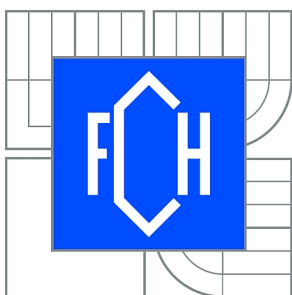




VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

FLUORESCENČNÍ SONDY VE VÝZKUMU DOMÉN ASOCIATIVNÍCH KOLOIDŮ

FLUORESCENCE PROBES IN INVESTIGATION OF ASSOCIATIVE COLLOID DOMAINS.

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

MONIKA MISCHINGEROVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. FILIP MRAVEC, Ph.D.

BRNO 2012



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	FCH-BAK0700/2011	Akademický rok: 2011/2012
Ústav:	Ústav fyzikální a spotřební chemie	
Student(ka):	Monika Mischingerová	
Studijní program:	Chemie a chemické technologie (B2801)	
Studijní obor:	Spotřební chemie (2806R002)	
Vedoucí práce	Ing. Filip Mravec, Ph.D.	
Konzultanti:	Ing. Tereza Halasová	

Název bakalářské práce:

Fluorescenční sondy ve výzkumu domén asociativních koloidů

Zadání bakalářské práce:

1. Shromáždit literární poznatky o stanovení agregačních koncentrací tenzidů pomocí fluorescenčních sond, ze jména s přihlédnutím na konečné koncentrace těchto sond ve vzorcích.
2. Na základě rešerše navrhnout koncentrační rozsah použité sondy pyrenu a zvolit vhodný typ asociativního koloidu pro další studium.
3. Použít navrhnutý systém a stanovit u asociativního koloidu jeho kritickou agregační koncentraci v roztoku s různým obsahem fluorescenční sondy.
4. Na základě získaných dat zhodnotit závislost agregační koncentrace pro různé asociativní koloidy na koncentraci fluorescenční sondy.

Termín odevzdání bakalářské práce: 4.5.2012

Bakalářská práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

Monika Mischingerová
Student(ka)

Ing. Filip Mravec, Ph.D.
Vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2012

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT:

Cílem této práce bylo zjistit, jakým způsobem samotná koncentrace fluorescenční sondy (pyrenu) ovlivňuje kritickou micelární koncentraci příslušného tenzidu. V této práci byly použity všechny druhy tenzidů (anionaktivní, kationaktivní a neionogenní). Zástupcem anionaktivního tenzidu byl dodecylsulfát sodný (SDS) a dodecylbenzensulfát sodný (SDBS). Jako kationaktivní tenzid byl zvolen cetyltrimetylamonium bromid (CTAB) a jako neionogenní polyoxyethylen(9,5)oktylfenol (TRITON X-100). Kritická micelární koncentrace těchto tenzidů byla proměřena s pyrenem o třech koncentračních řádech. Veškerá data získaná fluorescenční spektroskopií byla prokládána klesající Boltzmannovou sigmoidní křivkou, ze které byla určena hodnota kritické micelární koncentrace. Bylo zjištěno, že v případě anionaktivních tenzidů existuje jistá závislost mezi kritickou micelární koncentrací tenzidu a koncentrací fluorescenční sondy. Se zvyšující se koncentrací sondy se zvyšovala také hodnota kritické micelární koncentrace, a to v obou případech (SDS, SDBS). U ostatních tenzidů (kationaktivní a neionogenní) nebyla pozorována žádná změna hodnoty kritické micelární koncentrace v závislosti na koncentraci pyrenu.

ABSTRACT:

The aim of this thesis was to determine how the concentration of the fluorescent probe (pyrene) affects the critical micelle concentration. In this thesis were used all types of surfactants (anionic, cationic and nonionic). As representatives of the anionic surfactants were chosen sodium dodecylsulfate (SDS) and sodium dodecylbenzenesulfate (SDBS), as the cationic surfactant was chosen cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) and as the nonionic polyoxyethylene(9.5)octylphenol (Triton X-100). The critical micelle concentration of these surfactants were measured with a pyrene at three different concentrations. All data obtained by fluorescence spectroscopy were fitted by a Boltzmann-type sigmoid. It was found out that in the case of the anionic surfactants there is some correlation between the critical micelle concentration of the surfactant and the concentration of the fluorescent probe. In both cases (SDS, SDBS) the value of the critical micelle concentration increased with increasing concentration of the fluorescent probe. For the other surfactants (cationic and nonionic) was observed no change in the critical micelle concentration values depending on the concentration of pyrene.

KLÍČOVÁ SLOVA:

kritická micelární koncentrace, pyren, fluorescenční spektroskopie, tenzidy

KEYWORDS:

critical micelle concentration, pyrene, fluorescence spectroscopy, surfactants

MISCHINGEROVÁ, M. *Fluorescenční sondy ve výzkumu domén asociativních koloidů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2012. 43 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Filip Mravec, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem citovala správně a úplně. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....

podpis studenta

Poděkování:

Velice ráda bych poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce Ing. Filipu Mravcovi, Ph.D. a konzultantce Ing. Tereze Halasové za odborný dohled, trpělivost a užitečné rady. Rovněž bych ráda poděkovala své rodině za podporu při studiu.

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1	Fluorescenční spektroskopie	8
2.1.1	Pojmy spojené s fluorescencí.....	9
2.2	Fluorescenční sondy.....	10
2.2.1	Pyren	10
2.3	Koloidně disperzní soustavy	11
2.3.1	Rozdělení koloidně disperzních soustav	11
2.3.2	Micelární (asociativní, agregační) koloidy	12
2.3.3	Příprava micelárních koloidů	12
2.3.4	Tenzidy	12
2.3.5	Kritická micelární koncentrace (CMC).....	14
2.3.6	Micely	14
2.3.7	Velikost a tvar micel	15
2.3.8	Pojmy spojené s micelami a tenzidy	16
3	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	17
4	MATERIÁLY A METODY	20
4.1	Použité chemikálie	20
4.1.1	Fluorescenční sondy.....	20
4.1.2	Tenzidy	20
4.2	Příprava vzorků a zásobních roztoků:	22
4.2.1	Příprava zásobních roztoků fluorescenčních sond	22
4.2.2	Příprava vzorků k určení kritické micelární koncentrace	22
4.3	Měření emisních spekter pyrenu	23
4.4	Vyhodnocení naměřených dat.....	23
4.4.1	Stanovení kritické micelární koncentrace	23
4.4.2	Vyhodnocení výsledků v programu OriginPro 8.1	25
4.4.3	Stanovení chyby měření.....	27
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	28
5.1	Měření kritické micelární koncentrace anionaktivního tenzidu s pyrenem	28

5.1.1	Měření kritické micelární koncentrace SDS s pyrenem o koncentraci 10^{-5} M	28
5.1.2	Měření kritické micelární koncentrace SDS s pyrenem o koncentraci 10^{-6} M	29
5.1.3	Měření kritické micelární koncentrace SDS s pyrenem o koncentraci 10^{-7} M	29
5.1.4	Hodnocení výsledků měření.....	30
5.2	Měření kritické micelární koncentrace kationaktivního tenzidu s pyrenem	33
5.2.1	Měření kritické micelární koncentrace CTAB s pyrenem o koncentraci 10^{-5} M .	33
5.2.2	Měření kritické micelární koncentrace CTAB s pyrenem o koncentraci 10^{-6} M .	34
5.2.3	Měření kritické micelární koncentrace CTAB s pyrenem o koncentraci 10^{-7} M .	35
5.2.4	Hodnocení výsledků měření.....	36
5.3	Měření kritické micelární koncentrace neionogenního tenzidu s pyrenem	37
5.3.1	Měření CMC TRITONu X-100 s pyrenem o koncentraci 10^{-5} M.....	37
5.3.2	Měření CMC TRITONu X-100 s pyrenem o koncentraci 10^{-6} M.....	38
5.3.3	Měření CMC TRITONu X-100 s pyrenem o koncentraci 10^{-7} M.....	38
5.3.4	Hodnocení výsledků měření.....	39
6	ZÁVĚR	40
7	REFERENCE.....	41
8	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	43

1 ÚVOD

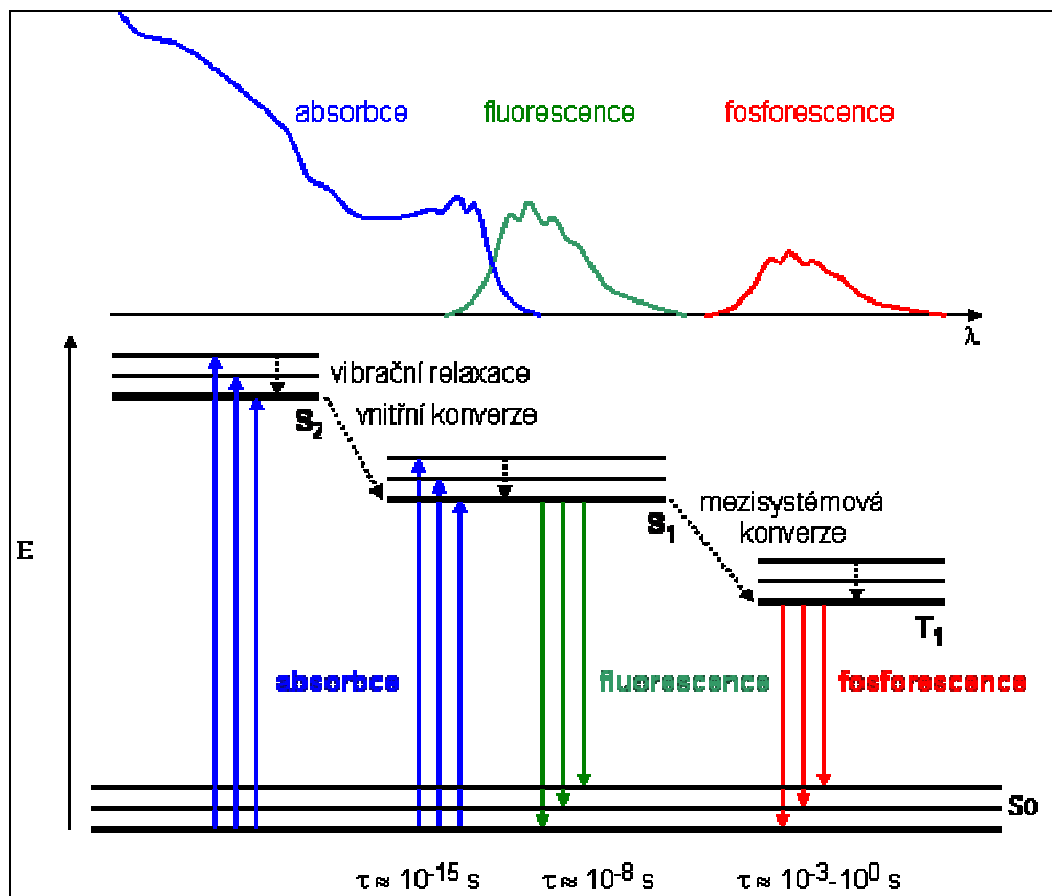
Cílem této práce je odpovědět na otázku, zda koncentrace samotné fluorescenční sondy ovlivňuje výsledky měření, získaných pro roztoky tenzidů pomocí fluorescenční spektroskopie. Má práce je zaměřena především na to, jak mění se koncentrace fluorescenční sondy ovlivňuje hodnotu kritické micelární koncentrace daného tenzidu. Jako fluorescenční sonda byl v této práci zvolen pyren.

V mnoha člancích se o pyrenu píše, že se jedná o hydrofobní sondu. Ve vodě se ale více či méně rozpouští a tím ovlivňuje samotnou agregaci vzorku. Známou věcí o pyrenu je, že v nízkých koncentracích ve vodě fluoreskuje. Na základě těchto poznatků byla navržena měření s pyrenem v různých koncentračních řádech, a to pro všechny druhy tenzidů (anionaktivní, kationaktivní a neionogenní).

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Fluorescenční spektroskopie

Metoda, která se využívá v mnoha odvětvích. Jedná se především o genetickou analýzu, stopovou analýzu, medicínu a analýzu polymerů, léčiv a vitaminů [1][2]. Základní fyzikální děje mezi absorpcí (pohlcením) a emisí (vyzářením) světla popisuje Jabloňského diagram.



Obr. 1: Jabloňského diagram [3]

Obrázek 1 vysvětluje děje a procesy, které mohou nastat po absorpci světla. Jedná se o zjednodušené schéma zářivých a nezářivých přechodů mezi elektronově vibračními stavy molekuly. Na obrázku je také znázorněn tvar absorpčních a emisních spekter, a to pro jednu danou modelovou látku. Spektra jiných látek se liší; vše totiž závisí na chemické struktuře dané molekuly. Diagram názorně ukazuje molekulární procesy, které se dějí při excitaci sledovaného fluoroforu a při jeho cestě zpět na základní hladinu – do základního stavu, který se označuje symbolem S₀. Fluorofor je látka, která je schopna absorbovat světlo určité vlnové délky a poté emitovat světlo o delší vlnové délce. V základním stavu absorbuje světlo (foton). Touto absorpcí dojde k excitaci elektronu, který přejde do nejbližšího neobsazeného orbitalu s vyšší energií. Může to být excitovaný singletový stav (spiny obou elektronů jsou antiparalelní) S₁, S₂ nebo tripletový stav (spiny

obou elektronů jsou paralelní) T_1 . Na tripletový stav se elektron dostane až vnitřní konverzí a následným mezisystémovým přechodem. Elektrony mají tendenci se vracet zpět na základní hladinu S_0 ; tento jev nazýváme deexcitací. K deexcitaci molekuly dochází dvěma způsoby, buďto zářivými pochody – excitovaná molekula ztratí svou energii vyzářením světla (luminiscencí), nebo nezářivými pochody – díky termochemickým reakcím (vibrační relaxace). V případě fluorescenční spektroskopie nás zajímají především luminiscenční jevy [4].

