

# Měření koncentrace methanolu v alkoholických nápojích metodou vibrační spektroskopie

Bc. Martin Tomeček

---

Diplomová práce  
2015



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta aplikované informatiky

---

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Martin Tomeček**  
Osobní číslo: **A13413**  
Studijní program: **N3902 Inženýrská informatika**  
Studijní obor: **Bezpečnostní technologie, systémy a management**  
Forma studia: **kombinovaná**

Téma práce: **Měření koncentrace methanolu v alkoholických  
nápojích metodou vibrační spektroskopie**  
Téma anglicky: **Measurements of the Concentration of Methanol in Alcoholic Drinks  
Using the Vibrational Spectroscopic Method**

Zásady pro vypracování:

1. Zhodnoťte aktuální situaci kolem "methanолоvé kauzy" v ČR.
2. Popište metody užívané pro stanovení přítomnosti a koncentrace methanolu v konzumních lihovinách.
3. Seznamte se s metodami vibrační spektroskopie, zejména principem Ramanovy spektroskopie.
4. Připravte vhodný soubor vzorků pro spektrální analýzu a provedte experimentální identifikaci s uvážením vlivu různých obalových materiálů.
5. Vyhodnoťte získaná spektrální data.
6. Diskutujte vhodnost a přesnost použité metody a její výhody i nevýhody.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

1. COLTHUP, N. B., DALY, L. H., WIBERLEY, S. E. Introduction to infrared and Raman spectroscopy. 3rd ed. Boston: Academic Press, 1990, 547s. ISBN 01-218-2554-X.
2. 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>.
3. PAINE, A. J.; DAYAN, A. D. Defining a tolerable concentration of methanol in alcoholic drinks. Human & experimental toxicology, 2001, 20(11), 563-568.
4. CHALMERS, John M, Howell G EDWARDS a Michael D HARGREAVES. Infrared and Raman spectroscopy in forensic science. 1st pub. Chichester, West Sussex, UK: Wiley, 2012, 618 s., [34] s. obr. příl. ISBN 978-0-470-74906-7.
5. BRÜNDERMANN, Erik, Heinz-Wilhelm HÜBERS a M KIMMITT. Terahertz techniques. Berlin: Springer, c2012, xxi, 383 s. ISBN 978-3-642-02591-4.
6. 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 diplomové práce:

**Mgr. Hana Vašková**

Ústav elektroniky a měření


Datum zadání diplomové práce:

**12. ledna 2015**

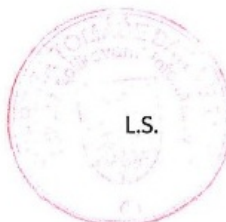
Termín odevzdání diplomové práce:

**15. května 2015**

Ve Zlíně dne 6. února 2015



doc. Mgr. Milan Adámek, Ph.D.  
*děkan*



doc. RNDr. Vojtěch Křesálek, CSc.

*ředitel ústavu*

## **Prohlašuji, že**

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/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 diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k prezenčnímu nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/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 diplomovou/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 – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen připouští-li tak licenční smlouva uzavřená mezi mnou a Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně s tím, že vyrovnání případného přiměřeného příspěvku na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše) bude rovněž předmětem této licenční smlouvy;
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/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 diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/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 diplomové práci pracoval samostatně a použitou literaturu jsem citoval. V případě publikace výsledků budu uveden jako spoluautor.
- že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

Ve Zlíně



.....  
podpis diplomanta

## **ABSTRAKT**

Téma diplomové práce se vztahuje k nedávné "methanolové kauze" v České republice, kdy došlo k několika případům smrtelných otrav methanolem obsaženým v konzumních lihovinách. V teoretické části jsou popsány metody, kterými je možno určit přítomnost a koncentraci methanolu v konzumních lihovinách. V praktické části je využita Ramanova spektroskopie pro analýzu připraveného souboru vzorků a hlavním cílem je zhodnocení rozpoznatelnosti nebezpečného množství methanolu v konzumních lihovinách. K tomuto účelu byly z naměřených dat sestaveny kalibrační křivky. V práci jsou zohledněny i možné faktory ovlivňující výsledky měření. Bylo zjištěno, že Ramanova spektroskopie je vhodnou metodou, s jejíž pomocí lze jednoduše a rychle analyzovat konzumní lihoviny a zjistit zda obsahují smrtelné množství methanolu.

Klíčová slova: vibrační spektroskopie, Ramanova spektroskopie, kalibrační křivka, methanol, spektrální analýza, konzumní lihoviny

## **ABSTRACT**

Topic of this thesis is related to the recent "methanol scandal" in the Czech Republic which caused a several cases of the fatal poisoning due to a consumption of the consumer spirits which contained methanol. Theoretical part describes the methods which can be used to determine the presence and the concentration of the methanol in the consumer spirits. In the practical part the Raman Spectroscopy is used to analyze prepared collection of samples and the main goal is to evaluate possibility to recognize the dangerous quantity of methanol in consumer spirits. For this purpose the calibration curves have been created from the measured data. This thesis is also consider possible factors which can affect the results of the measurement. It has been found that the Raman Spectroscopy is a suitable method that allows easily and quickly analyze consumer spirits and determine whether they contain the lethal amount of methanol.

Keywords: vibrational spectroscopy, Raman spectroscopy, calibration curve, methanol, spectral analysis, consumer spirits

Na tomto místě bych rád poděkoval rodině, přítelkyni a blízkým za podporu a zázemí, které mi poskytovali během zpracovávání diplomové práce. Velké díky patří vedoucí diplomové práce paní Mgr. Haně Vaškové za odborné vedení a čas věnovaný na konzultacích a při práci v laboratořích.

# OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>9</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>10</b>
<b>1 CHARAKTERISTIKA ALKOHOLŮ</b> .....	<b>11</b>
1.1 ETHANOL .....	11
1.1.1 Využití ethanolu .....	12
1.1.2 Účinky na lidský organismus .....	12
1.2 METHANOL .....	12
1.2.1 Využití methanolu .....	13
1.2.2 Účinky na lidský organismus .....	13
1.2.3 Otravy methanolem v České republice .....	13
1.2.4 Otravy methanolem ve světě .....	15
<b>2 KONTROLA OBSAHU METHANOLU V LIHOVINÁCH</b> .....	<b>16</b>
2.1 POVOLENÝ OBSAH METHANOLU V KONZUMNÍCH LIHOVINÁCH.....	16
2.2 PLYNOVÁ CHROMATOGRRAFIE .....	16
2.2.1 Konstrukce plynového chromatografu .....	17
2.2.2 Popis funkce .....	18
2.3 VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE .....	18
2.3.1 Konstrukce kapalinového chromatografu .....	19
2.3.2 Popis funkce .....	19
2.4 CYKlická VOLTAMETRIE.....	20
2.5 FOTOMETRICKÁ METODA .....	20
2.5.1 Příprava ke zkoušce.....	20
2.5.2 Provedení zkoušky .....	20
<b>3 METODY VIBRAČNÍ SPEKTROSKOPIE</b> .....	<b>22</b>
3.1 MOLEKULÁRNÍ OSCILACE.....	22
3.2 MOLEKULÁRNÍ POHYB .....	24
3.2.1 Specifikace vibračních modů .....	25
3.3 RAMANOVA SPEKTROSKOPIE.....	26
3.3.1 Princip Ramanova jevu .....	26
3.3.2 Podmínky vzniku Ramanova jevu .....	28
3.3.3 Ramanův spektrometr .....	28
3.3.4 Varianty Ramanovy spektroskopie .....	29
3.4 INFRAČERVENÁ SPEKTROSKOPIE .....	31
3.4.1 Princip infračervené spektroskopie .....	32
3.4.2 Infračervená spektroskopie kombinovaná s plynovou chromatografií .....	32
3.5 TERAHERTZOVÁ SPEKTROSKOPIE .....	33
3.5.1 Zdroje terahertzového záření.....	33
3.5.2 Detektory terahertzového záření .....	33
<b>4 DÍLČÍ ZÁVĚR - ZHODNOCENÍ UVEDENÝCH METOD</b> .....	<b>34</b>

4.1	CHROMATOGRAFICKÉ METODY .....	34
4.2	INFRAČERVENÁ SPEKTROSKOPIE .....	34
4.3	RAMANOVA SPEKTROSKOPIE.....	34
4.4	TERAHERTZOVÁ SPEKTROSKOPIE .....	34
<b>II</b>	<b>PRAKTICKÁ ČÁST .....</b>	<b>35</b>
<b>5</b>	<b>STANOVENÍ CÍLŮ PRAKTICKÉ ČÁSTI.....</b>	<b>36</b>
5.1	VYMEZENÉ CÍLE .....	36
5.2	ÚVODNÍ POPIS PROVEDENÍ EXPERIMENTU.....	36
<b>6</b>	<b>INSTRUMENTACE A PŘÍPRAVA VZORKŮ .....</b>	<b>37</b>
6.1	RAMANŮV SPEKTROMETR .....	37
6.1.1	Specifikace přístroje.....	37
6.1.2	Excitační zdroje.....	38
6.1.3	Optická sonda.....	38
6.1.4	Softwarové vybavení.....	39
6.2	PŘÍPRAVA VZORKŮ PRO LABORATORNÍ MĚŘENÍ .....	39
6.2.1	Vzorky pro sestavení kalibrační křivky .....	39
6.2.2	Vzorky pro test kalibrační křivky .....	41
<b>7</b>	<b>MĚŘENÍ VZORKŮ A JEJICH ANALÝZA .....</b>	<b>42</b>
7.1	POSTUP MĚŘENÍ.....	42
7.2	CHARAKTERISTIKA NAMĚŘENÝCH SPEKTER METHANOLU A ETHANOLU .....	43
7.3	SESTAVENÍ KALIBRAČNÍCH KŘIVEK.....	45
7.3.1	Kalibrační křivky z první měřené oblasti.....	47
7.3.2	Kalibrační křivky z druhé měřené oblasti .....	50
7.3.3	Sestavení kalibračních křivek - dílčí závěr .....	52
7.4	VYUŽITÍ KALIBRAČNÍ KŘIVKY K ANALÝZE TESTOVACÍCH VZORKŮ .....	53
7.4.1	Výsledky a závěry spektrální analýzy .....	54
7.5	VLIV OBALOVÝCH MATERIÁLŮ NA VÝSLEDKY MĚŘENÍ .....	56
7.5.1	Vliv obalových materiálů na výsledky měření - dílčí závěr .....	59
7.6	VLIV TEPLoty VZORKU NA VÝSLEDKY MĚŘENÍ.....	59
7.7	ANALÝZA VZORKŮ KONZUMNÍCH LIHOVIN.....	60
7.7.1	Analýza obsahu methanolu ve vybraných lihovinách.....	61
<b>8</b>	<b>SHRNUTÍ PRAKTICKÉ ČÁSTI .....</b>	<b>64</b>
8.1	VÝHODY POUŽITÉ METODY .....	64
8.2	NEVÝHODY POUŽITÉ METODY .....	64
	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>65</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>66</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK .....</b>	<b>71</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>73</b>
	<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>75</b>



## ÚVOD

Hlavním důvodem pro výběr tématu diplomové práce byly události kolem „methanolové kauzy“ z roku 2012, která se odehrála na území České republiky. Na podzim toho roku došlo k četným případům otrav methanolem, který byl obsažen v konzumních lihovinách. Koncentrace methanolu byla tak vysoká, že otravy byly pro konzumenty smrtelné či s doživotními zdravotními následky. Vzhledem k tomu, že určité množství lihovin obsahující smrtelné množství methanolu stále koluje mezi lidmi, důsledky „methanolové kauzy“ z podzimu roku 2012 pokračují i do současné doby. Celkově bylo nutné poměrně rychle a efektivně analyzovat velké množství lihovin s neznámým původem. Na tuto situaci reagovali výrobci analytických spektroskopických přístrojů a uvedli na trh přenosné Ramanovy spektrometry, s jejichž pomocí je možné určit koncentraci methanolu v konzumních lihovinách od 3 %. Nadlimitní množství methanolu stanovené Nařízením Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 110/2008 však začíná pro některé kategorie lihovin od 0,6 %. Cílem diplomové práce je ověřit možnosti laboratorního Ramanova spektrometru a pokusit se určit i nižší koncentrace methanolu v konzumních lihovinách. Jedním z cílů je i zhodnocení aspektů, které mohou ovlivnit výsledky měření vzorků konzumních lihovin. Je ověřeno, že Ramanova spektroskopie je pro podobné účely velmi sofistikovanou metodou. Ačkoliv první používaná metoda pro analýzu lihovin v souvislosti s „methanolovou kauzou“ byla plynová chromatografie, později při analyzování velkého množství vzorků se stala neefektivní. Bylo to hlavně z důvodu časové náročnosti při měření. Dalším negativním faktorem byla i finanční náročnost při použití plynové chromatografie. Ramanova spektroskopie je známá jako nedestruktivní, bezkontaktní a poměrně rychlá metoda. V porovnání s plynovou chromatografií lze rozhodně uvést nižší náklady na analýzu vzorků neznámých lihovin. Další výhodou oproti plynové chromatografii je možnost měření přes transparentní obaly. Tyto všechny uvedené aspekty kladně přispívají k celkovému využívání právě Ramanovy spektroskopie. Cílem této práce je tedy poukázat na možnosti této metody při identifikaci nebezpečných látek, vytvořit postup měření a metodiku kvantitativní analýzy a zvážit vlivy, které mohou nepříznivě ovlivnit výsledky měření. V teoretické části diplomové práce jsou uvedeny mimo Ramanovy spektroskopie a plynové chromatografie i další metody, kterými je možné měřit koncentrace methanolu v lihovinách. Ovšem v praxi nejsou až tak efektivní pro uvedený typ analýzy jako právě Ramanova spektroskopie.

