

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

**Katedra biofyziky a fyzikální chemie**

**Interakce tenzidů a barviv v roztocích I  
(diplomová práce)**

Hradec Králové 2007

Zuzana Otrádovská

**Čestné prohlášení**

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

1.4.2007

**Poděkování**

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

# **OBSAH**

<b>OBSAH.....</b>	<b>4</b>
<b>1. ÚVOD.....</b>	<b>7</b>
<b>2. TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>9</b>
2.1 TENZIDY .....	10
2.1.1 Složení tenzidů.....	10
2.1.2 Rozdělení tenzidů.....	10
2.1.3 Vlastnosti tenzidů .....	11
2.2 INTERAKCE ORGANICKÝCH BARVIV S TENZIDY .....	11
2.2.1 Tvorba agregátů azobarviv s kationickými tenzidy.....	12
2.2.2 J- a H-agregáty komplexu porfyrin-činidlo.....	12
2.2.3 Vliv délky uhlíkatého řetězce tenzidu na tvorbu agregátu .....	13
2.2.4 Elektrostatické interakce při agregaci .....	13
2.2.5 Vliv iontové skupiny v molekule barviva na agregaci.....	14
2.2.6 Proces tvorby agregátů .....	14
2.3 METODY STANOVENÍ TENZIDŮ .....	15
2.4 MĚŘENÍ ABSORPČNÍCH MOLEKULOVÝCH SPEKTER V UV A VIS OBLASTI .....	15
<b>3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>17</b>
3.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE.....	18
3.2 POUŽITÉ PŘÍSTROJE .....	19
3.3 PŘÍPRAVA ZÁSOBNÍCH ROZTOKŮ .....	19
3.3.1 Příprava základních vodných roztoků neutrální červeně.....	19
3.3.2 Příprava základních vodných roztoků krystalové violeti .....	20
3.3.3 Příprava vodných roztoků tenzidu.....	20
3.4 PŘÍPRAVA TLUMIVÝCH ROZTOKŮ.....	20
3.5 PRACOVNÍ POSTUP .....	21
3.5.1 Extrakční spektrofotometrie .....	21
3.5.2 UV-VIS absorpční spektrofotometrie .....	24
3.5.3 Fluorimetrie .....	26
<b>4. VÝSLEDKY.....</b>	<b>27</b>
4.1 EXTRAKČNÍ SPEKTROFOTOMETRIE .....	28
4.1.1 Výsledky studia vlivu pH na extrahovatelnost iontových párů .....	28
4.1.2 Výsledky hledání optimální vlnové délky .....	28
4.1.3 Výsledky studia vlivu doby třepání na extrahovatelnost iontových párů .....	30
4.1.4 Sledování vlivu přebytku NČ na interakci s LSS.....	30
4.2 UV-VIS ABSORPČNÍ SPEKTROFOTOMETRIE .....	32
4.3 FLUORIMETRIE .....	34
<b>5. DISKUZE.....</b>	<b>38</b>
5.1 INTERAKCE KV s LSS .....	39
5.2 INTERAKCE NČ s LSS .....	40
<b>6. ZÁVĚR.....</b>	<b>42</b>
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>44</b>

## **SOUHRN**

Tato diplomová práce se zabývá studiem interakcí mezi laurylsíranem sodným a organickými barvivy s využitím extrakční spektrofotometrie, UV-VIS absorpční spektrofotometrie a fluorimetrie. Studium roztoků, které obsahovaly neutrální červeň a lauralsíran sodný, poskytlo velmi zajímavé výsledky.

# **1. ÚVOD**

Tenzidy (povrchově aktivní látky, surfactanty) jsou v dnešní době hojně užívané látky. Z praktického hlediska jsou důležité především jejich schopnosti v roztocích, kde tenzidy vykazují emulgační, pěnicí, čisticí a hlavně stabilizující funkci. Všechny hrubě disperzní soustavy musí být stabilizovány pomocí tenzidů. Tenzidy jsou používány nejen ve farmacii, ale také v kosmetice a v potravinářství.

Pro farmaceutické účely musí být tenzid naprosto neškodný, čistý, v lékopise jsou dány limity obsahu příměsí, důležitá je také estetická stránka. Podmínkou pro to, aby byla molekula tenzidem je přítomnost nepolární a polární části, které musejí mít dostatečnou velikost a jsou v určité dostatečné vzdálenosti od sebe.

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

Protože léčiva obsahují jako stabilizátory příslušné tenzidy a současně obsahují i různá barviva, jsou důležité vzájemné interakce mezi těmito složkami v roztocích.

V této diplomové práci jsem sledovala interakce mezi laurylsíranem sodným a organickými barvivy s využitím extrakční spektrofotometrie, UV-VIS absorpční spektrofotometrie a fluorimetrie.



## **2. TEORETICKÁ ČÁST**

## **2.1 Tenzidy [1]**

### **2.1.1 Složení tenzidů**

Tenzidy jsou někdy také označovány jako povrchově aktivní látky, nebo surfaktanty. Jejich molekuly se skládají ze dvou částí, které mají opačnou afinitu k danému prostředí, a to z části hydrofilní a lipofilní, které musí mít určitou velikost a jsou v určité dostatečné vzdálenosti od sebe.

Hydrofilní je polární část nebo části molekuly, které mají afinitu k vodě a kolem kterých se vytváří solvatační obal z molekul vody. To znamená, že jsou ve vodném prostředí v různé míře hydratovány. Hydrofilní části molekuly tenzidu mohou ve vodném roztoku disociovat (např. - COOH, - SO<sub>3</sub>H).

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

### **2.1.2 Rozdělení tenzidů**

Podle schopnosti disociace ve vodě dělíme tenzidy na:

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

Amfoterních tenzidů je nejméně. Obsahují kationtové i aniontové skupiny a mění svůj náboj podle pH prostředí. Při vyšších hodnotách pH se vyskytují jako aniontové a při nižším jako kationtové. Při pH, při kterém je koncentrace obou nábojů stejná, má tenzid nejnižší rozpustnost ve vodě.

Aniontové tenzidy jsou nejvíce účinné tenzidy, proto jsou hojně využívány v průmyslu. Většinou mají formu soli (karboxylových kyselin, sulfonových kyselin, kyseliny fosforečné, kyseliny sírové). Ve vodě disociují na povrchově aktivní, negativně nabitý aniont a menší kationt.

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

### **2.1.3 Vlastnosti tenzidů**

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

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

## **2.2 Interakce organických barviv s tenzidy**

V publikacích, které se zabývají tématem interakce organických barviv s tenzidy, se sleduje vliv tenzidů na absorpční spektra organických barviv [3,4]. Změny v absorpčních spektrech barviv jsou způsobovány především vlivem elektrostatických interakcí. Tato skutečnost byla doložena i tím, že v přítomnosti souhlasně nabitých tenzidů nedojde ke změnám v absorpčních spektrech barviv [4,5]. V těchto publikacích jsou zkoumány tenzidy anionické (např. dodecylsírán sodný), kationické (např. cetrimid) i neionogenní tenzidy (např. Triton X-100) [3,4], jejichž koncentrace stoupají od koncentrací řádově stejných s koncentrací barviva až ke koncentracím, které odpovídají stonásobku koncentrace barviva [3-6,9]. R.K. Dutta a S.N. Bhat se zaměřili na sledování změn v absorpčním spektru methyloranže po přidání kationického tenzidu N-hexadecylpyridiniumchloridu a po přidání neionogenního tenzidu Tritonu X-100 [4]. Tímto pokusem potvrdili myšlenku, že docela běžně tvoří agregáty jak barvivo s tenzidem, které nesou opačný náboj, tak i barvivo s neionogenním tenzidem [8]. Vlivem tenzidu na absorpční spektrum organických barviv se zabývali také R.T. Buwalda a kol., kteří sledovali vliv různých koncentrací tenzidů (např. n-alkyltrimethylamoniumbromidu) na absorpční spektra barviv (např. methyloranže, ethyloranže) [6].

### 2.2.1 Tvorba agregátů azobarviv s kationickými tensidy

Autoři publikace [6] zkoumali interakce azobarviv s tensidy ve vodném prostředí prostřednictvím UV-VIS spektroskopie. Jak uvádějí, nabité polymery a neionogenní polymery mají schopnost působit společně s ionty organických molekul, což vede k utváření agregátů, které jsou důvodem změn v absorpčních spektrech barviv. Agregace je v první řadě umožněna Coulombovským přitahováním iontů tensidu a opačných nábojů aromatických molekul, což indukuje vznik elektroneutrálních agregátů. Agregace je dále usnadněna hydrofobickým shlukováním alkylových řetězců tensidu [2]. Studie [6] byla především zaměřena na interakce mezi molekulou kationického barviva a anionického proteinu, stejně jako kationického proteinu a anionického barviva. Bylo dokázáno, že mezi kationickými proteiny a methylovanými dochází k interakcím, které jsou zodpovědné za změny v absorpčních spektrech azobarviva. Stejně tak i kationické tensidy způsobují změny v absorpčních spektrech anionických barviv [4,5]. Největší změny v absorpčním spektru barviva jsou přitom pozorovány při koncentraci tensidu pod CMC (kritická micelární koncentrace).

