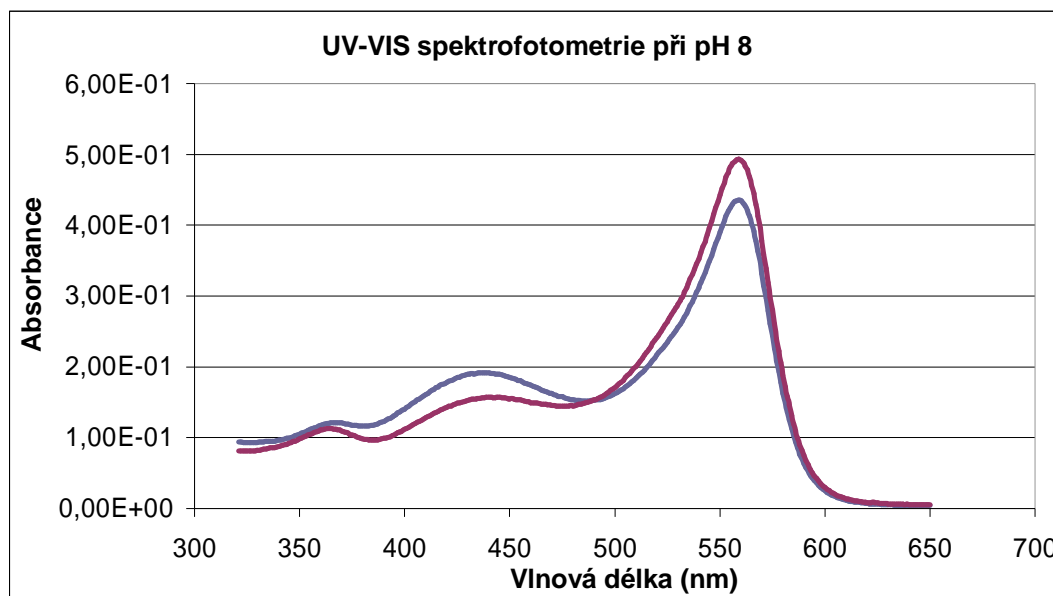
Absorpční spektra vzorků, obsahujících konstantní koncentraci tenzidu cetrimidu $2 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ a různé koncentrace fenolové červeně, jsem získala z měření na UV-VIS spektrofotometru proti příslušným slepým vzorkům (viz kapitola 3.4.1.3.). Hodnoty absorbancí při vlnových délkách 432 a 559 nm jsem zpracovala do tabulky č.15. Graf č.2 znázorňuje spektra při koncentracích $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ a $3 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$.

Tabulka č.15: Hodnoty naměřených absorbancí při 432 a 559 nm

c_2 [mol.l ⁻¹]	A při 432 nm	A při 559 nm
$2 \cdot 10^{-5}$	0,003	0,0078
$4 \cdot 10^{-5}$	0,0032	0,0084
$6 \cdot 10^{-5}$	0,0022	0,0057
$8 \cdot 10^{-5}$	0,0034	0,0087
10^{-4}	0,0041	0,009
$2 \cdot 10^{-4}$	0,1904	0,4356
$3 \cdot 10^{-4}$	0,1543	0,4935

V tabulce č.15 je c_2 koncentrace fenolové červeně ve vzorku.