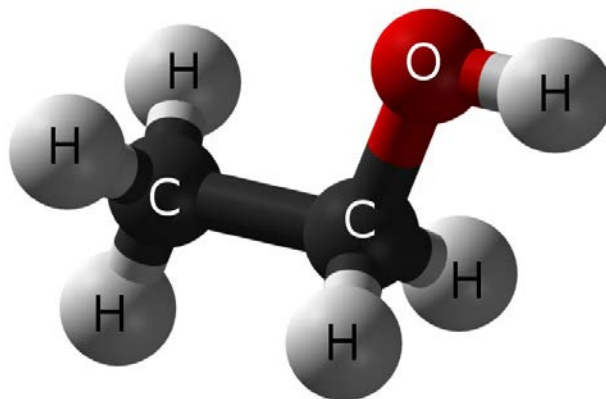
## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 CHARAKTERISTIKA ALKOHOLŮ

Alkoholy jsou organické chemické sloučeniny, které spolu s fenoly patří do skupiny zvané hydroxyderiváty. Obsahují hydroxylovou skupinu (-OH), která může být vázána na primární, sekundární či terciární uhlíkový atom. Z tohoto hlediska je možné alkoholy rozdělit na primární, sekundární či terciární [1, s. 196]. Další možnost rozdělení je dle počtu hydroxylových skupin (-OH) vázaných na uhlíkový atom. Tímto způsobem jsou rozlišovány alkoholy jednosytné, dvojsytné (dioly), trojsytné (trioly), čtyřsytné (tetraoly), atd. [2]. Dle typu uhlovodíkového zbytku, na který je vázána hydroxylová skupina (-OH) je možné alkoholy dále rozdělit na acyklické (alifatické) a cyklické (alicyklické). Pokud je hydroxylová skupina vázána na uhlíkový atom otevřeného (přímého nebo rozvětveného) uhlovodíkového zbytku, jedná se o alkoholy acyklické. Je-li hydroxylová skupina vázána na uhlíkový atom uzavřeného uhlovodíkového zbytku, jedná se o alkoholy cyklické [3]. Alkoholy mají slabě kyselý charakter. Jejich struktura je podobná struktuře vody a jsou do značné míry ve vodě rozpustné, zejména alkoholy s nízkou molekulovou hmotností [1, s. 197]. V rámci zaměření této diplomové práce jsou dále uvedeny a popsány dva důležité alkoholy, a sice ethanol a methanol.

### 1.1 Ethanol

Mezi nejznámější alkoholy patří ethanol (etylalkohol, líh). Jeho racionální konstituční vzorec je  $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$ . Obsahuje jednu hydroxylovou skupinu (-OH) která je vázána na uhlíkový atom, to znamená, že je jednosytný. Jedná se o bezbarvou hořlavou kapalinu příjemné vůně. Ethanol má bod varu  $78,3\text{ }^\circ\text{C}$ . Vyrábí se kvašením různých druhů kvasinek či synteticky, a to katalytickou hydratací ethenu. [4, s. 15-16]



Obr. 1. Prostorový model molekuly ethanolu [5]

### 1.1.1 Využití ethanolu

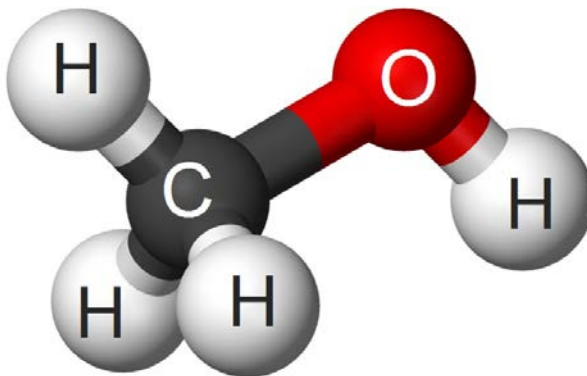
Ethanol je využíván k výrobě alkoholických nápojů, léčiv, kosmetických výrobků, rozpouštědel, organických sloučenin, apod. Používá se též jako ekologické palivo pro spalovací motory či jako dezinfekční prostředek. Pro technické účely se ethanol tzv. denaturuje. To znamená, že se přidají aditiva, aby se stal nepoživatelným. [2]

### 1.1.2 Účinky na lidský organismus

Lidský organismus přijímá ethanol trávicí soustavou po požití alkoholických nápojů. K největšímu vstřebávání dochází v tenkém střevě. Za půl až jednu hodinu po požití alkoholických nápojů dochází k maximální koncentraci ethanolu v krvi. Jeho působení na lidský organismus má z mentálního hlediska za následek dočasné snížení schopnosti reakce a vyvolává pocit euforie. Účinky jsou však individuální. Záleží na tělesné hmotnosti a pohlaví člověka. Metabolizování ethanolu probíhá v převážné části v játrech. Vlivem enzymu alkoholdehydrogenáza se ethanol přeměňuje oxidací na acetaldehyd (ethanal) a ten dále na kyselinu octovou. Pravidelným požíváním alkoholu vzniká závislost - alkoholismus. [6]

## 1.2 Methanol

Methanol (methylalkohol, karbinol) je obdobně jako ethanol bezbarvá hořlavá kapalina příjemné vůně. Jedná se o nejjednodušší acyklický (alifatický) alkohol. Jeho racionální konstituční vzorec je  $\text{CH}_3\text{-OH}$ . Obsahuje jednu hydroxylovou skupinu ( $-\text{OH}$ ) a řadíme jej tedy mezi jednosytné alkoholy. Bod varu methanolu je  $64,7\text{ }^\circ\text{C}$  [4, s. 16]. Dříve se vyráběl suchou destilací bukového dřeva, proto byl hovorově nazýván jako dřevitý líh. V dnešní době je jeho nejrozšířenější výroba průmyslová. Jedná se o katalytickou hydrogenaci oxidu uhelnatého z vodního plynu, za přítomnosti katalytické směsi mědi, oxidu zinečnatého, oxidu hlinitého za vysokých teplot (kolem  $250\text{ }^\circ\text{C}$ ) a za tlaků 5 až 10 MPa [2].



Obr. 2. Prostorový model molekuly methanolu [7]

### 1.2.1 Využití methanolu

Methanol se využívá jako rozpouštědlo či přísada k pohonným hmotám (výroba bionafty). Přibližně polovina produkce methanolu dále oxiduje na formaldehyd (methanal), který slouží k výrobě polymerů. Dále se využívá k výrobě dimethyleteru, kyseliny mravenčí, kyseliny octové, apod. [1, s. 219]

### 1.2.2 Účinky na lidský organismus

Methanol patří mezi silně toxické látky. Jeho požití může zapříčinit trvalé poškození jater či sítnice oka. Dochází tak ke zhoršení zraku až oslepnutí. Množství, které lze považovat jako zdraví nebezpečné je individuální. Stejně jako je tomu u ethanolu, záleží na hmotnosti a pohlaví člověka [8]. Methanol se metabolizuje na formaldehyd. Tento proces probíhá v játrech. Dále se přeměňuje na kyselinu mravenčí a ta na oxid uhličitý. Oproti ethanolu se methanol metabolizuje pomaleji, a to přibližně poloviční rychlostí. Celkové odbourávání methanolu je pomalý proces. Odpovídá přibližně sedmině rychlosti pro ethanol. Ethanol oproti methanolu má asi dvacetkrát větší schopnost se chemicky sloučit s alkoholdehydrogenázou. Při intoxikaci methanolem je ethanol podáván jako antidotum (protijed) [6]. Při intoxikaci methanolem je tedy doporučeno vypít jednorázově 200 ml kvalitního destilátu o obsahu alespoň 40 - 50 % ethanolu. Výrazně se tak zpomalí metabolismus methanolu a podstatně se tak sníží jeho biochemické a klinické účinky [9, s. 83]. Uvádí se, že nebezpečné nebo život ohrožující množství methanolu v alkoholických nápojích vzniká v případě, kdy není dodržen poměr methanolu a ethanolu 1 : 10 nebo nižší [9, s. 81].

### 1.2.3 Otravy methanolem v České republice

Z historického hlediska byl na českém území zmiňován pouze jediný incident, týkající se otravy methanolem. Jednalo se o nešťastnou událost z konce druhé světové války. Sovětští vojáci tehdy požili methanol z cisterny z chemičky v Ústí nad Labem. Na následky otravy, podle archiváře Vladimíra Kaisera, zemřel jeden Čech a sedm sovětských vojáků. Nyní se do novodobé historie zapsal, co do rozsahu a bohužel i počtu obětí, větší incident. Jedná se o případ z roku 2012 označován jako „methanolová kauza“ či „methanolová aféra“. [10]

### Úvodní fakta o „methanolové kauze“ v České republice

K hlavní vlně otrav methanolem došlo na podzim roku 2012. Karvinská policie oznámila 6. září 2012 první případ dvou zemřelých v Havířově [10]. 12. září byl Ministerstvem

zdravotnictví zřízen krizový štáb a dále byl vyhlášen plošný zákaz stánkového prodeje alkoholických nápojů s větším než 30 % obsahem alkoholu. 14. září došlo k úplnému zákazu prodeje, nabízení a distribuci alkoholických nápojů s obsahem alkoholu větším než 20 %. Distribuce a vývoz lihovin o obsahu větším než 20 % mimo území České republiky bylo zakázáno ministrem zdravotnictví 20. září. Ke zmírnění prohibice došlo 27. září 2012, a to povolením prodeje zakázaných lihovin, které byly vyrobeny do 31. prosince 2011. Zakázané lihoviny vyrobené po tomto datu mohly být prodávány pouze v případě, byl-li zajištěn doklad o původu použitého lihu. [11, s. 19-21]

### **Vyšetřování a soudní proces**

Policejní pátrání vyústilo v případ s největším počtem obviněných v dějinách české kriminalistiky. 24. září 2012 policie oznámila, že kriminalisté objevili zdroj jedovatého methanolu, a ten pocházel z ČR. Došlo k zadržení dvojice hlavních podezřelých. Byli to Rudolf Fian a Tomáš Křepela. Níže jsou uvedena jména hlavních aktérů „methanolové kauzy“ a tresty, které jim soud vyměřil. [12]

Rudolf Fian	doživotí
Tomáš Křepela	doživotí
Jiří Vacula	15 let
Jiří Vacula	15 let
Martin Jirout	16 let
Alexander Jordán	13 let
Martin Svoboda	12 let
Robert Sedlařík	8 let
Martin Cekota	13 let a 6 měsíců
Viktor Koláček	21 let
Libor Vanderka	20 let a 6 měsíců

### **Aktuální informace o „methanolové kauze“ v České republice**

Do konce roku 2014 zemřelo na otravu methanolem 49 osob, a to na různých místech ČR. Několik desítek osob bylo hospitalizováno s trvalým poškozením zraku. Tato čísla však nemusí být konečná vzhledem k tomu, že množství jedovatého methanolu stále koluje mezi lidmi a po hlavní vlně otrav se objevují nové oběti. Tři muže obžalované v hlavní části „methanolové kauzy“ olomoucký vrchní soud propustil na svobodu. Viktor Koláček, Mar-

tin Jirout a Libor Vanderka byli původně odsouzeni k vysokým trestům. Vrchní soud však jejich tresty v lednu 2015 zrušil. Po zrušení původních rozsudků následovalo v pondělí 9. února pravidelné soudní jednání, při němž se každé tři měsíce rozhoduje o prodloužení vazby. Kromě těchto tří obžalovaných byl rozsudek v lednu zrušen a případ vrácen krajskému soudu také u Alexandra Jordána, Aleše Svobody, Martina Cekoty a Roberta Sedlaříka. Ty ale předtím soud do vazby nevzal. Z původní hlavní větve „methanolové kauzy“ tak ve vazbě již není nikdo. Hlavní aktéři kauzy Křepela a Fian, kterým vrchní soud začátkem února potvrdil doživotní tresty, byli již podle Lichnovského převedeni do výkonu trestu. Sedlařík je ve vězení kvůli jinému případu. [13]

#### 1.2.4 Otravy methanolem ve světě

K podobné sérii otrav došlo v září 2001 v Pernovském kraji v Estonsku, kdy nápoje vyrobené z methanolu z odcizených sudů zavinily smrt 68 lidí a způsobily trvalé následky dalším 43 osobám. Pančovaný alkohol s přemírou methanolu zabíjel i v jiných státech. V roce 1981 zahynulo v indickém Bengalúru 308 lidí, v bangladéšském Narsingdi zemřelo v roce 1999 celkem 113 lidí a 137 lidí zemřelo v roce 2000 v keňském Nairobi [14]. Další země spojené s hromadnou otravou methanolem jsou například Norsko (2002), Tunisko (2003), Čína (2004), Indie (2009) nebo Turecko díky události z roku 2011 [15].

## 2 KONTROLA OBSAHU METHANOLU V LIHOVINÁCH

V následujících kapitolách jsou uvedeny současné metody užívané pro stanovení přítomnosti a koncentrace methanolu v konzumních lihovinách.

