



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**DEPROTONACE V EXCITOVANÉM STAVU JAKO
METODIKA CHARAKTERIZACE KOLOIDNÍCH SYSTÉMŮ**

EXCITED-STATE PROTON TRANSFER AS A TOOL FOR CHARACTERIZATION OF COLOID PARTICLES

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Veronika Richterová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Jakub Mondek

BRNO 2016



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

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce: **FCH-BAK1045/2015** Akademický rok: **2015/2016**
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Student(ka): **Veronika Richterová**
Studijní program: Chemie a chemické technologie (B2801)
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace (2808R031)
Vedoucí práce **Ing. Jakub Mondek**
Konzultanti:

Název bakalářské práce:

Deprotonace v excitovaném stavu jako metodika charakterizace koloidních systémů

Zadání bakalářské práce:

1. Shromáždit literární poznatky o využití přenosu protonu v excitovaném stavu v koloidních systémech.
2. Seznámit se s měřením fluorescence sond podstupujících přenos protonu v excitovaném stavu.
3. Navrhnout a provést experimenty pro charakterizaci kritické micelární koncentrace tenzidů pomocí přenosu protonu v excitovaném stavu.
4. Zhodnotit výsledky ve vztahu ke známým sondám pro stanovení kritické micelární koncentrace.

Termín odevzdání bakalářské práce: 20.5.2016

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

Veronika Richterová
Student(ka)

Ing. Jakub Mondek
Vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2016

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce je zaměřena na studium přenosu protonu v excitovaném stavu v micelárních systémech. Nejprve byla stanovena kritická micelární koncentrace použitých tenzidů CTAB, SDS a Tritonu X-100. Dále byla měřena stacionární a časově rozlišená fluorescence sond podstupujících přenos protonu v excitovaném stavu s těmito tenzidy. Jako sondy byly použity 1-naftol, HPTS a 3HNA. Na základě měření časově rozlišené fluorescence byly stanoveny rychlostní konstanty deprotonace 1-naftolu a HPTS a průměrné doby života 3HNA. Stacionární fluorescencí těchto sond byly pozorovány změny intenzit jejich forem před a po dosažení kritické micelární koncentrace.

ABSTRACT

This bachelor thesis deals with the study of excited-state proton transfer in micellar systems. At first critical micelle concentration of surfactants CTAB, SDS and Triton X-100 was determined. Further the steady-state and time-resolved fluorescence of probes that undergo excited-state proton transfer with these surfactants was measured. As probes were chosen 1-naphthol, HPTS and 3HNA. Deprotonation rates of 1-naphthol and HPTS and average lifetime of 3HNA were calculated from time-resolved measurement. Steady-state fluorescence was used for observation surfactants influence on excited-state proton transfer.

KLÍČOVÁ SLOVA

Kritická micelární koncentrace, přenos protonu v excitovaném stavu, stacionární fluorescence, časově rozlišená fluorescence, CTAB, SDS, Triton X-100, pyren, 1-naftol, 3HNA, HPTS

KEY WORDS

Critical micelle concentration, excited-state proton transfer, steady-state fluorescence, time-resolved fluorescence, CTAB, SDS, Triton X-100, pyrene, 1-naphthol, 3HNA, HPTS

RICHTEROVÁ, V. *Deprotonace v excitovaném stavu jako metodika charakterizace koloidních systémů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016. 42 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Jakub Mondek.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. 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

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce Ing. Jakubu Mondekovi za jeho odborný dohled. Dále bych ráda poděkovala Ing. Filipu Mravcovi, PhD za jeho cenné rady a připomínky. Mé poděkování patří také mým nejbližším za jejich objetí v případech potřeby.

OBSAH

1	Úvod	7
2	Teoretická část	8
2.1	Micelární koloidy	8
2.1.1	Dělení povrchově aktivních látek	8
2.1.2	Struktura micel a obrácených (reverzních) micel	9
2.1.3	Kritická micelární koncentrace	10
2.2	Fluorescence	10
2.2.1	Jablonského diagram	10
2.2.2	Charakteristiky fluorescence	12
2.2.3	Stacionární a časově rozlišená fluorescence	12
2.2.4	Fluorescenční sondy	13
2.3	Přenos protonu v excitovaném stavu	13
2.3.1	Intramolekulární přenos protonu v excitovaném stavu	14
2.3.2	Sondy podléhající přenosu protonu v excitovaném stavu	14
3	Současný stav řešené problematiky	16
4	Experimentální část	18
4.1	Použité chemikálie	18
4.2	Přístroje a zařízení	18
4.2.1	Aminco Bowman Series 2	18
4.2.2	Fluorocube HORIBA Jobin Yvon	19
4.3	Příprava zásobních roztoků tenzidů	20
4.4	Příprava zásobních roztoků fluorescenčních sond	20
4.5	Příprava vzorků	20
4.6	Vlastní měření	21
4.6.1	Měření emisních spekter	21
4.6.2	Měření dob života	21
4.7	Vyhodnocení	22
4.7.1	Stanovení kritické micelární koncentrace	22
4.7.2	Stanovení rychlostních konstant	23
5	Výsledky a diskuze	24
5.1	Stanovení kritické micelární koncentrace tenzidů pomocí pyrenu	24
5.2	Měření stacionární a časově rozlišené fluorescence 1-naftolu	25

5.2.1	Stacionární fluorescence 1-naftolu	25
5.2.2	Časově rozlišená fluorescence 1-naftolu	27
5.3	Měření stacionární a časově rozlišené fluorescence HPTS	28
5.3.1	Stacionární fluorescence HPTS	28
5.3.2	Časově rozlišená fluorescence HPTS	29
5.4	Měření stacionární a časově rozlišené fluorescence 3HNA.....	30
5.4.1	Stacionární fluorescence 3HNA	30
5.4.2	Časově rozlišená fluorescence 3HNA	32
6	Závěr.....	34
7	Seznam použitých zdrojů	36
8	Seznam použitých zkratk a symbolů	38
9	Přílohy	39

1 ÚVOD

Povrchově aktivní látky jsou všude kolem nás. Setkáváme se s nimi denně v běžném životě, ať už jako součástí kosmetických výrobků, čisticích prostředků, díky antibakteriálním vlastnostem některých tenzidů se využívají jako antiseptika nebo nacházejí své využití v medicíně, kde zastávají funkci nosičů léčiv. Toto praktické využití je podmíněno jejich základními vlastnostmi a schopnosti, kterými jsou emulgace, smáčení nebo snižování povrchového napětí.

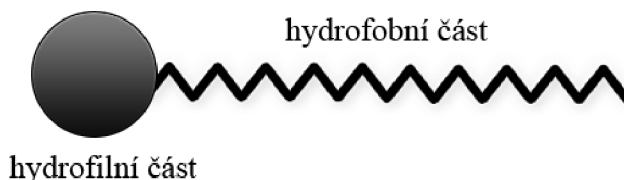
Většina těchto vlastností a praktických aplikací souvisí se schopností tenzidů (povrchově aktivních látek) asociovat se v koloidní částice, micely, a to po dosažení tzv. kritické micelární koncentrace.

Hodnotu kritické micelární koncentrace lze stanovit více způsoby, mezi které patří i stanovení na základě měření fluorescence, přičemž je možné namísto běžných sond, kam se řadí např. pyren, využít i sondy, které podléhají přenosu protonu v excitovaném stavu, mezi které patří např. 1-naftol.

2 TEORIETICKÁ ČÁST

2.1 Micelární koloidy

Koloidní systémy jsou heterogenní soustavy tvořené disperzním prostředím a dispergovanou fází. Touto fází jsou zde povrchově aktivní látky, nazývané také tenzidy nebo surfaktanty, jejichž struktura je zobrazena na Obr. 1.



Obr. 1 Struktura PAL

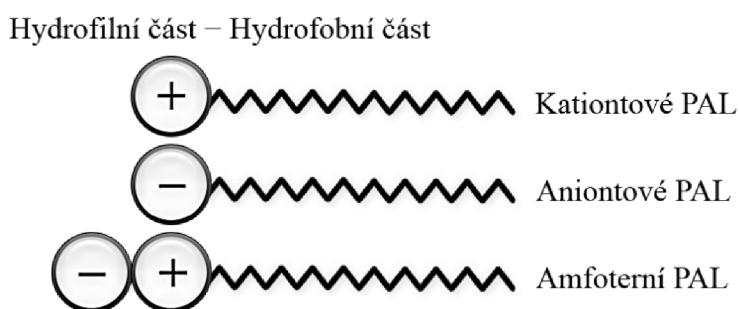
Povrchově aktivní látky (dále PAL) jsou látky amfifilní struktury, tvořené lyofilní a lyofobní částí. Lyofilní (často hydrofilní) část tvoří tzv. „hlavu“ molekuly a také se vyznačuje poměrně vysokou afinitou k rozpouštědлу. Lyofobní (často hydrofobní) část tvoří pak tzv. „ocas“ molekuly, který v daném prostředí rozpustný není.

U povrchově aktivních látek rozpustných ve vodě silně hydrofilní polární skupina zajišťuje rozpustnost ve vodě a uhlovodíkový řetězec, představující silně hydrofobní nepolární skupinu, je důvodem asociace těchto látek v micely.

2.1.1 Dělení povrchově aktivních látek

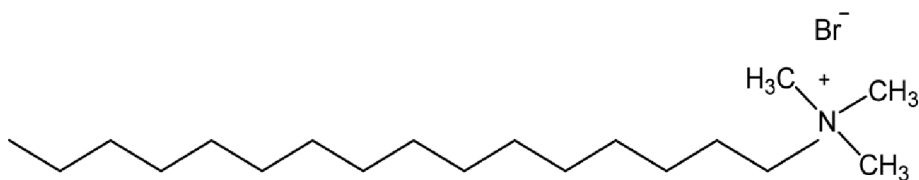
Povrchově aktivní látky se dělí podle jejich schopnosti disociace ve vodném prostředí na iontové (nabitě, ionogenní), které jsou schopné disociovat, a neiontové (nenabitě, neionogenní), které disociace schopné nejsou.

Iontové PAL se dále dělí na kationtové, které ve vodném prostředí nesou kladný náboj, aniontové, které ve vodném prostředí nesou náboj záporný, a amfoterní nesoucí oba náboje. Strukturu PAL s nábojem znázorňuje Obr. 2.

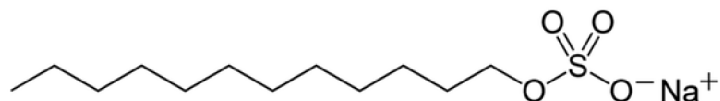


Obr. 2 PAL s nábojem

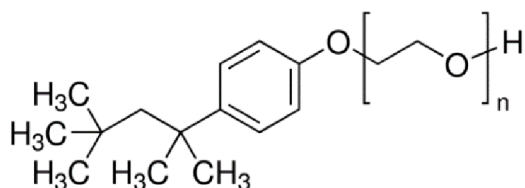
Příkladem kationtových PAL je *cetyltrimethylamonium bromid* (CTAB, viz Obr. 3), mezi aniontové tenzidy se řadí *dodecylsulfát sodný* (SDS, viz Obr. 4) a příkladem neiontových PAL může být *4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)fenyl-polyethylen glykol* (Triton X-100, viz Obr. 5).



Obr. 3 Kationtový tenzid – CTAB



Obr. 4 Aniontový tenzid – SDS

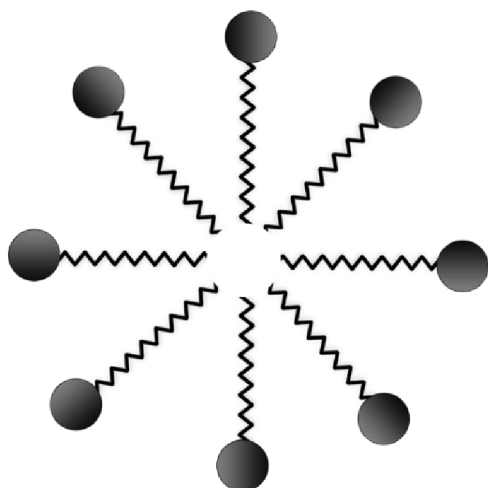


Obr. 5 Neiontový tenzid – Triton X-100

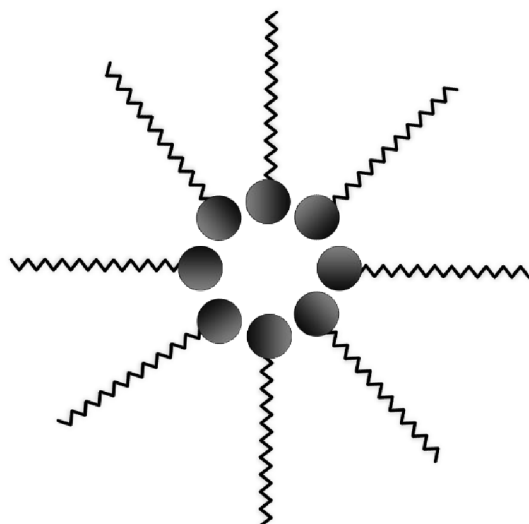
2.1.2 Struktura micel a obrácených (reverzních) micel

Ve vodném (polárním) prostředí micely zaujmají takovou orientaci, aby bylo co nejvíce zamezeno styku hydrofobní části s rozpouštědlem (vodou). Hydrofobní nepolární uhlovodíkové řetězce PAL se orientují k sobě a tvoří tak „jádro“ micely, zatímco hydrofilní polární hlava je orientována ven. Strukturu micely znázorňuje Obr. 6.

Pokud je rozpouštědlem jiná látka než polární, pak jsou nepolární uhlovodíkové konce směřovány ven směrem k tomuto nepolárnímu rozpouštědлу, a polární hlavy jsou orientovány dovnitř, kde tvoří „jádro“ micely. Uspořádání obrácené (reverzní) micely zobrazuje Obr. 7.



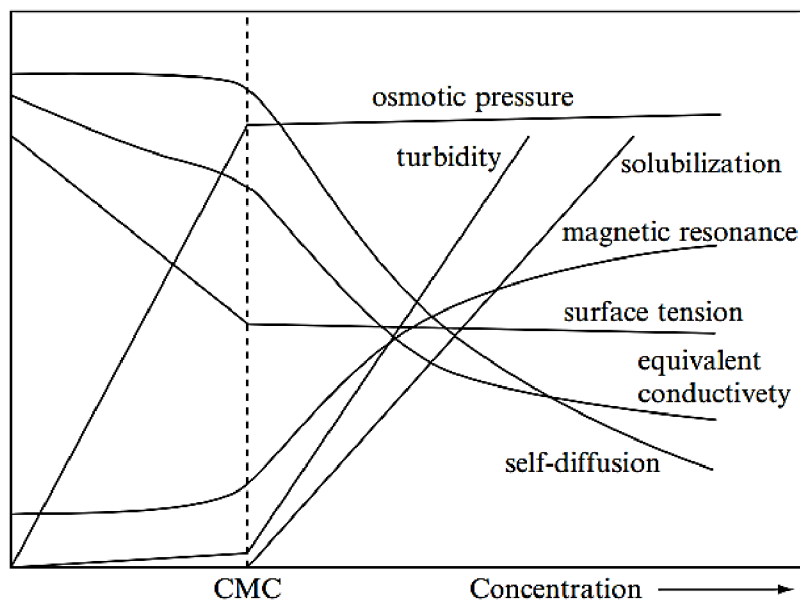
Obr. 6 Struktura micely



Obr. 7 Struktura obrácené micely

2.1.3 Kritická micelární koncentrace

Poměrně nízká koncentrace, při které se v pravém roztoku micelárního koloidu začínají asociovat PAL v micely, se nazývá kritická micelární koncentrace (CMC) a je jednou ze základních charakteristik micelárních koloidů. Pokud je hodnota koncentrace PAL nižší než hodnota kritické micelární koncentrace, látky v roztoku existují jako unimerní molekuly, ovšem po překročení této koncentrace nastává asociace do micel [2].



Obr. 8 Změny vybraných fyzikálních veličin v závislosti na koncentraci

Kritická micelární koncentrace závisí na struktuře uhlovodíkového řetězce a jeho délce, na vlastnostech hydrofilní skupiny a u ionogenních také na vlastnostech protiiontů a na teplotě a tlaku. Se změnou této koncentrace nastávají i změny ve fyzikálních vlastnostech PAL, což znázorňuje Obr. 8 [4].

Existuje několik metod, kterými se dá stanovit hodnota této koncentrace. Nejčastější metodou, kterou se hodnota CMC tenzidu určuje, je měření vodivosti nebo měření povrchového napětí. Nicméně se při měření CMC využívá i jiných metod, mezi které patří zejména potenciometrie nebo fluorescenční spektrofotometrie [5].

