

Stanovení přítomnosti methanolu v alkoholických nápojích

Determination of the Presence of Methanol in Alcoholic Beverages

Miriama Novosadová

Bakalářská práce
2013



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta aplikované informatiky

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta aplikované informatiky
akademický rok: 2012/2013

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Miriama NOVOSADOVÁ**
Osobní číslo: **A09289**
Studijní program: **B3902 Inženýrská informatika**
Studijní obor: **Informační a řídicí technologie**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Stanovení přítomnosti methanolu v alkoholických nápojích**

Zásady pro vypracování:

1. Uvedte základní fakta týkající se "metanolové kauzy" v ČR.
2. Seznamte se s metodami užívanými pro stanovení methanolu v konzumních lihovinách.
3. Nastudujte základní principy Ramanovy spektroskopie a měření na Ramanově spektrometru.
4. Zhodnoťte výhody a nevýhody Ramanovy spektroskopie v porovnání s ostatními uvedenými metodami.
5. Připravte vzorky pro naměření kalibračních křivek.
6. Naměřte spektrální data a diskutujte limity metody.
7. Vypracujte metodiku pro kvantitativní určení podílu methanolu a ethanolu v konzumních lihovinách.

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

1. **MATTER**, Edited by Lothar a Translated by Anthony J. RACKSTRAW. Food and environmental analysis by capillary gas chromatography hints for practical use [online]. Heidelberg: HüthigVerlag, 1997 [cit. 2013-02-01]. ISBN 527297146.
2. **HOLLAS, J.** Modern spectroscopy. 4th ED. Chichester: John Wiley, 2004, 452 s. ISBN 04-708-4416-7.
3. **LIN, K., ZHOU, X., LUO, Y., LIU, S.** The Microscopic Structure of Liquid Methanol from Raman Spectroscopy. The Journal of Physical Chemistry. 2010, roč. 114, č. 10, s. 3567-3573. ISSN 1520-6106. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jp9121968>
4. **PROSSER, Václav.** Experimentální metody biofyziky. 1. vyd. Praha: Academia, 1989, 712 s.
5. **Novinky v oblasti rychlého screeningu obsahu methanolu v alkoholických nápojích** [online]. 2013. Dostupné z: <http://www.rmi.cz/novinky/novinky-v-oblasti-rychleho-screeningu-obsahu-methanolu-v-alkoholickych-napojich> ČSN 56 0210-9 – Metody zkoušení lihovin. Stanovení methanolu v brandy a vinném destilátu. Technická norma.

Vedoucí bakalářské práce:

Mgr. Hana Vašková

Ústav elektroniky a měření


Datum zadání bakalářské práce:

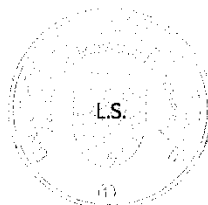
24. února 2013

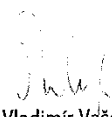
Termín odevzdání bakalářské práce:

14. června 2013

Ve Zlíně dne 24. února 2013


prof. Ing. Vladimír Vašek, CSc.
děkan




prof. Ing. Vladimír Vašek, CSc.
ředitel ústavu

ABSTRAKT

Hlavným podnetom k vypracovaniu tejto BP bola udalosť z jesene 2012, kedy sa v Českej republike vyskytlo viacero prípadov otravy metanolom, ktorý obsahovali na čierno vyrobené liehoviny. Tento pančovaný alkohol má za následok niekoľko desiatok životov. Pomocou Ramanovej spektroskopie sa dá jednoducho a rýchlo zistiť, či sa metanol nachádza v vzorke alebo nie. V praktickej časti sú skúmané vzorky s obsahom metanolu, vyhotovené kalibračné krivky a dôkaz toho, že aj z neznámej vzorky sa dá zistiť koncentrácia prítomného metanolu. Preto Ramanova metóda je vhodná k preverovaniu liehovín, aj keď je zatiaľ necertifikovaná.

Kľúčové slová: Ramanova spektroskopia, metanol, kalibračné krivky

ABSTRACT

The main and initial impulse for creating this thesis was an event that occurred autumn 2012 in Czech Republic. There were several cases of methanol poisoning from bootlegged spirits which resulted in dozens of deaths. With the utilization of Raman's spectroscopy it is simple and quick to find out whether methanol is present in the sample or not. In the practical part of the thesis samples with certain amounts of methanol are examined, calibration curves and a proof that concentration of methanol can be established even from an unknown sample are created. Therefore Raman's method is suitable for attesting of spirits, although it is still uncertified.

Keywords: Raman spectroscopy, methanol, calibration curves

Tu, na tomto mieste, by som sa chcela veľmi poďakovať môjmu otcovi a blízkym za podporu v štúdiu a zázemie, ktoré mi bolo poskytnuté.

Veľké ďakujem patrí aj vedúcej bakalárskej práce Mgr. Hane Vaškovej za odbornú prípravu a pripomienkam k práci. Ďalej, že poctivo a odborne dohliadala a pomáhala na merania v laboratóriu.

Prehlasujem, že odovzdaná verzia bakalárskej práce a verzia nahraná do IS/STAG sú totožné.

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby;
- beru na vědomí, že bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k prezenčnímu nahlédnutí, že jeden výtisk bakalářské práce bude uložen v příruční knihovně Fakulty aplikované informatiky Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3;
- beru na vědomí, že podle § 60 odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 odst. 2 a 3 autorského zákona mohu užít své dílo – bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Prohlašuji,

- že jsem na bakalářské práci pracoval samostatně a použitou literaturu jsem citoval. V případě publikace výsledků budu uveden jako spoluautor.
- že odevzdaná verze bakalářské práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

Ve Zlíně

.....
podpis diplomanta

OBSAH

ÚVOD	8
I TEORETICKÁ ČÁST	9
1 METHANOLOVA KAUZA V ČESKEJ REPUBLIKE	10
1.1 ALKOHOLY.....	10
1.2 METHANOL.....	11
1.3 ETHANOL.....	11
1.4 METABOLIZMUS ETHANOLU.....	11
1.5 INTOXIKÁCIA METHANOLOM.....	12
2 PLYNOVÁ CHROMATOGRAFIA	14
2.1 PRINCÍP PLYNOVEJ CHROMATOGRAFIE.....	14
2.2 ZISŤOVANIE PRÍTOMNOSTI METHANOLU PLYNOVOU CHROMATOGRAFIOU.....	15
3 CHARAKTERISTIKA RAMANOVEJ SPEKTROGRAFIE	16
3.1 VZNIK RAMANOVEJ METÓDY.....	16
3.2 CHARAKTERISTIKA ELEKTROMAGNETICKÉHO ŽIARENIA.....	16
3.3 MOLEKULOVÉ VIBRÁCIE.....	17
3.3.1 Biatomická molekula.....	17
3.3.2 Viacatómová molekula.....	18
3.4 PRINCÍPY RAMANOVEJ SPEKTROSKOPIE.....	19
3.5 RAMANOVO SPEKTRUM.....	20
4 POUŽITIE RAMANOVEJ SPEKTROSKOPIE	21
4.1 VYBRANÉ PŘÍKLADY POUŽITIA RAMANOVEJ SPEKTROSKOPIE.....	21
4.2 VÝHODY A NEVÝHODY POUŽITIA RAMANOVEJ SPEKTROSKOPIE.....	22
II PRAKTICKÁ ČÁST	24
5 VYPRACOVANIE CIEĽOV PRAKTICKEJ ČASTI	25
5.1 RAMANOV MIKROSKOP.....	25
5.2 PŘÍPRAVA JEDNOTLIVÝCH VZORIEK.....	25
5.3 POSTUP MERANIA SPEKTRÁLNYCH DÁT.....	26
5.4 ZOSTAVENIE KALIBRAČNÝCH KRIVIEK.....	28
5.5 VYPRACOVANIE METODIKY PRE UČENIE PODIELU METHANOLU A ETHANOLU V NEZNÁMYCH VZORKÁCH.....	30
5.5.1 Overenie výpočtom.....	31
5.6 ANALÝZA VZORIEK BEŽNE DOSTUPNÝCH ALKOHOLICKÝCH NÁPOJOV.....	34
ZÁVĚR	37
ZÁVĚR V ANGLIČTINĚ	38
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	39
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	40
SEZNAM OBRÁZKŮ	41
SEZNAM TABULEK	42
SEZNAM PŘÍLOH	CHYBA! ZÁLOŽKA NENÍ DEFINOVÁNA.

ÚVOD

Methanolová kauza na jeseň 2012 zaujala pozornosť nejedného občana. Táto časovaná bomba vypukla na území Moravskoslezského kraja. Ľudia, ktorí konzumovali nekvalitný alkohol sa otrávil metylom, ktorý sa nachádzal v niektorých druhoch liehovín vyrobených v ČR. Prípadov otrávených ľudí stále pribúdalo a trvalo kým sa podarilo odhaliť odkiaľ sa nekvalitný alkohol šíri. Zaznamenané boli aj smrteľné prípady. Ani s vyhlásenou prohibíciou problémy neutíchali, stále boli objavované miesta kde sa tento alkohol nelegálnou cestou vyrábal. Zaujímavosťou bolo, že tento alkohol sa predával aj v obchodných sieťach s riadne okolkovanými fľašami. Testovanie prebieha pomocou certifikovaných metód ako sú napríklad certifikovaná chromatografia. Tento výkon je však finančne a časovo náročný.

Pre analýzu podozrivých liehovín sa dá využiť aj metóda Ramanovej spektroskopie, ktorá patrí medzi spektrofotometrické metódy založené na využití elektromagnetického žiarenia. Touto metódou sa účinne a rýchlo stanovuje prítomnosť metylalkoholu v alkoholických nápojoch. K analýze stačí malá vzorka, ktorá sa dá merať priamo cez obalový materiál. Ramanova spektroskopia má široké využitie v mnohých vedných disciplínach. Využiť sa dá v biomedicíne, farmaceutike, mineralógii a iných. Analýza liehovín sa dá zaradiť medzi bezpečnostné aplikácie. Taktiež môže byť použitá k identifikácii neznámych látok, liečiv a drog.

Cieľom práce je skúmať a analyzovať vzorky s obsahom metylu v alkoholických nápojoch. Následné vypracovanie metodiky pre kvantitatívne určenie podielu methanolu a ethanolu v konzumných liehovinách. Metodika sa vypracuje pomocou nameraných spektrier a bude aplikovaná na troch neznámych vzorkách. U týchto vzoriek je potreba čo najpresnejšie určiť ich koncentráciu. Praktická časť bola meraná za pomoci Ramanovho mikroskopu, ktorý je k dispozícii v laboratóriu na FAI UTB. Ponúka veľa možností, ktoré možno využiť k analýze rôznych látok a ich vlastnostiam.

Metodika, ktorá bola v tejto práci vypracovaná môže ďalej poslúžiť ako základ pre praktické úlohy z bezpečnostných aplikácií.