S luminiscencí souvisejí dva pojmy, a to fluorescence a fosforescence. Při **fluorescenci** dochází k přechodu ze singletového stavu S_1 do základního stavu S_0 . Jedná se o zářivý přechod, který je spinově dovolený. Tento přechod je velice rychlý – v řádu nanosekund (10^{-9} s). Při **fosforescenci** dochází k přechodu z tripletového stavu T_1 do základního stavu S_0 . Tento přechod je rovněž zářivý, ale pomalejší, než u fluorescence. Jedná se o milisekundy až sekundy (10^{-3} až 1 s). Rychlost přechodu je způsobena zakázaným zářivým přechodem, kdy se mění multiplicita. S luminiscencí souvisí také další jev, označovaný jako **zpožděná fluorescence**, který je způsoben mezisystémovým přechodem ze singletového stavu S_1 do tripletového stavu T_1 a reverzním mezisystémovým přechodem zpět na nejnižší hladinu singletového stavu S_1 . Následně molekula ztrácí energii fluorescencí. Emisní spektrum zpožděné fluorescence je shodné s emisním spektrem okamžité fluorescence.

Proces fluorescence je opakovatelný. Pokud není fluorofor zničen v excitovaném stavu (fotovybělování – dochází k nevratnému zničení excitovaného fluoroforu); je možné tento fluorofor opakovatelně excitovat [3].

2.1.1 Pojmy spojené s fluorescencí

Kvantový výtěžek fluorescence je poměr mezi počtem emitovaných kvant (fotonů) a počtem absorbovaných kvant (fotonů) za sekundu.

$$\Phi = \frac{N_{emit}}{N_{absorb.}} \quad (1)$$

Intenzita fluorescence je úměrná intenzitě absorpce, vynásobené kvantovým výtěžkem fluorescence.

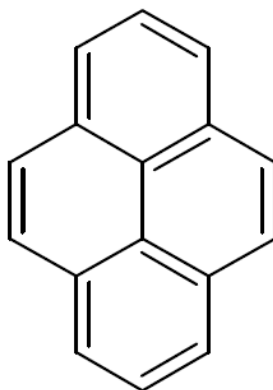
Vnitřní filtrační efekt, tento jev snižuje intenzitu fluorescence. Jedná se o chybu, která zkresluje výsledky pro více koncentrované roztoky fluoroforu, kde přestává platit přímá úměrnost mezi intenzitou fluorescence a koncentrací fluoroforu. Tak je tomu pouze za nízkých koncentrací fluoroforu. Při dopadu záření se vlivem absorpce části fotonů dostane do centrální části kyvety mnohem menší počet fotonů. Tento jev považujeme za vnitřní filtrační efekt prvního druhu, při kterém dochází ke snížení intenzity fluorescence. Existuje také vnitřní filtrační efekt druhého druhu, kdy dochází k reabsorbci fotonů fluorofory, a tím dochází k excitaci molekul a následné emisi fotonů do různých směrů [4][5].

2.2 Fluorescenční sondy

Jedná se o nevlastní fluorofory, které se ke zkoumané látce váží nekovalentně. Na volbě fluorescenční sondy závisí výsledky experimentů ve fluorescenční spektroskopii – její vlastnosti umožňují získat potřebné informace. V současné době je známo několik tisíc různých sond. Fotochemické vlastnosti sond jsou ale ovlivňovány prostředím, ve kterém se nachází. Nejpoužívanějšími sondami ve výzkumu systémů, jak ve vědeckých, výzkumných tak i v průmyslových odvětvích, jsou například pyren, prodan (polaritní sondy), 1,3-bis(pyren-1-yl)propan – P3P (viskozitní sonda). Polaritními sondami jsou například také 1-anilinonaftalén-8-sulfonát (ANS) a 2-p-toluidinonaftalén-6-sulfonát (TNS) [3].

2.2.1 Pyren

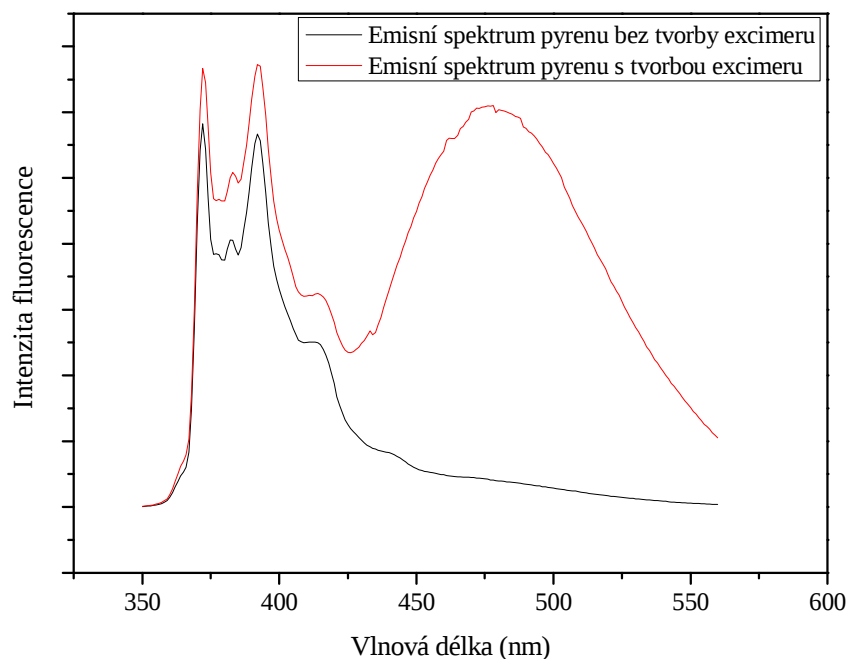
Pyren je polaritní sonda. Jedná se o polyaromatický uhlovodík s vysokou symetrií. Strukturní vzorec pyrenu je znázorněn na *Obrázku 2*.



Obr. 2: Strukturní vzorec molekuly pyrenu

Jeho emisní spektrum tvoří 5 maxim, která přísluší jednotlivým vibračním přechodům. Při měření s pyrenem se využívají hodnoty intenzit maxim v emisním spektru. Jedná se především o hodnotu intenzity prvního vibračního pásu, který se nachází u vlnové délky 373 nm. Toto první maximum označujeme symbolem I_1 . Dále pak o hodnotu intenzity třetího vibračního pásu, který se nachází u vlnové délky 383 nm (I_3), a také o hodnotu intenzity fluorescence při 470 nm (I_{EX}), která odpovídá maximu typickému pro excimer. Excimer – excitovaný dimer, komplex dvou stejných molekul, z nichž jedna je v excitovaném stavu a druhá ve stavu základním. Excimer v systému vzniká při lokálním zkoncentrování pyrenu v micelách (v okolí kritické micelární koncentrace – CMC). Postupným zvyšováním koncentrace tenzidu v roztoku za kritickou micelární koncentrací dochází k nárůstu počtu micel v roztoku. Sonda již není nahuštěná v jedné micelle. Zvýšení počtu micel má za následek rovnoměrnější rozprostření pyrenu v celém systému micel; v micelách již nedochází k tak častým srážkám molekul pyrenu – nedochází k tvorbě

excimeru. Proto se za CMC snižuje pravděpodobnost vzniku excimeru. Tyto hledané hodnoty zobrazuje *Obrázek 3 – emisní spektrum pyrenu*.



Obr. 3: Emisní spektrum pyrenu (s pásem excimeru při vlnové délce 470 nm) a bez excimeru

Pro stanovení CMC se využívá hodnota poměru fluorescence u pásů I_1 a I_3 . Tento poměr I_1/I_3 nám dává informaci o polaritě v okolí pyrenu (udává míru polaritu v mikroheterogenních systémech); označujeme ho jako polaritní index (PI). V polárním prostředí bývá tato hodnota vyšší než 1, maximum však nepřekračuje hodnotu 2. V nepolárním prostředí se hodnota pohybuje kolem 0,5 [6]. S rostoucí polaritou se zvyšuje intenzita prvního maxima a intenzita třetího maxima zůstává nezměněna.

2.3 Koloidně disperzní soustavy

Koloidně disperzní soustavy obsahují disperzum, což jsou rozptýlené částice o velikosti 1 – 500 (1000) nm. Ty z nich, které vznikají z povrchově aktivních látek, se nazývají micely a mohou mít různé tvary. Buď jsou izometrické, což znamená, že všechny tři rozměry jsou přibližně stejné, nebo jsou anizometrické, což znamená, že jeden, popř. dva rozměry převládají nad ostatními. Podstatné je, že alespoň jeden rozměr odpovídá rozměru koloidní částice.

2.3.1 Rozdělení koloidně disperzních soustav

Tyto soustavy se dělí na lyofobní a lyofilní koloidy. **Lyofobní koloidy** (fázové koloidy, soly), jejichž stabilizujícím faktorem je elektrická dvojvrstva, mají charakter vícefázového systému a jsou termodynamicky nestálé. O náboji zde rozhoduje pevná část elektrické dvojvrstvy – náboj sorbovaného iontu dle Fajánsova pravidla. Jsou nerozpustné v disperzním prostředí – nemají afinitu k molekulám rozpouštědla.

Lyofilní koloidy, jejichž stabilizujícím faktorem je solvatační obal, se skládají z pevné vnitřní fáze a z difuzní vnější fáze. Lyofilní koloidy se chovají podobně jako pravé roztoky – mají charakter homogenního systému. Poutají na svůj povrch částice rozpouštědla.

Lyofilní koloidy se dále rozdělují na *molekulové koloidy* – roztoky polymerů a *micelární (agregační, asociativní) koloidy* – roztoky nízkomolekulárních látek (př. mýdla).

2.3.2 Micelární (asociativní, agregační) koloidy

Koloidně disperzní částice – micely. Vznikají vratnou asociací z pravých roztoků některých nízkomolekulárních látek po překročení určité koncentrace. Nepotřebují umělou stabilizaci. Jejich velikost a koncentrace jsou určeny okamžitými stavovými veličinami (teplotou, tlakem a koncentrací). Tyto systémy jsou termodynamicky stabilní a lze pro ně do jisté míry použít termodynamiku pravých roztoků. Tyto látky jsou označovány jako povrchově aktivní látky (PAL), nebo také jako tenzidy. V praxi jsou tenzidy velmi často využívány. Díky jejich smáčecím, emulgačním a čistícím účinkům se s nimi lze setkat téměř na každém kroku, a to v podobě sprchových gelů, šamponů, prostředků na mytí nádobí a podobně.

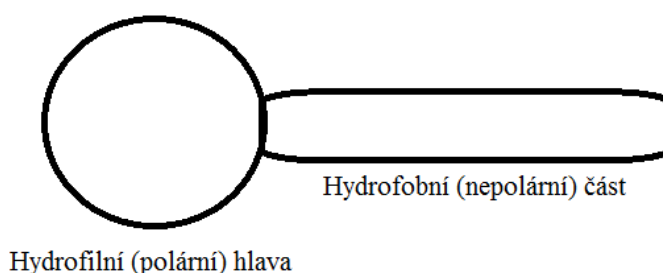
2.3.3 Příprava micelárních koloidů

V analyticky disperzní soustavě (roztok mýdla o nízké koncentraci) se postupně zvyšuje koncentrace, a to až do jisté prahové koncentrace – CMC, po jejímž překročení začnou molekuly asociovat – vytvářet agregáty. Jedna micela je tvořena desítkami až stovkami molekul (závisí vždy od dané micely), které jsou orientovány podle druhu rozpouštědla. Molekuly těchto látek mají vždy polární a nepolární část. V případě polárního rozpouštědla budou na povrchu micely polární části molekul. Polární skupina může být schopna disociace (je ionogenní). Pokud skupina uvolňuje kation a dále nese záporný náboj, nazývá se anionaktivní. Pokud přijímá protony a dále nese kladný náboj, nazývá se kationaktivní. Ve stavu dosažení kritické micelární koncentrace (počátek asociace) platí rovnováha mezi volnými molekulami A a micelami A_m , popsaná vztahem:

$$m \cdot A \leftrightarrow A_m \Rightarrow K = \frac{[A_m]}{[A]^m} \quad (2)$$

2.3.4 Tenzidy

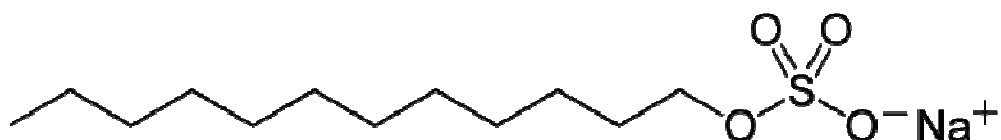
Tenzidy jsou látky snižující povrchové napětí kapalin, čímž usnadňují smáčení povrchu a tím také např. odstraňování nečistot. Každá molekula obsahuje lyofobní část, která je v rozpouštědle nerozpustná, ale také lyofilní část, která se v rozpouštědle rozpustí (*Obr. 4*). Když jako rozpouštědlo použijeme vodu, používáme termíny hydrofilní hlava a hydrofobní konec molekuly. Hydrofobní konec musí obsahovat jeden nebo více alifatických řetězců, obsahujících minimálně osm uhlíkových atomů. Hydrofilní hlava musí být vysoce polární – vysoce rozpustná ve vodě.



Obr. 4: Molekula tenzidu

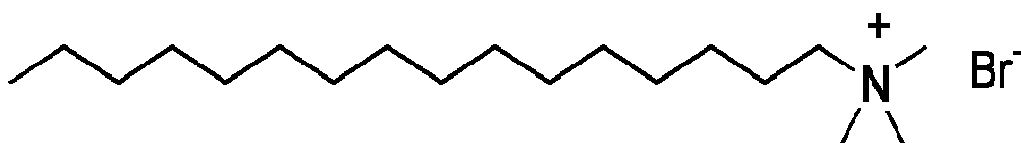
Tenzidy jsou rozděleny podle schopnosti disociovat ve vodném prostředí na ionogenní (anionaktivní, kationaktivní, amfoterní) a neionogenní.

Mezi anionaktivní tenzidy se řadí dodecylsulfát sodný – SDS (Obr. 5), dodecylbenzensulfát sodný – SDBS a další.



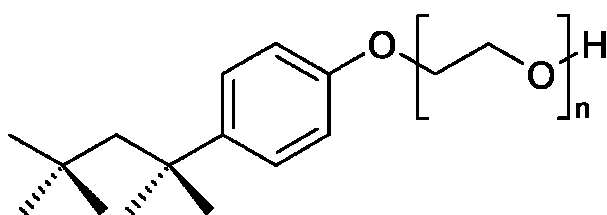
Obr. 5: Dodecylsulfát sodný (SDS)

Mezi zástupce kationaktivních tenzidů patří například tetradecyltrimethylamonium bromid – TTAB, cetyltrimethylamonium bromid – CTAB (Obr. 6), cetylpyridinium bromid – CPB a další.