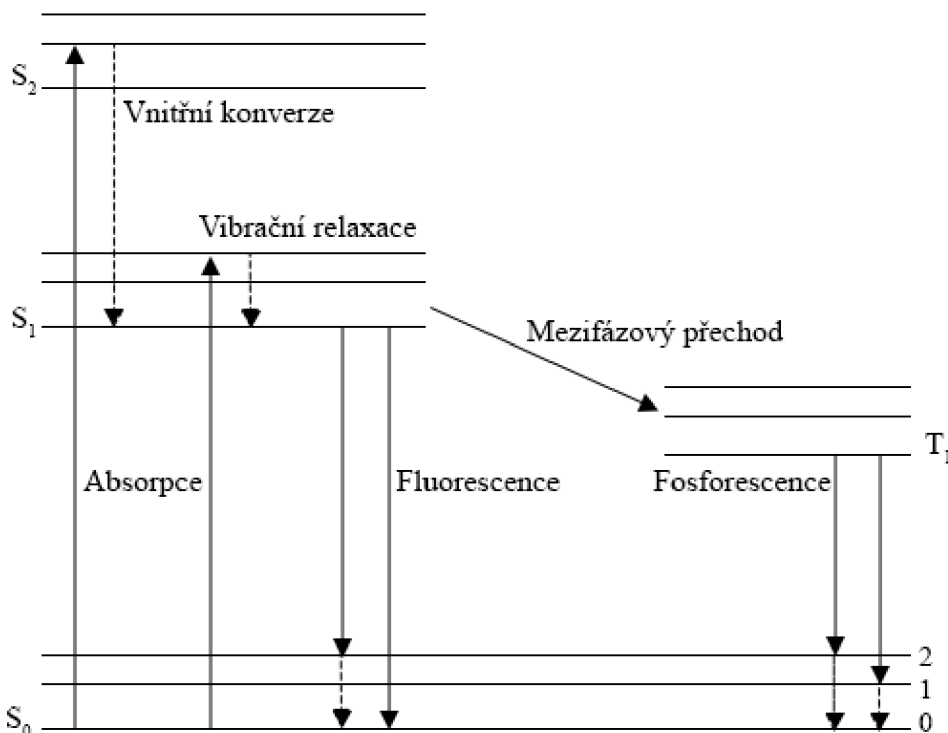
2.2 Fluorescence

Luminiscence je jev, který se projevuje emisí hmotou při deexcitaci, přičemž jednotlivé druhy luminiscenčních metod se dělí v závislosti na druhu energie potřebné k excitaci. Mezi druhy luminiscence patří např. chemiluminiscence (chemická energie) nebo termoluminiscence (tepelná energie).

Pokud excitace nastala energií světelnou, neboli elektromagnetickým zářením, pak se jedná o fotoluminiscenční metody, kde se dále, na základě jejich charakteru v excitovaném stavu, rozlišuje fluorescence a fosforescence.

2.2.1 Jablonskéhoho diagram

Procesy, ke kterým dochází při absorpci a emisi světla, tedy zářivé a nezářivé přechody mezi elektronově vibračními stavy, jsou často ilustrovány pomocí Jablonskéhoho diagramu [1].



Obr. 9 Jablonského diagram

Jak znázorňuje Obr. 9, systém v základním singletovém stavu (S_0) přijme energii ve formě fotonu a je excitován do vyšších energetických stavů (S_1 , S_2). Pokud energie fotonu postačí nejen k elektronové excitaci, ale i k excitaci vibračních pásů, dochází poté k vibrační relaxaci, při které se nezářivými přechody energie vyzáří do okolí. Přechod mezi nejnižší excitovanou hladinou (S_2) na nejvyšší vibrační hladinu základní singletové hladiny (S_1) se označuje jako vnitřní konverze.

Fluorescence nastává, pokud molekula excituje na vyšší energetickou hladinu, spin zůstane zachován a následně se vrátí na hladinu základní, a jde tedy o přechod z nejnižší hladiny stavu S_1 do S_0 . Fluorescence má krátký dosvit a odeznívá velmi rychle po ukončení excitace.

Může také nastat mezifázový přechod, který zahrnuje změnu spinu elektronu, a nastává, když se ze singletového stavu se dvěma opačnými spiny při přechodu na vyšší energetickou hladinu změni orientace jednoho spinu a nastane přechod do stavu tripletového. Mechanismus přechodu z S_1 do T_1 je podobný s vnitřní konverzí. Proces zahrnující změnu spinu elektronu je spinově zakázaný a je také méně pravděpodobný.

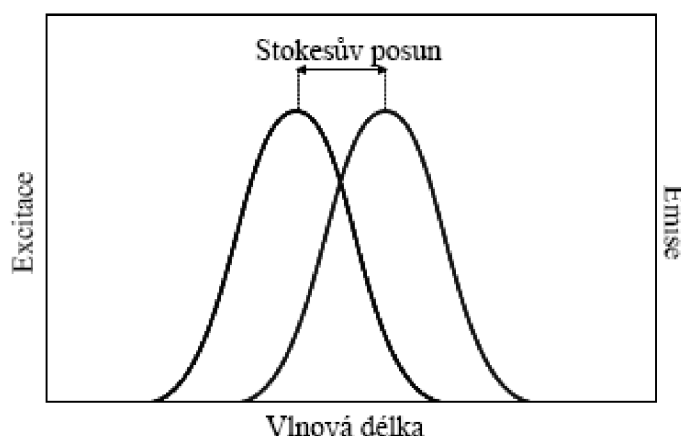
Fosforescence je pak emise fotonu z tripletového stavu T_1 do základního stavu S_0 . Fosforescence je méně častý jev než fluorescence a má také vyšší vlnové délky, jelikož přechod z T_1 do S_1 vyžaduje menší rozdíl energie než přechod z S_1 do S_0 . Fosforescence má dlouhý dosvit, jelikož elektron musí po absorpci záření přejít z S_1 na T_1 .

Pokud nastane reverzní mezifázový přechod mezi T_1 a S_1 , molekula přejde z nejnižší hladiny tripletového stavu zpět na nejnižší hladinu excitovaného singletového stavu, pak po návratu na S_1 dochází ke zpožděné fluorescenci, jejíž doba dosvitu je srovnatelná s fosforescencí (mezifázový přechod způsobuje zdržení), ale vlnová délka emitovaného záření s fluorescencí.

2.2.2 Charakteristiky fluorescence

Excitační spektrum je definováno jako intenzita fluorescence v závislosti na vlnové délce budícího záření, vlnová délka emitovaného záření je přitom konstantní. Emisní spektrum je naopak definováno jako intenzita fluorescence v závislosti na vlnové délce emitovaného záření, přičemž vlnová délka excitačního záření je konstantní.

Pro molekuly jsou emisní a excitační maxima charakteristická, jejich vzájemný vztah a zejména rozdíl mezi emisním a excitačním maximem vyjadřuje Stokesův posun. Fluorescenční spektrum je posunuto k vyšším vlnovým délkám, než spektrum absorpční a podstatou zrcadlového pravidla je to, že spektra mají většinou podobný tvar, nicméně jsou k sobě zrcadlově obrácena.



Obr. 10 Stokesův posun a zrcadlové pravidlo

Jednou z dalších základních charakteristik fluorescence (luminiscence) je nejvyšší intenzita fluorescence (luminiscence), které je dosaženo, pokud je systém excitován vlnovou délkou, která je rovna excitačnímu maximu daného systému.

Kvantový výtěžek fluorescence vyjadřuje míru intenzity fluorescence a je definován jako:

$$\varphi_F = \frac{N_F}{N}, \quad (1)$$

kde N_F je počet kvant vyzářených a N je počet soustavou absorbovaných zářivých kvant. Celkový kvantový výtěžek fotoluminiscence je určen jako součet kvantového výtěžku fluorescence a fosforescence a vždy je v důsledku nezářivých deexcitací menší než 100 %.

2.2.3 Stacionární a časově rozlišená fluorescence

Měření fluorescence je klasifikováno do dvou metod, kterými jsou stacionární a časově rozlišená fluorescence. Častější metodou měření fluorescence je stacionární (steady-state) fluorescence, při které se po ozáření vzorku kontinuálním paprskem světla měří průměrná intenzita fluorescence a je zaznamenáváno emisní spektrum. Intenzita stacionární fluorescence je v přímé úměře k době života a může být získána podle vztahu:

$$I = \int_0^{\infty} I_0 \cdot e^{-\frac{t}{\tau}} dt = I_0 \cdot \tau, \quad (2)$$

kde I je intenzita fluorescence, I_0 je intenzita fluorescence v čase $t = 0$ závisující na koncentraci fluoroforu a τ je doba života.

Časově rozlišená (time-resolved) fluorescence se využívá pro měření poklesu intenzity fluorescence v čase. Na rozdíl od stacionární fluorescence lze pomocí časově rozlišené fluorescence získat o vzorku mnohem více informací, kterými jsou např. doby života a jejich počet. Intenzita časově rozlišené fluorescence může být získána z exponenciální závislosti:

$$I = I_0 \cdot e^{-\frac{t}{\tau}}, \quad (3)$$

kde I je intenzita fluorescence, I_0 je intenzita fluorescence v čase $t = 0$ a τ je doba života příslušné formy.

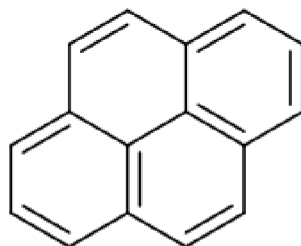
2.2.4 Fluorescenční sondy

Luminofor je molekula nebo její část, která zodpovídá za luminiscenci. U fotoluminiscenčních metod se tyto skupiny označují jako fluorofory (fluorescence) a fosforofory (fosforescence). Fluorofory jsou tedy molekuly (nebo jejich části), které jsou schopny absorbovat energii světelného záření a následně ji ztratit emisním zářením o delší vlnové délce, což podmiňuje jejich schopnost vykazovat fluorescence.

Pokud je molekula sama o sobě fluoroforem, jedná se o vlastní fluorescence. K látkám, které nemají schopnost vykazovat vlastní fluorescence, se váží nevlastní fluorofory – fluorescenční značky kovalentní vazbou a nekovalentně se vážící fluorescenční sondy.

2.2.4.1 Pyren

Pyren je aromatický uhlovodík, jehož sumární vzorec je $C_{16}H_{10}$ a jeho strukturu zobrazuje Obr. 11. Emisní spektrum pyrenu má 5 maxim, z čehož je pro nás nejdůležitější první ($\lambda \approx 370$ nm) a třetí ($\lambda \approx 380$ nm) maximum. Poměr intenzit fluorescence prvního a třetího maxima se označuje jako emisní polaritní index (EmPI) a využívá se při stanovení kritické micelární koncentrace. Na emisním spektru pyrenu lze taky okolo 470 nm pozorovat excimer (excitovaný dimer) pyrenu, kdy se v systému nachází vždy jedna molekula pyrenu v základním stavu a druhá ve stavu excitovaném, vznikající při solubilizaci pyrenu do micel.



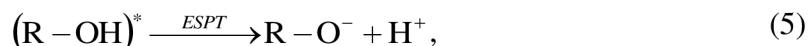
Obr. 11 *Struktura pyrenu*

2.3 Přenos protonu v excitovaném stavu

Některé fluorescenční sondy mohou podléhat deprotonaci v excitovaném stavu. Tyto fluorescenční sondy se pak označují jako fotokyseliny, jelikož se po excitaci mohou chovat jako kyseliny a mechanismus přenosu protonu v excitovaném stavu je velmi podobný mechanismu disociace kyselin na vodíkový ion a příslušný anion podle rovnice:

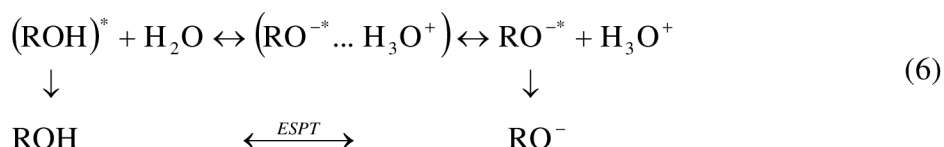


Fotokyselina obsahující proton, který může odstěpit, jej v základním stavu neodštěpuje. Nicméně pokud dojde k excitaci, dochází poté k deprotonaci fotokyseliny za vzniku aniontové formy této kyseliny. Zjednodušeně lze tento proces znázornit rovnicí:



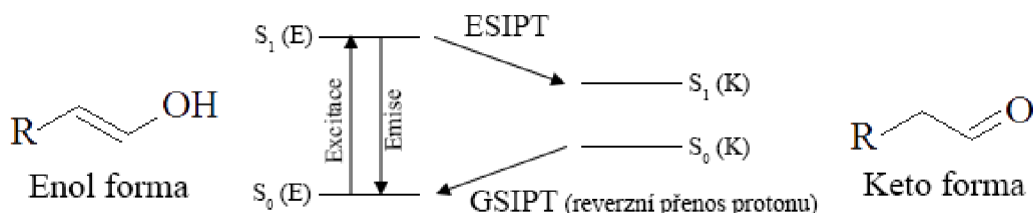
kde R-OH je obecný předpis fluorescenční sondy podléhající ESPT a R-O⁻ je obecný předpis její aniontové formy.

Několika hlavními kroky ESPT jsou ultrarychlá deprotonace, která podmiňuje vznik zdvojeného iontového páru, což vede k rekombinaci a následné disociaci [10]. Toto je znázorněno v následující rovnici, kde reakcí s vodou excitovaná molekula reaguje za vzniku iontového páru s přeneseným protonem a následně disociuje na dva samostatné ionty.



2.3.1 Intramolekulární přenos protonu v excitovaném stavu

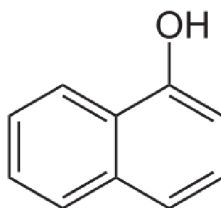
Intramolekulární přenos protonu v excitovaném stavu (ESIPT = excited-state intramolecular proton transfer) je fotoindukovaný tautomerizační proces, který se projevuje přenosem vodíku hydroxylové skupiny na uhlík karbonylové skupiny prostřednictvím vodíkových můstků. Mechanismus ESIPT je znázorněn na Obr. 12, kde enol forma po excitaci přechází ESIPT na keto formu, která se po deexcitaci mění reverzním přenosem protonu (GSIPT = ground-state intramolecular proton transfer) zpět na enol formu [16].



Obr. 12 Mechanismus ESIPT

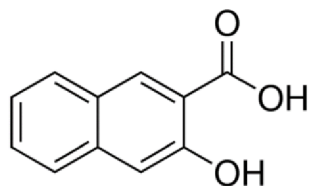
2.3.2 Sondy podléhající přenosu protonu v excitovaném stavu

1-Naftol je aromatický uhlovodík obsahující hydroxylovou skupinu na α -uhlíku, jehož sumární vzorec je C₁₀H₈O a jeho struktura je zobrazena na Obr. 13. Díky přítomnosti hydroxylové skupiny, která je donorem protonu, a vhodnému prostředí, které je akceptorem protonu, 1-naftol podstupuje ESPT. Emisní spektrum 1-naftolu vykazuje dvě maxima, jedno při 350 nm, které patří neutrální formě této sondy, druhé při 450 nm, které odpovídá deprotonovanému 1-naftolu.



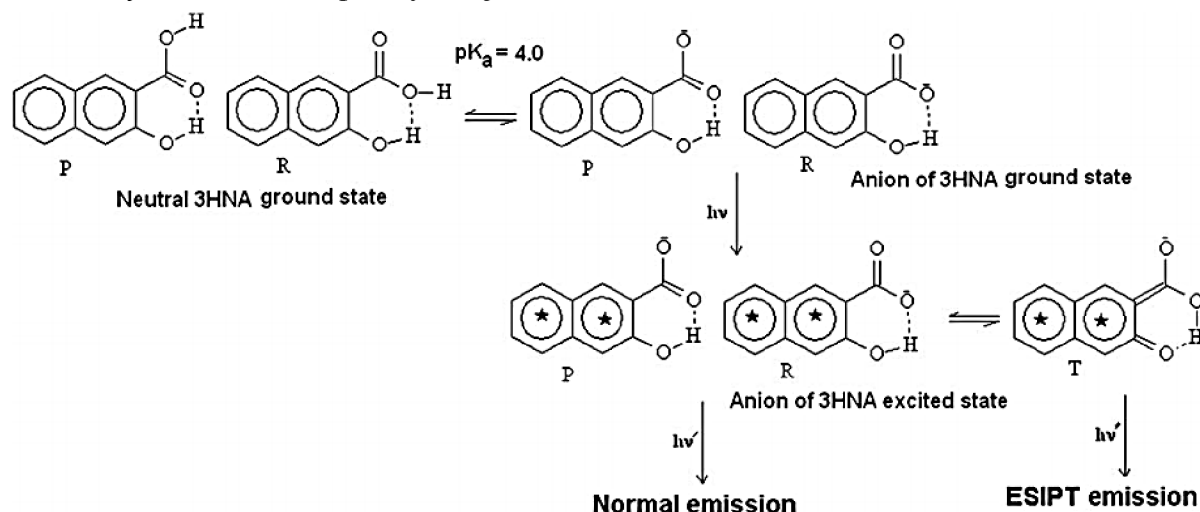
Obr. 13 Struktura 1-naftolu

3-Hydroxy-2-naftolová kyselina (3HNA) je aromatická sloučenina, jejíž sumární vzorec je $C_{11}H_8O_3$ a její struktura je zobrazena na Obr. 14.



