

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2010

HELENA BUKATOVÁ

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biofyziky a fyzikální chemie

Interakce tenzidů a organických barviv v roztocích II
Interaction of Tensides and Organic Dyes in Solutions II

Diplomová práce

Diploma thesis

Vedoucí práce: Ing. Vladimír Kubíček, CSc.

Hradec Králové 2010

Helena Bukatová

Čestné prohlášení

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.“

V Hradci Králové 15.05.2010

.....

Helena Bukatová

Poděkování

Mé velké poděkování za cenné rady a připomínky při zpracování diplomové práce, za odborné vedení práce a za čas věnovaný konzultacím k dané problematice patří panu Ing. Kubíčkoví, CSc., vedoucímu mé diplomové práce. Chtěla bych též poděkovat mé rodině a přítelovi, kteří mě podporovali a byli vždy mou velkou oporou.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra biofyziky a fyzikální chemie

Kandidát: Helena Bukatová

Školitel: Ing. Vladimír Kubíček, CSc.

Název diplomové práce: **Interakce tenzidů a organických barviv v roztocích II**

V diplomové práci byly zkoumány interakce vodných roztoků tenzidů a organických barviv v Brittonově-Robinsonově pufru pomocí dvou spektrálních metod, UV-VIS absorpční spektrofotometrie a fluorescenční spektroskopie. Zájem byl soustředěn na dva odlišné systémy barviva s tenzidem: neutrální červeň s laurylsíranem sodným a fenolovou červeň s cetrimidem. Možná ovlivnění byla pozorována v roztocích se vzrůstající koncentrací barviva na několika koncentračních hladinách tenzidů. Úkolem této práce bylo zjistit, zda tenzidy způsobují změny v optických spektrech barviv, a stanovit možné příčiny těchto změn.

Výsledky ukázaly, že absorpční spektra neutrální červeň jsou výrazně odlišná od spekter měřených na samotném barvivu. Tento odlišný charakter absorpčních spekter nastává od koncentrační hladiny laurylsíranu sodného $6 \cdot 10^{-5}$ mol/l. Pravděpodobně vznikají dva nové asociáty barviva s tenzidem. Asociát absorbující při nižší energii je považován za systém tenzidu s dvojitě protonizovaným barvivem.

Fenolová červeň naopak nevykazuje výrazné změny v měřených absorpčních spektrech. Dochází jen k nepatrnému poklesu absorbance při λ_{\max} okolo 559 nm. Tento pokles je přičítán tvorbě iontových párů. Stejně výsledky ukazují i fluorescenční spektra barviva, kde jsou zaznamenány jen nepatrné změny po přidání tenzidu.

Klíčová slova: UV-VIS absorpční spektrofotometrie; Fluorescenční spektroskopie; Neutrální červeň; Fenolová červeň; Povrchově aktivní látky; Interakce tenzid-barvivo

ABSTRACT

Charles University in Prague
Faculty of Pharmacy in Hradec Králové
Department of Biophysics and Physical Chemistry

Candidate: Helena Bukatová

Supervisor: Ing. Vladimír Kubíček, CSc.

Title of diploma thesis: **Interaction of Tensides and Organic Dyes in Solutions II**

This diploma work is devoted to examination of the aqueous solutions of surfactants and organic dyes in the solution of Britton–Robinson buffer by two spectral methods: UV-VIS absorption spectrophotometry and fluorescence spectroscopy. There are two different dye-surfactant systems investigated: neutral red with sodium lauryl sulfate and phenol red with hexadecyl-trimethyl-ammonium bromide. The possible interactions were observed in the several surfactant concentration levels of the solutions with increased dye concentration. The task of my work was investigation of changes in dye spectra as a consequence of the dye-surfactant interaction and determination of the possible origin of the spectra changes.

The results showed that absorption spectra of solutions containing neutral red itself differ sharply from those taken for solutions of neutral red and the tenside. The different character of the spectra is observable from the concentration of the tenside $6 \cdot 10^{-5}$ mol/l. Two types of dye-tenside associate are probably formed. The associate absorbing lower energy is denoted as to be formed by tenside and the neutral red molecule ionized by two protons.

On the contrary phenol red does not exhibit extensive changes in absorption spectra. Slight hypochromic shift at around 559 nm is observed only. The shift is ascribed to ion-pair formation. Analogous results are found in fluorescence spectra, where only slight changes are registered after the tenside is added.

Keywords: UV-VIS absorption spectrophotometry; Fluorescence spectroscopy, Neutral red; Phenol red; Surfactants; Interaction of tensides and dyes

OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	IX
SEZNAM OBRÁZKŮ	X
SEZNAM GRAFŮ Z EXPERIMENTÁLNÍ ČÁSTI	XI
SEZNAM TABULEK	XII
1 ÚVOD	1
2 TEORETICKÁ ČÁST	2
2.1 Základní charakteristika použitých optických metod	2
2.1.1 Principy absorpční spektrofotometrie	2
2.1.2 Principy fluorescenční spektroskopie	4
2.2 Konkrétní informace k použitým barvivům	6
2.2.1 Neutrální červeň.....	6
2.2.2 Fenolová červeň (syn. fenolsulfonftalein)	8
2.3 Přehled informací o povrchově aktivních látkách.....	10
2.3.1 Obecné poznatky o tenzidech	10
2.3.1.1 Základní charakteristika	10
2.3.1.2 Typy tenzidů.....	11
2.3.1.3 Agregační chování tenzidů.....	12
2.3.2 Charakteristika tenzidů použitých v této práci	14
2.3.2.1 Laurylsíran sodný.....	14
2.3.2.2 Cetyltrimethylammonium-bromid	15
2.4 Interakce v systému tenzid-barvivo	15
2.4.1 Tvorba iontových párů barvivo-tenzid	16
2.4.2 Tvorba agregátů barvivo-tenzid.....	18
2.4.3 Předpoklad tvorby iontového páru a následně asociátů barvivo-tenzid .	20

2.4.4	Tvorba nespecifických, J- a H-agregátů	22
2.4.4.1	Molekulární excitonový model	22
2.4.4.2	Nespecifické agregáty	23
2.4.4.3	J-agregáty	23
2.4.4.4	H-agregáty	24
3	CÍL PRÁCE	25
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	26
4.1	Použité chemikálie	26
4.1.1	Seznam chemikálií	26
4.1.2	Strukturní vzorce	26
4.2	Použité přístroje	27
4.3	Příprava zásobních roztoků	28
4.3.1	Zhotovení základních vodných roztoků neutrální červeně	28
4.3.2	Zhotovení základních vodných roztoků SDS	28
4.3.3	Zhotovení základních vodných roztoků fenolové červeně	29
4.3.4	Zhotovení základních vodných roztoků CTAB	29
4.3.5	Příprava univerzálního Brittonova-Robinsonova pufru	30
4.4	Pracovní postup	31
4.4.1	Pozorování interakce neutrální červeně s SDS metodou absorpční spektrofotometrie a následně metodou fluorescenční spektroskopie	31
4.4.1.1	Příprava slepých vzorků NR	31
4.4.1.2	Postup při měření absorpčního spektra NR	32
4.4.1.3	Vzorky s koncentrací SDS $2 \cdot 10^{-5}$ mol/l	32
4.4.1.4	Vzorky s koncentrací SDS $4 \cdot 10^{-5}$ mol/l	32
4.4.1.5	Vzorky s koncentrací SDS $6 \cdot 10^{-5}$ mol/l	32
4.4.1.6	Vzorky s koncentrací SDS $8 \cdot 10^{-5}$ mol/l	32
4.4.1.7	Vzorky s koncentrací SDS $1 \cdot 10^{-4}$ mol/l	33

4.4.2	Pozorování interakce fenolové červeně s CTAB metodou absorpční spektrofotometrie a následně metodou fluorescenční spektroskopie	35
4.4.2.1	Příprava slepých vzorků PR	35
4.4.2.2	Postup při měření absorpčního spektra PR	35
4.4.2.3	Vzorky s koncentrací CTAB $2 \cdot 10^{-5}$ mol/l	36
4.4.2.4	Vzorky s koncentrací CTAB $4 \cdot 10^{-5}$ mol/l	36
4.4.2.5	Vzorky s koncentrací CTAB $6 \cdot 10^{-5}$ mol/l	36
4.4.2.6	Vzorky s koncentrací CTAB $8 \cdot 10^{-5}$ mol/l	36
5	VÝSLEDKY	38
5.1.1	Absorpční spektrum NR v BR pufru	38
5.1.2	Výsledky zkoumání vlivu SDS na optické vlastnosti vodného roztoku neutrální červeně.....	39
5.1.2.1	Výsledky na koncentrační hladině SDS $2 \cdot 10^{-5}$ mol/l	39
5.1.2.2	Výsledky na koncentrační hladině SDS $4 \cdot 10^{-5}$ mol/l	39
5.1.2.3	Výsledky na koncentrační hladině SDS $6 \cdot 10^{-5}$ mol/l	39
5.1.2.4	Výsledky na koncentrační hladině SDS $8 \cdot 10^{-5}$ mol/l	40
5.1.2.5	Výsledky na koncentrační hladině SDS $1 \cdot 10^{-4}$ mol/l	40
5.1.2.6	Výsledky vlivu měnící se koncentrace SDS na stálou koncentraci NR	41
5.1.2.7	Pozorování vlivu SDS na λ_{\max} NR ve VIS oblasti	48
5.1.3	Absorpční spektrum PR v BR pufru	49
5.1.4	Výsledky zkoumání vlivu CTAB na optické vlastnosti vodného roztoku fenolové červeně	50
5.2	Fluorescenční spektroskopie.....	57
5.2.1	Výsledky zkoumání vlivu SDS na intenzitu fluorescence vodného roztoku neutrální červeně.....	57
5.2.2	Výsledky zkoumání vlivu CTAB na intenzitu fluorescence vodného roztoku fenolové červeně	61

6	DISKUSE	64
6.1	Interakce SDS s NR	64
6.2	Interakce CTAB s PR.....	65
7	ZÁVĚR.....	66
8	LITERATURA	68

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

BR pufr	Brittonův-Robinsonův pufr
BR základní roztok	Brittonův-Robinsonův základní roztok kyselin
cmc	kritická micelární koncentrace
CTAB	cetyltrimethylammonium-bromid, cetrimid
HLB	hydrofilně-lipofilní rovnováha
IF	intenzita fluorescence
MO	methyloranž
NR	neutrální červeň - neutrální forma
NRH ⁺	neutrální červeň - kationická forma
NRH ⁺ Cl ⁻	neutrální červeň - hydrogenchlorid
PA	kyselina pikrová
PR	fenolová červeň
SDS	laurylsíran sodný

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr.1. Obecné znázornění absorpčního spektra acidobazického indikátoru v závislosti na pH	3
Obr.2. Schéma zářivých a nezářivých přechodů mezi elektronově vibračními stavy složité molekuly (forma Jablonskiho diagramu)	5
Obr.3. Dvě odlišné protolytické formy NR, kationická a neutrální	6
Obr.4. Absorpční spektra NRH^+Cl^- ($6\mu\text{M}$) ve vodě při různém pH	7
Obr.5. Fluorescenční emisní spektra NR a NRH^+ jak byla obdržena ve vodných roztocích NRH^+Cl^- při pH 9 a 4	7
Obr.6. Změny ve struktuře PR v závislosti na pH prostředí	9
Obr.7. Absorpční spektra fenolsulfonftaleinu o $c=5\cdot 10^{-6}$ M, čísla popisující spektra značí hodnoty pH vodných roztoků	9
Obr.8. Schematické znázornění hydrofobního a hydrofilního hydratačního obalu, které se v amfifilních molekulách překrývají	10
Obr.9. Rozdělení tenzidů	11
Obr.10. Schematické znázornění odlišných typů tenzidů	11
Obr.11. Typické tvary agregátů, do kterých se tenzidy shromažďují ve vodném roztoku	13
Obr.12. Deprotonizace sulfonftaleinových barviv monomerním surfaktantem	17
Obr.13. Agregace amfifilních molekul vede k překrytí hydratačních obalů	18
Obr.14. Schematické znázornění odlišných stupňů interakce barviva s tenzidem při pevné koncentraci barviva	19
Obr.15. Schematické znázornění rozdělení excitačního stavu agregátů barviv	22
Obr.16. Neutrální červeň, hydrogenchlorid	26
Obr.17. Fenolová červeň	27
Obr.18. Laurylsíran sodný	27
Obr.19. Hexadecyltrimethylammonium-bromid, cetrimid	27

SEZNAM GRAFŮ Z EXPERIMENTÁLNÍ ČÁSTI

Obr.20. Absorpční spektra NR o koncentracích $2,81 \cdot 10^{-5}$ mol/l a $8,00 \cdot 10^{-5}$ mol/l	38
Obr.21. Absorpční spektra NR s SDS na koncentrační hladině $2 \cdot 10^{-5}$ mol/l	42
Obr.22. Absorpční spektra NR s SDS na koncentrační hladině $4 \cdot 10^{-5}$ mol/l	43
Obr.23. Absorpční spektra NR s SDS na koncentrační hladině $6 \cdot 10^{-5}$ mol/l	44
Obr.24. Absorpční spektra NR s SDS na koncentrační hladině $8 \cdot 10^{-5}$ mol/l	45
Obr.25. Absorpční spektra NR s SDS na koncentrační hladině $1 \cdot 10^{-4}$ mol/l	46
Obr.26. Absorpční spektra NR o koncentraci $8 \cdot 10^{-5}$ mol/l s SDS	47
Obr.27. Absorbance NR s SDS při λ_{\max} ve VIS oblasti	48
Obr.28. Absorpční spektra PR o koncentracích $2,38 \cdot 10^{-5}$ mol/l a $8,00 \cdot 10^{-5}$ mol/l	49
Obr.29. Absorpční spektra PR s CTAB na koncentrační hladině $2 \cdot 10^{-5}$ mol/l	51
Obr.30. Absorpční spektra PR s CTAB na koncentrační hladině $4 \cdot 10^{-5}$ mol/l	52
Obr.31. Absorpční spektra PR s CTAB na koncentrační hladině $6 \cdot 10^{-5}$ mol/l	53
Obr.32. Absorpční spektra PR s CTAB na koncentrační hladině $8 \cdot 10^{-5}$ mol/l	54
Obr.33. Absorpční spektra PR o koncentraci $8 \cdot 10^{-5}$ mol/l s CTAB	55
Obr.34. Absorbance PR s CTAB při λ_{\max} okolo 559 nm ve VIS oblasti	56
Obr.35. Fluorescenční spektra NR o $c=5,00 \cdot 10^{-5}$ mol/l na různých hladinách SDS	58
Obr.36. Intenzita fluorescence NR v emisních maximech na různých hladinách SDS v závislosti na koncentraci NR	59
Obr.37. Fluorescenční spektra PR o $c=5,00 \cdot 10^{-5}$ mol/l na různých hladinách CTAB ..	61
Obr.38. Intenzita fluorescence PR v emisních maximech na různých hladinách CTAB v závislosti na koncentraci PR	62

SEZNAM TABULEK

Tab.1.: Příprava BR pufru ze 100 ml BR základního roztoku.....	30
Tab.2.: Příprava roztoků slepých vzorků NR	31
Tab.3.: Příprava roztoků vzorků NR s SDS	34
Tab.4.: Příprava roztoků slepých vzorků PR	35
Tab.5.: Příprava roztoků vzorků PR s CTAB	37
Tab.6.: Výsledky zkoumání vlivu SDS na intenzitu fluorescence vodného roztoku NR	60
Tab.7.: Výsledky zkoumání vlivu CTAB na intenzitu fluorescence vodného roztoku PR	63

1 ÚVOD

Interakce tenzidů a barviv patří již delší dobu k velice často studovaným okruhům. Vědci z různých koutů světa usilují o rozluštění vlivu povrchově aktivních látek na fyzikální (především optické) a chemické vlastnosti rozličných organických barviv solvatovaných různými typy rozpouštědel. Do popředí vystupují studie s azobarvivy, sulfonftaleinovými barvivy, fenazinovými barvivy, ale i porfyriny v roztocích s kationaktivními, anionaktivními a neionickými tenzidy.

Je snahou najít v těchto systémech obecné závislosti změn vlastností barviv po přidání tenzidu, které by se daly uplatnit v různých oborech. Systém tenzid-barvivo je již stěžejní v barvířském a fotografickém průmyslu, v biologické a medicínské fotosenzitizaci, v analytických vědách, oborech zabývajících se životním prostředím a v řadě dalších použití [1].

V minulosti bylo již mnohokrát zpozorováno, že se mění barva acidobazických indikátorů po přidavku detergentů. Tento efekt nastal jen v přítomnosti opačně nabitého tenzidu oproti disociované indikátorové molekule. Čerstvě připravený roztok barviva a tenzidu nesoucího opačný náboj oproti barvivu poskytuje široké absorpční spektrum, které není shodné s naměřeným spektrem monomerní či dimerní formy barviva [1]. V tomto systému se předpokládá tvorba různých forem asociátů, které jsou příčinou změn v optických vlastnostech roztoků barviv. Důležitou roli při tvorbě rozličných premicelárních útvarů hrají hydrofobní a elektrostatické interakce, což řada autorů potvrzuje ve svých dílech.

Katedra biofyziky a fyzikální chemie se též zabývá těmito interakcemi. Příspěním k řešení dané problematiky jsou poznatky publikovaného článku o interakci methylované kyseliny pikrové s kationickými tenzidy pomocí dvou spektrálních metod, extrakční a UV-VIS spektrofotometrie.

Při řešení své práce vycházím z poznatků daných studií, které se převážně zaměřují na ovlivnění spektroskopických vlastností při vzrůstající koncentraci tenzidu a zároveň stálé koncentraci barviva. Mnou prováděné postupy měření vychází z odlišného přístupu: v dané vzrůstající koncentrační řadě barviva je koncentrace tenzidu stálá, a zároveň jsou měření prováděna na několika koncentračních hladinách tenzidu. Při praktickém vypracování jsem využívala dvě optické metody, absorpční a fluorescenční spektroskopii.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Základní charakteristika použitých optických metod

V diplomové práci byly použity dvě základní spektroskopické metody: UV-VIS absorpční spektrofotometrie a fluorimetrie.

2.1.1 Principy absorpční spektrofotometrie

První metoda, nazývaná absorpční spektrofotometrie v ultrafialové a viditelné oblasti, je založena na absorpci světelných kvant hmotným prostředím (skládajícím se z molekul) při přechodu z nižšího elektronového stavu do vyššího. Jedná se o přechody valenčních elektronů ze základních orbitalů na orbitály antivazebné (excitované) [2,3].

Seskupení atomů v molekulách nazývané **chromofor** způsobuje absorpci v oblasti 200-800nm, která je ve spektru vyjádřena absorpčním pásem. Častými chromofory jsou organické aromatické či heterocyklické sloučeniny s rozsáhlým systémem konjugovaných dvojných vazeb, dále sloučeniny nearomatické s násobnými vazbami [2]. Konjugace snižuje energii potřebnou k příslušným elektronovým přeskokům, z toho vyplývá, že s prodlužováním konjugovaného řetězce se posunuje maximum absorpce k vyšším λ [3]. Použitá organická barviva tímto systémem konjugovaných vazeb oplývají, tudíž lze změřit charakteristické elektronové molekulové spektrum.

Molekuly barviv se tedy skládají již z dříve popsaného chromoforu, dále však také z auxochromů a tzv. modifikátorů. **Auxochromy** jako karboxylový, hydroxylový či aminosubstituent pozměňují barvu molekul a jsou odpovědní (pokud jsou ionizovatelné) při barvení v textilním průmyslu za vazbu molekul na vlákna. Alkylové skupiny se nazývají modifikátory, mohou ovlivňovat též barvu a tím spektra barviv [4].

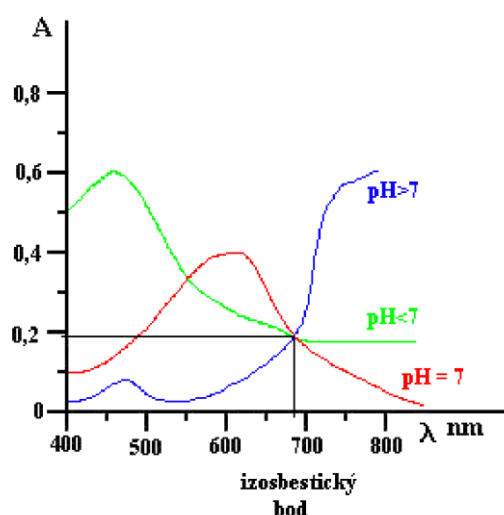
Lidské oko zaznamenává pouze vlnové délky ve viditelné oblasti, které rozlišuje jako barvy. Barevnost látek je způsobena zachycením odrážejícího se a propuštěného světla, ve kterém chybějí pohlcené vlnové délky. Barva je komplementární k barvě odpovídající absorbovaným vlnovým délkám. Proto se nám jeví roztoky NR jako tmavočervené, neboť vlnové délky u absorbovaného pásu se pohybují okolo 530 nm, to znamená, že absorbovaná barva je zelená [3].

Ve své diplomové práci jsem měřila závislost absorpce na vlnové délce systému barvivo-tenzid. Absorpční pás je charakterizován absorpčním maximem při λ_{\max} .

Absorpční spektrum je charakteristické pro každou látku a zároveň přináší základní informace o absorbujícím prostředí, včetně rozpouštědla [5]. Ke změnám ve spektru dochází následkem disociace, dimerizace, reakce s rozpouštědlem, tvorbou komplexů nebo i změnou teploty [2]. Posun maxima absorpce k vyšším hodnotám λ se nazývá bathochromní, posun k nižším hodnotám λ je hypsochromní, posun k vyšší absorbanci je hyperchromií, posun k nižší absorbanci je hypochromií [3].

Je-li v analyzovaném roztoku více absorbujících složek, je výsledná absorbance součtem jednotlivých absorbancí přítomných složek. Absorbance má aditivní charakter. Při měření vzorků konkrétních barviv je vhodné eliminovat absorbanci rušících složek pomocí slepých roztoků.

Použitá barviva patří do skupiny acidobazických indikátorů a při odlišném pH prostředí vykazují jiné absorbanční křivky s jinými maximy absorbancí, jak ukazuje obecný příklad (obr.1.) [5].



Obr.1. Obecné znázornění absorpčního spektra acidobazického indikátoru v závislosti na pH, převzato z [5]

Z předchozího odstavce vyplývá, že nedisociovaná a disociovaná forma těchto organických sloučenin se liší barvou. Disociace acidobazického indikátoru je znázorněna rovnicí (1),



kde $HInd$ je nedisociovaná forma indikátoru, Ind^- je disociovaná forma indikátoru a H^+ je proton vznikající při této disociaci.

Poměr nedisociované a disociované formy závisí na pH, jak vyplývá ze vztahu (2),

$$pH = pK_{ind} + \log \frac{[Ind^-]}{[HInd]} \quad (2)$$

kde pH je pH prostředí, pK_{ind} je disociační konstantou indikátoru, $[Ind^-]$ je koncentrace disociované formy a $[HInd]$ je koncentrace nedisociované formy indikátoru.

Z rovnice (2) plyne, že poměr koncentrací disociované a nedisociované formy indikátoru závisí na pH. Změní-li se tento poměr z 1:10 na 10:1, zaznamená lidské oko barevnou změnu. To znamená, že barevný přechod proběhne v rozmezí přibližně dvou jednotek pH kolem pK_{ind} . Toto rozmezí pH se nazývá funkční oblast indikátoru. Barevný přechod acidobazických indikátorů je nejvýraznější v oblasti, kde $pH=pK_{ind}$ [3].

2.1.2 Principy fluorescenční spektroskopie

Metoda, která je založena na emisi záření molekulou při přechodu elektronu z vyšší hladiny do nižší, se obecně nazývá luminiscenční analýza [2]. Molekuly excitované absorpcí energie jsou nestabilní a snaží se navrátit do základních energetických stavů (nejčastěji přeměnou na teplo). V některých případech se molekuly zbavují přebytečné energie vyzářením ve formě elektromagnetického záření, které se označuje jako záření luminiscenční a poskytuje luminiscenční spektrum [3].

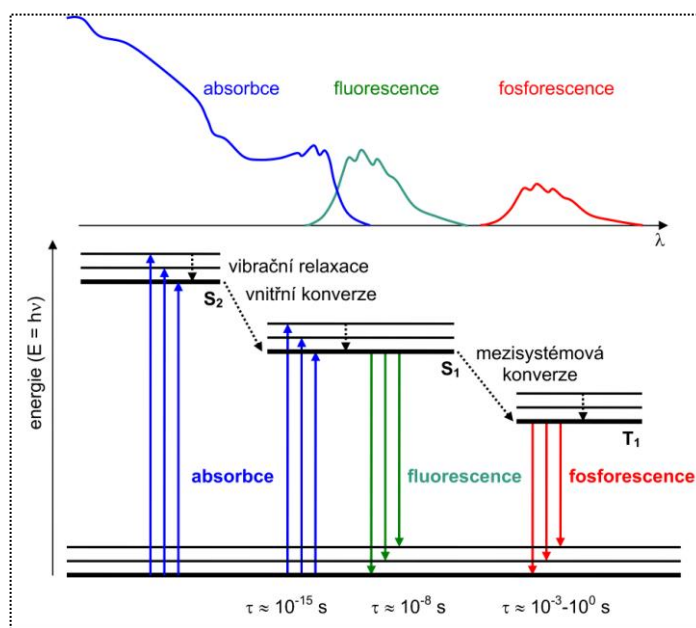
Luminiscence se dělí na: fluorescenci, fosforescenci a zpožděnou fluorescenci (viz obr.2.), které se liší tzv. dobou dosvitu. Doba dosvitu je časový interval mezi ukončením excitace a luminiscenčním vyzářením. Charakteristické je též teplotní zhášení luminiscence, tj. snižování kvantového výtěžku s teplotou [3, 6].