Obr. 6: Cetyltrimethylamonium bromid

Mezi neionogenní tenzidy se řadí např. polyoxyetylen(9,5)oktylfenol – Triton X-100 (Obr. 7), polyoxyethylensorbitan monolaurát – Tween 20 a n-octyl β-D-thioglucopyranosid – OTG.



Obr. 7: Triton X-100

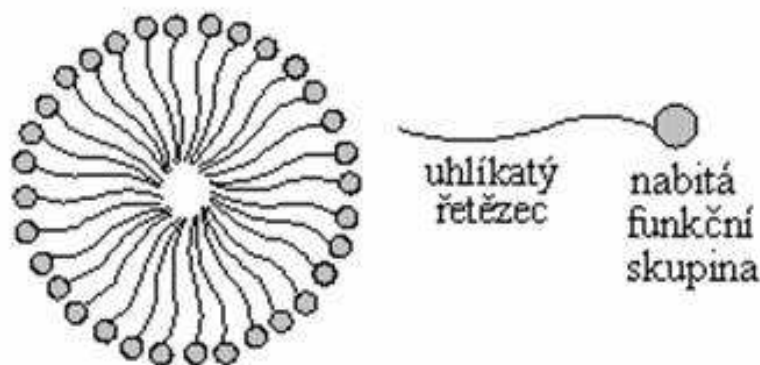
Anionaktivní tenzidy disociují za vzniku povrchově aktivních aniontů, kationaktivní disociují za vzniku povrchově aktivních kationtů. Amfoterní tenzidy mají takovou strukturu, že jejich disociovaný náboj se mění v závislosti na pH prostředí. Příkladem amfoterního tenzidu je 1–trimethylamonium tetradekanoát.

2.3.5 Kritická micelární koncentrace (CMC)

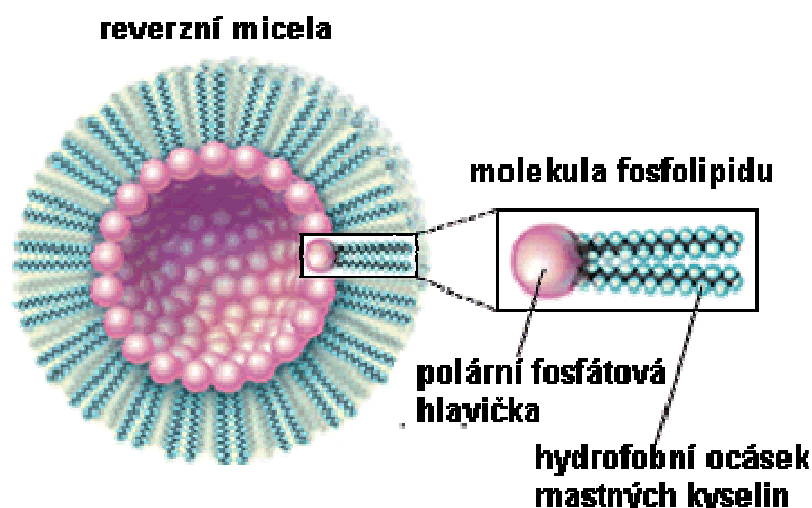
Je to koncentrace, při které se v roztoku začínají tvořit micely. Tato koncentrace nebývá zpravidla vysoká. U většiny tenzidů se pohybuje v rozmezí 10^{-5} až 10^{-3} mol·dm⁻³. V případě koncentrací vyšších, než je kritická micelární koncentrace, všechny přidávané molekuly asociují do micel. CMC závisí na délce uhlovodíkového řetězce a také na jeho struktuře. Dále CMC výrazně ovlivňuje přítomnost dalších látek v roztoku. Do jisté míry CMC ovlivňuje také teplota a tlak. Hodnoty kritických micelárních koncentrací jsou tabelovány pro určité prostředí, tlak a teplotu. Například hodnota CMC pro dodecylsulfát sodný (SDS) je stanovena v rozmezí 7 – 10 mmol·dm⁻³ [7] (ve vodě, bez jiných přísad nebo solí; atmosferický tlak, 20 – 25 °C).

2.3.6 Micely

Jedná se o agregáty koloidních rozměrů. Jsou tvořeny molekulami, které mají relativně nízké molekulární hmotnosti. Základní rozdělení micel je odvozeno od prostředí, ve kterém se nacházejí. V polárním prostředí (voda) je jádro micely tvořeno hydrofobním uhlíkovým řetězcem, a povrch micely je tvořen vysoce polární hydrofilní hlavou, rozpustnou v polárním prostředí (Obr. 8). Naopak v nepolárním prostředí se vytváří inverzní micely, kde jádro micel tvoří hydrofilní hlavy tenzidů a uhlíkaté řetězce jsou orientovány do nepolárního prostředí (Obr. 9).



Obr. 8: Micela v polárním prostředí [8]

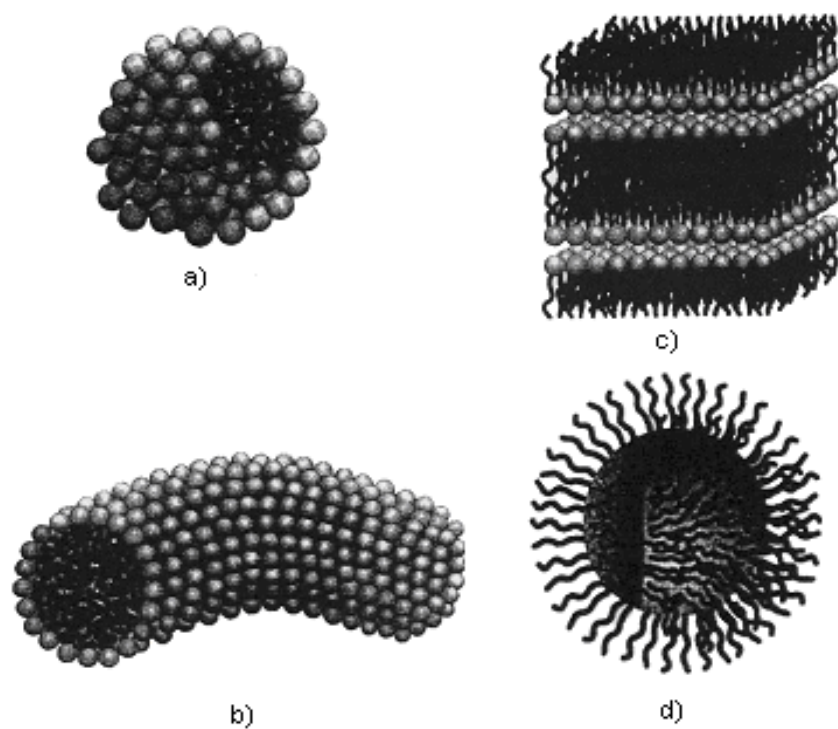


Obr. 9: Micela v nepolárním prostředí [9]

2.3.7 Velikost a tvar micel

Velikost i tvar micel závisí na koncentraci, teplotě PAL aj. Je známo několik typů micel.

Hartleyovy micely – jedná se o **sférické micely** (*Obr. 10: a*). Tyto micely vznikají ve zředěných vodných roztocích (ale za CMC). Jsou nejjednodušším typem, poloměr těchto micel je téměř shodný s délkou jedné molekuly tenzidu. Se zvyšující se koncentrací roztoku se přestávají tvořit sférické micely a začínají se tvořit **micely válcové** (*Obr. 10: b*). Jedná se o micely podobné sférickým. Rozdílem je jen prodloužené jádro, micelární délka není jednoznačná – jedná se o polydisperzní micely. Dalším typem **jsou laminární, McBainovy micely** (*Obr. 10: c*), které vznikají ještě při vyšších koncentracích roztoku. Jsou složeny ze dvou vrstev PAL (micely jsou k sobě obráceny uhlovodíkovými řetězci). V důsledku tvorby laminárních micel a jejich charakteristickému uspořádání mohou dostatečně koncentrované roztoky přecházet v gel. Dalším typem je výše zmíněná **reverzní micela** (*Obr. 10: d*). Jádro těchto micel tvoří polární skupiny a uhlovodíkové řetězce směřují ven do nepolárního prostředí [10].



Obr. 10: Tvary micel: a) sférická micela, b) válcová micela, c) laminární micela, d) reverzní micela [11]

2.3.8 Pojmy spojené s micelami a tenzidy

Agregační číslo (N) udává počet molekul tenzidu v celkové struktuře micely. Většinou se pohybuje v rozmezí 10 až 100. Micelární hmotnost (MW) udává hmotnost jednoho molu micel [8].

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Pyren, jakožto fluorescenční sonda, se používá velmi často, a to nejen k určování kritické micelární koncentrace. Využívá se především hodnota poměru fluorescence u pásů I_1 (373 nm) a I_3 (383 nm). Mnoho výzkumníků používá pyren v různých koncentracích (např. 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} M) bez ohledu na to, zda sama koncentrace sondy ovlivňuje hodnotu CMC.

J. Aguiar a spol. [12] zkoumali, jak přesně nakládat s poměrem fluorescence u pásů I_1 a I_3 (polaritním indexem) v souvislosti s určováním kritické micelární koncentrace. Jejich práce byla založena na předpokladu, že data vynesena do grafu (PI, koncentrace tenzidu) byla fitována Boltzmanovou sigmoidní křivkou. Z těchto fitovaných dat posuzovali dva možné body, které by mohly odpovídat hodnotě CMC. Prvním bodem byl inflexní bod $(x_{\text{CMC}})_1$ a druhým bodem průsečík minima a lineárního proložení klesající části křivky $(x_{\text{CMC}})_2$. Byly nalezeny tabelované hodnoty CMC pro anionaktivní, kationaktivní i neionogenní tenzidy (Tabulka 1).

Tabulka 1: Studované tenzidy s hodnotou CMC nalezenou v literatuře [12] při teplotě 25°C

Tenzidy	Jméno	Zkratka	CMC (mM)
Anionaktivní	Dodecylsulfát sodný	SDS	8,20
Kationaktivní	Cetyltrimethylammonium bromid	CTAB	0,92–1,00
Neionogenní	Triton X-100	TX-100	0,24–0,27

Tabulka 2 udává výsledky naměřené pomocí metody I_1/I_3 (fitováno Boltzmannovým typem sigmoidní křivky). Bylo zjištěno, že v případě ionogenních tenzidů jsou hodnoty $(x_{\text{CMC}})_2$ velmi blízké hodnotě CMC, získané vodivostní metodou a také hodnotám z literatury (Tabulka 1). Naopak pro neionogenní tenzidy se shodují s hodnotami z literatury spíše hodnoty $(x_{\text{CMC}})_1$.

Tabulka 2: Parametry proložení pro data získaná metodou poměru fluorescence u pásů I_1 a I_3 pro zkoumané tenzidy: x_0 je inflexní bod sigmoidní křivky, CMC je kritická micelární koncentrace získaná vodivostní metodou

Tenzid	x_0	$(x_{\text{CMC}})_1$ (mM)	$(x_{\text{CMC}})_2$ (mM)	CMC (mM)
SDS	7,62	7,62	8,18	8,22
CTAB	0,897	0,897	1,011	0,98
TX-100	0,245	0,245	0,345	–

Gargi Basu Ray a spol. [13] řešili problematiku, zda absorpce pyrenu může být vhodnou metodou pro zkoumání kritické micelární koncentrace, a také, zda poukazuje na polaritu okolí. Pro zjišťování CMC existuje mnoho různých metod, jako je například fluorimetrie, kalorimetrie, vodivostní metody aj. Hodnoty CMC tenzidů získané různými metodami jsou uvedeny v *tabulce 3*. Spektrální metody, které využívají barevných a jiných sloučenin jako sondy, jsou také často užívány k určení CMC. Poměr fluorescence u pásů I_1 a I_3 (pro pyren) je velmi často používán nejen k odhadu polarity micel, ale také k samotnému určení CMC.

Cílem bylo určit CMC vodných roztoků tenzidů pomocí fluorescenční sondy pyrenu, konkrétně jeho absorpčních a emisních spekter. Cílem dále bylo srovnat absorpční metody s fluorescenčními metodami. Absorpční metoda – spektra byla měřena v rozmezí 200 až 400 nm, s krokem 10 nm. Fluorescenční metoda – excitace byla nastavena na 331,5 nm a emise byla detekována v rozmezí vlnové délky 340 – 450 nm. Štěrbiny byly nastaveny na 0,4 nm. Koncentrace pyrenu (ve vodném prostředí) byla 2 μM . Bylo zjištěno, že absorpční spektra pyrenu vykazují 8 maxim při vlnových délkách 232, 242, 252, 260, 272, 308, 320 a 336 nm. Dále bylo měřeno fluorescenční spektrum. Při této koncentraci sondy (2 μM) nebyla pozorována tvorba excimeru. Výsledkem bylo, že PI pro CTAB byl o mnoho větší než u SDS. Polaritní indexy pro všechny měřené látky byly uvedeny v *tabulce 4*. Bylo zjištěno, že UV absorpce pyrenu v roztocích tenzidů může být vyhovující metodou ke zjišťování jejich CMC. Dále, že absorpční i emisní spektra pyrenu v různých roztocích tenzidů vykazují shodu pro dané výsledky; spektrální parametr Δa (rozdíl mezi asymptotami Boltzmannova sigmoidního profilu) závisí na systému a také na micelární polaritě. Závislost Δa na polaritním indexu vykazovala lineární profil. Díky těmto poznatkům navrhli, že parametr Δa by mohl být používán k určování polarit micel.