### 2.1 Povolený obsah methanolu v konzumních lihovinách

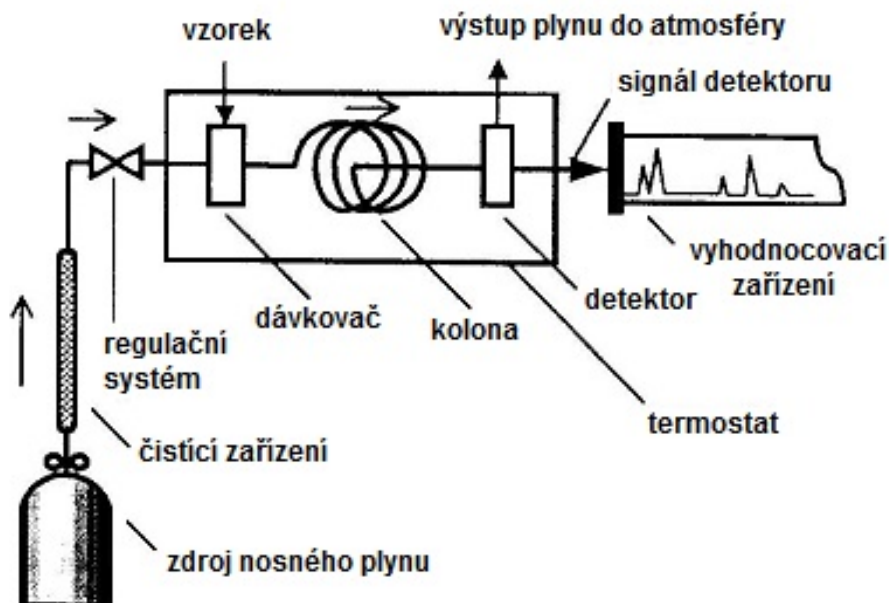
Jednou z vlastností týkající se ovocných destilátů je to, že mohou obsahovat určité množství methanolu, které vzniká při procesu kvašení. Povolené množství methanolu v ovocných destilátech stanovuje Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 110/2008, o definici, popisu, obchodní úpravě, označování a ochraně zeměpisných označení lihovin. Dle zmíněného nařízení je povolené množství methanolu stanoveno podle kategorie, do které daná lihovina patří. Z těchto kategorií vyplývá, že například Vinný destilát, Brandy a Weinbrand jsou lihoviny obsahující nejvýše 200 g methanolu na hektolitr ethanolu o koncentraci 100 % objemových. Matolinovice ovocná je lihovina, která musí splňovat podmínku obsahu methanolu v množství nejvýše 1 500 g na hektolitr ethanolu o koncentraci 100 % objemových. U ovocných destilátů je maximální obsah methanolu závislý na druhu ovoce nebo bobuloviny, ze které byl získán. Pro slívy, mirabelky, švestky, jablka, hrušky, maliny, ostružiny, meruňky a broskve je to 1 200 g na hektolitr ethanolu o koncentraci 100 % objemových. Pro hrušky odrůdy "Williams", červený rybíz, černý rybíz, jeřabiny, bezinky, kdoule a bobule jalovce platí, že maximální obsah methanolu je 1 350 g na hektolitr ethanolu o koncentraci 100 % objemových. Destiláty z cidru a z perry obsahují nejvýše 1 000 g methanolu na hektolitr ethanolu o koncentraci 100 % objemových. [16]

### 2.2 Plynová chromatografie

V souvislosti s „methanolovou kauzou“, byla plynová chromatografie (GC) využívanou metodou pro stanovení obsahu methanolu v konzumních lihovinách [11]. Jedná se o jednu z fyzikálně chemických metod, která umožňuje separaci složek obsažených v analyzovaném vzorku. Základem je rozdělování složek mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze. Jedna fáze se nazývá stacionární. Druhá fáze je mobilní. V případě plynové chromatografie se u mobilní fáze jedná o plyn. K tomu, aby došlo k separaci složek ze vzorku, je předpokladem vzájemně rozdílná afinita (přilnavost) k jednotlivým fázím. Pokud má jedna složka větší afinitu k mobilní fázi, je touto fází více unášena. Má-li složka větší afinitu ke stacionární fázi je mobilní fází unášena naopak méně. Metoda bývá doplněna hmotnostní spektroskopií (Mass Spectrometry) označována zkratkou GC-MS. [17]



### 2.2.1 Konstrukce plynového chromatografu



Obr. 3. Schématické znázornění plynového chromatografu [18, s. 11]

**Zdroj nosného plynu** - Je tvořen tlakovou lahví obsahující helium, dusík či argon. Nosný plyn bývá určen druhem použité kolony a detektoru.

**Čistící zařízení** - Slouží jako filtr k zachycení nečistot a vlhkosti v nosném plynu. Dále zabraňuje poškození stacionární fáze v koloně tím, že odstraňuje stopy reaktivního kyslíku.

**Regulační systém** - Je realizován ventilem. Dle použitého typu může zajišťovat stálý průtok nosného plynu nebo proměnlivý programově se měnící.

**Dávkořač** (injektor) - slouží k zavedení vzorku do proudu nosného plynu. Technika dávkování musí zajistit odpaření vzorku v co nejkratším čase. Roztoky se dávkují pomocí injekčních stříkaček (0,1 - 10  $\mu$ l) přes pryřové septum.

**Kolona** - V této části chromatografu se nachází stacionární fáze. V koloně dochází k separaci složek.

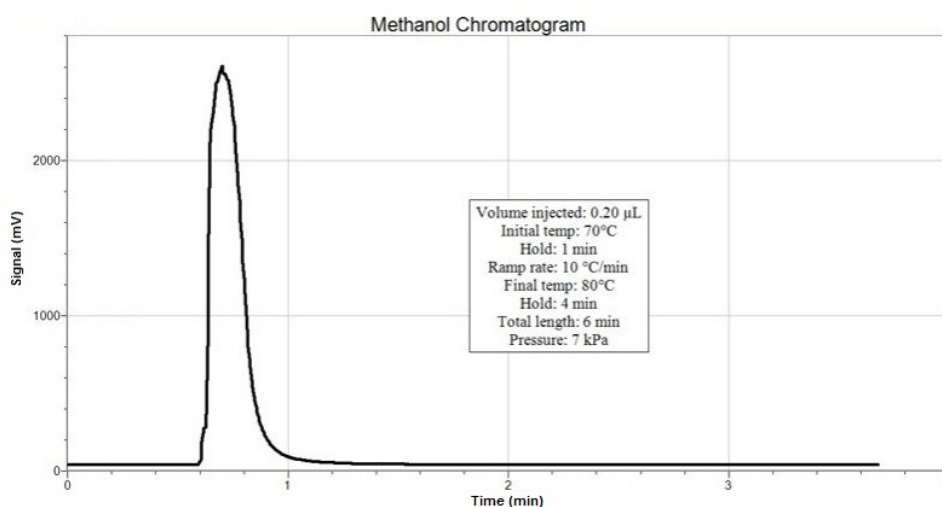
**Detektor** - Umořňuje detekovat přítomnost látek v nosném plynu.

**Vyhodnocovací zařízení** - Výstupem je chromatografická křivka, jejíž podoba závisí na průběhu signálu z detektoru.

**Termostat** - Zajiřřuje spínání ohřevu dávkovače, kolony, detektoru a udržuje tak dostatečně vysokou teplotu, aby vzorek setrval v plynném stavu. [18, s. 10-12]

### 2.2.2 Popis funkce

Kolonou neustále prochází nosný plyn. Vzorek je injektorem zaveden do proudu nosného plynu ve formě par. V koloně dochází k separování složek vzorku, a to v závislosti na míře afinity (přilnavosti) se stacionární fází. Látky postupně vycházejí z kolony a následně do detektoru, kde je indikována okamžitá koncentrace separovaných látek v nosném plynu. Signál z detektoru je zpracován pomocí vyhodnocovacího zařízení. Toto zařízení zakresluje chromatografickou křivku (tzv. chromatogram).



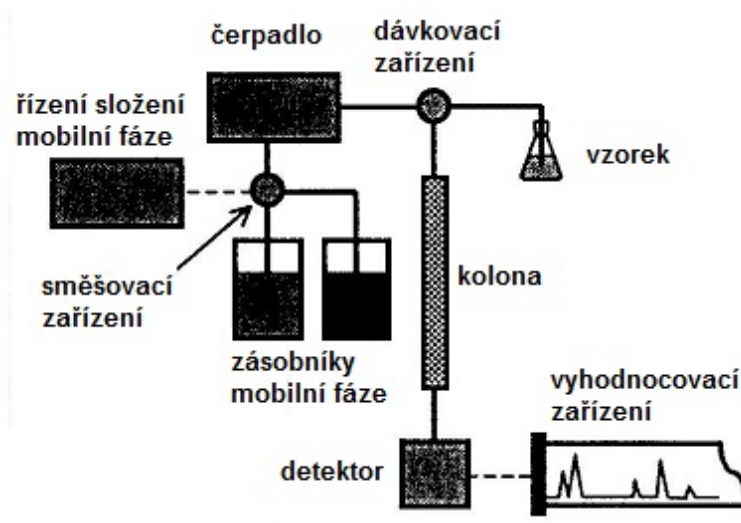
Obr. 4. Chromatografická křivka methanolu [19]

Na obrázku (Obr. 4) je příklad chromatografické křivky methanolu. Osa  $x$  znázorňuje čas a osa  $y$  intenzitu signálu z detektoru. Podle polohy píku lze určit identitu látky. Koncentraci látky je možno určit porovnáváním ploch píků standardního vzorku (známá koncentrace) a ploch píků zkoumaného vzorku (neznámá koncentrace). Je-li součástí chromatografu počítač, vyhodnocování provádí program. [17]

### 2.3 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Další chromatografickou metodou vhodnou pro stanovení přítomnosti methanolu v konzumních lihovinách je vysokoúčinná kapalinová chromatografie. V odborném textu je též známá pod zkratkou HPLC (High Performance Liquid Chromatography) [20]. Na rozdíl od plynové chromatografie je mobilní fáze tvořena kapalinou. Analyzovaný vzorek není nutné převádět na plyn a je možné metodu využít pro separaci nestálých sloučenin. U většiny separací HPLC též není nutné nastavovat teplotu, jelikož proces probíhá při laboratorní teplotě. Principiálně se separační děje u kapalinové chromatografie neliší od chromatografie plynové. [18, s. 25]

### 2.3.1 Konstrukce kapalinového chromatografu



Obr. 5. Schématické znázornění kapalinového chromatografu [18, s. 25]

**Čerpadlo** - Zajišťuje průtok mobilní fáze od řádově několika  $\mu\text{l}$  do desítek ml za minutu.

**Směšovací zařízení** - Umožňuje měnit složení mobilní fáze, a to i během separace. Je možno jej řídit programově.

**Dávkovací zařízení** - Slouží k zavedení vzorku do mobilní fáze. Je realizováno injekčními systémy nebo obtokovým dávkovacím kohoutem.

**Kolony** - Zde je umístěna stacionární fáze. Používají se pouze náplňové.

**Detektory** - Používají se fotometrické, refraktometrické a fluorescenční. U vysokoúčinné kapalinové chromatografie by měly být málo citlivé na mobilní fázi a selektivní pro analyty.

**Vyhodnocovací zařízení** - Výstupem je chromatografická křivka, jejíž podoba závisí na průběhu signálu z detektoru podobně jako u plynového chromatografu. [18, s. 25-26]

### 2.3.2 Popis funkce

Vzorky jsou dávkovacím zařízením zaváděny do mobilní fáze. Odtud jsou jednotlivé složky vzorku unášeny na kolonu, kde v závislosti na fyzikálně-chemických vlastnostech dochází k separaci analytů. Analyty jsou po průchodu separační kolonou detekovány v průtokové cele detektoru. V detektoru je měřena fluorescence, absorbance, index lomu a elektrická vodivost. Výstup je zpracován pomocí vyhodnocovacího zařízení a stejně jako

u plynové chromatografie je vykreslen chromatogram, z něž je hodnocena plocha nebo výška píku. [21]

## 2.4 Cyklická voltametrie

Další metodou pomocí níž je možné stanovit koncentraci methanolu v konzumních lihovinách je cyklická voltametrie. Je to metoda odvozená od polarografie, při níž se provádí elektrolýza zkoumaného roztoku. Cyklická voltametrie je založena na sledování proudové odezvy v obvodu pracovní a pomocné elektrody v závislosti na napětí (trojúhelníkový průběh potenciálu) vkládaném mezi pracovní a referenční elektrodu. Výstup měření znázorňuje voltogram. Jednotlivé píky ve voltogramu charakterizují každou molekulu analytu. Výška píku udává množství molekul, které podlely elektrochemické reakci a dle potenciálu, ve kterém je pík ve voltogramu umístěn lze určit danou látku. [22, s. 108] V lednu roku 2013 byl publikován způsob pro současné stanovení methanolu a ethanolu v bioethanolu použitím cyklické voltametrie [23].