Graf č.2



4.1.3. Fluorimetrie s použitím pufru o pH=8

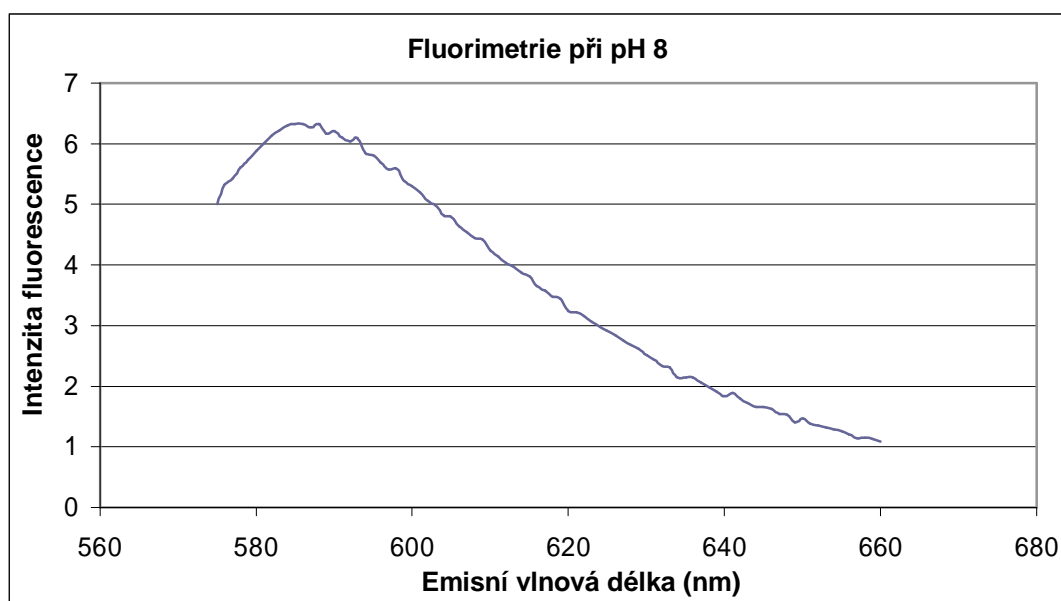
Na fluorimetru jsem měřila spektra vzorků i slepých vzorků (viz kapitola 3.4.1.3.). Citlivost jsem nastavila na nejméně koncentrovaný vzorek, resp. slepý vzorek. Ze spekter jsem odečetla vlnovou délku, při níž byla fluorescence maximální a intenzity fluorescence v emisním maximu u jednotlivých vzorků a slepých vzorků a uspořádala do tabulky č.16. Vzorové emisní fluorescenční spektrum vzorku č.2 znázorňuje graf č.3.

Tabulka č.16: Vlnové délky a intenzity fluorescence v emisním maximu

č. vzorku	λ [nm]	I	č. slep. vzorku	λ [nm]	I
1	582	6,115	-	-	-
2	585	6,331	2	581	6,012
3	587	5,518	3	589	6,006
4	591	4,322	4	589	5,533
5	595	3,531	5	592	4,131
6	601	0,889	6	594	3,349
7	604	0,518	7	602	1,184

V tabulce č.16 je λ vlnová délka, při níž byla fluorescence maximální a I intenzita fluorescence.

Graf č.3



4.1.4. UV-VIS spektrofotometrie u řady se stoupající koncentrací tenzidu a pufrem pH=8

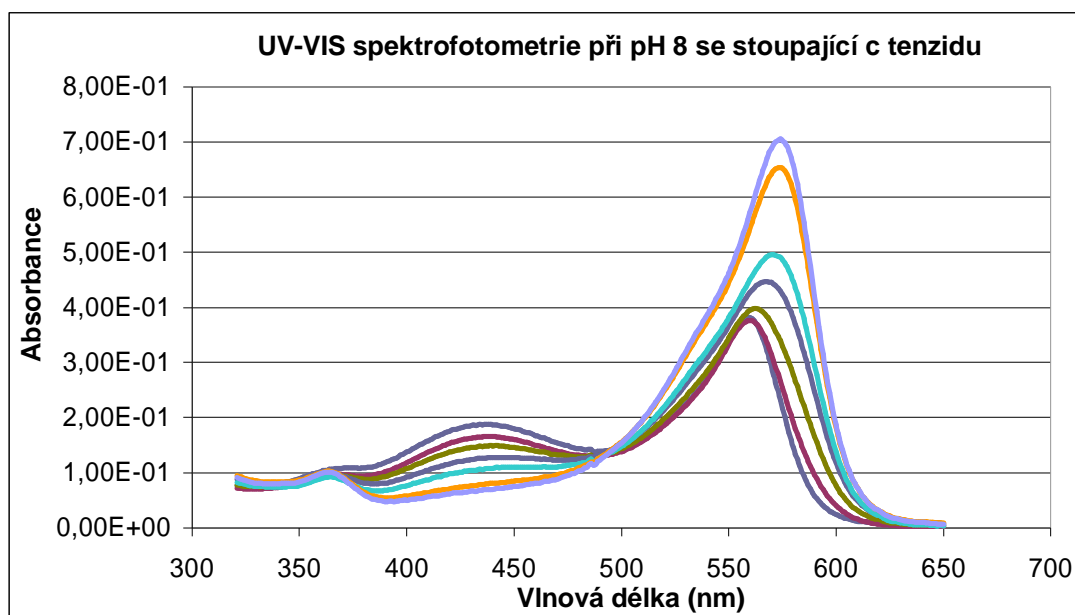
Měřením na UV-VIS spektrofotometru proti slepému vzorku jsem získala absorpční spektra vzorků obsahujících konstantní koncentraci fenolové červeně $2 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ a lišících se koncentrací tenzidu cetrimidu (viz kapitola 3.4.1.4.). Tabulka č.17 vyjadřuje změny absorpčního maxima v závislosti na koncentraci tenzidu. Graf č.4 zobrazuje spektra všech měřených vzorků.