Ve své práci jsem se zabývala fluorescencí daných roztoků barviv v přítomnosti tenzidu, která nastala excitací molekul světlem, jedná se tedy o fotoluminiscenci. O fluorescenci mluvíme, nastane-li emise záření z excitovaného elektronového stavu jedním či více spontánními energetickými přechody (zářivý přechod, obvykle z rovnovážné vibrační hladiny stavu S_1 do některé z vibračních hladin základního stavu S_0) a zpravidla ji pozorujeme během buzení a po jeho vypnutí prakticky ihned mizí (doba dohasínání je obvykle řádově 10^{-8} s).

Většina složitých organických molekul nefluoreskuje; intenzivní fluorescenci vykazují některé aromatické sloučeniny (polyaromatické uhlovodíky nebo heterocykly) nazývané **fluorofory** nebo **fluorescenční barviva**.

Na obr.2. je zjednodušené schéma zářivých a nezářivých přechodů mezi elektronově vibračními stavy složité molekuly a tvar absorpčních a emisních spekter (λ -vlnová délka). Po absorpci světelného kvanta budícího záření (viz modré šipky) přechází elektrony ze singletního stavu S_0 do excitovaných singletních stavů S_1 , S_2 , ... a tripletních stavů T_1 , T_2 , 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; viz zelené a červené šipky) nebo nezářivými přechody (vnitřní konverze, mezisystémová konverze, vibrační relaxace; viz černé tečkované šipky). Doba trvání τ jednotlivých procesů je pro absorpci řádově 10^{-15} s, pro fluorescenci 10^{-8} s, pro fosforescenci je mnohem delší než 10^{-8} s (obvykle milisekundy až sekundy), pro vibrační relaxaci 10^{-12} - 10^{-13} s, pro vnitřní konverzi 10^{-6} - 10^{-12} s, pro mezisystémovou konverzi 10^{-4} - 10^{-12} s [6].



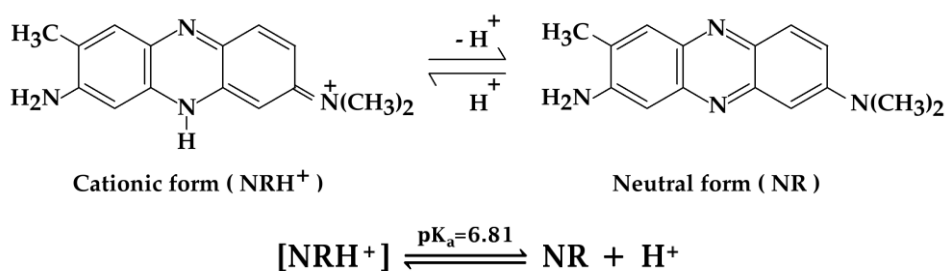
Obr.2. Schéma zářivých a nezářivých přechodů mezi elektronově vibračními stavy složité molekuly (forma Jablonskiho diagramu), převzato z [6]

2.2 Konkrétní informace k použitým barvivům

2.2.1 Neutrální červeně

Co se týče vzhledu, jedná se o tmavě zelený až černý prášek, který je při 25°C dobře rozpustný ve vodě (50 g/l) [7]. Chemickou strukturou náleží k fenazinovým sloučeninám (viz obr.16.). Tato látka se považuje za významný acidobazický indikátor a barvivo vitálních tkání. Jako pH indikátor mění zabarvení blízko neutrální oblasti pH (pK_a barviva 6,8) z červeného v kyselém pH na žluté v zásaditém pH [8].

V roztocích může neutrální červeně existovat ve dvou rozdílných protolytických formách, jmenovitě kationická forma (NRH^+) a neutrální forma (NR) (viz obr.3.) [9]. Ve vodném roztoku jsou přítomny obě formy v rovnováze [8]. V mnoha organických rozpouštědlech koexistují obě formy barviva v různých poměrech v závislosti na koncentraci barviva a druhu rozpouštědla [9].

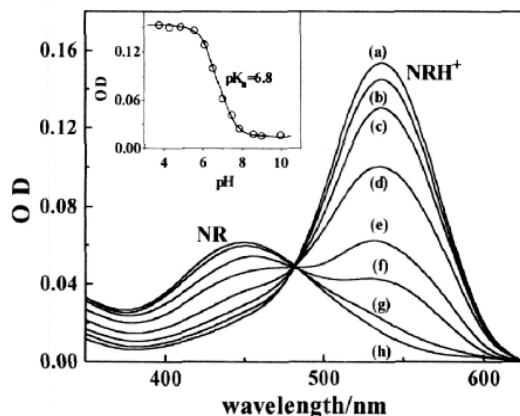


Obr.3. Dvě odlišné protolytické formy NR, kationická a neutrální, převzato z [9]

Rozpustnost NRH^+Cl^- ve vodě je docela dobrá a ve vodných roztocích lze pozorovat absorpční spektra kationické formy barviva s absorpčním maximem okolo 535 nm [9]. Pozice λ_{max} NRH^+ je závislá na složení tlumivé soustavy roztoku a její rozdílnost je připisována různé tvorbě dimerů a vyšších agregátů barviva v odlišných pufovacích systémech [8].

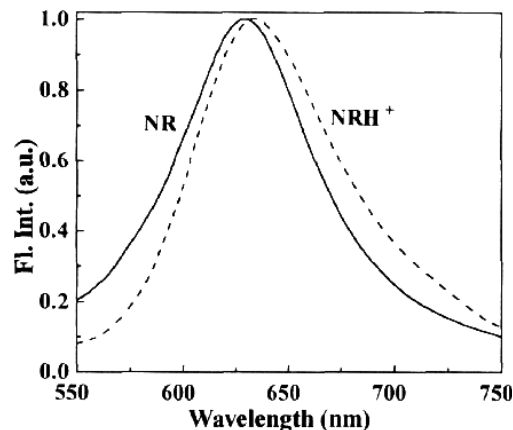
Ve vodných roztocích NRH^+Cl^- existuje téměř 100% barviva jako NRH^+ forma. Pokud pH roztoku zvýšíme, NRH^+ podléhá deprotonaci na NR, která vykazuje absorpční maximum při 452 nm (viz obr.4.) [9].

Indičtí autoři při svých pokusech též měřili fluorescenční spektra NRH^+ v různých rozpouštědlech. Ve vodném prostředí mírně okyseleném stanovili λ_{em} NRH^+ na 635 nm a porovnávali ji i s neutrální formou červeně. (viz obr.5.) [9].



Obr.4. Absorpční spektra NRH^+Cl^- ($6\mu\text{M}$) ve vodě při různém pH: (a) 3,8; (b) 5,6; (c) 6,1; (d) 6,5; (e) 7,0; (f) 7,5; (g) 7,9; (h) 10,0

Vložený obr.: změna absorbance s pH při 535 nm, převzato z [9]



Obr.5. Fluorescenční emisní spektra NR a NRH^+ jak byla obdržena ve vodných roztocích NRH^+Cl^- při pH 9 a 4, převzato z [9].

M. A Rauf et al. [10] ve své práci uvádějí významný vliv rozpouštědla na spektrální vlastnosti NR. Pro svou studii zvolili jedenáct druhů rozpouštědel s různou polaritou a rozpouštědla si rozdělili na dvě skupiny, na barviva tvořící vodíkové můstky a na barviva bez této schopnosti. Důležitým procesem při rozpouštění barviva, který autoři uvádějí, je tvorba dipól-dipólových interakcí v rozpouštědlech netvořících vodíkové můstky a tvorba vodíkových můstků v procesu rozpouštění v druhé skupině. Výsledkem jejich měření bylo zjištění posunu absorpčních maxim v závislosti na polaritě rozpouštědla a jiných vlastnostech rozpouštědla. V této studii bylo zjištěno, že v nejméně polárním rozpouštědle chloroformu je λ_{max} nejnižší (522 nm), zatímco v polárních rozpouštědlech je λ_{max} až o 22 nm vyšší. To je autory vysvětleno prostřednictvím tvorby silných vodíkových můstků mezi molekulami polárního rozpouštědla, tudíž jejich schopnost interagovat s barvivem je menší než v apolárním chloroformu. Spektrální změny pozorované ve vodě jsou ale zcela odlišné od těch v jiných rozpouštědlech. Ve vodě byla autory naměřena $\lambda_{\text{max}} = 527 \text{ nm}$, kterou vysvětlují tvorbou silných vodíkových můstků mezi molekulami vody a barvivem.

M.K. Singh a jeho spolupracovníci sledovali fotofyzikální vlastnosti kationické formy neutrální červeně v různých rozpouštědlech. Z jejich závěrů vyplývá, že absorpční a fluorescenční charakteristika barviva v protických rozpouštědlech vykazuje existenci intermolekulárních vodíkových můstků mezi NRH^+ a molekulami rozpouštědla, a to jak v základním stavu, tak ve stavu excitovaném [9]. Zde se opět ukazuje důležitost výběru rozpouštědla pro jeho vliv na optické vlastnosti barviva.

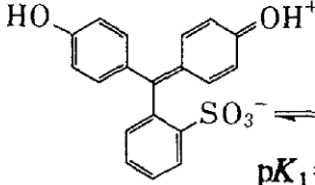
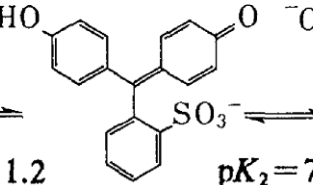
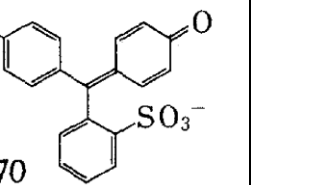
Z uvedených článků plyne důležitá podmínka pro správné posuzování vlivu interakce tenzidu s barvivem, a to zachování shodného rozpouštědla i shodného pH pro všechna měření.

2.2.2 Fenolová červeně (syn. fenolsulfonftalein)

Toto barvivo existuje ve formě světle až tmavě červeného krystalického prášku, který je velmi těžce rozpustný ve vodě (0,77 g/l při 100°C [11]) a těžce rozpustný v lihu 96%. Součástí totožnosti dle lékopisu je zkouška absorbance v roztoku uhličitanu sodného, v němž má PR absorpční maximum při $\lambda_{\text{max}}=558 \text{ nm}$ [12].

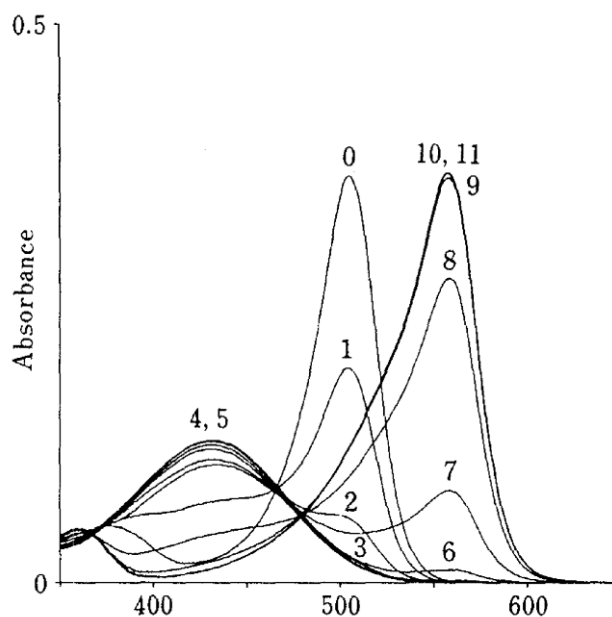
Pokud se budeme zabývat chemickou strukturou, zařadíme tuto sloučeninu k trifenylmethanovým sloučeninám do skupiny sulfonftaleinových barviv (viz obr.17.). V mnoha zdrojích je ukázána struktura PR s atomem síry jako součástí cyklického kruhu, tedy sulfonového kruhu, podobně jako u struktury fenolftaleinu. Avšak cyklický kruh v krystalické formě barviva nebyl potvrzen rentgenovou krystalografií provedenou japonskými autory, kteří vyvodili z měření strukturu barviva jako obojetného iontu [13, 14].

Toto barvivo se používá v mnoha oborech, které využívají jeho charakteristickou indikátorovou vlastnost v různých prostředích. Sloučenina vykazuje dva barevné přechody (v $\text{pH}\approx 1,2$ a v $\text{pH}\approx 7,7$). Barevné změny jsou způsobeny deprotonací barviva se zvyšujícím se pH. V krystalické formě a velmi kyselém roztoku se vyskytuje struktura jako obojetný ion (H_2In) se sulfátovou skupinou nabitou negativně a s ketonovou skupinou nesoucí přídatný proton, tudíž kladný náboj. Pokud pH zvýšíme, odpojí se proton z ketoskupiny (HIn^-) a roztok se zbarví žlutě. Při zásaditém pH dochází i ke ztrátě protonu na zbývajícím hydroxyly (In^{2-}) a zbarvení přechází na červené. Vše je znázorněno v obr.6. [14].

TVAR	H_2In	HIn^-	In^{2-}
STRUKTURA	 <p>H_2+PS^- orange-red</p>	 <p>HPS^- yellow</p>	 <p>PS^{2-} red</p>
BARVA	červeno-oranžová	žlutá	červená

Obr.6. Změny ve struktuře PR v závislosti na pH prostředí, převzato z [14]

Závislost absorpce acidobazického indikátoru na pH prostředí je velice výrazná. Absorpční spektra fenolové červeně ve vodném roztoku (viz obr.7.) demonstrují, že konkrétní formy dominují při $pH < 1$ pro H_2In , $pH = 4$ pro HIn^- a $pH > 11$ pro In^{2-} [14].



Obr.7. Absorpční spektra fenolsulfonftaleinu o $c = 5 \cdot 10^{-6}$ M, čísla popisující spektra značí hodnoty pH vodných roztoků, převzato z [14]

2.3 Přehled informací o povrchově aktivních látkách

2.3.1 Obecné poznatky o tenzidech

Chemická a fyzikální struktura molekul těchto sloučenin hraje významnou roli v interakčních procesech. V následujícím textu budou popsány některé společné rysy, kterými tyto látky disponují:

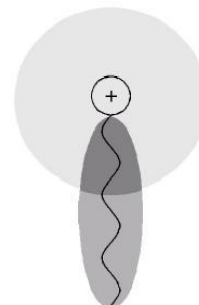
2.3.1.1 Základní charakteristika

Název tenzidy (surfaktanty) je odvozen z povrchové aktivity těchto amfifilních sloučenin, z jejich silné pozitivní adsorpce na povrchu vodné fáze, olejové fáze a na fázových rozhraních. Molekuly vykazují silně asymetrický bipolární charakter s výrazným dipólovým momentem. Látky s touto strukturou molekuly se nazývají **amfipatické** nebo také **amfifilní**. Molekuly nebo ionty tenzidů se tak vyznačují dvojakým charakterem, skládají se z rozsáhlejší *lipofilní* (hydrofobní) části a menší *hydrofilní* části. Přes velmi rozdílné struktury se molekuly nebo ionty tenzidů obrazně znázorňují jako malá hydrofilní hlavička s lomeným flexibilním lipofilním chvostíkem [15].

Lipofilní část (nepolární část) je nejčastěji představovaná nepolární uhlovodíkovou strukturou, v jednoduchém případě delším alkylovým řetězcem, a umožňuje rozpustnost v nepolárních rozpouštědlech. Tato část odpuzuje 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 nevásovcových interakcí. Z této oblasti interakcí jsou molekuly vody vytlačovány [15].

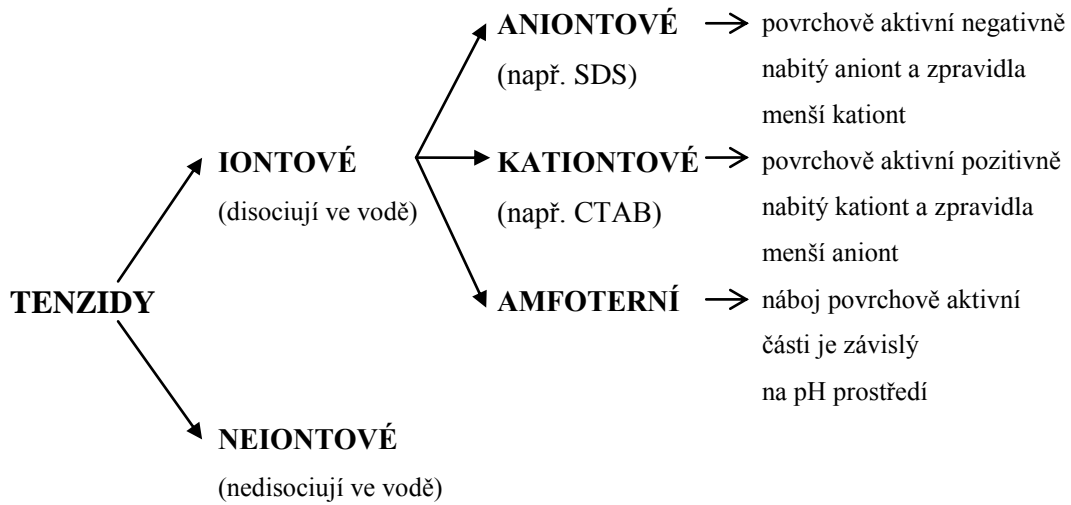
Hydrofilní část (polární část) určuje afinitu tenzidu k vodě a zabezpečuje rozpustnost tenzidu ve vodě a jiných polárních rozpouštědlech. Ve vodném prostředí se kolem ní vytváří solvatační obal. Míra hydratace polární části je přímo úměrná její polaritě [15]. Všeobecně se hydratace polární skupiny prostírá až k třetímu uhlíku v apolární části molekuly tenzidu (viz obr.8.) [4].

Obr.8. Schematické znázornění hydrofobního a hydrofilního hydratačního obalu, které se v amfifilních molekulách překrývají, převzato z [4]



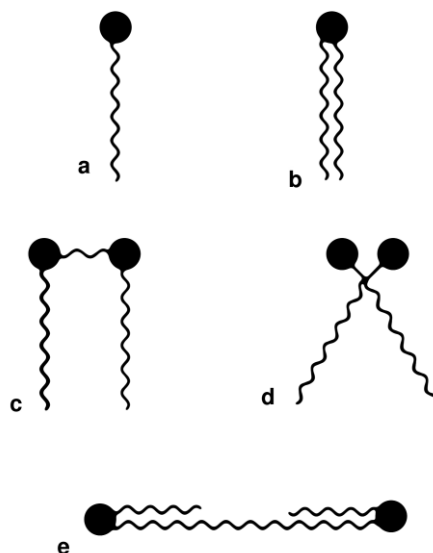
2.3.1.2 Typy tenzidů

Základní rozdělení podle schopnosti disociace a typu hydrofilní části tenzidu udává obr.9.



Obr.9. Rozdělení tenzidů [15]

Další rozdělení tenzidů může být dle jejich celkové struktury, míněno dle počtu hydrofilních a hydrofobních částí. Takové tenzidy jsou buď tradiční jednořetězcové či dvouřetězcové připojené k jedné hlavě tenzidu. Zvláštním typem tenzidů jsou tenzidy „gemini“ (z angl. blíženci) a „bolaform“ tenzidy (viz obr.10.) [4].



Obr.10. Schematické znázornění odlišných typů tenzidů:

a jednořetězcový, b dvouřetězcový, c a d „gemini“,
e „bolaform“, převzato z [4]

„Gemini“ tenzidy jsou novým nadřazeným typem tenzidů. Název je odvozen od dané dimerní struktury: dva hydrokarbonové řetězce, dvě hydrofilní hlavové skupiny a rovina symetrie nebo C2 osa jako spojka. Tyto tenzidy disponují lepšími vlastnostmi než jejich jednotlivé monomerní složky (nižší cmc, větším snižováním povrchového napětí,...atd.). „Bolaform“ tenzidy se skládají z dvou hydrofilních hlav spojených hydrokarbonovou spojkou [4].

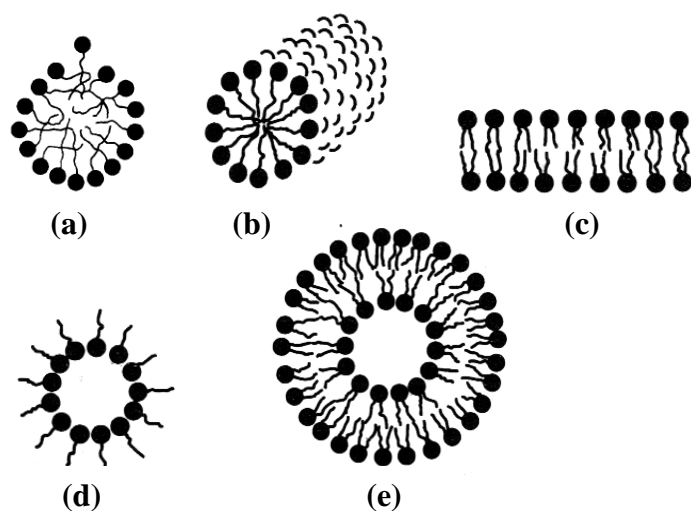
V technologii léků je obvyklé třídění tenzidů podle jejich iontového charakteru a podle hydrofilně-lipofilní rovnováhy. HLB tenzidu se klasifikuje bezrozměrným číslem. V současnosti se používají hodnoty HLB počítané podle strukturního vzorce dohodnutým způsobem sumace tabulkových hydrofilních a lipofilních příspěvků jednotlivých skupin. Čím je číslo HLB větší, tím je tenzid hydrofilnější. Hodnoty HLB tenzidů použitých v mé práci jsou následující: HLB(SDS)=40, HLB(CTAB)=30 [15].

2.3.1.3 AgregáčnÍ chování tenzidů

Pokud se tenzidy rozpouštějí ve vodě, vytvářejí nejprve pravé roztoky s monovrstvami molekul na povrchu vodné fáze či fázovém rozhraní, ale od určité **tzv. kritické micelární koncentrace** se molekuly nebo ionty tenzidů v roztoku asociují, shlukují na koloidní micely. Při rostoucí koncentraci tenzidu, neboli při klesajícím podílu vody v systému, pak asociace pokračuje tvorbou dalších rozličných koloidních struktur (hexagonální fáze, lamelární fáze představující předěl, a následně nastává inverzní pořadí fází s reverzně uspořádanými asociáty (viz obr.11.)) [15].

Tvar agregátu je hlavně určen citlivou rovnováhou mezi přitažlivými hydrofobními interakcemi alkylových řetězců a elektrostatickým odpuzováním polárních skupin v hydrofilní hlavičce tenzidu. Molekulární architektura daných tenzidů určuje typ agregátu, do kterého se tenzid ve vodných roztocích asociuje [4]. Asociace tenzidů je vratná, zředěním až na nižší koncentraci, než je příslušná cmc, se koloidní systém vrátí zpět na původní pravý roztok.

Tvorba koloidních asociátů je především důsledkem hydrofobních interakcí, tendencí lipofilních skupin se vzájemně sdružovat, aby se zbavily energeticky nevýhodného kontaktu s vodou. Důsledkem náhlého vzniku micel je také náhlý zlom fyzikálních vlastností roztoku, z kterého se většinou experimentálně určuje cmc tenzidu.



Obr.11. Typické tvary agregátů, do kterých se tenzidy shromažďují ve vodném roztoku:

- (a) sférické micely (b) tyčinkovité, válcovité micely
 (c) lamelární dvojvrstva (d) reverzní micely
 (e) vesikuly, převzato z [4]

Čím je tenzid lipofilnější, tím je jeho cmc nižší, běžné tenzidy mají cmc zhruba v rozsahu 10^{-2} - 10^{-4} mol/l. Přídavek soli (elektrolytu), která s tenzidem nereaguje, podporuje micelizaci a snižuje cmc zejména iontových tenzidů. Přídavek lihu nebo jiného málo polárního rozpouštědla do vodného roztoku zvyšuje rozpustnost tenzidů, ale současně potlačuje jejich micelizaci, takže zvyšuje cmc. Micelizaci naopak podporuje tvorba směsných micel, tenzidy s lipofilními nečistotami nebo směsi tenzidů mají podstatně nižší cmc než čisté složky [15]. Agregace se ve vodných směsích aniontového a kationtového tenzidu objeví při koncentraci, která je značně snížena oproti cmc jednotlivých tenzidů. V systému tenzid-barvivo jsou cmc obvykle také nižší než ty měřené v nepřítomnosti barviva [4].

Tenzidy slouží též jako micelární solubilizátory organických látek. Při zabudování barviv do micel po překročení cmc lze dle jejich slabě amfifilního charakteru předpokládat stejnou orientaci v micelle jako mají tenzidy [15].

2.3.2 Charakteristika tenzidů použitých v této práci

Použité tenzidy nevykazují fluorescenci ve vodných roztocích [16].

2.3.2.1 Laurylsíran sodný

Pevný bílý prášek se velmi dobře rozpouští ve vodě (150 g/l při 20°C) za vzniku opalizujícího roztoku, po protřepání se vytvoří bohatá pěna prokazující totožnost této látky [17 a., 12]. Vodný roztok SDS má malý absorpční pás kolem 300 nm, pod cmc je ale pás téměř nerozlišitelný, ve viditelné oblasti roztok neabsorbuje [18].