## 2.5 Fotometrická metoda

Koncentraci methanolu v konzumních lihovinách je možno stanovit i pomocí fotometrie. Tou lze zjišťovat koncentraci určité látky v roztoku na základě pohlcování světla o určité vlnové délce. Porovnává se intenzita zbarvení vzorků o neznámé koncentraci s roztokem známé koncentrace. V normě ČSN 56 0210-9 (Metody zkoušení lihovin) je popsán postup a provedení zkoušky na stanovení methanolu v brandy a vinném destilátu. Metoda je založena na oxidaci methanolu v kyselém prostředí manganistanem draselným na formaldehyd, který tvoří s kyselinou chromotropovou nebo její dvousodnou solí sloučeninu růžovofialové barvy. [24, s. 1]

### 2.5.1 Příprava ke zkoušce

Před provedením zkoušky se připraví sedm srovnávacích roztoků o různé koncentraci methanolu a kontrolní roztok. Tyto roztoky slouží k sestrojení kalibrační křivky, a to měřením absorbance srovnávacích roztoků proti kontrolnímu roztoku. Měření se provádí na spektrofotometru nebo fotoelektrokolorimetru při vlnové délce 575 nm. [24, s. 1-3]

### 2.5.2 Provedení zkoušky

Brandy nebo vinný destilát se před provedením zkoušky ředí destilovanou vodou na roztok s objemovým podílem alkoholu 40 %. Vzniklý roztok se destiluje. Ze získaného destilátu

se stanoví hmotnostní koncentrace methanolu. Dále se připraví kontrolní roztok z destilované vody. Ke zkoušce je možno použít destilát brandy nebo vinného destilátu po stanovení obsahu ethanolu. V tomto případě se ředí destilát na roztok s objemovým podílem ethanolu 40 %. V bezbarvém vinném destilátu se stanovení provádí bez destilace.

Hmotnostní koncentrace methanolu v brandy a vinném destilátu  $X [g \cdot dm^{-3}]$  se vypočítá podle vzorce:

$$X = A \cdot K \quad (1)$$

kde  $A [g \cdot dm^{-3}]$  je hmotnostní koncentrace methanolu ve zkoumaném roztoku zjištěná v kalibračním grafu a  $K$  je činitel ředění brandy nebo vinného destilátu.

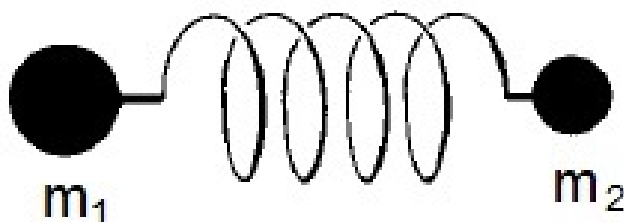
Konečným výsledkem je aritmetický průměr dvou souběžných stanovení, mezi nimiž není větší rozdíl než  $0,1 g \cdot dm^{-3}$ . Konečný výsledek se vyjadřuje s přesností na jedno desetinné místo. [24, s. 3-4]

### 3 METODY VIBRAČNÍ SPEKTROSKOPIE

Vibrační spektroskopie je souhrnný termín používaný zejména v souvislosti s analytickými technikami, a to infračervenou (IR), Ramanovou a terahertzovou spektroskopií [25, s. 9]. Spektroskopické metody poskytují nedestruktivním způsobem informace o molekulární struktuře a složení zkoumaného vzorku. Lze jimi měřit přechody mezi vibračními hladinami, které souvisí s vibracemi chemických vazeb ve vzorku. Neexistují dvě různé látky se stejným spektrem. Získané spektrum je unikátní a lze jej srovnat s jedinečností otisku prstu. Metody vibrační spektroskopie jsou používány pro identifikaci látek, objasnění struktury, sledování reakcí, kontrolu kvality, či kvantitativní určení množství látky ve zkoumaném vzorku. Jsou tedy využitelné i pro měření obsahu methanolu v konzumních lihovinách. [26, s. 179]

#### 3.1 Molekulární oscilace

Zjednodušený model dvouatomové molekuly je znázorněn na obrázku (Obr. 6).



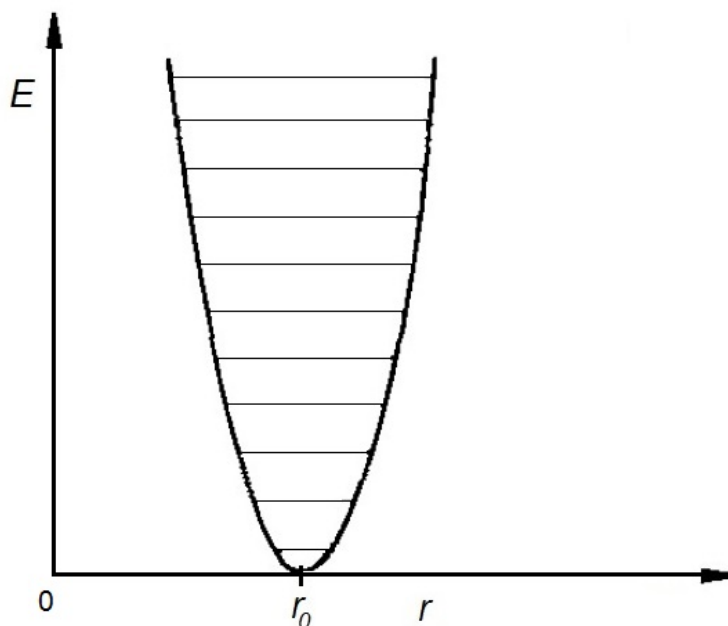
Obr. 6. Model dvouatomové molekuly [27, s. 8]

Atomy jsou reprezentovány dvěma hmotnými body  $m_1$  a  $m_2$ , které jsou spojeny pružinou. Jako vibrace dvouatomové molekuly je chápána periodická změna mezijaderné vzdálenosti. Jedná se tedy při klasickém popisu o oscilátor, pro jehož frekvenci platí vztah:

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \cdot \sqrt{\frac{k}{m_R}} \quad (2)$$

kde  $m_R$  je redukovaná hmotnost,  $k$  je silová konstanta [26, s. 7-10]. Pro redukovanou hmotnost platí následující vztah:

$$m_R = \frac{m_1 \cdot m_2}{m_1 + m_2} \quad (3)$$



Obr. 7. Křivka potenciální energie harmonického oscilátoru [27, s. 11]

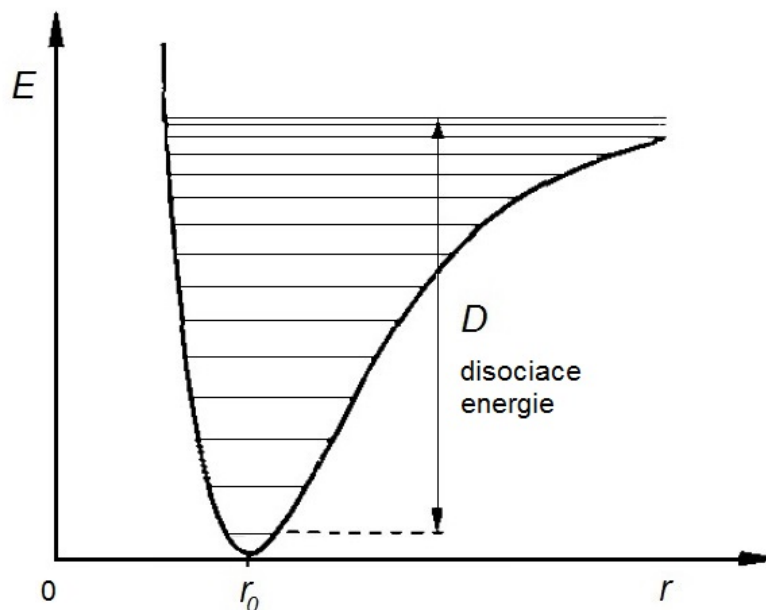
Na obrázku (Obr. 7) je grafické znázornění vychýlení atomů z rovnovážné polohy s energetickými hladinami podle kvantové mechaniky. Osa  $x$  představuje vychýlení atomů  $r$ , kde v bodě  $r_0$  je rovnovážný stav. Na osu  $y$  je vynesena energie  $E$ . Podle klasické mechaniky, může harmonický oscilátor kmitat s libovolnou velikostí amplitudy, což znamená, že může mít libovolné množství energie, velké nebo malé. Kvantová mechanika, však ukazuje, že molekuly mohou existovat pouze v určitých energetických stavech. Energie je tedy dána vztahem:

$$E = hv \cdot \left( n + \frac{1}{2} \right) \quad (4)$$

kde  $h$  je Planckova konstanta,  $v$  je frekvence oscilátoru a  $n$  je vibrační kvantové číslo. Pro rozdíl energetických hladin harmonického oscilátoru platí následující vztah:

$$\Delta E = hv \quad (5)$$

K přechodu mezi energetickými hladinami dojde, pokud je molekule dodána energie prostřednictvím elektromagnetického záření a zároveň energie, která je rovna rozdílu energetických hladin. [27, s. 11]



Obr. 8. Křivka potenciální energie anharmonického oscilátoru [27, s. 11]

Z obrázku (Obr. 8) je patrné, že u anharmonického oscilátoru se vzdálenosti mezi energetickými hladinami s rostoucí energií zmenšují. Pro anharmonický oscilátor platí dle kvantové mechaniky následující vztah:

$$E = hv \cdot \left( n + \frac{1}{2} - q \cdot \left( v + \frac{1}{2} \right)^2 \right) \quad (6)$$

kde  $q$  je anharmonická konstanta. V reálných systémech je kladná, což je důvodem, proč energetické hladiny nejsou ve stejné vzdálenosti tak, jako je tomu u modelu harmonického oscilátoru. [26, s. 25-26]

### 3.2 Molekulární pohyb

Molekulární pohyb může nastat v podstatě třemi různými způsoby:

- molekula se pohybuje jako celek,
- otáčením kolem vlastní osy,
- vibrační pohyb (pravidelné změny atomárních vazeb).

Dále bude rozebrán vibrační pohyb, který je důležitý pro popis energetických změn. Dosud bylo uvažováno pouze s dvouatomovými molekulami. V případě víceatomových molekul je vibrační pohyb popsán základní frekvencí nebo různými typy vibrací, které jsou definovány následujícími podmínkami:



- všechny atomy molekuly se pohybují se stejnou frekvencí a obvykle ve stejné fázi,
- vibrační pohyb nezpůsobí přesun nebo rotaci molekuly jako celku,
- každý typ vibrace může být vybuzen samostatně. [28, s. 255-259]

### 3.2.1 Specifikace vibračních modů

#### Základní typy vibrací

- změna délky jedné nebo více vazeb (Stretching Vibrations),
- změna úhlů vazeb v rovině (In-Plane Bending Vibrations),
- pohyb jednoho atomu mimo rovinu (Out-of-Plane Bending Vibrations),
- pohyb více atomů mimo rovinu (Torsion Vibrations).

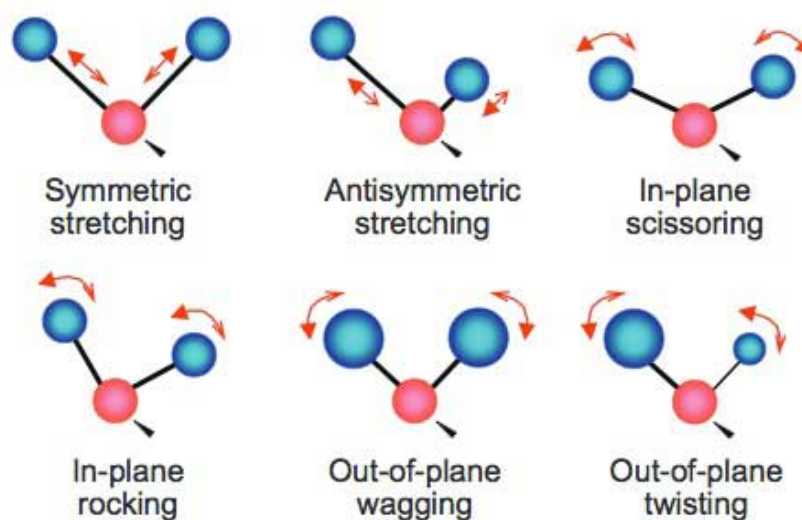
#### Molekulární symetrie

U vibrací, při kterých dochází ke změně délky vazby (Stretching) existují dvě varianty:

- symetrické vibrace,
- asymetrické vibrace. [28, s. 259-261]

#### Deformační vibrace

- rovinné - kyvadlové (Rocking), nůžkové (Scissoring),
- mimo rovinné - krouživé (Twisting), vějířové (Wagging). [29]



Obr. 9. Vibrační módy dvouatomové molekuly [29]

### 3.3 Ramanova spektroskopie

Ramanova spektroskopie je metoda, která umožňuje nedestruktivním způsobem zkoumat mikroskopickou strukturu či složení látek v pevném, plynném a kapalném skupenství [30]. Základem Ramanovy spektroskopie je nepružný rozptyl světla. Rakouský fyzik Adolf Smekal, předložil roku 1923 teorii o tomto rozptylu, který byl experimentálně pozorován a popsán indickými fyziky až v roce 1928. Byli to sir C. V. Raman a K. S. Krishnan. Od té doby byl zmíněný nepružný rozptyl světla označován jako Ramanův jev. Roku 1930 byla C. V. Ramanovi udělena Nobelova cena za fyziku. [27, s. 3]

#### 3.3.1 Princip Ramanova jevu

Jako zdroj světelného záření se v Ramanově spektroskopii používají lasery, a to z oblasti ultrafialového záření, z oblasti viditelného světla a z blízké infračervené oblasti. Laser slouží jako excitační zdroj, kterým jsou ozářeny molekuly vzorku. Fotony z excitačního zdroje interagují se vzorkem. Část fotonů se absorbuje a část je rozptýlena. Dochází k nepružnému a pružnému rozptylu světla. [27, s. 63]

#### Nepružný rozptyl světla

Nepružný rozptyl světla vzniká interakcí elektromagnetického záření s molekulou zkoumaného vzorku. Jakmile fotony interagují s vibračními a rotačními stavy molekuly, dochází k výměně energie. Rozdíl mezi energií dopadajícího a rozptýleného fotonu odpovídá některému z vibračních energetických přechodů v molekule. Energie fotonu po srážce s molekulou je dána vztahem:

$$\Delta E = h(\nu_0 \pm \nu_{vib}) \quad (7)$$

kde  $h$  je Planckova konstanta,  $\nu_0$  je frekvence elektromagnetického záření dopadajícího na molekulu,  $\nu_{vib}$  je vibrační frekvence molekuly. Nepružný rozptyl světla má dvě varianty.