Tabulka č.17: Změny absorpčního maxima s koncentrací tenzidu

c_4 [mol.l ⁻¹]	λ_{max} [nm]
$2 \cdot 10^{-5}$	559
$4 \cdot 10^{-5}$	560
$6 \cdot 10^{-5}$	562
$8 \cdot 10^{-5}$	568
10^{-4}	571
$2 \cdot 10^{-4}$	574
$3 \cdot 10^{-4}$	574

V tabulce č.17 je c_4 koncentrace tenzidu ve vzorku a λ_{max} je absorpční maximum při dané koncentraci tenzidu.

Graf č.4



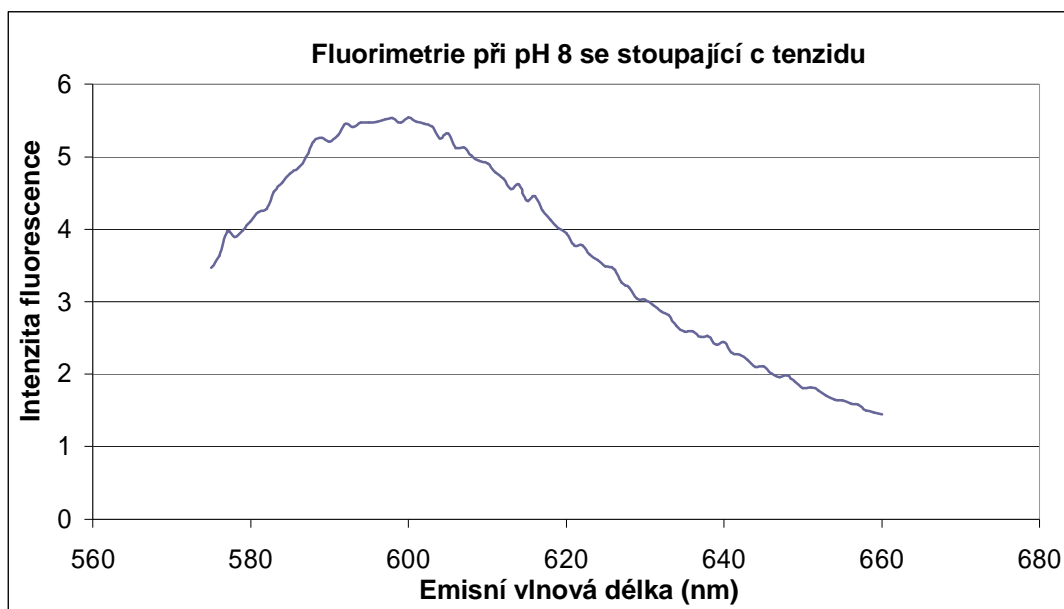
4.1.5. Fluorimetrie u řady se stoupající koncentrací tenzidu a pufrem pH=8

Na fluorimetru jsem měřila spektra vzorků.(viz kapitola 3.4.1.4.). Citlivost byla nastavena na nejméně koncentrovaný vzorek. Vlnové délky vzorků, při nichž byla naměřena maximální fluorescence a intenzity fluorescence jsem uspořádala do tabulky č.18. Graf č.5 znázorňuje emisní fluorescenční spektrum vzorku č.4.