Tato sloučenina je po chemické stránce monoester kyseliny sírové (viz obr.18.), který se připravuje reakcí laurylalkoholu s kyselinou sírovou a následnou neutralizací uhličitánem sodným. Molekula obsahuje 12 uhlíků v řetězci (hydrofobní část), na které je napojena sulfátová skupina (hydrofilní část), jedná se tedy o látku povrchově aktivní, látku amfifilního charakteru [15].

Z pohledu této diplomové práce je důležité zařazení této sloučeniny k anionickým tenzidům [15]. Agregace a fázové chování SDS ve vodných roztocích byly detailně studovány. SDS tvoří ve vodných roztocích micely, zatímco po přidání chloridů alkalických kovů vznikají lamelární struktury tenzidu. Stejně tak vznikají lamelární struktury po zahřátí nad Krafftovu teplotu, tyto jsou označovány jako myelinová vlákna [4] a skládají se z tyčinkovitých útvarů, které obklopují centrální osu vodného jádra [19]. Při míchání se z těchto útvarů tvoří vesikuly.

L. García-Río a jeho spolupracovníci měřili cmc SDS pomocí změn v měrné vodivosti roztoku a potvrdili tak mnoha literaturami uváděnou cmc $8,0 \cdot 10^{-3}$ mol/l vodného roztoku SDS při 25°C. Autoři ve své studii uvádějí i možnost ovlivnění cmc malým množstvím krystalové violeti řádově 10^{-6} mol/l, tuto možnost však měřeními vyvrátili, neboť tak malá koncentrace barviva byla bez vlivu na cmc tenzidu v koncentraci o tři řády vyšší. V práci je též zmíněna možnost tvorby premicelárních agregátů ze samotného tenzidu pod cmc, tuto koncentraci autoři označují cmc'. Při ní dochází k výrazným změnám ve spektru [1].

Při měření povrchového napětí roztoku SDS ve fosfátovém pufru o pH 7 byla indickými autory zjištěna [8] cmc $7,4 \cdot 10^{-4}$ mol/l. S přidavkem elektrolytu se snižuje cmc, jak již bylo uvedeno dříve. V BR pufru o pH=5,02 je cmc $4,6 \cdot 10^{-3}$ mol/l [20].

2.3.2.2 Cetyltrimethylammonium-bromid

Bílá či téměř bílá pevná látka, která je těžce rozpustná ve vodě (3 g/l při 20°C). Při pokojové teplotě jsou roztoky stálé několik let [17 b.]. Z etikety suroviny je patrné, že CTAB (0,1 M ve vodě) má absorpční maxima při 260 nm a 280 nm, tedy v UV oblasti, z čehož vyplývá, že neruší svou absorpční spektra barviva ve VIS oblasti.

Sloučenina je charakteru kvartérní amoniové soli s třemi methyly a s 16-ti uhlíkatým řetězcem, které jsou připojeny k dusíku, nesoucím tímto kladný náboj (viz obr.19.). Jako v předchozím případě se jedná o amfifilní molekulu s částí hydrofobní (16-ti uhlíkatý řetězec) a s částí hydrofilní (kladný dusíkatý atom). Tato látka patří do skupiny kationických tenzidů [15].

Zmínit bych měla jeho kritickou micelární koncentraci ve vodném roztoku, která má hodnotu $9,2 \cdot 10^{-4}$ mol/l [21, 22]. V přítomnosti PR o koncentraci $2,5 \cdot 10^{-5}$ mol/l se ve vodném roztoku při 25°C snižuje na $6,0 \cdot 10^{-4}$ mol/l [21]. V BR pufru byla naměřena při 25°C cmc $2,3 \cdot 10^{-4}$ mol/l [23], což odpovídá prostředí použitému v mé diplomové práci. Lze tedy počítat ještě se snížením po přidání barviva. V boritanovém pufru o pH 9,4 při 30°C je cmc CTAB $10 \cdot 10^{-4}$ mol/l a s 25 μ M koncentrací MO je pozorována agregační koncentrace $0,24 \cdot 10^{-4}$ mol/l [19]. Zde je patrné velké ovlivnění cmc nejen prostředím, ale i samotným barvivem, s nímž tvoří tenzid agregáty a tato koncentrace je pak označována jako agregační koncentrace systému tenzid-barvivo [4] a jde o již zmíněnou cmc' (kritickou premicelární koncentraci) [1].

2.4 Interakce v systému tenzid-barvivo

Hydrofobní interakce patří k nejdůležitějším nekovalentním vazbám a hrají velmi důležitou roli v mnoha biologických procesech. Řada pochodů ve vodných roztocích jako je konformace proteinů, agregace tenzidů či molekulární rozpoznávací procesy (enzym-substrátový systém) silně závisí na interakcích mezi apolárními částmi molekul sloučenin. K dalším nekovalentním vazbám, které hrají důležitou roli, patří vodíkové můstky a elektrostatické interakce. Často dochází k souhře všech zmíněných typů vazeb [4].

Informace o interakcích mezi barvivem a iontovými tenzidy mohou přispívat k našemu pochopení působení kombinovaných elektrostatických a hydrofobních interakcí při těchto procesech. Variabilita ve spektrálním chování vodných roztoků

iontových barviv, pozorována po přidání opačně nabitých iontových tenzidů v koncentracích pod cmc, je přisuzována: tvorbě iontového páru, tvorbě soli barvivo-tenzid, vzniku molekulárního komplexu, dostatkem barviva indukovaným micelám, indukovaným agregátům z molekul barviva, agregaci barvivo-tenzidového komplexu či změnám v mikroprostředí chromoforu barviva. Avšak původ interakcí se může měnit s rozdílnými typy systémů barvivo-tenzid [22].

2.4.1 Tvorba iontových párů barvivo-tenzid

Předpokladem vzniku iontových párů je přítomnost opačně nabitých molekul barviva a tenzidu.

Indičtí autoři [21] studovali vliv různých typů tenzidů (nesoucích kladný náboj) na spektrální vlastnosti methyloranže. Ve svých pokusech zjistili, že ve vodných roztocích s velmi malou koncentrací tenzidu klesá absorbance při 463 nm (λ_{\max} typická pro samotnou MO) rapidně se vzrůstající koncentrací tenzidu. Přitom vzniká nový absorpční pás při λ_{\max} 375 nm, který je v této studii přiřazen tvorbě iontového páru mezi danými komponentami. Nově vzniklý pás nelze spojovat s tvorbou samotných dimerů barviva, což bylo i potvrzeno cirkulárním dichroismem. Na druhé straně se nejedná ani o další deprotonizaci barviva, neboť ve vodném roztoku již molekula neobsahuje žádný nahraditelný proton. Pozorován je též isosbestický bod při 388 nm. S dalším zvyšováním koncentrace tenzidu dochází k bathochromnímu posunu absorpčního pásu při λ_{\max} 375 nm k vyšší vlnové délce. Tento nově vzniklý absorpční pás při 431 nm je připisován barvivu začleněnému v micelách.

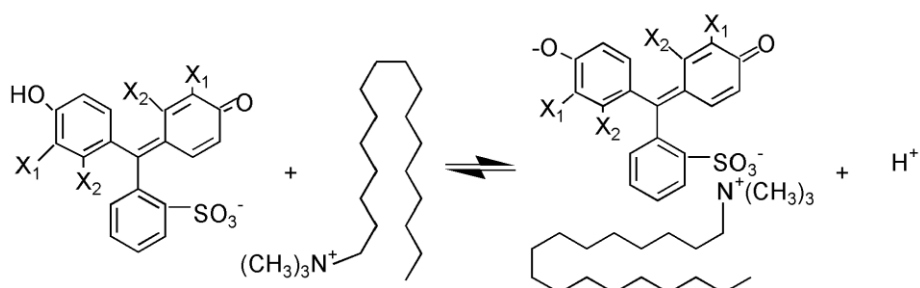
Na závěr autoři shrnují, že hypsochromní posun absorpčního pásu MO je díky změnám v mikroprostředí chromoforu, kde dipóly vody obklopující barvivo jsou částečně nahrazeny tenzidovými hydrofobními řetězci. Síla interakcí závisí na délce alkylového řetězce, typu iontové skupiny a protiiontu tenzidu [21].

R.K. Dutta a S.N. Bhat [21] dále uvádějí, že podobný efekt na změny v elektronové distribuci chromoforu MO vedoucí ke zvýšení přechodové energie má přebytek jednoduchých elektrolytů, kationické polymery či přebytek alkalických hydroxidů.

B. Gohain a jeho spolupracovníci [22] se zabývali deprotonací barviv sulfonftaleinového typu v systému barvivo-tenzid (při submicelární koncentraci) vyvolanou hydrofobicitou řetězce tenzidu. PR jeví též změny ve spektru po přidání kationického tenzidu pod cmc bez precipitace vzniklé soli. Byla pozorována PR

ve vodném roztoku, která jako jednomocný aniont vykazuje 431 nm absorpční pás, který se snižoval s přidávkem tenzidu se současným zvyšováním nového pásu při 572 nm značícím vznik iontového páru s barvivem deprotonovaným do druhého stupně (viz obr.12.). Spektrální změny barviva ukazují na tvorbu do druhého stupně deprotonovaného aniontu barviva, který jinak bez absence tenzidu vzniká jen v silně zásaditých roztocích.

Iontový pár se rozpadá nad cmc tenzidu, kdy jsou tvořeny micely. Solubilizace barviva v micelách pravděpodobně převládá nad tvorbou iontového páru. Isobestický bod pozorovaný při zvyšující se koncentraci tenzidu ukazuje na rovnováhu mezi volnou monoaniontovou formou barviva a iontovým párem tenzidu s dianiontovou formou barviva. Aniontové a neiontové tenzidy nemají žádný vliv na PR pod cmc [22].



Obr.12. Deprotonace sulfonftaleinových barviv monomerním surfaktantem
PR - $X_1=X_2=H$, převzato z [22]

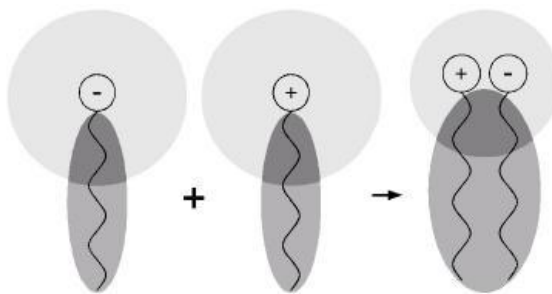
Podobně se tvoří ve vodných roztocích fenazinových barviv s SDS těsně uspořádané iontové páry pod cmc, kde dochází k protonizaci barviva bez přidání jakékoli kyseliny. Důkaz hydrofobní solvatací způsobené protonizace barviva byl pozorován také u iontového páru mezi NR a SDS ve vodných roztocích při pH 7 ve fosfátovém pufru [22].

R.K.Dutta a S.N.Bhat [8], kteří sledovali spektrální změny ve spektru NR po přidávání SDS, uvádějí vliv tenzidu na sekundární protonizaci barviva při pH 7, která je vynucena silnou hydrofobicitou iontového páru barvivo-tenzid. Již při malých koncentracích SDS indikátor absorbuje při vysokých vlnových délkách, cca 580-680 nm, což je připisováno dvojitě protonizované formě barviva s tenzidem $NR^{2+}H_2 \cdot SDS^-$. Tato dvojitá protonizace je jinak přítomná pouze v silně kyselých roztocích NR o $pH < 1$. Při vyšší koncentraci SDS (nad cmc) dochází k micelizaci barviva ve formě NRH^+ přednostně před NR a λ_{max} se posouvá k 538 nm, přičemž

původní pás mizí, neboť dochází k disociaci jednoho protonu. Stejně změny byly pozorovány při pH 4,5 v acetátovém pufru, zatímco při pH 9,2 neukazují spektrální data žádnou podobnou interakci s dvojitě deprotonizovaným barvivem, po přidávání tenzidu dochází pouze ke zvyšování absorbance absorpčního pásu při λ_{\max} 538 nm, což značí tvorbu micel s NRH^+ jako v předchozím případě.

2.4.2 Tvorba agregátů barvivo-tenzid

K agregaci iontových tenzidů a barviv dojde při velmi nízkých koncentracích tenzidů. Přítomnost chromoforu v molekule barviva dovoluje sledovat agregační proces prostřednictvím spektroskopických metod. Interakce jsou pozorovány jen, když barvivo a tenzid nesou opačné náboje. Efekt stabilizace amfifilních agregátů hydrofobními a elektrostatickými interakcemi je schematicky ukázán na obr.13. [4].

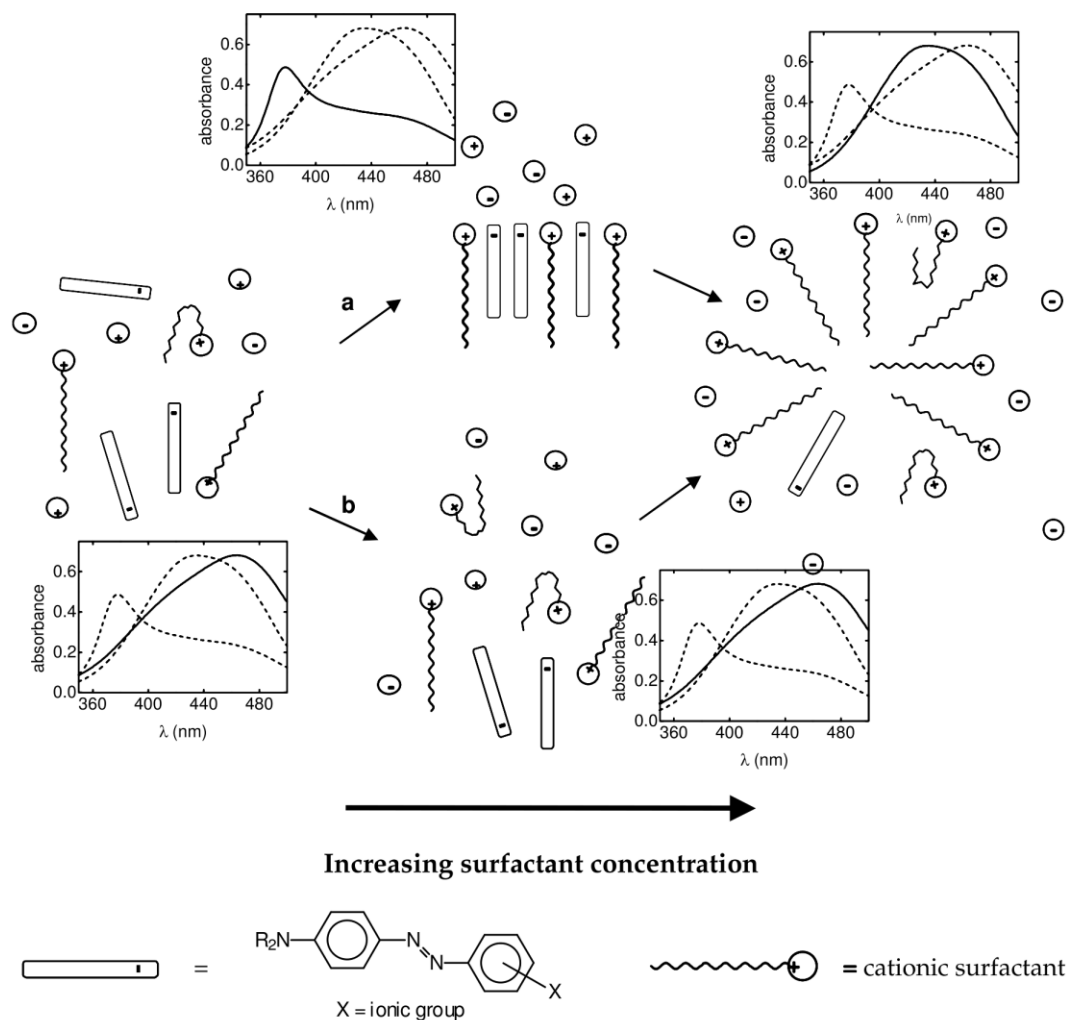


Obr.13. Agregace amfifilních molekul vede k překrytí hydratačních obalů, schematické znázornění převzato z [4]

R.T.Buwalda a jeho spolupracovníci [19] se zabývali interakcí azobarviv s různými typy kationaktivních tenzidů. Autoři práce jsou názoru, že agregáty, které způsobují hypsochromní posun (MO s C_{12}TAB 463 nm \rightarrow 380 nm) ve spektru, jsou po přidání malého množství tenzidu vytvořeny z agregátů barviva navázaného na agregáty tenzidu. Interakce barviva s tenzidem je doprovázena vazbou molekul barviva do paralelního tvaru [4]. Autoři též doplňují, že by se mohlo jednat o tzv. H-agregáty (viz níže), v kterých jsou chromofory agregovány do tohoto tvaru (viz obr.14. cesta a). Změna v maximu absorbance z 380 nm \rightarrow 430 nm je vysvětlována jako zředění agregátů barviva dalším přídatkem tenzidu a následně tvorbou micel s navázaným barvivem [19].

U některých azobarviv se agregace ve spektru neprojeví, to je dáno sterickým uspořádáním molekul, např. rotací aromatického systému barviva kvůli substituentu v ortho poloze, přítomností dvojně vazby v řetězci tenzidu nebo absencí hydrofobní

dialkylaminoskupiny, odpovědné za hydrofobní poutání k tenzidům. Bez agregace barviva dochází jen k tvorbě micel z tenzidů se solvatovanými molekulami barviva. (viz obr.14. cesta b) [4].



Obr.14. Schematické znázornění odlišných stupňů interakce barviva s tenzidem při pevné koncentraci barviva, převzato z [4].

Zvyšováním koncentrace tenzidu se může vyvolat agregace barviva (cesta **a**).

Další přidavek tenzidu vede k rozpuštění barviva v micelách tenzidu.

Agregace barviva chybí na cestě **b**.

Odpovídající agregační spektra jsou ukázána v každém stupni agregačního procesu.

Z experimentů R.T.Buwalda a jeho kolektiv zjistili, že proces interakce závisí významně na délce řetězce tenzidu, na typu a pozici substituentů v barvivu a na přítomnosti elektrolytů [19].

Autoři práce [19] zpochybňují tvorbu iontových párů, kterou navrhli indiští pracovníci. Udávají, že zde není žádný důvod, aby se iontové páry tvořily jen při malých koncentracích tenzidu. Dále autoři vyvracejí vysvětlení posunu v absorpčním maximu prostřednictvím změny polaritý prostředí, neboť nově vzniklý pás se liší od pásu pozorovaného při změně polaritý rozpouštědla.

Ve vodných roztocích při těchto měřeních se objevuje fázová separace agregátů barviva s tenzidem ještě pod cmc, což je připisováno solím těchto barviv s tenzidem. Precipitáty se skládají z ekvimolárního množství obou komponent [19] a lze je pozorovat ve vodných roztocích, pokud je interakce iontových skupin velmi silná [4]. Použitím optické a elektronové mikroskopie byla určena i morfologie těchto solí, které byly izolovány [19]. Byla pozorována tvorba vesikul z barviva a tenzidu, což je následkem změny morfologie částice tenzidu v důsledku navázání na molekulu barviva (zvětšení apolární části a zmenšení polární) [4].

2.4.3 Předpoklad tvorby iontového páru a následně asociátů barvivo-tenzid

V. Kubíček a K. Němcová [23] spolupracovali na objasnění netypického chování roztoků obsahujících MO s různými typy kationaktivních tenzidů pomocí UV-VIS spektrofotometrie a iontově-párové extrakční spektrofotometrie. Jejich pozorování je zaměřeno na vzrůstající molární přebytek barviv nad molárním množstvím tenzidu, což je zcela odlišné od přístupu v jiných studiích. Autoři navazují na článek Buwaldy [4], který se rozsáhle zabýval vztahy mezi azobarvivy a tenzidy.

Interakce tenzidů s PA, která byla těmito autory [23] též sledována, se liší od interakce s MO. Zatímco u MO-tenzidových systémů byly pozorovány výrazné změny ve spektrech, u PA nedochází k žádným neobvyklým jevům. Tyto rozdíly jsou připisovány strukturálním odlišnostem obou barviv. Molekula PA je schopna tvořit intramolekulární můstky mezi hydroxylem a nitroskupinou a její tendence k hydrofobním interakcím je podstatně snížena vlivem vysoké elektronové hustoty nitroskupin, čímž chybí silná hydrofobní část molekuly a předpoklad tvorby asociátů není splněn. Naproti tomu molekula MO obsahuje obě části nutné k asociaci, hydrofobní i iontovou.

Iontově-párovou extrakční spektrofotometrií byl zjištěn hypochromní posun při zvyšujícím se molárním poměru MO/tenzid. Absorbance měřená v chloroformové vrstvě je přiřítána iontovému páru, jehož množství se zvyšujícím molárním poměrem klesá. To je autory vysvětleno prostřednictvím tvorby ve vodě rozpustného asociátu,

který negativně ovlivňuje tvorbu iontového páru. Tvorba iontového páru je tudíž potlačena a v chloroformu je extrahované jeho menší množství. Čeští pracovníci [23] vyloučili i možnosti, že by hypochromní posun způsobovalo samotné barvivo, inverzní micely tenzidu či premicelární asociáty v chloroformové vrstvě.

Pomocí UV-VIS spektrofotometrie byl autory [23] potvrzen stejný posun ve spektru při měnící se koncentraci tenzidu jako v experimentech Buwaldy [19]. Čeští autoři [23] se odlišují ve svých měřeních od ostatních v opačném přístupu. Nastavena byla stálá koncentrace tenzidu $2 \cdot 10^{-5}$ mol/l a pokusy byly prováděny se vzrůstající koncentrací barviv, přičemž přebytečné neasociované barvivo (barvivo vázané na tenzid za předpokladu interakce 1:1) bylo odstraněno pomocí slepých vzorků. Ve spektrech byl zaznamenán rozsáhlý hypsochromní posun v okamžiku, kdy molární koncentrace MO přesáhla koncentraci tenzidu. Absorpční maximum volné MO a systému MO-tenzid v poměru 1:1 (předpoklad tvorby iontového páru) se neliší, z čehož autoři usuzují, že λ_{\max} iontového páru se rovná λ_{\max} volné MO, a tudíž velký hypsochromní posun nemůže být způsoben iontovými páry. Byla vyloučena i možnost posunu ve spektru tvorbou samotných dimerů barviva. Dále bylo zjištěno, že asociáty obsahující barvivo i tenzid, jsou nerozpustné v chloroformu, mají iontový charakter a jejich tvorba je v kompetici s tvorbou iontových párů.

L.García-Río a jeho pracovní skupina [1] kineticky a spektroskopicky zkoumali vliv SDS na vodné roztoky o stálé koncentraci krystalové violeti. Ve své práci došli k závěru, že se po přidání malého množství tenzidu tvoří iontové páry violeti a monomeru SDS a po překročení cmc' se tyto páry rozpadají za vzniku premicelárních agregátů. Po překročení cmc se molekuly barviva inkorporují do micel a iontovou částí směřují k povrchu, který je hydratován.

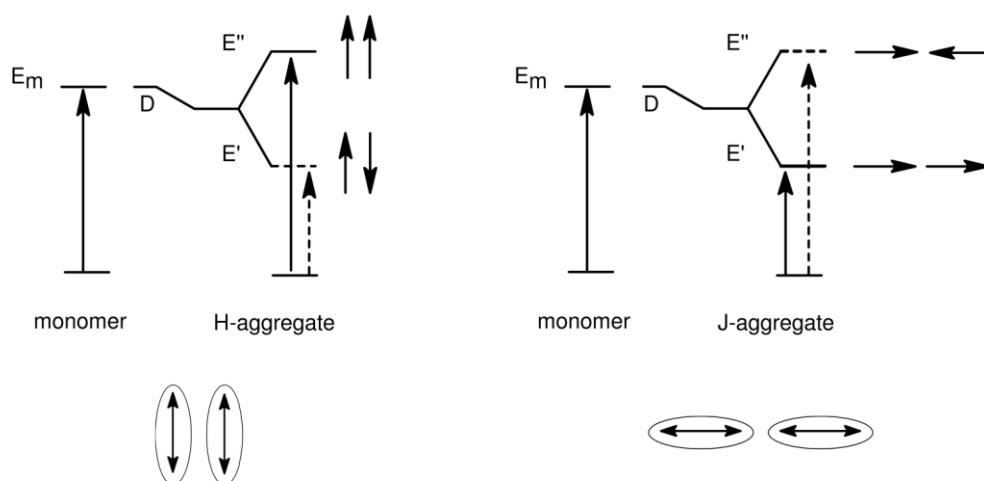
2.4.4 Tvorba nespecifických, J- a H-agregátů

Indičtí autoři [16] podrobně zkoumali interakce tenzidů s iontovými porfyriny rozpustnými ve vodě. Ke svému bádání použili mnoho spektroskopických metod, kterými identifikovali agregáty, které se tvoří za přítomnosti tenzidů ještě pod cmc. Tyto agregáty pak následně rozdělili do několika typů: nespecifické, J- a H- agregáty. Po dosažení cmc agregáty porfyrinů disociovaly a monomery porfyrinů byly enkapsulovány do micel tenzidů. V některých případech se nevytvoří agregáty, dochází pouze k micelizaci, někdy nevznikají ani micely z tenzidů (pokud odpuzivé síly mezi tenzidem a porfyriny jsou příliš velké). Při tvorbě micel porfyriny podléhají deprotonizaci.

K pochopení struktury J- a H- agregátů slouží následující model:

2.4.4.1 Molekulární excitonový model

Absorpční spektra agregátů barviv ukazují obvykle velké rozdíly oproti spektrům monomerních molekul barviv. Rozdíly jsou způsobeny tzv. excitonovou spojkou mezi přechodovými dipólovými momenty jednotlivých molekul barviv. Interakce excitovaných stavů chromoforů v agregátech vede k rozdělení excitačního stavu. To je znázorněno na obr.15. Molekuly barviva agregují buď paralelně (H-agregáty) nebo ve formě „hlava-ocas“ (J-agregáty).