Tabulka 3: CMC tenzidů získaných různými metodami [13]

Systém	CMC (mM)		
	Absorbance	Fluorescence	Vodivost
C₁₆TAB	0,95	0,87	0,91
SDS	7,09	7,05	7,75
SDBS	1,34	–	1,82

Tabulka 4: Hodnoty I_1/I_3 , Δa [13]

Systém	Δa	I_1/I_3 (pro CMC)
C₁₆TAB	0,13	1,06
SDS	0,105	0,968
SDBS	0,069	0,873

Mingyan Yan a spol.[14] zkoumali kritickou agregační koncentraci a agregační číslo kolagenu z kůže Aljašské tresky pomocí fluorescenční sondy pyrenu. Výsledky ukázaly, že pyren byl vhodný pro studium chování agregace kolagenu v pufru fosforečnanu sodného při pH 7,2. Tito výzkumníci vynesli do grafu hodnoty polaritního indexu pyrenu ku logaritmu totální koncentrace kolagenu. Získaná křivka měla typickou klesající sigmoidní závislost. Z tohoto sigmoidního poklesu byla stanovena kritická agregační koncentrace $0,48 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. Bylo také prokázáno, že agregační číslo kolagenu nebylo stále konstantní – lišilo se s měnící se koncentrací kolagenu. Struktura agregátů měla tendenci být stabilní při překročení koncentrace kolagenu $1,2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$.

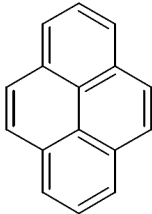
Limin Zhai a spol. [15] se zabývali interakcemi mezi spontánně formovanou směsí SDBS/CTAB a polymerem pomocí fluorescenčních metod. Tato interakce mezi dodecylbenzensulfátem sodným, hexadecyltrimethylamonium bromidem a polymerem byla studována pomocí pyrenu. Změna polarity prostředí pyrenu byla doprovázena změnou hodnot poměru I_1/I_3 (PI). Koncentrace použitého pyrenu byla 10^{-4} M . Bylo zjištěno, že byla pozorována interakce mezi anionaktivním tensidem a polymerem – na základě změny poměru I_1/I_3 . Naopak žádná interakce nebyla pozorována v případě kationaktivního tenzidu a polymeru. Zásadní interakcí v systému byla elektrická přitažlivost.

Techen, Anne a spol. [16] se zabývali nosiči léčiv. Pro tuto studii použili kationaktivní tensid hexadecyltrimethylamonium bromid (CTAB). Tento tensid byl použit jako modelový dopravce ve studiu nosičů léčiv na základě interakcí s fluorescenčními sondami (5-hexadecanoylamino fluorescein (HAF) a 2,10-bis-(3-aminopropoxy)dibenzo[a, j]perylene-8,16-dion (NIR 628)). Vlivy sond na parametry (kritická micelární koncentrace, agregační číslo, hydrodynamický poloměr) byly zkoumány za fyziologických podmínek. V přítomnosti dalších elektrolytů, například v pufru, kritická micelární koncentrace klesla asi o desetinu. Napříč tomu ale nebyl pozorován žádný vliv sondy na hodnotu kritické micelární koncentrace ani na agregační číslo. Výsledky ukázaly, že HAF nemá vliv na vlastnosti micel CTAB. Analýzou dat fluorescenční korelační spektroskopie a časově rozlišené anizotropie bylo prokázáno, že HAF 628 a NIR agregují s micelami jiným způsobem.

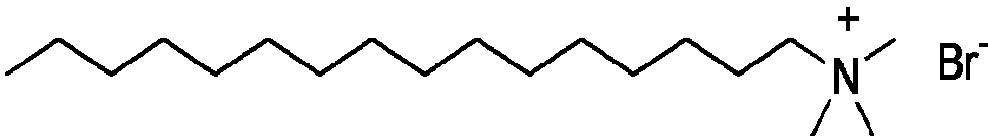
4 MATERIÁLY A METODY

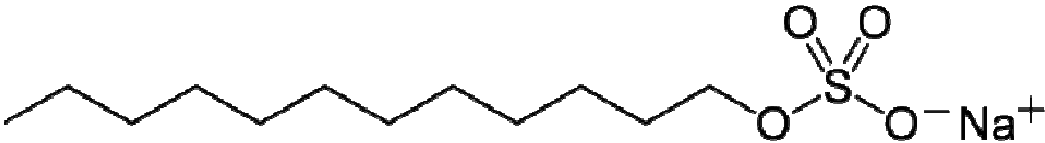
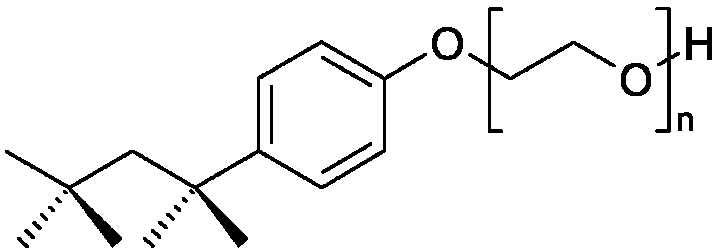
4.1 Použité chemikálie

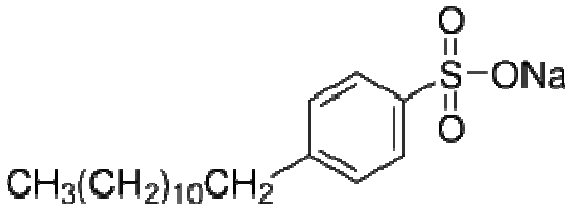
4.1.1 Fluorescenční sondy

PYREN
Strukturní vzorec: 
Sumární vzorec: C ₁₆ H ₁₀
Molární hmotnost: 202,25 g · mol ⁻¹
Výrobce: Fluka
Registrační číslo CAS: 129-00-0
Číslo šarže: 430166/1
čistota ≥ 99,0 %

4.1.2 Tenzidy

Cetyltrimethylamonium bromid – CTAB
Strukturní vzorec: 
Sumární vzorec: C ₁₉ H ₄₂ BrN
Molární hmotnost: 364,46 g · mol ⁻¹
Výrobce: SIGMA Aldrich
Registrační číslo CAS: 57-09-0
Číslo šarže: 117K0732
Čistota ≥ 99,0 %

Dodecylsulfát sodný – SDS	
Strukturní vzorec:	
Sumární vzorec:	$\text{NaC}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4$
Molární hmotnost:	$288,38 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$
Výrobce:	Fluka Analytical 71727
Registrační číslo CAS:	151-21-3
Číslo šarže:	1353471
Čistota	$> 99,0 \%$
Polyoxyethylen(9,5)oktylfenol – TRITON X – 100	
Strukturní vzorec:	
Sumární vzorec:	$\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{O}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n$ (n = 9-10)
Molární hmotnost:	$625 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$
Výrobce:	Fluka BioChemika 93418
Registrační číslo CAS:	9002-93-1
Číslo šarže:	1249005

Dodecylbenzensulfát sodný – SDBS
Strukturní vzorec:  Sumární vzorec: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_3\text{Na}$
Molární hmotnost: $348,48 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$
Výrobce: SIGMA Aldrich
Registrační číslo CAS: 25155-30-0
Číslo šarže: 28,995-7

4.2 Příprava vzorků a zásobních roztoků:

4.2.1 Příprava zásobních roztoků fluorescenčních sond

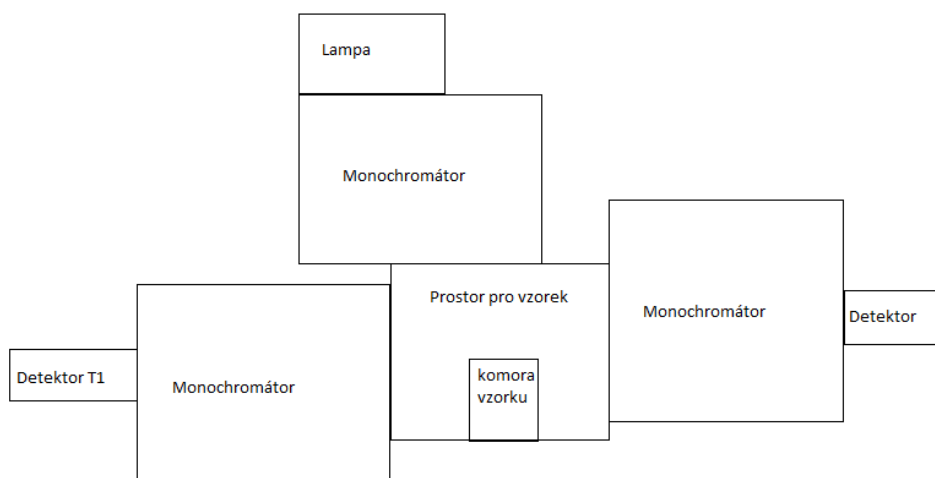
Všechny zásobní roztoky byly připraveny v acetonu v koncentracích řádů 10^{-4} M . Případné jiné potřebné koncentrace byly vždy získány ředěním těchto zásobních roztoků. Všechny zásobní roztoky byly následně uchovávány v lednici.

4.2.2 Příprava vzorků k určení kritické micelární koncentrace

Úvodem byla vždy navržena koncentrační řada tenzidu tak, aby byla v rozsahu, ve kterém se nachází předpokládaná hodnota CMC. Například SDS – pro toto měření byla zvolena koncentrační řada tenzidu v rozsahu $0,01 - 100 \text{ mM}$ tak, aby předpokládaná hodnota CMC ($7 - 10 \text{ mM}$) [7][12] byla zhruba uprostřed tohoto rozsahu. Pro SDBS byla zvolena koncentrační řada v rozsahu $0,1 - 10 \text{ mM}$, pro CTAB v rozsahu $0,1 - 10 \text{ mM}$ opět tak, aby předpokládaná hodnota CMC (1 mM) [7][12] byla zhruba uprostřed tohoto rozsahu. Pro TRITON X-100 byla koncentrační řada volena v rozsahu $0,05$ až $0,5 \text{ mM}$. Do každé vialky bylo napipetováno potřebné množství fluorescenční sondy (pyrenu) v acetonu tak, aby výsledná koncentrace pyrenu ve vzorku byla ve třech koncentračních řádech, konkrétně 10^{-5} , 10^{-6} a 10^{-7} M . Po odpaření acetonu byl přidán tenzid (CTAB, SDS, Triton X – 100, SDBS) a na závěr vždy voda. Ve všech přípravách vzorků byla vždy použita voda typu Mili-Q. Výsledný objem vzorku byl vždy 5 ml .

4.3 Měření emisních spekter pyrenu

Veškeré měření bylo prováděno na přístroji firmy HORIBA (Fluorolog HORIBA JOBIN YVON). Schéma tohoto přístroje je na *Obrázku 11*. Postup při nastavování přístroje před měřením byl následující: excitace byla nastavena na vlnové délce 335 nm, emisní sken byl měřen v rozsahu vlnových délek 350 – 560 nm, s krokem 1 nm. Všechny vzorky byly proměřeny tímto způsobem. Do laboratorního deníku byly vždy zapisovány hodnoty intenzit při vlnových délkách 373 ± 1 nm (I_1), 383 ± 1 nm (I_3) a 470 ± 1 nm (I_{ex}). Všechna měření byla prováděna při teplotě 25 °C, pouze CTAB bylo měřeno v cele s temperovanou teplotou (Peltier) na 20 °C, z důvodu jeho rozpustnosti ve vodě.

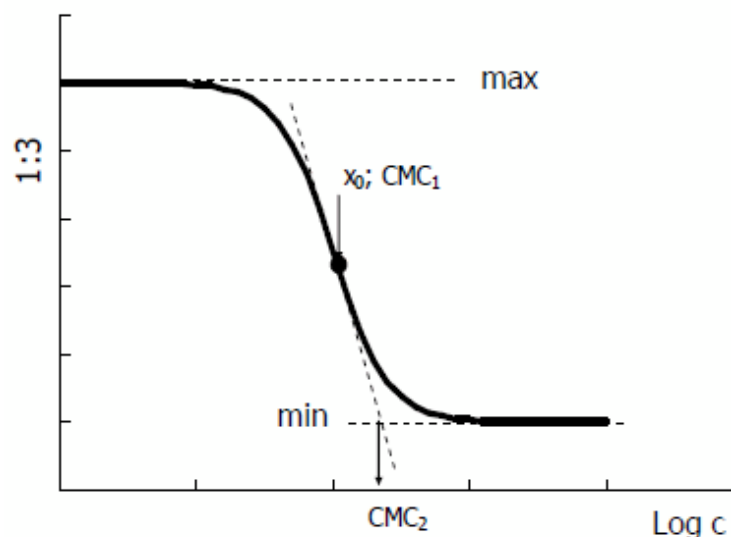


Obr. 11: Schéma přístroje

4.4 Vyhodnocení naměřených dat

4.4.1 Stanovení kritické micelární koncentrace

Pro vyhodnocení dat z pyrenového spektra se nejčastěji používá poměr I_1/I_3 , který označujeme jako polaritní index. V případě měření emisního spektra nazýváme tento poměr jako emisní polaritní index (EmPI). Používáme tedy intenzitu fluorescence při vlnové délce 373 a 383 nm. Tato závislost, vztažená k logaritmu koncentrace tenzidu, vykazuje charakteristický sigmoidní průběh. Tento průběh lze popsat Boltzmanovou sigmoidní křivkou se čtyřmi parametry (*Obr. 12*). Tato metoda se stala jednou z nejpoužívanějších pro zjišťování a stanovování důležitých parametrů v micelárním systému [12]. Používá se nejen pro čisté micelární roztoky, ale také pro roztoky s více tenzidy, a to především pro zjištění a zkoumání vzájemných interakcí v systému, ale také pro zjištění, co se děje v systému po přidání různých aditiv [12].