Tabulka č.18: Vlnové délky a intenzity fluorescence v emisním maximu

č. vzorku	λ [nm]	I
1	588	6,398
2	588	6,564
3	591	6,416
4	601	6,045
5	603	6,189
6	605	6,694
7	605	7,099

Graf č.5



4.2. VÝSLEDKY STUDIA INTERAKCÍ FENOLOVÉ ČERVENĚ S BENZETHONIUM CHLORIDEM

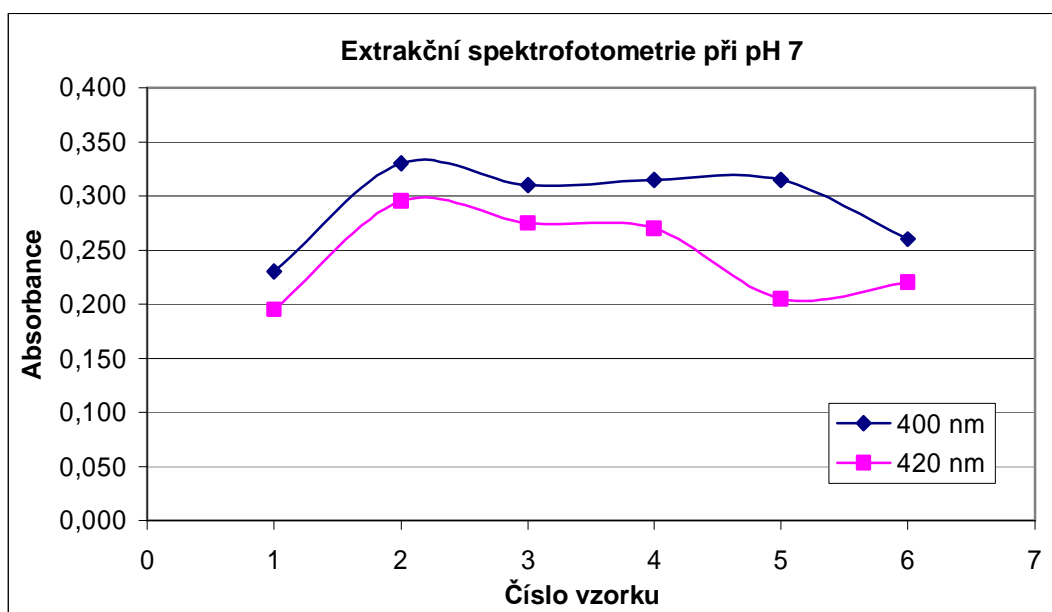
4.2.1. Extrakční spektrofotometrie s použitím pufru o pH=7

Měřila jsem absorbanci 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.19) a hodnoty z této tabulky jsem zpracovala do grafu č.6.

Tabulka č.19: Měření po dvaceti minutách třepání

měření při 400 nm		měření při 420 nm	
č.vzorku	A	č.vzorku	A
1.	0,230	1.	0,195
2.	0,330	2.	0,295
3.	0,310	3.	0,275
4.	0,315	4.	0,270
5.	0,315	5.	0,205
6.	0,260	6.	0,220