Obr.15. Schematické znázornění rozdělení excitačního stavu agregátů barviv v paralelním tvaru a v uspořádání „hlava-ocas“, převzato z [4].

V případě paralelní agregace přechodové dipóly obou excitačních stavů chromoforů mohou být uspořádány paralelně či antiparalelně a úhel mezi dipólovým momentem a spojkou obou center molekul je pravý. Paralelní uspořádání vede k excitovanému stavu s vyšší energií než má monomer barviva (díky většímu elektrostatickému odpuzování). Tento stav je očekáván u H-agregátu, neboť přechod na antiparalelní stav je zakázán v důsledku nulového dipólového momentu daného vektorovým součtem obou komponent. Tím je dán hypsochromní posun agregátů barviva ve spektru oproti spektru monomerů. Charakteristické je též značné vyhasínání fluorescence.

Pokud existují přechodové momenty v orientaci „hlava-ocas“, jedná se o J-agregáty. Úhel mezi přechodovým momentem a spojkou mezi molekulárními centry, tedy chromofory, je nulový. Uspořádání přechodových dipólů obou excitačních stavů chromoforů ve stejné fázi vede díky elektrostatické přitažlivosti k nižší přechodové energii a ve spektru se projeví bathochromním posunem oproti spektru monomerů barviva, zatímco uspořádání s rozdílnou fází je díky elektrostatickému odpuzování nepřijatelné. J-agregáty vykazují zvětšenou fluorescenci oproti fluorescenci monomeru, která je bathochromně posunuta [4].

2.4.4.2 Nespecifické agregáty

Interakce porfyrin-tenzid mnoha porfyrinů při neutrálním pH patří do kategorie nespecifických agregátů. Zde se sice tvoří premicelární agregáty, což bylo indickými autory potvrzeno [16], ale spektrální posun absorpce je tak malý, že tyto struktury nelze přiřadit ani k jednomu typu agregátů.

2.4.4.3 J-agregáty

Tento typ agregátů předchází většinou tvorbě H-agregátů. Vznikají při poměru porfyrin/CTAB 1:2. Absorpční spektrum je charakterizováno bathochromním posunem a úzkým absorpčním pásem. Při nepatrném zvýšení koncentrace tenzidu se stávají J-agregáty nestabilní a postupně mizí za tvorby H-agregátů. Po překročení cmc dochází k tvorbě micel s monomery porfyrinů. Fluorescence J-agregátu je slabá ve srovnání s H-agregáty. J-agregát vykazuje na rozdíl od ostatních struktur spirálovité uspořádání monomerů v agregátu, což bylo dokázáno cirkulárním dichroismem [16].

2.4.4.4 H-agregáty

Jsou vysoce uspořádané agregáty, kterým může předcházet tvorba J-agregátů. H-agregáty vytvářejí tetraaniontové porfyriny s CTAB při neutrálním pH a tyto agregáty vykazují hypsochromní posun v absorpčním spektru a bathochromní posun ve fluorescenčním spektru. Komplex se rozpadá při vyšší koncentraci CTAB a vytváří se micely s monomery, které se projeví novým absorpčním pásem a jsou stabilní i při vysokých koncentracích tenzidu.

Tvoření agregátů je maximální při poměru porfyrin/CTAB 1:4. Tato stechiometrie je odůvodnitelná, neboť použitý porfyrin je tetraaniont a CTAB nese jeden kladný náboj. Agregáty jsou tedy stabilizovány elektrostatickými interakcemi mezi jednotlivými komponentami a hydrofobní solvatací alkylovými řetězci tenzidů. Bylo též určeno, že tyto agregáty obsahují mnoho porfyrinových molekul. Při značné blízkosti těchto molekul působí mezi nimi excitonické interakce a mají samozhášecí schopnost zjištěnou při měření fluorescence [16].

3 CÍL PRÁCE

Tato diplomová práce je zaměřena na získání informací o změnách v absorpčních a fluorescenčních spektrech v systému barvivo-tenzid při vzrůstající koncentraci barviva a stálé koncentraci tenzidu a to na několika koncentračních hladinách tenzidu. Následně je pak snahou vysvětlit tato naměřená spektra v souvislosti s chemickou strukturou a možnými interakcemi obou komponent.

Záměrem mé práce bylo sledování změn v následujících spektrech:

- absorpční spektra systému NR-SDS
- absorpční spektra systému PR-CTAB
- fluorescenční spektra systému NR-SDS
- fluorescenční spektra systému PR-CTAB

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité chemikálie

4.1.1 Seznam chemikálií

Při svých pokusech jsem pracovala s následujícími surovinami:

Barviva:

- Neutrální červeň, hydrogenchlorid - Lachema n.p. Brno (viz obr.16.)
- Fenolová červeň - Lachema n.p. Brno (viz obr.17.)

Tenzidy:

- Laurylsíran sodný - Lachema a.s., Neratovice (viz obr.18.)
- Hexadecyltrimethylammonium-bromid, Cetyltrimethylammonium-bromid, cetrimid – Fluka, Biochemika (viz obr.19.)

Pufr Brittonův- Robinsonův:

- Hydroxid sodný - Lachema a.s., Neratovice ($M_r(\text{NaOH})=40$)
- Kyselina boritá - Lachema a.s., Neratovice ($M_r(\text{H}_3\text{BO}_3)=62$)
- Kyselina fosforečná - Lachema a.s., Neratovice ($M_r(\text{H}_3\text{PO}_4)=98$)
- Kyselina octová - Lachema a.s., Neratovice ($M_r(\text{CH}_3\text{COOH})=60$)

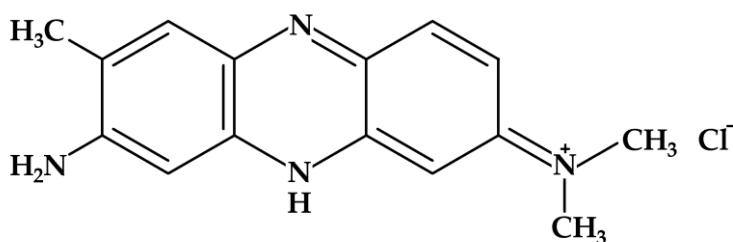
Rozpouštědlo:

- Deionizovaná voda připravená reverzní osmózou

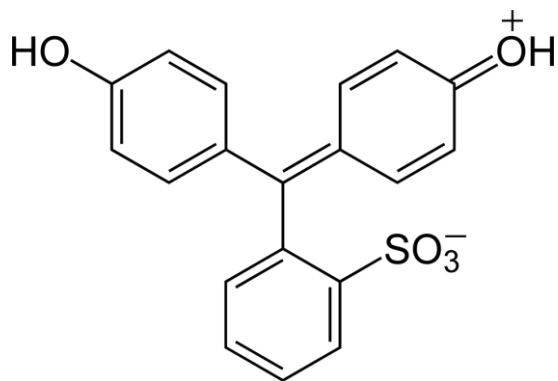
Pomocná chemikálie:

- Lihomethanol

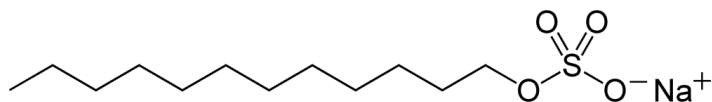
4.1.2 Strukturní vzorce



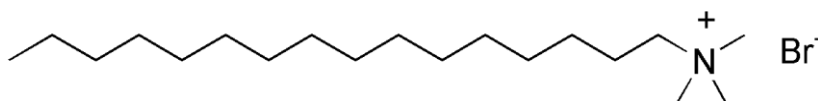
Obr.16. Neutrální červeň, hydrogenchlorid ($M_r=288,8$)



Obr.17. Fenolová červeň ($M_r=354,44$)



Obr.18. Laurylsíran sodný ($M_r=288,38$)



Obr.19. Hexadecyltrimethylammonium-bromid, cetrimid ($M_r=364,46$)

4.2 Použité přístroje

Při provádění diplomové práce jsem používala následující přístroje:

- digitální analytické váhy - Sartorius
- pH-metr InoLab pH 720 - WTW s kombinovanou pH-elektrodou THETA 103
- spektrofotometr HP 8453 - Hewlett Packard
- spektrofluorimetr AMINCO-Bowman Series 2 - AMINCO-Bowman

4.3 Příprava zásobních roztoků

4.3.1 Zhotovení základních vodných roztoků neutrální červeně

Neutrální červeně jako substance hydrogenchlorid se dobře rozpouští v deionizované vodě.

Na digitálních analytických vahách jsem si diferenčně do odměrné baňky navážila 0,0729 g (0,0739-0,0010 g) NR substance, kterou jsem v odměrné baňce rozpustila a doplnila deionizovanou vodou do 50,0 ml. Roztok jsem v intervalu deseti minut několikrát protřepávala. Tímto jsem získala roztok o koncentraci $5,0 \cdot 10^{-3}$ mol/l.

Druhý základní roztok potřebný k měření daného barviva byl požadován o koncentraci $2,0 \cdot 10^{-4}$ mol/l. Tento roztok jsem připravila odpipetováním 4 ml předchozího roztoku do 100 ml odměrné baňky a doplněním deionizovanou vodou po rysku.

4.3.2 Zhotovení základních vodných roztoků SDS

Surovina SDS je dobře rozpustná ve vodě za vzniku opalizujícího roztoku [12].

Na digitálních analytických vahách jsem si diferenčně do odměrné baňky navážila 0,7119 g (0,7215-0,0096 g) SDS substance, kterou jsem v odměrné baňce rozpustila a doplnila deionizovanou vodou do 50,0 ml. Roztok jsem v intervalu deseti minut několikrát protřepávala, o přítomnosti tenzidu svědčilo i výrazné pění. Tímto jsem získala roztok o koncentraci $5,0 \cdot 10^{-2}$ mol/l.

Druhý základní roztok potřebný k měření daného barviva byl požadován o koncentraci $1,0 \cdot 10^{-4}$ mol/l. Tento roztok jsem připravila odpipetováním 1 ml předchozího roztoku do 100 ml odměrné baňky a doplněním deionizovanou vodou po rysku a dále jsem 20 ml takto naředěného roztoku odpipetovala do 100 ml a opět doplnila deionizovanou vodou po rysku.

Třetí základní roztok potřebný k měření daného barviva byl vhodný o koncentraci $5,0 \cdot 10^{-4}$ mol/l. Tento roztok jsem připravila odpipetováním 1 ml prvního roztoku do 100 ml odměrné baňky a doplněním deionizovanou vodou po rysku.

4.3.3 Zhotovení základních vodných roztoků fenolové červeně

Barvivo PR je velmi těžce rozpustné ve vodě (0,77 g/l při 100°C [11]), tudíž vytvoření zásobního roztoku $5,0 \cdot 10^{-3}$ mol/l za standardních podmínek je neproveditelné.

Při zhotovování základních roztoků jsem barvivo převedla na sodnou sůl, která je již rozpustná ve vodě. Pro vznik této soli postačí ekvimolární množství NaOH a PR.

Na digitálních analytických vahách jsem si diferenčně do odměrné baňky navážila 0,0904 g (0,0908-0,0004 g) PR substance, kterou jsem v odměrné baňce rozpustila s částí deionizované vody. K takto připravené směsi jsem po malých částech přidávala 0,1 M NaOH až do rozpuštění PR. Potřebné množství 0,1 M NaOH jsem vypočítala na 2,55 ml tohoto roztoku. Poté jsem doplnila roztok deionizovanou vodou do 50,0 ml. Roztok jsem v intervalu deseti minut několikrát protřepávala. Tímto jsem získala roztok o koncentraci $5,1 \cdot 10^{-3}$ mol/l.

Druhý základní roztok potřebný k měření daného barviva byl požadován o koncentraci $2,0 \cdot 10^{-4}$ mol/l. Tento roztok jsem připravila odpipetováním 4 ml předchozího roztoku do 100 ml odměrné baňky a doplněním deionizovanou vodou po rysku.

4.3.4 Zhotovení základních vodných roztoků CTAB

Tenzid CTAB je těžce rozpustný ve vodě (3 g/l při 20°C) [17 b.], i přesto tak nepatrné množství (0,0903 g na 50 ml), které jsem odvažovala, je ještě za standardních podmínek rozpustné.

Na digitálních analytických vahách jsem si diferenčně do odměrné baňky navážila 0,0903 g (0,0970-0,0067 g) CTAB suroviny, kterou jsem v odměrné baňce rozpustila a doplnila deionizovanou vodou do 50,0 ml. Roztok jsem v intervalu deseti minut několikrát protřepávala, o přítomnosti tenzidu svědčilo opět pění. Tímto jsem získala roztok o koncentraci $5,0 \cdot 10^{-3}$ mol/l.

Druhý základní roztok potřebný k měření daného barviva byl požadován o koncentraci $1,0 \cdot 10^{-4}$ mol/l. Tento roztok jsem připravila odpipetováním 2 ml předchozího roztoku do 100 ml odměrné baňky a doplněním deionizovanou vodou po rysku.

Třetí základní roztok potřebný k měření daného barviva byl vhodný o koncentraci $5,0 \cdot 10^{-4}$ mol/l. Tento roztok jsem připravila odpipetováním 5 ml prvního roztoku do 50 ml odměrné baňky a doplněním deionizovanou vodou po rysku.

4.3.5 Příprava univerzálního Brittonova-Robinsonova pufru

Při zkoumání vlivu povrchově aktivních látek na optické vlastnosti daných barviv je při měření nutné zachovat konstantní acidobazické vlastnosti prostředí.

Jako optimální se nabízí použití univerzálního Brittonova-Robinsonova pufru, který je směsí pěti tlumivých soustav a pokrývá širokou oblast pH (pH 2-12). Jedná se o roztok směsi kyselin fosforečné, octové a borité, ke kterému se přidá předepsané množství roztoku NaOH za účelem vytvoření tlumivého roztoku o požadovaném pH [2].

Nejprve jsem si namíchala BR základní roztok kyselin a 0,2 M roztok NaOH:

BR základní roztok jsem si připravila navážením 7,8400 g H_3PO_4 , 4,8000 g CH_3COOH , 4,9600 g H_3BO_3 , navážky jsem rozpustila v deionizované vodě a v odměrné baňce jsem doplnila na 2000 ml. Všechny kyseliny mají v tomto roztoku koncentraci 0,04 M.

Pro 0,2 M roztok NaOH je zapotřebí 8,0000 g navážky pevného hydroxidu sodného. Při každé přípravě tohoto roztoku jsem si navážila požadované množství s přesností na setiny s tím, že tento roztok byl vždy mírně koncentrovanější.

Zhotovení tlumivého pufru o požadovaném pH:

Před použitím BR pufru jsem přidala odpovídající množství hydroxidu sodného k základnímu roztoku dle tabulek [24]. pH jsem upravila na požadovanou hodnotu pomocí pH-metru InoLab pH 720 po kalibraci přístroje následovně:

Změřila jsem si pH připravené směsi základního roztoku s roztokem NaOH. Dle výsledné hodnoty pH jsem zjistila, v jaké oblasti pH se roztok nachází. Přidáváním (pipetováním) kyselého nebo zásaditého roztoku k vytvořené směsi roztoku a mechanickým mícháním jsem upravila hodnotu na požadovanou dle tabulek [24]. Vzhledem ke koncentrovanějšímu zásaditému roztoku NaOH bylo vždy nutné k vytvořené směsi roztoků přidávat BR základní roztok kyselin.

Byly používány pufrы s hodnotami pH 5,02 a 7,96 (viz tab.1.).

Tab.1.: Příprava BR pufru ze 100 ml BR základního roztoku

pH BR pufru	V (0,2 M NaOH) [ml]
5,02	35
7,96	60

4.4 Pracovní postup

U všech prováděných měření byl použit lihomethanol k odstraňování zbylého barviva z kyvet před následujícím měřením. Lihomethanol, který by ovlivňoval polaritu prostředí, byl následně vysušen pomocí fénu.

Všechny vzorky měly objem 4 ml. Měření byla uskutečňována při 25°C.

4.4.1 Pozorování interakce neutrální červeně s SDS metodou absorpční spektrofotometrie a následně metodou fluorescenční spektroskopie

Při všech měřeních byla zachovávána acidita roztoku BR pufrům o pH 5,02.

4.4.1.1 Příprava slepých vzorků NR

Do třinácti kádinek jsem si (viz tab.2.) odpipetovala potřebné množství NR o $c=2\cdot 10^{-4}$ mol/l a doplnila jsem BR pufrům o pH 5,02 do 4 ml. Roztoky jsem promíchala a nechala několik minut stát. Tyto slepé roztoky jsem používala při všech měřeních s NR.

Tab.2.: Příprava roztoků slepých vzorků NR

	SLEPÉ VZORKY (NR o $c=2\cdot 10^{-4}$ mol/l)		
	c_{NR} [M]	V_{NR} [ml]	PUFR o pH 5,02
1	0	0	4,000
2	$0,19\cdot 10^{-5}$	0,038	3,962
3	$0,38\cdot 10^{-5}$	0,076	3,924
4	$0,56\cdot 10^{-5}$	0,112	3,888
5	$0,81\cdot 10^{-5}$	0,162	3,838
6	$1,00\cdot 10^{-5}$	0,200	3,800
7	$2,00\cdot 10^{-5}$	0,400	3,600
8	$3,00\cdot 10^{-5}$	0,600	3,400
9	$4,00\cdot 10^{-5}$	0,800	3,200
10	$5,00\cdot 10^{-5}$	1,000	3,000
11	$6,00\cdot 10^{-5}$	1,200	2,800
12	$8,00\cdot 10^{-5}$	1,600	2,400
13	$1,00\cdot 10^{-4}$	2,000	2,000

4.4.1.2 Postup při měření absorpčního spektra NR

Při měřeních absorpčních spekter samotné NR v BR pufru jsem využila slepých roztoků. Měření bylo provedeno se všemi slepými vzorky od č.2 a slepý vzorek č.1 bez obsahu barviva byl použit k odstranění rušivých absorbujících složek.

4.4.1.3 Vzorky s koncentrací SDS $2 \cdot 10^{-5}$ mol/l

Do třinácti kádinek jsem odpipetovala potřebný objem NR o $c=2 \cdot 10^{-4}$ mol/l a poté jsem přidala pufr, vše (viz tab.3.) pro požadovanou koncentraci SDS $2 \cdot 10^{-5}$ mol/l. Následně jsem do každého z takto vytvořených roztoků přidala ještě 0,80 ml SDS o $c=1 \cdot 10^{-4}$ M. Roztoky jsem promíchala a nechala několik minut stát.

Absorpční spektra roztoků jsem měřila proti slepým vzorkům (příprava viz 4.4.1.1). Takto připravené roztoky jsem použila k měření fluorescence.

4.4.1.4 Vzorky s koncentrací SDS $4 \cdot 10^{-5}$ mol/l

Celý dřívější postup je shodný i pro tuto koncentraci SDS (viz tab.3.) s tím rozdílem, že jsem změnila množství a koncentraci přidávaného tenzidu na 0,32 ml SDS o $c=5 \cdot 10^{-4}$ M.

Absorpční spektra roztoků jsem měřila proti slepým vzorkům (příprava viz 4.4.1.1). Takto připravené roztoky jsem použila k měření fluorescence.

4.4.1.5 Vzorky s koncentrací SDS $6 \cdot 10^{-5}$ mol/l

I na této koncentrační hladině tenzidu jsem připravovala třináct vzorků NR s pufrům obdobně s tím rozdílem, že jsem změnila množství přidávaného tenzidu oproti předchozímu případu na 0,48 ml SDS o $c=5 \cdot 10^{-4}$ M (viz tab.3.).

Absorpční spektra roztoků jsem měřila proti slepým vzorkům (příprava viz 4.4.1.1). Takto připravené roztoky jsem použila k měření fluorescence.

4.4.1.6 Vzorky s koncentrací SDS $8 \cdot 10^{-5}$ mol/l

Opět jsem (viz tab.3.) promíchala potřebný objem NR s příslušným objemem pufru. Poté jsem do každé kádinky napipetovala 0,64 ml SDS o $c=5 \cdot 10^{-4}$ M a nechala jsem několik minut stát.

Absorpční spektra roztoků jsem měřila proti slepým vzorkům (příprava viz 4.4.1.1). Takto připravené roztoky jsem použila k měření fluorescence.

4.4.1.7 Vzorky s koncentrací SDS $1 \cdot 10^{-4}$ mol/l

Ten samý postup jsem provedla i u poslední požadované koncentrace SDS. Zde jsem přimíchala do každého vzorku 0,80 ml SDS o $c=5 \cdot 10^{-4}$ M (viz tab.3.).

Absorpční spektra roztoků jsem měřila proti slepým vzorkům (příprava viz 4.4.1.1). Takto připravené roztoky jsem použila k měření fluorescence.

Tab.3.: Příprava roztoků vzorků NR s SDS na různých koncentračních hladinách

	Požadovaná c(SDS):		2·10 ⁻⁵ mol/l	4·10 ⁻⁵ mol/l	6·10 ⁻⁵ mol/l	8·10 ⁻⁵ mol/l	1·10 ⁻⁴ mol/l
	NR o c=2·10 ⁻⁴ mol/l VE VZORCÍCH		0,80 ml SDS o c=1·10 ⁻⁴ M	0,32 ml SDS o c=5·10 ⁻⁴ M	0,48 ml SDS o c=5·10 ⁻⁴ M	0,64 ml SDS o c=5·10 ⁻⁴ M	0,80 ml SDS o c=5·10 ⁻⁴ M
	c _{NR} [M]	V _{NR} [ml]	PUFR	PUFR	PUFR	PUFR	PUFR
1	2,00·10 ⁻⁵	0,400	2,800	3,280	3,120	2,960	2,800
2	2,19·10 ⁻⁵	0,438	2,762	3,242	3,082	2,922	2,762
3	2,38·10 ⁻⁵	0,476	2,724	3,204	3,044	2,884	2,724
4	2,56·10 ⁻⁵	0,512	2,688	3,168	3,008	2,848	2,688
5	2,81·10 ⁻⁵	0,562	2,638	3,118	2,958	2,798	2,638
6	3,00·10 ⁻⁵	0,600	2,600	3,080	2,920	2,760	2,600
7	4,00·10 ⁻⁵	0,800	2,400	2,880	2,720	2,560	2,400
8	5,00·10 ⁻⁵	1,000	2,200	2,680	2,520	2,360	2,200
9	6,00·10 ⁻⁵	1,200	2,000	2,480	2,320	2,160	2,000
10	7,00·10 ⁻⁵	1,400	1,800	2,280	2,120	1,960	1,800
11	8,00·10 ⁻⁵	1,600	1,600	2,080	1,920	1,760	1,600
12	1,00·10 ⁻⁴	2,000	1,200	1,680	1,520	1,360	1,200
13	1,20·10 ⁻⁴	2,400	0,800	1,280	1,120	0,960	0,800

4.4.2 Pozorování interakce fenolové červeně s CTAB metodou absorpční spektrofotometrie a následně metodou fluorescenční spektroskopie

Při všech měřeních byla zachovávána bazicita roztoku BR pufrům o pH 7,96.

4.4.2.1 Příprava slepých vzorků PR

Do třinácti kádinek jsem si (viz tab.4.) odpipetovala potřebné množství PR o $c=2\cdot 10^{-4}$ mol/l a doplnila jsem BR pufrům o pH 7,96 do 4 ml. Roztoky jsem promíchala a nechala několik minut stát. Tyto slepé roztoky jsem používala při všech měřeních s PR.

Tab.4.: Příprava roztoků slepých vzorků PR

	SLEPÉ VZORKY (PR o $c=2\cdot 10^{-4}$ mol/l)		
	c_{PR} [M]	V_{PR} [ml]	PUFR o pH 7,96
1	0	0	4,00
2	$0,19\cdot 10^{-5}$	0,038	3,962
3	$0,38\cdot 10^{-5}$	0,076	3,924
4	$0,56\cdot 10^{-5}$	0,112	3,888
5	$0,81\cdot 10^{-5}$	0,162	3,838
6	$1,00\cdot 10^{-5}$	0,200	3,800
7	$2,00\cdot 10^{-5}$	0,400	3,600
8	$3,00\cdot 10^{-5}$	0,600	3,400
9	$4,00\cdot 10^{-5}$	0,800	3,200
10	$5,00\cdot 10^{-5}$	1,000	3,000
11	$6,00\cdot 10^{-5}$	1,200	2,800
12	$8,00\cdot 10^{-5}$	1,600	2,400
13	$1,00\cdot 10^{-4}$	2,000	2,000

4.4.2.2 Postup při měření absorpčního spektra PR

Při měřeních absorpčních spekter samotné PR v BR pufru jsem využila slepých roztoků. Měření bylo provedeno se všemi slepými vzorky od č.2 a slepý vzorek č.1 bez obsahu barviva byl použit k odstranění rušivých absorbujících složek.

4.4.2.3 Vzorky s koncentrací CTAB $2 \cdot 10^{-5}$ mol/l

Do třinácti kádinek jsem odpipetovala potřebný objem PR o $c=2 \cdot 10^{-4}$ mol/l a poté jsem přidala pufr, vše (viz tab.5.) pro požadovanou koncentraci CTAB $2 \cdot 10^{-5}$ mol/l. Následně jsem do každého z takto vytvořených roztoků přidala ještě 0,80 ml CTAB o $c=1 \cdot 10^{-4}$ M. Roztoky jsem promíchala a nechala několik minut stát.