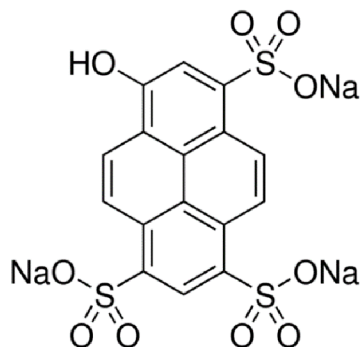
Obr. 14 *Struktura 3HNA*

3HNA na druhém uhlíku obsahuje skupinu karboxylovou a na třetím uhlíku se nachází skupina hydroxylová, díky kterým tato sonda podléhá ESIPT. Na Obr. 15 lze vidět, že molekula 3HNA má dva konformační izomery, enol (P) a keto (R). Tautomerní (T) forma těchto dvou excitovaných konformerů pak vykazuje ESIPT emisi [14], [15].



Obr. 15 *Struktura neutrální a aniontové formy 3HNA v základním a excitovaném stavu [15]*

8-Hydroxypyren-1,3,6-trisulfonát sodný (HPTS) je pH citlivá fluorescenční sonda ze skupiny arylsulfonátů, přičemž sulfonová skupina zodpovídá za rozpustnost ve vodě a hydroxylová skupina za citlivost k pH. Sumární vzorec pyraninu je $C_{16}H_7Na_3O_{10}S_3$ a struktura sondy je zobrazena na Obr. 16. Díky její pK_a ($\approx 7,4$) se využívá v klinické praxi [1]. Na emisním spektru je viditelná zejména aniontová forma při vlnové délce 520 nm, neutrální forma při 420 nm má mnohem menší intenzitu fluorescence.



Obr. 16 *Struktura HPTS*

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Faktorem ovlivňujícím dynamiku ESPT je prostředí, ve kterém deprotonace probíhá. Jak je popsáno v kapitole 2.3, mechanismus ESPT probíhá analogicky k disociační reakci kyselin, což je reakce probíhající ve vodném prostředí. V systému, kde se nachází pouze příslušná sonda a voda, lze měřením fluorescence naměřit vyšší intenzitu fluorescence deprotonované formy sondy RO^- , kdežto intenzita fluorescence neutrální formy sondy ROH je podstatně nižší. Ve vodném prostředí je tedy mechanismus deprotonace fluorescenční sondy velmi rychlý. Oproti tomu v nepolárních rozpouštědlech disociace kyselin, a tedy i ESPT, vzhledem k vysoké energetické bariéře neprobíhá a jednalo by se o velmi endotermický proces.

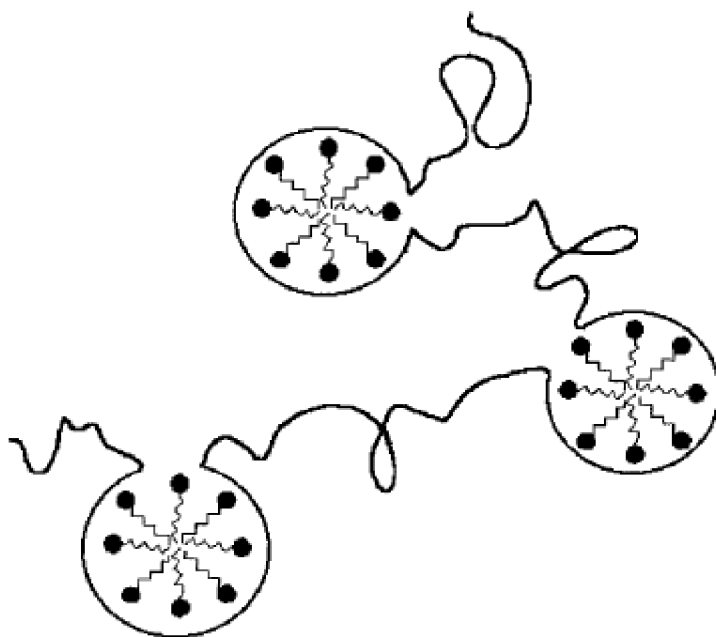
Nejčastěji používané fotokyseliny většinou nejsou schopny disociace v nevodných roztocích a přenášejí proton po jejich asociaci s vodou. Silnější fotokyseliny jsou schopny přenášet proton i v jiných polárních protických rozpouštědlech, zejména alkoholech, během jejich excitovaného stavu.

Závislosti rozpouštědla na ESPT se věnovali ve své práci Spies a spol., kteří pracovali s deriváty odvozenými od HPTS, jako rozpouštědla používali vodu, methanol a ethanol. Měření časově rozlišené fluorescence se ukázalo, že ESPT probíhá nejrychleji ve vodném prostředí, poté v methanolu, nejpomalejší ESPT probíhal v prostředí ethanolu. Zjištěné rychlostní konstanty přenosu protonu ve vodném prostředí byly o tři řády vyšší, než tomu bylo v prostředí obou alkoholů. Z experimentu také vyplývá, že s rostoucí koncentrací alkoholu v systému klesá rychlost deprotonace [12].

Studium ESPT sondy HPTS v methanolu studovali také Mondal a spol., kteří měření stacionární a časově rozlišené fluorescence porovnávali rychlost přenosu protonu ve vodě a methanolu. V tomto případě byla rychlostní konstanta přenosu protonu v methanolu nižší o dva řády než tomu bylo ve vodě [13].

Při využití ESPT k charakterizaci koloidních systémů dochází také ke změnám dynamiky deprotonace také v závislosti na množství tenzidů v systému. V systémech, kde se vyskytují povrchově aktivní látky, ale ne v takové koncentraci, aby docházelo k asociaci v micely, probíhá ESPT analogicky k procesům ve vodném prostředí, intenzita fluorescence aniontové formy je vyšší než intenzita fluorescence formy neutrální. Po dosažení kritické micelární koncentrace se tenzidy začínají asociovat v micely a sonda se vyskytuje jak volně, tak i vázaná v micelách, deprotonace je tedy značně potlačena, v systémech roste intenzita fluorescence neutrální formy a intenzita fluorescence aniontové formy je nižší [8].

Obdobně se dají charakterizovat i systémy, kde se krom povrchově aktivních látek vyskytují i polymery. Pro tyto systémy je charakteristická kritická agregační koncentrace (CAC), po jejímž dosažení se začínají tvořit agregáty polymer–tenzid. Sonda se tak může vyskytovat jak volně, tak i vázaná v těchto agregátech nebo volných micelách, opět je deprotonace potlačena a intenzita fluorescence aniontové formy sondy je nižší [11].



Obr. 17 Model „perlového náhrdelníku“ u agregátů polymer–tenzid [11]

Dutta a spol. studovali přenos protonu v excitovaném stavu 1-naftolu v agregátech hydroxypropylcelulózy a dodecylsulfátu sodného pomocí časově rozlišené fluorescence. Při malých koncentracích tenzidu (před CMC) bylo chování neutrální a aniontové formy sondy odlišné oproti chování za kritickou micelární koncentrací, kde byly molekuly 1-naftolu rozloženy mezi agregáty a volné micely, kdy s rostoucí koncentrací tenzidu také roste podíl sondy v micelách. Bylo také pozorováno, že po dosažení CAC, kdy již v roztoku existovaly agregáty HPC-SDS, 1-naftol již nepodléhal deprotonaci [17].

D. Roy a spol. studovali ESPT stacionární a časově rozlišenou fluorescencí HPTS v CTAB micelách, věnovali se také tomu, jak přenos protonu HPTS v CTAB micelách ovlivňuje přidavek octanu sodného. Bylo zjištěno, že se HPTS neváže k aniontovým (např. SDS) ani neutrálním (např. Triton X-100) tenzidům. Aniontová forma HPTS se ovšem velmi silně váže k micelám kationtového tenzidu CTAB, přičemž na spektrech HPTS s CTAB se projevuje jak aniontová, tak neutrální forma této sondy, nicméně proces ESPT v tomto systému je velmi pomalý. S přidavkem octanu sodného intenzita emise neutrální formy HPTS v CTAB micelách klesá s rostoucí intenzitou emise aniontové formy této sondy, což indikuje větší efektivitu ESPT. ESPT sondy HPTS v octanu probíhá mnohem rychleji ve vodném prostředí, v prostředí CTAB micel probíhá pomaleji [7].

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité chemikálie

Fluorescenční sondy Pyren: Fluka, pro fluorescenci
CAS: 129-00-0
Číslo šarže: 430166/1

1-Naftol: Sigma-Aldrich, ReagentPlus®
CAS: 90-15-3
Číslo šarže: 101256295

3HNA: Fluka
CAS: 92-70-6
Číslo šarže: 101291110

HPTS: Sigma-Aldrich Chemistry
CAS: 6358-69-6
Číslo šarže: 101445391

Povrchově aktivní látky CTAB: Sigma-Aldrich Life Science, pro molekulární biologii
CAS: 57-09-0
Číslo šarže: 101486215

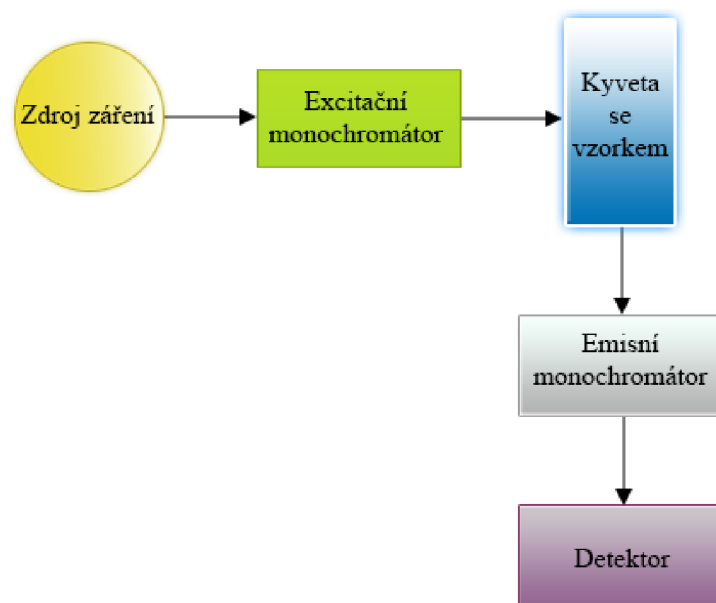
SDS: Fluka, pro molekulární biologii
CAS: 151-21-3
Číslo šarže: 1256726

Triton X-100: Sigma-Aldrich Chemistry
CAS: 9002-93-1
Číslo šarže: 101597883

4.2 Přístroje a zařízení

4.2.1 Aminco Bowman Series 2

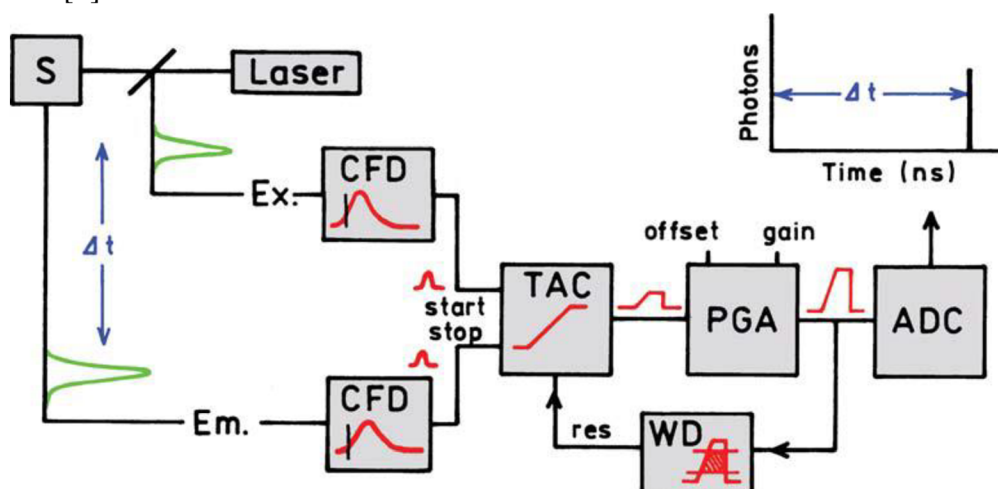
Zdrojem polychromatického záření je xenonová lampa (150 W). Toto záření vstupuje do excitačního monochromátoru, který vybírá excitační záření o vhodné vlnové délce. Takto vybraný paprsek prochází křemennou kyvetou optické dráhy 1 cm, kde dochází k vybuzení fluoroforu. V kolmém směru je pak po průchodu emisním monochromátorem, stanovujícím vlnovou délku emisního záření, detekováno emitované světlo, které je snímáno fotonásobičem.



Obr. 18 Schéma měření na spektrofluorimetru Aminco

4.2.2 Fluorocube HORIBA Jobin Yvon

Nejprve dochází k vybuzení vzorku excitačním pulzem z LED diody. Vyslaný signál poté prochází CFD diskriminátorem (constant function discriminator), který přesně měří čas příchodu pulzu. Následně signál prochází konvertorem TAC (time to amplitude converter), ten generuje napětí lineárně se zvyšující s časem. Druhý emisní kanál detekuje emitovaný foton, jehož příchod čas je přesně zaznamenán pomocí CFD, který vyšle signál do TAC. TAC tak obsahuje napětí, které odpovídá časovému zpoždění mezi excitačním a emisním signálem. Napětí může být zesíleno zesilovačem PGA (programmable gain amplifier). Příslušné napětí je převedeno na numerickou hodnotu pomocí ADC (analog to digital converter) konvertoru. Hodnoty napětí jsou ukládány do histogramu, který je tvořen mnohonásobným opakováním tohoto procesu. Měření TCSPS probíhalo v tzv. „reverzním módu“. Toto měření je analogické k výše popsanému procesu, nicméně TAC je spuštěn příchodem fotonu a zastaven pulzem excitačním. [1]



Obr. 19 Schéma měření na spektrofluorimetru Fluorocube [1]

4.3 Příprava zásobních roztoků tenzidů

Pro přípravu zásobního roztoku CTAB o koncentraci $6 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ bylo na analytických vahách naváženo 0,218 7 g tohoto tenzidu, toto množství bylo kvantitativně převedeno do 100 ml odměrné baňky a po rozpuštění navážky byl roztok doplněn deionizovanou vodou po rysku.

Pro přípravu zásobního roztoku SDS o koncentraci $4 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ bylo na analytických vahách naváženo 1,153 5 g tohoto tenzidu, toto množství bylo kvantitativně převedeno do 100 ml odměrné baňky a po rozpuštění navážky byl roztok doplněn deionizovanou vodou po rysku.

Pro přípravu zásobního roztoku Tritonu X-100 o koncentraci $4 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ bylo na analytických vahách naváženo 0,025 0 g tohoto tenzidu, toto množství bylo kvantitativně převedeno do 100 ml odměrné baňky a po rozpuštění navážky byl roztok doplněn deionizovanou vodou po rysku.

4.4 Příprava zásobních roztoků fluorescenčních sond

Zásobní roztok pyrenu o koncentraci $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ byl připraven následujícím způsobem. Na analytických vahách bylo naváženo 0,004 1 g pyrenu. Toto množství bylo kvantitativně převedeno do 100 ml odměrné baňky a po rozpuštění navážky byl roztok doplněn acetonem po rysku.

Zásobní roztok 1-naftolu o koncentraci $10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ byl připraven následujícím způsobem. Na analytických vahách bylo naváženo 0,014 4 g 1-naftolu. Toto množství bylo kvantitativně převedeno do 100 ml odměrné baňky a po rozpuštění navážky byl roztok doplněn methanolem po rysku.

Zásobní roztok HPTS o koncentraci $10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ byl připraven následujícím způsobem. Na analytických vahách bylo naváženo 0,052 4 g HPTS. Toto množství bylo kvantitativně převedeno do 100 ml odměrné baňky a po rozpuštění navážky byl roztok doplněn ethanolem po rysku.

Zásobní roztok 3HNA o koncentraci $2 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ byl připraven následujícím způsobem. Na analytických vahách bylo naváženo 0,037 6 g 3HNA. Toto množství bylo kvantitativně převedeno do 100 ml odměrné baňky a po rozpuštění navážky byl roztok doplněn ethanolem po rysku.