- a) **Stokesův rozptyl** - vzniká v případě, že molekula po interakci s fotonem přechází do vyššího vibračního energetického stavu a foton má menší energii a větší vlnovou délku. Pro energii fotonu pak platí:

$$\Delta E = h\nu_0 - h\nu_{vib} \quad (8)$$

b) **Anti-Stokesův rozptyl** - foton přijímá energii od molekuly a má kratší vlnovou délku. Pro energii fotonu platí:

$$\Delta E = h\nu_0 + h\nu_{vib} \quad (9)$$

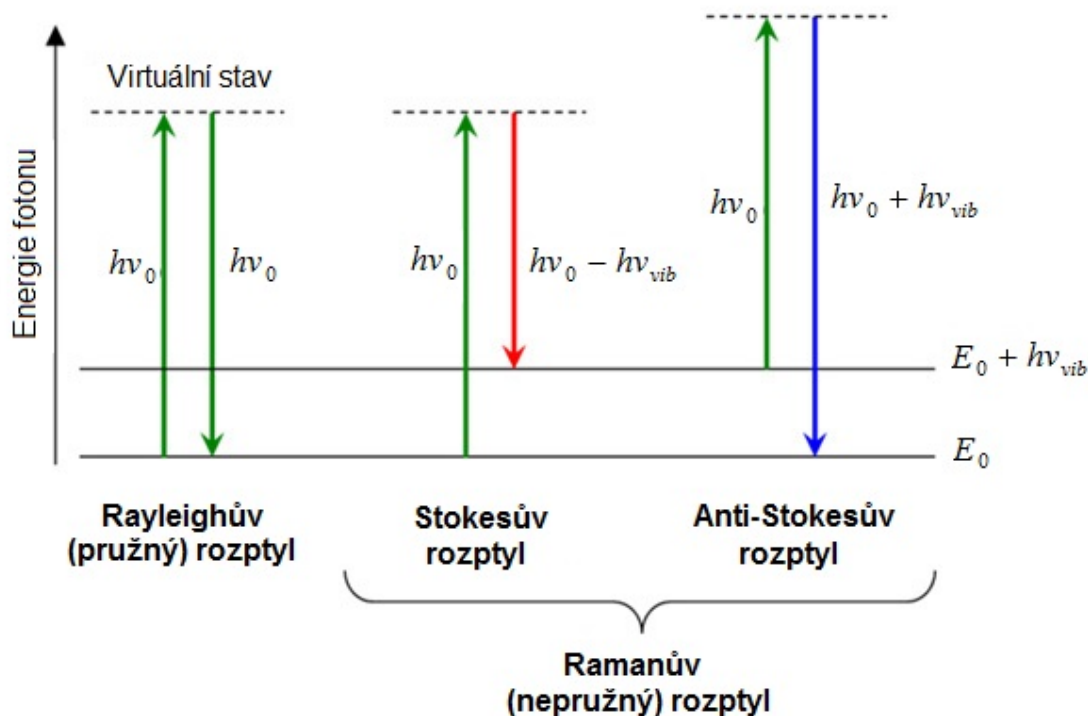
Anti-Stokesův rozptyl má menší pravděpodobnost vzniku než Stokesův. Spektra jsou v praxi měřena v oblasti Stokesova rozptylu. [26, s. 60-62]

### Pružný rozptyl světla

U pružného rozptylu světla nedochází ke změnám energie fotonu. Vyzářený foton i foton z excitačního zdroje mají stejnou vlnovou délku a molekulám vzorku není předána žádná energie.

$$\Delta E = h \cdot \nu_0 \quad (10)$$

Pružný rozptyl světla nazýváme **Rayleighův rozptyl**. Tento rozptyl při interakcích vzniká vždy, ale jelikož nenesení žádnou informaci o struktuře látek, je z výsledných paprsků odfiltrován. K tomuto účelu se používají tzv. Rayleighovy filtry [31].



Obr. 10. Znárodnění energetických přechodů pro Rayleighův a Ramanův rozptyl [31]

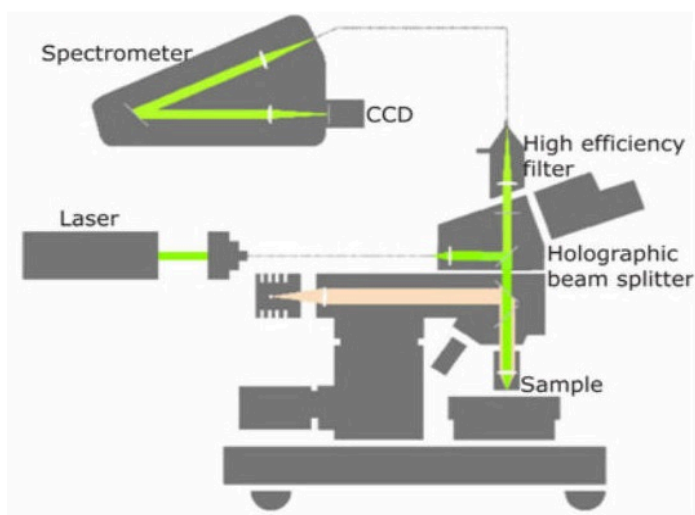
### 3.3.2 Podmínky vzniku Ramanova jevu

Aby mohl vzniknout nepružný rozptyl světla, je nutné splnit podmínku nenulové polarizovatelnosti  $\alpha$ . Polarizovatelnost může být popsána jako schopnost deformace elektronového obalu molekuly působením elektrického pole. Nesymetrické rozdělení náboje popisuje dipólový moment  $\mu$ , pro něj platí:

$$\mu = \alpha \cdot E \quad (11)$$

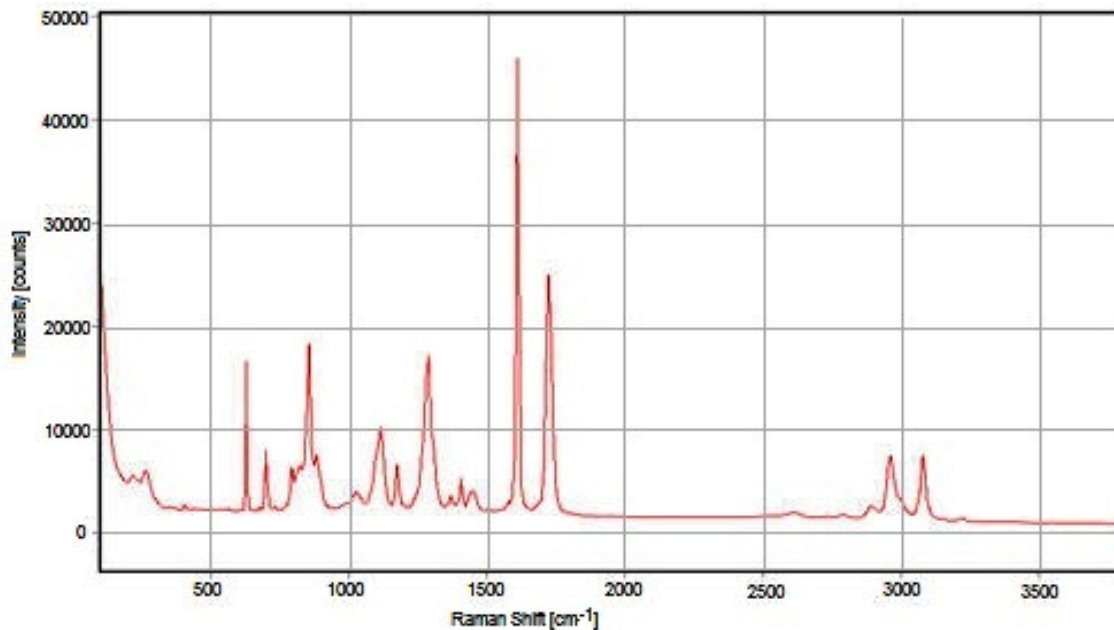
kde  $\alpha$  je polarizovatelnost a  $E$  je síla elektrického pole. [26, s. 62-63]

### 3.3.3 Ramanův spektrometr



Obr. 11. Systém pro Ramanovu spektroskopii [32]

Pro měření Ramanova rozptylu se používá vědecký přístroj zvaný Ramanův spektrometr. Ramanovy spektrometry je možno rozdělit do dvou kategorií dle použité technologie, a to disperzní spektrometry a spektrometry s Fourierovou transformací. Každá z uvedených technologií má své výhody a je vhodná pro specifické typy analýz. U většiny dnešních Ramanových spektrometrů pro laboratorní účely je jeho součástí mikroskop. Ten umožňuje lepší zkoumání velmi malých vzorků a detekci velmi malého množství materiálu. V přístrojích jsou k detekci použity chlazené CCD čipy, které se vyznačují nízkým šumem. K spektroskopu je možné zapojit více laserů. Z důvodu velké intenzity a větší pravděpodobnosti výskytu Rayleighova rozptylu na úkor Ramanova rozptylu jsou v přístroji instalovány filtry. Většinu laboratorních spektrometrů je možno ovládat přes PC. Všechny operace jsou tak prováděny přes uživatelské rozhraní. [25, s. 22-30]



Obr. 12. Ramanovo spektrum polyesteru [33]

Výstupem měření (spektrální analýzy) je Ramanovo spektrum. To obsahuje informace o vibračních stavech molekuly. Osa  $x$  představuje vlnčet  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ], což je převrácená hodnota vlnové délky. Na osu  $y$  je vynesena intenzita Ramanova záření [Counts]. Každé určité vibraci molekuly odpovídá příslušný Ramanův pás, který má tedy pro danou vibraci přesně stanovenou pozici. [34, s. 6-7]

### 3.3.4 Varianty Ramanovy spektroskopie

Bylo vyvinuto několik variant Ramanovy spektroskopie, zejména z důvodu nízké intenzity Ramanova rozptylu. Níže uvedené varianty vedou ke zvýšení citlivosti, zlepšení prostorového rozlišení, nebo umožňují získat velmi specifické informace o zkoumaném vzorku.

#### **Povrchem zesílená Ramanova spektroskopie (SERS)**

Jedná se o techniku, která umožňuje zvýšení intenzity Ramanova rozptylu, a to molekulami adsorbovanými na vhodné kovové povrchy. Typickými kovy pro tento účel jsou zlato nebo stříbro. Dochází ke zvýšení polarizovatelnosti molekul díky silné interakci s kovovým povrchem. Intenzita dopadajícího i rozptýleného záření se výrazně zesiluje díky rezonanční excitaci povrchových plasmonů v kovu. SERS se využívá v případech kde je citlivost či rychlost klasické Ramanovy spektroskopie nedostatečná. Signál vzroste až  $10^6$  krát. [34, s. 113-117]

### **Rezonanční Ramanova spektroskopie (RR)**

Při této technice je volena vlnová délka excitačního zdroje tak, aby byla přibližena k maximu absorpčního pásu zkoumaného vzorku. Obvykle to znamená oblast UV-viditelné absorpce. Signál vzroste až  $10^6$  krát. [27, s. 358-359]

### **Rezonanční povrchem zesílená Ramanova spektroskopie (SERRS)**

Představuje kombinaci technik SERS a RR pro zvýšení intenzity Ramanova rozptylu. [34, s. 113-116]

### **Hrotem zesílená Ramanova spektroskopie (TERS)**

Tato technika je v podstatě variantou SERS. V těsné blízkosti povrchu zkoumaného vzorku (obvykle několika nanometrů) je umístěn kovový hrot. Stejně jako u SERS se používá zlato nebo stříbro. Kovový hrot slouží ke zvýšení intenzity elektrického pole. Ramanův signál je generován převážně na špičce hrotu, kde je intenzita elektrického pole maximální. [25, s. 235-238]

### **Koherentní Anti-Stokes Ramanova spektroskopie (CARS)**

K vytvoření Ramanova rozptylu jsou použity dva laserové paprsky. Metoda se používá jako prostředek ke snížení fluorescence. Ramanův rozptyl je získán nelineární konverzí dvou laserových paprsků do jednoho, čili je vytvořen paprsek vysoké intenzity v oblasti Anti-Stokesova rozptylu. Metoda je velmi vhodná pro získání Ramanova spektra fluoreskujících vzorků např. plynů ve výbojích či plazmatu. Je využívána v atmosférické chemii. [27, s. 501-502]

### **Využití Ramanovy spektroskopie**

Moderní Ramanova spektroskopie je v praxi poměrně jednoduchý, variabilní nástroj určený k analýze látek. Pomocí této metody je možné zjišťovat složení, strukturu zkoumaného vzorku, koncentraci vybrané látky ve zkoumaném vzorku, a to při minimální přípravě a obvykle i v minimálním čase určeném pro měření. Z tohoto faktu vychází i množství oborů, které využívají některou z technik Ramanovy spektroskopie. Níže jsou uvedeny některé obory a vědy využívající Ramanovu spektroskopii. U každé oblasti je zmíněn příklad konkrétnější možnosti využití. Ten však pro daný obor či vědu nemusí být zdaleka jediný.