Absorpční spektra roztoků jsem měřila proti slepým vzorkům (příprava viz 4.4.2.1). Takto připravené roztoky jsem použila k měření fluorescence.

4.4.2.4 Vzorky s koncentrací CTAB $4 \cdot 10^{-5}$ mol/l

Celý dřívější postup je shodný i pro tuto koncentraci CTAB (viz tab.5.) s tím rozdílem, že jsem změnila množství a koncentraci přidávaného tenzidu na 0,32 ml CTAB o $c=5 \cdot 10^{-4}$ M.

Absorpční spektra roztoků jsem měřila proti slepým vzorkům (příprava viz 4.4.2.1). Takto připravené roztoky jsem použila k měření fluorescence.

4.4.2.5 Vzorky s koncentrací CTAB $6 \cdot 10^{-5}$ mol/l

I na této koncentrační hladině tenzidu jsem připravovala třináct vzorků PR s pufrům obdobně s tím rozdílem, že jsem změnila množství přidávaného tenzidu oproti předchozímu případu na 0,48 ml CTAB o $c=5 \cdot 10^{-4}$ M (viz tab.5.).

Absorpční spektra roztoků jsem měřila proti slepým vzorkům (příprava viz 4.4.2.1). Takto připravené roztoky jsem použila k měření fluorescence.

4.4.2.6 Vzorky s koncentrací CTAB $8 \cdot 10^{-5}$ mol/l

Opět jsem (viz tab.5.) promíchala potřebný objem PR s příslušným objemem pufru. Poté jsem do každé kádinky napipetovala 0,64 ml CTAB o $c=5 \cdot 10^{-4}$ M a nechala jsem několik minut stát.

Absorpční spektra roztoků jsem měřila proti slepým vzorkům (příprava viz 4.4.2.1). Takto připravené roztoky jsem použila k měření fluorescence.

Tab.5.: Příprava roztoků vzorků **PR** s **CTAB** na různých koncentračních hladinách

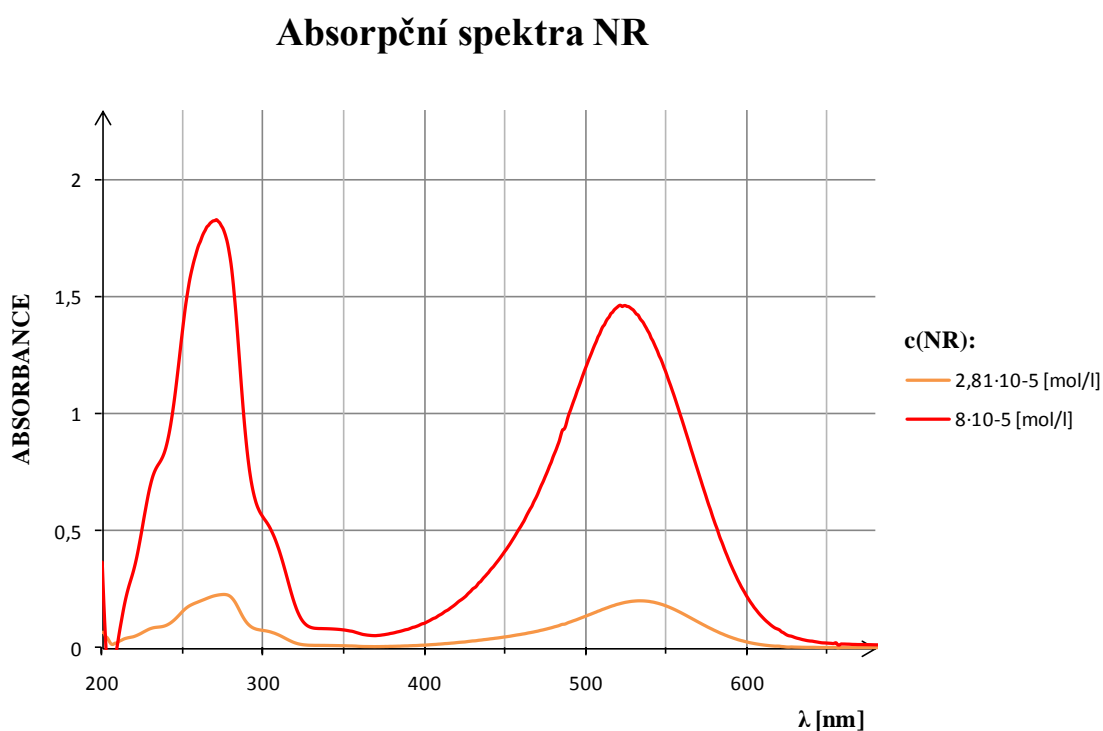
	Požadovaná c(CTAB):		2·10 ⁻⁵ mol/l	4·10 ⁻⁵ mol/l	6·10 ⁻⁵ mol/l	8·10 ⁻⁵ mol/l
	PR o c=2·10 ⁻⁴ mol/l VE VZORCÍCH		0,80 ml CTAB o c=1·10 ⁻⁴ M	0,32 ml CTAB o c=5·10 ⁻⁴ M	0,48 ml CTAB o c=5·10 ⁻⁴ M	0,64 ml CTAB o c=5·10 ⁻⁴ M
	c _{PR} [M]	V _{PR} [ml]	PUFR	PUFR	PUFR	PUFR
1	2,00·10 ⁻⁵	0,400	2,800	3,280	3,120	2,960
2	2,19·10 ⁻⁵	0,438	2,762	3,242	3,082	2,922
3	2,38·10 ⁻⁵	0,476	2,724	3,204	3,044	2,884
4	2,56·10 ⁻⁵	0,512	2,688	3,168	3,008	2,848
5	2,81·10 ⁻⁵	0,562	2,638	3,118	2,958	2,798
6	3,00·10 ⁻⁵	0,600	2,600	3,080	2,920	2,760
7	4,00·10 ⁻⁵	0,800	2,400	2,880	2,720	2,560
8	5,00·10 ⁻⁵	1,000	2,200	2,680	2,520	2,360
9	6,00·10 ⁻⁵	1,200	2,000	2,480	2,320	2,160
10	7,00·10 ⁻⁵	1,400	1,800	2,280	2,120	1,960
11	8,00·10 ⁻⁵	1,600	1,600	2,080	1,920	1,760
12	1,00·10 ⁻⁴	2,000	1,200	1,680	1,520	1,360
13	1,20·10 ⁻⁴	2,400	0,800	1,280	1,120	0,960

5 VÝSLEDKY

Jak je patrné z teoretické části (viz 2.3.2), absorpční a fluorescenční spektra samotných tenzidů pod cmc neabsorbují v oblasti vlnových délek 300 nm-800 nm, proto nově vzniklé pásy ve spektrech nemohou být přičítány samotným tenzidům.

5.1.1 Absorpční spektrum NR v BR pufru

Absorpční spektra NR v BR pufru o pH 5,02 jsem získala proměřením slepých roztoků s postupně vzrůstající koncentrací barviva (viz 4.4.1.2). Ze změřených spekter jsem vybrala dvě odlišná spektra, která jsou znázorněna na obr.20. Tato absorpční spektra odpovídají NR o koncentraci $2,81 \cdot 10^{-5}$ mol/l a $8,00 \cdot 10^{-5}$ mol/l. V BR pufru vykazuje NR dvě absorpční maxima. Pro koncentraci $2,81 \cdot 10^{-5}$ mol/l je λ_{\max} NR v UV oblasti 276 nm a ve VIS oblasti 534 nm, zatímco koncentrace $8,00 \cdot 10^{-5}$ mol/l vykazuje λ_{\max} NR v UV oblasti 271 nm a ve VIS oblasti 522 nm. Je patrné, že se vzrůstající koncentrací NR se absorpční maxima posouvají k nižším vlnovým délkám.



Obr.20. Absorpční spektra NR o koncentracích $2,81 \cdot 10^{-5}$ mol/l a $8,00 \cdot 10^{-5}$ mol/l

5.1.2 Výsledky zkoumání vlivu SDS na optické vlastnosti vodného roztoku neutrální červeně

5.1.2.1 Výsledky na koncentrační hladině SDS $2 \cdot 10^{-5}$ mol/l

Na obr.21. jsou znázorněna spektra NR na konstantní hladině SDS $2 \cdot 10^{-5}$ mol/l. Tato absorpční spektra byla měřena proti slepým roztokům (příprava viz 4.4.1.1). Koncentrace NR ve vzorcích v této řadě postupně roste od $2,00 \cdot 10^{-5}$ mol/l až po $1,20 \cdot 10^{-4}$ mol/l a hladina SDS se nemění (příprava vzorků viz 4.4.1.3). Různé koncentrace barviva jsou odlišeny barvami.

Jak je vidět ze spekter, se zvyšující se hladinou barviva se absorpční maxima posouvají k nižším vlnovým délkám ($275 \text{ nm} \rightarrow 267 \text{ nm}$ a $531 \text{ nm} \rightarrow 521 \text{ nm}$). Ve spektrech nedochází na této koncentrační hladině k jiným výrazným posunům. Absorbance se vzrůstající koncentrací NR u obou absorpčních maxim klesá.

5.1.2.2 Výsledky na koncentrační hladině SDS $4 \cdot 10^{-5}$ mol/l

Na obr.22. jsou znázorněna dvě vybraná spektra NR na konstantní koncentrační hladině SDS $4 \cdot 10^{-5}$ mol/l. Opět byla měřena absorpční spektra třinácti vzorků (příprava vzorků viz 4.4.1.4) proti stejným slepým roztokům jako v předchozím případě. Koncentrace NR roste obdobně jako v předchozím případě a hladina SDS se nemění. Spektra jsou rozlišena barevně dle koncentrací NR.

Na obrázku je znázorněn vzorek č.5 a č.11, tedy vzorky s koncentracemi barviva $2,81 \cdot 10^{-5}$ mol/l a $8,00 \cdot 10^{-5}$ mol/l. Ve spektru dochází k výraznému snížení absorbance a opět k posunům absorpčních maxim k nižším vlnovým délkám. Absorpční spektra ostatních vzorků byla podobná těm na předchozí koncentrační hladině s tendencí posouvání absorpčních maxim k nižším vlnovým délkám se vzrůstající koncentrací barviva a s klesající absorbancí ve stejné závislosti. Vzorek 13., zde neznázorněn, se již výrazně liší svou nízkou absorbancí od ostatních.

5.1.2.3 Výsledky na koncentrační hladině SDS $6 \cdot 10^{-5}$ mol/l

Na obr.23. jsou znázorněna opět všechna spektra NR na konstantní koncentrační hladině SDS $6 \cdot 10^{-5}$ mol/l. Byla měřena absorpční spektra třinácti vzorků (příprava vzorků viz 4.4.1.5) proti stejným slepým roztokům jako v předchozích případech. Koncentrace NR roste obdobně jako v předchozích případech a hladina SDS se nemění. Spektra jsou rozlišena barevně dle koncentrací NR.

U těchto absorpčních spekter můžeme pozorovat již výrazné odlišnosti. Tyto změny se odehrávají od koncentrace NR $7,00 \cdot 10^{-5}$ mol/l, kdy se původní absorpční pásy převrací do záporných hodnot, v UV oblasti dochází se vzrůstající koncentrací barviva k navyšování absorpčního pásu při 329 nm a ve viditelné oblasti vzniká další absorpční pás při 641 nm. Absorpční spektra nejeví ostré isosbestické body.

5.1.2.4 Výsledky na koncentrační hladině SDS $8 \cdot 10^{-5}$ mol/l

Na obr.24. jsou znázorněna dvě vybraná spektra NR na konstantní koncentrační hladině SDS $8 \cdot 10^{-5}$ mol/l. Výběr je shodný jako v případě koncentrační hladiny $4 \cdot 10^{-5}$ mol/l, aby mohla být později porovnána daná spektra. Opět byla měřena absorpční spektra třinácti vzorků (příprava vzorků viz 4.4.1.6) proti stejným slepým roztokům jako v předchozích případech. Koncentrace NR roste obdobně jako v předchozích případech a hladina SDS se nemění. Spektra jsou rozlišena barevně dle koncentrací NR.

Na obrázku je znázorněn vzorek č.5 a č.11, tedy vzorky s koncentracemi barviva $2,81 \cdot 10^{-5}$ mol/l a $8,00 \cdot 10^{-5}$ mol/l. Zatímco koncentrace barviva $2,81 \cdot 10^{-5}$ mol/l má ještě absorpční maxima v kladných hodnotách, v druhém případě je tomu naopak. Absorbance v absorpčních maximech jsou ještě výrazněji sníženy oproti předchozí koncentrační hladině tenzidu.

5.1.2.5 Výsledky na koncentrační hladině SDS $1 \cdot 10^{-4}$ mol/l

Na obr.25. jsou znázorněna spektra NR na konstantní hladině SDS $1 \cdot 10^{-4}$ mol/l. Byla měřena absorpční spektra třinácti vzorků (příprava vzorků viz 4.4.1.7) proti stejným slepým roztokům jako v předchozích případech. Koncentrace NR roste obdobně jako v předchozích případech a hladina SDS se nemění. Spektra jsou rozlišena barevně dle koncentrací NR.

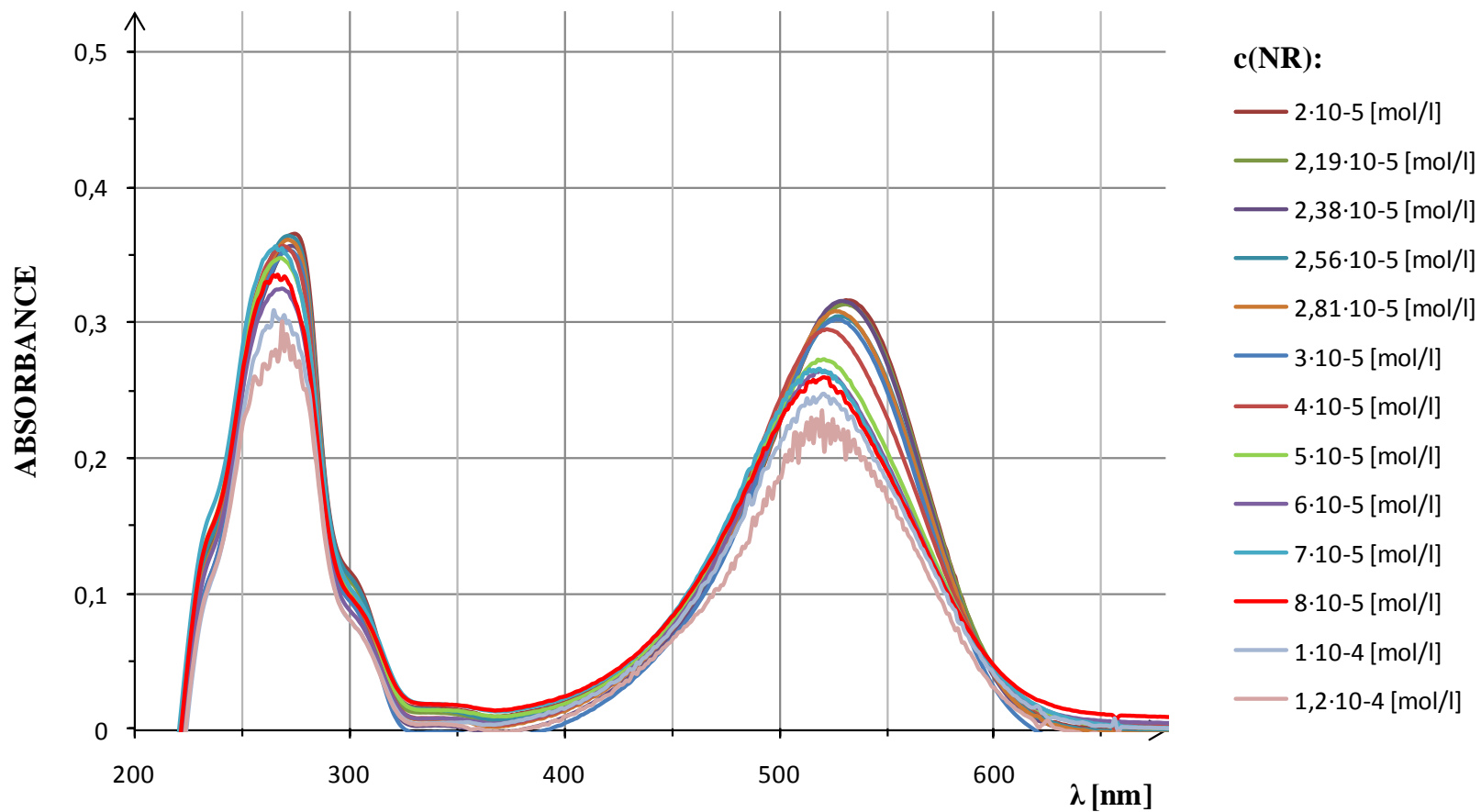
Na spektrech jsou vidět výrazné změny. Zlomem k těmto změnám je koncentrace NR $5,00 \cdot 10^{-5}$ mol/l, kdy se absorpční maxima opět dostávají do záporných hodnot a vznikají dva nové absorpční pásy při 334 nm a 648 nm. V těchto absorpčních spektrech jsou patrné tři isosbestické body při 312 nm, 412 nm a 586 nm.

5.1.2.6 Výsledky vlivu měnící se koncentrace SDS na stálou koncentraci NR

Na obr.26. jsou znázorněna spektra NR o $8,00 \cdot 10^{-5}$ mol/l na vzrůstající hladině SDS. Tento obrázek je poskládán z předchozích naměřených spekter při koncentraci barviva $8 \cdot 10^{-5}$ mol/l. Zde je pozorován opačný přístup v hodnocení spekter, přesněji řečeno vliv zvyšující se koncentrace SDS na stálou koncentraci barviva.

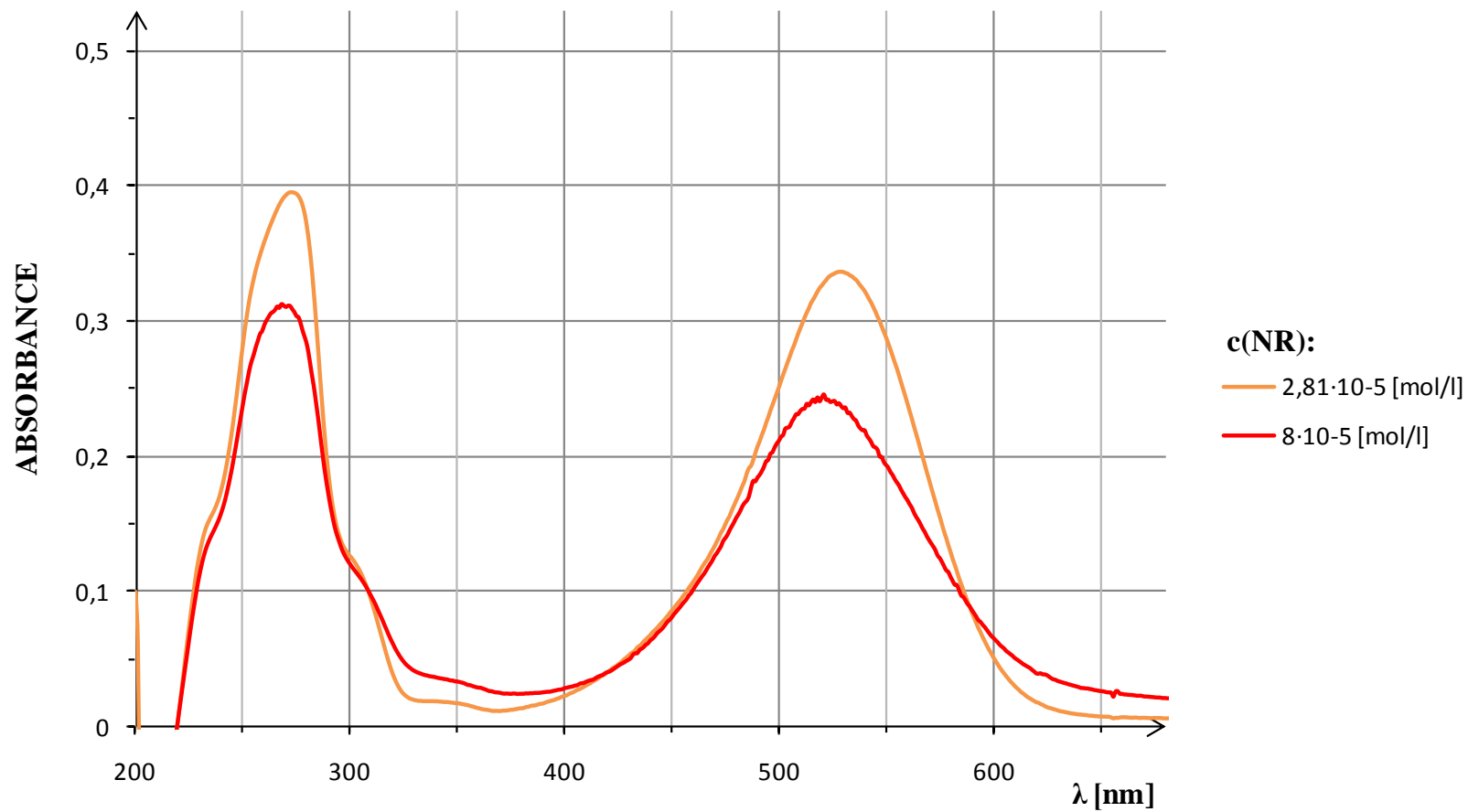
Na obrázku je patrné, že dochází k výrazným změnám od koncentrace tenzidu $6 \cdot 10^{-5}$ mol/l., kdy se absorpční maxima pohybují v záporných hodnotách a vznikají dva nové absorpční pásy při 330 nm a 638 nm. Isosbestické body nejsou ostré.

Absorpční spektra NR s SDS o $c = 2 \cdot 10^{-5}$ mol/l



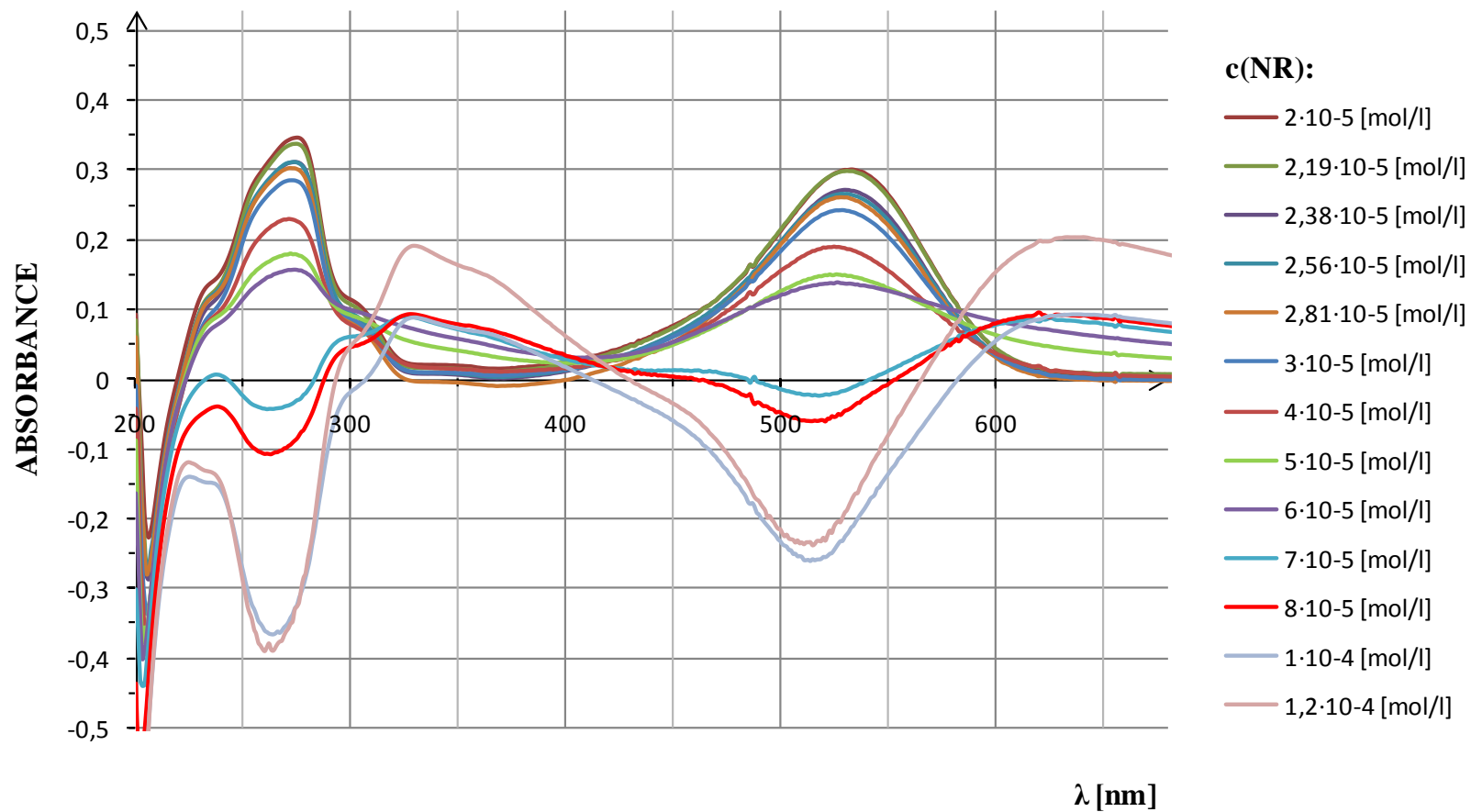
Obr.21. Absorpční spektra NR s SDS na koncentrační hladině $2 \cdot 10^{-5}$ mol/l