V některých pokusech [6] byl sledován vliv měnících se koncentrací tensidů (n-alkyltrimethylamoniumbromidu a 4-n-alkyl-1-methylpyridiniumjodidu) na absorpční spektra azobarviv (methylovaný, p-methylčervený, ethylovaný). Bylo zjištěno, že nejmenší použité koncentrace tensidů (např. cetrimidu) vedly ke snížení absorbance MO ve vodném prostředí při vlnové délce 463 nm [6], v jiných studiích [7] bylo absorpční maximum MO při 465 nm, a v prostředí ethanolu [6] bylo absorpční maximum MO naměřeno při 417 nm. Pokud se zvyšuje koncentrace tensidu, dochází v absorpčním spektru MO při vlnové délce 380 nm k vytvoření nového absorpčního pásu, jehož výskyt je vysvětlován tvorbou iontového páru příslušného barviva s tensidem. Intenzita tohoto absorpčního pásu se zvyšovala se zvyšujícím se přídatkem tensidu až do vytvoření absorpčního pásu při vlnové délce 430 nm, kdy začala intenzita klesat. Tato vlnová délka odpovídá MO vázané ke kationickým micelám tensidu. Tyto pokusy byly provedeny v přítomnosti borátového pufru o pH 9,4 [6].

### 2.2.2 J- a H-agregáty komplexu porfyrin-činidlo

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

Popsali, že pokud tvorba agregátu není ve spektru zřetelná, to znamená že posun

absorpčního pásu je nepatrný, mluví se o tvorbě nespecifického agregátu, u něhož nemůže být jasně řečeno, zda je to J- nebo H-typ. O J-typu nebo H-typu mluvíme u agregátů, které mají molekuly barviva vysoce uspořádané. Tvorba H-agregátu se v absorpčním spektru projeví vytvořením nového absorpčního pásu, který je užší v porovnání s absorpčním pásem samotného barviva a je oproti němu posunut hypsochromně, zatímco absorpční pás J-agregátu je posunut bathochromně.

Někdy může tvorbě H-agregátu předcházet tvorba J-agregátu. Jednotlivé typy agregátů se tvoří při různých koncentracích tenzidu. U porfyrinových barviv se monomer mění v J-agregát tehdy, když se koncentrace tenzidu rovná dvojnásobku koncentrace barviva. Při dalším zvyšování koncentrace tenzidu je J-agregát nestabilní a jakmile je koncentrace tenzidu oproti koncentraci barviva čtyřnásobná, J-agregát zmizí a vzniká H-agregát.

### **2.2.3 Vliv délky uhlíkatého řetězce tenzidu na tvorbu agregátu**

Ukazuje se, že i hydrofobní interakce jsou pro tvorbu agregátů důležité. Toto tvrzení bylo prokázáno tím, že spektrum MO nebylo ovlivněno dodecyltrimethylamoniumbromidem v prostředí ethanolu [6]. Sledováním interakcí mezi MO a alkyltrimethylamoniumbromidovými sloučeninami s různou délkou alkylových řetězců v prostředí 0,003 mol/l hydroxidu sodného (NaOH) bylo zjištěno, že tvorba agregátů je závislá na délce uhlíkatého řetězce tenzidu, což naznačuje, že hydrofobní interakce hrají v procesu agregace důležitou roli [10].

Vliv hydrofobních interakcí na tvorbu agregátů vyplývá v podstatě i ze skutečnosti, že MO vytvoří při interakci s tenzidem, který má delší uhlíkatý řetězec, jako je například dodecyltrimethylamoniumbromid, nový absorpční pás v oblasti vlnové délky 380 nm. Avšak při použití tenzidu s kratším uhlíkatým řetězcem, jako je decyltrimethylamoniumbromid se tento pás neobjeví [6]. Nakonec bylo R.K. Duttou a S.N. Bhatem zjištěno, že interakce mezi tenzidem a organickým barvivem jsou jak elektrostatické, tak hydrofobní [4].

### **2.2.4 Elektrostatické interakce při agregaci**

Vliv iontové síly na absorpční spektrum barviva ve vodném roztoku tenzidu byl zkoumán [6] prostřednictvím měnících se koncentrací chloridu sodného, který byl přidáván do soustavy tenzidu (cetyltrimethylamoniumbromid) a azobarviva (MO) ve vodném prostředí a bylo zjištěno, že čím je vyšší koncentrace přidávaného chloridu (roste iontová síla

v soustavě), tím se zmenšuje absorpční pás v oblasti vlnové délky 380 nm. Toto v podstatě odráží důležitost elektrostatických interakcí při tvorbě agregátů. Elektrolyty mohou zmenšovat elektrostatické interakce mezi barvivem a tenzidem [8]. Některými studii [10] bylo zjištěno, že blednutí krystalové violeti je silně inhibováno anionty solí, které se při koncentraci blízké CMC naváží k povrchu micely daného tenzidu elektrostatickými interakcemi a zabrání tak jejich interakci s barvivem. Pořadí efektivity aniontů jako inhibitorů, je dáno jejich relativní schopností snižovat CMC a zvyšovat agregační číslo pro daný tenzid. Efektivita aniontů jako inhibitorů tedy roste v pořadí:  $F^- < Cl^- < Br^- < N_3^- < NO_3^-$  [10].

### 2.2.5 Vliv iontové skupiny v molekule barviva na agragaci

Na tvorbu agregátu má vliv také poloha a druh iontové skupiny v molekule barviva. Důležitější roli při interakci mezi azobarvivem a tenzidem hraje poloha tohoto iontu v molekule než jeho druh. Sledováním spektrálních posunů [6] u barviva, kde je iontová skupina v poloze para (methyloranž), bylo zjištěno, že spektrální posuny jsou výraznější, než v případě, kdy se vyskytuje iontová skupina v poloze ortho (methylčerveně) nebo kde iontová skupina zcela chybí (methylžlutě). V těchto případech se totiž poloha absorpčního maxima posunuje od vlnové délky absorpčního maxima methylčerveně a methylžluti pouze k vlnové délce absorpčního maxima, kdy je dané azobarvivo vázáno na micely tenzidu [6].

### 2.2.6 Proces tvorby agregátů

Holandští autoři [6] sledovali vodné roztoky methyloranže a *p*-methylčerveně s tenzidem, jehož koncentrace byla pod CMC. Zjistili, že v těchto roztocích byla pozorována sraženina, která byla tvořena krystaly obsahujícími ekvimolární množství tenzidu a barviva. Před vznikem sraženiny ukázalo absorpční spektrum daných roztoků absorpční pás krátké vlnové délky, jehož původ není ještě objasněn. Vědci odmítají vysvětlení, že tento pás vzniká na základě vznikajícího iontového páru, ale domnívají se, že vzniká díky tvorbě agregátů azobarviva vázaného na agregáty tenzidu. Naopak R.K. Dutta a S.N. Bhat [4] jsou toho názoru, že tento pás může být připisován vzniku iontového páru, který je tvořen kationtem N-hexadecylpyridiniumchloridu a aniontem methyloranže. Změny v absorpčním spektru MO po přidavku nízkých koncentrací tenzidu (tj. pod CMC) mohou být vysvětleny tvorbou iontového páru příslušného tenzidu s azobarvivem a agregátů obsahujících azobarvivo v příslušném dimerickém nebo vyšším agregačním stupni [5]. Autoři publikace [6] však

namítají, že tvorba iontového páru vypadá nepravděpodobně, neboť zde není důvod, aby iontový pár vznikl jen při nízkých koncentracích tenzidu. Z výsledků uvedených v práci [12] rovněž vyplývá, že absorpční pás krátké vlnové délky lze jen těžko přisoudit samotnému iontovému páru.

### **2.3 Metody stanovení tenzidů [7]**

Tenzidy jsou dnes hojně používány, setkáme se s nimi v potravinářství, kosmetice, farmacii, jsou užívány jako solubilizery, detergenty, emulgátory. Metody jejich stanovení jsou proto důležité.

Ke stanovení tenzidů se dá využít řada metod jako např. chromatografie, titrace, spektrofotometrie. Pro kvantitativní kontrolu detergentů se používala především titrace. I. Casero a spolupracovníci [8] se snažili využít titraci pro stanovení kvartérních amoniových tenzidů. Při monitorování znečištění vody, se uplatňují především spektrofotometrické metody založené na extrakci barevného iontového asociátu (tvořeného tenzidem a barvivem opačného náboje).

Qiaohong He a Hengwu Chen [7] sledovali využití průtokové injekční analýzy (FIA), při které je detekce provedena prostřednictvím spektrofotometru. Stanovení anionického tenzidu je založeno na kompetici mezi methylovanými a tímto tenzidem o interakci s kationickým tenzidem cetylpyridiniumchloridem.

### **2.4 Měření absorpčních molekulových spekter v UV a VIS oblasti [12]**

Tato spektra jsou někdy označovaná jako elektronová, protože vznikají přechodem elektronů mezi jednotlivými orbitály o různé energii, a jsou vyjádřena jako závislost absorbance na vlnové délce světla procházejícího vzorkem. Uplatnění absorpčních molekulových elektronových spekter je široké: např. při studiu struktury molekul, v kvantitativní analýze (díky platnosti Lambertova - Beerova zákona), atd.

Měřením molekulového spektra v UV a VIS oblasti hledáme závislost absorbance na vlnové délce pro daný vzorek. Podle principu měření můžeme rozdělit spektrofotometry na tzv. klasické přístroje a přístroje s tzv. reverzní optikou (př. HP 8453).

U klasických přístrojů dopadá na kyvetu se vzorkem pouze úzké rozmezí vlnových délek, které bylo vyčleněno při průchodu světla monochromátorem. Intenzita světla dané

vlnové délky je po průchodu vzorkem vyhodnocena fotočlánkem a porovnána s intenzitou světla, které prošlo slepým vzorkem a tím je získána absorbance. Monochromátor mění postupně v průběhu měření vlnovou délku propouštěného světla a díky tomu je postupně proměřeno spektrum ve zvoleném úseku vlnových délek. Výhodou této metody je větší lineární fotometrický rozsah s lepším rozlišením.