Obr. 12: Boltzmannova S-křivka (závislost PI na logaritmu koncentrace tenzidu) [6]

Tuto závislost lze popsat také matematicky a to následující rovnicí (3), popsanou 4 parametry – maximem (A_1) a minimem (A_2), koncentrací tenzidu x , inflexním bodem x_0 a gradientem Δx . Této rovnici odpovídá *obrázek 12*.

$$1:3 = \frac{(A_1 - A_2)}{1 + e^{\frac{x - x_0}{\Delta x}}} + A_2 \quad (3)$$

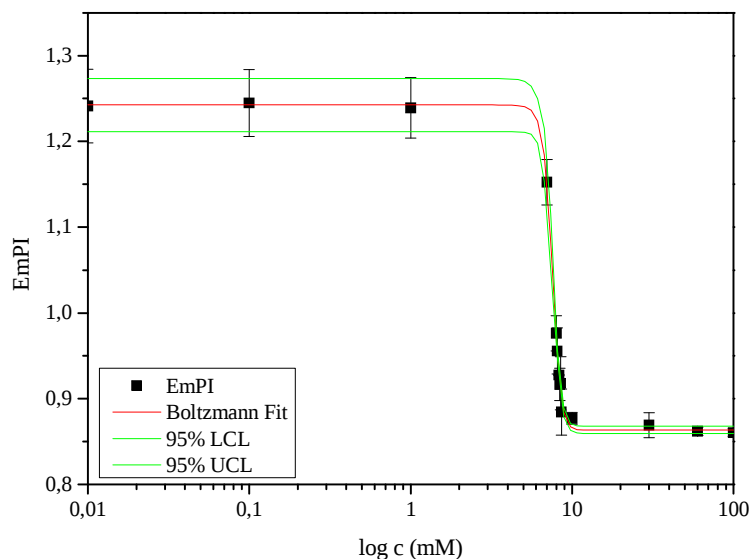
Jak lze z obrázku vyčíst, závislost nabízí 3 potenciální body, které mohou určit hodnotu CMC. Jednak by to mohl být první zlom – průsečík maxima a lineárního proložení klesající části, pak inflexní bod a také průsečík minima a lineárního proložení klesající části. První z možností neuvažujeme z důvodu možné tvorby pre-micelárních útvarů. CMC_1 se určí z naměřených dat pomocí programu Origin – funkcí „Non-linear curve fitting“; program nabízí přímo Boltzmannovu sigmoidní křivku. Po proložení dat získávám přímo hodnotu CMC_1 jako souřadnici „ x_0 “ inflexního bodu. Hodnota CMC_2 je pak implicitně určena právě bodem CMC_1 a gradientem závislosti Δx následnou rovnicí [6].

$$CMC_2 = CMC_1 + 2\Delta x \quad (4)$$

Dále byla použita orientační metoda tvorby excimeru – parametr Ex:Mo. Excimer v systému vzniká, když se do jednoho hydrofobního jádra nasolubilizuje více než jedna molekula pyrenu. Tím dochází k překrytí pyrenových jader a k vyzáření emisního záření, které je typické pro vlnovou délku 470 nm (I_{ex}). Při zvyšování koncentrace tenzidu za CMC roste počet micel, ve kterých se může sonda rozpouštět. Tím se za bodem CMC snižuje pravděpodobnost vzniku excimeru a ve spektru dochází k poklesu jeho intenzity-molekuly pyrenu se rovnoměrně rozdělí do všech vzniklých micel. Tuto metodu ale nelze považovat za definitivní a úplně přesnou, jelikož výsledné hodnoty jsou závislé na koncentrační řadě, kterou nelze popsat žádnou matematickou funkcí.

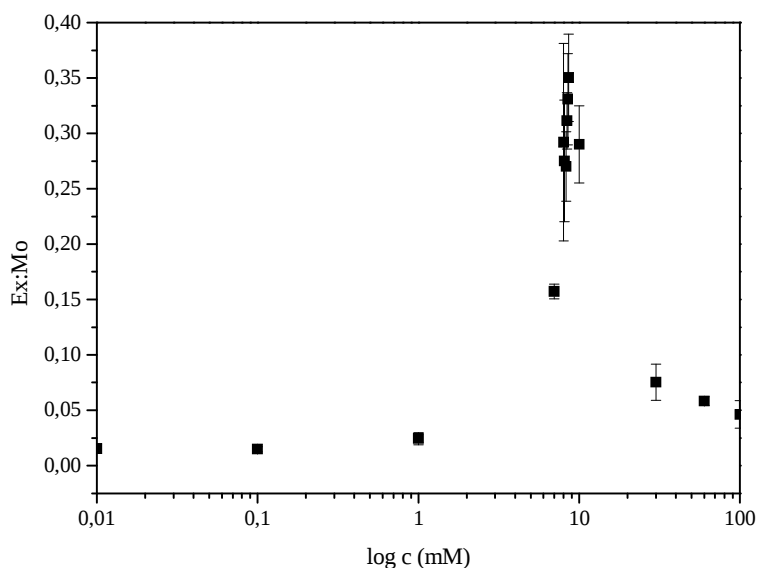
4.4.2 Vyhodnocení výsledků v programu OriginPro 8.1

K vyhodnocení veškerých dat byl použit program OriginPro 8.1 a jeho analytické funkce (fitování). Ve všech případech byly vytvořeny následující grafy, které poukazují na hodnotu CMC. Jako příklady jsou použity grafy pro měření anionaktivního tensidu SDS s pyrenem o koncentraci 10^{-5} M.



Obr. 13: Závislost $EmPI$ na logaritmu koncentrace tensidu s chybovými úsečkami

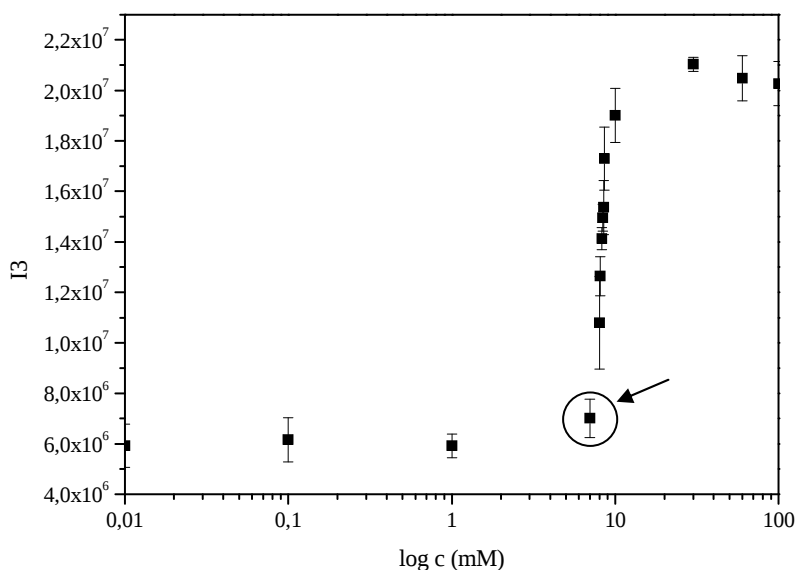
Obrázek 13 popisuje závislost emisního polaritního indexu na logaritmu koncentrace tensidu. Výsledkem tohoto měření je sigmoidní křivka. Tento graf byl získán proložení (fitováním) dat v programu OriginPro 8.1 po nastavení všech fitovacích parametrů tak, aby byla získaná data proložena sigmoidní Boltzmannovou křivkou, popsanou výše zmíněnou rovnicí (3). Dále bylo proložení dat nastaveno tak, aby byla zobrazena dolní a horní mez spolehlivosti (s hladinou významnosti 95 %) – v grafech zelenou čarou. Z této rovnice byl vybrán parametr x_0 , který odpovídá hodnotě CMC.



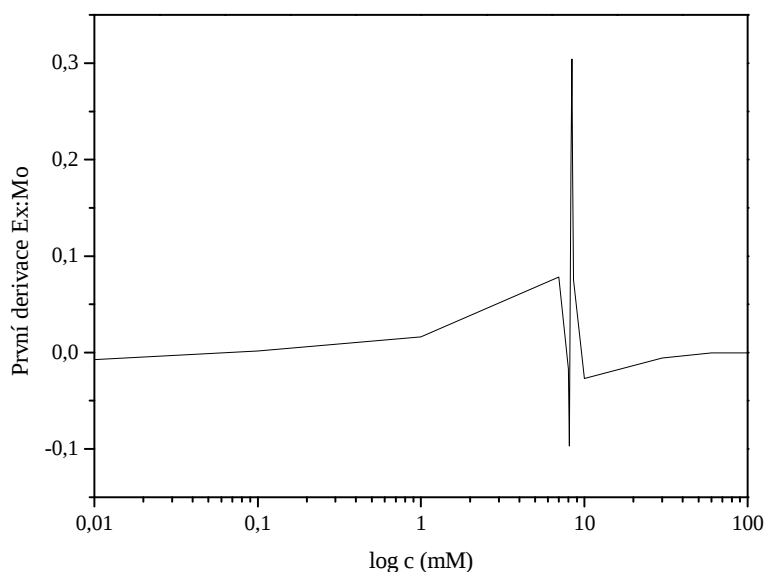
Obr. 14: Tvorba excimeru v systému

Další možností, která poukazuje na přibližnou hodnotu CMC je znázorněna v *Obrázku 14*, představuje tvorbu excimeru v systému. Jedná se o závislost Ex:Mo na logaritmu koncentrace. Maximum této křivky udává přibližnou hodnotu CMC.

Dále byl vždy vytvořen graf závislosti intenzity třetího vibračního pásu na logaritmu koncentrace tenzidu (*Obr. 15*). Na polaritě okolí sondy je závislé pouze první maximum, tudíž třetí maximum by nemělo vykazovat změny v závislosti na polaritě okolí dané sondy. Otázkou ale je, zda hodnota CMC je také inflexním bodem této rostoucí sigmoidní křivky, nebo zda za bod CMC lze považovat koncentraci, při které dochází k prvnímu nárůstu intenzity na křivce. Dle zjištěné hodnoty CMC (viz první měření) a porovnání této hodnoty s *Obrázkem 15* se pravděpodobně jedná o bod, vykazující první růst sigmoidní křivky.



Obr. 15: Závislost intenzity třetího maxima na logaritmu koncentrace tenzidu



Obr. 16: Závislost první derivace Ex:Mo na logaritmu koncentrace tenzidu

Obrázek 16 znázorňuje závislost první derivace na logaritmu koncentrace tenzidu. První derivace obecně poukazuje na lokální extrémy dané funkce. V našem případě ukazuje maxima a minima dané závislosti. Inflexní bod mezi těmito lokálními extrémy opět poukazuje na hodnotu CMC.

4.4.3 Stanovení chyby měření

Všechna měření byla prováděna třikrát. Hodnoty získané z těchto měření byly vždy zprůměrovány v programu MS Excel. Ke všem naměřeným bodům byla spočtena směrodatná odchylka pomocí funkce SMODCH.VÝBĚR v programu MS Excel. V grafech byly směrodatné odchylky vyjádřeny chybovými úsečkami.

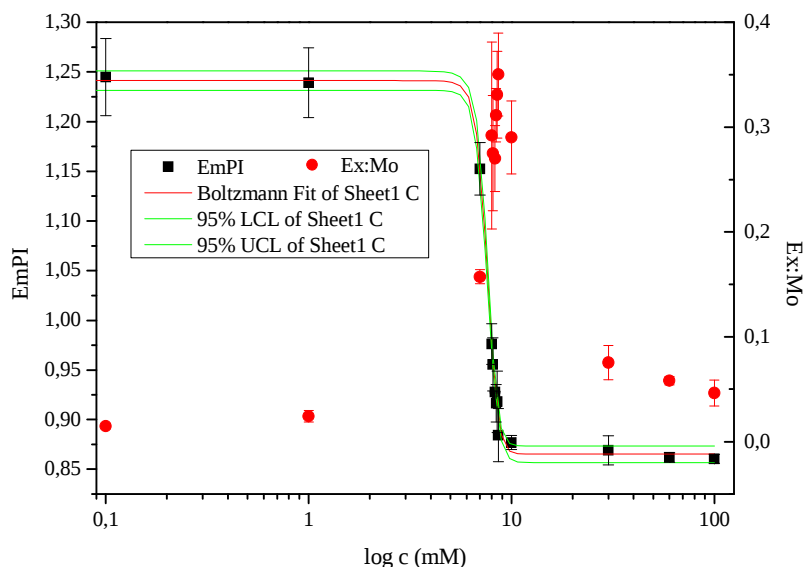
5 VÝSLEDKY A DISKUZE

Pro zjištění, zda koncentrace fluorescenční sondy, konkrétně pyrenu, ovlivňuje hodnotu kritické micelární koncentrace (CMC), bylo navrženo měření zástupců všech druhů tensidů (anionaktivního, kationaktivního a neionogenního) s pyrenem o třech různých koncentracích (10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} M). Vyhodnocení naměřených dat bylo provedeno vždy stejným způsobem.

5.1 Měření kritické micelární koncentrace anionaktivního tensidu s pyrenem

Jako anionaktivní tensid byl zvolen dodecylsulfát sodný. Pro všechna měření s tímto tensidem byla použita jedna koncentrační řada tensidu v rozsahu 0,01 – 100 mM. Následně pro ověření lineární závislosti naměřených hodnot byl použit dodecylbensensulfát sodný s koncentrační řadou v rozsahu 0,1 – 10 mM.

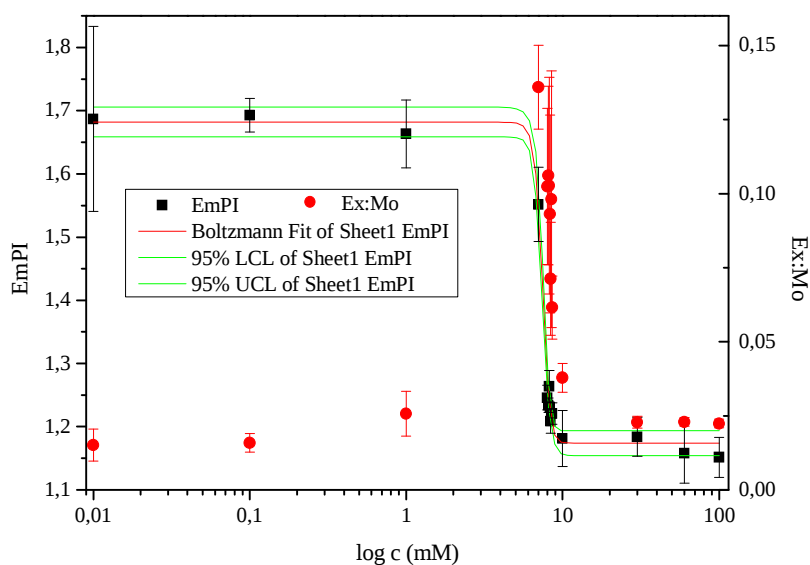
5.1.1 Měření kritické micelární koncentrace SDS s pyrenem o koncentraci 10^{-5} M



Obr. 17: Závislost $EmPI$ a $Ex:Mo$ na logaritmu koncentrace tensidu

Obrázek 17 znázorňuje graf závislosti $EmPI$ na logaritmu koncentrace tensidu, dále také závislost tvorby excimeru ($Ex:Mo$) na logaritmu koncentrace tensidu. Závislost $Ex:Mo$ na logaritmu koncentrace tensidu slouží pro ověření této CMC. Za přibližnou hodnotu CMC se považuje maximum této křivky; tato závislost je samostatně znázorněna v Obrázku 14. Hodnota CMC byla stanovena na $7,56 \pm 0,04$ mM.