### Příklady využití Ramanovy spektroskopie:

**Pyrotechnika** (identifikace výbušnin)

**Potravinářství** (kontrola kvality potravin)

**Umění a archeologie** (ověřování pravosti uměleckých předmětů)

**Farmaceutické aplikace** (detekce padělků léčiv)

**Biologie** (studium DNA)

**Forenzní vědy** (analýza stop)

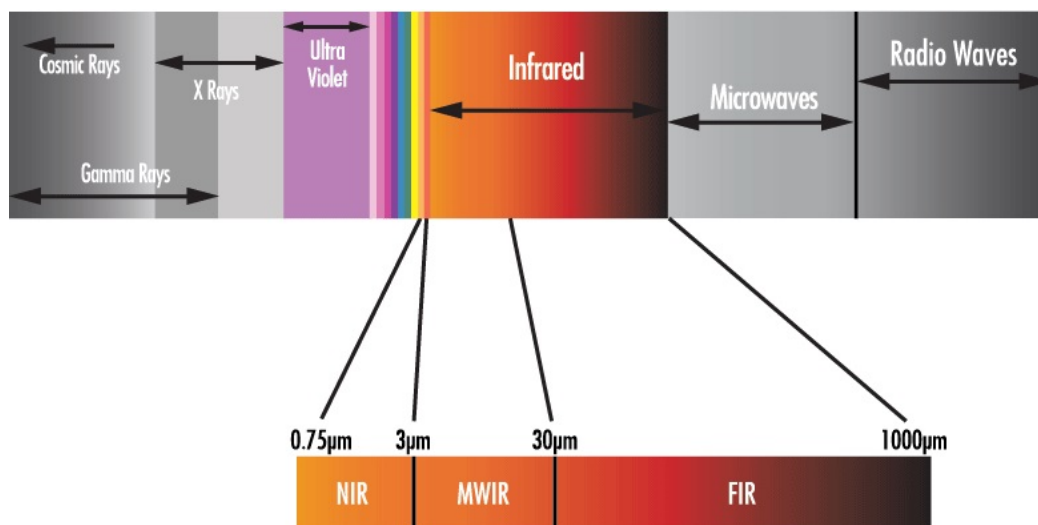
**Nanotechnologie** (analýza uhlíkových nanotrubic)

**Elektronika** (kontrola kvality součástek)

**Mineralogie** (analýza anorganických látek a minerálů) [34, s. 135-172]

## 3.4 Infračervená spektroskopie

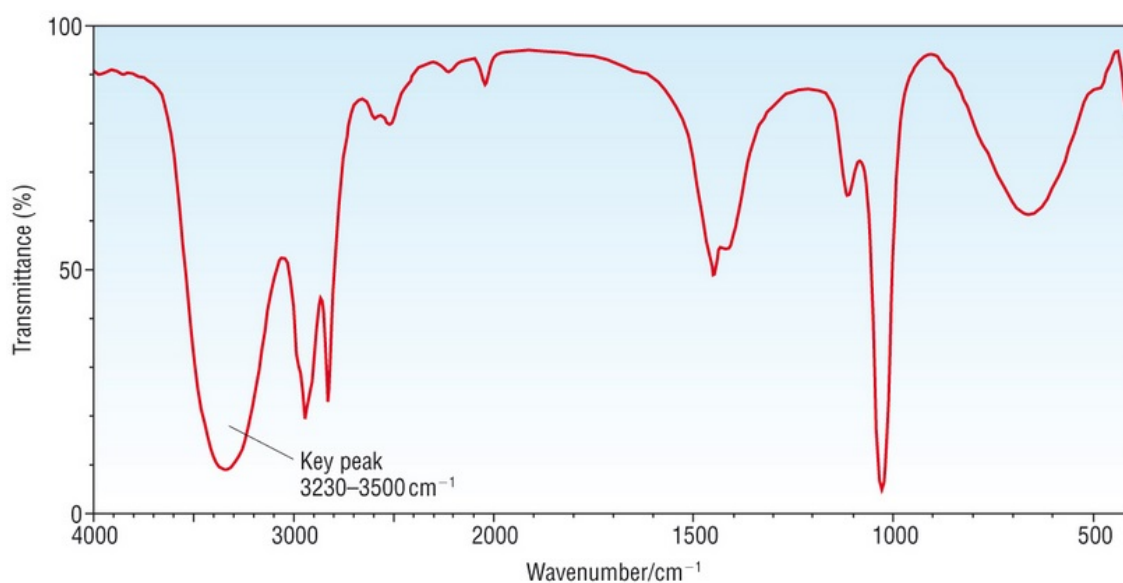
Infračervenou spektroskopii, stejně jako Ramanovu, lze označit jako nedestruktivní analytickou metodu, poskytující informace o molekulárním složení zkoumaného vzorku. Umožňuje analyzovat látky v pevném, plynném a kapalném skupenství. Infračervená spektroskopie se dělí dle oblasti vlnových délek zvoleného elektromagnetického záření na dalekou (FIR), střední (MWIR) a blízkou (NIR) infračervenou spektroskopii. Největší význam má v praxi střední infračervená oblast. K měření se používají dispersní spektrometry a spektrometry s Fourierovou transformací (FTIR). [35]



Obr. 13. Elektromagnetické spektrum [35]

### 3.4.1 Princip infračervené spektroskopie

Metoda je založena na interakci elektromagnetického (IR) záření s molekulami zkoumaného vzorku. Při průchodu vzorkem dochází k absorpci infračerveného záření, kde podmínkou je nenulová změna dipólového momentu  $\mu$  molekuly. Výstupem měření je infračervené spektrum - na obrázku (Obr. 14) je jako příklad uvedeno spektrum methanolu. Na osu  $x$  je vynášen vlnčet (převrácená hodnota vlnové délky) v  $\text{cm}^{-1}$  (podobně jako u Ramanovy spektroskopie) a na osu  $y$  transmittance  $T$  v procentech, vyjadřující množství záření procházejícího vzorkem. V některých případech je na osu  $y$  vynesena absorbance v bezrozměrných jednotkách. Absorbance je definována jako dekadický logaritmus  $1/T$ . Infračervená a Ramanova spektroskopie jsou v dnešní době nejpoužívanějšími metodami umožňující měření vibračních energií částic (rotačně vibrační přechody molekul). V závislosti na typu vibrace, která je určena symetrií či asymetrií molekuly, je rozhodujícím faktorem pro to, zda se zkoumaná látka v infračerveném spektru projeví či nikoliv. Zpravidla se látky neaktivní v infračerveném spektru dobře promítnou v Ramanově spektru. Ramanova a infračervená spektroskopie jsou vzájemně komplementárními metodami. [26, s. 94-103]



Obr. 14. Infračervené spektrum methanolu [7]

### 3.4.2 Infračervená spektroskopie kombinovaná s plynovou chromatografií

Kombinace plynové chromatografie s infračervenou spektroskopií (GC-FTIR) představuje další metodu určenou k identifikaci látky a analýze její struktury. Plynový chromatograf je u této kombinace použit k separaci složek zkoumaného roztoku. Jednotlivé složky jsou nasměrovány do FTIR spektrometru, kde výstupem je infračervené spektrum vzorku.



Metoda je vhodná zvláště pro identifikaci izomerů a je rychlejší než klasická plynová chromatografie. Tato technika je komplementární k GC-MS (plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií). [36, s. 43]

### 3.5 Terahertzová spektroskopie

Terahertzová spektroskopie využívá oblast elektromagnetického záření mezi 100 GHz a 10 THz. Toto záření je neionizující a má schopnost pronikat nevodivými materiály. Nedokáže tedy proniknout vodou a kovy. Terahertzové záření dokáže vybudit polární kmity mříže v pevných látkách a vibrace větších řetězců biomolekul, indukovat plasmové oscilace volných nosičů a interagovat s nosiči náboje lokalizovanými v nanočásticích. Existuje několik nástrojů a metod terahertzové spektroskopie:

- spektrometry s Fourierovou transformací (Fourier-Transform Spectrometer),
- heterodynní spektrometry,
- terahertzová spektroskopie v časové doméně (Time-Domain Spectroscopy). [37]

#### 3.5.1 Zdroje terahertzového záření

Pro terahertzovou spektroskopii bylo vyvinuto několik umělých zdrojů. Mezi hlavní zdroje terahertzového záření patří:

- oscilátor se zpětnou vlnou,
- kvantové kaskádové lasery (pro generování úzkopásmového THz záření),
- lasery s volnými elektrony,
- polovodičové terahertzové emitory,
- optické usměrňování (Bulk Electrooptic Rectification). [37, s. 103-140]

#### 3.5.2 Detektory terahertzového záření

Co se týká detekce terahertzového záření, je vyžadována vyšší citlivost detektoru. Jsou používány následující typy detektorů:

- teplotní detektory (pyroelektrický detektor),
- fotovodivé detektory,
- heterodynní detekce. [37, s. 169-222]

## 4 DÍLČÍ ZÁVĚR - ZHODNOCENÍ UVEDENÝCH METOD

V následující kapitole je stručné shrnutí a zhodnocení metod používaných v souvislosti s měřením obsahu, přítomnosti nebo koncentrace methanolu v konzumních lihovinách.

### 4.1 Chromatografické metody

Plynová chromatografie byla na počátku „methanolové kauzy“ první metodou, pomocí níž byla ověřována přítomnost methanolu v konzumních lihovinách. Avšak díky neustále vzrůstajícímu počtu vzorků, které bylo nutno prověřit, se nakonec ukázala jako nedostačující. Nevýhodou byla časová náročnost ale i fakt, že náklady na otestování jednoho vzorku byly podle odhadů 300 až 400 Kč. [11]

### 4.2 Infračervená spektroskopie

V souvislosti s analýzou alkoholických nápojů je vhodná především kombinovaná metoda GC-FTIR, což je plynová chromatografie kombinovaná s infračervenou spektroskopií. Pomocí metody lze určit obsah i koncentraci methanolu v konzumních lihovinách. [38]

### 4.3 Ramanova spektroskopie

Ramanova spektroskopie se v průběhu „methanolové kauzy“ stala velmi využívanou metodou. Na rozdíl od plynové chromatografie, jsou výsledky získány během několika sekund a náklady na analýzu jedné láhve jsou řádově v desítkách korun. Testování lihovin může probíhat i přes láhev. Ve srovnání s infračervenou spektroskopií, je Ramanovo spektrum jednodušší. Za negativum může být považováno zkreslení výstupu zpravidla způsobené intenzivní fluorescencí zkoumaného vzorku. [39]

### 4.4 Terahertzová spektroskopie

Donedávna byly aplikace terahertzové spektroskopie omezeny. Důvodem byly chybějící technologie. Zejména nedostatečně výkonné zdroje terahertzového záření a nevyhovující detektory (nízká citlivost). K rozšíření terahertzové spektroskopie dochází až v posledních letech například v bezpečnostních aplikacích (bezpečnostní kontroly, skenování osob). Je prokázána použitelnost terahertzové spektroskopie pro stanovení obsah ethanolu v alkoholických nápojích. Co se týká měření koncentrace methanolu v konzumních lihovinách, platí fakt, že ethanol a methanol mají podobná spektra, proto různé koncentrace methanolu budou poměrně stěží detekovatelné. Výsledky by tedy neměly praktický význam. [40]

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 5 STANOVENÍ CÍLŮ PRAKTICKÉ ČÁSTI

### 5.1 Vymezené cíle

- Výběr metody.
- Návrh postupu při provedení experimentu.
- Příprava souboru vzorků pro spektrální analýzu.
- Experimentální identifikace připravených vzorků.
- Zkoumání vlivu obalových materiálů na výsledky měření.
- Vliv teploty na výsledky měření připravených vzorků.
- Spektrální analýza vybraných konzumních lihovin.
- Vyhodnocení získaných spektrálních dat.
- Diskuze vhodnosti použité metody.
- Výhody a nevýhody.