U přístrojů s reverzní optikou dopadá na kyvetu se vzorkem polychromatické světlo emitované zdrojem, protože tu chybí monochromátor. Po průchodu polychromatického světla vzorkem je intenzita světla vyhodnocena tzv. diodovým polem, což je soustava polovodičových diod, z nichž každá je citlivá na intenzitu světla určitého úzkého rozmezí vlnových délek. Intenzita světla dané vlnové délky snímaná danou diodou po průchodu vzorkem je porovnána s intenzitou světla prošlého při dané vlnové délce slepým vzorkem a tím se získá hodnota absorbance pro tuto vlnovou délku. Příslušné spektrum vzorku se vytvoří proložením spojitě čáry všemi naměřenými hodnotami absorbance. Výhodou tohoto principu měření je rychlost snímání spekter a absence mechanického konstrukčního prvku - monochromátoru.



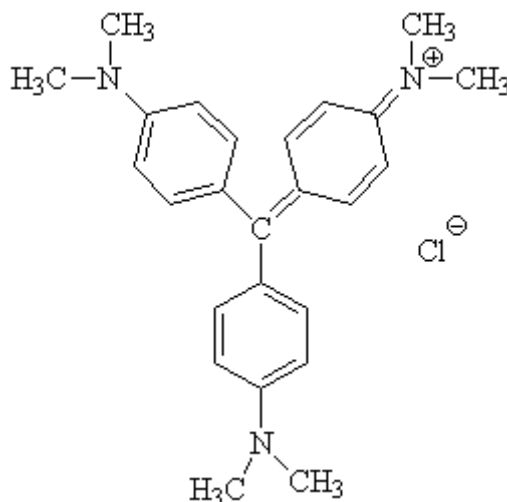
### **3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

### 3.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE

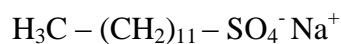
Při svých pokusech jsem použila dané chemikálie:

- Destilovaná voda – FaF UK
- Hydroxid sodný – Lachema s.p. Brno, o.z. Neratovice
- Chloroform – Lachema a.s. Neratovice
- Krystalová violet' (viz vzorec č.1) – Lachema n.p. Brno, použitá zkratka KV
- Kyselina boritá – Lachema n.p. Brno (krystalická)
- Kyselina chlorovodíková – Lachema n.p. Brno, o.z. Neratovice
- Kyselina fosforečná – Lachema n.p. Brno, o.z. Neratovice
- Kyselina octová – Lachema a.s. Neratovice
- Laurylsíran sodný (viz vzorec č.2) – Lachema a.s. Neratovice, použitá zkratka LSS
- Lihometanol – FaF UK
- Neutrální červeň (viz vzorec č.3) – Lachema n.p. Brno, použitá zkratka NČ

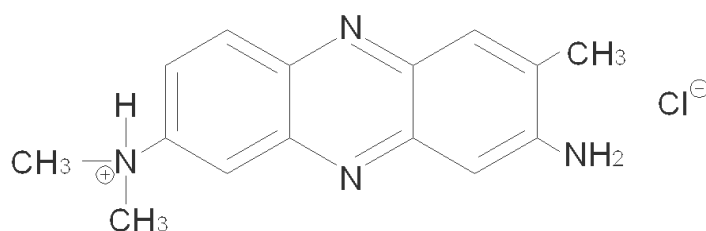
Vzorec č.1: Krystalová violet' (Mr = 408)



Vzorec č.2: Laurylsíran sodný (Mr = 288,38)



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



### **3.2 POUŽITÉ PŘÍSTROJE**

Při své práci jsem používala tyto přístroje:

- Digitální analytické váhy – Sartorius
- Luminiscenční spektrometr AMINCO-BOWMAN SERIES 2
- Mechanická laboratorní třepačka LT-2- Kavalier Sázava
- pH-metr PerpHect 350 – ORION
- Spektrofotometr HP 8453 – Hewlet Packard
- Spektrofotometr Spekol – Carl Zeiss Jena

### **3.3 PŘÍPRAVA ZÁSOBNÍCH ROZTOKŮ**

#### **3.3.1 Příprava základních vodných roztoků neutrální červeně**

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

Dále jsem pro svá měření používala roztoky NČ o koncentracích  $5 \cdot 10^{-4}$  mol/l,  $2,5 \cdot 10^{-4}$  mol/l a  $1 \cdot 10^{-4}$  mol/l.

Roztok o koncentraci  $5 \cdot 10^{-4}$  mol/l jsem získala odpipetováním 5 ml zásobního roztoku NČ o koncentraci  $5 \cdot 10^{-3}$  mol/l do 50 ml odměrné baňky a doplněním destilovanou vodou po rysku.

Roztoky o koncentraci  $2,5 \cdot 10^{-4}$  mol/l a  $1 \cdot 10^{-4}$  mol/l jsem si připravila odpipetováním 2,5 ml a 1 ml roztoku NČ o koncentraci  $5 \cdot 10^{-3}$  mol/l do odměrné baňky a doplněním destilovanou vodou do 50 ml.

### **3.3.2 Příprava základních vodných roztoků krystalové violeti**

Pro přípravu 50 ml roztoku KV ( $M_r = 408$ ) o koncentraci  $5 \cdot 10^{-4}$  mol/l jsem si nejprve na analytických vahách navážila 0,0102 g KV, převedla jsem ji kvantitativně do odměrné baňky, rozpustila a doplnila destilovanou vodou do 50 ml.

Pro svá měření jsem dále potřebovala roztok KV o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4}$  mol/l. Odpipetováním 10 ml roztoku KV o koncentraci  $5 \cdot 10^{-4}$  mol/l a doplněním destilovanou vodou v odměrné baňce do 50 ml jsem získala potřebný roztok.

Roztoky KV o nižších koncentracích  $2,5 \cdot 10^{-5}$  mol/l a  $1 \cdot 10^{-5}$  mol/l jsem připravila odpipetováním 2,5 ml a 1 ml roztoku KV o koncentraci  $5 \cdot 10^{-4}$  mol/l do 50 ml odměrné baňky a doplněním destilovanou vodou po rysku.

### **3.3.3 Příprava vodných roztoků tenzidu**

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

Roztok o koncentraci 10x nižší, to znamená  $5 \cdot 10^{-3}$  mol/l, jsem získala odpipetováním 5 ml základního roztoku tenzidu a doplněním destilovanou vodou na 50 ml.

Dále jsem potřebovala roztoky LSS o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4}$  mol/l,  $2 \cdot 10^{-4}$  mol/l a  $1 \cdot 10^{-5}$  mol/l. Tyto roztoky jsem získala z roztoku LSS o koncentraci  $5 \cdot 10^{-3}$  mol/l odpipetováním 1 ml, 2 ml a 0,1 ml do odměrné baňky na 50 ml a doplněním destilovanou vodou po rysku.

## **3.4 PŘÍPRAVA TLUMIVÝCH ROZTOKŮ**

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

Podle literatury [11] jsem připravila Britton-Robinsonův pufr (BR) smísením dvou roztoků v určitém poměru. K jeho přípravě jsem potřebovala hydroxid sodný o koncentraci

0,2 mol/l, jehož potřebné množství, které jsem našla v dané literatuře, jsem přidávala ke 25 ml roztoku kyseliny borité, kyseliny fosforečné a kyseliny octové o koncentraci 0,04 mol/l. Tak jsem získala přidáváním různého množství hydroxidu pufru o různém pH (viz tabulka č.1).

Tabulka č.1: Příprava univerzálního Britton-Robinsonova pufru

Objem 0,04 mol/l roztoku kyselin (ml)	Objem 0,2 mol/l NaOH (ml)	pH
25	8,75	5,02
	11,87	6,59
	13,12	7,00
	14,37	7,54
	15,00	7,96
	15,62	8,36
	16,87	8,95
	18,12	9,37
	20,63	10,88

### 3.5 PRACOVNÍ POSTUP

#### 3.5.1 Extrakční spektrofotometrie

##### 3.5.1.1 Vliv pH na extrahovatelnost iontových párů

### NČ

Připravila jsem pět pufrů s různými hodnotami pH - 6,59; 7,00; 7,54; 8,36 a 9,37. Tyto pufrы jsem získala odměřením potřebného množství roztoku hydroxidu sodného a zásobního roztoku kyselin podle tabulky č.1 (viz kapitola 3.4).

Do pěti zkumavek jsem odpipetovala 3 ml pufru o příslušném pH, 1 ml zásobního roztoku LSS o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4}$  mol/l, 1 ml zásobního roztoku NČ o koncentraci  $5 \cdot 10^{-4}$  mol/l a 5 ml chloroformu. Všechny zkumavky jsem uzavřela parafilmem, nechala jsem je dvacet minut třepat na třepačce a deset minut stát v klidu. Slepé vzorky jsem si připravila stejným postupem, ale místo tenzidu jsem použila stejné množství (1 ml) destilované vody. Absorbanci vzorků jsem měřila při vlnové délce 510 nm.

### 3.5.1.2 Hledání optimální vlnové délky pro následující experimenty

#### NČ

Z výsledků předešlého měření (viz kapitola 3.5.1.1) jsem zjistila, že pro hledání optimální vlnové délky je vhodné použít pH 6,59. Měřila jsem absorbance tohoto roztoku proti slepému vzorku při různých vlnových délkách.

Vzhledem k nejasným výsledkům u pufru 6,59 jsem si připravila podle postupu v kapitole 3.4 Britton-Robinsonův pufr o pH 5,02 a použila jsem ho pro přípravu vzorku a slepého vzorku podle postupu v kapitole 3.5.1.1.

#### KV

Připravila jsem si dvě zkumavky, do jedné jsem odpipetovala 1 ml zásobního roztoku LSS s koncentrací  $1 \cdot 10^{-4}$  mol/l, do druhé jsem odpipetovala stejné množství vody (tento vzorek byl slepý vzorek), do zkumavek jsem přidala po 1 ml zásobního roztoku KV s koncentrací  $5 \cdot 10^{-4}$  mol/l a 3 ml Britton–Robinsonova pufru s pH 7,96. Nakonec jsem přidala 5 ml chloroformu, uzavřela jsem je parafilmem a nechala je dvacet minut třepat na třepačce a deset minut stát v klidu. Absorbance jsem proměřovala při různých vlnových délkách.