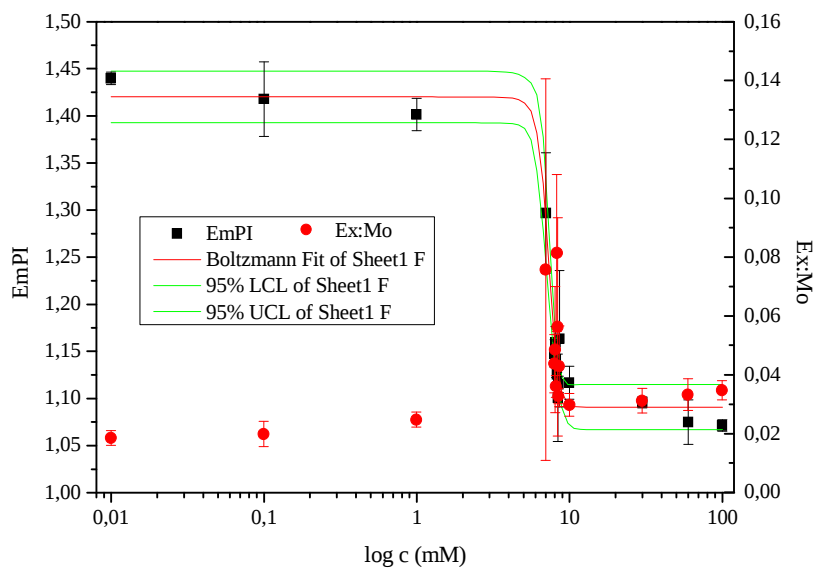
5.1.2 Měření kritické micelární koncentrace SDS s pyrenem o koncentraci 10^{-6} M



Obr. 18: Závislost $EmPI$ a $Ex:Mo$ na logaritmu koncentrace tenzidu

Obrázek 18 znázorňuje závislost $EmPI$ a $Ex:Mo$ na logaritmu koncentrace tenzidu. V tomto případě byla zjištěna kritická micelární koncentrace $7,41 \pm 0,06$ mM. Tato hodnota byla ověřena pomocí tvorby excimeru v systému.

5.1.3 Měření kritické micelární koncentrace SDS s pyrenem o koncentraci 10^{-7} M



Obr. 19: Závislost $EmPI$ a $Ex:Mo$ na logaritmu koncentrace tenzidu

Ze sigmoidní Boltzmannovy křivky (Obr. 19) byl zjištěn parametr x_0 , hodnota kritické micelární koncentrace tedy byla stanovena na $7,26 \pm 0,14$ mM.

5.1.4 Hodnocení výsledků měření

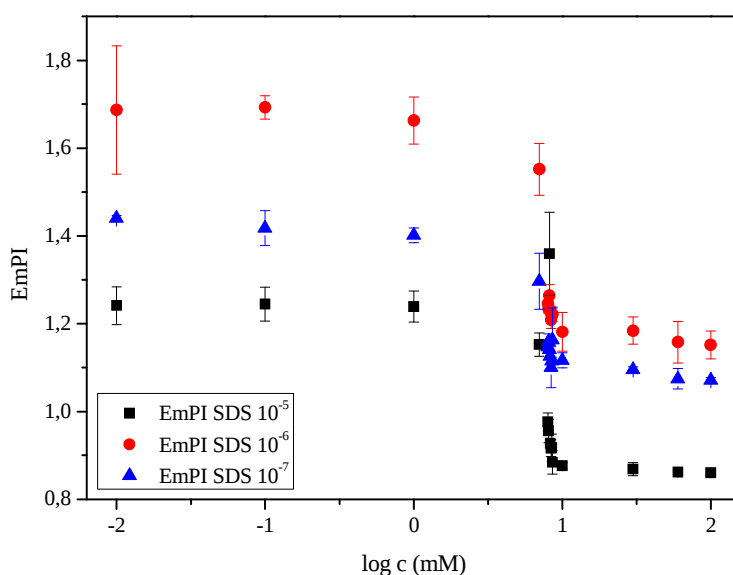
V Tabulce 5 jsou uvedeny získané hodnoty kritických micelárních koncentrací SDS pro všechny měřené koncentrace pyrenu.

Tabulka 5: Získané hodnoty CMC pro různé koncentrace pyrenu

Koncentrace pyrenu (M)	Hodnota CMC (mM)
10^{-5}	$7,56 \pm 0,04$
10^{-6}	$7,41 \pm 0,06$
10^{-7}	$7,26 \pm 0,14$

Při porovnání jednotlivých grafů pro měření s pyrenem o koncentraci 10^{-5} M a pro měření s pyrenem o koncentracích 10^{-6} a 10^{-7} M, byly zjištěny odlišnosti jak v jednotlivých grafech, tak v samotné hodnotě CMC.

Změna byla pozorována také v tom, jak různě začínají samotné závislosti EmPI na logaritmu koncentrace tenzidu. Odlišnosti v těchto hodnotách ukazuje Obrázek 20.



Obr. 20: Závislost EmPI na logaritmu koncentrace pro všechny koncentrace pyrenu

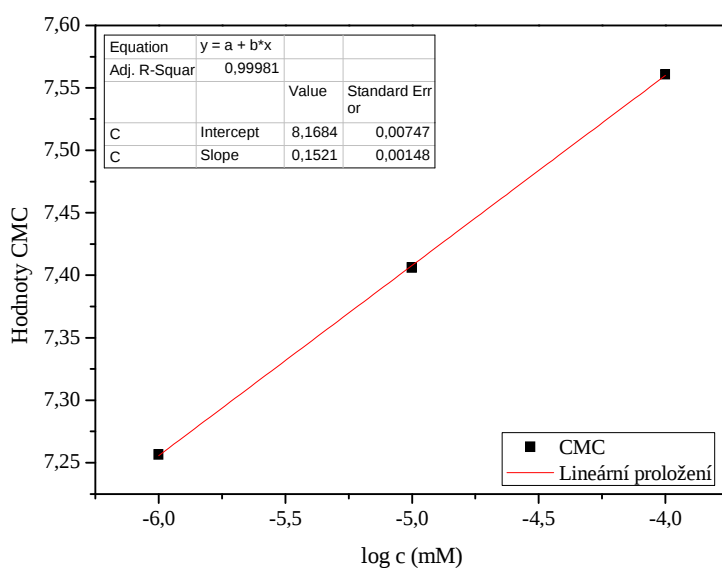
Nejzajímavější v tomto obrázku je, že křivka odpovídající pyrenu o koncentraci 10^{-5} M (černou barvou) se nachází pod křivkami značící pyren s nižší koncentrací. Předpokládala bych, že by se tato křivka měla nacházet u nejvyšších hodnot EmPI, protože při nejnižší koncentraci pyrenu (10^{-7} M – modrou barvou) by měla být potlačena jeho emise z vody – hodnota EmPI by měla být nejmenší, a naopak. Dále je zajímavá také hodnota EmPI pro konec křivky (pyren o koncentraci 10^{-5} M). Jako jediná ze tří uvedených křivek se nepřibližuje k hodnotě přibližně 1,1; konec této křivky se nachází u hodnoty 0,9.

Mohlo by se jednat o zhydrolyzování SDS. Vzorčky mezi namícháním a měřením stály zhruba 24 hodin.

Tento jev však pravděpodobně nijak neovlivňuje samotnou hodnotu kritické micelární koncentrace, což je pro mou práci podstatné.

Z Tabulky 5 je zřejmé, že se snižující se koncentrací pyrenu se také snižovala hodnota kritické micelární koncentrace tenzidu.

Hodnoty CMC byly vyneseny do grafu v závislosti na logaritmu koncentrace pyrenu (Obr. 21). Překvapivá byla především hodnota spolehlivosti $R^2 = 0,999$. Rovnice přímky v tomto případě byla $y = 0,152x + 8,168$.



Obr. 21: Závislost hodnoty CMC na logaritmu koncentrace pyrenu

Lze tedy říci, že byla pozorována lineární závislost mezi hodnotou CMC anionaktivního tenzidu a koncentrací fluorescenční sondy (pyrenem).

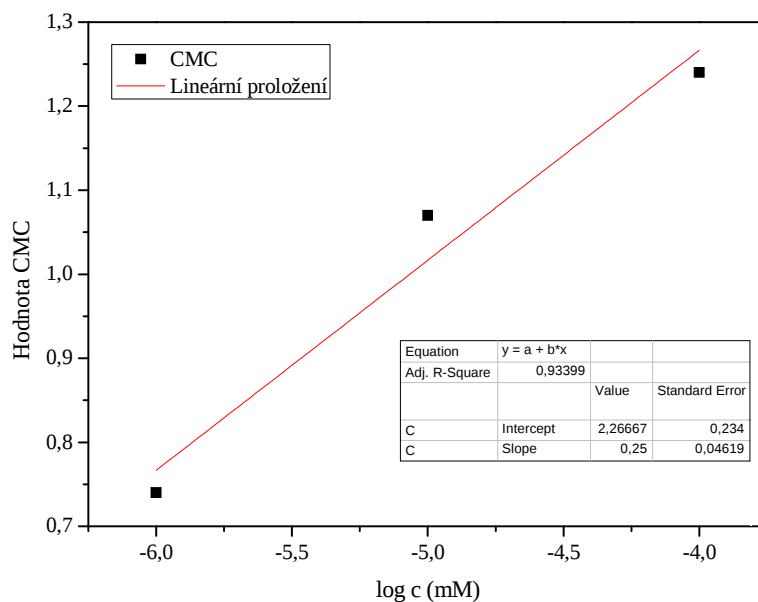
Pro potvrzení naměřených výsledků s SDS byl proměřen ještě jeden anionaktivní tenzid, konkrétně dodecylbenzensulfát sodný (SDBS). Výsledky měření s tímto tenzidem jsou uvedeny v tabulce 6.

Tabulka 6: Získané hodnoty CMC pro různé koncentrace pyrenu

Koncentrace pyrenu (M)	Hodnota CMC (mM)
10^{-5}	$1,51 \pm 0,08$
10^{-6}	$1,07 \pm 0,08$
10^{-7}	$0,74 \pm 0,02$

Tímto měřením byla potvrzena závislost hodnoty CMC anionaktivního tenzidu na koncentraci fluorescenční sondy. Také v tomto případě se s klesající koncentrací pyrenu

snižovala hodnota CMC příslušného tenzidu. Hodnoty CMC v závislosti na logaritmu koncentrace byly vyneseny do grafu. Tuto závislost lze vidět na *Obrázku 22*.



Obr. 22: Závislost hodnoty CMC na logaritmu koncentrace pyrenu

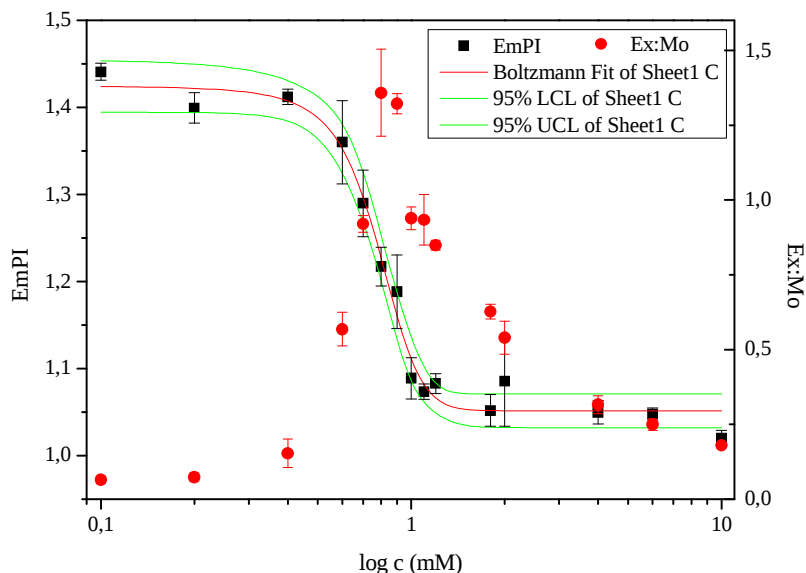
Z tohoto grafu byla určena rovnice přímky $y = 0,25x + 2,267$. Hodnota spolehlivosti $R^2 = 0,934$.

Veškeré naměřené hodnoty se nacházely v rozmezí dolní a horní hranice spolehlivosti (s hladinou významnosti 95 %). Lze tedy říci, že s 95 % spolehlivostí měla naměřená data sigmoidní tvar a dala se proložit Boltzmannovou sigmoidní křivkou.

5.2 Měření kritické micelární koncentrace kationaktivního tenzidu s pyrenem

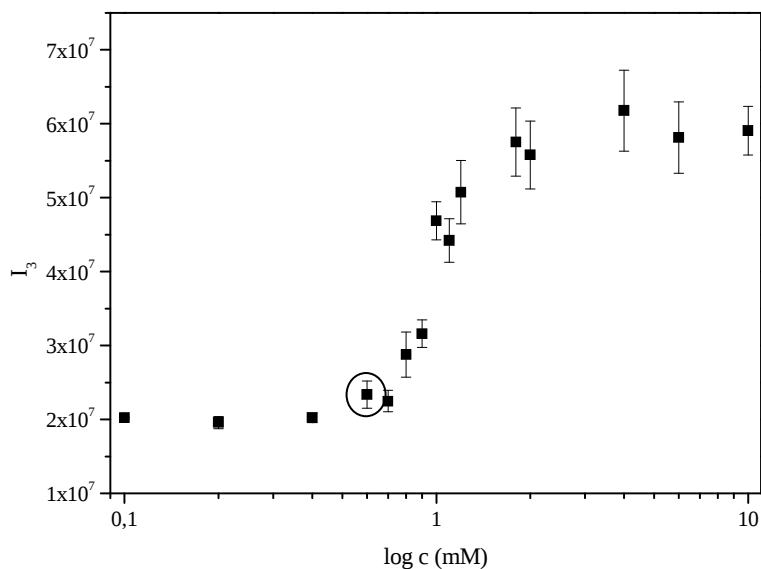
5.2.1 Měření kritické micelární koncentrace CTAB s pyrenem o koncentraci 10^{-5} M

Koncentrační řada CTAB byla v rozsahu 0,1 – 10 mM. Hodnota kritické micelární koncentrace byla stanovena na $0,78 \pm 0,02$ mM. Do grafu byly vyneseny hodnoty EmPI a Ex:Mo v závislosti na logaritmu koncentrace tenzidu (Obr. 23).