4.5 Příprava vzorků

Do skleněných vialek bylo vždy pipetováno potřebné množství sondy a rozpouštědlo bylo následně odpařeno v digestoři. Koncentrace pyrenu ve vzorcích byla $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, koncentrace 1-naftolu ve vzorcích byla $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, koncentrace 3HNA ve vzorcích byla $2 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a koncentrace HPTS ve vzorcích $2 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Poté bylo do vialek pipetováno takové množství tenzidu tak, aby po doplnění deionizovanou vodou na celkový objem 5 ml vznikla vhodná koncentrační řada 15 vzorků s předpokládanou hodnotou CMC zhruba uprostřed. Koncentrační řada CTAB byla v rozmezí $2 \cdot 10^{-4} - 6 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, koncentrační řada SDS byla v rozmezí $2 \cdot 10^{-3} - 4 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a koncentrační řada Tritonu X-100 byla v rozmezí $5 \cdot 10^{-5} - 4 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Všechny vzorky byly připraveny třikrát.

4.6 Vlastní měření

Emisní spektra jednotlivých fluorescenčních sond byla měřena na spektrofluorimetru Fluorolog HORIBA Jobin Yvon za konstantní teploty 22 °C, která byla udržována termostatem.

Časově rozlišená fluorescence jednotlivých fluorescenčních sond byla měřena na spektrofluorimetru Fluorocube HORIBA Jobin Yvon v reverzním módu a za konstantní teploty 22 °C, čehož bylo docíleno připojenou vodní lázní.

Všechna měření byla provedena třikrát a výsledné hodnoty (spektra a doby života) byly získány zprůměrováním naměřených dat v MS Excel, chyba měření byla stanovena pomocí směrodatné odchylky a v grafech je vyznačena chybovými úsečkami.

4.6.1 Měření emisních spekter

Byla proměřena emisní spektra pyrenu, kdy excitační vlnová délka byla 335 nm a emisní spektrum bylo měřeno ve vlnových délkách 350 – 550 nm. U excitačního monochromátoru byla nastavena štěrbina na 1,5 nm, u emisního pak na 2 nm.

Pro měření emisních spekter 1-naftolu byla excitační vlnová délka 300 nm a emisní spektrum bylo snímáno v rozsahu 320 – 580 nm. Štěrbiny u obou monochromátorů byly nastaveny na 2 nm.

Emisní spektra HPTS byla měřena v rozmezí 380 – 580 nm s excitační vlnovou délkou 375 nm. Štěrbiny u obou monochromátorů byly nastaveny na 2 nm.

Emisní spektra 3HNA byla měřena v rozmezí 380 – 560 nm s excitační vlnovou délkou 350 nm. Štěrbiny u obou monochromátorů byly nastaveny na 2 nm.

4.6.2 Měření dob života

Pro měření vyhasínání fluorescence 1-naftolu byla zvolena nanoLED dioda vlnové délky 301 nm. Emisní monochromátor byl nastaven na vlnovou délku 350 nm při sledování neutrální formy a na 450 nm při sledování formy aniontové. TAC rozsah byl nastaven na 50 ns při sledování neutrální formy a na 100 popř. 200 ns při sledování aniontové formy. Cyklus vyhasínání byl zopakován 10 000krát.

Pro měření vyhasínání fluorescence HPTS byla zvolena nanoLED dioda vlnové délky 372 nm, při sledování neutrální formy HPTS byl emisní monochromátor nastaven na 420 nm, při sledování aniontové formy HPTS byl nastaven na 520 nm. TAC rozsah byl nastaven na 50, popř. 100 ns a cyklus vyhasínání byl zopakován 10 000krát.

Pro měření vyhasínání fluorescence 3HNA byla zvolena nanoLED dioda vlnové délky 361 nm. U 3HNA byla sledována pouze aniontová forma sondy a emisní monochromátor byl v tomto případě nastaven na vlnovou délku 510 nm. TAC rozsah byl nastaven na 50 ns. Cyklus vyhasínání byl zopakován 10 000krát.

K rozptylu světla pro stanovení tzv. IRF (instrument response function) byl použit roztok koloidního křemíku. Stanovení proběhlo vždy po proměření prvního vzorku. Nastavení bylo stejné až na emisní monochromátor, který byl nastaven na vlnovou délku použité diody.

4.7 Vyhodnocení

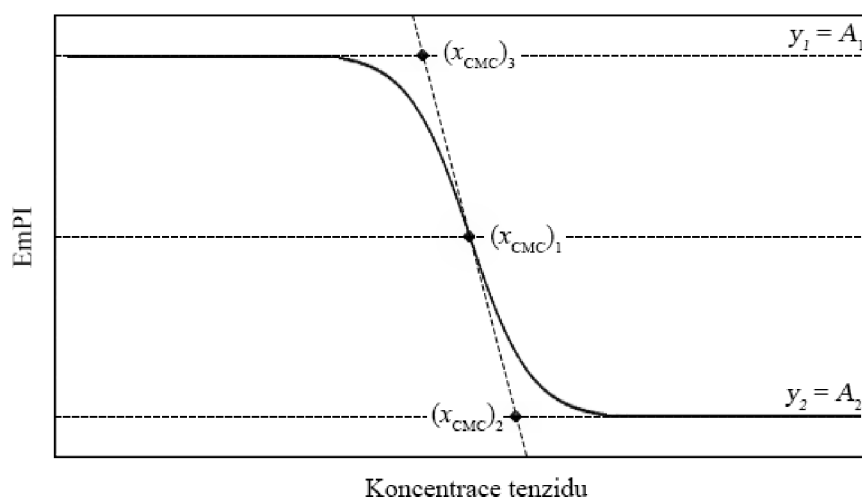
4.7.1 Stanovení kritické micelární koncentrace

Hodnota kritické micelární koncentrace byla zjištěna na základě použití fluorescenční sondy pyrenu. Metoda je založena na měření závislosti intenzity fluorescence, resp. poměru intenzit prvního a třetího vibračního pásu, označovaném jako emisní polaritní index (dále EmPI), na logaritmu koncentrace tenzidu [9].

Tato závislost může být popsána sigmoidní křivkou Boltzmanova typu, kterou lze matematicky popsat rovnicí:

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{\frac{x-x_0}{\Delta x}}} + A_2, \quad (7)$$

kde y odpovídá poměru intenzit fluorescence prvního a třetího píku pyrenu, hodnoty A_1 a A_2 odpovídají maximu a minimu funkce, hodnota x představuje celkovou koncentraci tenzidu, Δx je gradient a hodnota x_0 je inflexním bodem funkce.



Obr. 20 Sigmoidní křivka Boltzmanova typu pro určení CMC

Na Obr. 20, zobrazujícím sigmoidní Boltzmanovu křivku, se nacházejí tři body, podle kterých se dá CMC stanovit. Prvním bodem je inflexní bod funkce $x_0 = (x_{CMC})_1$, dalším bodem je maximum funkce $(x_{CMC})_3$, posledním bodem je pak minimum funkce $(x_{CMC})_2$.

Jak lze z předchozího obrázku vyčíst, hodnota CMC v bodě x_0 lze určit přímo z grafu, nicméně hodnoty CMC v krajních bodech musí být dopočítány a jedná se o průsečíky minima, popř. maxima, funkce s tečnou sigmoidní závislosti.

Derivací matematického vyjádření sigmoidní křivky a následnými úpravami byl získán předpis tečny funkce v inflexním bodě, čímž po následném dosazení y_1 , popř. y_2 , a úpravě byly získány vztahy pro výpočet hodnoty CMC v maximu i minimu:

$$\begin{aligned} (x_{CMC})_2 &= x_0 + 2 \cdot \Delta x, \\ (x_{CMC})_3 &= x_0 - 2 \cdot \Delta x. \end{aligned} \quad (8)$$

Hodnoty CMC z inflexního bodu a ostatní hodnoty potřebné pro další výpočty byly získány v programu Origin, na základě závislosti EmPI na koncentraci tenzidu a následným proložením této závislosti sigmoidní křivkou.

4.7.2 Stanovení rychlostních konstant

Data vyhasínání fluorescence naměřená na spektrofluorimetru Fluorocube byla analyzována v programu DAS6 Fluorescence Decay Analysis Software, tato data byla proložena vhodnou (1 až 5) exponenciální funkcí, jejíž obecný předpis je:

$$F(t) = A + B_i \cdot e^{-\frac{t}{\tau_i}}, \quad (10)$$

kde A je fitovací parametr, B je předexponenciální funkce, t je čas a τ je příslušná doba života. Předexponenciální funkce souvisí s množstvím emitující látky ve vzorku [1].

Proložením vhodnou exponenciální funkcí byly získány hodnoty doby života sondy a jejich procentuální zastoupení. Rychlostní konstanty neutrální formy sondy (k_{ROH}) a rychlostní konstanty deprotonované formy sondy (k_{RO^-}) byly vypočítány z nejdelších dob života, což jsou doby života právě těchto forem [18]:

$$k_{ROH} = (\lambda_1)_{ROH} = \left(\frac{1}{\tau_3} \right)_{ROH}, \quad (11)$$

$$k_{RO^-} = (\lambda_1)_{RO^-} = \left(\frac{1}{\tau_3} \right)_{RO^-}. \quad (12)$$

Rychlostní konstanta přenosu protonu (k_{PT}) byla vypočítána na základě následujících výpočtů [18]:

$$\lambda_3 = \frac{1}{\tau_1}, \quad \lambda_2 = \frac{1}{\tau_2}, \quad \lambda_1 = \frac{1}{\tau_3}, \quad (13)$$

$$R = \frac{B_2}{B_1}, \quad (14)$$

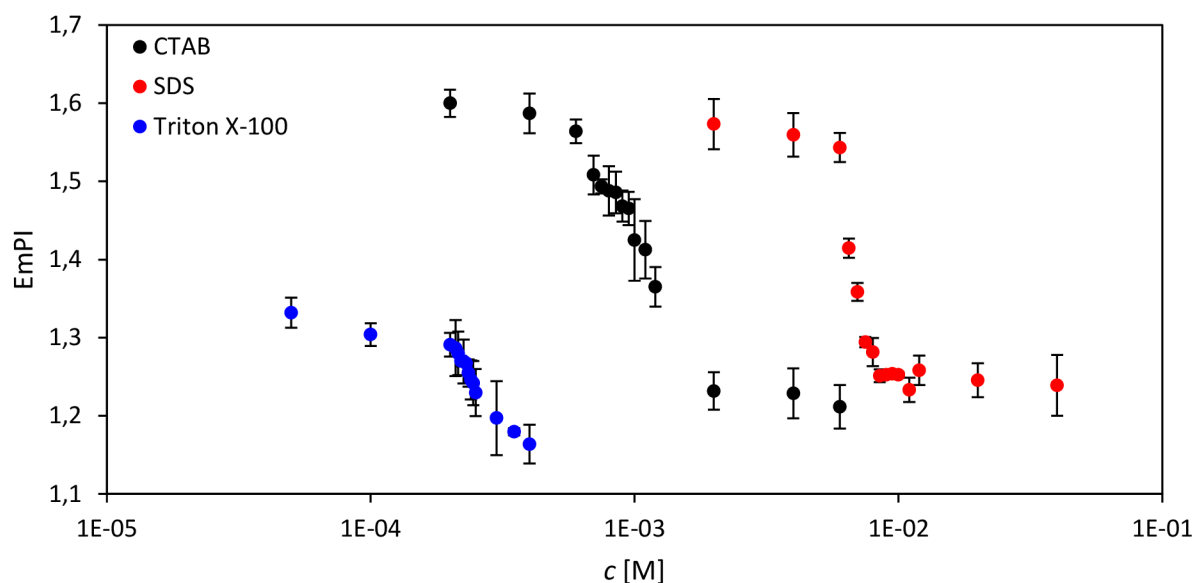
$$k_{PT} = \frac{R \cdot \lambda_3 + \lambda_2}{R + 1}, \quad (15)$$

kde τ značí dobu života a B značí relativní zastoupení dané doby.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Stanovení kritické micelární koncentrace tenzidů pomocí pyrenu

Hodnota kritické micelární koncentrace tenzidů CTAB, SDS a Tritonu X-100 byla stanovena měřením stacionární fluorescence pyrenu. Princip tohoto stanovení je popsán v kapitole 4.7.1. Pyren byl vybrán z toho důvodu, že se jedná o známou sondu pro určování kritické micelární koncentrace, je dlouho používaný a k nalezení ve spoustě publikací. V této práci slouží jako modelová sonda pro určení kritické micelární koncentrace. Z naměřených hodnot intenzity fluorescence byl vytvořen graf závislosti emisního polaritního indexu na koncentraci tenzidu (Obr. 21) a tyto hodnoty byly v programu Origin proloženy sigmoidní křivkou, čímž byly získány parametry potřebné pro výpočet kritické micelární koncentrace.



Obr. 21: Hodnota emisního polaritního indexu v závislosti na koncentraci tenzidů CTAB, SDS a Tritonu X-100. Osa x je v logaritmickém měřítku.

Byla stanovena hodnota kritické micelární koncentrace CTAB na 1,03 mM pro inflexní bod funkce, 0,71 mM pro maximum funkce a 1,35 mM pro minimum funkce. Hodnota CMC udávaná výrobcem je 1 mM, některé zdroje uvádějí hodnotu této koncentrace v rozmezí 0,92 – 1 mM [9].

Hodnota kritické micelární koncentrace SDS byla stanovena na 6,67 mM z inflexního bodu funkce, 6,23 mM z maxima funkce a 7,11 mM z minima funkce. Hodnota udávaná výrobcem leží v rozmezí 7 – 10 mM. Hodnota zjišťovaná nejen fluorescenčně, ale také pomocí absorpční spektrometrie nebo konduktometrie, se vyskytuje v rozmezí 7 – 8 mM [5].

Kritická micelární koncentrace Tritonu X-100 byla stanovena na 0,24 mM z inflexního bodu funkce, 0,21 mM z maxima funkce a 0,27 mM z minima funkce. Výrobce udává hodnotu CMC v rozmezí 0,2 – 0,9 mM, ale v publikacích se vyskytuje rozmezí 0,22 – 0,27 mM [9].

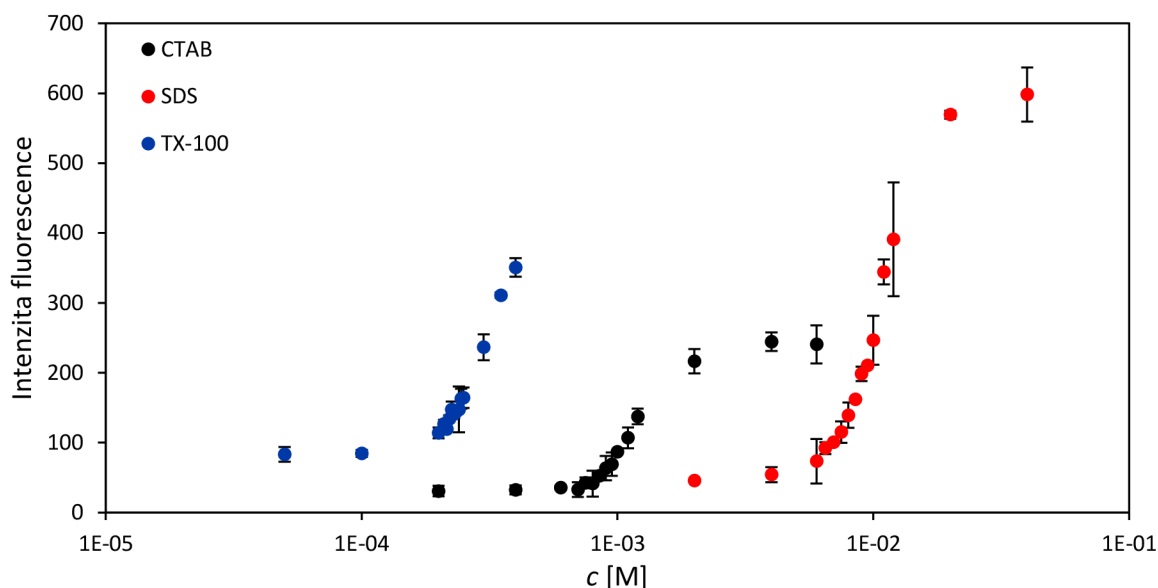
Pro tenzidy, které by měly mít nízkou hodnotu kritické micelární koncentrace (pod 1 mM) by měla platit hodnota určená právě z inflexního bodu, naopak u tenzidů s vyšší hodnotou kritické micelární koncentrace by měla být správnější hodnota určená z bodu $(x_{CMC})_2$ závislosti popsané v kapitole 4.7.1 [9].

Porovnáním s hodnotou udávanou výrobcem a experimentálně zjištěnými hodnotami z různých zdrojů se pro CTAB jako nejvhodnější nachází skutečně hodnota určená z inflexního bodu funkce, tedy 1,03 mM, obdobně jako u Tritonu X-100, kde v inflexním bodě je naměřená hodnota 0,24 mM, pro SDS odpovídá hodnota 7,11 mM stanovená z minima funkce.