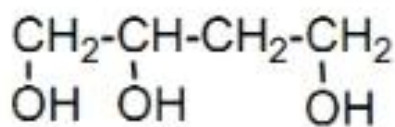
I. TEORETICKÁ ČÁST

1 METHANOLOVA KAUZA V ČESKEJ REPUBLIKE

K sériám otráv zapríčineným methanolom, došlo v Českej republike na jeseň 2012. Prvé dva prípady úmrtia boli zaznamenané v Havířove 6. septembra 2012. Následne vláda ČR plošne zakázala úplný predaj a distribúciu alkoholu s obsahom nad 20%, v tej dobe mal už methanol za následok 19 obetí. Následne zakázali obchodovanie s alkoholom s obsahom nad 20% vyrobeným v ČR, Poľsko a Slovensko. Na Slovensku boli tiež zaznamenané štyri prípady otravy, tento alkohol bol privezený z ČR, našťastie sa ani jeden prípad nekončil smrťou. Prohibícia trvala necelý mesiac. V ČR sa ku dňu 3. apríla 2013 otrávil celkom 127 ľudí, z toho 43 obetí zomrelo. Polícia obvinila 60 ľudí, páchatelom hrozia tresty za obecné ohrozenie odňatie slobody na dvanásť až dvadsať rokov. [1]

1.1 Alkoholy

Alkoholy patria do skupiny hydroxyderivátov. Ide o zlúčeniny obsahujúce jednoväzbové hydroxylové skupiny $-OH$. Ak je $-OH$ skupina naviazaná na uhlíku $C-sp^3$, ide o alkoholy. Pri fenoloch je $-OH$ skupina naviazaná na $C-sp^2$.



bután-1, 2, 4-triol

Obr. 1 Chemický vzorec alkoholu

Rozpustnosť alkoholov klesá s rastúcim počtom uhlíkov v molekule. Alkoholy sa používajú ako prísady do rôznych rozpúšťadiel farieb a nemrznúcich zmesí. Všetky alkoholy sú ľahšie ako voda. Kvapalné alkoholy majú narkotické účinky a sú jedovaté. Nižšie alkoholy sú bezfarebné kvapaliny s omamnou vôňou, sú dobre rozpustné vo vode a majú nižšie teploty varu v porovnaní s inými základnými uhlíkovodíkmi. Vyššie alkoholy sú typické nepríjemným zápachom a jedná sa o olejovité bezfarebné kvapaliny. Dychovou skúškou na zistenie prítomnosti alkoholu u vodičov je založená na oxidácii etanolu s oxidačným činidlom, dichromanom draselným v kyseline sírovej. [2]

1.2 Methanol

Methanol, drevný lieh, je najjednoduchší alifatický alkohol. Je to bezfarebná kvapalina s alkoholickým zápachom, ktorú možno riediť vodou. Je to horľavá a silne jedovatá látka, ktorá sa môže ľahko pomýliť s ethanolom. Pálenky pripravované z prírodných surovín v páleniciach obsahujú taktiež určité množstvo methanolu, ktoré vzniká pri fermentácii a nie je celkovo odstránené destiláciou. Limity pre prirodzený výskyt obsahu methanolu sú dané vyhláškou č. 305/2004 Sb. Českej republiky (50-15000mg methanolu na 1l 100% ethanolu podľa typu destilátu). Dôvodom prečo sa alkohol pančuje je zaiste jeho cena na trhu a podstatnú rolu zohráva aj daň. Methanol sa priemyselne vyrába katalytickou hydrogenáciou oxidu uhoľnatého z vodného plynu, tj. zmes vodíka a oxidu uhoľnatého pri vysokých teplotách a tlaku a za prítomnosti katalyzátoru na báze medi, oxidu zinočnatého a oxidu hlinitého. Túto chemickú reakciu popisuje rovnica:



V bežne destilovaných liehovinách je povolené množstvo 12g methanolu na 1l ethanolu. Túto hraničnú hodnotu predstavuje koncentrácia 0,75% methanolu na 1l ethanolu. Vzorky, ktoré majú nižšiu hodnotu ako je hraničná hodnota vo výslednom Ramanovom spektre nemajú viditeľný methanolvý pík v oblasti 1035nm.[3]

1.3 Ethanol

Ethanol je bezfarebná kvapalina ostrej vône, ktorá je základná súčasť alkoholických nápojov. Je ľahko zápalný a preto je klasifikovaný ako horľavina 1. Najväčšia časť produkcie sa pripravuje z jednoduchých cukrov alkoholovým kvasením pôsobením rôznych druhov kvasiniek. Najznámejšie použitie ethanolu je pri výrobe alkoholických nápojov. Taktiež sa používa ako aditívum do pohonných hmôt. Môže sa dokonca uplatniť aj ako vysoko kvalitné biopalivo pre spaľovacie motory. V lekárstve sa používa ako rozpúšťadlo, pri príprave niektorých kvapalných prípravkov pre vnútorné i vonkajšie použitie a k dezinfekcii neporanenej kože. Takisto nájde svoje uplatnenie aj v kozmetickom priemysle pri výrobe parfumov, ale aj čistiacich prostriedkov. [2]

1.4 Metabolizmus ethanolu

Ethanol je dobre rozpustný vo vode a nepotrebuje trávenie. Ihneď sa vstrebáva do krvi. V pečeni sa alkohol premieňa pomocou enzýmu alkoholdehydrogenázy na formu, ktorá je

využitelná pre svaly ako zdroj energie. Veľké množstvo požitia môže poškodiť mozog. Väčšina osôb dokáže metabolizovať 100-200mg na kilogram telesnej hmotnosti za hodinu. [3]

1.5 Intoxikácia methanolom

Samotný methanol pre človeka nie až tak nebezpečný, toxickými sa stávajú až jeho metabolity a pre intoxikáciu alkoholom je charakteristická niekoľkohodinová doba latencie. V ľudskom tele sa methanol metabolizuje enzýmom alkoholdehydrogenázy na formaldehyd, ďalej na kyselinu mravčiu a nakoniec na oxid uhličitý. Tento rozklad prebieha hlavne v pečeni a na očnej sietnici, kde je spomínaný enzým prítomný. Methanol veľmi negatívne ovplyvňuje centrálnu nervovú sústavu, ale omnoho viac toxickéjšie a nebezpečnejšie sú jeho metabolity, formaldehyd a kyselina mravčia. Práve kyselina mravčia sa považuje za príčinu poškodenia sietnice, ale odborníci nevyklúčujú ani to, že methanol metabolizuje práve v oku. V tele sa rozvíja metabolická acidióza, ktorá keď nie je liečená môže končiť až smrťou. Škodlivá dávka methanolu sa nedá jednoznačne popísať vzhľadom k množstvu okolností ako napríklad zmes s ethanolom, vek, pohlavie, hmotnosť a pod. Pohybuje sa od niekoľko ml (4-10ml) do dávky 70-100ml, ktorá spôsobí smrť. Je to teda asi 1ml čistého methanolu na 1kg hmotnosti. Pri konzumácii malých dávok, ktoré sú zanedbateľné v ovocných pálenkách sa methanol z tela odbúra do jedného dňa. [4]

Pre predstavu existuje príklad, pri ktorom je použitý pohárik s obsahom 50ml.



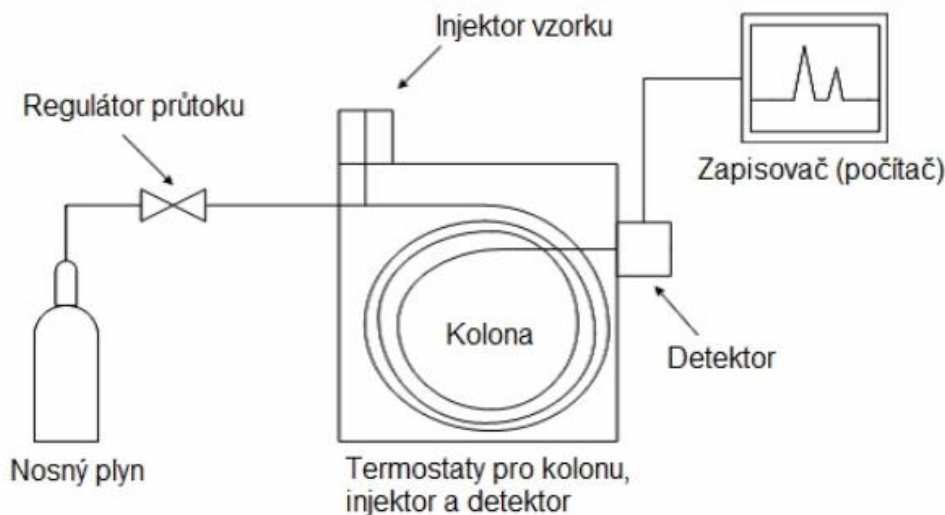
Obr. 2 Pohárik o objeme 50 ml

Predpokladá sa, že konzument pije alkoholický nápoj s 40% obsahom alkoholu (ethanolu). Čiže jeden pohárik obsahuje 20ml ethanolu. Pokiaľ by mal konzument telesnú hmotnosť 70kg, vypitím jedného pohárika, to znamená dávku $20/70 = 0,29$ ml ethanolu na jeden kilogram telesnej hmotnosti. Pri vypití „pančovaného“ alkoholu s obsahom 30% methanolu, by to asi bolo 0,09 ml na kilogram telesnej hmotnosti. Konzumenta teda môže naozaj poškodiť, či dokonca zabiť aj jeden až desať vypitých poldecových pohárikov. Nikto popredu nemôže vedieť, či práve on bude poškodený už po vypití jedného pohárika. Zdržanlivosť je teda naozaj na mieste. Státní potravinová a zemédelská inspekce Českej republiky analyzovala 23 vzoriek alkoholu, pri ktorých sa preukázalo prekročenie povolenej koncentrácie methanolu, z v siedmych vzorkách bola zistená vysoká toxická koncentrácia až cez 500 000 miligramov na liter absolútneho alkoholu, a tak methanol predstavoval cez 50% časť všetkého alkoholu vo fľaši. [5]

Pri podozrení na otravu methnanolom je nevyhnutné bezodkladne vyhľadať lekársku pomoc. Prvou pomocou je podanie ethanolu, ktorý slúži ako protijed a zabráni ďalšiemu enzymatickému rozkladu methanolu v organizme. Odporúča sa požitie 1-2 dcl kvalitného 40% alkoholického nápoja s ohľadom na telesnú hmotnosť a následné lekárske ošetrovanie, ktoré zabráni metabolizácii a korekcii acidózy.

2 PLYNOVÁ CHROMATOGRAFIA

Plynová chromatografia je analytická a separačná metóda určená k deleniu a stanoveniu plynov, kvapalín a pevných látok s bodom varu približne do 400°C. Metóda je založená na rozdeľovaní zložiek medzi dve fázy, a to fázu pohyblivú(mobilnú) a fázu nepohyblivú(stacionárnu). V plynovej chromatografii je mobilnou fázou plyn, nazývaný nosný plyn. Ako nosný plyn sa najčastejšie používajú vodík, dusík, hélium a argón. Stacionárna fáza je umiestnená v chromatografickej kolóne. Stacionárna fáza u náplňových kolón môže byť pevná látka (sílikagél, aktívne uhlie, polymérne sorbety apod.) alebo vysokovriaca kvapalina nanesená v tenkej vrstve na pevnom, internom nosiči. U kapilárnych kolón je stacionárna fáza nanesená v tenkej vrstve priamo na upravenú vnútornú stenu kremíkovej kapiláry. [6]



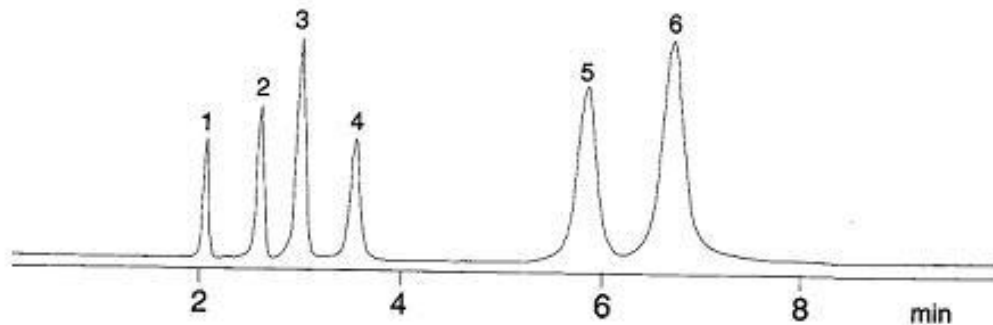
Obr. 3 Zjednodušená schéma plynového chromatografu

2.1 Princíp plynovej chromatografie

Kolónou so stacionárnou fázou neustále prechádza nosný plyn. Vzorka sa vstriečne do vyhrievaného bloku, nástreková komora(injektor), kde sa odparí a formou pár je unášaná nosným plynom do kolóny. Zložky zo vzorky sa sorbujú na začiatku kolóny stacionárnej fázy a potom desorbujú čerstvým nosným plynom. Nosný plyn unáša vzorku postupne až ku koncu kolóny a tento deliaci proces sa neustále opakuje. Každá zložka vzorky postupuje kolónou svojou vlastnou rýchlosťou závislou na distribučnej konštante:

$$K_D = \frac{c_s}{c_m}, \quad (2)$$

kde c_s a c_m sú rovnovážne koncentrácie zložky v stacionárnej a mobilnej fáze. Látky postupne vychádzajú z kolóny v poradí rastúcich hodnôt distribučných konštánt a vstupujú do detektora. Detektor indikuje okamžitú koncentráciu separovaných látok v nosnom plyne. Signál detektora je vhodne upravený a plynulo sa registruje. Výsledný grafický záznam závislosti signálu detektora na čase sa nazýva chromatogram. Pokiaľ dôjde k separácii všetkých n-zložiek analyzovanej vzorky, výsledný chromatogram n-elučných kriviek, t.j. píkov, týchto zložiek. Podľa polôh jednotlivých píkov je možné identifikovať danú látku, plocha píkov je úmerná množstvu danej zložky vo vzorke. [7]



Obr. 4 Ukážka výsledného chromatogramu

2.2 Zisťovanie prítomnosti methanolu plynovou chromatografiou

Pre zisťovanie prítomnosti methanolu sa využíva certifikovaná separačná metóda, ktorá sa nazýva plynová chromatografia. Pre skúmané vzorky môžu byť použité alkoholy samotné ale aj krv človeka, ktorý má podozrenie na intoxikáciu methanolom. Meranie je možné vykonávať len v špecializovaných a na to vybavených laboratóriách, kde laboranti postupne analyzujú dané vzorky. Meranie je časovo a finančne náročné.