Tento pokus jsem zopakovala, ale místo zásobního roztoku KV s koncentrací  $5 \cdot 10^{-4}$  mol/l, jsem použila nejprve zásobní roztok KV s koncentrací  $1 \cdot 10^{-5}$  mol/l a poté  $1 \cdot 10^{-4}$  mol/l (příprava viz kapitola 3.3.2).

Nakonec jsme pokus zopakovala ještě jednou podle stejného postupu s použitím zásobní roztoku LSS s koncentrací  $1 \cdot 10^{-4}$  mol/l a se zásobním roztokem KV s koncentrací  $1 \cdot 10^{-4}$  mol/l, ale BR pufr o pH 7,96 jsem nahradila za stejné množství kyseliny chlorovodíkové 0,2 mol/l.

### 3.5.1.3 Vliv doby třepání na extrahovatelnost iontových párů

#### NČ

Zkumavku se vzorkem, ve kterém byla určena ideální vlnová délka, jsem nechala dalších 10 minut třepat na třepačce a 10 minut stát v klidu. Absorbanci vzorku jsem znovu proměřila při vlnové délce 530 nm.

### 3.5.1.4 Sledování vlivu přebytku NČ na interakci s LSS

#### NČ

K pokusu jsem si připravila vzorky, kde jsem použila pufr o pH 6,59. Postup přípravy těchto vzorků byl následující: k 1 ml zásobního roztoku LSS o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4}$  mol/l jsem odpipetovala 1 ml zásobního roztoku NČ o daných koncentracích (viz tabulka č.2), 3 ml pufru o pH 6,59 a 5 ml chloroformu. Zkumavky jsem uzavřela parafilmem a nechala 20 minut třepat na třepačce a 10 minut stát. Měřila jsem absorbanci těchto vzorků proti slepým vzorkům, které byly připraveny stejným postupem, ale místo tenzidu obsahovaly destilovanou vodu. Absorbance vzorků jsem měřila při vlnové délce 530 nm.

Tentýž vzorek jsem proměřila ještě dvakrát po 20 minutách třepání a deseti minutách stání.

Tabulka č.2: Potřebné koncentrace neutrální červeně

Číslo vzorku	Koncentrace neutrální červeně ve vodné fázi (mol/l)
1	$1 \cdot 10^{-4}$
2	$2 \cdot 10^{-4}$
3	$4 \cdot 10^{-4}$
4	$6 \cdot 10^{-4}$
5	$8 \cdot 10^{-4}$
6	$1 \cdot 10^{-3}$

### 3.5.2 UV-VIS absorpční spektrofotometrie

#### NČ

Do třinácti kádinek jsem odpipetovala 0,8 ml zásobního roztoku LSS o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4}$  mol/l, potřebná množství pufru o pH 5,02 a zásobního roztoku NČ o odpovídající koncentraci podle tabulky č.3. Podle této tabulky jsem si připravila i příslušné slepé vzorky, které odpovídaly roztokům NČ o různé koncentraci, tenzid byl ve slepých roztocích nahrazen vodou.

Stejný postup jsem použila i pro proměření vzorků s pufrům o pH 10,88.

Tabulka č.3: Složení vzorků s nadbytkem barviva

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

#### KV

#### Vliv přebytku KV na interakci s LSS na hladině $1 \cdot 10^{-6}$ mol/l

Postup přípravy je stejný jako u NČ, použila jsem však zásobní roztok LSS o koncentraci  $1 \cdot 10^{-5}$  mol/l, BR pufr o pH 7,96 a zásobní roztok KV o koncentraci viz tabulka č.4. Potřebná množství BR pufru a zásobního roztoku KV jsou znázorněny v tabulce č.4.



Tabulka č.4: Příprava vzorků pro absorpční a fluorescenční spektrometrii

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

Pokus jsem zopakovala, pufr jsem však nahradila kyselinou chlorovodíkovou 0,2 mol/l.

#### Vliv přebytku KV na interakci s LSS na hladině $2 \cdot 10^{-5}$ mol/l

Do pěti kádínek jsem odpipetovala vždy 0,4 ml zásobního roztoku LSS o koncentraci  $2 \cdot 10^{-4}$  mol/l, zásobní roztok KV o koncentraci  $2,5 \cdot 10^{-4}$  mol/l podle tabulky č.5 a BR pufr o pH 7,96 do objemu 4 ml. Podle tabulky č.5 jsem připravila i slepé vzorky, které obsahovaly místo tenzidu stejné množství destilované vody.

Další pokus jsem zopakovala stejným postupem s tím, že jsem rozšířila koncentrační řadu (viz tabulka č.6)

Absorpční spektra vzorků jsem proměřila proti slepým vzorkům.

Tabulka č.5: Příprava měřeného a slepého vzorku.

Koncentrace zásobního roztoku KV (mol/l)	Objem zásobního roztoku KV (ml)	Objem pufru (ml)	Slepý roztok - objem zásobního roztoku KV (ml)	Slepý roztok - objem pufru (ml)
$2,5 \cdot 10^{-4}$	0,32	3,28	0,00	0,00
$2,5 \cdot 10^{-4}$	0,64	2,96	0,32	3,68
$2,5 \cdot 10^{-4}$	0,96	2,64	0,64	3,36
$2,5 \cdot 10^{-4}$	1,28	2,32	0,96	3,04
$2,5 \cdot 10^{-4}$	1,60	2,00	1,28	2,72

Tabulka č.6: Rozšířená koncentrační řada

Koncentrace zásobní roztoku KV (mol/l)	Objem zásobního roztoku KV (ml)	Objem pufru (ml)	Slepý roztok - objem zásobního roztoku KV (ml)	Slepý roztok - objem pufru (ml)
$2,5 \cdot 10^{-4}$	0,32	3,28	0,00	0,00
$2,5 \cdot 10^{-4}$	0,48	3,12	0,32	3,68
$2,5 \cdot 10^{-4}$	0,64	2,96	0,48	3,52
$2,5 \cdot 10^{-4}$	0,80	2,80	0,64	3,36
$2,5 \cdot 10^{-4}$	0,96	2,64	0,80	3,20
$2,5 \cdot 10^{-4}$	1,12	2,48	0,96	3,04
$2,5 \cdot 10^{-4}$	1,28	2,32	1,12	2,88
$2,5 \cdot 10^{-4}$	1,44	2,16	1,28	2,72
$2,5 \cdot 10^{-4}$	1,60	2,00	1,44	2,56

### 3.5.3 Fluorimetrie

Bylo měřeno excitační spektrum čistého barviva, aby bylo možno určit vhodnou excitační vlnovou délku, a následně byla u všech vzorků i slepých vzorků snímána spektra emisní.

Roztoky jsem si připravila stejným způsobem jako v kapitole 3.5.2 (tabulka č.3) pro NČ a (tabulka č.4) pro KV.

Spektra jsem měřila i u slepých vzorků, které odpovídaly roztokům NČ a KV o různé koncentraci. Tyto slepé vzorky jsem připravila odpipetováním potřebného množství zásobního roztoku NČ a KV o koncentracích odpovídajícím rozpisu tabulek (viz tabulky č.3 a 4), potřebné množství tenzidu jsem nahradila destilovanou vodou a doplnila BR pufrem o pH 5,02 na objem 4ml.

Tento postup jsem zopakovala s pufrem 10,88 u NČ.

U KV jsem postup zopakovala s kyselinou chlorovodíkovou 0,2 mol/l místo pufru.

## **4. VÝSLEDKY**

## 4.1 Extrakční spektrofotometrie

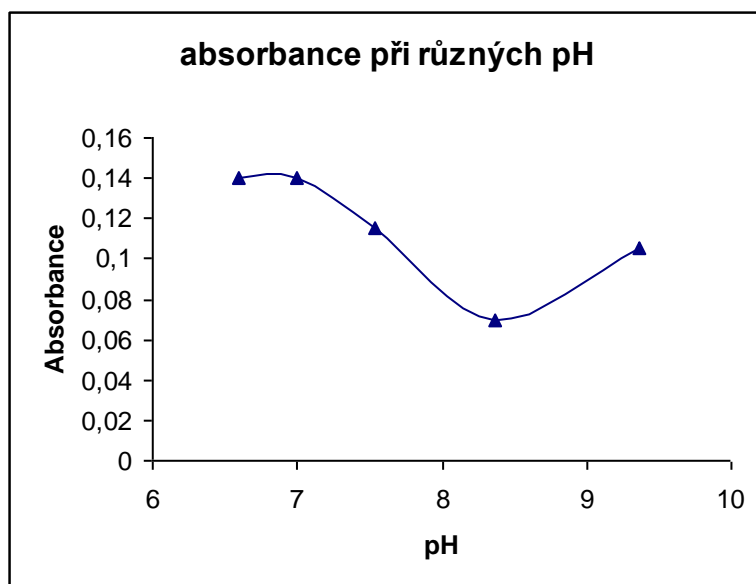
### 4.1.1 Výsledky studia vlivu pH na extrahovatelnost iontových párů

#### NČ

Tabulka č.7 znázorňuje naměřené absorbance vodných roztoků NČ a LSS o různých hodnotách pH, které byly naměřeny proti slepým vzorkům při vlnové délce 510 nm, která byla odhadnuta jako výchozí (kapitola 3.5.1.1). Nejvyšší hodnotu absorbance (0,140) jsem naměřila u vzorků s BR pufrů o pH 6,59 a 7,00. Protože NČ poskytuje při reakci kation, předpokládala jsem, že bude protonizace probíhat lépe v kyselějším prostředí. Proto jsem zvolila jako optimální prostředí pro další experimenty pH 6,59. Graf závislosti absorbance na pH je znázorněn na obr. 1.