Absorpční spektra NR s SDS o $c = 4 \cdot 10^{-5}$ mol/l



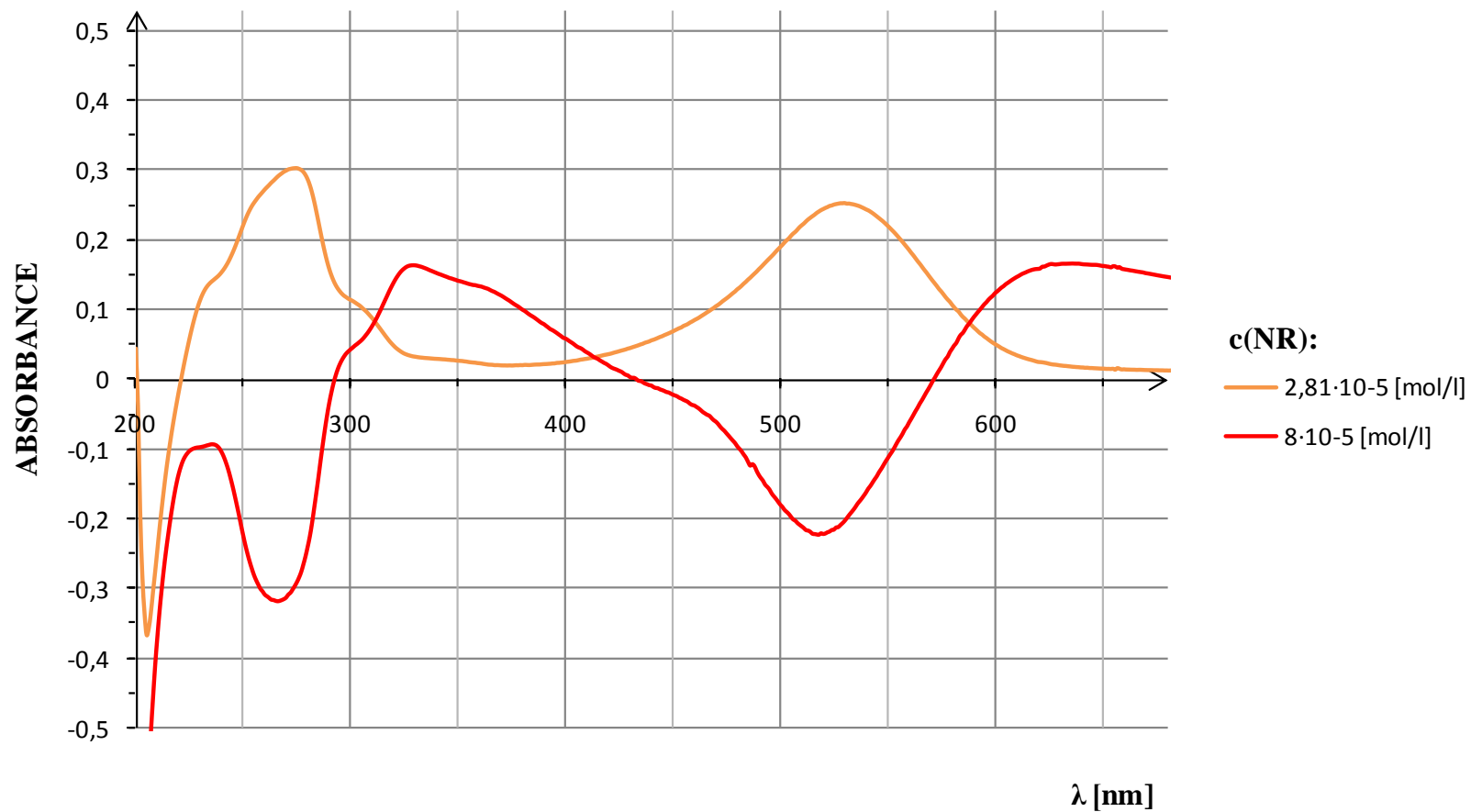
Obr.22. Absorpční spektra NR s SDS na koncentrační hladině $4 \cdot 10^{-5}$ mol/l

Absorpční spektra NR s SDS o $c = 6 \cdot 10^{-5}$ mol/l



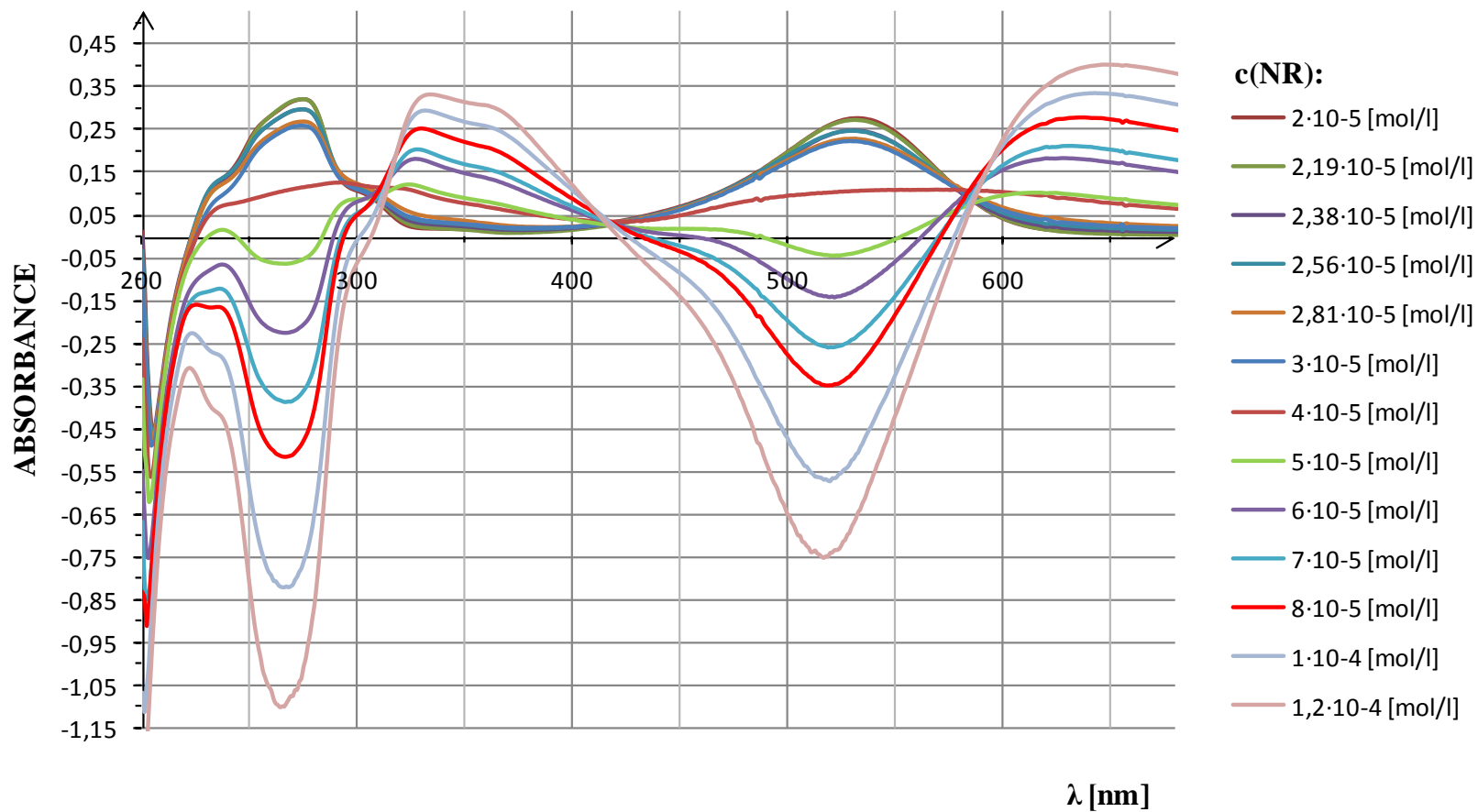
Obr.23. Absorpční spektra NR s SDS na koncentrační hladině $6 \cdot 10^{-5}$ mol/l

Absorpční spektra NR s SDS o $c = 8 \cdot 10^{-5}$ mol/l



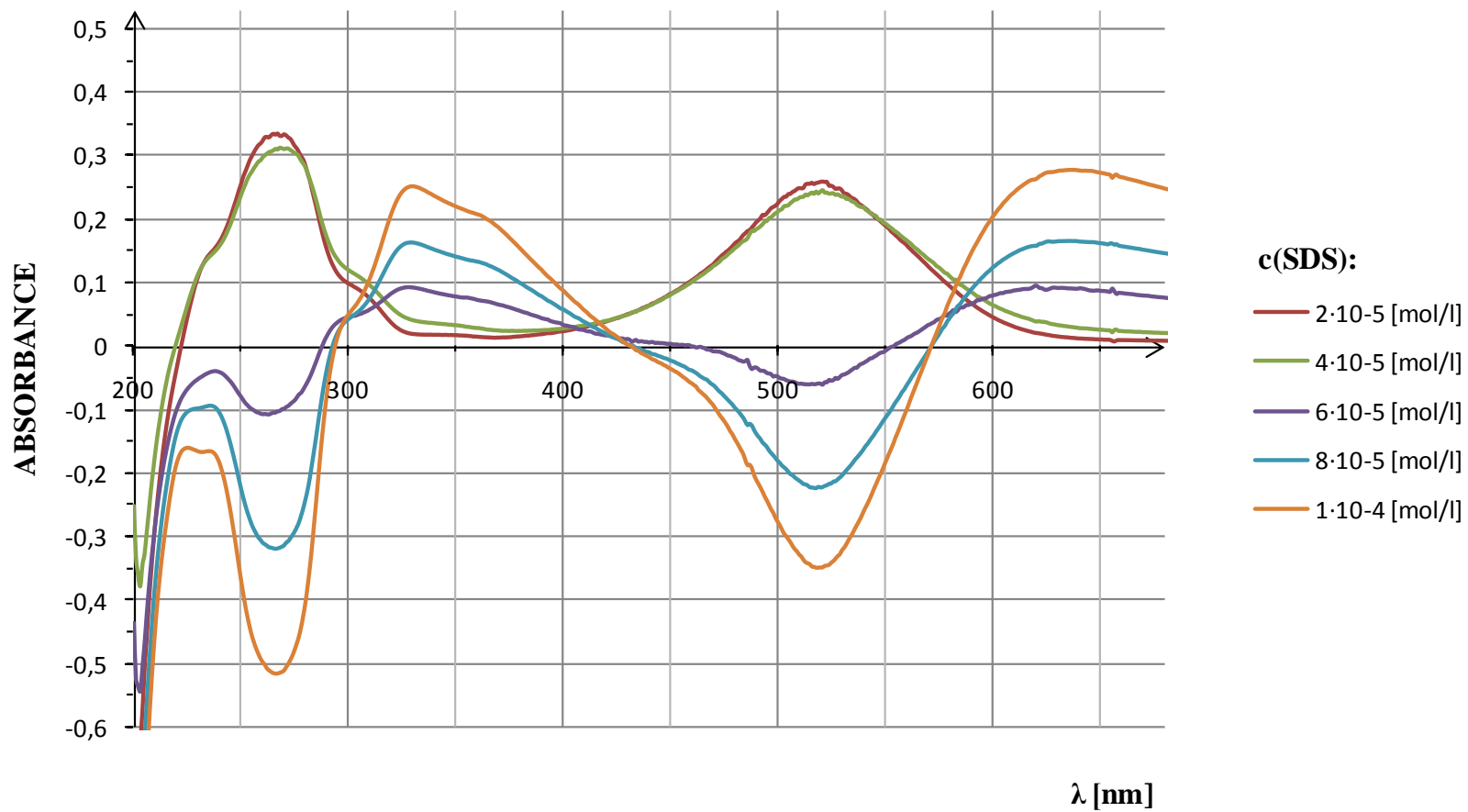
Obr.24. Absorpční spektra NR s SDS na koncentrační hladině $8 \cdot 10^{-5}$ mol/l

Absorpční spektra NR s SDS o $c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol/l



Obr.25. Absorpční spektra NR s SDS na koncentrační hladině $1 \cdot 10^{-4}$ mol/l

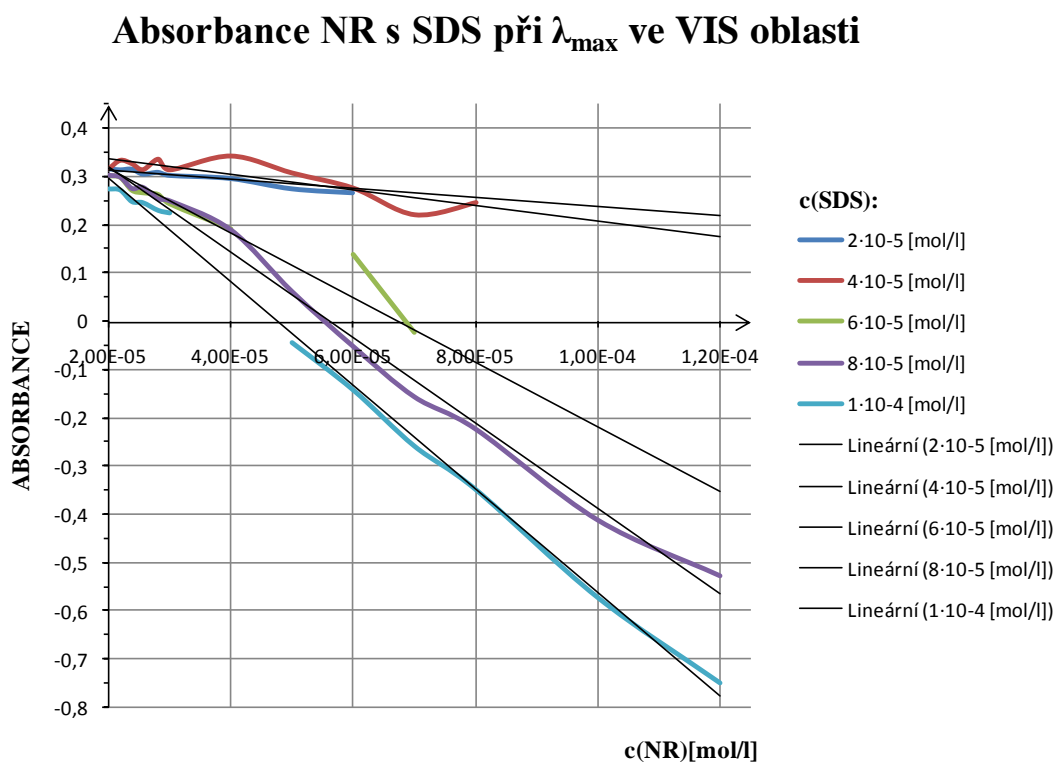
Absorpční spektra NR o $c=8 \cdot 10^{-5}$ mol/l s SDS



Obr.26. Absorpční spektra NR o koncentraci $8 \cdot 10^{-5}$ mol/l s SDS

5.1.2.7 Pozorování vlivu SDS na λ_{\max} NR ve VIS oblasti

Na obr.27. je patrná klesající tendence absorbance v absorpčním maximu NR na různých hladinách SDS. Čím je vyšší hladina tenzidu, tím strmější je pokles absorbance. S absorbancí klesají λ_{\max} . Výsledné závislosti absorbance (A_{\max}) na koncentraci NR byly proloženy na jednotlivých koncentračních hladinách SDS lineární funkcí. Chybějící hodnoty absorbance nebylo možné vyčíst z absorpčních spekter.

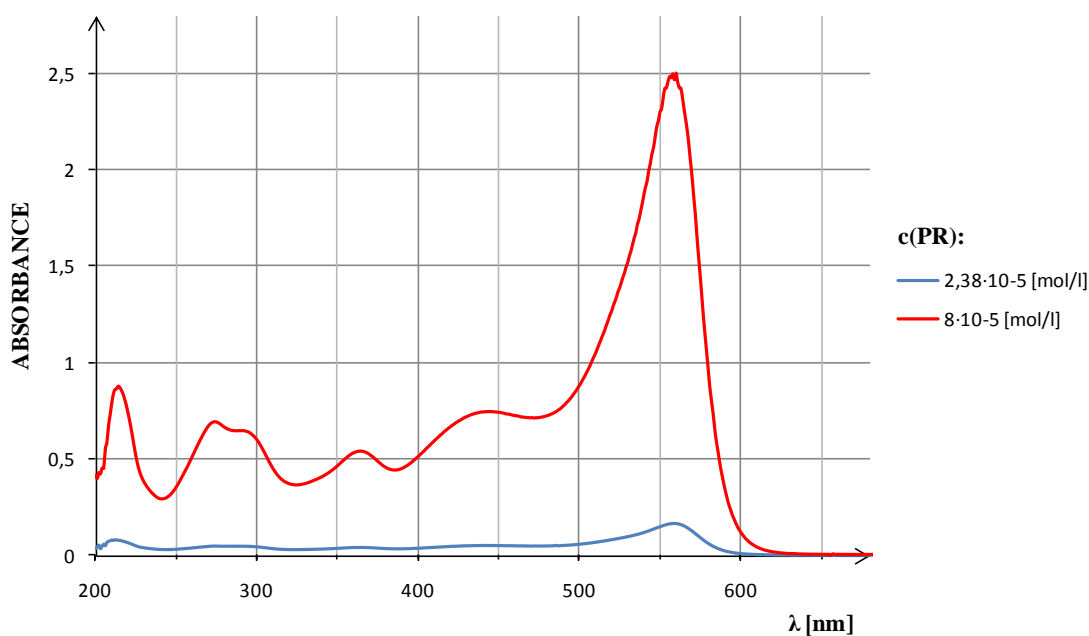


Obr.27. Absorbance NR s SDS při λ_{\max} ve VIS oblasti

5.1.3 Absorpční spektrum PR v BR pufru

Absorpční spektra PR v BR pufru o pH 7,96 jsem získala proměřením slepých roztoků obsahujících vzrůstající koncentraci barviva (viz 4.4.2.2). Ze změřených spekter jsem vybrala dvě odlišná spektra, která jsou znázorněna na obr.28. Tato absorpční spektra odpovídají PR o koncentracích $2,38 \cdot 10^{-5}$ mol/l a $8,00 \cdot 10^{-5}$ mol/l. V BR pufru vykazuje PR několik absorpčních maxim. Pro koncentraci $2,81 \cdot 10^{-5}$ mol/l je patrné pouze λ_{\max} PR 559 nm ve VIS oblasti, zatímco koncentrace $8,00 \cdot 10^{-5}$ mol/l vykazuje několik λ_{\max} PR v UV oblasti a ve VIS oblasti absorpční maxima při 444 nm a 560 nm.

Absorpční spektra PR



Obr.28. Absorpční spektra PR o koncentracích $2,38 \cdot 10^{-5}$ mol/l a $8,00 \cdot 10^{-5}$ mol/l

5.1.4 Výsledky zkoumání vlivu CTAB na optické vlastnosti vodného roztoku fenolové červeně

Na obr.29. až obr.32. jsou znázorněna spektra PR na různých koncentračních hladinách CTAB (příprava vzorků viz 4.4.2.3 až 4.4.2.6). Měření probíhalo proti slepým roztokům (příprava viz 4.4.2.1).

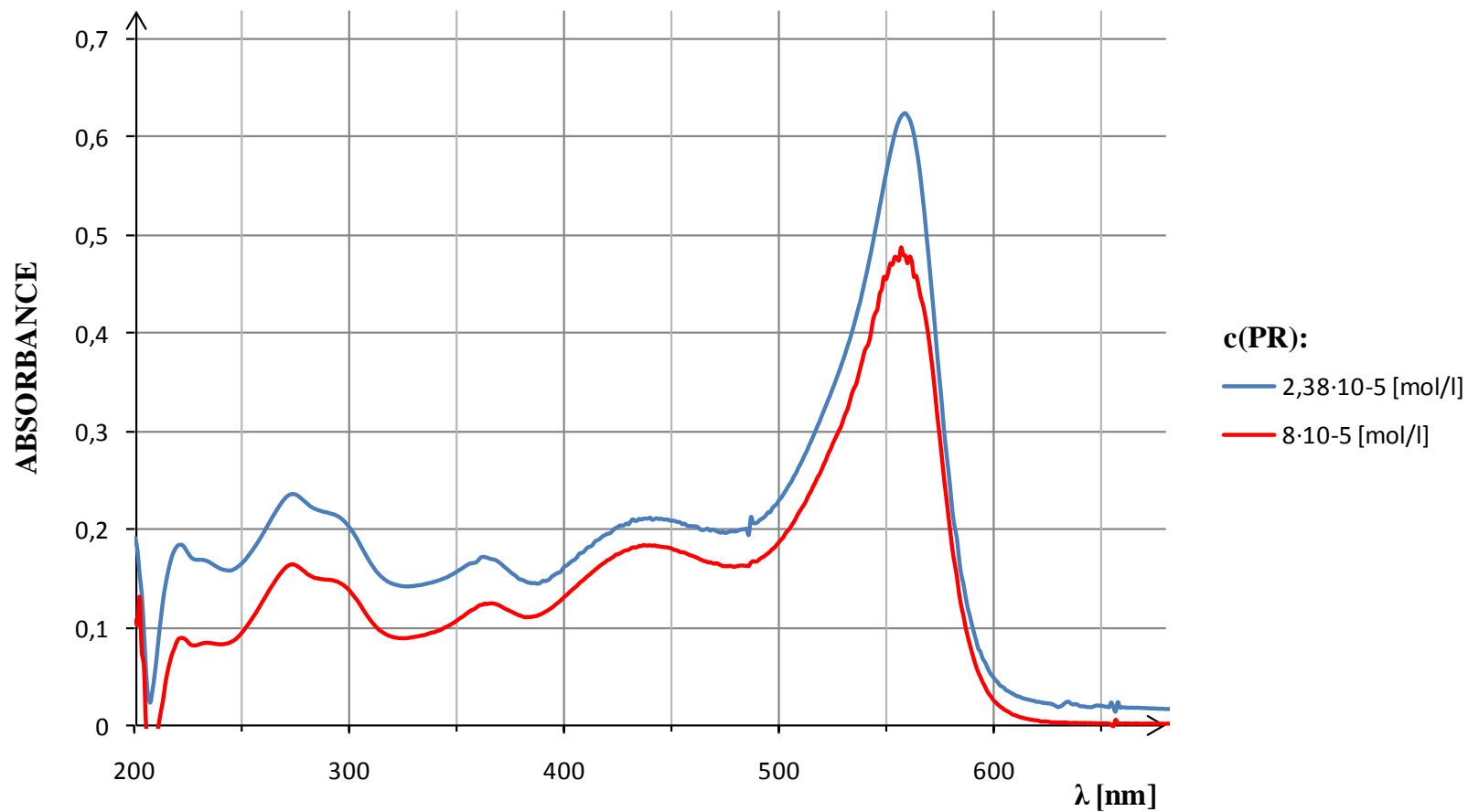
Na všech obrázcích jsou spektra velice podobná, blízká spektrům samotné PR. Absorpční maxima PR těchto spekter se pohybují okolo 440 nm a 559 nm. Se vzrůstající koncentrací barviva v jednotlivé řadě a koncentrací tenzidu na jednotlivých koncentračních hladinách dochází k poklesu absorpčního maxima při 559 nm a nepatrnému zvýšení druhého maxima při 440 nm.

Na obr.33. jsou znázorněna spektra PR o $8,00 \cdot 10^{-5}$ mol/l na vzrůstající hladině CTAB. Tento obrázek je poskládán z předchozích naměřených spekter při koncentraci barviva $8,00 \cdot 10^{-5}$ mol/l. Zde je pozorován běžně v literatuře popisovaný přístup v hodnocení spekter, přesněji řečeno vliv zvyšující se koncentrace CTAB na stálou koncentraci barviva.

Z obrázku je patrné, že dochází pouze k nevýrazným změnám hlavně v UV oblasti, přičemž závislost není zřejmá. V absorpčním maximu při 559 nm dochází ke snižování absorbance úměrně k vzrůstající koncentraci tenzidu.