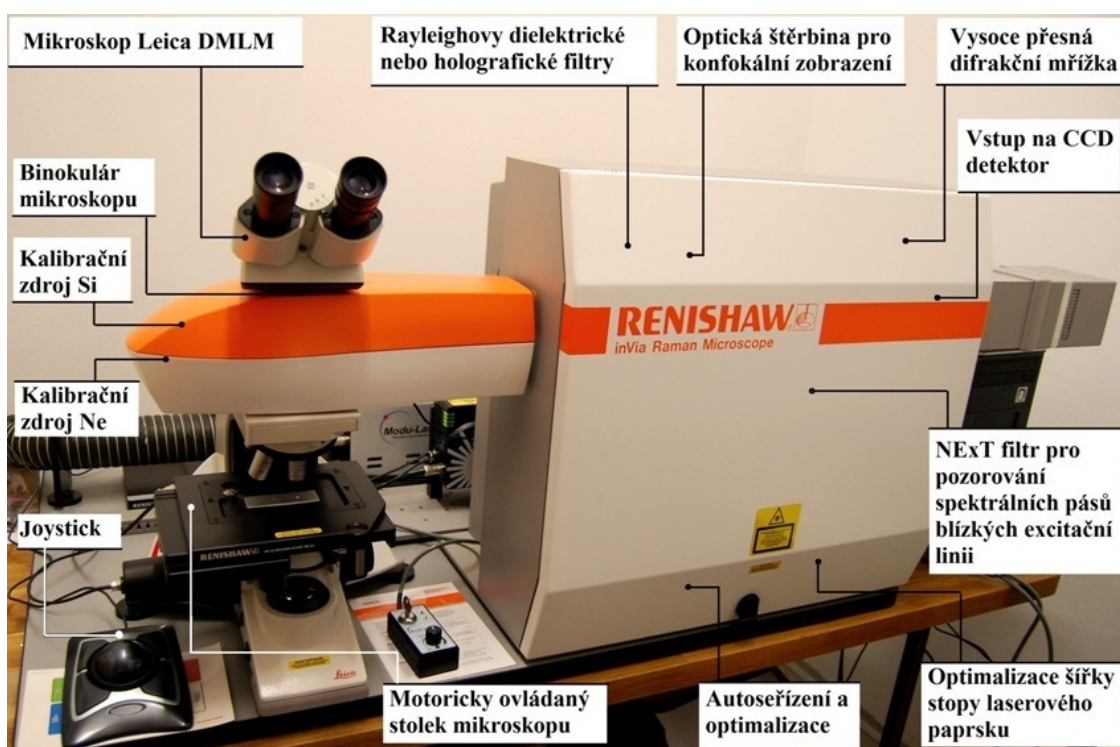
### 5.2 Úvodní popis provedení experimentu

Pro spektrální analýzu vzorků byla využita Ramanova spektroskopie jako jedna z metod moderní vibrační spektroskopie. Bylo naměřeno množství experimentálních spektrálních dat připravených vzorků. Tato data byla dále využita k sestavení kalibrační křivky, pomocí níž lze kvantitativně určit koncentraci methanolu v konzumních lihovinách. Měření bylo provedeno na přístrojovém vybavení v laboratoři spektrální analýzy na Fakultě aplikované informatiky (FAI). Všechny důležité fáze provedení experimentu byly fotograficky z dokumentovány.

## 6 INSTRUMENTACE A PŘÍPRAVA VZORKŮ

### 6.1 Ramanův spektrometr

V laboratoři spektrální analýzy je nainstalován Ramanův spektrometr inVia Basis od firmy Renishaw. Jedná se o dispersní spektrometr představující komplexní systém složený z mnoha komponent. Konfigurace přístroje je znázorněna na obrázku (Obr. 15). K základní desce jsou jednotlivé komponenty připojeny pomocí vysoce přesných kinematických uložení. Opakovatelnost spoje 0,5  $\mu\text{m}$ . Přístroj umožňuje připojení maximálně čtyř laserových excitačních zdrojů, z nichž každý má definovanou vlastní optickou dráhu.



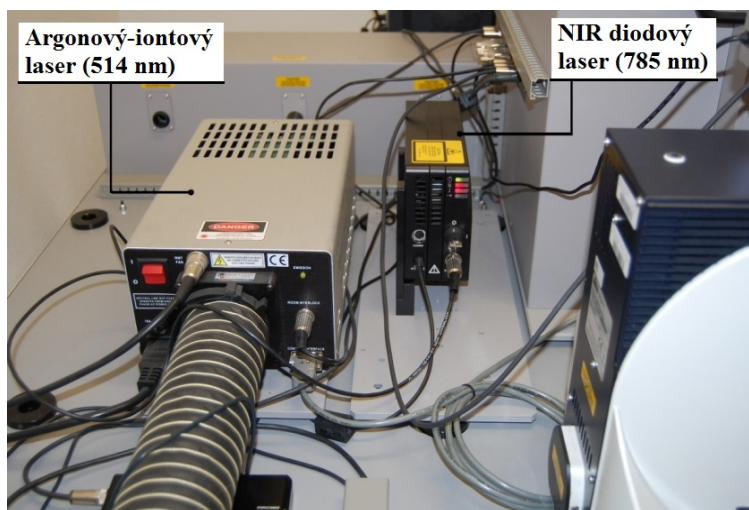
Obr. 15. Ramanův spektrometr inVia Basis - konfigurace

#### 6.1.1 Specifikace přístroje

- automatická schopnost kalibrace a seřízení (vestavěné kalibrační zdroje),
- termoelektricky chlazený (-70 °C) CCD detektor se zvýšenou citlivostí,
- konfokálnost přístroje umožňuje měření Ramanových spekter velmi malých oblastí,
- integrovaný vědecký mikroskop Leica DMLM s objektivy x5, x20 a x50,
- připojení až čtyř Rayleighových filtrů pro různé vlnové délky excitačních laserů,
- motorický stolek s pojezdem v osách X, Y, Z (ovladatelný joystickem).

### 6.1.2 Excitační zdroje

Jako excitační zdroje jsou v laboratoři spektrální analýzy nainstalovány dva lasery. Argon-iontový laser s vlnovou délkou 514 nm, jehož maximální výkon dosahuje 20 mW a infračervený (NIR) diodový laser od firmy Renishaw s vlnovou délkou 785 nm a maximálním výstupním výkonem 300 mW.



Obr. 16. Excitační zdroje v laboratoři spektrální analýzy

### 6.1.3 Optická sonda

Součástí Ramanova spektrometru na FAI je i kompaktní sonda RP10 od firmy Renishaw použitelná pro analýzu širokého spektra vzorků. Využívá se například v případě, že vzorek nemůže být přemístěn k přístroji nebo jej nelze z technických důvodů umístit na motorický stolek, pod kterýkoliv z objektivů mikroskopu Leica DMLM. Pro využití sondy je nutno přepnout na Argon-iontový laser s vlnovou délkou 514 nm.



Obr. 17. Optická sonda RP10 od firmy Renishaw

#### 6.1.4 Softwarové vybavení

Na počítači v laboratoři spektrální analýzy je nainstalován program WiRE<sup>TM</sup> ve verzi 3.2, který slouží k ovládání Ramanova spektrometru inVia Basis. Přes uživatelské rozhraní programu lze sledovat průběh měření, nastavovat parametry měření, ovládat optickou sondu, či přepínat mezi excitačními lasery. Program dále umožňuje zpracování naměřených dat pro jejich prezentaci. Lze i vytvářet vlastní uživatelská rozhraní. Software podporuje různé techniky pro získání Ramanových spekter jako například technika plošného mapování, hloubkové mapování, Raman paging, měření s využitím teplotní komory a další. V rámci měření pro účely této diplomové práce byl program WiRE<sup>TM</sup> využit k nastavování parametrů měření a zpracování naměřených dat. Použité funkce pro úpravu naměřených spekter:

- PEAK PICK,
- NORMALIZE DATA,
- INTEGRATE DATA,
- SUBTRACT BASELINE,
- SMOOTH.

## 6.2 Příprava vzorků pro laboratorní měření

Namíchání vzorků bylo provedeno na FAI v chemické laboratoři s odsávacím zařízením. Bylo nutné dodržovat bezpečnostní zásady při práci s vysoce hořlavými kapalinami. Jako pomůcky pro odměření přesného množství látky byly použity čtyři mikropipety s objemovými rozsahy 0,5 - 10  $\mu$ l, 10 - 100  $\mu$ l, 100 - 1000  $\mu$ l a 500 - 5000  $\mu$ l. Z důvodu kontaminace při míchání vzorků byly špičky k jednotlivým mikropipetám rezervovány zvlášť pro methanol, ethanol a též pro vodu.

### 6.2.1 Vzorky pro sestavení kalibrační křivky

Pro sestavení kalibrační křivky bylo připraveno 12 vzorků smícháním methanolu, ethanolu a destilované vody. Před samotným namícháním však bylo nutné vhodně určit koncentrace methanolu pro jednotlivé vzorky a dopočítat objem ethanolu tak, aby výsledný obsah alkoholu byl 40 objemových %. Do skleněné vialky byl pipetován nejprve methanol a poté ethanol. K nim bylo dále pipetováno vždy stejné množství vody. Každá vialka se směsí o výsledném objemu 4 ml byla bezprostředně po namíchání opatřena uzávěrem, aby nedo-

šlo k odpařování roztoku. Stanovené koncentrace a dopočítané koncentrace jednotlivých složek jsou uvedeny v tabulce (Tab. 1). K namíchání vzorků pro kalibrační křivku byly použity kapaliny s následující charakteristikou:

- koncentrovaný methanol (šarže: 278701, obsah: min. 99,5 %),
- absolutní bezvodý ethanol (šarže: 48401, obsah: min. 99,5 %),
- destilovaná voda.

Při sestavování tabulky (Tab. 1) koncentrací a objemů nebyl zohledňován skutečný obsah alkoholů uvedený na láhvi. Ať se jednalo o methanol či ethanol, bylo uvažováno se 100 % obsahem. Ze sloupců „*Koncentrace*“ v tabulce (Tab. 1) je možné určit poměr methanolu a ethanolu ve vzorku.

*Tab. 1. Koncentrace a objem jednotlivých složek ve vzorcích pro kalibrační křivku*

Číslo vzorku	METHANOL		ETHANOL		VODA
	<i>Koncentrace</i> [%]	<i>Objem</i> [μl]	<i>Koncentrace</i> [%]	<i>Objem</i> [μl]	<i>Objem</i> [μl]
1	0	0	100	1600	2400
2	0,1	1,6	99,9	1598,4	2400
3	0,25	4	99,75	1596	2400
4	0,5	8	99,5	1592	2400
5	0,75	12	99,25	1588	2400
6	1	16	99	1584	2400
7	3	48	97	1552	2400
8	5	80	95	1520	2400
9	10	160	90	1440	2400
10	20	320	80	1280	2400
11	50	800	50	800	2400
12	100	1600	0	0	2400



### 6.2.2 Vzorky pro test kalibrační křivky

Pro ověření toho, zda jsme schopni stanovit obsah methanolu v konzumních lihovinách a s jakou přesností, byly namíchany čtyři testovací vzorky (směs methanolu, ethanolu a vody). Stejně jako ve vzorcích pro kalibrační křivku, byl výsledný objem každého roztočku 4 ml. Koncentrace methanolu ve vzorcích C a D byla volena tak, aby odpovídala přibližně nejvyššímu povolenému množství methanolu v konzumních lihovinách (dle Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 110/2008).

Tab. 2. Koncentrace a objem jednotlivých složek ve vzorcích pro test kalibrační křivky

Označení vzorku	METHANOL		ETHANOL		VODA
	Koncentrace [%]	Objem [ $\mu$ l]	Koncentrace [%]	Objem [ $\mu$ l]	Objem [ $\mu$ l]
A	14,5	232	85,5	1368	2400
B	3,5	56	96,5	1544	2400
C	0,9	14,4	99,1	1585,6	2400
D	0,6	9,6	99,4	1590,4	2400



Obr. 18. Komora v laboratoři FAI pro manipulaci s těkavými látkami

## 7 MĚŘENÍ VZORKŮ A JEJICH ANALÝZA

Před provedením spektrální analýzy byly zváženy možnosti Ramanova měřicího systému inVia Basis a softwarového vybavení pro požadované účely. Byl navržen postup měření. Jako zdroj excitačního záření byl zvolen NIR diodový laser s vlnovou délkou 785 nm, a to z důvodu předchozích zkušeností. Zvolený excitační zdroj má oproti Argon-iontovému laseru vyšší maximální výkon a lepší odezvu pro uvažovaný typ spektrální analýzy.

### 7.1 Postup měření

Vzhledem k tomu, že zkoumané látky jsou vysoce hořlavé a též z důvodu zaměření diplomové práce bylo měření vzorků provedeno přes obalové materiály. V tomto případě skleněné vialky (4 ml). Vzhledem k tomu, že bylo nutné dostat paprsek z excitačního zdroje pod povrch vialky, byly v programu WiRE<sup>TM</sup> využity funkce „Set origin“ a „Go to origin“. Postup měření vzorku ve skleněné vialce lze shrnout do následujících bodů:

1. Upevnění vialky se vzorkem do držáku a umístění na motorický stolek pod mikroskop.
2. Manuální nastavení optiky (pro účely všech analýz v praktické části byl použit objektiv se zvětšením x5).
3. Zapnutí kamery pomocí programu WiRE<sup>TM</sup>.
4. Manuální posunutí motorického stolku tak, aby se požadovaná oblast vzorku dostala do zorného pole objektivu, pro jemný posuv lze použít joystick.
5. Zaostření objektivu na povrch skleněné vialky, použitím funkce „Set origin“ se nastaví referenční nula pro všechny osy (X, Y, Z).
6. Do pole pro softwarově řízený posuv motorického stolku v ose Z vepíšeme požadovanou hodnotu posuvu (např.: -2,5 mm) a použijeme funkci „Go to origin“ (tímto se motorický stolek posune o 2,5 mm nahoru a tím se při měření dostane paprsek z excitačního zdroje pod povrch vialky obsahující zkoumaný roztok).
7. Stisknutím ikony Run se spustí laser a proběhne proces měření (před spuštěním měření je nutné vypnout osvětlení v místnosti laboratoře z důvodu negativního ovlivnění výsledků).
8. Uložení naměřených dat.

Ve výše uvedených bodech není zmíněno nastavení parametrů měření. Parametry se nastavovaly v programu WiRE<sup>TM</sup> a vše bylo voleno s cílem dosažení nejoptimálnějších výsledků. Zpočátku bylo provedeno několik testovacích měření s různým nastavením parametrů. Po zhodnocení výsledných spekter bylo vybráno nastavení uvedené v tabulce (Tab. 3).