5.2 Měření stacionární a časově rozlišené fluorescence 1-naftolu

5.2.1 Stacionární fluorescence 1-naftolu

Obdobně jako v případě pyrenu byla stanovena hodnota kritické micelární koncentrace jednotlivých tenzidů na základě měření stacionární fluorescence 1-naftolu. Namísto EmPI byly vyneseny závislosti intenzit neutrální formy 1-naftolu na koncentraci tenzidů (Obr. 22), ty byly následně proloženy sigmoidní křivkou a ze získaných parametrů byly stanoveny hodnoty kritické micelární koncentrace.



Obr. 22 Intenzita fluorescence neutrální formy (350 nm) 1-naftolu v závislosti na koncentraci tenzidů CTAB, SDS a Tritonu X-100. Osa x je v logaritmickém měřítku.

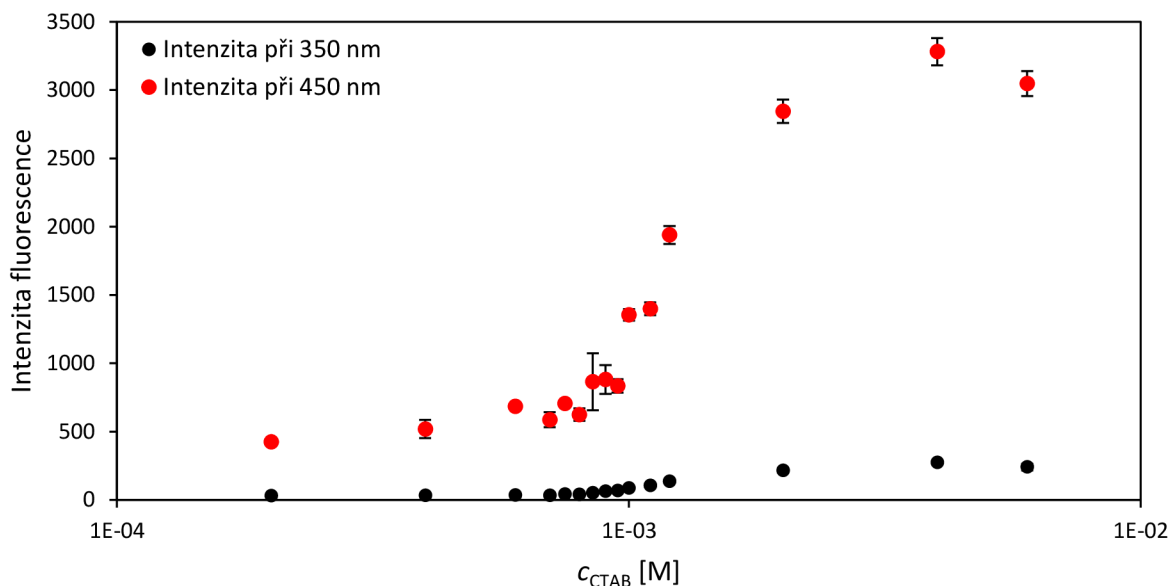
Hodnota kritické micelární koncentrace CTAB stanovená je pro inflexní bod 1,18 mM, pro minimum funkce 1,01 mM a pro maximum funkce 1,35 mM. Hodnota stanovená pomocí pyrenu porovnáním s hodnotami uvedenými v publikacích byla stanovena z inflexního bodu na 1,03 mM, této hodnotě odpovídá hodnota z minima funkce stanovená na 1,01 mM.

Kritická micelární koncentrace SDS je pro inflexní bod 10,80 mM, pro minimum funkce 8,95 mM a pro maximum funkce 12,65 mM. Hodnota stanovená pomocí pyrenu byla stanovena z minima na 7,11 mM, této hodnotě se nejvíc blíží hodnota stanovená z minima funkce na 8,95 mM.

Hodnota kritické micelární koncentrace u Tritonu X-100 je pro inflexní bod 0,29 mM, pro minimum funkce 0,24 mM a pro maximum funkce 0,34 mM. Pro Triton X-100 byla hodnota stanovena v předchozí kapitole na 0,24 mM z inflexního bodu, stejná hodnota byla stanovena pomocí 1-naftolu v minimu funkce.

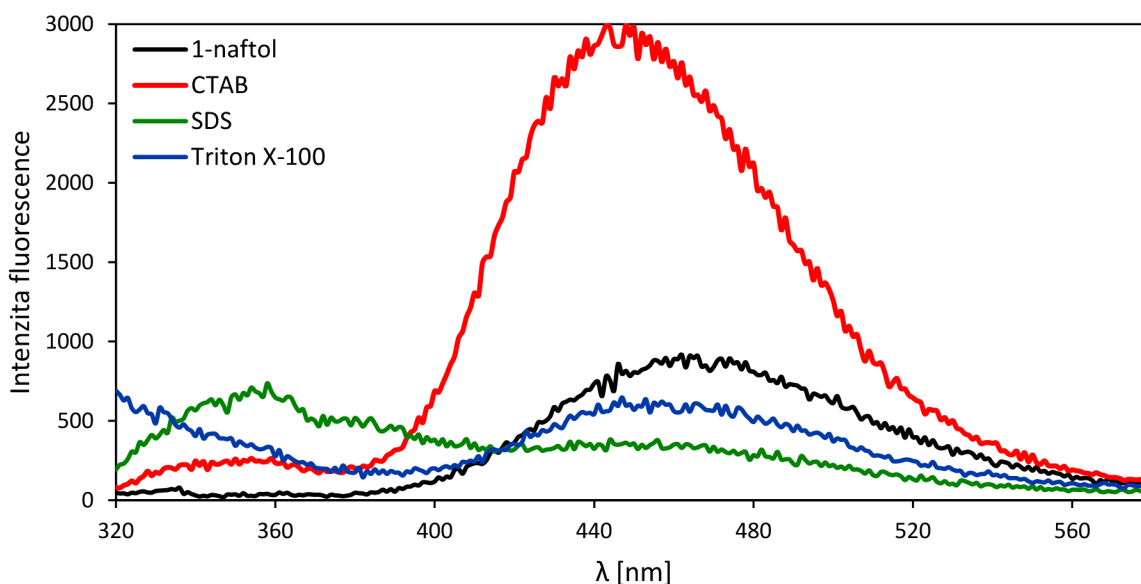
Pro systém 1-naftol s CTAB byl vynesen graf závislosti neutrální (350 nm) a aniontové (450 nm) formy 1-naftolu v závislosti na koncentraci CTAB (Obr. 23). U obou forem dochází

ke zvýšení intenzity fluorescence s rostoucí koncentrací tenzidu. V době, kdy je v roztoku nízká koncentrace CTAB, a nebylo tak dosaženo kritické micelární koncentrace, je intenzita fluorescence téměř konstantní. Markantnější nárůst intenzity nastává v okamžiku, kdy se v roztoku začínají tvořit micely.



Obr. 23 Intenzita fluorescence neutrální (350 nm) a aniontové (450 nm) formy 1-naftolu v závislosti na koncentraci CTAB. Osa x je v logaritmickém měřítku.

Na Obr. 24 jsou zobrazena naměřená emisní spektra samotného 1-naftolu a 1-naftolu v přítomnosti tenzidů CTAB, SDS a Tritonu X-100 za kritickou micelární koncentrací.



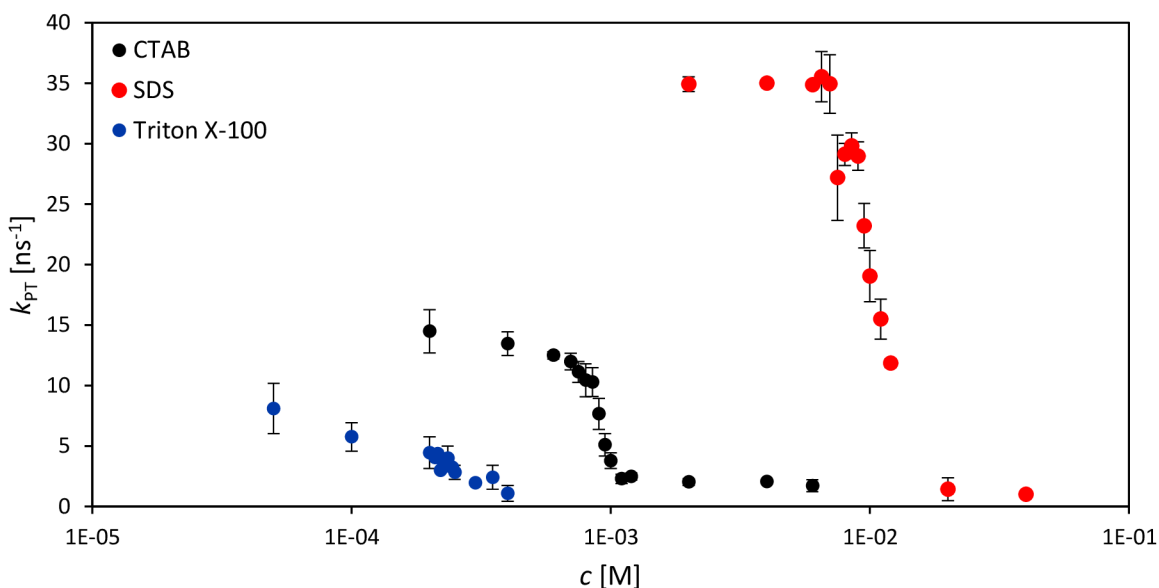
Obr. 24 Emisní spektrum 1-naftolu v systému bez přítomnosti tenzidů a v přítomnosti CTAB, SDS a Tritonu X-100 za kritickou micelární koncentrací.

Na emisním spektru v systému s CTAB za kritickou micelární koncentrací (6 mM) lze pozorovat mnohem vyšší intenzitu aniontové formy 1-naftolu než je tomu u SDS (40 mM) a Tritonu X-100 (0,4 mM). U CTAB zároveň nelze pozorovat převýšení intenzity aniontové

formy formou neutrální, což je viditelné zejména u SDS, kde je se stoupající koncentrací SDS pozorovatelný pokles intenzity aniontové formy a nárůst intenzity neutrální formy. Graf závislosti intenzit obou forem 1-naftolu na koncentraci SDS je uveden v příloze (viz Příloha 1), stejně tak je v příloze (viz Příloha 2) uveden graf závislosti obou forem 1-naftolu na koncentraci Tritonu X-100. U kationtového CTAB se aniontová forma 1-naftolu nachází pravděpodobně spíše u hydrofilních kladně nabitých hlav micel, tedy ve Sternově vrstvě. Z tohoto důvodu docházelo k nárůstu nejen intenzity neutrální formy, ale i formy aniontové. Pokud by 1-naftol nebyl solubilizován do micel, intenzita neutrální formy by se nezvyšovala, protože by nedocházelo k potlačení deprotonace. V případě, že by docházelo k začlenění 1-naftolu do micel, pak by v hydrofobní části micel deprotonace neprobíhala a aniontová forma by tak nebyla pozorovatelná. V případě aniontového SDS byl 1-naftol lokalizován uvnitř micel, proto docházelo k potlačení deprotonace a intenzita neutrální formy 1-naftolu po dosažení kritické micelární koncentrace převýšila intenzitu aniontové formy 1-naftolu. Systém s Tritonem X-100 se chová obdobně jako systém s CTAB, dochází v něm ke zvýšení intenzity obou forem 1-naftolu s rostoucí koncentrací Tritonu X-100.

5.2.2 Časově rozlišená fluorescence 1-naftolu

Na základě měření časově rozlišené fluorescence byly vypočteny rychlostní konstanty deprotonace (viz kapitola 4.7.2), ty byly vyneseny do grafu v závislosti na koncentraci jednotlivých tenzidů (Obr. 25).



Obr. 25 Rychlostní konstanta deprotonace (k_{PT}) v závislosti na koncentraci tenzidů CTAB, SDS a Tritonu X-100. Osa x je v logaritmickém měřítku.

Před dosažením kritické micelární koncentrace, kdy se ve vzorcích nevyskytovaly žádné micely, lze pozorovat vyšší hodnoty příslušných rychlostních konstant přenosu protonu. Ve vzorcích, ve kterých už byly přítomny tenzidy v takové koncentraci, aby začalo docházet k tvorbě micel, se 1-naftol nenacházel pouze ve vodném prostředí, ale byl i vázán v micelách, popř. se nacházel na rozhraní micely a vody, o čemž vypovídají klesající hodnoty rychlostní konstanty. Po dosažení kritické micelární koncentrace jsou hodnoty rychlostních konstant

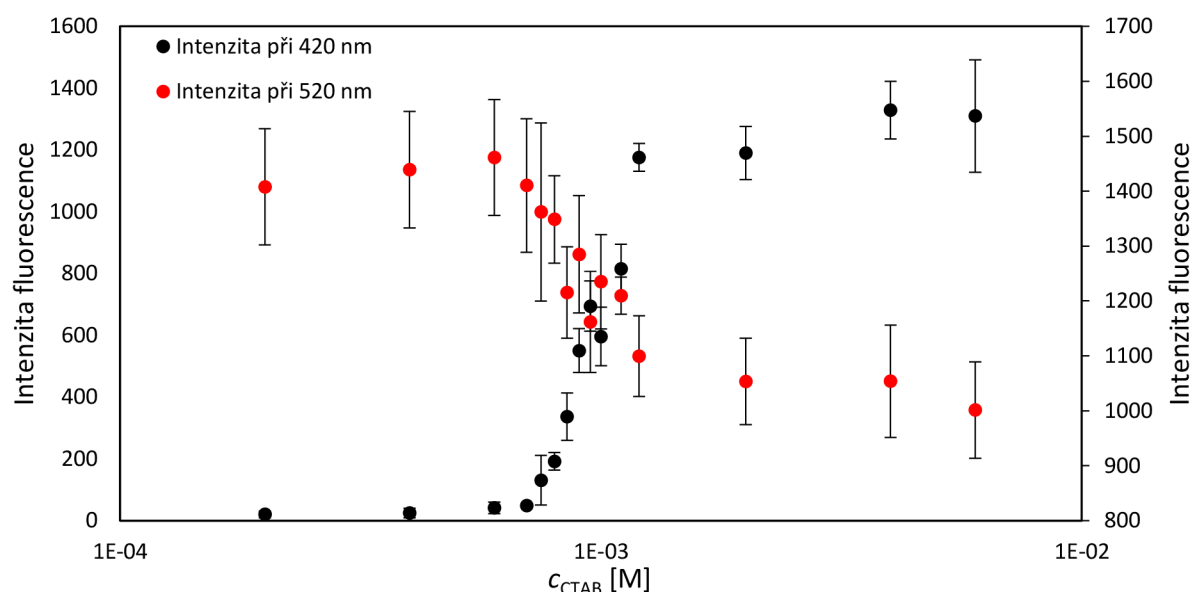
deprotonace velmi nízké, většina molekul sondy byla solubilizována do micel a deprotonace tak byla omezená.

Závislost rychlostní konstanty deprotonace na koncentraci jednotlivých tenzidů byla pro srovnání taky v Originu proložena sigmoidní křivkou. Pro tenzid CTAB byla hodnota stanovena na 0,89 mM v inflexním bodě funkce, na 0,97 mM v maximum funkce a na 0,81 mM v minimum funkce. Tyto hodnoty jsou mnohem nižší v porovnání s měřením stacionární fluorescence pyrenu i 1-naftolu a hodnotě kritické micelární koncentrace odpovídá hodnota z maxima funkce na 0,97 mM. Vyšší hodnoty kritické micelární koncentrace než v předchozích případech byly stanoveny pro SDS, a to na 10,46 mM pro inflexní bod funkce, 12 mM pro maximum funkce a na 8,92 mM pro minimum funkce, což je hodnota, která přechodím stanovením odpovídá nejvíc. U Tritonu X-100 byla hodnota kritické micelární koncentrace stanovena na 0,22 mM pro inflexní bod, 0,25 mM v maximum funkce a 0,18 mM v minimum funkce. Odpovídající je hodnota v inflexním bodě 0,22 mM.

5.3 Měření stacionární a časově rozlišené fluorescence HPTS

5.3.1 Stacionární fluorescence HPTS

Pro systém HPTS s CTAB byl vynesena graf závislosti neutrální (420 nm) a aniontové (520 nm) formy HPTS v závislosti na koncentraci CTAB (Obr. 26).