Tab. č.7: Hodnoty absorbancí při různých pH

pH	A
6,59	0,140
7,00	0,140
7,54	0,115
8,36	0,070
9,37	0,105



Obr. 1: Závislost absorbance na pH

### 4.1.2 Výsledky hledání optimální vlnové délky

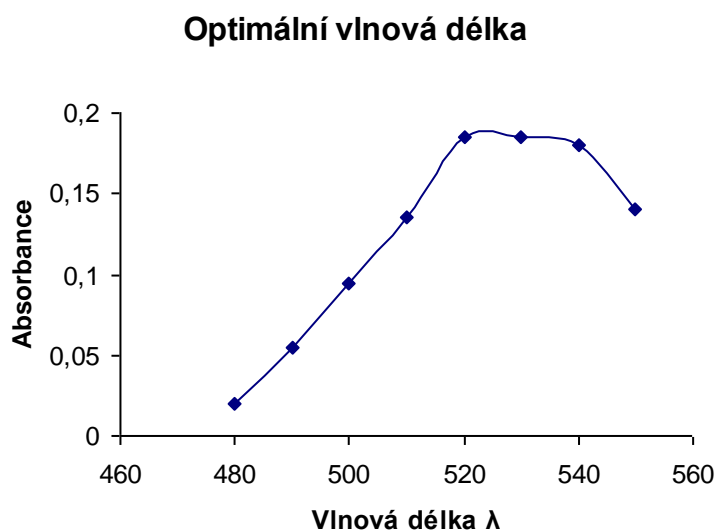
#### NČ

Proměřením vzorku s BR pufrů o pH 6,59 (viz kapitola 3.5.1.1) jsem získala výsledky uvedené v tabulce č.8. Z obr. 2, který znázorňuje závislost absorbance na vlnové délce u vzorků osahujících BR pufr o pH 6,59, nevyplývá jednoznačně optimální vlnová délka, neboť absorpční maximum je příliš ploché. Protože jsem předpokládala, že bude NČ

lépe protonizována v kyselějším prostředí, zopakovala jsem měření s BR pufrům o pH 5,02. Z výsledků (viz tabulka č.9) vyplynulo, že optimální vlnová délka pro další měření je 530 nm, při které byla dosažena nejvyšší absorbance. Závislost absorbance na vlnové délce pro vzorky obsahující BR pufr o pH 5,02 je znázorněna na obr. 3.

Tab. č.8: Absorbance vzorků s BR pufrům o pH 6,59

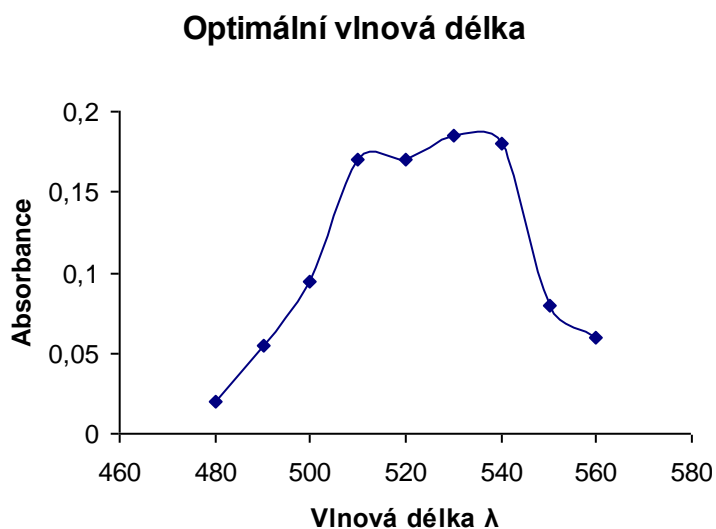
Vlnová délka $\lambda$ (nm)	Absorbance
480	0,020
490	0,055
500	0,095
510	0,135
520	0,185
530	0,185
540	0,180
550	0,140



Obr. 2: Závislost absorbance na vlnové délce u vzorků s BR pufrům o pH 6,59

Tab. č.9: Absorbance vzorků s BR pufrům o pH 5,02

Vlnová délka $\lambda$ (nm)	Absorbance
480	0,020
490	0,055
500	0,095
510	0,170
520	0,170
530	0,185
540	0,180
550	0,080
560	0,060



Obr. 3: Závislost absorbance na vlnové délce u vzorků s BR pufrům o pH 5,02

## KV

Proměření vzorků připravených postupem v kapitole 3.5.1.2 s použitím KV o koncentraci  $5 \cdot 10^{-4}$  mol/l, jsem neměřila žádné výsledky. Vzorky se odbarvily při 460 nm a

nebyly měřitelné. Proto jsem pokus zopakovala s KV s nižšími koncentracemi  $1 \cdot 10^{-5}$  mol/l a  $1 \cdot 10^{-4}$  mol/l, ale i v těchto případech došlo k odbarvení.

Daný pokus jsem zopakovala v prostředí kyseliny chlorovodíkové 0,2 mol/l místo pufru. Ani tyto vzorky nebyly měřitelné.

#### 4.1.3 Výsledky studia vlivu doby třepání na extrahovatelnost iontových párů

##### NČ

Podle kapitoly 3.5.1.3 jsem provedla měření, kterým jsem se snažila stanovit optimální dobu třepání (tabulka č.10). Z uvedených výsledků nelze jednoznačně určit vhodnou dobu třepání.

Tab. č.10: Naměřená absorbance po určitých časových úsecích

Doba třepání (min)	Absorbance
10	0,225
20	0,305
30	0,345

##### KV

V případě KV jsou hodnoty absorbancí, které jsou zjišťovány po určité době třepání, neměřitelné.

Od dalších pokusů s KV metodou extrakční spektrofotometrie jsem proto upustila.

#### 4.1.4 Sledování vlivu přebytku NČ na interakci s LSS

##### NČ

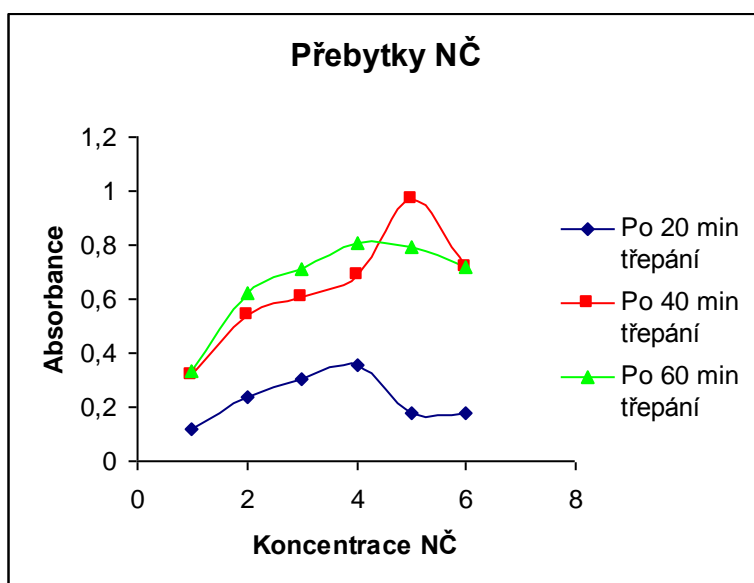
Postupem uvedeným v kapitole 3.5.1.4 jsem připravila vzorky, které obsahovaly různé přebytky NČ. Změřila jsem absorbance těchto vzorků proti příslušným slepým vzorkům, které obsahovaly místo tenzidu vodu. Výsledky měření jsou znázorněny v tabulce č.11.

Vzhledem k tomu, že v předchozích pokusech nebyla ideální doba třepání stanovena, byly hodnoty absorbancí měřeny ještě po dalších 20 a 40 minutách. Výsledky měření jsou znázorněny v tabulce č.11.

Závislost naměřených absorbancí na přebytcích NČ po 20, 40 a 60 minutách třepání je znázorněna na obr. 4.

Tab. č.11: Absorbance vzorků s přebytkem NČ

Koncentrace NČ (mol/l)	Absorbance		
	Po 20 min třepání	Po 40 min třepání	Po 60 min třepání
$1,0 \cdot 10^{-4}$	0,115	0,315	0,335
$2,0 \cdot 10^{-4}$	0,235	0,540	0,620
$4,0 \cdot 10^{-4}$	0,305	0,610	0,710
$6,0 \cdot 10^{-4}$	0,355	0,690	0,810
$8,0 \cdot 10^{-4}$	0,180	0,670	0,790
$1,0 \cdot 10^{-3}$	0,180	0,610	0,720