3 CHARAKTERISTIKA RAMANOVEJ SPEKTROGRAFIE

3.1 Vznik Ramanovej metódy

Metóda bola objavená a pomenovaná v Kalkate po indickom fyzikovi Chandrasekhara Venkata Ramanovi (1888-1970). V roku 1922 publikoval ako prvý so spolupracovníkom K.S. Kirschmanom prácu pod názvom "Molecular Diffraction of Light" (Molekulárna difrakcia svetla), ktorá napokon viedla v roku 1928 k objavu radiačného efektu, tento obor bol po ňom pomenovaný. Za tento objav C. V. Raman v roku 1930 získal Nobelovou cenou.



Obr. 5. C. V. Raman [8]

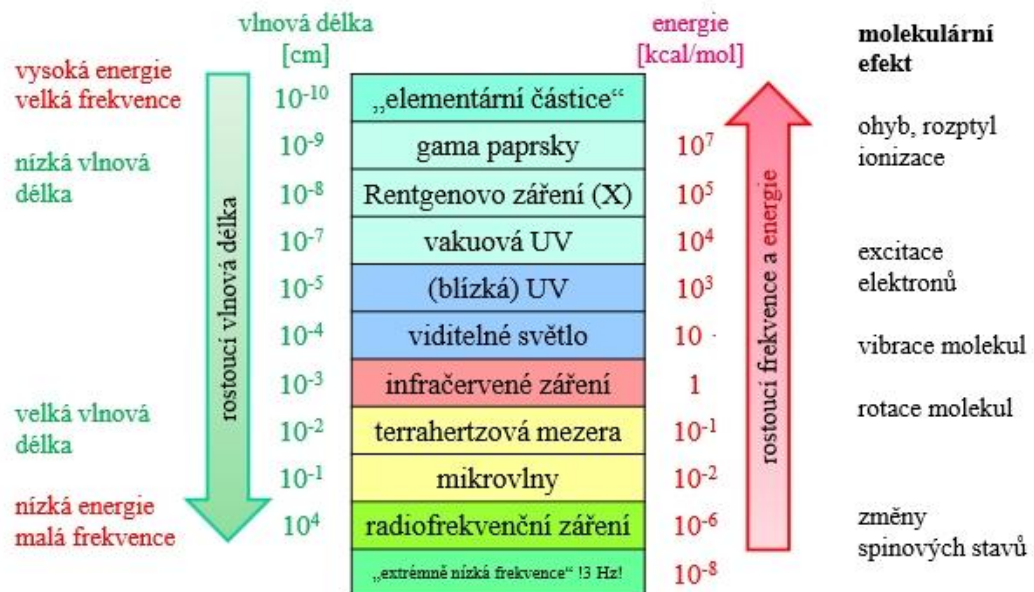
Od počiatočného vzniku bola teoretická a experimentálna práca v oblasti Ramanovej spektroskopie zameraná na základy štúdia neelastického rozptylu a aplikáciou tohto javu na štúdium molekulárnej štruktúry. Neelastické zrážky sú také zrážky, pri ktorých je časť kinetickej energie zrážajúcich sa telies behom zrážky premenená na vnútornú energiu, tzn. kinetická energia aspoň jedného zo zrážajúcich telies sa nezachová. Ramanov rozptyl je jav vznikajúci pri interakcii medzi fotónmi dopadajúceho svetla, kedy sa predáva energia vibračným a rotačným stavom atómov alebo molekúlám, kedy rozptýlené žiarenie má inú vlnovú dĺžku ako žiarenie dopadajúce. [8]

Týmto Ramanova spektroskopia dopĺňuje rodinu spektrálnych metód. Patrí medzi významné vibračné metódy.

3.2 Charakteristika elektromagnetického žiarenia

Osciláciou elektrického a magnetického poľa vznikajú elektromagnetické vlny, ktoré sú charakterizované frekvenciami, spolu tvoria spektrum. Elektromagnetické spektrum je

vytvorené z γ -žiarenia, röntgenového, ultrafialového, viditeľného a infračerveného žiarenia, po ktorých nasleduje pásmo mikrovln a rádiových vln. Človek je zrakom schopný vnímať len úzku oblasť spektra od cca 380 do 760 nm, nazývanú viditeľné svetlo. Niektoré živočíchy sú schopné vidieť aj v iných oblastiach spektra.[9]



Obr. 6 Spektrum elektromagnetického žiarenia a jeho molekulárne efekty

3.3 Molekulové vibrácie

Samotný Ramanov posun je závislý na rozdieloch medzi energetickými hladinami jednotlivých vibrácií molekúl. Aby bola vibrácia Raman aktívna, pozorovaná v Ramanovom spektre, musí byť molekula anizotropne polarizovateľná. Aktívne molekuly sú všetky lineárne a dvojatómové molekuly. S porovnaním v rámci infračervenej spektroskopie sú pozorovateľné len tie vibrácie, ktorým sa mení dipólový moment molekuly. Zmena dipólového momentu zodpovedá rozdielnym vibráciám v porovnaní s vibráciami molekúl v Ramanovej spektroskopii, z tohto dôvodu sa tieto dve metódy vzájomne veľmi dobre dopĺňajú. Látky, ktoré sú v infračervenej spektroskopii inaktívne, sú v Ramanovej spektroskopii aktívne a naopak. [10]

3.3.1 Biatomická molekula

Biatomickú vibráciu molekúl možno popísať ako periodickú zmenu medzi jadrami.

Interakcia medzi molekulami a žiarením sa prejavuje vibračným prechodom. Biatomickú vibráciu možno popísať ako harmonický oscilátor s dvoma hmotnými bodmi a pružinou, ktorý je znázornený na obrázku 7.

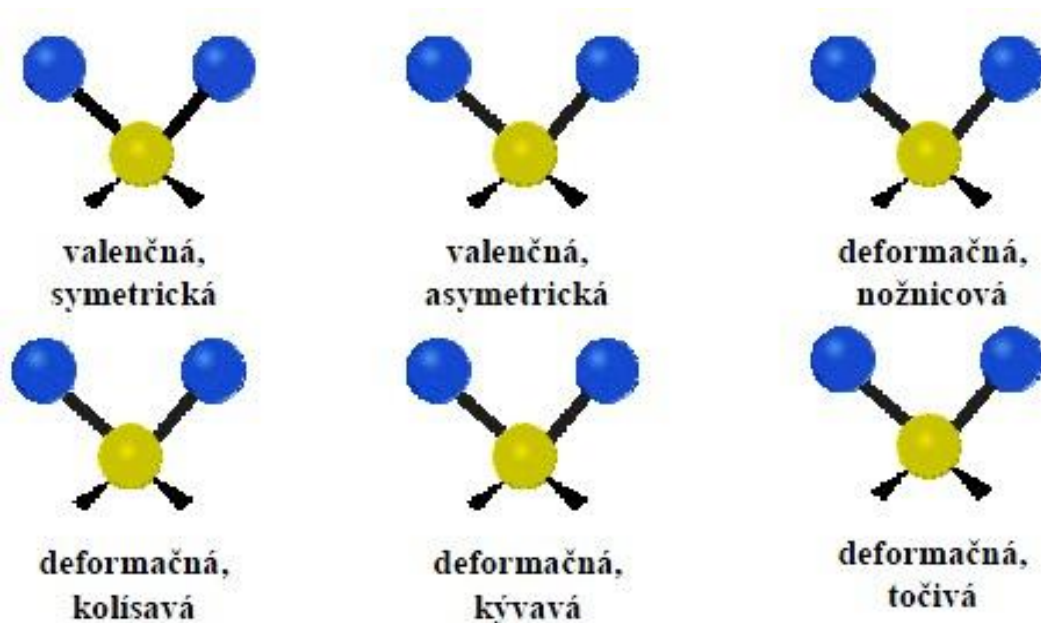


Obr. 7 Harmonický oscilátor

Na to, aby nastal prechod molekúl medzi susednými vibračnými hladinami je potrebné dodanie energie vo forme elektromagnetického žiarenia.

3.3.2 Viacatómová molekula

Viacatómovú molekulu možno popísať ako sústavu hmotných bodov, ktoré sú viazané vzájomnými silami. Súčtom jednotlivých kmitavých pohybov možno získať tzv. normálne vibrácie. Pri viacatómových molekulách počet vibrácií závisí na počte väzieb v molekule. K tomu treba brať do úvahy aj to či ide o lineárnu alebo nelineárnu molekulu. [11]



Obr. 8 Vibračné formy trojatómovej molekuly

3.4 Princípy Ramanovej spektroskopie

Ramanova spektroskopia využíva tzv. Ramanov jav, ktorý je možno charakterizovať ako neelastický rozptyl fotónov ultrafialového a viditeľného žiarenia vyvolaného excitáciou svetelného lúča laseru, pričom rozdiel medzi energiou dopadajúceho a rozptýleného fotónu odpovedá niektorému z vibračných energetických prechodov v molekule. Tento rozdiel energií vyjadruje rovnica:

$$\Delta E = h(\nu_0 - \nu_r), \quad (3)$$

kde ν_0 vyjadruje energiu dopadajúceho fotónu a ν_r energiu rozptýleného fotónu.