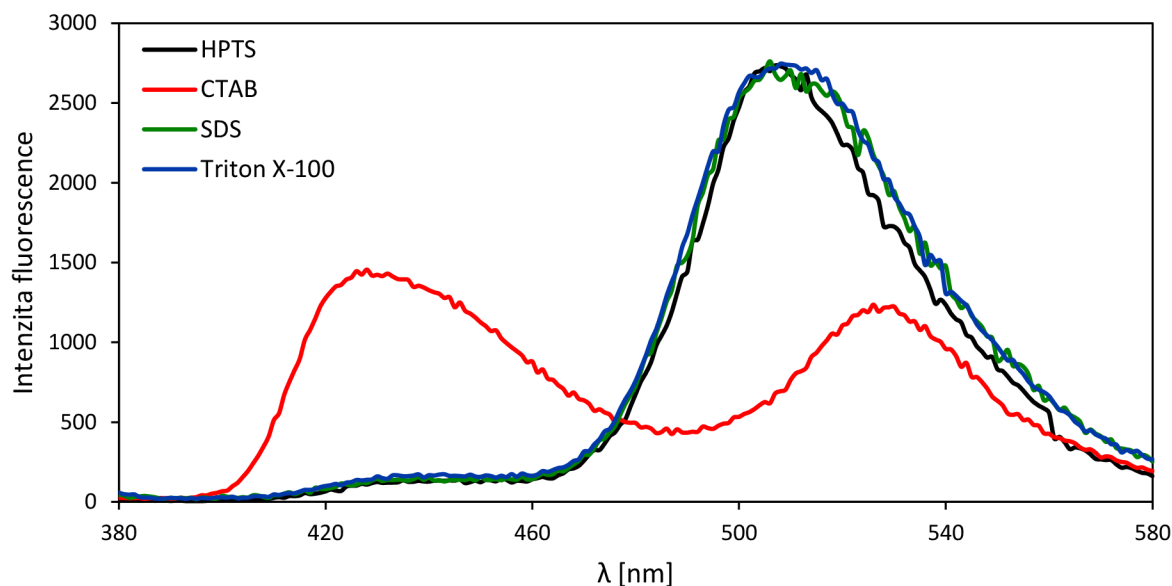


Obr. 26 Intenzita fluorescence neutrální (420 nm) a aniontové (520 nm) formy HPTS v závislosti na koncentraci CTAB. Osa x je v logaritmickém měřítku.

Proložení závislosti intenzity fluorescence neutrální formy HPTS na koncentraci CTAB sigmoidní křivkou byly zároveň získány hodnoty kritické micelární koncentrace CTAB. Hodnota kritické micelární koncentrace v minimum funkce byla stanovena na 0,85 mM. Před dosažením této koncentrace zároveň dochází ke zvyšování intenzity neutrální formy HPTS. Hodnota kritické micelární koncentrace byla v inflexním bodě stanovena na 0,97 mM. V maximum funkce byla hodnota kritické micelární koncentrace stanovena na 1,10 mM. Za touto koncentrací již nedochází k nárůstu intenzity neutrální formy HPTS.

Porovnáním s hodnotami stanovenými pomocí pyrenu a porovnáním s již zjištěnými hodnotami se jako správné jeví hodnoty stanovené z inflexního bodu na 0,97 mM a z maxima funkce na 1,10 mM.

Jak lze pozorovat i na emisním spektru HPTS v systému s CTAB, SDS a Tritonem X-100 (Obr. 27), intenzita ani jedné z forem HPTS se neměnila se vzrůstající koncentrací SDS a Tritonu X-100.

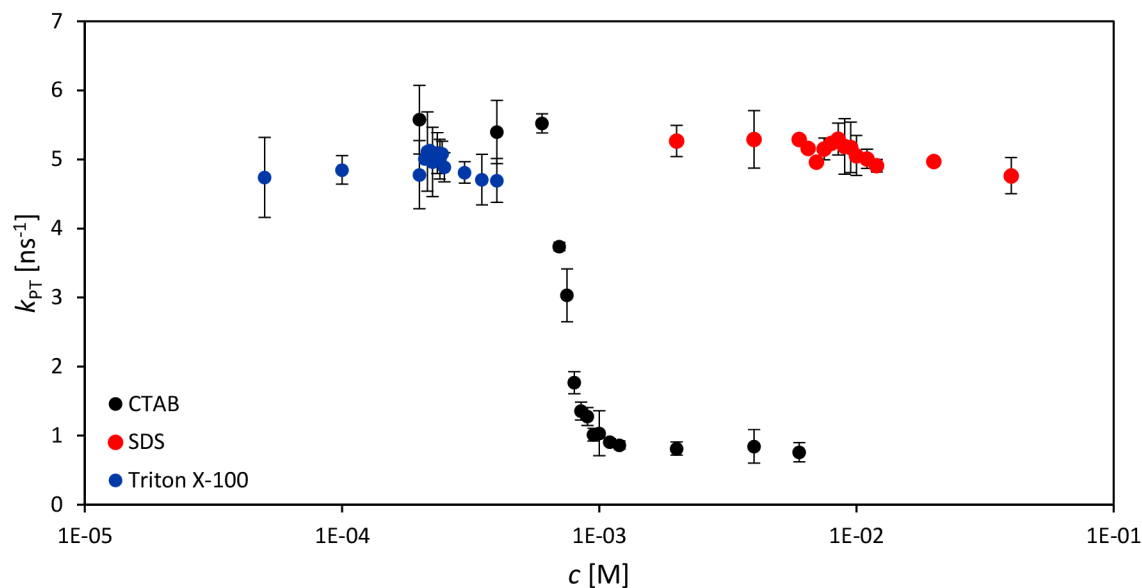


Obr. 27 Emisní spektrum HPTS v systému bez přítomnosti tenzidů a v přítomnosti CTAB, SDS a Tritonu X-100 za kritickou micelární koncentrací.

Překročení kritické micelární koncentrace je významné pouze pro tenzid CTAB, kdy před dosažením kritické micelární koncentrace intenzita neutrální formy nepřevýšila intenzitu aniontové formy. Ve chvíli, kdy se v roztoku začaly tvořit micely, docházelo k poklesu intenzity aniontové formy a k nárůstu formy neutrální, a v době, kdy byla dostatečná koncentrace CTAB a tím i dostatečné množství micel, docházelo k solubilizaci HPTS do micel a deprotonace tak byla potlačena. V příloze jsou uvedeny grafy intenzity neutrální i aniontové formy HPTS v závislosti na koncentraci SDS (viz Příloha 3) a v závislosti na koncentraci Tritonu X-100 (viz Příloha 4). Pro možné porovnání jsou v příloze uvedeny také závislosti intenzity neutrální formy HPTS na koncentraci jednotlivých tenzidů (viz Příloha 5), kde je viditelná konstantní intenzita fluorescence neutrální formy HPTS u tenzidů SDS a Tritonu X-100, porovnatelná s intenzitou fluorescence v systému s CTAB před kritickou micelární koncentrací. U tenzidů SDS a Triton X-100 nemá kritická micelární koncentrace na průběh deprotonace významnější vliv, HPTS se k nim totiž neváže z důvodu záporně nabitých sulfonových skupin, není tedy potlačen přenos protonu, jelikož se veškerá sonda nachází ve vodném prostředí a intenzita aniontové formy tak převyšuje intenzitu neutrální formy v jakékoliv koncentraci těchto dvou tenzidů.

5.3.2 Časově rozlišená fluorescence HPTS

Vypočtené rychlostní konstanty deprotonace HPTS byly vyneseny do grafu závislosti těchto konstant na koncentraci jednotlivých tenzidů (Obr. 28).



Obr. 28 Rychlostní konstanty deprotonace (k_{PT}) HPTS v závislosti na koncentraci tenzidů CTAB, SDS a Tritonu X-100. Osa x je v logaritmickém měřítku.

Pro HPTS v prostředí CTAB lze pozorovat stejný trend jako u 1-naftolu, kdy k výraznému poklesu deprotonace dochází během kritické micelární koncentrace. Za kritickou micelární koncentrací jsou rychlostní konstanty deprotonace velmi malé a po solubilizaci většiny molekul HPTS do micel CTAB už deprotonace téměř neprobíhá. Vysoké hodnoty rychlostních konstant deprotonace HPTS v prostředí s SDS a Tritonem X-100 odpovídají hodnotám rychlostních konstant deprotonace HPTS v prostředí CTAB před dosažením kritické micelární koncentrace. Tato skutečnost, stejně jako u měření stacionární fluorescence v kapitole 5.3.1, potvrzuje, že se HPTS neváže k micelám SDS a Tritonu X-100, proto nedochází k potlačení deprotonace.

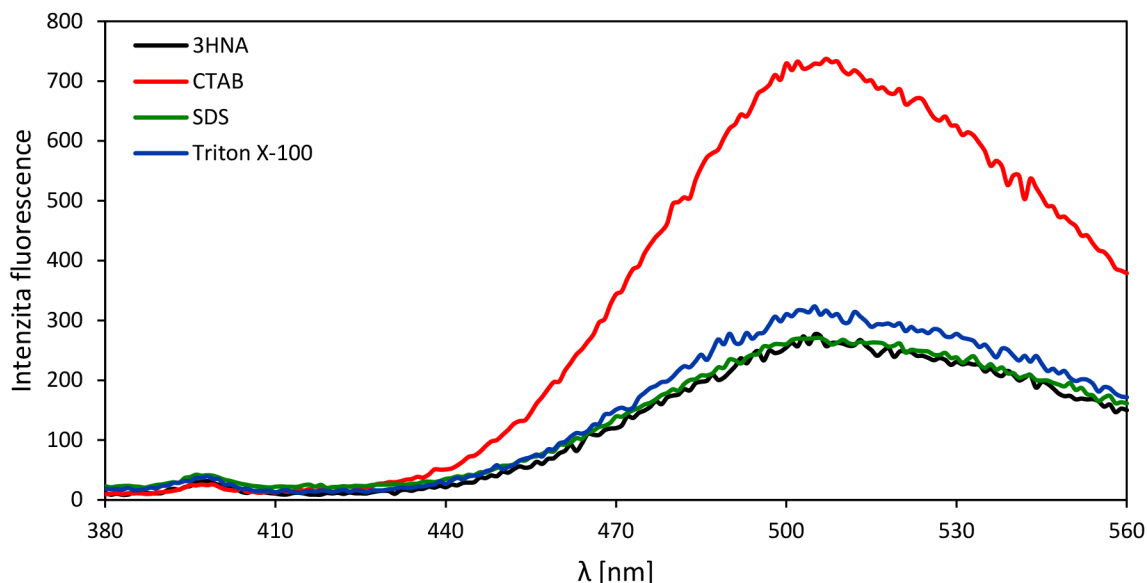
Proložení výše uvedené závislosti rychlostní konstanty deprotonace HPTS na koncentraci CTAB sigmoidní křivkou byly i z tohoto měření získány hodnoty kritické micelární koncentrace. Nejbližší hodnotám stanoveným z předchozích měření je bod odpovídající 0,78 mM z maxima funkce. Hodnota z inflexního bodu byla stanovena na 0,73 mM a hodnota z minima funkce na 0,68 mM.

5.4 Měření stacionární a časově rozlišené fluorescence 3HNA

3HNA na rozdíl od předchozích sond 1-naftolu a HPTS nepodléhá ESPT ale ESIPT. Tato sonda byla vybrána právě pro možné porovnání intermolekulárního i intramolekulárního přenosu protonu v excitovaném stavu.

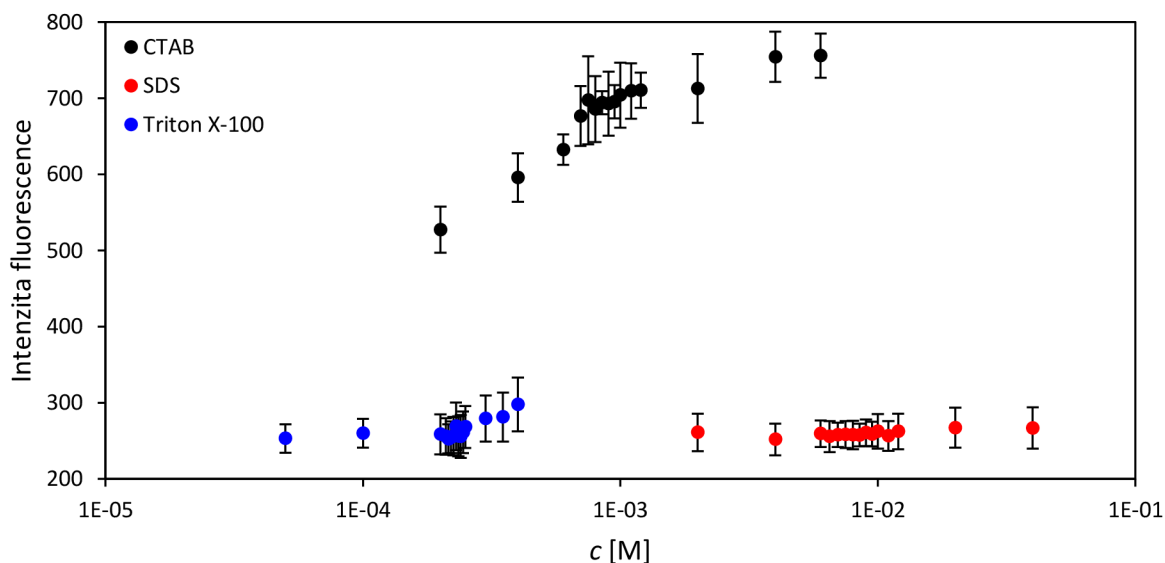
5.4.1 Stacionární fluorescence 3HNA

Na Obr. 29 jsou naměřená emisní spektra 3HNA bez přítomnosti tenzidů a v přítomnosti tenzidů CTAB, SDS a Tritonu X-100 po dosažení kritické micelární koncentrace. Neutrální forma 3HNA (400 nm) se na spektru významně neprojevuje pro žádný z uvedených systémů, viditelná je intenzita ESIPT emise při 510 nm.



Obr. 29 Emisní spektrum 3HNA v systému bez přítomnosti tenzidů a v přítomnosti CTAB, SDS a Tritonu X-100 za kritickou micelární koncentrací.

V přítomnosti tenzidů SDS a Tritonu X-100 za kritickou micelární koncentrací 3HNA nevykazuje výraznou změnu intenzity ESIPT emise. U SDS je hodnota intenzity ESIPT emise 3HNA konstantní, vzhledem k zápornému náboji u SDS i 3HNA zde nedochází k žádné interakci, o čemž svědčí i měření časově rozlišené fluorescence. Oproti tomu v systému s CTAB intenzita fluorescence 3HNA roste skoro lineárně s rostoucí koncentrací CTAB ve vzorcích a mnohem vyšší intenzitu fluorescence vykazuje už první vzorek před dosažením kritické micelární koncentrace. Tomuto skoku odpovídá i časově rozlišené měření v kapitole 5.4.2. U Tritonu X-100 nedochází k tak markantnímu nárůstu intenzity ESIPT emise 3HNA, nicméně za kritickou micelární koncentrací ke zvýšení dochází. Závislost intenzity fluorescence 3HNA při 510 nm na koncentraci jednotlivých tenzidů je uvedena na Obr. 30.



Obr. 30 Intenzity fluorescence 3HNA při 510 nm v závislosti na koncentraci tenzidů CTAB, SDS a Tritonu X-100. Osa x je v logaritmickém měřítku.

5.4.2 Časově rozlišená fluorescence 3HNA

Vyhasínací křivky aniontové formy 3HNA byly prokládány mono- až biexponenciální funkcí, čímž byly získány doby života sondy. U systémů, kde se nevyskytoval žádný tenzid, byl pozorován monoexponenciální pokles, čímž byla zjištěna doba života volné 3HNA. V následující tabulce (Tab. 1) jsou pro jednotlivé systémy uvedeny hodnoty průměrných dob života.

Tab. 1 Průměrné doby života 3HNA v systémech s CTAB, SDS a Tritonem X-100.

Vzorek	CTAB		SDS		Triton X-100	
	<i>c</i> [M]	τ [ns]	<i>c</i> [M]	τ [ns]	<i>c</i> [M]	τ [ns]
0	0	1,6	0	1,6	0	1,6
1	2,00E-04	4,4	2,00E-03	1,7	5,00E-05	1,6
2	4,00E-04	4,6	4,00E-03	1,6	1,00E-04	1,6
3	6,00E-04	4,8	6,00E-03	1,6	2,00E-04	1,6
4	7,00E-04	4,9	6,50E-03	1,6	2,10E-04	1,6
5	7,50E-04	4,9	7,00E-03	1,6	2,15E-04	1,6
6	8,00E-04	4,9	7,50E-03	1,6	2,20E-04	1,6
7	8,50E-04	5,0	8,00E-03	1,6	2,25E-04	1,6
8	9,00E-04	5,0	8,50E-03	1,6	2,30E-04	1,6
9	9,50E-04	5,0	9,00E-03	1,6	2,35E-04	1,6
10	1,00E-03	5,0	9,50E-03	1,6	2,40E-04	1,6
11	1,10E-03	5,3	1,00E-02	1,6	2,45E-04	1,6
12	1,20E-03	5,3	1,10E-02	1,6	2,50E-04	1,6
13	2,00E-03	5,4	1,20E-02	1,6	3,00E-04	1,7
14	4,00E-03	5,4	2,00E-02	1,6	3,50E-04	1,7
15	6,00E-03	5,5	4,00E-02	1,6	4,00E-04	2,9

U vzorků, kde se nacházela pouze samotná 3HNA, tedy bez přítomnosti tenzidů, doba života volné 3HNA odpovídá hodnotě 1,6 ns. Na rozdíl od CTAB, kdy v přítomnosti tenzidů poměrně výrazně vzrostla hodnota průměrné doby života, v přítomnosti SDS se průměrná hodnota doby života moc neliší od hodnoty naměřené pro samotnou 3HNA. Obdobné chování vykazuje i Triton X-100, kde je ovšem za kritickou micelární koncentrací pozorovatelný vzrůst průměrné doby života. Naměřené doby života všech systémů a jejich relativní zastoupení je uvedeno v příloze (viz Příloha 6, Příloha 7 a Příloha 8).