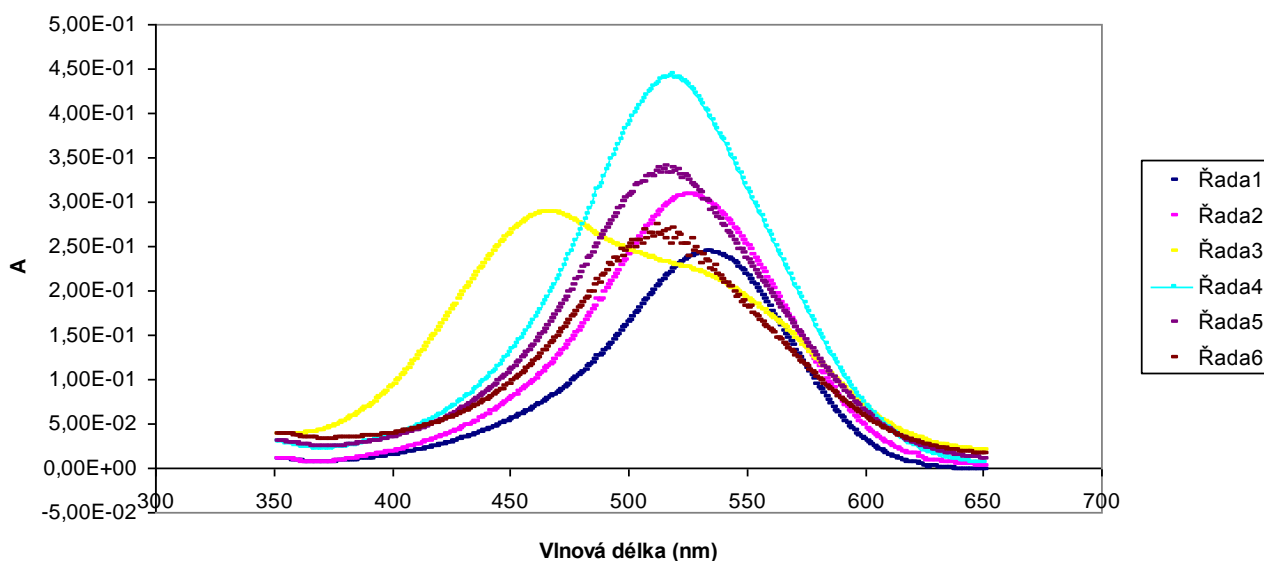


Obr. 4: Absorbance vzorků s přebytky NČ po 20, 40, 60 minutách třepání

## 4.2 UV-VIS absorpční spektrofotometrie

### NČ

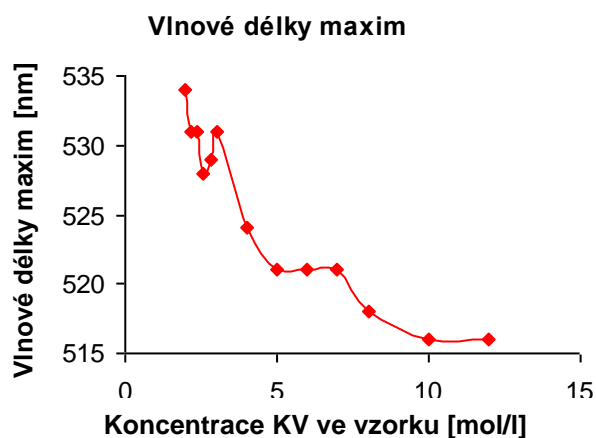
Vzorky, které jsem připravila postupem v kapitole 3.5.2 podle tabulky č.3 (pufr o pH 5,02), jsem proměřila proti příslušným slepým vzorkům. Vlnové délky maxim pro dané koncentrace NČ se pohybují v rozmezí 516 až 534 nm a jsou znázorněny v tabulce č.12. Absorpční spektra jsou znázorněna na obr. 5, kde je pro lepší přehlednost znázorněno pouze šest spekter. Obr. 6 znázorňuje závislost koncentrace NČ ve vzorku na vlnové délce maxim.



Obr. 5: Absorpční spektra roztoku NČ a LSS

Tab. č.12: Vlnové délky maxim pro různé koncentrace NČ

Koncentrace KV ve vzorku (mol/l)	Vlnové délky maxim (nm)
$2,00 \cdot 10^{-5}$	534
$2,19 \cdot 10^{-5}$	531
$2,38 \cdot 10^{-5}$	531
$2,56 \cdot 10^{-5}$	528
$2,81 \cdot 10^{-5}$	529
$3,00 \cdot 10^{-5}$	531
$4,00 \cdot 10^{-5}$	524
$5,00 \cdot 10^{-5}$	521
$6,00 \cdot 10^{-5}$	521
$7,00 \cdot 10^{-5}$	521
$8,00 \cdot 10^{-5}$	518
$1,00 \cdot 10^{-4}$	516
$1,20 \cdot 10^{-4}$	516



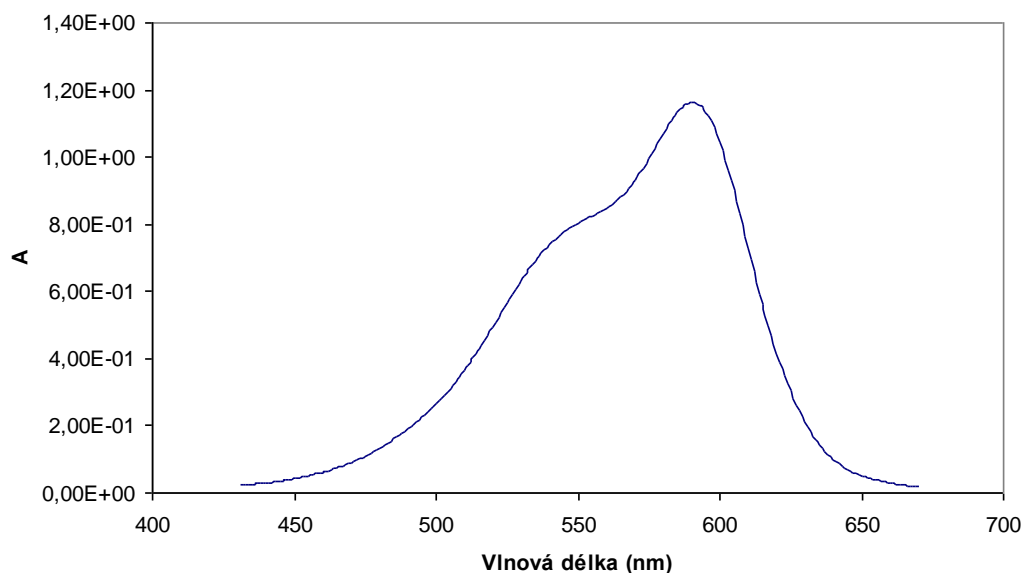
Obr. 6: Vlnové délky maxim pro dané koncentrace NČ



Pokus byl zopakován se vzorky s BR pufr o pH 10,88, avšak stejně jako v případě extrakční spektrofotometrie ani v tomto případě se nedají výsledky naměřené v zásaditém prostředí (pufr o pH 10,88) využít. Je to proto, že NČ poskytuje kation a lépe protonizuje v kyselém prostředí.

## KV

Postupem v kapitole 3.5.2 (KV) byly připraveny vzorky, které obsahovaly různé přebytky KV a ve kterých jsem sledovala vliv těchto přebytků na interakci s LSS na hladině  $1 \cdot 10^{-6}$  mol/l a  $2 \cdot 10^{-5}$  mol/l. Tyto vzorky byly proměřeny proti příslušným slepým vzorkům. Spektra pro jednotlivé koncentrační hladiny se neměnila, proto je na obr. 7 uvedeno pouze jedno (vzorové) spektrum. Vlnová délka maxima se pohybuje kolem hodnoty 590 nm.



Obr. 7: Vzorové spektrum roztoku KV a LSS

V předchozím měření jsem pozorovala po určité době odbarvení daných vzorků. Pokus jsem zopakovala u prvních třinácti vzorků s kyselinou chlorovodíkovou (0,2 mol/l), v průběhu prvních 15 minut měření se však většina vzorků odbarvila a bylo možné změřit pouze vzorky 7-13, ale i u nich došlo k patrnému zesvětlení v průběhu času. Absorbance byly velice nízké.

### 4.3 Fluorimetrie

#### NČ

Postupem v kapitole 3.5.2 (tabulka č.3) jsem si připravila vzorky s BR pufrů o pH 5,02 a 10,88, které jsem proměřovala na luminiscenčním spektrometru. Nejprve jsem změřila excitační spektrum samotné NČ o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4}$  mol/l (obr. 8), aby bylo možno určit vhodnou excitační vlnovou délku, a následně byla u všech vzorků i slepých vzorků snímána spektra emisní. Vzhledem k tomu, že se tvar spekter při různých koncentracích neměnil, uvádím pouze jedno vzorové emisní spektrum (obr. 9). Hodnoty emisních maxim pro vzorky a slepé vzorky s BR pufrů o pH 5,02 jsou v tabulce č.13 a s BR pufrů o pH 10,88 v tabulce č.14.

Tab. č.13: Emisní maxima pro vzorky s BR pufrů o pH 5,02

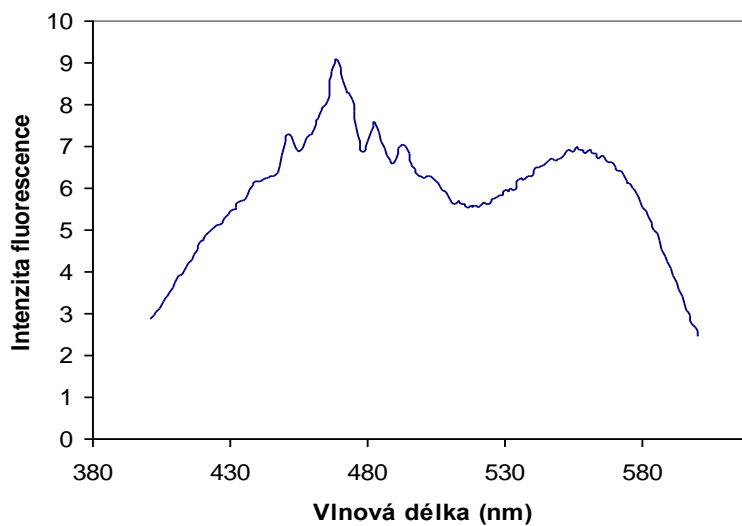
Koncentrace NČ ve vzorku (mol/l)	Číslo vzorku	Emisní maxima vzorků	Číslo slepého vzorku	Emisní maxima slepých vzorků
$2,00 \cdot 10^{-5}$	1	628	1	628
$2,19 \cdot 10^{-5}$	2	629	2	631
$2,38 \cdot 10^{-5}$	3	629	3	629
$2,56 \cdot 10^{-5}$	4	629	4	629
$2,81 \cdot 10^{-5}$	5	629	5	629
$3,00 \cdot 10^{-5}$	6	629	6	627
$4,00 \cdot 10^{-5}$	7	629	7	629
$5,00 \cdot 10^{-5}$	8	629	8	629
$6,00 \cdot 10^{-5}$	9	629	9	629
$7,00 \cdot 10^{-5}$	10	629	10	629
$8,00 \cdot 10^{-5}$	11	631	11	629
$1,00 \cdot 10^{-4}$	12	631	12	631
$1,20 \cdot 10^{-4}$	13	631	13	631