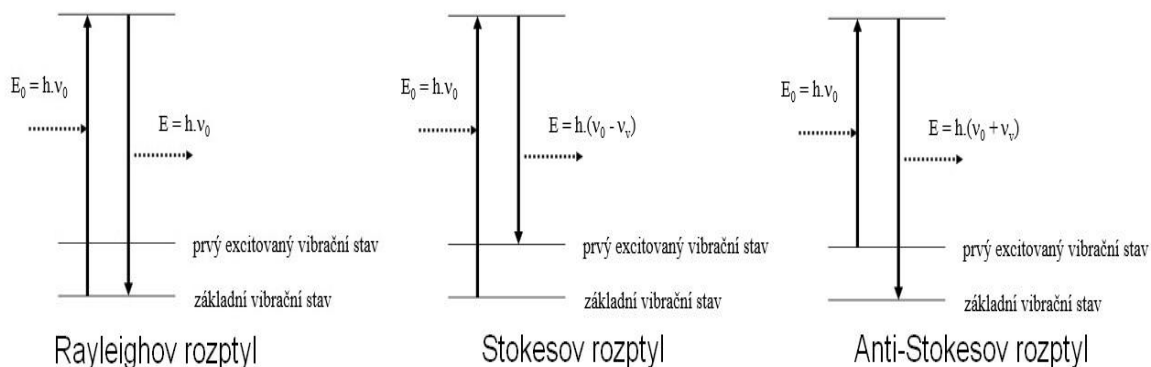
Podstata Ramanovho rozptylu je, že dochádza k žiarivému dvojfotónovému prechodu medzi dvoma stacionárnymi vibračnými stavmi molekuly, ktorých energie sú E_1 a E_2 . Tento prechod vyvolaný interakciou molekuly s fotónom dopadajúceho žiarenia o frekvencii f_0 vyjadruje rovnica:

$$f_0 > \frac{|E_2 - E_1|}{h}, \quad (4)$$

kde h je Planckova konštanta s hodnotou $6,6256 \cdot 10^{-24} Js$ a prevádzaný vyžiarením fotónu rozptýleného žiarenia o frekvencii ν_R . Zjednodušene si možno predstaviť tento rozptylový efekt ako súčasnú absorpciu fotónu budiaceho žiarenia molekulou, kedy molekula prechádza na virtuálnu energetickú hladinu a emisiou sekundárneho fotónu za splnenie podmienky zachovania energie. [6]

Excitáciou molekúl laserovým lúčom nastávajú tri prípady, ktoré sú znázornené na obrázku:

$$\Delta E = E_0 - E = 0$$



Obr. 9 Znázornenie rozptylov Ramanovej spektroskopie

Pri Rayleighovom rozptyle je molekula excitovaná fotónom s energiou $E_0 = h \cdot \nu_0$ na virtuálnu energetickú hladinu, odkiaľ sa vracia do základného stavu pričom molekula emituje rovnaké množstvo energie $E = h \cdot \nu_0$. Zjednodušene možno povedať, že počas rozptylu neprichádza k zmene frekvencie žiarenia a tým pádom sa jeho vlnová dĺžka nemení. Pri Stokesovom rozptyle je molekula excitovaná fotónom s energiou $E_0 = h \cdot \nu_0$ na virtuálnu hladinu, odkiaľ sa vracia do prvého excitačného vibračného stavu pričom molekula emituje taktiež fotón s nižším množstvom energie $E = h(\nu_0 - \nu_v)$. Ide o žiarenie s nižšou energiou (vyššou vlnovou dĺžkou). Molekula pri Anti-Stokesovom rozptyle je opäť excitovaná fotónom s energiou $E_0 = h \cdot \nu_0$ na virtuálnu hladinu, ktorá má vyššiu energiu než Rayleighov a Stokesov rozptyl. Pri návrate do základného stavu molekula emituje energiu $E = h(\nu_0 + \nu_v)$. Toto žiarenie je nižšou vlnovou dĺžkou. [9]

3.5 Ramanovo spektrum

Ramanové spektrá sa získavajú vnesením intenzity rozptýleného svetla v závislosti vlnočtu, ktorý sa uvádza v cm^{-1} . Každý Raman aktívnej vibrácii molekuly zodpovedá príslušný pás v spektre. Poskytuje informácie o štruktúre a vlastnostiach molekúl a ich vibračných vlastnostiach. Každá molekula má jedinečný set vibračných pohybov a Ramanove spektrum molekuly je zložené z vrcholov (píkov), ktoré odpovedajú charakteristickým vibračným frekvenciám. V zmesi rôznych chemických zložiek dostávame jedinečné spektrum, pomocou ktorého je možné určiť povahu jednotlivých zložiek.[12]

4 POUŽITIE RAMANOVEJ SPEKTROSKOPIE

Postupne sa stala Ramanova spektroskopia dôležitým nástrojom pri analýze pevných látok (kryštalické a amorfné materiály, kovy, polovodiče, polymery, atp.), kvapalín (čisté látky, roztoky vodné i nevodné), plynov, ďalej taktiež napríklad pri analýze povrchov (napr. elektródy, senzory) či pri analýze biologických systémov (od biomolekúl až po organizmy). Svoje uplatnenie nachádza tiež v mineralógii, geochémií cez farmaceutický priemysel (zist'ovanie liečiv, drog) až po biológiu a lekárstvo. Poskytuje neoceniteľné informácie o danom materiáli, ktoré sa týkajú hlavne vibračných a rotačných pohybov molekúl. Každá skúmaná látka má svoje originálne spektrum, ktoré je jedinečné. Pomocou vyhodnotenia jednotlivých spektier sa identifikuje daný materiál. Pre porovnanie výsledkov z experimentálneho štúdia, existuje mnoho dostupných online databáz. K rozšíreniu Ramanovej spektroskopie prispel aj fakt, že doba technologicky pokročila, ale aj to, že v súčasnosti sú prístroje dostupnejšie na trhu.

4.1 Vybrané príklady použitia Ramanovej spektroskopie

Ramanova spektroskopia má široké uplatnenie v rôznych vedných disciplínach. Jednotlivé vybrané príklady použitia:

- I. Farmácia
 - analýza zloženia liečiv na jednotlivé aktívne a pomocné látky
 - identifikácia prímiesí liečiv
- II. Umenie
 - overovanie pravosti umeleckých diel
 - identifikácia pigmentov použitých na umeleckých dielach
 - využitie pri reštaurovaní výberom vhodných materiálov
- III. Minerály a diamanty
 - identifikácia kvality vzácnych kameňov
- IV. Náuka o materiáloch
 - skúmanie a identifikácia jednotlivých materiálov
 - typickými materiálmi sú polyméry, kompozity apod.
- V. Forenzné vedy
 - dokazovanie pravosti atramentov a skúmanie pravosti dokumentov, peňazí
 - identifikácia liečiv, omamných látok a drog
 - zist'ovanie zvyškov strelného prachu

VI. Biomedicína

- zisťovanie DNA
- identifikácia tkanív postihnutých rakovinovými bunkami
- schopnosť sledovať zmeny bunkových metabolitov a zmeny bielkovinových štruktúr [9]

4.2 Výhody a nevýhody použitia Ramanovej spektroskopie

Medzi nesporné výhody Ramanovej spektroskopie patrí skúmanie širokého spektra látok. Analyzovať možno vzorky rôznych skupenstiev, organického či anorganického pôvodu, plyny, gély, roztoky, vlákna, liečivá, drogy, kryštály, bunky, tkanivá, bielkoviny, tuky či alkoholy. Výhodou je aj to, že v Ramanovom spektre má voda slabý signál, a tak je vhodným rozpúšťadlom, zatiaľ čo v infračervenej spektroskopii má voda negatívny vplyv. Vodné roztoky je možné študovať pomerne ľahko, nedochádza k skresľovaniu výsledkov, dajú sa merať aj cez obalové materiály (sklo, polymér), ktoré nie sú farbené. Meranie cez obalové materiály je časovo a finančne nenáročné a dá sa vykonať priamo v teréne. Na jednotlivú vzorku postačí naozaj zopár mililitrov. Príprava vzoriek je nenáročná a potrebuje naozaj len malý zásah užívateľa. Meranie prebehne za niekoľko sekúnd, výsledky sa transportujú pomocou optických vlákien aj do vzdialenejších miest, čo umožňuje meranie aj vo výrobných priestoroch. Výsledky poskytujú jedinečné detailné informácie o chemickom zložení danej látky. [9]

Po vypuknutí Methanolovej kauzy v Českej republike na jeseň roku 2012, sa VŠCHT rozhodla testovať vzorky prineseného alkoholu pomocou Ramanovej spektroskopie, ktorá je zatiaľ ako necertifikovaná metóda. Pre veľký záujem verejnosti nestíhali testovať prinesené vzorky, klasickou overenou certifikovanou metódou na plynovom chromatografe, ktorá zaberala omnoho viac času a bola finančne náročná. Analýza pomocou Ramanovej spektroskopie na Obr. 10 odhalí podozrivé vzorky behom niekoľko minút. V praxi, ako prví, používajú túto novú metódu analýzy už aj ostravskí policajti, ktorí okamžite dokážu v teréne odhaliť cez uzatvorenú fľašu prítomnosť metylalkoholu či pervitínu. Svoj prenosný spektrometer napoja na notebook a po nastavení požadovaných parametrov môžu začať s analýzou podozrivých látok. [13]



Obr. 10 Ukážka testovania podozrivej vzorky pomocou Ramanovho spektroskopu

Pri Ramanovej spektroskopii sa objavujú problémy spojené s fluorescenciou, odparovaním a zahrievaním vzoriek. Zahrievanie vzoriek vzniká z veľkej intenzity dopadajúceho lúča, ktorému sa dá predísť chladením, rotáciou alebo cirkuláciou vzorky. Je treba analyzovať vzorku s vysokou koncentráciou, pretože Ramanov jav je slabý. Problémy nastávajú pri zle rozpustných vzorkách či niektorých biologických vzorkách. Napríklad niektoré kovy a zliatiny sú pre Ramanovu spektroskopiu inaktívne, takže nie sú vhodné pre analýzu pomocou tejto metódy. Fluorescencia pohlcuje časť svetla, najmä u nečistých vzoriek, ktorá sa dá odstrániť pomocou zahriatia. Dochádza však k degradácii farebných vzoriek, použitím média KBr alebo NaCl. Je dobré poznať chemické zloženie skúmanej látky a jej vedľajšie zložky, pretože vo výslednom spektre sa odčítajú, a tak výsledok bude omnoho presnejší. Častým problémom hlavne u alkoholov a prchavých látok je odparovanie, ktorému sa dá zabrániť pomocou merania cez obalový materiál. [14]

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 VYPRACOVANIE CIEĽOV PRAKTICKEJ ČASTI

V praktickej časti tejto práce boli študované vzorky vybraných koncentrácií alkoholov s obsahom methanolu pomocou Ramanovej sprektroskopie. Bol k tomu použitý Ramanov mikroskop inVia Basis. Cieľom zadania BP je príprava vzoriek pre meranie kalibračných kriviek, nameranie spektrálnych dát a vypracovanie metodiky pre kvantitatívne určenie podielu methanolu a ethanolu v alkoholických nápojoch.

5.1 Ramanov mikroskop

K vypracovaniu praktickej časti nám poslúžil Ramanov mikroskop inVia Basis od firmy Renishaw, ktorý je dostupný v laboratóriu FAI UTB. Ide o systém kombinujúci Ramanov spektrometer s integrovaným mikroskopom, ktorý uplatňuje konfokálne meranie s vysokým rozlíšením. Disponuje dvoma lasermi s exitačnou vlnovou dĺžkou 514nm a 785nm. K Ramanovmu mikroskopu je možno pripojiť viacero exitačných laserov, medzi ktorými si užívateľ vyberá automatickým prepínaním. Nastavenie snímacích režimov sa vykonáva pomocou softwaru WiRE™ 3.0. Pracovanie v jednotlivých módoch skenovania je s vysokou citlivosťou. K nastaveniu potrebných parametrov postačí pár kliknutí myšou.[15]

5.2 Príprava jednotlivých vzoriek

Pre experimentálne skúmanie methanolu v alkoholických nápojoch sme si postupne zvolili a namiešali vzorky s rôznym podielom methanolu, ktorých koncentrácia je zaznamenaná v tabuľke (Tab. 1). Ďalej sme pre spätnú kontrolu, kde sme zisťovali z neznámej vzorky koľko % methanolu obsahu, mali tri neznáme vzorky. Pre kontrolu a overenie sú tieto koncentrácie uvedené v tabuľke (Tab. 2).