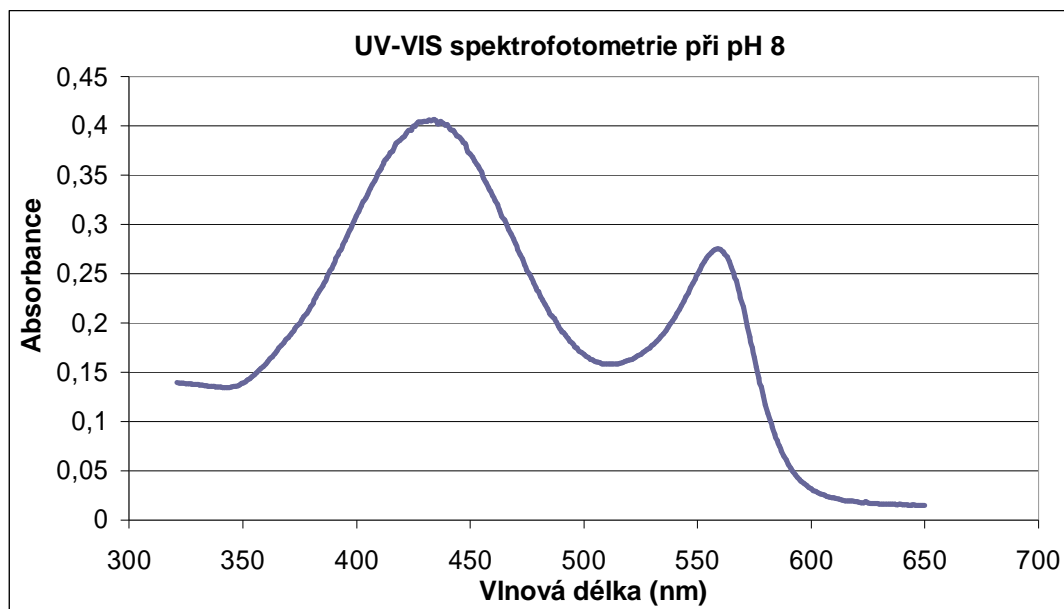
Graf č.6



4.2.2. UV-VIS spektrofotometrie s použitím pufru o pH=7

Absorpční spektra vzorků, obsahujících konstantní koncentraci tenzidu benzethonium chloridu $2 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ 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.7. Absorpční maxima jsou 432 a 559 nm.

Graf č.7



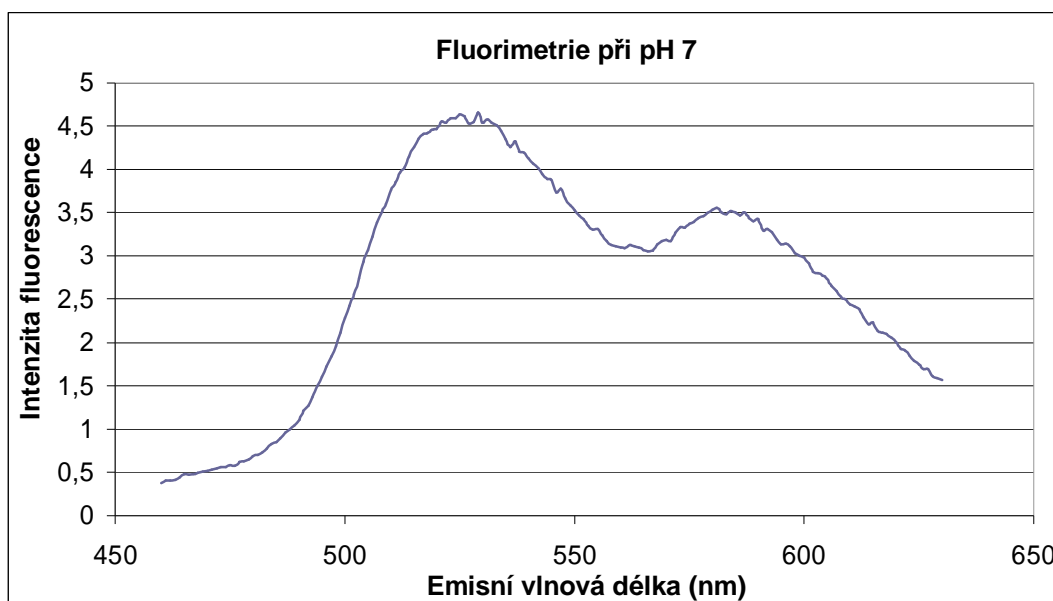
4.2.3. Fluorimetrie s použitím pufru o pH=7

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. 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.20. Graf č.8 znázorňuje emisní fluorescenční spektrum vzorku č.3.

Tabulka č.20: Vlnové délky a intenzity fluorescence v emisním maximu

č. vzorku	l [nm]	I	č. slep. vzorku	l [nm]	I
1	517	6,272	-	-	
2	527	6,328	2	517	6,133
3	529	4,660	3	527	6,134
4	526	3,367	4	526	4,511
5	521	2,212	5	527	3,318
6	595	0,476	6	591	0,924
7	601	0,428	7	593	0,435

Graf č.8



4.2.4. UV-VIS spektrofotometrie u řady se stoupající koncentrací tenzidu a pufrem pH=7

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 benzethonium chloridu (viz kapitola 3.4.2.4.). Vzorové spektrum uvádím pouze v kapitole 4.2.2., protože tenzid ani vyšší koncentrace barviva spektra nijak neovlivnily.