Tab. č.14: Emisní maxima pro vzorky s BR pufrů o pH 10,88

Koncentrace NČ ve vzorku (mol/l)	Číslo vzorku	Emisní maxima vzorků	Číslo slepého vzorku	Emisní maxima slepých vzorků
$2,00 \cdot 10^{-5}$	1	618	1	Signal over
$2,19 \cdot 10^{-5}$	2	618	2	616
$2,38 \cdot 10^{-5}$	3	620	3	616
$2,56 \cdot 10^{-5}$	4	621	4	618
$2,81 \cdot 10^{-5}$	5	620	5	620
$3,00 \cdot 10^{-5}$	6	620	6	620
$4,00 \cdot 10^{-5}$	7	621	7	621
$5,00 \cdot 10^{-5}$	8	621	8	621
$6,00 \cdot 10^{-5}$	9	619	9	619

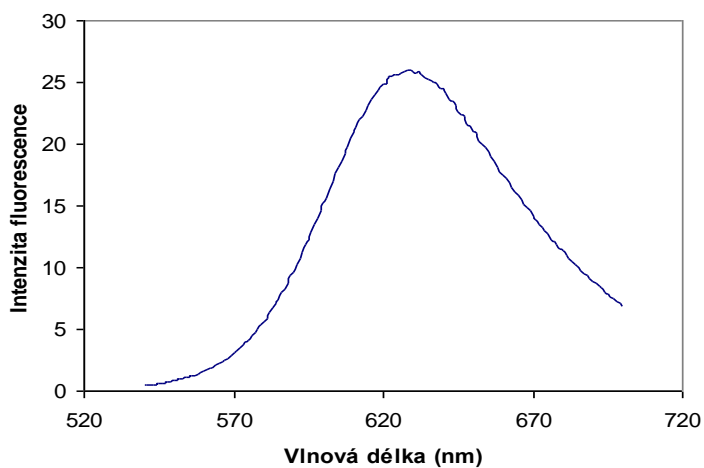
Koncentrace NČ ve vzorku (mol/l)	Číslo vzorku	Emisní maxima vzorků	Číslo slepého vzorku	Emisní maxima slepých vzorků
$7,00 \cdot 10^{-5}$	10	621	10	621
$8,00 \cdot 10^{-5}$	11	619	11	619
$1,00 \cdot 10^{-4}$	12	621	12	621
$1,20 \cdot 10^{-4}$	13	621	13	621

### Excitační spektrum NČ



Obr. 8: Vzorové excitacionní spektrum roztoku NČ a LSS

### Emisní spektrum NČ



Obr. 9: Vzorové emisní spektrum roztoku NČ a LSS

## KV

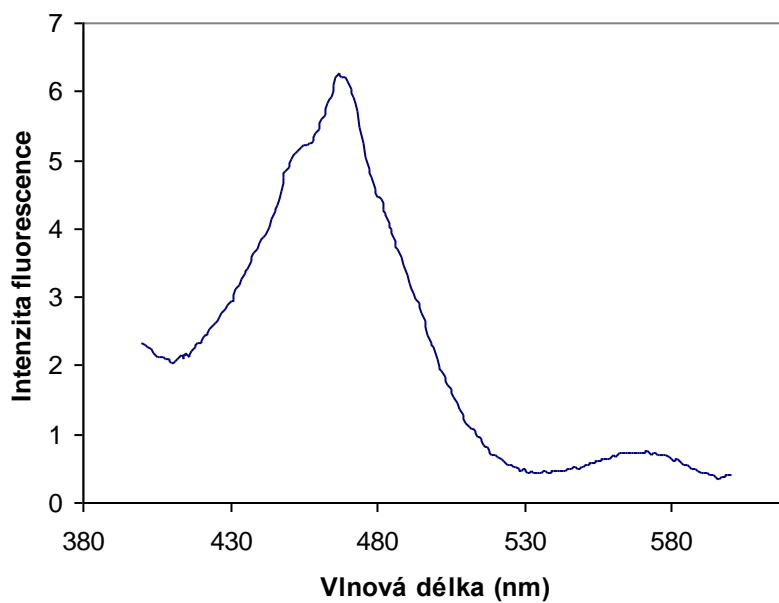
Postupem v kapitole 3.5.2 (tabulka č.4) jsem si připravila vzorky a slepé vzorky, které jsem proměřovala na luminiscenčním spektrometru. Nejprve bylo měřeno excitační spektrum samotné KV o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4}$  mol/l (obr. 10), aby bylo možno určit vhodnou excitační vlnovou délku, a následně byla u všech vzorků i slepých vzorků snímána spektra emisní. Vzhledem k tomu, že se tvar spektra při různých koncentracích barviva neměnil, je uvedeno pouze jedno vzorové emisní spektrum (obr. 11). Emisní maxima vzorků s různými koncentracemi KV jsou znázorněna v tab. č.15.

Tento pokus jsem zopakovala se vzorky, které obsahovaly místo BR pufru o pH 7,96 stejné množství 0,2 mol/l kyseliny chlorovodíkové. U těchto vzorků však došlo asi po 15 minutách k odbarvení, tudíž jsem nemohla provést měření.

Tab. č.15: Emisní maxima pro vzorky s různými koncentracemi KV

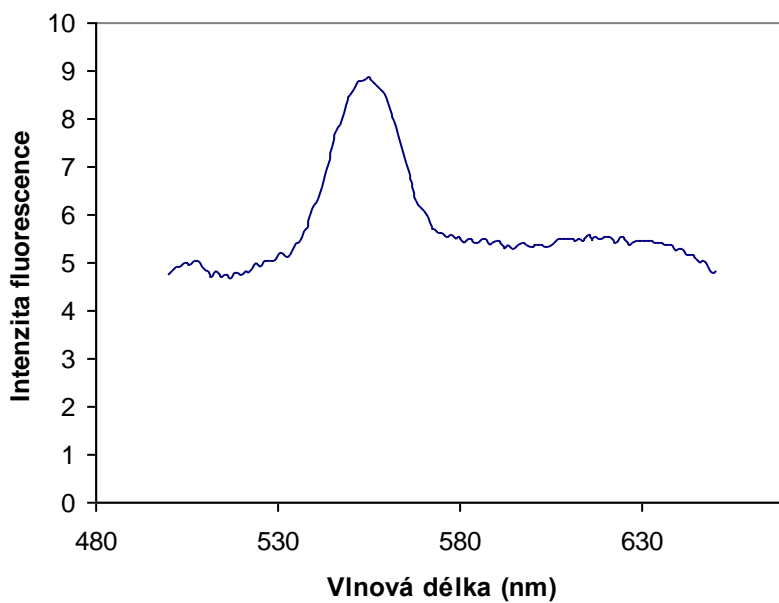
Koncentrace KV ve vzorku (mol/l)	Emisní maxima vzorků	Číslo slepého vzorku	Emisní maxima slepých vzorků
$2,00 \cdot 10^{-6}$	553	1	553
$2,19 \cdot 10^{-6}$	554	2	554
$2,38 \cdot 10^{-6}$	555	3	554
$2,56 \cdot 10^{-6}$	553	4	553
$2,81 \cdot 10^{-6}$	554	5	554
$3,00 \cdot 10^{-6}$	554	6	554
$4,00 \cdot 10^{-6}$	554	7	554
$5,00 \cdot 10^{-6}$	554	8	554
$6,00 \cdot 10^{-6}$	554	9	554
$7,00 \cdot 10^{-6}$	555	10	Signal over
$8,00 \cdot 10^{-6}$	555	11	554
$1,00 \cdot 10^{-5}$	554	12	554
$1,20 \cdot 10^{-5}$	554	13	554

### Excitační spektrum KV



Obr. 10: Vzorové excitační spektrum roztoku KV a LSS

### Emisní spektrum KV



Obr. 11: Vzorové emisní spektrum roztoku KV a LSS

## **5. DISKUZE**

## **5.1 Interakce KV s LSS**

Při přípravě vzorků s KV o koncentraci  $5 \cdot 10^{-4}$  mol/l, došlo po určité době k odbarvení vzorků, a proto jsem nemohla vzorky proměřit. Zkusila jsem naředit vzorky s použitím KV o nižší koncentraci  $1 \cdot 10^{-5}$  mol/l a  $1 \cdot 10^{-4}$  mol/l, ale i u těchto vzorků došlo k odbarvení. Protože KV lépe protonizuje v kyselém prostředí, zopakovala jsem pokus s kyselinou chlorovodíkovou 0,2 mol/l místo pufru, ale opět jsem nezískala žádné výsledky. Od dalších pokusů s KV extrakční spektrofotometrií jsem upustila, protože je extrakční spektrofotometrie v případě KV nepoužitelná.

Sledováním vlivu přebytku KV na interakci s LSS na hladinách  $1 \cdot 10^{-6}$  mol/l a  $2 \cdot 10^{-5}$  mol/l, jsem zjistila, že se zvyšující se koncentrací KV ve vzorcích nedochází k posunům absorpčních spekter KV. Vlnová délka maxim se pohybovala vždy okolo hodnoty 590 nm. U vzorků jsem mohla pozorovat, že došlo v průběhu prvních patnácti minut měření k odbarvení a proto byl pokus zopakován v prostředí kyseliny chlorovodíkové 0,2 mol/l. I v tomto případě došlo u některých vzorků v průběhu prvních patnácti minut měření k odbarvení, pouze vzorky 7-13 jsem mohla proměřit, ale i u nich došlo k výraznému zesvětlení a naměřené absorbance byly velmi nízké.