Tab. 1 Zoznam namiešaných vzoriek a ich koncentrácia methanolu

Vzorka č.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Koncentrácia [%]	0,05	0,1	0,25	0,5	0,75	1	2	3	4	5	7,5	10	20	50

Tab. 2 Hodnoty neznámých vzoriek

Vzorka	A	B	C
Koncentrácia [%]	0,85	1,2	3,75

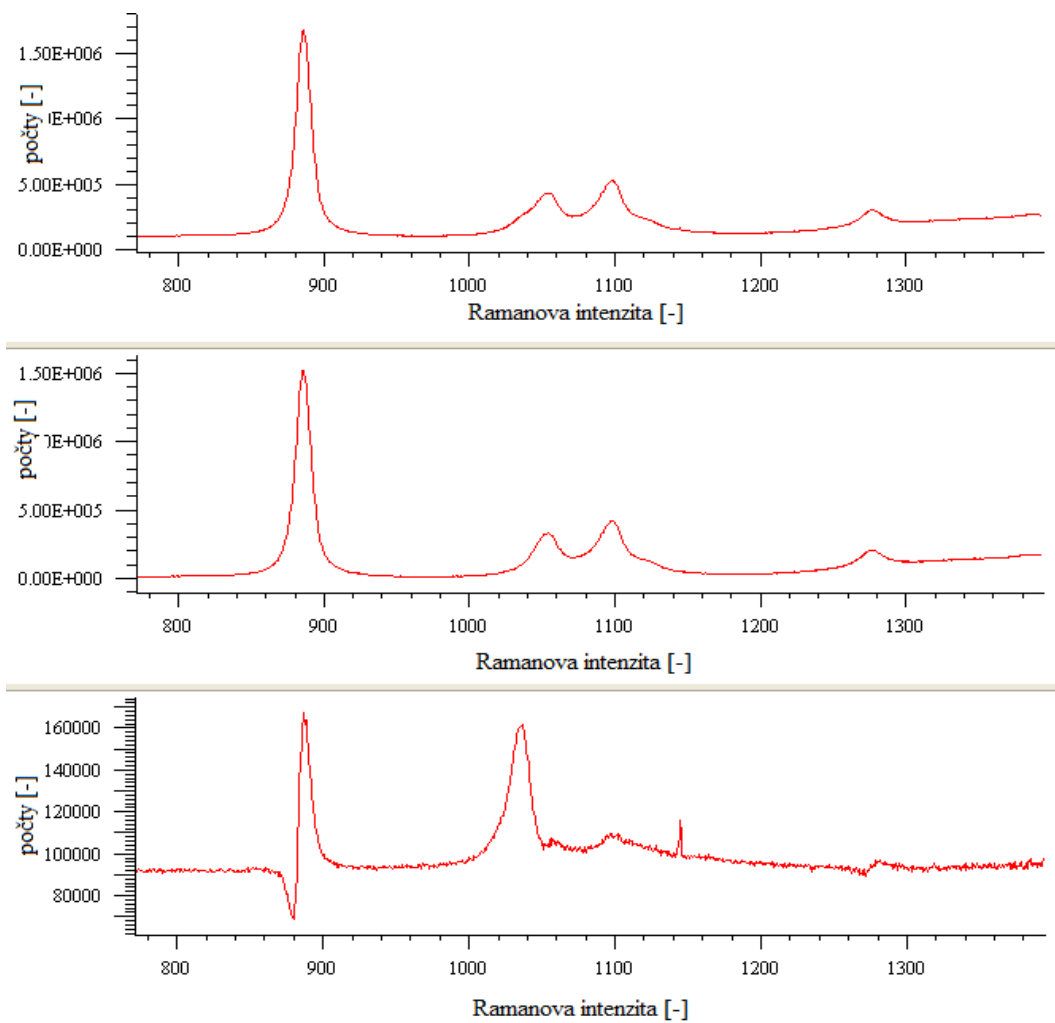
Namiešané vzorky sme potom jednotlivo analyzovali pomocou Ramanovho spektrometru a výsledných kalibračných kriviek. Pre analýzu poslúžili aj vzorky bežne dostupných alkoholov od domácich slivovic, griotiek cez rum až po whisky. Vzorky sme merali dvoma spôsobmi, a to kvapnutím namiešaných vzoriek na kovovú doštičku a priamo cez obalový materiál. Pri oboch spôsoboch sa merania sa výsledky nijak podstatne od seba nelíšili. Avšak pri dlhom státi vzorky majú tendenciu sa z kovovej doštičky vyparovať. Aj preto je lepšie zvoliť postup merania cez obalový materiál, ktorý je aj časovo rýchlejší. Vo výsledných spektrách sme sa zaoberali hlavne píkom s vlnovou dĺžkou 1035nm čo predstavuje práve methanolový pík.

5.3 Postup merania spektrálnych dát

1. Pre meranie zvolíme laser s vlnovou dĺžkou 785nm, ktorý je pre náš typ analýzy vhodnejší.
2. Na začiatku je potrebné spustenie programu WiRE™ 3.0 pomocou, ktorého nastavujeme parametre a ovládame Ramanov mikroskop.
3. Na kovovú doštičku aplikujeme pomocou pipety malé množstvo vzorky a upevníme do držiaku. Rýchlejšim spôsobom je vzorku umiestnenú v ampulke zachytiť pod mikroskop pomocou prídavného držiaka.
4. V programe WiRE™ 3.0 si nastavíme typ snímania, rozsah času merania, výkon lasera a počet opakovaní. Potom môžeme zapnúť CCD kameru a zaostriť objektív do vnútra vzorky. Automaticky sa spustí aj laser. Pre zaostrenie slúži joystick alebo zaostrovacie prvky umiestnené po pravej strane mikroskopu. Skúmanú plochu vidíme aj v okne programu.
5. Keď máme danú vzorku dostatočne zaostrenú, zatemníme miestnosť, v ktorej meranie prebieha a stlačením ikony RUN spustíme meranie. Na obrazovke môžeme priebežne sledovať meranie.
6. Po chvíli máme výsledné spektrum, ktoré môžeme následne priamo upravovať v programe pomocou funkcií:

- funkcia MATH OPERATIONS poskytuje rôzne matematické operácie
- funkcia PEAK PICK zobrazí hodnoty oblastí jednotlivých pík
- funkcia NORMALIZE nanormalizuje vzorku na vybranú hodnotu
- funkcia BASE LINE umožňuje úpravu základne nameraného spektra
- funkcia CURVE-FIT zmeria plochu pod píkom

7. Pomocou funkcie PEAK PICK vyberieme oblasť hodnoty 880-885 (môže sa líšiť v každom spektre) a zistíme si výšku daného píku. Následne na to si nanormalizujeme 100% ethanol na túto hodnotu a uložíme. Zoberieme spektrum a od neho spravíme pomocou MATH OPERATIONS odpočet nanormalizovaného ethanolu. Rozdiel vhodne upravíme a vyrovnáme základňu. Rozdiel môžeme vidieť na obrázku (Obr. 11) Na takto upravenom rozdiely sa zameriame na pík s vlnovou dĺžkou 1035nm, ktorý popisuje methanol. Funkciou CURVE-FIT zistíme plochu pod píkom.



Obr. 11 Rozdiel nameranej vzorky nanormovaného ethanolu

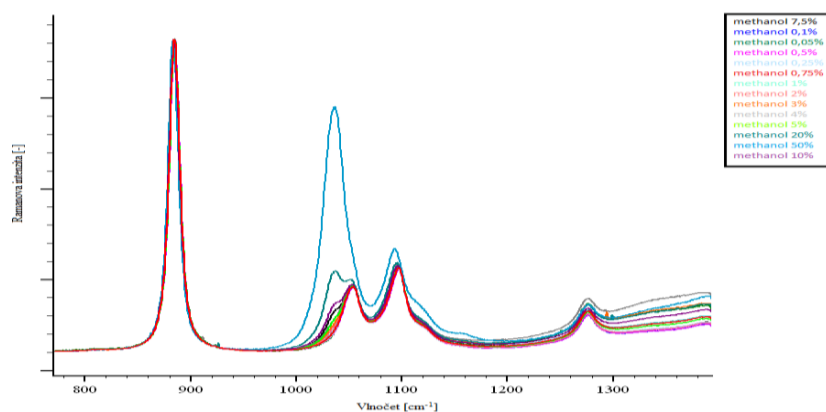
5.4 Zostavenie kalibračných kriviek

Pre zostavenie kalibračných kriviek je potrebné si zistiť pomocou spomínaných funkcií z jednotlivých zmeraných a upravených dát Ramanovu intenzitu a plochu pod píkom 1035nm. V tabuľke (Tab. 3) uvádzam potrebné namerané hodnoty.

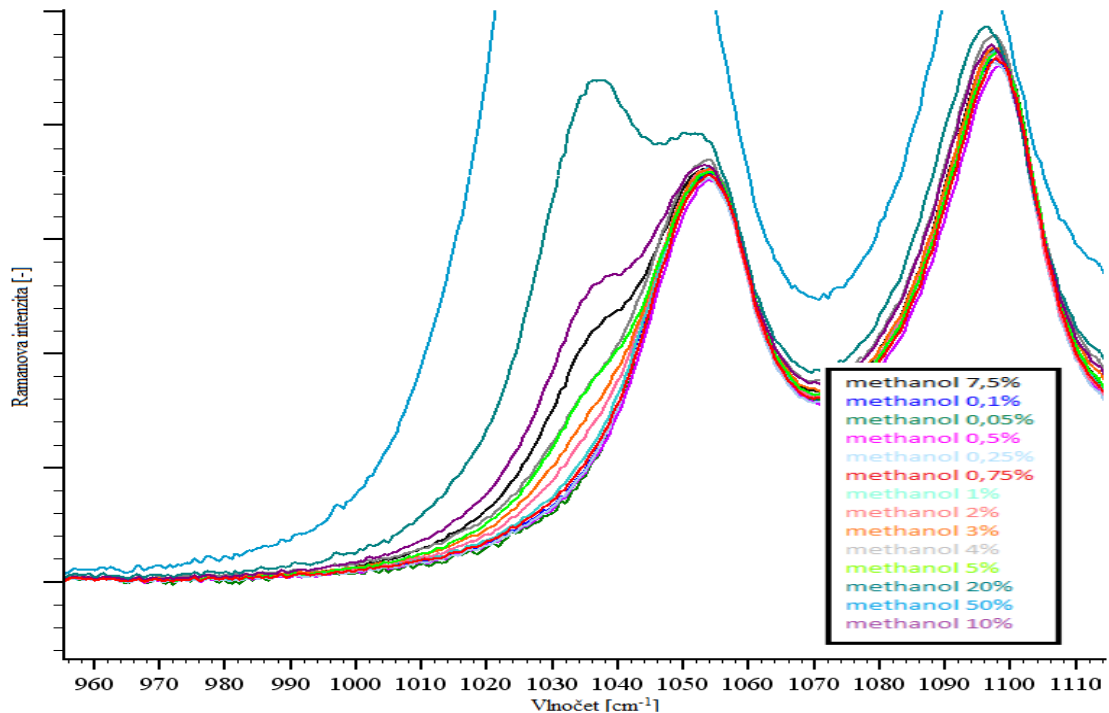
Tab. 3 Namerané dáta pre kalibračné krivky

Koncentrácia %	Ramanova intenzita	Plocha pod píkom 1035nm
0,05	0	0
0,1	0	0
0,25	3854,56	64835,6
0,5	5326,13	40171,8
0,75	7391,09	80754,3
1	11776,3	182178
2	27872,1	678204
3	34677,9	763842
4	53828,6	1083190
5	64770,5	1440150
7,5	105746	2330550
10	143576	3416430
20	194648	5463160
50	558007	14693300

Vzorky s koncentráciou 0,05% a 0,1% nevykazovali žiadne náznaky prítomnosti píku 1035nm. Preto ich do úvahy v grafe kalibračných kriviek brať nebudeme. Jednotlivé grafy kalibračných kriviek sa preložili lineárnou regresiou v programe MS Excel, a tým sme získali rovnice potrebné pre výpočet pri overení neznámych vzoriek.