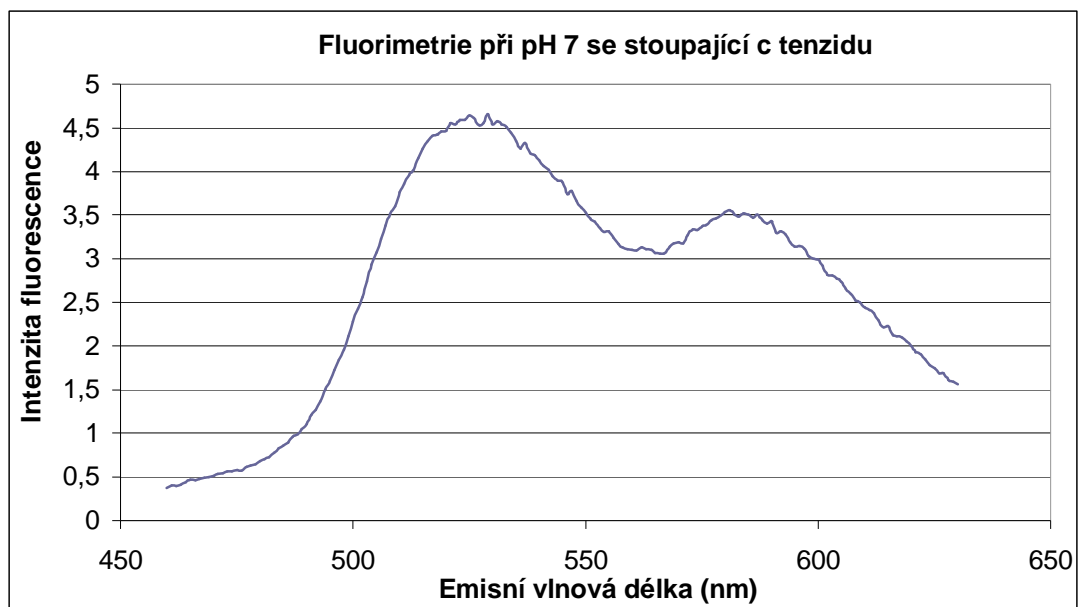
4.2.5. Fluorimetrie u řady se stoupající koncentrací tenzidu a pufrem pH=7

Na fluorimetru jsem měřila spektra vzorků.(viz kapitola 3.4.2.4.). Citlivost byla nastavena na nejméně koncentrovaný vzorek. Vlnové délky vzorků, při nichž byla naměřena maximální fluorescence a intenzity fluorescence jsem uspořádala do tabulky č.21. Graf č.9 znázorňuje emisní fluorescenční spektrum vzorku č.1.

Tabulka č.21: Vlnové délky a intenzity fluorescence v emisním maximu

č. vzorku	λ [nm]	I
1	517	6,083
2	514	6,579
3	515	6,029
4	517	6,107
5	517	6,139
6	517	6,301
7	517	6,333

Graf č.9



5. DISKUSE

5.1. INTERAKCE FENOLOVÉ ČERVENĚ S CETRIMIDEM

Pokusy provedené extrakční spektrofotometrií s roztoky obsahujícími cetrimid a fenolovou červeň ukázaly absorpční maximum při $\text{pH}=8$. Podle literatury (12) je horní mez funkční oblasti (přechodového intervalu) fenolové červě 8,2. Již tento fakt zřejmě svědčí o existenci vzájemného ovlivňování (interakce) obou látek. Je totiž známo, že tenzidy mohou ovlivnit hodnotu pK barviva i velikost funkční oblasti. Podle zákonů, jimiž se řídí procesy extrakční spektrofotometrie, je třeba očekávat nalezení absorpčního maxima v oblasti, kde je barvivo zcela disociováno, proto je možné soudit, že cetrimid má vliv na pK fenolové červě. Z grafu č.1 na str.31 lze vyčíst průběh závislosti absorbance při $\text{pH}=8$ a při absorpčních maximech na přebytku barviva při konstantní koncentraci tenzidu. Tento průběh je zcela ve shodě s dříve naměřenými analogickými závislostmi u jiných barviv a tenzidů, například u roztoků cetrimidu a methylčervě, případně cetylpyridinium chloridu a methylčervě (13).