Jak už bylo zmíněno v kapitole 5.4.1, už v prvním vzorku obsahujícím CTAB dochází k výraznému skoku. V rámci stacionární fluorescence dochází k výraznému nárůstu intenzity ESIPT emise, u časově rozlišené fluorescence je průměrná doba života prvního vzorku výrazně vyšší, než doba života samotné 3HNA. Z naměřených dob života a jejich relativního zastoupení lze usuzovat, že probíhají interakce mezi 3HNA a CTAB už v prvním vzorku, o čemž svědčí i prudce stoupající zastoupení doby života připadající na 3HNA vázanou v CTAB.

Vyhasínací křivky 3HNA s SDS byly prokládány monoexponenciální funkcí. 3HNA nevykazuje žádné interakce s SDS a doba života volné 3HNA odpovídá v téměř všech vzorcích hodnotě 1,6 ns.

Vyhasínací křivky 3HNA v systému s Tritonem X-100 byly prokládány biexponenciální funkcí. První vzorky nevykazovaly významný nárůst průměrné doby života, nicméně za kritickou micelární koncentrací docházelo k nárůstu průměrné doby života, stejně jako klesalo procentuální zastoupení doby života připadajícího volné 3HNA a rostlo procentuální zastoupení odpovídající 3HNA vázané v micelách Tritonu X-100. S rostoucí koncentrací Tritonu X-100 by pravděpodobně průměrná doba života stále rostla, dokud by veškeré molekuly 3HNA nebyly vázány v micelách.

6 ZÁVĚR

Cílem této práce bylo sesbírání poznatků a sepsání literární rešerše týkající se problematiky přenosu protonu v excitovaném stavu a charakterizaci koloidních systémů pomocí měření stacionární a časově rozlišené fluorescence sond, které této deprotonaci v excitovaném stavu podléhají. Zároveň cílem práce bylo zhodnocení výsledků vzhledem ke známým sondám. Pro experimentální část byly vybrány tři fluorescenční sondy podléhající deprotonaci v excitovaném stavu, byly to sondy 1-naftol, HPTS a 3HNA, jako modelová sonda byl použit pyren. Jako tenzidy byly použity kationtový tenzid CTAB, aniontový tenzid SDS a neionogenní tenzid Triton X-100.

Nejdříve byla zjištěna kritická micelární koncentrace pomocí pyrenu, který byl vybrán jako známá sonda pro stanovení kritické micelární koncentrace. Pro CTAB byla hodnota kritické micelární koncentrace stanovena z inflexního bodu na 1,03 mM. Hodnota kritické micelární koncentrace pro SDS byla stanovena z minima funkce na 7,11 mM. U Tritonu X-100 byla hodnota kritické micelární koncentrace stanovena z inflexního bodu na 0,24 mM.

Hodnoty kritické micelární koncentrace byly stanoveny i pomocí 1-naftolu. U CTAB na rozdíl od měření s pyrenem nebyla kritická micelární koncentrace stanovena z inflexního bodu, nýbrž z minima funkce na 1,01 mM měřením stacionární fluorescence a z maxima funkce na 0,97 mM měřením časově rozlišené fluorescence. Pro SDS byly hodnoty stanoveny stejně jako s použitím pyrenu z minima funkce, a to na 8,95 mM pro stacionární fluorescenci a na 8,92 mM pro časově rozlišenou fluorescenci. Tyto hodnoty jsou ovšem mnohem vyšší v porovnání se stanovením pomocí pyrenu. Hodnota kritické micelární koncentrace Tritonu X-100 stanovená z minima funkce na 0,24 mM pro stacionární fluorescence odpovídá hodnotě z inflexního bodu stanovené pomocí pyrenu. Hodnota určená z časově rozlišené fluorescence na 0,22 mM byla stanovena z inflexního bodu stejně jako při měření s pyrenem. Pro stanovení kritické micelární koncentrace všech typů tenzidů lze 1-naftol využít. U tenzidů, jejichž hodnota kritické micelární koncentrace není vysoká, odpovídá hodnota kritické micelární koncentrace minimu funkce a ne inflexnímu bodu jako v případě pyrenu. U tenzidů s vyšší hodnotou kritické micelární koncentrace odpovídá, stejně jako u pyrenu, hodnota stanovená z minima funkce.

Měřeními stacionární fluorescence byly pozorovány změny intenzity fluorescence aniontové i neutrální formy 1-naftolu. U kationtového tenzidu CTAB docházelo s rostoucí koncentrací CTAB ke zvýšení intenzity fluorescence obou forem 1-naftolu, 1-naftol se nacházel ve Sternově vrstvě a deprotonace nebyla potlačena natolik, aby docházelo k převýšení intenzity aniontové formy formou neutrální, obdobně jako u neutrálního Tritonu X-100. Oproti tomu u SDS byla deprotonace s rostoucí koncentrací SDS potlačena, 1-naftol byl lokalizován uvnitř micel a po kritické micelární koncentraci k převýšení intenzit došlo. Měřeními časově rozlišené fluorescence byly spočteny rychlostní konstanty deprotonace. U všech tří tenzidů byly před dosažením kritické micelární koncentrace pozorovány vysoké hodnoty rychlostní konstanty deprotonace. Po dostatečné koncentraci tenzidů ve vzorcích docházelo k solubilizaci 1-naftolu do micel a u všech tří tenzidů je viditelný pokles rychlostních konstant deprotonace. Ve vzorcích za kritickou micelární koncentrací už hodnoty rychlostních konstant neklesaly.

Další sondou podstupující přenos protonu v excitovaném stavu byl HPTS. Měřeními stacionární i časově rozlišené fluorescence bylo zjištěno, že se z důvodu náboje na molekulách

HPTS k micelám SDS ani Tritonu X-100 neváže. Měřením stacionární fluorescence systému HPTS s CTAB byla stanovena kritická micelární koncentrace na 0,97 mM z inflexního bodu funkce stejně jako u měření s pyrenem. Hodnota stanovená měřením časově rozlišené fluorescence byla stanovena z maxima funkce na 0,78 mM, což je oproti skutečné hodnotě mnohem nižší hodnota. HPTS tedy může být jako sonda využita pro stanovení kritické micelární koncentrace, ale pouze kationtových tenzidů, měřením stacionární fluorescence z inflexního bodu obdobně jako v případě pyrenu.

Před dosažením kritické micelární koncentrace byla intenzita aniontové formy HPTS mnohem vyšší než intenzita neutrální formy HPTS. Kolem této koncentrace CTAB docházelo ke zlomu a za kritickou micelární koncentrací byla mnohem vyšší intenzita neutrální formy HPTS, takže většina molekul sondy byla solubilizována uvnitř micel. Měřením časově rozlišené fluorescence HPTS byly stanoveny rychlostní konstanty deprotonace. U vzorků s tenzidy SDS a Tritonem X-100 jsou hodnoty rychlostních konstant deprotonace neliší a odpovídají hodnotám u CTAB před dosažením kritické micelární koncentrace, čímž bylo opět potvrzeno, že se HPTS k těmto tenzidům neváže a deprotonace není ničím potlačena. Rychlostní konstanty deprotonace HPTS s CTAB vykazují stejný trend jako u 1-naftolu, tedy konstantní hodnoty před kritickou micelární koncentrací, poté snížení hodnot rychlostních konstant potlačením deprotonace a za kritickou micelární koncentrací opět konstantní hodnoty rychlostních konstant deprotonace.

Poslední zkoumanou sondou byla 3HNA, která na rozdíl od 1-naftolu a HPTS podstupuje intramolekulární přenos protonu v excitovaném stavu. Měřením stacionární fluorescence byl pozorován lineární vzrůst ESIPT emise 3HNA s rostoucí koncentrací CTAB. U Tritonu X-100 za kritickou micelární koncentrací k vzrůstu ESIPT emise 3HNA docházelo, nicméně ne tak viditelně jako v případě CTAB. V systému s SDS byla intenzita ESIPT emise 3HNA beze změny, 3HNA s SDS nevykazuje žádné vzájemné interakce. K obdobným závěrům spěje i časově rozlišené měření. Doba života volné 3HNA byla stanovena na 1,6 ns. V systému s CTAB docházelo k interakcím 3HNA a ke vzrůstu průměrné doby život. U Tritonu X-100 docházelo ke zvýšení průměrné doby života až za kritickou micelární koncentrací. Hodnota doby života 3HNA v systému s SDS odpovídá ve všech vzorcích samotné 3HNA, což opět značí, že zde nedocházelo k interakcím 3HNA s SDS. Vzhledem k prudkému vzrůstu jak intenzit, tak dob života 3HNA v systému s CTAB a téměř žádných rozdílů v intenzitách a dobách života 3HNA v systému s SDS a Tritonem X-100 není 3HNA vhodnou sondou pro určování kritické micelární koncentrace.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] LAKOWICZ, Joseph R. 2006. *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3rd ed. New York: Springer, xxvi, 954 p. ISBN 03-873-1278-1.
- [2] BARTOVSKÁ, Lidmila a Marie ŠIŠKOVÁ. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. Vyd. 6., přeprac. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2010, 262 s. ISBN 978-80-7080-745-3.
- [3] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003, 132 s. ISBN 80-863-6907-2.
- [4] HOLMBERG, Krister. 2003. *Surfactants and polymers in aqueous solution*. 2nd ed. Chichester: John Wiley, xvi, 545 s. ISBN 04-714-9883-1.
- [5] DOMINGUEZ, Ana, Aurora FERNANDEZ, Noemi GONZALEZ, Emilia IGLESIAS a Luis MONTENEGRO. 1997. Determination of Critical Micelle Concentration of Some Surfactants by Three Techniques. *Journal of Chemical Education*. 74(10). DOI: 10.1021/ed074p1227.
- [6] CARMONA-RIBEIRO, Ana a Leticia de Melo CARRASCO. 2013. Cationic Antimicrobial Polymers and Their Assemblies. *International Journal of Molecular Sciences*. 14(5): 9906-9946. DOI: 10.3390/ijms14059906.
- [7] ROY, Durba, Rana KARMAKAR, Sudip Kumar MONDAL, Kalyanasis SAHU a Kankan BHATTACHARYYA. 2004. Excited state proton transfer from pyranine to acetate in a CTAB micelle. *Chemical Physics Letters*. 399(1-3): 147-151. DOI: 10.1016/j.cplett.2004.09.125.
- [8] MANDAL, Debabrata, Samir Kumar PAL a Kankan BHATTACHARYYA. Excited-State Proton Transfer of 1-Naphthol in Micelles. *The Journal of Physical Chemistry A*. 1998, **102**(48), 9710-9714. DOI: 10.1021/jp982483n. ISSN 1089-5639. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jp982483n>
- [9] AGUIAR, J., P. CARPENA, J.A. MOLINA-BOLÍVAR a C. : 3 ratio method. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2003, **258**(1). DOI: 10.1016/S0021-9797(02)00082-6. ISSN 00219797. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021979702000826>
- [10] MONDAL, Tridib, Atanu Kumar DAS, Dibyendu Kumar SASMAL a Kankan BHATTACHARYYA. 2010. Excited State Proton Transfer in Ionic Liquid Mixed Micelles. *The Journal of Physical Chemistry B*. 114(41): 13136-13142. DOI: 10.1021/jp1058758.
- [11] SUKUL, Dipankar, Samir Kumar PAL, Debabrata MANDAL, Sobhan SEN a Kankan BHATTACHARYYA. Excited State Proton Transfer as a Probe for Polymer–Surfactant Interaction. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2000, 104(26), 6128-6132. DOI: 10.1021/jp993748g. ISSN 1520-6106. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jp993748g>
- [12] SPIES, Christian, Shay SHOMER, Björn FINKLER, Dina PINES, Ehud PINES, Gregor JUNG a Dan HUPPERT. Solvent dependence of excited-state proton transfer from pyranine-derived photoacids. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2014, 16(19), 9104-. DOI: 10.1039/c3cp55292f. ISSN 1463-9076. Dostupné také z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c3cp55292f>

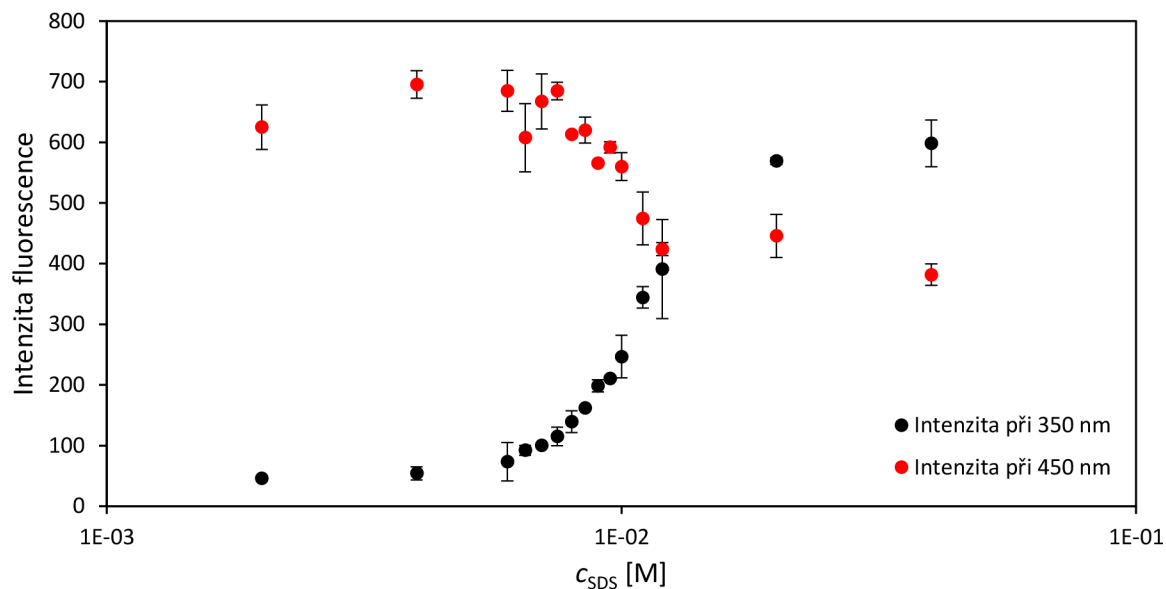
- [13] MONDAL, Sudip Kumar, Subhadip GHOSH, Kalyanasis SAHU, Pratik SEN a Kankan BHATTACHARYYA. Excited-state proton transfer from pyranine to acetate in methanol. *Journal of Chemical Sciences*. 2007, 119(2), 71-76. DOI: 10.1007/s12039-007-0012-x. ISSN 0253-4134. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s12039-007-0012-x>
- [14] MISHRA, Hirdyesh. Photo-Induced Relaxation and Proton Transfer in Some Hydroxy Naphthoic Acids in Polymers. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2006, 110(19), 9387-9396. DOI: 10.1021/jp052371d. ISSN 1520-6106. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jp052371d>
- [15] MAITY, Shyam Sundar, Subhodip SAMANTA, Pinki Saha SARDAR, Anirban PAL, Swagata DASGUPTA a Sanjib GHOSH. Fluorescence, anisotropy and docking studies of proteins through excited state intramolecular proton transfer probe molecules. *Chemical Physics*. 2008, 354(1-3), 162-173. DOI: 10.1016/j.chemphys.2008.10.020. ISSN 03010104. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301010408004813>
- [16] LI, HaiLi, HongRu LI, Long YANG, XiaoFang XU, ShengTao ZHANG a Fang GAO. Excited state intramolecular proton transfer fluorescence emission of o-hydroxyphenyl-triazine derivatives. *Chinese Science Bulletin*. 2011, 56(14), 1457-1460. DOI: 10.1007/s11434-011-4473-4. ISSN 1001-6538. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s11434-011-4473-4>
- [17] DUTTA, Partha, Arnab HALDER, Saptarshi MUKHERJEE, Pratik SEN, Sobhan SEN a Kankan BHATTACHARYYA. Excited State Proton Transfer of 1-Naphthol in a Hydroxypropylcellulose/Sodium Dodecyl Sulfate System. *Langmuir*. 2002, 18(21), 7867-7871. DOI: 10.1021/la020390y. ISSN 0743-7463. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la020390y>
- [18] GIESTAS, Letícia, Chang YIHWA, João C. LIMA, Carolina VAUTIER-GIONGO, António LOPES, Antonio L. MAÇANITA a Frank H. QUINA. The Dynamics of Ultrafast Excited State Proton Transfer in Anionic Micelles †. *The Journal of Physical Chemistry A*. 2003, 107(18), 3263-3269. DOI: 10.1021/jp0265900. ISSN 1089-5639. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jp0265900>