Obr. 23: Závislost EmPI a Ex:Mo na logaritmu koncentrace tenzidu

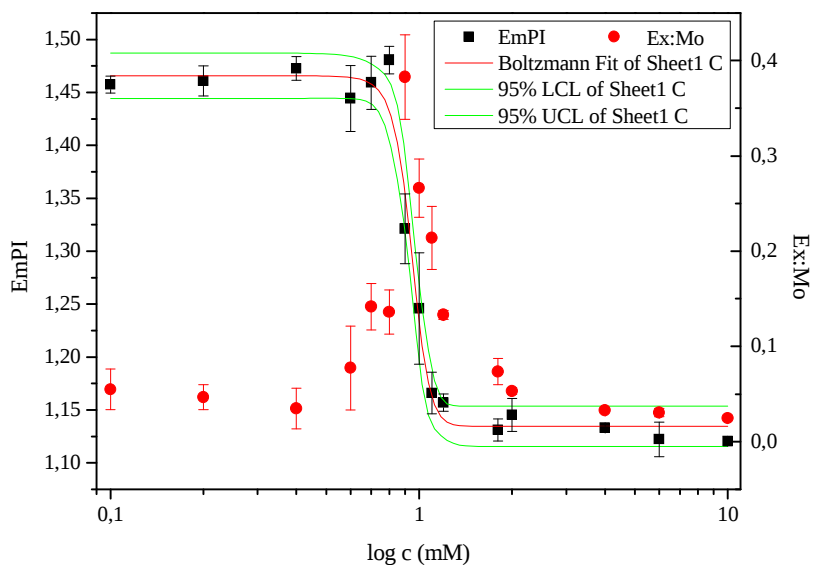
Z Obrázku 24, ve kterém vidíme závislost intenzity třetího vibračního pásu pyrenu na logaritmu koncentrace tenzidu, je patrné, že se v systému něco dělo již u bodu, který odpovídá koncentraci CTAB 0,6 mM. Vzhledem k velikosti chybových úseček v této oblasti předpokládám, že se v systému pravděpodobně začínaly tvořit pre-micelární útvary.



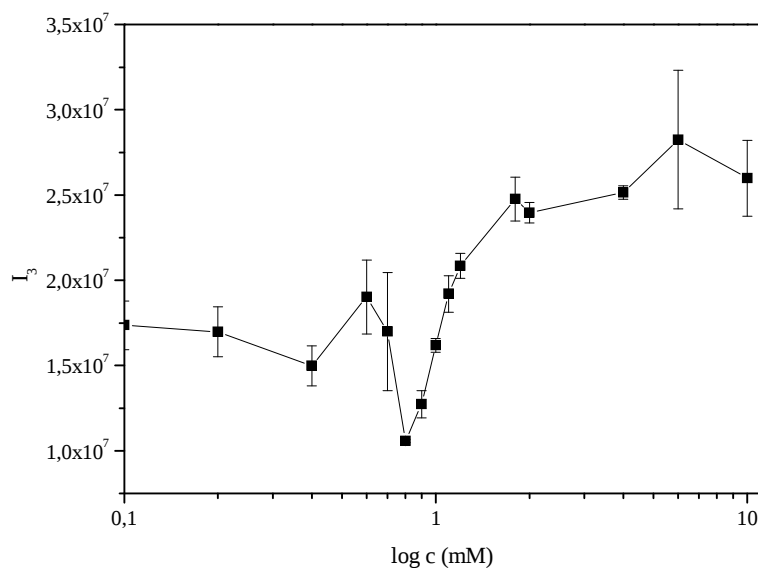
Obr. 24: Závislost intenzity třetího maxima na logaritmu koncentrace tenzidu

5.2.2 Měření kritické micelární koncentrace CTAB s pyrenem o koncentraci 10^{-6} M

Parametr x_0 byl odečten ze sigmoidní Boltzmannovy křivky (Obr. 25) a hodnota CMC byla následně stanovena na $0,94 \pm 0,01$ mM.



Obr. 25: Závislost $EmPI$ a $Ex:Mo$ na logaritmu koncentrace tenzidu

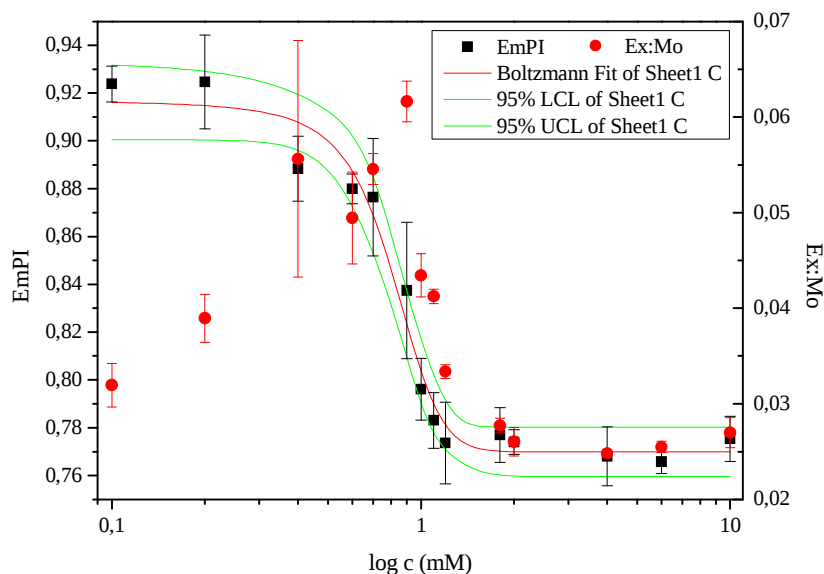


Obr. 26: Závislost intenzity třetího maxima na logaritmu koncentrace tenzidu

V Obrázku 26 je patrný prudký pokles intenzity fluorescence a to u bodu, který značí koncentraci tenzidu 0,8 mM. Jedná se pravděpodobně o zhášení fluorescence tvorbou excimeru v systému.

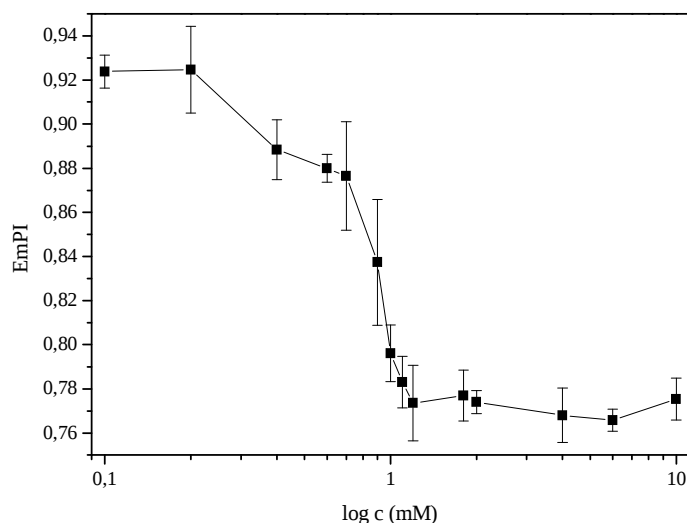
5.2.3 Měření kritické micelární koncentrace CTAB s pyrenem o koncentraci 10^{-7} M

Byla odečtena hodnota CMC $0,81 \pm 0,04$ mM. Závislost emisního polaritního indexu a Ex:Mo na logaritmu koncentrace je znázorněna v Obrázku 27.



Obr. 27: Závislost emisního polaritního indexu na logaritmu koncentrace tenzidu

Body byly následně vyneseny do grafu bez proložení dat sigmoidní Boltzmannovou křivkou (Obr. 28).

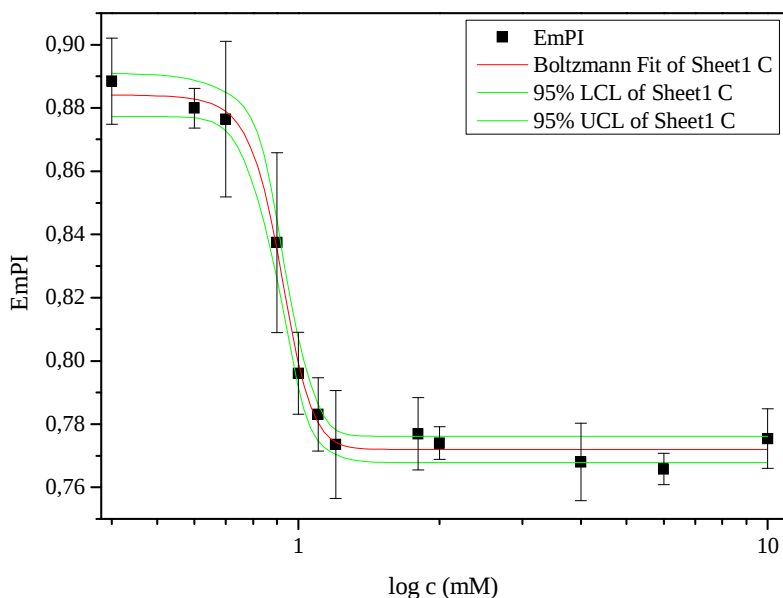


Obr. 28: Závislost EmPI na logaritmu koncentrace tenzidu

Z Obrázku 28 je patrné, že došlo k naměření dvouzlomové sigmoidní křivky. Při pohledu na hodnotu EmPI v počátku této dvouzlomové křivky bylo zjištěno, že hodnota se pohybuje okolo 0,92. V případě tak nízké hodnoty EmPI to pravděpodobně znamená, že v systému již byly vytvořeny nějaké agregáty. V systému se nacházelo na jednu molekulu pyrenu tisíc molekul tenzidu, tudíž nemohl být problém se samotnou agregací vzorku. Pravděpodobně se v tomto případě jednalo o nějaký typ fázové přeměny v systému.

Dvouzlomová sigmoidní křivka byla získána díky nízké koncentraci pyrenu; při velmi nízkých koncentracích pyrenu by měla být potlačena jeho emise z vody.

Aby byla hodnota CMC přesnější, byl vytvořen nový graf, ve kterém byl z prokládání sigmoidní Boltzmannovou křivkou vynechán první zlom (Obr. 29). Z tohoto proložení byl odečten parametr x_0 ; hodnota CMC byla $0,92 \pm 0,01$ mM.



Obr. 29: Závislost $EmPI$ na logaritmu koncentrace tenzidu při vynechání prvních dvou naměřených hodnot

5.2.4 Hodnocení výsledků měření

V Tabulce 7 jsou uvedeny získané hodnoty kritických micelárních koncentrací CTAB pro všechny měřené koncentrace pyrenu.

Tabulka 7: Získané hodnoty CMC pro různé koncentrace pyrenu

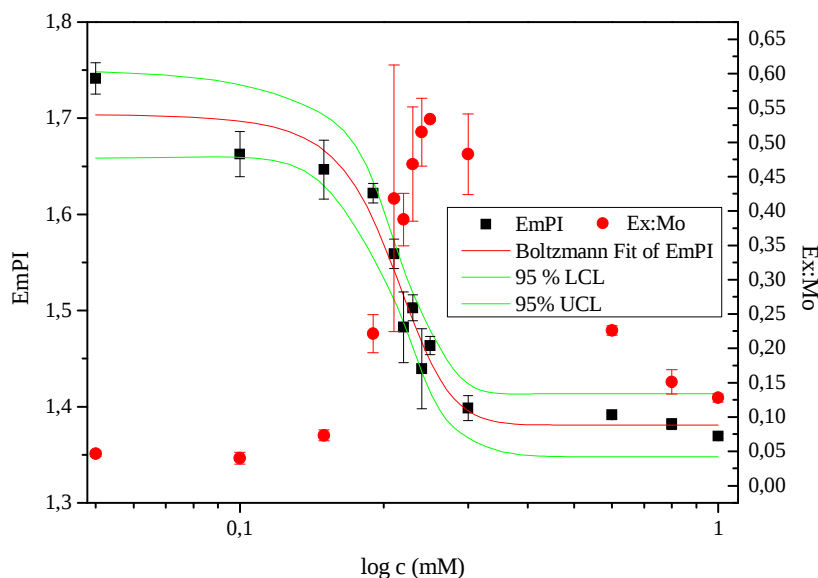
Koncentrace pyrenu (M)	Hodnota CMC (mM)
10^{-5}	$0,78 \pm 0,02$
10^{-6}	$0,94 \pm 0,01$
10^{-7}	$0,92 \pm 0,01$

Při porovnání daných výsledků je patrné, že se výrazně odlišuje hodnota CMC při měření s pyrenem o koncentraci 10^{-5} M. Celkově se dá ale říci, že koncentrace pyrenu hodnotu CMC kationaktivního tenzidu neovlivňuje.

5.3 Měření kritické micelární koncentrace neionogenního tenzidu s pyrenem

Jako neionogenní tenzid byl zvolen v této práci polyoxyetylen(9,5)oktylfenol (TRITON X–100). Koncentrační řada pro tento tenzid byla v rozsahu 0,05 – 0,5 mM.