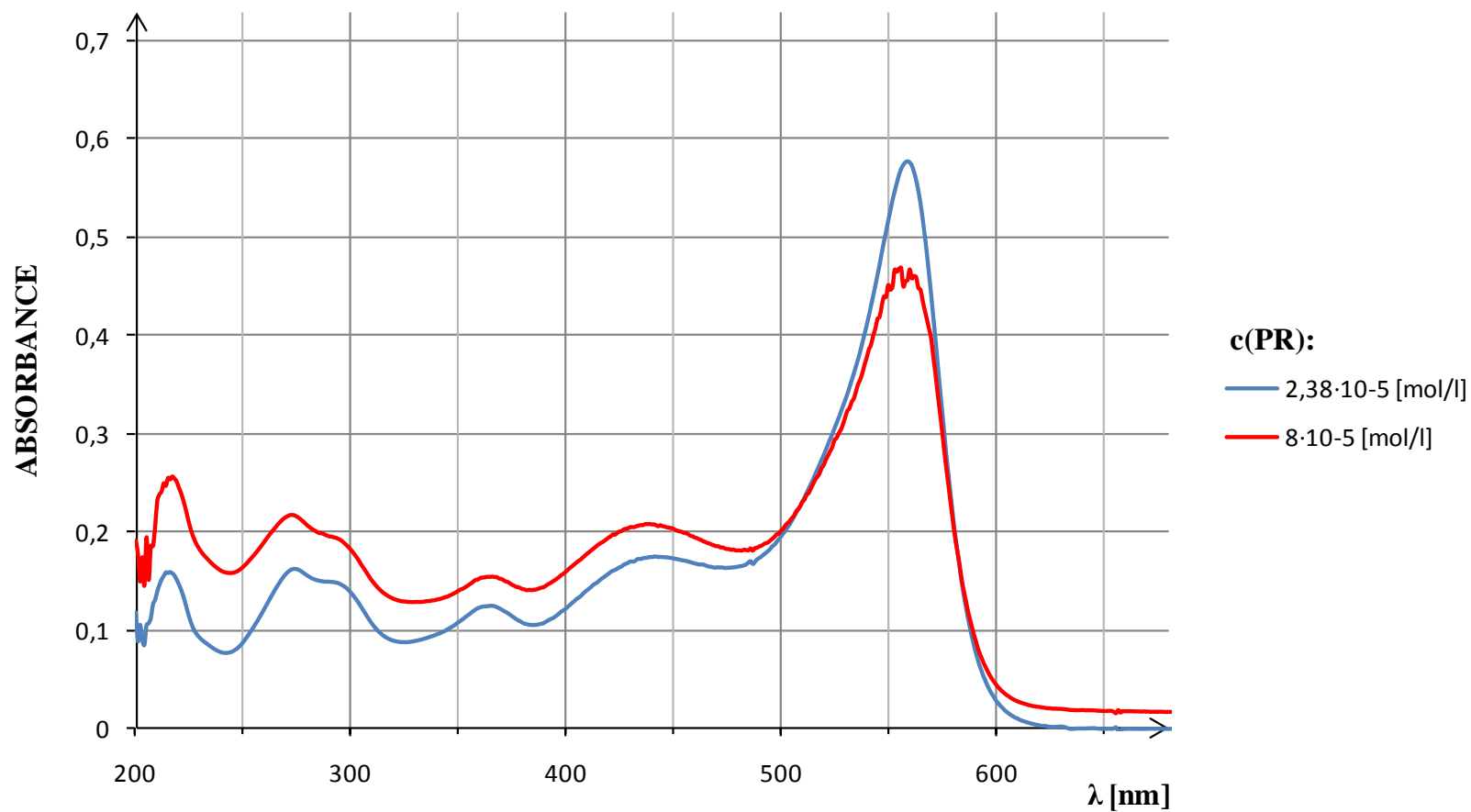
Při pozorování vlivu CTAB na různých koncentračních hladinách na λ_{\max} PR okolo 559 nm ve VIS oblasti (viz obr.34.) nalezneme klesající závislost jako u předchozího barviva. Strmost těchto křivek na různých hladinách tenzidu je podobná.

Absorpční spektra PR s CTAB o $c=2 \cdot 10^{-5}$ mol/l



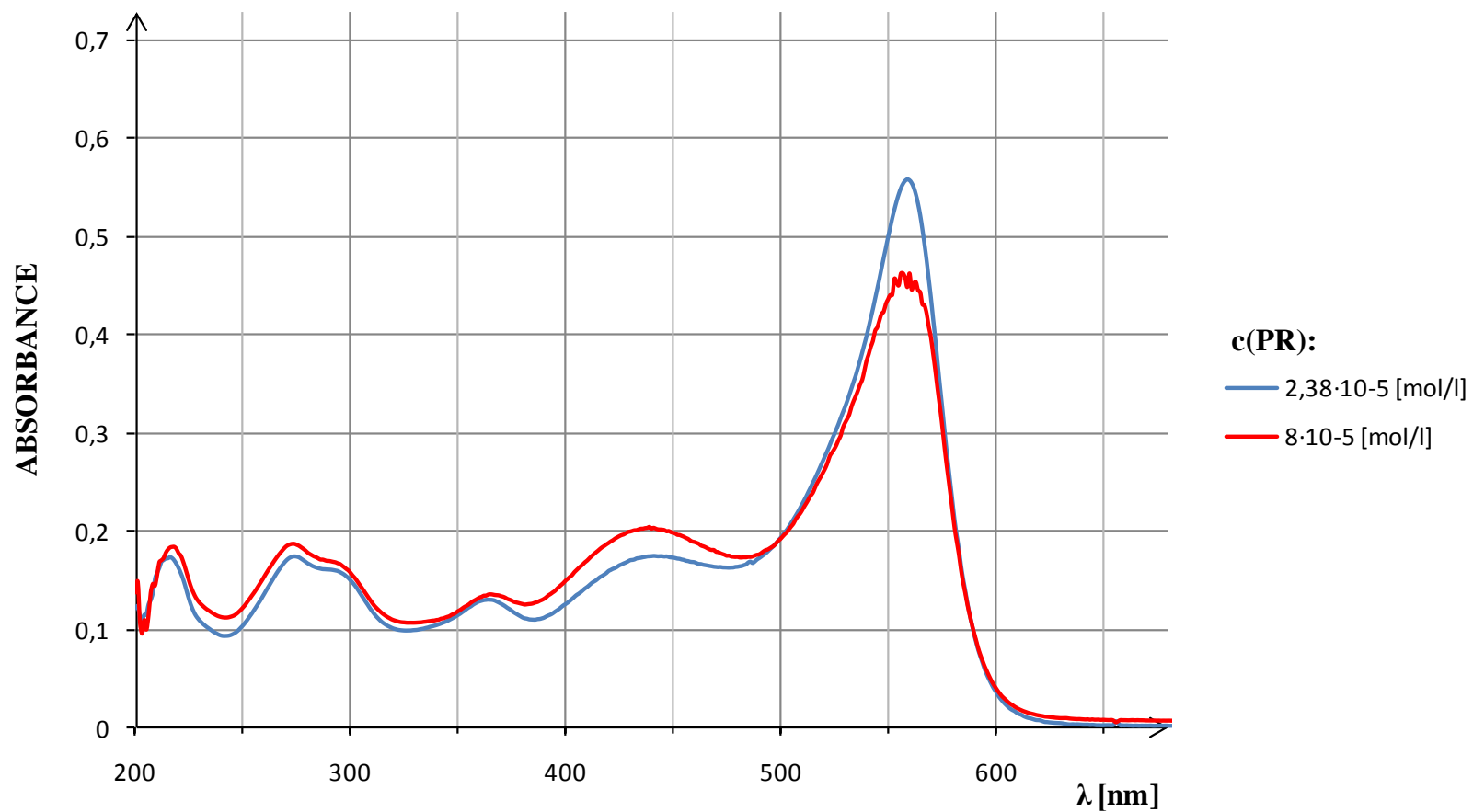
Obr.29. Absorpční spektra PR s CTAB na koncentrační hladině $2 \cdot 10^{-5}$ mol/l

Absorpční spektra PR s CTAB o $c=4 \cdot 10^{-5}$ mol/l



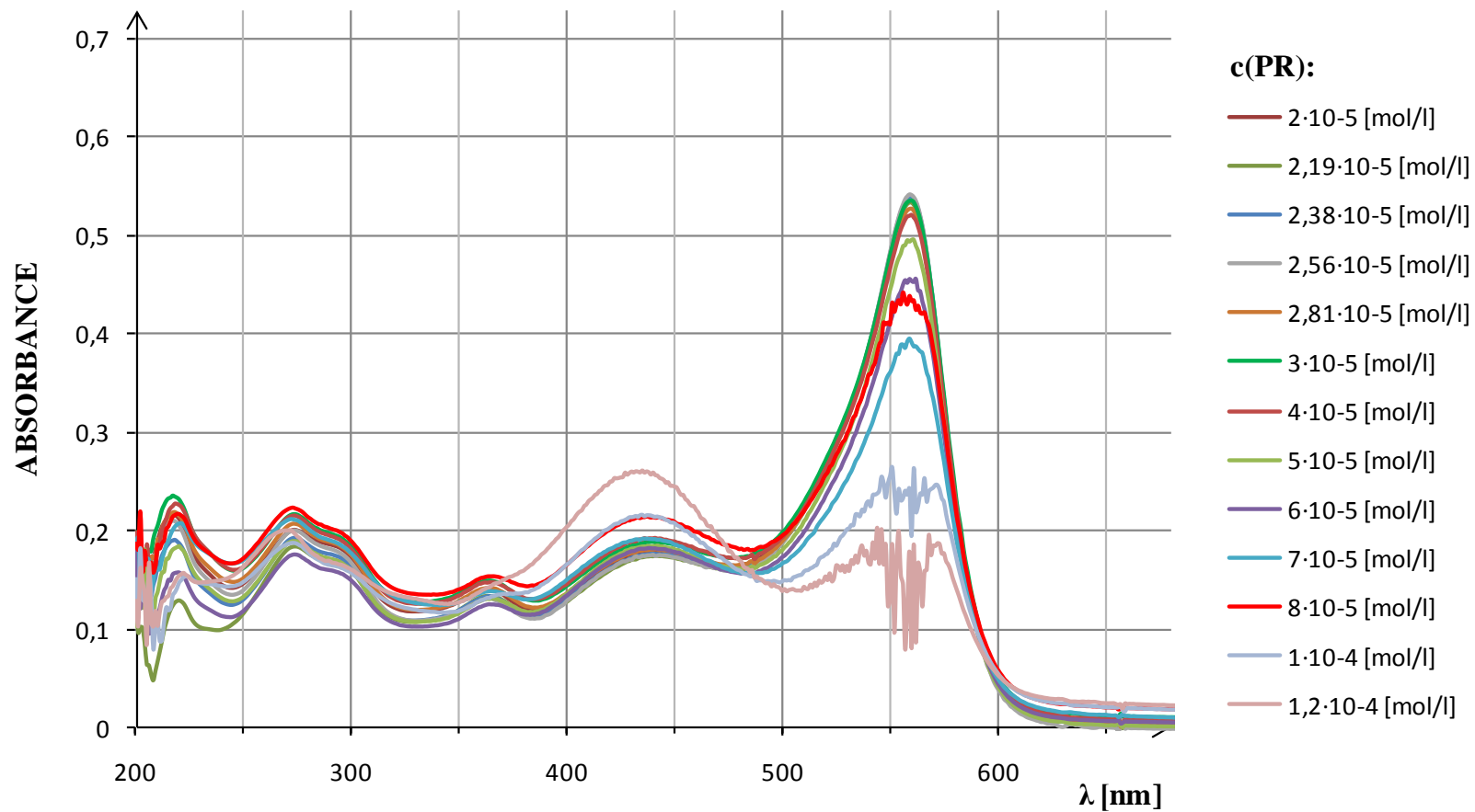
Obr.30. Absorpční spektra PR s CTAB na koncentrační hladině $4 \cdot 10^{-5}$ mol/l

Absorpční spektra PR s CTAB o $c=6 \cdot 10^{-5}$ mol/l



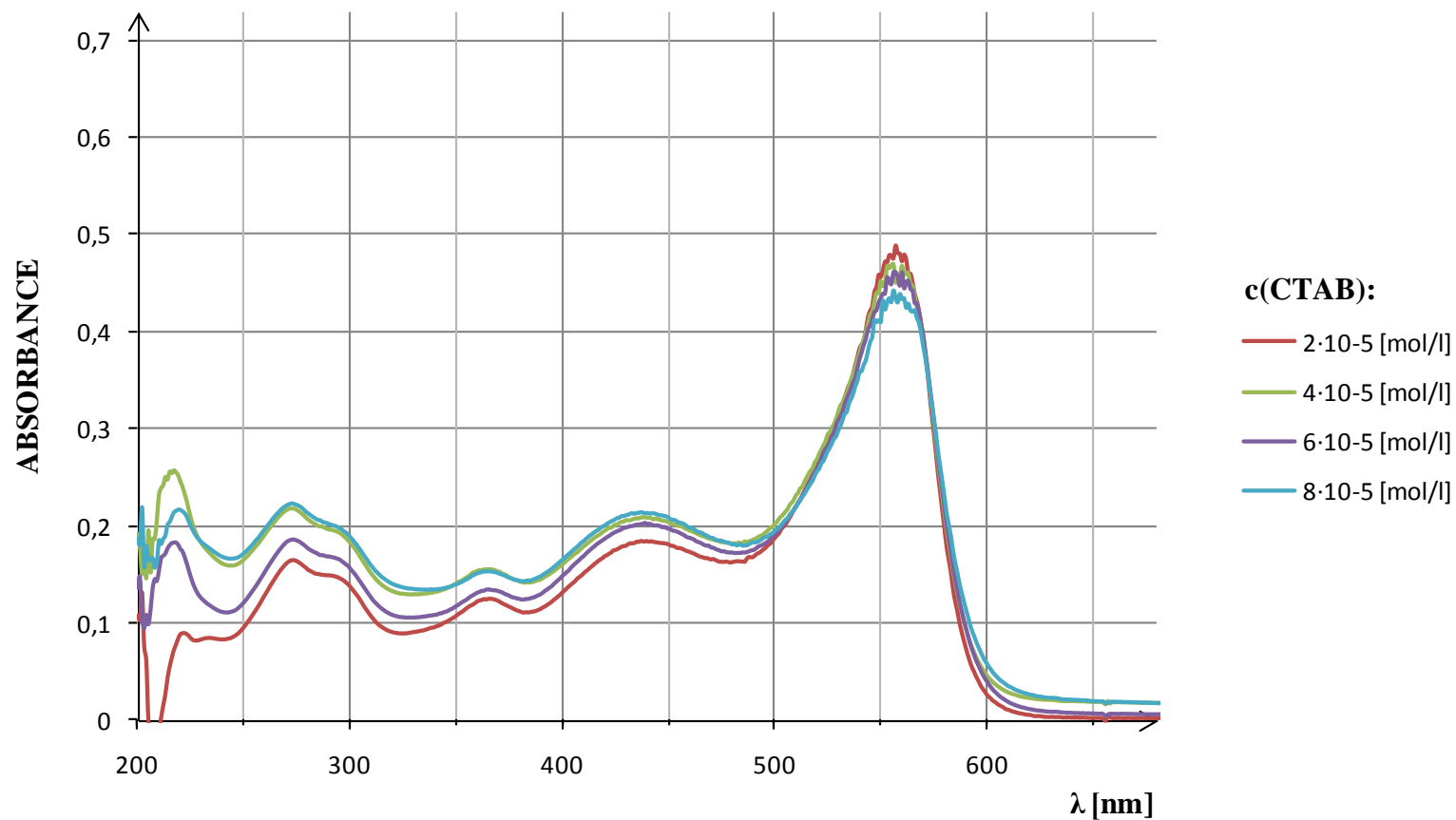
Obr.31. Absorpční spektra PR s CTAB na koncentrační hladině $6 \cdot 10^{-5}$ mol/l

Absorpční spektra PR s CTAB o $c=8 \cdot 10^{-5}$ mol/l



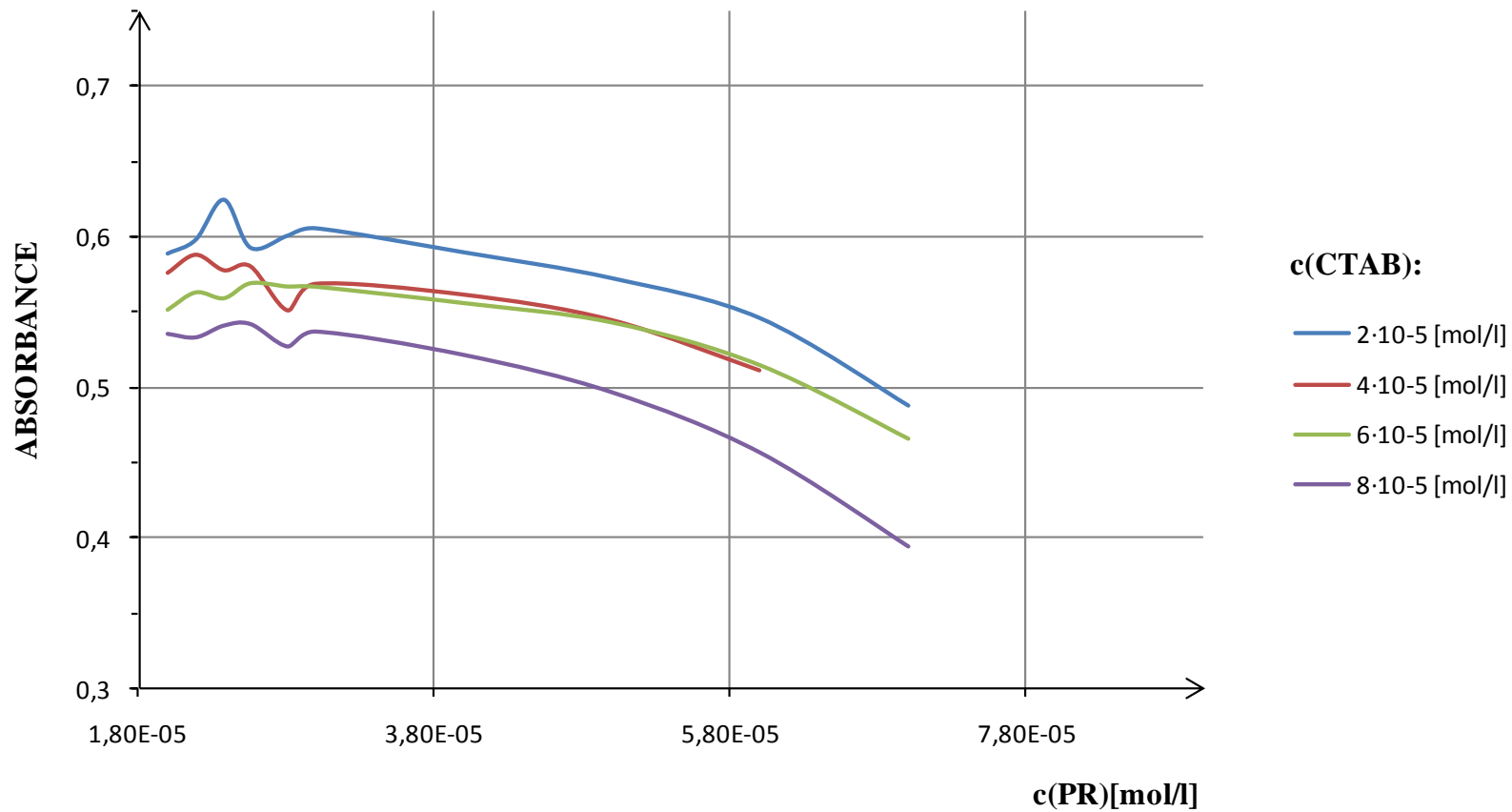
Obr.32. Absorpční spektra PR s CTAB na koncentrační hladině $8 \cdot 10^{-5}$ mol/l

Absorpční spektra PR o $c=8 \cdot 10^{-5}$ mol/l s CTAB



Obr.33. Absorpční spektra PR o koncentraci $8 \cdot 10^{-5}$ mol/l s CTAB

Absorbance PR s CTAB při λ_{\max} ve VIS oblasti



Obr.34. Absorbance PR s CTAB při λ_{\max} okolo 559 nm ve VIS oblasti

5.2 Fluorescenční spektroskopie

5.2.1 Výsledky zkoumání vlivu SDS na intenzitu fluorescence vodného roztoku neutrální červeně

Intenzita fluorescence byla měřena na vzorcích zhotovených dle kapitol 4.4.1.3 až 4.4.1.7.

Na koncentračních hladinách SDS $4 \cdot 10^{-5}$ mol/l, $8 \cdot 10^{-5}$ mol/l a $1 \cdot 10^{-4}$ mol/l jsem nastavila spektrofluorimetr AMINCO-Bowman Series 2 následovně:

- λ_{ex} : měněna dle hodnot λ_{max} odečtených z absorpčních spekter daných vzorků (viz tab.6.), červeně uvedené hodnoty nebylo možné odečíst z absorpčních spekter, hodnoty byly nastavené dle předpokládané λ_{max}
- λ_{em} : 605 nm
- Šířka štěrbin: 4 nm
- Citlivost: 885 voltů
- **Vzorek pro nastavení citlivosti:** č. 5 v koncentrační řadě SDS $4 \cdot 10^{-5}$ mol/l pro všechna měření

Na koncentrační hladině SDS $2 \cdot 10^{-5}$ mol/l:

- λ_{ex} : měněna dle hodnot λ_{max} odečtených z absorpčních spekter daných vzorků (viz tab.6.), červeně uvedené hodnoty nebylo možné odečíst z absorpčních spekter, hodnoty byly nastavené dle předpokládané λ_{max}
- λ_{em} : 620 nm
- Šířka štěrbin: 4 nm
- Citlivost: 850 voltů
- **Vzorek pro nastavení citlivosti:** č. 5 v této koncentrační řadě

Na koncentrační hladině SDS $6 \cdot 10^{-5}$ mol/l:

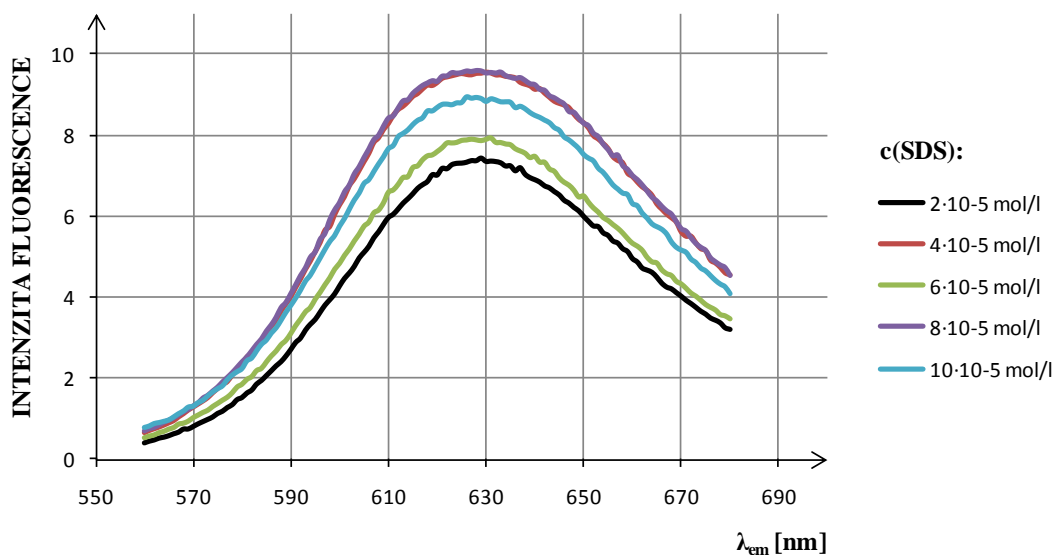
- λ_{ex} : měněna dle hodnot λ_{max} odečtených z absorpčních spekter daných vzorků (viz tab.6.), červeně uvedené hodnoty nebylo možné odečíst z absorpčních spekter, hodnoty byly nastavené dle předpokládané λ_{max}
- λ_{em} : 630 nm
- Šířka štěrbin: 4 nm

- **Citlivost:** 860 voltů
- **Vzorek pro nastavení citlivosti:** č. 5 v této koncentrační řadě

Poznámka: Citlivost se u použitého typu spektrofluorimetru nastavuje jako napětí na fotonásobiči.

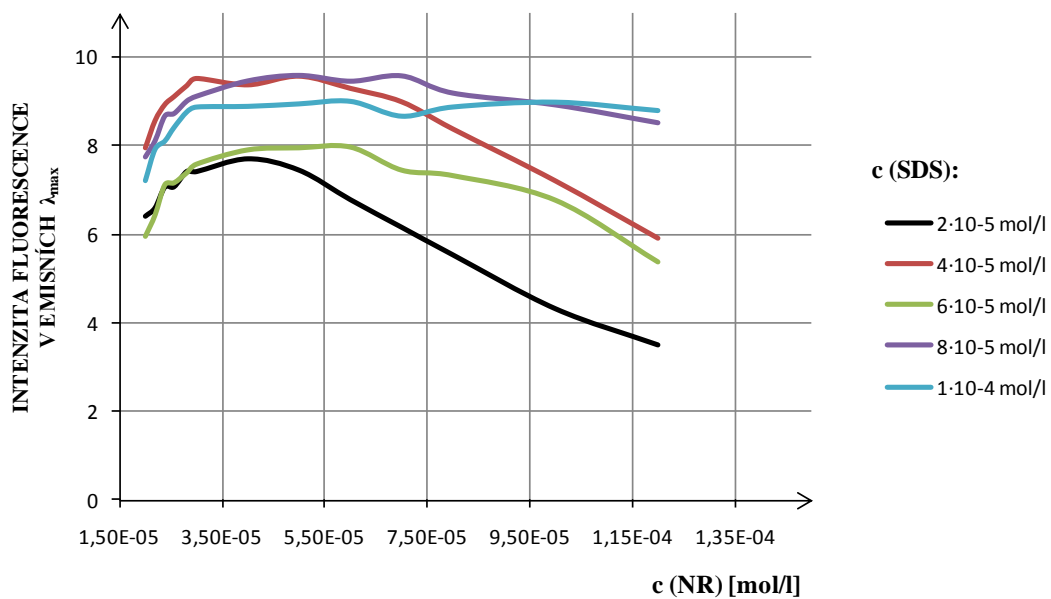
Při sledování fluorescenčních spekter barviva s tenzidem by mělo být měřeno vše při stejné citlivosti, ale ve dvou případech se to nepodařilo. Na obr.35. jsou fluorescenční spektra NR o koncentraci $5,00 \cdot 10^{-5}$ mol/l na různých hladinách SDS (hodnoty IF viz tab.6., tučně vyištěný řádek). Pokud se soustředíme na spektra měřená shodně, tudíž na koncentračních hladinách SDS $4 \cdot 10^{-5}$ mol/l, $8 \cdot 10^{-5}$ mol/l a $1 \cdot 10^{-4}$ mol/l, pak dochází k nepatrnému snížení IF u hladiny $1 \cdot 10^{-4}$ mol/l. λ_{em} se pohybuje okolo 630 nm. IF NR v emisních maximech na různých hladinách SDS se zvyšující se hladinou NR klesá různě strmě (viz obr.36., hodnoty viz tab.6.). Při srovnání koncentračních hladin tenzidu $4 \cdot 10^{-5}$ mol/l, $8 \cdot 10^{-5}$ mol/l a $1 \cdot 10^{-4}$ mol/l, dochází opět ke snížení IF při dosažení hladiny $1 \cdot 10^{-4}$ mol/l.