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

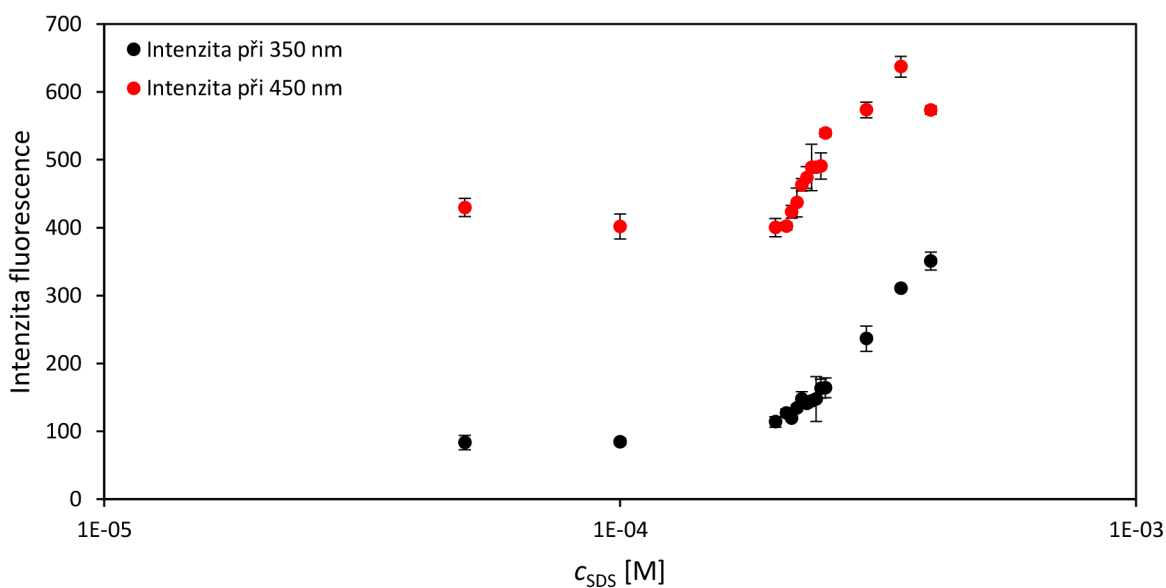
PAL	povrchově aktivní látka
CTAB	cetyltrimethylamonium bromid
CMC	kritická micelární koncentrace
EmPI	emisní polaritní index
ESPT	přenos protonu v excitovaném stavu
ROH	neutrální forma sondy
RO ⁻	aniontová forma sondy
ESIPT	intramolekulární přenos protonu v excitovaném stavu
3HNA	3-hydroxy-2-naftolová kyselina
HPTS	8-hydroxypyren-1,3,6-trisulfonát
CAC	kritická agregační koncentrace
CFD	constant function discriminator
TAC	time-to-amplitude converter
PGA	programmable gain amplifier
ADC	analog-to-digital converter
TCSPC	time-correlated single photon counting
S ₀	základní singletová hladina
S ₁	první excitovaná singletová hladina
S ₂	druhá excitovaná singletová hladina
T ₁	první tripletový stav
ϕ_F	kvantový výtěžek fluorescence
N_F	počet soustavou vyzářených kvant
N	počet zářivých kvant absorbovaných soustavou
I	intenzita fluorescence
I_0	intenzita fluorescence v čase $t = 0$
τ	doba života fluoroforu
λ	vlnová délka
y	poměr intenzit prvního a třetího maxima
x	celková koncentrace tenzidu
A_1	maximum funkce
A_2	minimum funkce
x_0	inflexní bod sigmoidní křivky
Δx	gradient
$(x_{CMC})_1$	hodnota CMC v inflexním bodě funkce
$(x_{CMC})_2$	hodnota CMC v minimu funkce
$(x_{CMC})_3$	hodnota CMC v maximu funkce
A	fitovací parametr
B	předexponenciální funkce, relativní zastoupení doby života
k_{ROH}	rychlostní konstanta neutrální formy sondy
k_{RO^-}	rychlostní konstanta aniontové formy sondy
k_{PT}	rychlostní konstanta přenosu protonu
M	$\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$
IRF	instrument response function

9 PŘÍLOHY

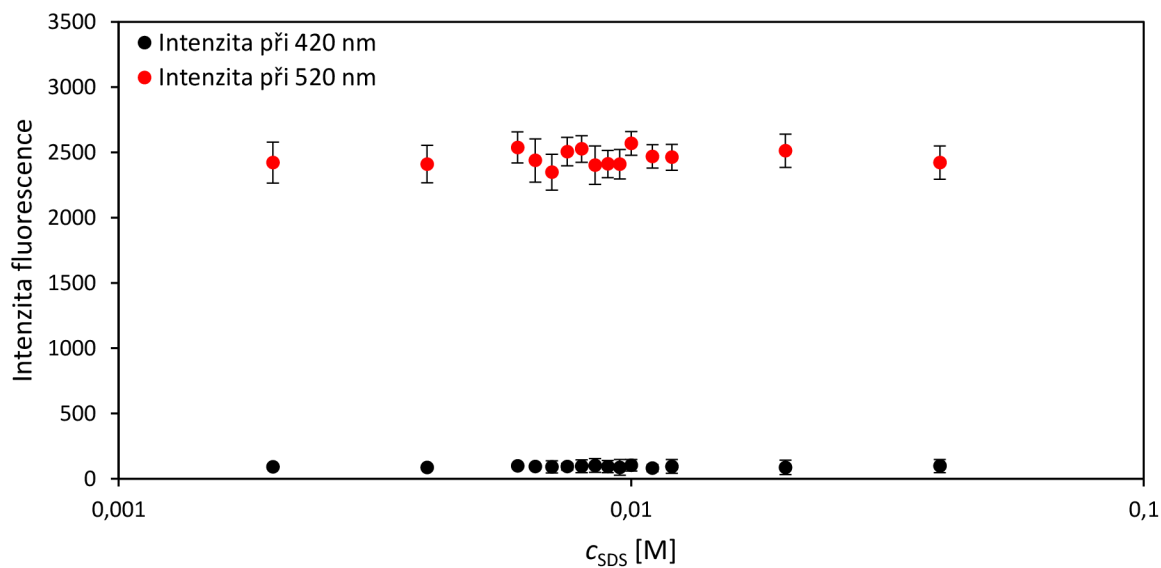
Příloha 1 Závislost intenzity neutrální (350 nm) a aniontové (450 nm) formy 1-naftolu na koncentraci SDS. Osa x je v logaritmickém měřítku.



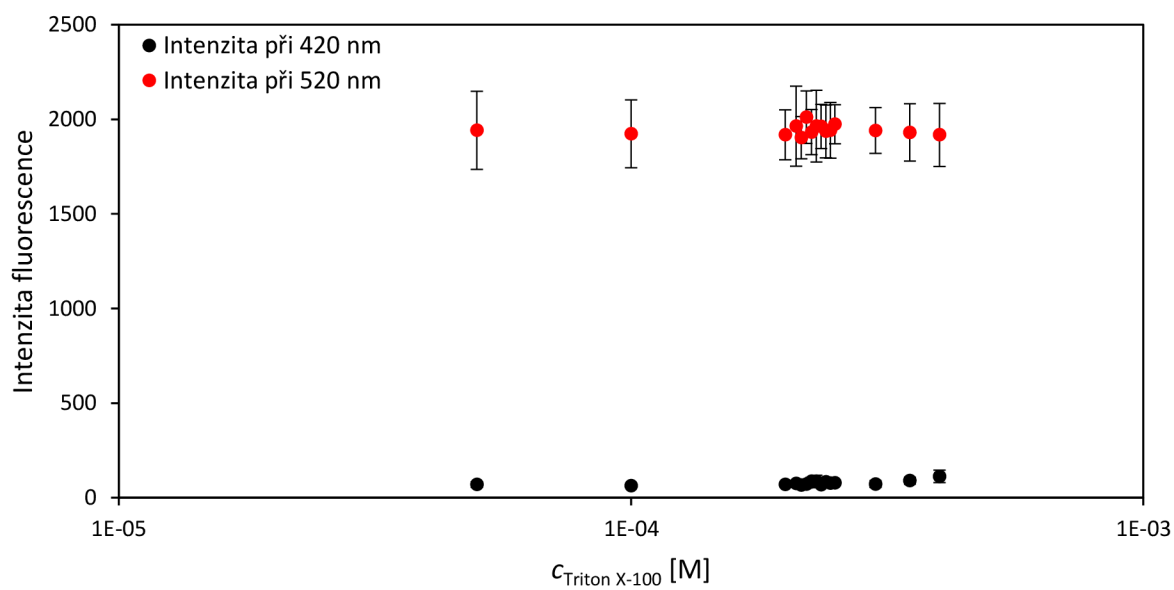
Příloha 2 Závislost intenzity neutrální (350 nm) a aniontové (450 nm) formy 1-naftolu na koncentraci Tritonu X-100. Osa x je v logaritmickém měřítku.



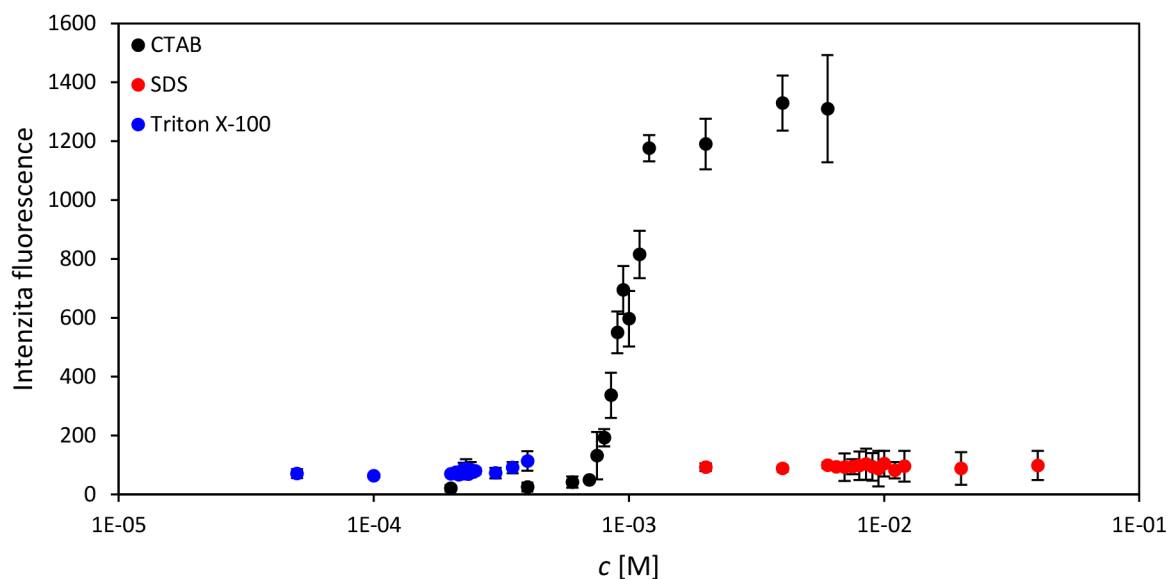
Příloha 3 Závislost intenzity neutrální (420 nm) a aniontové (520 nm) formy HPTS na koncentraci SDS. Osa x je v logaritmickém měřítku.



Příloha 4 Závislost intenzity neutrální (420 nm) a aniontové (520 nm) formy HPTS na koncentraci Tritonu X-100. Osa x je v logaritmickém měřítku.



Příloha 5 Závislost intenzity neutrální (420 m) formy HPTS na koncentraci tenzidů CTAB, SDS a Tritonu X-100. Osa x je v logaritmickém měřítku.



Příloha 6 Doby života 3HNA (τ_1 , τ_2), jejich relativní zastoupení (B_1 , B_2) průměrná doba života 3HNA (τ) v systému s CTAB.

Vzorek	c [M]	τ_1 [s]	B_1 [%]	τ_2 [s]	B_2 [%]	τ [ns]
0	0	1,64E-09	100	-	-	1,64
1	2,00E-04	2,48E-09	16,11	4,81E-09	83,89	4,44
2	4,00E-04	2,54E-09	13,63	4,98E-09	86,37	4,64
3	6,00E-04	2,53E-09	11,09	5,07E-09	88,91	4,79
4	7,00E-04	2,46E-09	9,40	5,10E-09	90,60	4,85
5	7,50E-04	2,56E-09	7,76	5,12E-09	92,24	4,92
6	8,00E-04	1,96E-09	7,15	5,13E-09	92,85	4,91
7	8,50E-04	2,23E-09	5,60	5,14E-09	94,40	4,98
8	9,00E-04	2,41E-09	5,49	5,14E-09	94,51	4,99
9	9,50E-04	2,52E-09	5,20	5,19E-09	94,80	5,05
10	1,00E-03	2,37E-09	5,06	5,19E-09	94,94	5,04
11	1,10E-03	2,52E-09	4,52	5,43E-09	95,48	5,30
12	1,20E-03	2,72E-09	4,09	5,43E-09	95,91	5,32
13	2,00E-03	2,52E-09	3,20	5,48E-09	96,80	5,38
14	4,00E-03	2,40E-09	2,74	5,51E-09	97,26	5,43
15	6,00E-03	2,41E-09	1,47	5,55E-09	98,53	5,50

Příloha 7 Doby života 3HNA (τ_1 , τ_2), jejich relativní zastoupení (B_1 , B_2) průměrná doba života 3HNA (τ) v systému s SDS.

Vzorek	c [M]	τ_1 [s]	B_1 [%]	τ_2 [s]	B_2 [%]	τ [ns]
0	0	1,62E-09	100	-	-	1,62
1	2,00E-03	1,66E-09	100	-	-	1,66
2	4,00E-03	1,61E-09	100	-	-	1,61
3	6,00E-03	1,62E-09	100	-	-	1,62
4	6,50E-03	1,64E-09	100	-	-	1,64
5	7,00E-03	1,62E-09	100	-	-	1,62
6	7,50E-03	1,61E-09	100	-	-	1,61
7	8,00E-03	1,63E-09	100	-	-	1,63
8	8,50E-03	1,63E-09	100	-	-	1,63
9	9,00E-03	1,63E-09	100	-	-	1,63
10	9,50E-03	1,62E-09	100	-	-	1,62
11	1,00E-02	1,60E-09	100	-	-	1,60
12	1,10E-02	1,63E-09	100	-	-	1,63
13	1,20E-02	1,62E-09	100	-	-	1,62
14	2,00E-02	1,61E-09	100	-	-	1,61
15	4,00E-02	1,64E-09	100	-	-	1,64

Příloha 8 Doby života 3HNA (τ_1 , τ_2), jejich relativní zastoupení (B_1 , B_2) průměrná doba života 3HNA (τ) v systému s Tritonem X-100.

Vzorek	c [M]	τ_1 [s]	B_1 [%]	τ_2 [s]	B_2 [%]	τ [ns]
0	0	1,62E-09	100,00	-	-	1,62
1	5,00E-05	1,62E-09	100,00	-	-	1,62
2	1,00E-04	1,66E-09	95,53	6,71E-10	4,47	1,61
3	2,00E-04	1,65E-09	95,27	6,78E-10	4,73	1,60
4	2,10E-04	1,63E-09	94,84	6,84E-10	5,16	1,58
5	2,15E-04	1,67E-09	94,84	6,90E-10	5,16	1,62
6	2,20E-04	1,61E-09	94,60	7,18E-10	5,40	1,57
7	2,25E-04	1,70E-09	92,71	7,22E-10	7,29	1,63
8	2,30E-04	1,64E-09	92,45	7,33E-10	7,55	1,57
9	2,35E-04	1,66E-09	91,77	8,11E-10	8,23	1,59
10	2,40E-04	1,67E-09	91,57	8,18E-10	8,43	1,60
11	2,45E-04	1,64E-09	88,66	9,92E-10	11,34	1,57
12	2,50E-04	1,64E-09	86,84	1,16E-09	13,16	1,58
13	3,00E-04	1,88E-09	68,21	1,42E-09	31,79	1,73
14	3,50E-04	2,20E-09	33,53	1,50E-09	66,47	1,73
15	4,00E-04	3,48E-09	21,77	2,79E-09	78,23	2,94