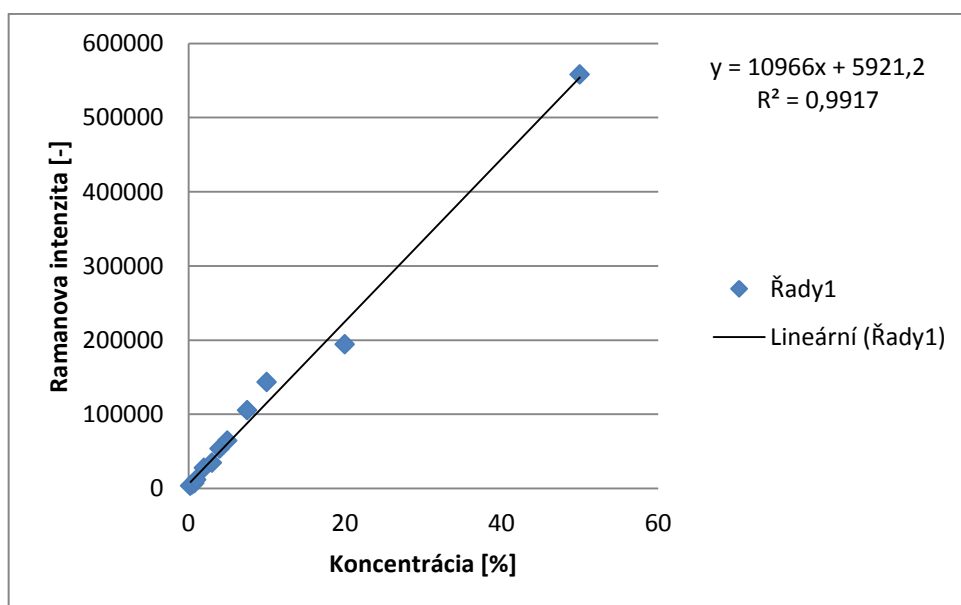


Obr. 12 Ramanovane spektrum všetkých známych vzoriek



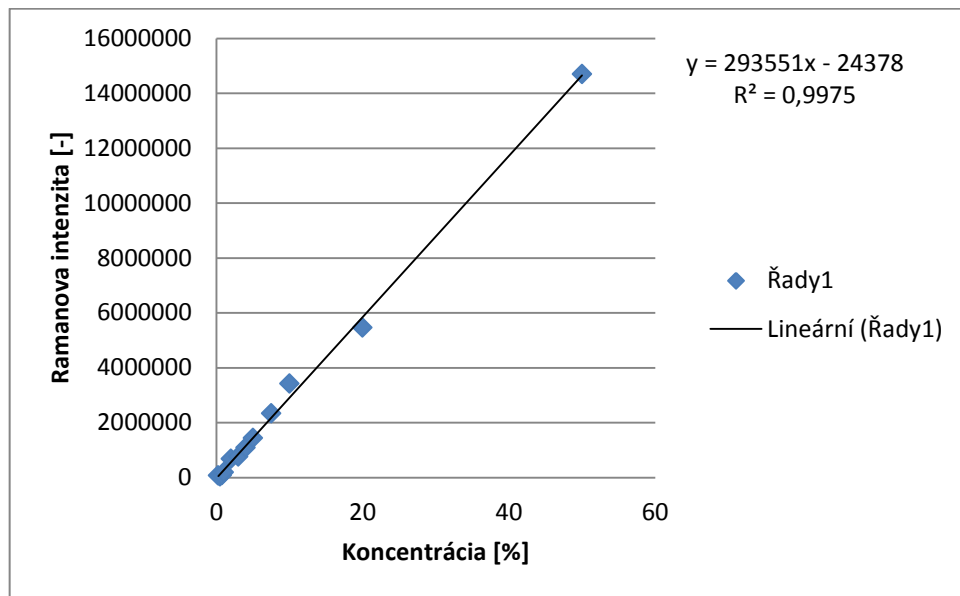
Obr. 13 Rez Ramanovým spektrom so zameraním na methanолоvý pík

Na obrázkoch (Obr. 12, Obr. 13) je zobrazené výsledné Ramanove spektrum meraných vzoriek, ktoré sme namiešali. Pre bližšiu predstavu a ukážku prikladám podrobnejší zväčšený rez, v ktorom sa zameriavame práve na methanолоvý pík 1035nm. V tomto mieste ako je na obrázku (Obr. 13) vidno môžeme pozorovať vybiehajúci methanолоvý pík. Hraničná hodnota kedy sa pík ešte dobre vykresľuje je 0,75%. So stúpajúcou koncentráciou je aj výraznejší pík.



Obr. 14 Kalibračná krivka získaná pomocou intenzít

V grafe na obrázku (Obr. 11) si môžeme všimnúť, že rastúca koncentrácia nie je priamo úmerná intenzite. Táto kalibračná krivka nám ďalej poslúži pri výpočte na určenie koncentrácie neznámych vzoriek.



Obr. 15 Kalibračná krivka získaná pomocou plôch pod píkom 1035nm

Kalibračná krivka vykreslená na obrázku (Obr. 12) ukazuje takisto, že rastúca koncentrácia nie je priamo úmerná veľkostiam plôch pod píkom 1035nm. Získaná rovnica regresie bude ďalej používaná k určovaniu neznámych vzoriek.

5.5 Vypracovanie metodiky pre učenie podielu methanolu a ethanolu v neznámych vzorkách

K vypracovaniu tejto metodiky bolo potrebné najskôr vypracovať kalibračné krivky. Tieto krivky sa získali už v spomínanej kapitole. K tomuto meraniu sme mali k dispozícii tri neznáme vzorky, ktoré boli poskytnuté vedúcou práce. Úlohou bolo zistenie koncentrácií methanolu v týchto vzorkách. Poslúžia k tomu už uvedené vypracované kalibračné krivky. Pre jednotlivé vzorky sme získali vyššie uvádzaným postupom Ramanove spektrá. Pre všetky tri vzorky si najskôr zmerame Ramanove spektrum. Z týchto spektier sme zistili pomocou funkcií programu WiRE™ 3.0 intenzity a plochy pod píkom 1035nm. Pre intenzity sa meranie opakovalo trikrát a výsledky sa spriemerovali. Vstupné hodnoty pre výpočet nájdete v tabuľkách (Tab.4, Tab. 5).

Tab. 4 Namerané hodnoty pre intenzitu

	Vzorka	A	B	C
		Ramanova intenzita		
Meranie	1	8751	14288	37971
	2	9119	14043	42052
	3	9404	14536	48570
	Priemer	9091,333	14289	42864,33

Tab. 5 Namerané hodnoty pre plochu pod píkom 1035nm

Vzorka	A	B	C
Plocha pod píkom 1035nm	212784	341944	992246

Odhadnúť približnú koncentráciu môžeme už len tým, že sa pozrieme do tabuľky pre zostavenie kalibračných kriviek (Tab.3) a zistíme, že neznáma vzorka A sa nachádza v rozmedzí hodnôt koncentrácií 0,75-1%, vzorka B medzi 1-2% a vzorka C medzi 3-4%. Porovnanie či už intenzít alebo plôch pod píkom ukazujú na rovnaké medze.

5.5.1 Overenie výpočtom

Z grafov kalibračných kriviek na obrázkoch (Obr.11, Obr. 12) sme dostali dve rovnice lineárnych regresíí.

$$y = 10966x, \quad (5)$$

$$y = 293551x, \quad (6)$$

Následne do týchto dvoch rovníc dosadíme namerané hodnoty z tabuliek (Tab. 4, Tab.5) a získame výslednú koncentráciu neznámych vzoriek. Výpočet som previedla pomocou programu Excel a jednotlivé výsledky zaznamenala do tabuľky (Tab.6).

Tab. 6 Výsledky neznámych vzoriek pomocou výpočtu

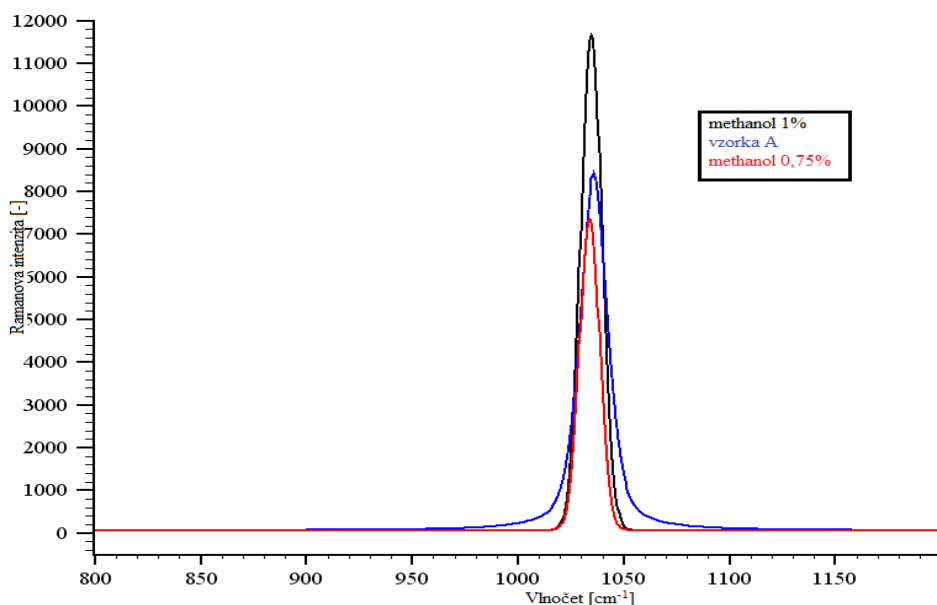
Vzorka	A	B	C
Plocha pod píkom	0,72486212	1,16485381	3,38014859
Intenzita	0,82904736	1,30302754	3,90883944

Výsledky, ktoré sa nachádzajú v tabuľke (Tab. 6) sa približujú k ozajstným hodnotám skúmaných vzoriek. Keďže ide o experimentálne meranie s prípustnými chybami merania

tieto výsledky sa dajú považovať za dostačujúce. Čiže k tomu môžeme povedať, že týmto postupom môžeme preverovať neznáme vzorky a ich koncentráciu methanolu. S určitosťou dokážeme odhaliť nadlimitné hodnoty, ktoré sa začínajú od koncentrácie 0,75%.

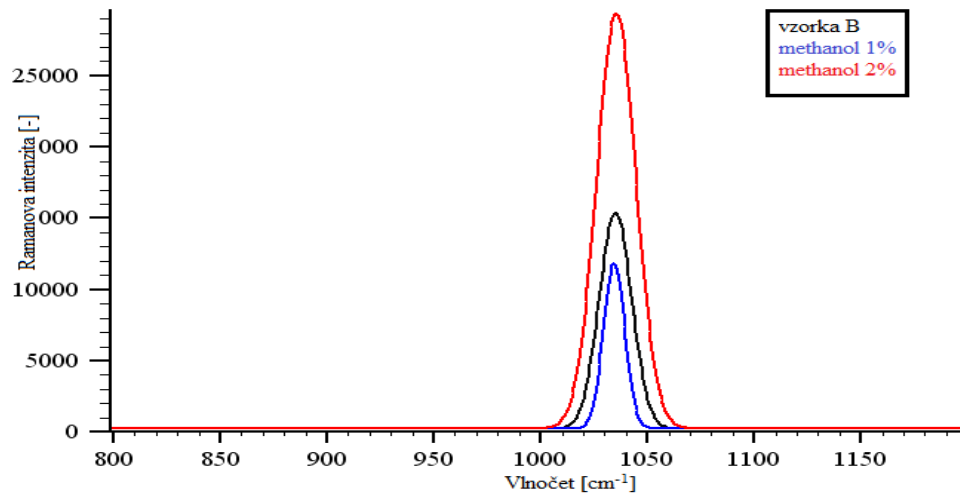
5.5.2 Zrovnanie Ramanových spektrier neznámych vzoriek so susednými hodnotami

V nasledujúcich Ramanových spektrách si vyobrazíme jednotlivé priebehy neznámych vzoriek, ktoré sme overili výpočtom a k nim priradíme ich susedné hodnoty. Tieto Ramanové spektrá sú vytvorené z hodnôt zodpovedajúcich plochám pod píkom 1035nm. Upravené do konečnej podoby pomocou nástrojov v programe WiRE™ 3.0.