K odbarvení vzorků dochází pravděpodobně v důsledku navázání LSS na částečně záporný náboj částice KV, tím je porušen systém konjugovaných dvojných vazeb a absorpční maximum se posouvá do UV oblasti. Podobnou situaci popisuje Okubo (13), který pozoroval odbarvování vzorků KV při vysokých hodnotách pH, kdy jsou rovněž molekuly KV v roztoku atakovány zápornými  $\text{OH}^-$  ionty, a autoři práce (10).

V pokusech provedených metodou fluorimetrie došlo u vzorků, které obsahovaly různé nadbytky KV a zásobní roztok LSS o koncentraci  $1 \cdot 10^{-5}$  mol/l, k mírným posunům emisních maxim. Tyto posuny jsou však velmi malé (553 – 555 nm), a navíc se prakticky shodují posuny u vzorků a u slepých vzorků. To znamená, že nelze na základě těchto experimentů usuzovat na významnou míru interakce mezi LSS a KV. Určité posuny v absorpčních a fluorescenčních spektrech KV jsou v literatuře popsány (14), avšak až v nadkritické oblasti. Tyto posuny se pokusila Všetečková (15) použít ke zjišťování CMC tenzidů.

## 5.2 Interakce NČ s LSS

Z absorbancí naměřených extrakční spektrofotometrií jsem zjistila, že se začne absorbance při pH 9,37 zvyšovat, proto jsem pro kontrolu připravila a metodou UV-VIS absorpční spektroskopie proměřila i vzorky s BR pufrem o pH 10,88, ale výsledky naměřené u vzorků se zásaditějším pufrem se nedají využít. U vzorků s BR pufrem o pH 5,02 došlo k výrazným posunům v absorpčních spektrech. Vlnové délky maxim pro dané koncentrace NČ se pohybují v rozmezí 516-534 nm. Z pohledu těchto výrazných hypsochromních posunů ve spektrech NČ lze označit získané výsledky za velmi zajímavé. Závislost vlnové délky absorpčního maxima na koncentraci barviva je téměř monotónní. Výjimku z tohoto pravidla tvoří pouze dva vzorky z oblasti koncentrací NČ kolem hodnoty  $3 \cdot 10^{-5}$  mol/l. Tuto anomálii je momentálně obtížné nějak vyhodnotit a zasloužila by si dalšího zkoumání. Zmíněný hypsochromní posun v absorpčních spektrech dává možnost soudit, že v roztocích NČ a LSS dochází k významným interakcím barvivo-tenzid. Tyto interakce mají za následek tvorbu agregátů, které se svou strukturou blíží spíše agregátům typu H.

Moulik et al. (16) uvádějí výsledky studia chování NČ v micelách a mikroemulzích (typu olej ve vodě). Jejich výsledky jsou od výsledků této práce zásadně odlišné. Autoři práce (16) nepozorovali závislost vlnové délky absorpčního maxima na koncentraci, ale popisují markantní rozšíření absorpčních pásů právě v závislosti na koncentraci. Domnívám se, že uvedené rozdíly ve výsledcích práce (16) a výsledcích mých tkví v rozdílnosti prostředí, v nichž byla měření prováděna. Zatímco mikroemulze a micely představují nepolární, event. slabě polární prostředí, byla moje měření prováděna v prostředí vodném, tedy silně polárním. Nelze se patrně domnívat, že hydrofobní části molekul LSS při koncentracích hluboko pod CMC výrazně ovlivní polaritu prostředí. Bylo by však zajímavé provést experimenty analogické experimentům z mé diplomové práce při koncentraci LSS těsně pod CMC, kdy již může docházet k významnému shlukování většího počtu molekul tenzidu.

Proměřením výše popsaných vzorků metodou fluorimetrie byl objeven trend nevýrazného bathochromního posunu emisních maxim u vzorků s BR pufrem o pH 5,02, i u vzorků s BR pufrem o pH 10,88. Ovšem s ohledem na skutečnost, že prakticky stejný trend se vyskytuje i u příslušných slepých vzorků, není možné přisoudit uvedený posun tvorbě asociálů barviva a tenzidu, ale spíše postupné mírné agregaci samotného barviva. Tyto výsledky jsou ve zdánlivém rozporu s výsledky UV-VIS absorpční spektrofotometrie. Avšak práce (2), jejíž autoři se zabývali studiem interakcí porfyrinových barviv s tenzidy, uvádí



výsledky, které jsou s mými v kvalitativní shodě: Tvorba H-agregátů se projeví posuny absorpčních maxim, ale fluorescenční spektra neagregovaného barviva a H-agregátu mají stejný tvar bez posunů vlnových délek fluorescenčních maxim.

Fluorescenční spektra měřená v této diplomové práci byla skenována s krokem 2 nm. Pokud v případě nižších koncentrací mělo spektrum natolik nevyhlazený tvar, že bylo obtížné vyhodnotit fluorescenční maxima, byla surová spektrální data vyhlazena Savitzky-Golayovým algoritmem (17), který je součástí vyhodnocovacího softwaru luminiscenčního spektrometru AMINCO-BOWMAN SERIES 2 a takto vyhlazená spektra byla dále zpracována.

## **6. ZÁVĚR**

Tato diplomová práce se zabývá studiem interakcí mezi laurylsíranem sodným a dvěma organickými barvivy (krystalovou violetí a neutrální červení) s využitím extrakční spektrofotometrie, UV-VIS absorpční spektrofotometrie a fluorimetrie. Experimenty s krystalovou violetí nepřinesly žádné informace o takových interakcích. Výsledky studia interakcí neutrální červení s laurylsíranem sodným v pufovaných roztocích naproti tomu nasvědčují tvorbě vysoce uspořádaných agregátů typu H.

## **7. LITERATURA**

- (1) Chalabala M. et al.: *Technologie léků*, nakladatelství Galén, Praha 2001.
- (2) Maiti C. Nakul, Mazumdar S., Periasamy N.: J- and H-Aggregates of Porphyrin-Surfactant Complexes: Time-Resolved Fluorescence and Other Spectroscopic Studies, *Journal of Physical Chemistry B* 102 (1998), 1528-1538.
- (3) Němcová I., Čermáková L.: Interactions of Surfactants and Organic Spectrophotometric Reagents, *Tenside Surf. Det.* 31 (1994) 5, 331-336.
- (4) Dutta R.K., Bhat S.N.: Interaction of Phenazinium Dyes and Methyl Orange with Micelles of Various Charge Types, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 106 (1996), 127-134.
- (5) Gehlen M.H., Ferreira M., Neumann M.G.: Interaction of Methyl Orange with Cationic Micelles and Its Effects on Dye Photochemistry, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 87 (1995), 55-60.
- (6) Buwalda R.T., Jonker J.M., Engberts J.B.F.N.: Aggregation of Azo Dyes with Cationic Amphiphiles at Low Concentrations in Aqueous Solution, *Langmuir* 15 (1999), 1083-1089.
- (7) Qiaohong He., Hengwu Chen: Flow Injection Spectrophotometric Determination of Anionic Surfactants Using Methyl Orange as Chromogenic Reagent: *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 367 (200), 270-274.
- (8) Casero I., Sicilia D., Rubio S., Pérez-Bendito D.: Study of the Formation of Dye-Induced Premicellar Aggregates and Its Application to the Determination of Quaternary Ammonium Surfactants, *Talanta* 45 (1997), 167-180.
- (9) Ali Awan M., Shan S.S.: Hydrophobic Interaction of Amphiphilic Hemicyanine Dyes with Cationic and Anionic Surfactant Micelles, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 122 (1997), 97-101.
- (10) Albrizzio J., Archila J., Rodulfo T., Cordes E.H.: Secondary Valence Force Catalysis. XIII. Kinetics of the Alkaline Fading of Crystal Violet in the Presence of Cationic Surfactants, *Journal of Organic Chemistry* 37 (1972), 871-874.
- (11) Čihalík J., Dvořák J., Suk V.: *Příručka měření pH*, SNTL, Praha 1975.
- (12) Kubíček V., Němcová K.: Study of the Interaction Phenomena of Cetyl-trimethyl-ammonium Bromide, Cetylpyridinium Chloride and Benzethonium Chloride with C.I Acid Orange 52 and Picric Acid by Two Spectral Methods, *Dyes and Pigments* 68 (2006), 183-189.
- (13) Okubo T., Ise N.: Catalytic Action of Polyelectrolytes on the Alkaline Fading Reactions of Triphenylmethane Dyes. *Journal of American Chemical Society* 95 (1973), 2293-2297.
- (14) De S., Girigoswami A., Mandal S.: Enhanced Fluorescence of Triphenylmethane Dyes in Aqueous Solutions at Supramicellar Concentrations – Effect of Added Electrolyte. *Spectrochimica Acta Part A* 58 (2002), 2547 – 2555.

- (15) Všecková P: Vliv elektrolytů na CMC kationických tenzidů, diplomová práce, katedra biofyziky a fyzikální chemie, Farmaceutická fakulta UK v Hradci Králové, 2005.
- (16) Moulik S. P., Paul B. K. Mukherjee D. C.: Acid –Base Behavior of Neutral Red in Compartmentalized Liquids (Micelles and Microemulsions). *Journal of Colloid and Interface Science* 161 (1993), 72-82.
- (17) Savitzky A., Golay M. J. E.: Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures. *Analytical Chemistry* 36 (1964), 1627-1639. DOI:10.1021/ac60214a047.