Je zajímavé, že v případě UV-VIS absorpčních spekter nelze vyzorovat téměř žádné pozoruhodné jevy při zvyšující se koncentraci barviva v roztocích. Vlnové délky absorpčních maxim ve viditelné oblasti zůstávají konstantní a ani hodnoty absorbancí v těchto maximech nevykazují u prvních pěti roztoků (viz tab.č.15 na str.32) žádný trend. Drobné fluktuace těchto absorbancí jsou způsobeny malými nepřesnostmi při přípravě roztoků a odpovídajících slepých roztoků a nelze jim přisuzovat nějaký význam. Pozoruhodný je až razantní vzestup absorbancí posledních dvou roztoků. Graf č.2 na téže straně ukazuje absorpční křivky příslušející těmto dvěma roztokům. Křivky se protínají, což by bylo možné přisoudit dvěma v úvahu přicházejícím jevům. Jedním možným vysvětlením je počínající agregace molekul barviva v roztoku za daných podmínek, která se v tomto případě projevuje hyperchromně-hypochromním posunem. Druhým možným vysvětlením je vliv samotného tenzidu. Zde je však otázkou, proč se tento vliv projeví až při tak velkém přebytku barviva. Je možné uvažovat i o tom, že zjištěné skutečnosti, tj. vzestup absorbancí a křížení absorpčních křivek, jsou způsobeny synergickým působením obou právě zmíněných jevů.

Výsledky měření absorpčních UV-VIS spekter jsou ve shodě s výsledky měření spekter fluorescenčních, kdy se zvyšujícím se přebytkem barviva dochází k bathochromnímu posunu (viz tab.č.16). Nejmarkantnější je tento posun právě mezi spektrem 5. a 6. roztoku, tedy tam, kde v případě absorpčních spekter došlo k vzestupu absorbance. Tvar fluorescenčních spekter se při zvyšování přebytku barviva neměnil, proto je uvedeno pouze vzorové spektrum v grafu č.3. Tato shoda podporuje názor, že při přebytku barviva oproti tenzidu daném koncentrací 6. vzorku dochází ke spontánní agregaci molekul barviva, patrně s přispěním tenzidu. To je potvrzeno i závislostí intenzity fluorescence v emisním maximu na přebytku barviva (viz tab.č.16). U prvních pěti roztoků

tato intenzita poněkud klesá se stoupající koncentrací barviva, což lze vysvětlit filtračním efektem barviva při excitaci a emisi. Hodnoty intenzity fluorescence 6. a 7. vzorku však již tímto způsobem vysvětlit nelze a svědčí patrně o agregaci.

Významný vliv tenzidu na strukturu roztoku fenolové červeně a cetrimidu zcela jasně potvrzují výsledky měření absorpčních křivek barviva při stoupající koncentraci tenzidu (viz tab.č.17, graf č.4). Absorpční křivky se protínají v isosbestickém bodě a v druhém absorpčním maximu je pozorován bathochromní posun. Podobnými výsledky dokazuje Buwalda (6) interakci cetrimidu s některými barvivy.

Bathochromní posun vykazují i emisní maxima měřená u týchž vzorků (graf č.5). Přitom je zajímavé, že rozdíl vlnových délek absorpčního a emisního maxima je přibližně konstantní.

5.2. INTERAKCE FENOLOVÉ ČERVENĚ S BENZETHONIUM CHLORIDEM

V případě roztoků, které obsahovaly fenolovou červeně a benzethonium chlorid byly získány poněkud odlišné výsledky v porovnání s roztoky diskutovanými v předchozí části. Extrakční spektrofotometrií byly získány nejvyšší absorbance při pH=7, což by mělo svědčit o velmi významném vlivu tenzidu na pK barviva. Závislost absorbance na přebytku barviva při konstantní koncentraci tenzidu, znázorněná v grafu č.6, se svým průběhem poněkud odlišuje od analogické závislosti pro cetrimid. Podobná odlišnost uvedených závislostí pro tyto dva tenzidy však již byla pozorována v případě methylčerveně (13). Ovšem získaný průběh diskutované závislosti, charakterizovaný hypochromním posunem při zvyšujícím se přebytku barviva, je možné vysvětlit pouze interakcí tenzidu a barviva v roztoku. Pokud je totiž tenzid nahrazen látkou, která nemá amfifilní povahu, není hypochromní posun pozorován.