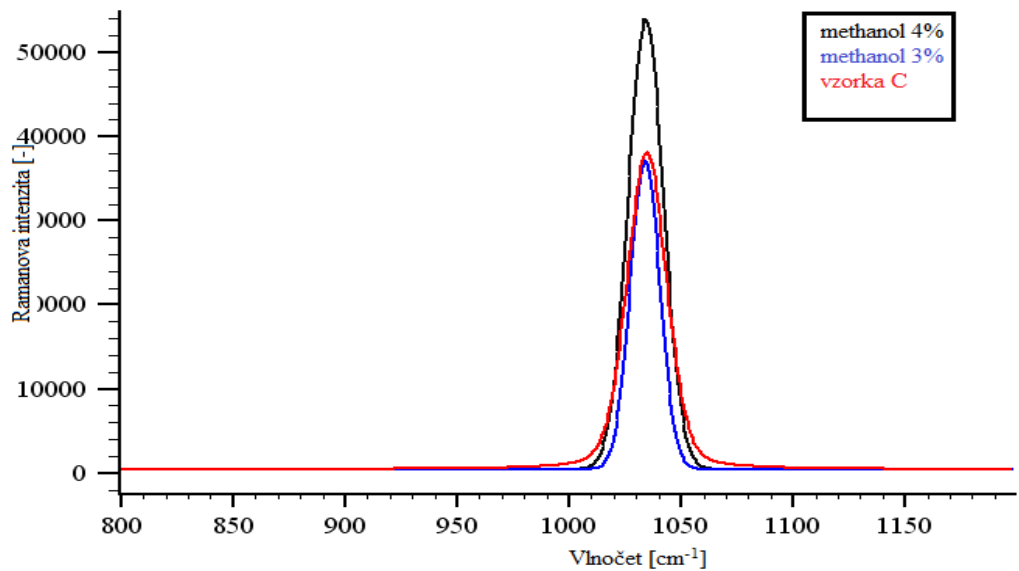
Obr. 16 Porovnanie vzorky A so susednými hodnotami

Výpočtom pre vzorku A sme dokázali, že koncentrácia methanolu sa nachádza medzi hodnotami 0,75% a 1%. Na obrázku (Obr. 16) si tento fakt môžeme overiť pomocou jednotlivých Ramanových spektier. Skutočná hodnota obsahu methanolu vzorky A bola 0,85%. Myslím, že k tejto hodnote sme sa priblížili ako v Ramanovom spektre tak aj výpočtom.



Obr. 17 Vzorka B v porovnaní so susednými hodnotami

Pri vzorke B sme výpočtom zistili, že neznáma koncentrácia je v rozsahu medzi 1% až 2%. Po porovnaní Ramanových spektier môžeme, že naozaj vzorka B sa približuje k hľadanej hodnote 1,2%. Prevedením výpočtov sa nám taktiež podarilo priblížiť k skutočnej hodnote takmer presne.

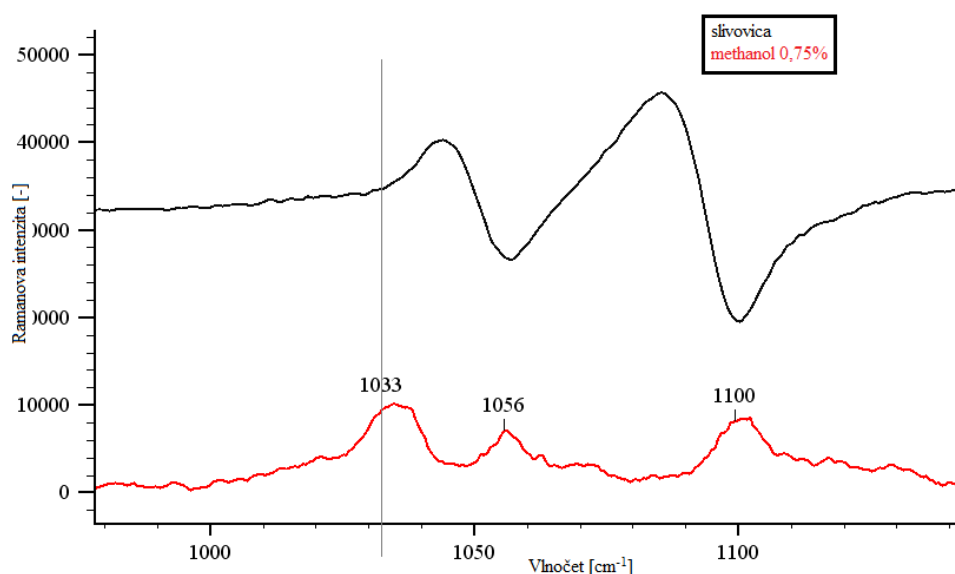


Obr. 18 Vzorka C v porovnaní so susednými vzorkami

Priebeh vzorky nie celkom vyšiel. Z grafu vyplýva, že výsledná hodnota sa skôr blíži k hodnote 3%. Skutočná koncentrácia mala obsah methanolu 3,75%. Toto Ramanove spektrum môžeme považovať s chybou merania a preto sú výsledky skreslené.

5.6 Analýza vzoriek bežne dostupných alkoholických nápojov

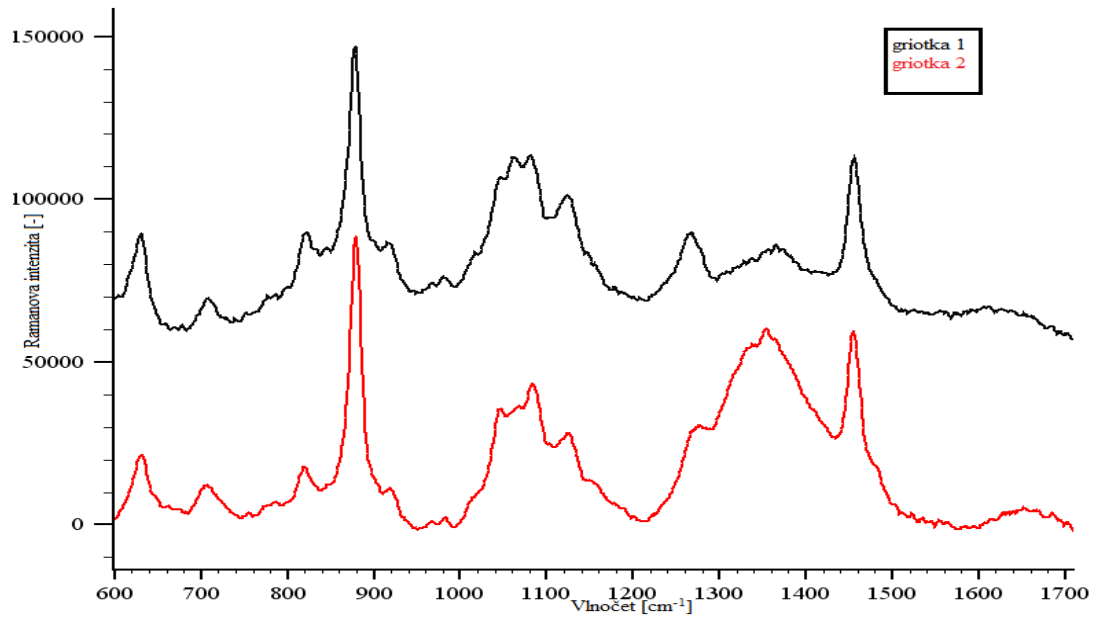
Pre experimentálnu časť sme použili aj vzorky bežne dostupných liehovín. Skúmali sme ich jednotlivé spektrá so zameraním na metanolový pík. Tu sa ukázkovo potvrdilo to, že každá analyzovaná látka má jedinečné spektrum. V týchto spektrách sa objavujú ďalšie špecifické vibrácie molekúl, ktoré sú následkom prímiesí vzniknutých napríklad pri ovocnom kvasení alebo technologickom postupe vo výrobe. Pre znázornenie uvádzame vybrané spektrá. Tento odsek by sa nemohol zaobísť od analýzy typického nápoja obľúbenom hlavne v regiónoch Moravy a Slovenska, ktorým je slivovica.



Obr. 19 Ramanovo spektrum slivovice porovnané s 0,75% metanolom

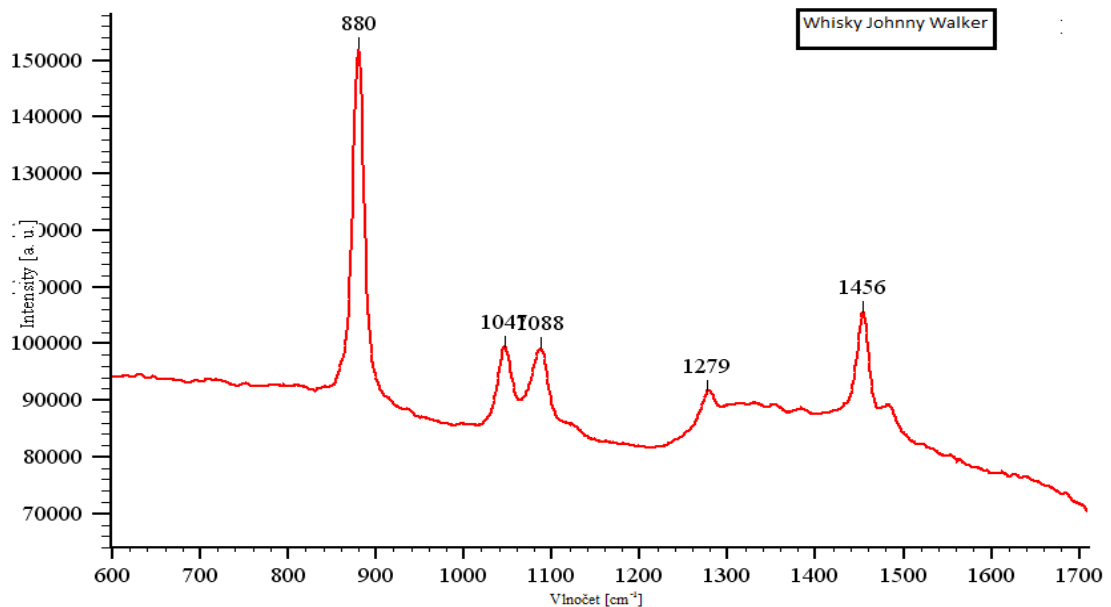
Ramanovo spektrum slivovice v porovnaní s limitnou hodnotou metanolu. V takto pripravených spektrách môžeme študovať jednotlivé vzorky so zameraním na metanolový pík. Pre lepšie sledovanie sme do grafu priadli pomocnú kolmicu, aby sme mali presne znázornené miesto, kde by sa mohol vyskytnúť prípadný obsah metanolu. Táto vzorka neobsahuje podozrivé množstvo metanolu.

Veľmi zaujímavým spektrom sa javia spektrá griotiek. Griotky pochádzajú z dvoch odlišných zdrojov a obe boli vyrobené domácim vylúhovaním višní v destiláte. Oba priebehy sú podobné, čo značí, že látky, ktoré vznikali pri lúhovaní sú približne rovnaké. Upravené spektrum sme si posunuli, aby sme sa mohli lepšie orientovať v spektre. V týchto dvoch priebehoch sa taktiež nevyskytuje prítomnosť metanolu.