Fluorescence NR s SDS



Obr.35. Fluorescenční spektra NR o $c=5,00 \cdot 10^{-5}$ mol/l na různých hladinách SDS

Fluorescence NR s SDS



Obr.36. Intenzita fluorescence **NR** v emisních maximech na různých hladinách **SDS** v závislosti na koncentraci **NR**

Tab.6.: Výsledky zkoumání vlivu SDS na intenzitu fluorescence vodného roztoku NR

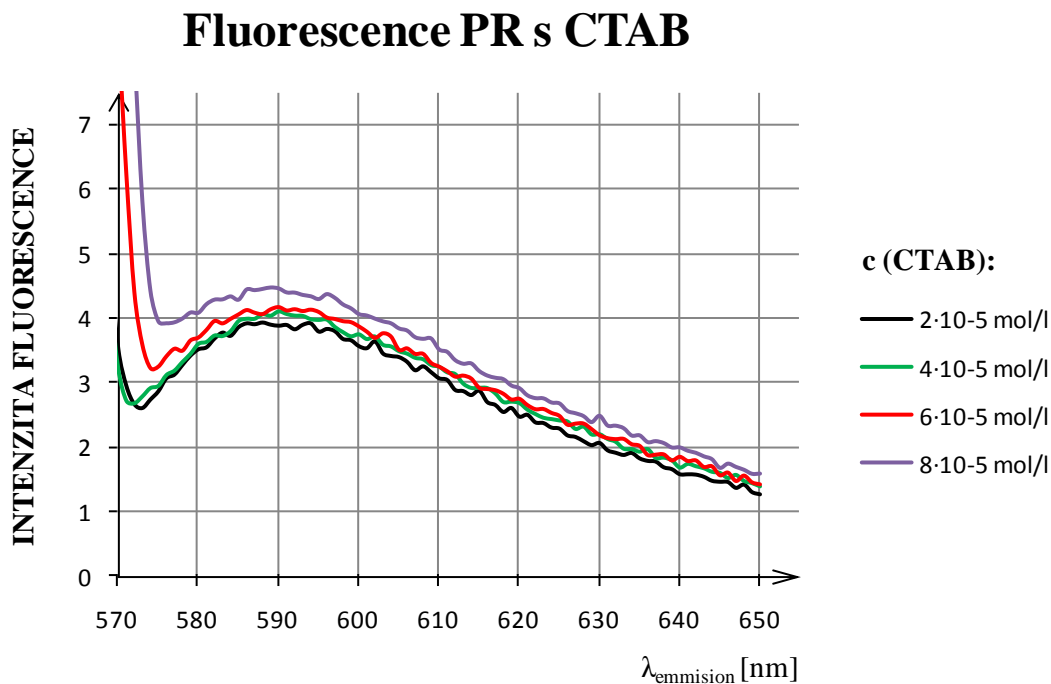
	Požadovaná c(SDS):														
	2·10 ⁻⁵ mol/l			4·10 ⁻⁵ mol/l			6·10 ⁻⁵ mol/l			8·10 ⁻⁵ mol/l			1·10 ⁻⁴ mol/l		
	λ_{ex} [nm]	λ_{em} [nm]	IF	λ_{ex} [nm]	λ_{em} [nm]	IF	λ_{ex} [nm]	λ_{em} [nm]	IF	λ_{ex} [nm]	λ_{em} [nm]	IF	λ_{ex} [nm]	λ_{em} [nm]	IF
1	531	628	6,41022	533	625	7,94220	533	628	5,93536	534	627	7,72430	533	625	7,22107
2	531	631	6,60034	531	627	8,55560	531	627	6,41937	533	627	8,09296	531	627	7,92572
3	529	629	7,07123	531	629	8,91449	530	630	7,09900	530	625	8,65234	532	630	8,10730
4	529	628	7,07794	530	627	9,09302	529	628	7,14233	529	628	8,70850	530	627	8,41278
5	526	626	7,42554	529	627	9,34021	528	628	7,37030	530	627	8,99261	532	629	8,76190
6	528	627	7,42035	527	626	9,49951	529	627	7,56439	530	628	9,10187	529	625	8,86993
7	522	629	7,70874	525	625	9,35638	525	631	7,88605	527	627	9,44946	530	631	8,88489
8	521	629	7,45117	523	630	9,55109	521	631	7,93243	530	628	9,57428	530	626	8,94043
9	519	629	6,78467	521	629	9,27734	527	629	7,94922	530	627	9,44214	530	627	8,99750
10	520	629	6,16089	522	630	8,97522	518	629	7,42859	530	627	9,56360	530	625	8,66486
11	520	629	5,53741	521	629	8,36517	520	630	7,30438	530	630	9,17267	530	629	8,87085
12	521	625	4,31976	525	629	7,19879	514	627	6,75049	530	631	8,90411	530	628	8,97888
13	520	632	3,50189	525	631	5,91217	520	629	5,35828	530	627	8,49915	530	629	8,79059

5.2.2 Výsledky zkoumání vlivu CTAB na intenzitu fluorescence vodného roztoku fenolové červeně

Intenzita fluorescence byla měřena na vzorcích zhotovených dle kapitol 4.4.2.3 až 4.4.2.6 při tomto nastavení spektrofluorimetru AMINCO-Bowman Series 2:

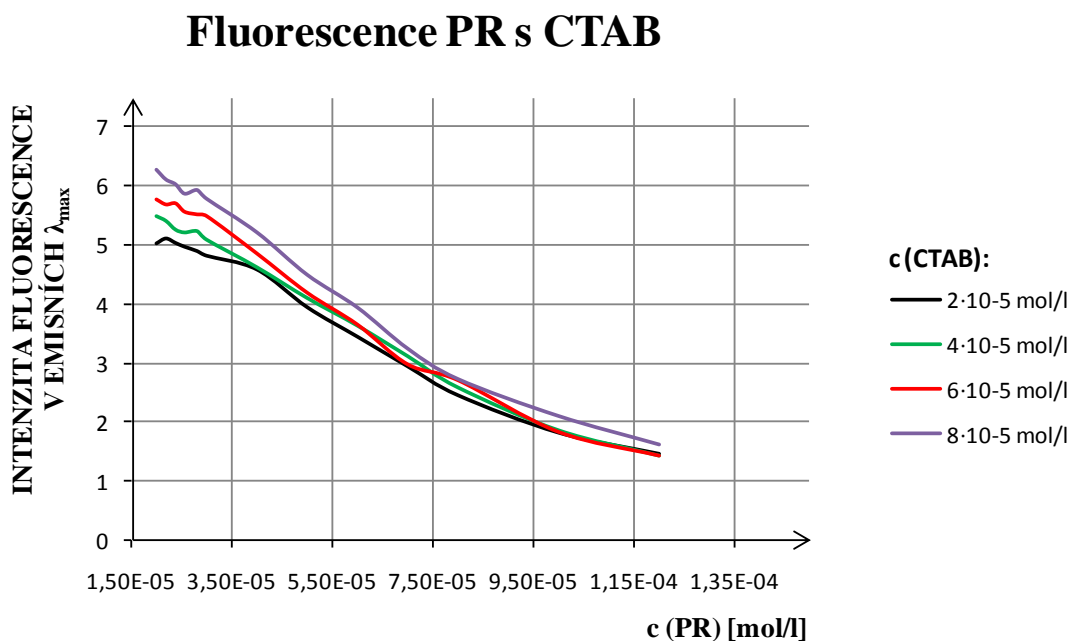
- λ_{ex} : měněna dle hodnot λ_{max} odečtených z absorpčních spekter daných vzorků (viz tab.7.), červeně uvedené hodnoty nebylo možné odečíst z absorpčních spekter, hodnoty byly nastavené dle předpokládané λ_{max}
- λ_{em} : 580 nm
- Šířka štěrbin: 8 nm
- Citlivost: 1275 voltů
- Vzorek pro nastavení citlivosti: č.6 v 1.koncentrační řadě pro všechna měření

Při sledování vlivu CTAB na fluorescenční spektrum PR nebyly pozorovány výrazné změny. Na obr.37. jsou fluorescenční spektra PR o koncentraci $5,00 \cdot 10^{-5}$ mol/l na různých hladinách CTAB (hodnoty IF viz tab.7., tučně vytištěný řádek). Se zvyšující se koncentrací tenzidu intenzita fluorescence nepatrně roste. λ_{em} se pohybuje okolo 589 nm.



Obr.37. Fluorescenční spektra PR o $c=5,00 \cdot 10^{-5}$ mol/l na různých hladinách CTAB

Na obr.38. je závislost intenzity fluorescence v emisních maximech na vzrůstající koncentraci PR (hodnoty viz tab.7.). Intenzita fluorescence ve všech případech strmě klesá s rostoucí koncentrací PR a nejvyšší strmota je pozorována u koncentrační hladiny tenzidu $8 \cdot 10^{-5}$ mol/l.



Obr.38. Intenzita fluorescence **PR** v emisních maximech na různých hladinách **CTAB** v závislosti na koncentraci PR

Tab.7.: Výsledky zkoumání vlivu **CTAB** na intenzitu fluorescence vodného roztoku **PR**

	Požadovaná c(CTAB):											
	2·10 ⁻⁵ mol/l			4·10 ⁻⁵ mol/l			6·10 ⁻⁵ mol/l			8·10 ⁻⁵ mol/l		
	λ_{ex} [nm]	λ_{em} [nm]	IF	λ_{ex} [nm]	λ_{em} [nm]	IF	λ_{ex} [nm]	λ_{em} [nm]	IF	λ_{ex} [nm]	λ_{em} [nm]	IF
1	559	584	5,01434	559	580	5,48340	559	581	5,76477	559	581	6,27167
2	559	582	5,09766	559	581	5,40222	559	584	5,67871	559	582	6,10535
3	559	586	5,02258	559	581	5,25482	559	582	5,69855	559	580	6,02478
4	559	585	4,95850	559	584	5,20782	559	583	5,55634	559	585	5,86426
5	559	585	4,88525	559	584	5,22980	559	583	5,51086	560	583	5,92651
6	559	584	4,80621	559	587	5,08514	559	589	5,48248	560	583	5,77728
7	559	586	4,57428	560	588	4,62006	559	588	4,84924	560	587	5,20721
8	559	588	3,93829	558	590	4,10156	560	590	4,18549	561	589	4,48761
9	558	591	3,44086	558	590	3,63525	559	590	3,64563	559	591	3,93158
10	560	591	2,94037	559	592	3,11981	558	591	2,97302	559	594	3,23395
11	559	593	2,45361	559	594	2,59277	559	597	2,70508	559	595	2,71759
12	559	595	1,82312	559	596	1,87073	559	596	1,83044	559	597	2,09045
13	559	598	1,46698	559	601	1,44348	559	597	1,42914	559	598	1,60675

6 DISKUSE

6.1 Interakce SDS s NR

Při pozorování absorpčních spekter barviva s tenzidem je nejdříve nutné, abychom znali absorpční spektra samotných barviv. Na obr.20. je znázorněno samotné spektrum NR o dvou různých koncentracích. Obě vlnové délky maxima se posouvají se vzrůstající koncentrací barviva k nižším hodnotám. Tyto nevelké hypsochromní posuny v řádu jednotek až jedné desítky nm lze přisuzovat tvorbě dimerů barviva [23, 8]. Tyto nepatrné změny nemají význam při posuzování absorpčních spekter barviva s tenzidem, kde byly nalezeny posuny mnohem větší.

Ve své práci jsem sledovala interakci NR s SDS na koncentračních hladinách SDS $2 \cdot 10^{-5}$ mol/l, $4 \cdot 10^{-5}$ mol/l, $6 \cdot 10^{-5}$ mol/l, $8 \cdot 10^{-5}$ mol/l a $1 \cdot 10^{-4}$ mol/l. Tyto hladiny byly zvoleny v koncentracích ještě pod cmc tenzidu, která s ohledem na iontovou sílu použitého pufru je $4,6 \cdot 10^{-3}$ mol/l [20].

Na koncentračních hladinách $2 \cdot 10^{-5}$ mol/l a $4 \cdot 10^{-5}$ mol/l nedochází k výrazným změnám, pouze se snižují λ_{\max} a absorbance se zvyšují se koncentrací barviva. Poněvadž dochází přibližně ke stejným posunům λ_{\max} jako tomu je u samotného barviva, nelze předpokládat tvorbu jakýchkoli agregátů NR s tenzidem. Zde pouze usuzují na tvorbu iontových párů, které výrazně snižují absorbanci barviva.

Na koncentračních hladinách $6 \cdot 10^{-5}$ mol/l, $8 \cdot 10^{-5}$ mol/l a $1 \cdot 10^{-4}$ mol/l (viz obr.21. až obr.25.) je situace ale výrazně odlišná od předchozích dvou hladin. Vznikají dva nové absorpční pásy se současným zánikem pásů původních. Tyto nové systémy se liší v energii, kterou při přechodu elektronů přijímají, jinak řečeno absorbují při odlišných vlnových délkách oproti původnímu barvivu. Nově vzniklý absorpční pás (648 nm) lze přisuzovat dvojitě protonizované formě barviva asociované s tenzidem [8], zatímco druhý pás při 334 nm vzniká při tvorbě jiného vysoce uspořádaného asociátu tenzidu s barvivem. Původní absorpční pás okolo 530 nm odpovídá barvivu v kationické formě, které nejspíše vytváří iontový pár s tenzidem, což je pozorováno díky snižující se absorbanci se vzrůstající koncentrací barviva.

Nejvýraznější posuny nastávají na koncentrační hladině $1 \cdot 10^{-4}$ mol/l. Zde jsou zřetelné i tři isosbestické body, které charakterizují rovnováhu mezi čtyřmi formami systému barvivo-tenzid. Zřejmě se jedná o samotný kationt, iontový pár, asociát dvojitě

protonizovaného kationtu s tenzidem a vysoce uspořádaný asociát. Absorpční pás při 334 nm nelze přičítat neutrální formě barviva, neboť tento pás leží okolo 452 nm.

Fluorescenční spektra v tomto případě poskytují méně informací. To je částečně způsobeno tím, že se nepodařilo měřit na všech hladinách se stejnou citlivostí. Avšak přesto je vidět, že nedochází k posunům vlnové délky emisních maxim a změny v intenzitě emise jsou přinejmenším z velké míry ovlivněny nestejnými absorbancemi v závislosti na koncentracích barviva, tedy nestejnou intenzitou excitačního záření.

6.2 Interakce CTAB s PR

Zatímco samotné spektrum NRjevilo zřetelné změny v λ_{\max} , u spekter PR hodnoty λ_{\max} kolísají velmi nepatrně, což může být způsobeno také limitovanou přesností určení vlnových délek maxim z naměřených spekter (viz obr.28.).

Ve své práci jsem sledovala interakci PR s CTAB na koncentračních hladinách CTAB $2 \cdot 10^{-5}$ mol/l, $4 \cdot 10^{-5}$ mol/l, $6 \cdot 10^{-5}$ mol/l a $8 \cdot 10^{-5}$ mol/l. Tyto hladiny byly zvoleny v koncentracích ještě pod cmc tenzidu, která je v tomto případě při 25°C $2,3 \cdot 10^{-4}$ mol/l [23].

Spektra vykazují dvě absorpční maxima (viz obr.29. až obr.32.), která se v průběhu zvyšování koncentrací PR i CTAB, co se týče vlnových délek maxim, nemění. Absorbance v okolí 559 nm se vzrůstající koncentrací barviva pozvolna klesá, což ukazuje na určité ovlivnění tenzidem. Absorpční maximum okolo 440 nm odpovídá jednomocnému aniontu barviva a druhé absorpční maximum okolo 559 nm náleží dvojmocnému aniontu barviva [9]. V druhém případě dochází jen k nepatrnému poklesu absorbance vlivem rostoucího množství tenzidu a zároveň se začíná více uplatňovat jednomocný aniont barviva.

Je-li PR v roztoku přítomna v dianiontové formě, je polarita tohoto aniontu patrně již tak velká, že zásadně převládá iontový charakter částice nad hydrofobním a hydrofobní vlastnosti se neprojeví. Domnívám se, že nepatrné posuny maxim ve spektrech mohou být vyvolány pouze tvorbou iontových párů.

Se zvyšující se hladinou tenzidu se jen nepatrně navyšuje IF (viz obr.37.). Se zvyšující se koncentrací barviva IF v emisních maximech strmě klesá, z čehož by se dala usuzovat samozhášecí schopnost PR. Je ovšem třeba i zde připomenout, že pokles hodnot IF s koncentrací PR je ve značné míře způsoben klesající intenzitou excitačního záření (srov. obr.34. a obr.38.). Emisní λ_{\max} se nějak výrazně nemění a pohybuje se okolo 589 nm.

7 ZÁVĚR

Tato diplomová práce se zabývala pozorováním interakcí ve dvou odlišných systémech barviva s tenzidem: neutrální červeně s laurylsíranem sodným a fenolové červeně s cetyltrimethylammonium-bromidem. Měření byla prováděna v submicelární oblasti. Byl zvolen postup, kdy měření probíhala na několika koncentračních hladinách tenzidu, a koncentrace barviv byly na příslušné koncentrační hladině tenzidu zvyšovány. K posuzování daných interakcí byly použity dvě optické metody absorpční a fluorescenční spektroskopie.

Změny v absorpčních spektrech NR s SDS jsou významného charakteru oproti spektrům samotného barviva. Se zvyšující se koncentrací SDS (od hladiny SDS $6 \cdot 10^{-5}$ mol/l) dochází k tvorbě dvou nových odlišných asociátů. Nejvýraznější změny jsou pozorovány na hladině SDS $1 \cdot 10^{-4}$ mol/l. Asociát absorbující při nižší energii je považován za systém tenzidu s dvojitě protonizovaným barvivem. Naměřená fluorescenční spektra nebylo možné k podobným závěrům využít.

V roztocích PR s CTAB nedochází k výrazným změnám absorpčních spekter pravděpodobně proto, že dianiontová forma PR v molekule postrádá dostačující hydrofobní část. Je pravděpodobné, že při těchto interakcích působí pouze iontové síly, a tudíž se tvoří iontové páry.

Fluorescenční analýza roztoků PR s CTAB koreluje s dosaženými výsledky v absorpční spektroskopii, neboť ani zde nedochází k markantním změnám. S přidáním CTAB na konstantní koncentraci barviva se jen nepatrně zvyšuje intenzita fluorescence, naopak se zvyšující se koncentrací barviva intenzita fluorescence v emisních maximech výrazně klesá.

U obou barviv je zřejmé, že dochází k ovlivnění jejich optických vlastností tenzidy, což se projeví v absorpčních a emisních spektrech. V obou případech však bylo možné získat viditelně více informací o interakcích barvivo-tenzid ze spekter absorpčních. To lze interpretovat tak, že energie nejnižšího excitovaného singletního stavu není ovlivněna rozsahem asociace částic ve studované soustavě. To je poněkud paradoxní závěr, uvědomíme-li si, že při interpretaci absorpčních spekter byla ve shodě s literárními údaji uvažována tvorba iontů s jedním i více náboji. Je však možné, že díky asociaci jsou fluorofory ve studovaných roztocích natolik stabilizovány bez ohledu na rozsah ionizace, že se ionizace v emisních spektrech nijak neprojeví.

Míra a forma změn ve spektrech závisí výrazně na hydrofobních i elektrostatických nevazebných interakcích ve studovaných systémech. To je patrně důvodem mnohem výraznějších změn ve spektrech v roztocích NR s SDS v porovnání s roztoky PR s CTAB. Tato skutečnost je rovněž překvapující neboť koncentrace CTAB v roztocích PR s CTAB byly mnohem blíže hodnotě cmc než koncentrace SDS v roztocích NR s SDS.

Lze konstatovat, že podle získaných výsledků se v roztocích barviv a tenzidů vyskytují asociáty různého složení, což podporuje závěry práce [23].

8 LITERATURA

- [1] GARCÍA-RÍO, L. et al. Spectroscopic and kinetic investigation of the interaction between crystal violet and sodium dodecylsulfate. *Chemical Physics*, **2007**, 335: 164-176.
- [2] KARLÍČEK, R. et al. *Analytická chemie pro farmaceuty*. Praha: Karolinum, **2005**. 281 s. ISBN 80-246-0348-9.
- [3] LÁZNÍČKOVÁ, A., KUBÍČEK, V. *Základy fyzikální chemie: Vybrané kapitoly pro posluchače Farmaceutické fakulty*. Praha: Karolinum, **2004**, 171 s. ISBN 80-246-0220-2.
- [4] BUWALDA, R.T. *Molecular Aggregation in Water: The Interplay of Hydrophobic and Electrostatic Interactions (Chapter 1, 7)* [online]. Groningen, Nov. **2001**. 159 s. Dissertation at University of Groningen. Faculty of Mathematics and Natural Sciences. ISBN 90-367-1434-6. [citováno 2010-04-05].
Dostupné z : <<http://irs.ub.rug.nl/ppn/229410448> >
- [5] VLAS, T. *Spektrofotometrie: Absorbanční křivka* [online]. Poslední revize 9.5.2007 [citováno 2010-04-05].
Dostupné z: <<http://projektalfa.ic.cz/>>
- [6] FIŠAR, Z. *Fluorescenční spektroskopie v neurovědách* [online]. Praha: 1. lékařská fakulta UK. Psychiatrická klinika. Publikováno na internetu v roce **2003**. 88 s. [citováno 2010-04-05].
Dostupné z : <www1.lf1.cuni.cz/~zfishar/fluorescence/soubory/fluorescence.pdf>
- [7] *Sicherheitsdatenblatt: gemäß 1907/2006/EG, Artikel 31 (NEUTRALROT (C.I. 50040) p.a.)*. Karlsruhe: Carl Roth GmbH + Co. KG, 2008. 4 s.
- [8] DUTTA, R.K., BHAT, S.N. Association of neutral red with micelles and its effect on the pK_a. *Can. J. Chem.*, **1993**, 71:1785-1791.
- [9] SINGH., M.K. et al. Photophysical Properties of Cationic Form of Neutral Red. *Photochemistry and Photobiology*, **1999**, 69(5): 529-535.
- [10] RAUF, A M., SOLIMAN, A A., KHATTAB, M. Solvent effect on the spectral properties of Neutral Red. *Chemistry Central Journ*, Sept. **2008**, 2: 19.

-
- [11] *Sicherheitsdatenblatt: gemäß Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 (Phenolrot Indikator ACS)*. Darmstadt: Merck KGaA, **2009**. 5 s.
- [12] *Český lékopis 2009: Pharmacopoea Bohemica MMIX*. Ministerstvo zdravotnictví ČR. Praha: Grada Publishing, a.s., **2009**. 3968 s. ISBN 978-80-247-2994-7.
- [13] YAMAGUCHI, K., TAMURA, Z., MAEDA, M. Molekular Structure of the Zwitterionic Form of Phenolsulfonphthalein. *Analytical sciences*, **1997**, vol.13: 521-522.
- [14] TAMURA, Z., MAEDA, M. Differences between Phthaleins and Sulfonphthaleins. *Yakugaku Zasshi*, **1997** Nov, 117 (10-11): 764-770. (Pozn. text je originálně v japonštině, využit anglický abstrakt a obrázky 6., 8.)
- [15] KOMÁREK, P., RABIŠKOVÁ, M. et al. *Technologie léků: Galenika*. Třetí, přepracované a doplněné vydání. Praha: Galén, **2006**. 399 s. ISBN 80-7262-423-7.
- [16] 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*, **1998**, 102: 1528-1538.
- [17] *Gefahrstoffdatenbanken: a. Natriumdodecylsulfate,*
b. Cetyltrimethylammoniumbromid .
IFA-Institut für Arbeitsschutz der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung [online] [citováno 2010-04-12].
Dostupné z : **a., b.** <www.dguv.de/ifa/stoffdatenbank>
- [18] WILLIAMS, CH.L., BHAKTA, A.B., NEOGI, P. MASS Transfer of a Solubilizate in a Micellar Solution and Across an Interface. *J. Phys. Chem. B*, **1999**, 103: 3242-3249.
- [19] 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*, **1999**, 15: 1083-9.
- [20] LUNDOVÁ, T. *Bakalářská práce*, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, katedra biofyziky a fyzikální chemie, **2009**.
- [21] DUTTA, R.K., BHAT, S.N. Interaction of Methyl Orange with Submicellar Cationic Surfactants. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1993**, 66: 2457-2460.

-
- [22] GOHAIN, B., et al. Hydrophobicity-induced deprotonation of dye in dye-submicellar surfactant systems. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2002**, 4: 2617-2620.
- [23] KUBÍČEK, V., NĚMCOVÁ, K. Study of the interaction phenomena of cetyltrimethyl-ammonium bromide, cetylpyridinium chloride and benzethonium chloride with C.I. Acid Orange 52 and picric acid by two spectral methods. *Dyes and Pigments*, **2006**, 68: 183-189.
- [24] ČIHALÍK, J., DVOŘÁK, J., SUK, V. *Průručka měření pH*. Praha: SNTL, **1975**.

Prohlášení: Obrázky jsou reprodukovány se svolením autorů.