5.3.1 Měření CMC TRITONu X–100 s pyrenem o koncentraci 10^{-5} M



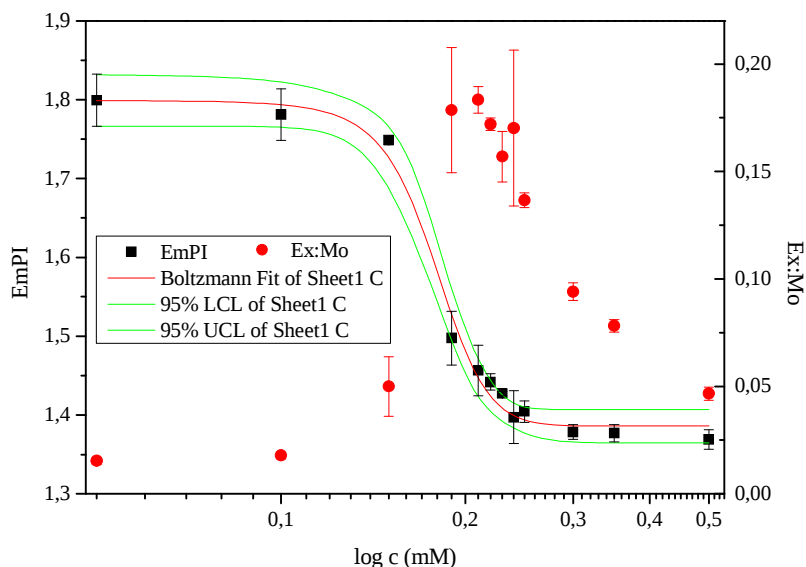
Obr. 30: Znázornění závislosti $EmPI$ a $Ex:Mo$ na logaritmu koncentrace tenzidu

V tomto případě koncentrace pyrenu bylo nutné zvětšit rozsah koncentrační řady tenzidu a to na 0,05 až 1,0 mM (Obr. 30). Hodnota CMC byla $0,210 \pm 0,007$ mM.

Z Obrázku 30 je patrná velmi široká závislost $Ex:Mo$ a to téměř v celém koncentračním rozsahu. S přidavkem dalšího tenzidu se pravděpodobně netvořily další micely. V systému tedy bylo velmi málo micel, ve kterých by se pyren mohl solubilizovat.

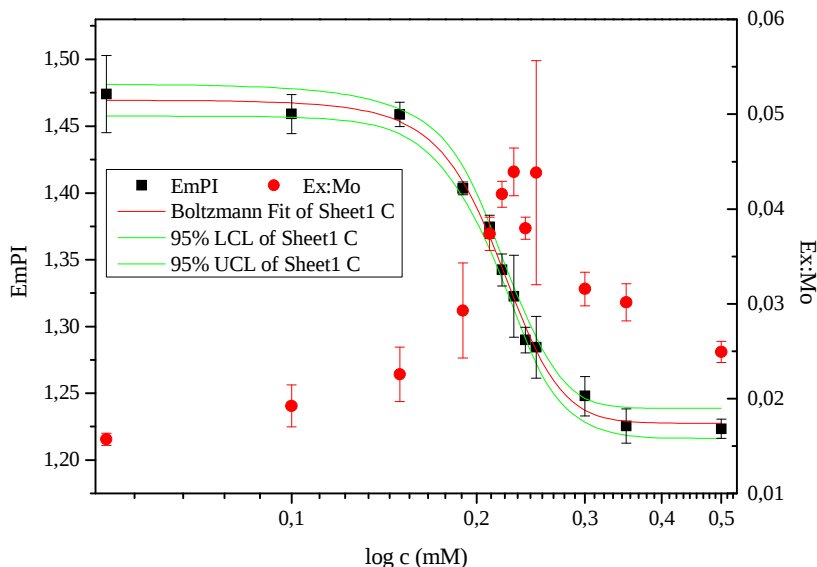
5.3.2 Měření CMC TRITONu X-100 s pyrenem o koncentraci 10^{-6} M

Obrázek 31 znázorňuje průběh závislosti EmPI a Ex:Mo na logaritmu koncentrace tensidu. V tomto měření byla hodnota CMC stanovena na $0,178 \pm 0,004$ mM.



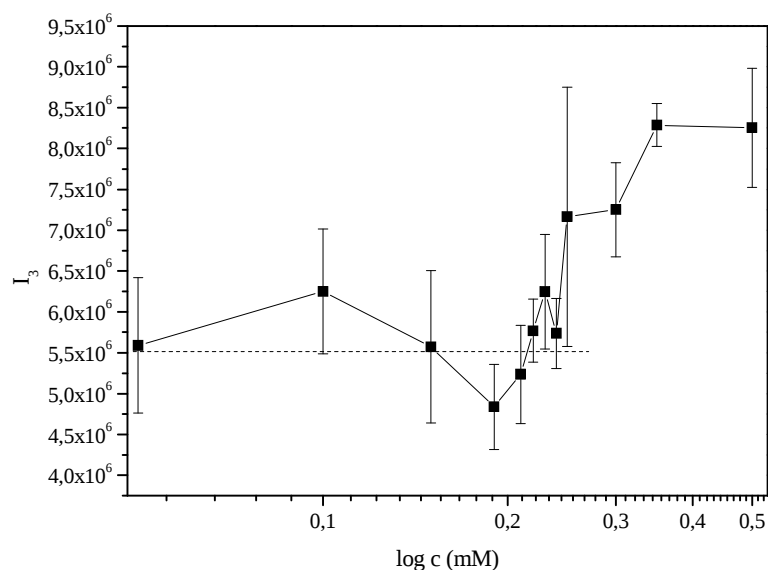
Obr. 31: Znázornění závislosti EmPI a Ex:Mo na logaritmu koncentrace tensidu

5.3.3 Měření CMC TRITONu X-100 s pyrenem o koncentraci 10^{-7} M



Obr. 32: Závislost EmPI a Ex:Mo na logaritmu koncentrace tensidu

Závislost EmPI na logaritmu koncentrace pro toto měření je znázorněno na Obrázku 32, kde je také znázorněna tvorba excimeru. Byl zjištěn parametr x_0 a tím i hodnota CMC $0,218 \pm 0,002$ mM.



Obr. 33: Závislost třetího maxima na logaritmu koncentrace tenzidu

V Obrázku 33 je patrný náhlý propad intenzity fluorescence s minimem v bodě, odpovídajícím koncentraci tenzidu 0,19 mM. Pokud se však podíváme na velikost chybových úseček, je patrné, že s přihlédnutím na tyto úsečky by se mezi prvními osmi body dalo najít téměř lineární proložení (v obrázku znázorněno čárkovanou čarou), tento propad fluorescence tedy nebyl brán v potaz.

5.3.4 Hodnocení výsledků měření

V tabulce 8 jsou uvedeny získané hodnoty kritických micelárních koncentrací TRITONu X-100 pro všechny měřené koncentrace pyrenu.

Tabulka 8: hodnoty CMC pro různé koncentrace pyrenu

Koncentrace pyrenu (M)	Hodnota CMC (mM)
10^{-5}	$0,210 \pm 0,007$
10^{-6}	$0,178 \pm 0,004$
10^{-7}	$0,218 \pm 0,002$

Při porovnání daných výsledků je patrné, že se výrazněji odlišuje hodnota CMC při měření s pyrenem o koncentraci 10^{-6} M. Výsledné hodnoty u ostatních koncentrací pyrenu (10^{-5} a 10^{-7} M) jsou si dosti podobné. O neionogenním tenzidu lze tedy říci, že neexistuje žádná závislost mezi koncentrací fluorescenční sondy a samotnou hodnotou CMC neionogenního tenzidu.

Veškeré naměřené hodnoty se nacházely v rozmezí dolní a horní hranice spolehlivosti (s hladinou významnosti 95 %).

6 ZÁVĚR

Cílem této práce bylo zpracovat literární rešerši s tematikou stanovení agregčních koncentrací tenzidů pomocí fluorescenčních sond a na základě této rešerše navrhnout koncentrační rozsah použité sondy pyrenu a zvolit vhodný typ asociativního koloidu k dalšímu studiu. Dále bylo cílem zjistit kritickou micelární koncentraci asociativního koloidu v roztoku s různým obsahem fluorescenční sondy (v mém případě pyrenu), a na základě získaných dat zhodnotit závislost agregční koncentrace pro různé asociativní koloidy na koncentraci fluorescenční sondy (pyrenu).

Pro měření byly zvoleny všechny druhy tenzidů. Zástupci anionaktivních tenzidů byly SDS a SDBS. Zástupcem kationaktivního tenzidu byl CTAB a neionogenního tenzidu TRITON X-100. Měření bylo prováděno s pyrenem o třech koncentračních řádech, konkrétně 10^{-5} , 10^{-6} a 10^{-7} M. Při měření s pyrenem bylo cílem získat Boltzmannovu sigmoidní křivku.

Tato sigmoidní křivka byla získána při vynesení dat závislosti $EmPI$ na logaritmu koncentrace daného tenzidu do grafu. Z této křivky byla následně odečtena hodnota kritické micelární koncentrace. Tímto způsobem byly zjištěny výsledky pro všechny měřené tenzidy, se všemi koncentracemi pyrenu.

Na základě naměřených výsledků fluorescenční spektroskopii v této práci bylo zjištěno, že existuje závislost mezi kritickou micelární koncentrací tenzidu a koncentrací fluorescenční sondy. Projevila se ale pouze u anionaktivních tenzidů, a to tak, že s rostoucí koncentrací fluorescenční sondy rostla také hodnota kritické micelární koncentrace (v obou případech anionaktivního tenzidu – SDS i SDBS). Žádná taková závislost nebyla pozorována u kationaktivního ani u neionogenního tenzidu.

V této bakalářské práci bylo dosaženo všech předepsaných cílů, a u anionaktivního tenzidu byla zjištěna lineární závislost kritické micelární koncentrace na logaritmu koncentrace fluorescenční sondy.

Další možností, jak dále zkoumat vliv fluorescenční sondy na kritickou micelární koncentraci daného tenzidu je například přidavek soli ($NaCl$, $NaBr$, NaI) do systému. Přídavkem aniontů (Cl^- , Br^- a I^-) do systému dochází ale k vnitřnímu filtračnímu efektu a tím ke zhášení fluorescence. Chloridové anionty by měly fluorescenci zhášet nejméně a jodidové naopak nejvíce. Přídavkem soli k ionogennímu tenzidu by se měla posunout kritická micelární koncentrace k nižším hodnotám. Cílem další práce by bylo zjistit, jak se bude celý systém chovat po přidavku soli, a zda zjištěná závislost mezi kritickou micelární koncentrací anionaktivního tenzidu a koncentrací fluorescenční sondy bude i nadále stejná, nebo se nějakým způsobem změní.

7 REFERENCE

- [1] Millar, D. P. Fluorescence studies of DNA and RNA structure and dynamics. *Current Opinion in Structural Biology*. 1996, 6, 3, s. 322-326.
- [2] Schneckenburger, H.; Seidlitz, H. K.; Eberz, J. New trends in photobiology: Time-resolved fluorescence in photobiology. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 1988, 2, 1, s. 1-19.
- [3] FIŠAR, Zdeněk. *FLUORESCENČNÍ SPEKTROSKOPIE V NEUROVĚDÁCH* [online]. Praha, 2009. Dostupné z: <http://www1.lf1.cuni.cz/~zfisar/fluorescence/Default.htm>
- [4] Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Springer, 2006. ISBN 0-387-31278-1.
- [5] Valeur, B. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*. Wiley-VCH Verlag GmbH, 2001. ISBN 3-527-29919-X.
- [6] MRAVEC, Filip. *Fluorescenční spektroskopie ve výzkumu koloidních a asociativních systémů*. 3. vyd. Brno, 2006.
- [7] SIGMA-ALDRICH. SIGMA-ALDRICH CO. LLC. [online]. [cit. 2012-03-25]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/czech-republic.html>
- [8] ŠÍMA, Jan. *Využití tenzidů v analytické chemii* [online]. Dostupné z: http://users.prf.jcu.cz/sima/vybrane_kapitoly/tenzidy_anal.htm
- [9] PETŘÍK, Milan. Éter a evoluční teorie 3 - fyzikální model evoluce. In: *Lidovky.cz* [online]. 16. listopad 2009 [cit. 2012-03-25]. Dostupné z: <http://petrik.bigblogger.lidovky.cz/c/110946/Eter-a-evolucni-teorie-3-fyzikalni-model-evoluce.html>
- [10] Bartovská Lidmila, Šišková Marie: *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav* [online]. Verze 1.0. Praha: VŠCHT Praha, 2005 [cit. 2012-04-19]. P. 190. Dostupné z: [www: <http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_isbn-80-7080-579-X/pages-pdf/190.html>](http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_isbn-80-7080-579-X/pages-pdf/190.html). ISBN 80-7080-579-X
- [11] Integrovaný registr znečišťování: Oktylfenoly a oktylfenol ethoxyláty. CENIA A MINISTERSTVO ŽITOVNÍHO PROSTŘEDÍ. [online]. [cit. 2012-04-18]. Dostupné z: <http://www.irz.cz/node/75>
- [12] AGUIAR, J., P. CARPENA, J.A. MOLINA-BOLÍVAR a C. CARNERO RUIZ. On the determination of the critical micelle concentration by the pyrene 1:3 ratio method. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2002, roč. 2003, č. 258, s. 116-122. Dostupné z: www.sciencedirect.com

- [13] CHAKRABORTY, Indranil, Gargi Basu RAY a Satya P. MOULIK. Pyrene absorption can be a convenient method for probing critical micellar concentration (cmc) and indexing micellar polarity. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2005, roč. 2006, č. 294, s. 248-254. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com>
- [14] MINGYAN, Yan, Li BAFANG a Zhao XUE. Determination of critical aggregation concentration and aggregation number of acid-soluble collagen from walleye pollock (*Theragra chalcogramma*) skin using the fluorescence probe pyrene. *Food Chemistry*. 2010, roč. 122, č. 4, 1333–1337. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com>
- [15] LIMIN, Zhai, Lu XIUHUI, Chen WENJUN, Hu CHANGBO a Zheng LIN. Interaction between spontaneously formed SDBS/CTAB vesicles and polymer studied by fluorescence method. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2004, roč. 236, 1-3, 1–5. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com>
- [16] TECHEN, Anne, Carsten HILLE, Carsten DOSCHE a Michael U. KUMKE. Fluorescence study of drug-carrier interactions in CTAB/PBS buffer model systems. *Journal of Colloid and Interface Science*. Available online 30 March 2012. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com>

8 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

PAL	povrchově aktivní látka
CMC	kritická micelární koncentrace
SDS	dodecylsulfát sodný
SDBS	dodecylbenzensulfát sodný
CTAB	cetyltrimethylamonium bromid
EmPI	poměr intenzit prvního a třetího vibračního pásu u pyrenu (I_1/I_3) emisní polaritní index
Ex:Mo	poměr intenzit excimeru a prvního vibračního pásu u pyrenu (I_{ex}/I_1)
PI	polaritní index
M	mol dm^{-3}