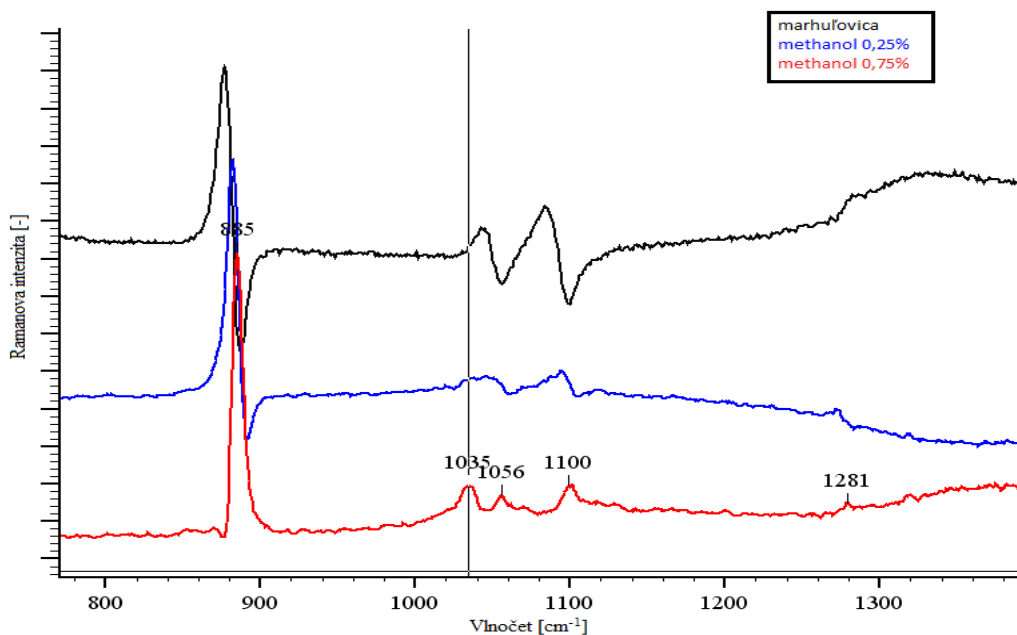


Obr. 20 Ramanove spektrum dvoch griotiek

Na nasledujúcom obrázku (Obr. 21) máme vyobrazené spektrum whisky. Vo Whisky sa nachádzajú opäť jedinečné prímеси, ktoré vznikajú pri výrobnom postupe. Pík methanolu sme opäť nezaznamenali, takže aj táto vzorka je zdraviu neškodná.



Obr. 21 Ramanove spektrum whisky



Obr. 22 Ramanove spektrum marhuľovice

Toto Ramanove spektrum zobrazuje marhuľovicu a pre ukážku sme pridali priebeh s nemerateľnou hodnotou methanolu a s hraničnou hodnou methanolu. Preloženie píku 1035nm kolmicou uľahčí orientáciu pre hľadaný pík. Ako je z grafu zrejmé hodnota s obsahom methanolu 0,75% sa v grafe ukázala ako závadná. Marhuľovica je teda nezávadná. Táto vzorka bola použitá z domácich zdrojov získaných destiláciou ovocia.

5.7 Záver k meranej experimentálnej časti

Zhodnotením a diskutovaním sme sa dopracovali k záveru, že Ramanova spektroskopia je perspektívnou metódou pri zisťovaní obsahu methanolu v liehovinách. Sledovanie a identifikácia látok ponúka nasledujúce výhody:

- ide o nedeštrukčnú a nekontaktnú metódu;
- netreba náročnú špeciálnu prípravu vzoriek;
- vhodným výberom intenzity nedochádza k poškodeniu materiálov;
- analýza môže byť prevedená cez obalový materiál, ktorý zabraňuje kontaminácii s neznámou látkou;
- vzorky môžu byť v mikrorozmeroch $1\mu\text{m} - 2\mu\text{m}$
- poskytuje analýzu vodných roztokov, ktorá slúžia ako dobré rozpúšťadla látok

ZÁVĚR

Aplikačné možnosti Ramanovej spektroskopie si našli široké uplatnenie v oblastiach vedy, výskumu a priemyslu. Využitie tejto metódy sa efektívne využíva pri identifikácii látok a analýze molekulovej štruktúry. Základom pre meranie je naštudovanie základných princípov a javov. Samostatné merania prebiehajú rýchlo, avšak dopracovanie sa k výsledkom je niekedy omnoho ťažšie. K porovnaniu nameraných výsledkov slúžia knižnice spektier látok, ktoré ponúkajú možnosť vytvoriť si aj vlastné pre ďalšie účely.

Methanolova kauza v ČR poukázala na to, ako ľahko sa aj napriek častým kontrolám dokáza dostať na trh nelegálne vyrobené liehoviny. Je to naozaj závažný problém, kde si výrobcovia obohacujú svoje peňaženky a hazardujú s ľudským zdravím. Preto by téma nelegálnej výroby alkoholických nápojov nemala byť tabu a za pomoci príslušných orgánov by takáto vážna situácia už nemala nastať. Človek, ktorý zaplatí riadne daň by sa nemal otráviť po pohárikovi z riadne okolkovaného alkoholu.

Teoretické princípy Ramanovej spektroskopie sme premietli do praktickej časti tejto práce. Výsledky a experiment zisťovania neznámych vzoriek dokazuje, že Ramanova spektroskopie je vhodná k zisťovaniu prítomnosti methanolu. Pri tomto experimente sa naozaj potvrdilo, že táto síce necertifikovaná metóda, poslúži k jednoduchej a rýchlej analýze skúmaných látok. Dokážeme ňou odhaliť aj neznámu vzorku, ktorej približná koncentrácia sa dá získať jednoduchým výpočtom. K namiešaným vzorkám s obsahom methanolu patrili aj vzorky páleníek z domácich zdrojov. V žiadnej zo skúmaných vzoriek z domácich zdrojov sa nepotvrdila prítomnosť nadlimitnej hodnoty methanolu.

Ramanov mikroskop dostupný v laboratóriu FAI UTB ponúka mnohopočetné možnosti pre výskumnú činnosť zaoberajúcu sa identifikáciou látok.

ZÁVĚR V ANGLIČTINĚ

Possibilities of Raman's spectroscopy application have found a wide utilization in fields of science, research and industry. The usage of this method is widely applied in identification of chemicals and analysis of molecular structure. The basis for measuring is making oneself familiar with basic principles and events. The measurements themselves proceed fast, getting the results is sometimes much harder, however. Libraries of substances spectra are used to compare the resulting values and these also enable to create one's own for further usage.

Methanol cause in Czech Republic pointed out how simple it is to market bootlegged spirits, despite frequent inspections. It is a serious problem when producers pack up their wallets and put human health to danger. Therefore the topic of bootlegging should not be a taboo and with the help of respective authorities this serious situation should never occur again. Anyone paying the tax should not get poisoned from properly marked bottle of alcohol.

We transferred the theoretical principles of Raman's spectroscopy into the practical part of our thesis. The results and the experiment of establishing the contents of unknown samples prove that Raman's spectroscopy is suitable for validating the presence of methyl. With this experiment we were able to prove, that this method, even though still uncertified, will serve as a simple and quick means of analysis of samples being researched. Samples of home-made spirits were added to the samples with the content of methyl. Over-the-limit-amount of methyl was proved in none of them. Raman's microscope available in FAI UTB's laboratory offers multiple possibilities for research of chemicals identification.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] <http://zpravy.idnes.cz/metanolova-kauza-je-nejvetsi-pripad-ceske-kriminalistiky-p3e-domaci.aspx?c=A130402_212608_domaci_br> [on-line][cit.10.6.2013]
- [2] <<http://www.sskp.sk/edu/images/files/och/3.3%20%20HYDROXYDERIV%C3%81TY.pdf>> [on-line][cit.6.2.2013]
- [3] <<http://czvp.szu.cz/aktuality/alkohol13.pdf>> [on-line][cit.4.6.2013]
- [4] <<http://czvp.szu.cz/aktuality/metanol.htm>> [on-line][cit.4.6.2013]
- [5] <<http://www.szpi.gov.cz/docDetail.aspx?docid=1042485&docType=ART&nid=11913>> [on-line][cit.4.6.2013]
- [6] <http://cheminfo.chemi.muni.cz/chem_sekce/predmety/C7300/GC/uvod.pdf> [on-line][cit.8.6.2013]
- [7] <http://www.fns.uniba.sk/uploads/media/GC_v_Environmentalnej_chemii_02.pdf> [on-line][cit.8.6.2013]
- [8] <http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/physics/laureates/1930/raman-bio.html> [on-line][cit.12.3.2013]
- [9] <<http://www.vscht.cz/lam/new/SpAnalPL-3.pdf>> [on-line][cit.12.3.2013]
- [10] <<http://www.vscht.cz/anl/lach2/RAMAN.pdf>> [on-line][cit.12.3.2013]
- [11] <<http://archiv.otevrena-veda.cz/users/Image/default/C1Kurzy/NH2006pdf/15.pdf>> [on-line][cit.25.4.2013]
- [12] COLTHUP, N. B., L. H. DALY, S.E. WIBERLEY. *Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy*. 2010, s. 69-72. ISSN 0-12-182554-X
- [13] <<http://www.ceskatelevize.cz/ct24/domaci/215780-policie-ma-unikatni-pristroj-metanol-a-pervitin-odhali-i-pres-obal/>> [on-line][cit.10.6.2013]
- [14] <<http://archiv.otevrena-veda.cz/users/Image/default/C1Kurzy/NH2006pdf/15.pdf>> [on-line][cit.10.6]
- [15] <http://www.renishaw.com/en/raman-spectroscopy-applications--6259> [on-line][cit.18.2.2013]

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

ČR	Česká republika
cm^{-1}	Jednotka vlnočtu
l	Jednotka objemu (rovnako ako ml)
kg	Jednotka hmotnosti (rovnako ako mg)
m	Jednotka dĺžky (rovnako ako mm, nm, cm)
E	Energia fotónu
$E_{1,2}$	Energia excitovanej molekuly vzhľadom k fotónu
$E_{v0,vR}$	Energia základnej hladiny a vibračnej hladiny
h	Planckova konštanta
f_R	Ramanova frekvencia
IČ	Infračervené elektromagnetické žiarenie
$m_{1,2}$	Hmotnosť atómu
$\tilde{\nu}$	Vlnočet
λ	Vlnová dĺžka

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obr. 1 Chemický vzorec alkoholu</i>	10
<i>Obr. 2 Pohárik o objeme 50 ml</i>	12
<i>Obr. 3 Zjednodušená schéma plynového chromatografu</i>	14
<i>Obr. 4 Ukážka výsledného chromatogramu</i>	15
<i>Obr. 5. C. V. Raman [8]</i>	16
<i>Obr. 6 Spektrum elektromagnetického žiarenia a jeho molekulárne efekty</i>	17
<i>Obr. 7 Harmonický oscilátor</i>	18
<i>Obr. 8 Vibračné formy trojatómovej molekuly</i>	18
<i>Obr. 9 Znázornenie rozptylov Ramanovej spektroskopie</i>	19
<i>Obr. 10 Ukážka testovania podozrivej vzorky pomocou Ramanovho spektroskopu</i>	23
<i>Obr. 11 Rozdiel nameranej vzorky nanormovaného ethanolu</i>	27
<i>Obr. 12 Ramanovane spektrum všetkých známych vzoriek</i>	28
<i>Obr. 13 Rez Ramanovym spektrom so zameraním na methanolový pík</i>	29
<i>Obr. 14 Kalibračná krivka získaná pomocou intenzít</i>	29
<i>Obr. 15 Kalibračná krivka získaná pomocou plôch pod píkom 1035nm</i>	30
<i>Obr. 16 Porovnanie vzorky A so susednými hodnotami</i>	32
<i>Obr. 17 Vzorka B v porovnaní so susednými hodnotami</i>	33
<i>Obr. 18 Vzorka C v porovnaní so susednými vzorkami</i>	33
<i>Obr. 19 Ramanovo spektrum slivovice porovnané s 0,75% methanolom</i>	34
<i>Obr. 20 Ramanove spektrum dvoch griotiek</i>	35
<i>Obr. 21 Ramanove spektrum whisky</i>	35
<i>Obr. 22 Ramanove spektrum marhuľovice</i>	36

SEZNAM TABULEK

<i>Tab. 1 Zoznam namiešaných vzoriek a ich koncentrácia methanolu</i>	<i>25</i>
<i>Tab. 2 Hodnoty neznámych vzoriek</i>	<i>26</i>
<i>Tab. 3 Namerané dáta pre kalibračné krivky</i>	<i>28</i>
<i>Tab. 4 Namerané hodnoty pre intenzitu.....</i>	<i>31</i>
<i>Tab. 5 Namerané hodnoty pre plochu pod píkom 1035nm.....</i>	<i>31</i>
<i>Tab. 6 Výsledky neznámych vzoriek pomocou výpočtu.....</i>	<i>31</i>