V rozporu s tímto závěrem jsou ovšem pozorování provedená pomocí UV-VIS absorpčních spekter. Při měření těchto spekter nebyl pozorován vliv přebytku barviva ani vliv zvyšující se koncentrace tenzidu na jejich tvar, polohu maxim nebo hodnoty absorbancí. Tato pozorování jsou ale na druhou stranu ve shodě s výsledky získanými pro roztoky benzethonium chloridu a methylčerveně (13), kdy rovněž nebyly žádné změny ve spektrech zaznamenány.

Z výsledků fluorescenčních měření se však lze domnívat, že při koncentracích barviva od $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ dochází k agregaci barviva. Svědčí o tom náhlý bathochromní posun i prudká změna intenzity fluorescence při této koncentraci (viz tab.č.20). V případě benzethonium chloridu je však role tenzidu v této agregaci sporná, alespoň z pohledu interpretace emisních spekter, neboť analogický trend lze pozorovat i u příslušných slepých vzorků.

6. ZÁVĚR

Tato diplomová práce se zabývala studiem interakcí tenzidů cetrimidu a benzethonium chloridu s organickým barvivem fenolovou červení prostřednictvím extrakční spektrofotometrie, UV-VIS spektrofotometrie a fluorimetrie.

V případě roztoků cetrimidu a fenolové červeně je možné konstatovat, že všechny tři použité metody prokazují existenci významných interakcí tenzidu a barviva v roztocích. Tyto interakce mají za následek vznik větších agregátů částic. Vzhledem k tomu, že pozitivní výsledky byly získány extrakční spektrofotometrií v nepolárním prostředí (chloroformu) i oběma dalšími metodami v prostředí polárním (pufrované vodné roztoky) je možné mít za prokázané, že k interakcím tenzidu a barviva dochází prostřednictvím hydrofobních i elektrostatických sil.

U roztoků benzethonium chloridu a fenolové červeně je situace poněkud sporná. Zatímco extrakční spektrofotometrie svědčí pro vznik agregátů na základě vzájemných interakcí, UV-VIS absorpční spektrofotometrie žádné interakce neprokázala a fluorimetrie nedala jednoznačnou odpověď. To samo o sobě neznamena, že interakce v této soustavě neexistují, je však pozoruhodné, že obě poslední metody při tomto studiu zklamaly. Tato skutečnost by mohla souviset s odlišným typem hydrofobního řetězce benzethonium chloridu v porovnání s hydrofobním řetězcem cetrimidu. Benzethonium chlorid obsahuje ve svém hydrofobním řetězci etherové můstky, které zřejmě výrazně usnadňují hydrataci tohoto řetězce. K elektrostatickým interakcím pak dochází prostřednictvím molekul vody, což má za následek, že tenzid i barvivo se do značné míry chovají jako oddělené molekuly a vzniklé eventuální agregáty jsou významně hydratovány i uvnitř své struktury. Uvedená hydratace agregátů by mohla mít negativní vliv na projevy agregace při spektrálních měřeních v polárním prostředí.

7. LITERATURA

- (1) Chalabala M. et al.: Technologie léků, nakladatelství Galén, Praha 2001.
- (2) Bhattacharya S., Mandal S.S.: Interaction of surfactants with DNA. Role of hydrophobicity and surface charge on intercalation and DNA melting, *Biochimica et Biophysica acta* 1323 (1997) 29-44.
- (3) Sarma S., Bora M., Dutta R.K.: Effects of alcohol on partition equilibrium of phenol red in micellar solutions and o/w microemulsions of anionic surfactants, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 256 (2005) 105-110.
- (4) Čihalík J., Dvořák J., Suk V.: Příručka měření pH, SNTL, Praha 1975.
- (5) Gasparič J., Barcuchová A., Horká I.: Zjednodušený postup pro extrakčně-fotometrická stanovení organických látek, Farmaceutická fakulta UK v Hradci Králové, 1985.
- (6) Buwalda R.T., Jonker J.M., Engberts J.B.F.N.: Aggregation of Azo Dyes with Cationic Amphiphiles at Low Concentrations in Aqueous Solution, *Langmuir* 15 (1999), 1083-1089.
- (7) 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.
- (8) Karlíček R., a kol.: Analytická chemie pro farmaceuty, Karolinum, Praha 2005.
- (9) Klimeš J., a kol.: Kontrola léčiv I, Karolinum, Praha 2002.
- (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) 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.