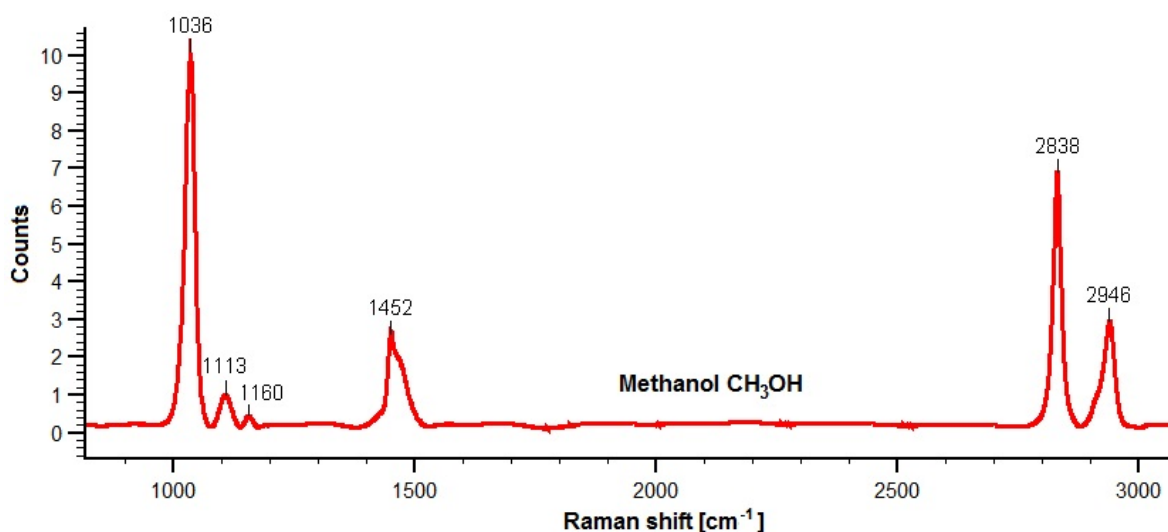
Tab. 3. Nastavení parametrů měření

Výkon laseru	Počet akumulací	Expoziční čas [s]	Typ snímání	Střed vlnočtu [ $\text{cm}^{-1}$ ]	Zvětšení
100 %	10	5	static	1350	x5
				2900	

V tabulce jsou uvedeny dvě hodnoty pro střed vlnočtu. Ramanovo spektrum alkoholů bylo při nastavení parametrů měření účelně rozděleno na dvě části. Důvodem byla efektivnější práce s naměřenými spektry. Každý vzorek určený k sestavení kalibrační křivky byl tedy měřen dvakrát, a to v oblasti se středem vlnočtu  $1350 \text{ cm}^{-1}$  a poté  $2900 \text{ cm}^{-1}$ .

## 7.2 Charakteristika naměřených spekter methanolu a ethanolu

Před spektrální analýzou vzorků určených k sestavení kalibrační křivky, byly pomocí Ramanova spektrometru měřeny vzorky čistého methanolu a ethanolu. Výsledky měření slouží k popisu částicového pohybu v molekulách methanolu a ethanolu. Nastavení parametrů měření odpovídalo hodnotám v tabulce (Tab. 3). Za účelem získání spekter methanolu a ethanolu ve větším rozsahu byly vzorky změřeny v režimu extended.

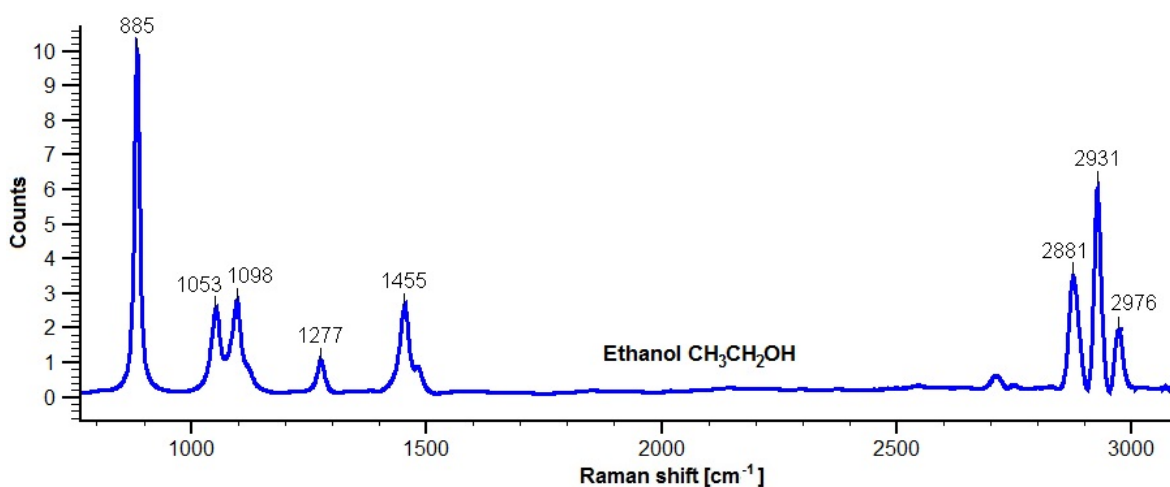


Obr. 19. Ramanovo spektrum čistého methanolu

Tab. 4. Vlnočty methanolu a odpovídající částicový pohyb

Naměřené hodnoty [cm <sup>-1</sup> ]	Hodnoty uvedené v literatuře [cm <sup>-1</sup> ]	Odpovídající částicový pohyb v molekule
1036	1033	C-O Stretching
1113	1106	CH <sub>3</sub> Rocking
1160	1149	CH <sub>3</sub> Bending
1452	1448	-
2838	2832	C-H Symetric Stretching
2946	2940	C-H Antisymmetric Stretching

Na obrázku (Obr. 19) je naměřené Ramanovo spektrum čistého methanolu. Osa  $x$  znázorňující vlnočty je označena jako Raman shift (tímto způsobem je označena i v ostatních spektrech uvedených v praktické části). Spektrum bylo upraveno funkcí BASELINE SUBTRACTION pro srovnání spektra se základnou. Pomocí funkce PEAK PICK jsou ve vrcholech spektra zaznačeny hodnoty vlnočtu. Vrcholy neboli píky ve spektru odpovídají určité vibraci v molekule CH<sub>3</sub>OH. Každé hodnotě vlnočtu píky odpovídají příslušné vibrační stavy zkoumané látky. V tabulce (Tab. 4) jsou vypsány charakteristické vlnočty methanolu, které byly převzaty z naměřeného spektra v porovnání s hodnotami vlnočtů uvedených v literatuře [15]. K těmto hodnotám je uveden odpovídající částicový pohyb.



Obr. 20. Ramanovo spektrum čistého ethanolu

Tab. 5. Vlnočty ethanolu a odpovídající částicový pohyb

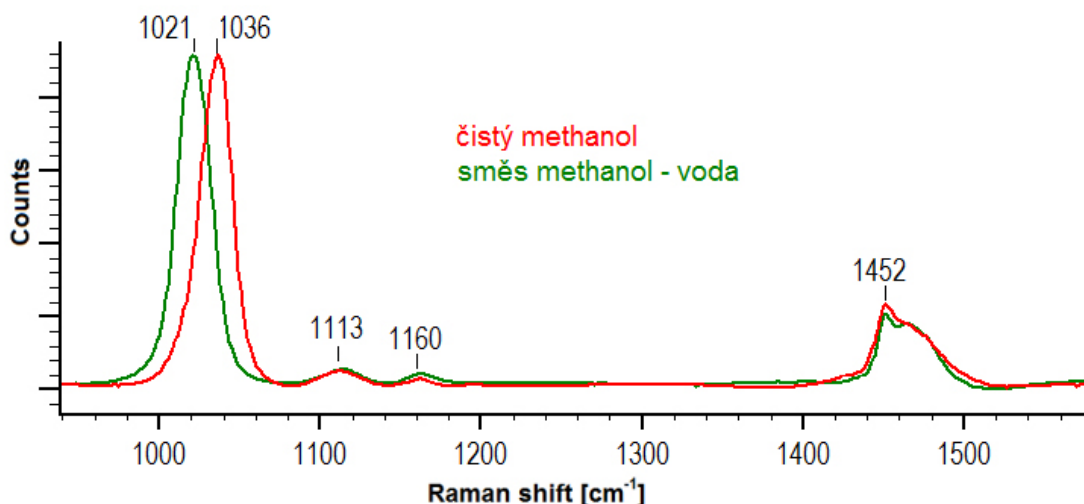
Naměřené hodnoty [cm <sup>-1</sup> ]	Hodnoty uvedené v literatuře [cm <sup>-1</sup> ]	Odpovídající částicový pohyb v molekule
885	883	C-C Stretching
1053	1054	C-O Stretching
1098	1096	CH <sub>3</sub> Rocking
1277	1454	CH <sub>3</sub> Bending
1455	1479	CH <sub>3</sub> Bending
2881	2878	CH <sub>2</sub> - CH <sub>3</sub> Stretching
2931	2929	CH <sub>2</sub> - CH <sub>3</sub> Stretching
2976	2972	CH <sub>2</sub> - CH <sub>3</sub> Stretching

Na obrázku (Obr. 20) je naměřené Ramanovo spektrum čistého ethanolu. Píky ve spektru odpovídají vibracím v molekule CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH. Při měření ethanolu byly parametry nastaveny opět dle tabulky (Tab. 3). Výsledná spektra byla sečtena a byla provedena úprava s použitím funkcí BASELINE SUBTRACTION a PEAK PICK. Z obrázků (Obr. 19) a (Obr. 20) je patrné, že v uvedených spektrech v oblasti s hodnotou vlnočtu v rozmezí od 1500 cm<sup>-1</sup> do 2800 cm<sup>-1</sup> nevykazují zkoumané vzorky nějakou zásadní odezvu. To je jedním z důvodů, proč byla při dalším měření spektra rozdělena na dvě oblasti. S vhodným nastavením středu vlnočtu byla získána spektra vždy v oblasti, kde byla zřejmá odezva částicového pohybu. Z tabulek (Tab. 4) a (Tab. 5) je patrné, že hodnoty vlnočtu naměřené a hodnoty uvedené v literatuře nejsou shodné. Tyto rozdíly mohou být zapříčiněny například kalibrací přístrojů, což je dáno změnou polohy Ramanových pásů ve spektru.

### 7.3 Sestavení kalibračních křivek

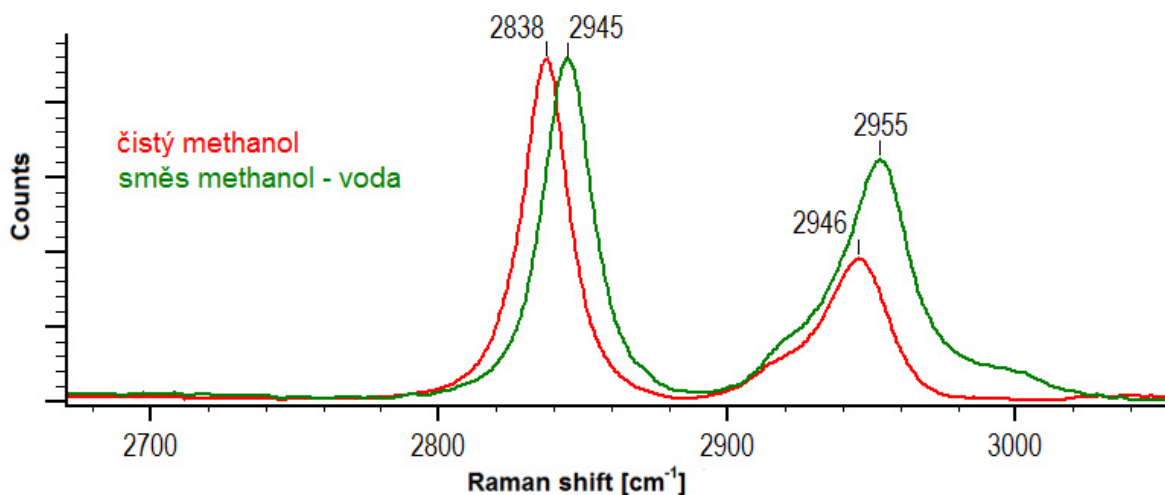
V praktické části byly sestaveny celkem čtyři kalibrační křivky. Zvlášť pro první měřenou oblast se středem vlnočtu 1350 cm<sup>-1</sup> a pro druhou měřenou oblast se středem vlnočtu 2900 cm<sup>-1</sup>. Pro každou z těchto uvedených oblastí byla využita závislost intenzity Ramanova záření na koncentraci stanovované látky a závislost plochy pod píkem (ve zvolené oblasti) na koncentraci stanovované látky. Před sestavením kalibračních křivek je nutno zmínit určitý jev, který byl pozorován po naměření všech dvanácti vzorků. Při porovnání všech

spekter směsi obsahující vodu s naměřeným spektrem čistého methanolu byl zaznamenán posuv píků s hodnotou vlnočtu 1036, 2838 a 2946  $\text{cm}^{-1}$ . Pík s hodnotou 1036  $\text{cm}^{-1}$  v čistém methanolu odpovídá změnám délky vazby C-O (C-O Stretching) [15]. Ve směsi methanol-ethanol-voda se pík posunul na hodnotu vlnočtu 1021  $\text{cm}^{-1}$ . Na obrázcích (Obr. 21) a (Obr. 22) je znázorněn posuv píků v porovnání spektra čistého methanolu a spektra vzorku číslo 12, což je 4 ml směs methanolu (1,6 ml) a vody (2,4 ml).



Obr. 21. Znázornění změny spektra v první měřené oblasti

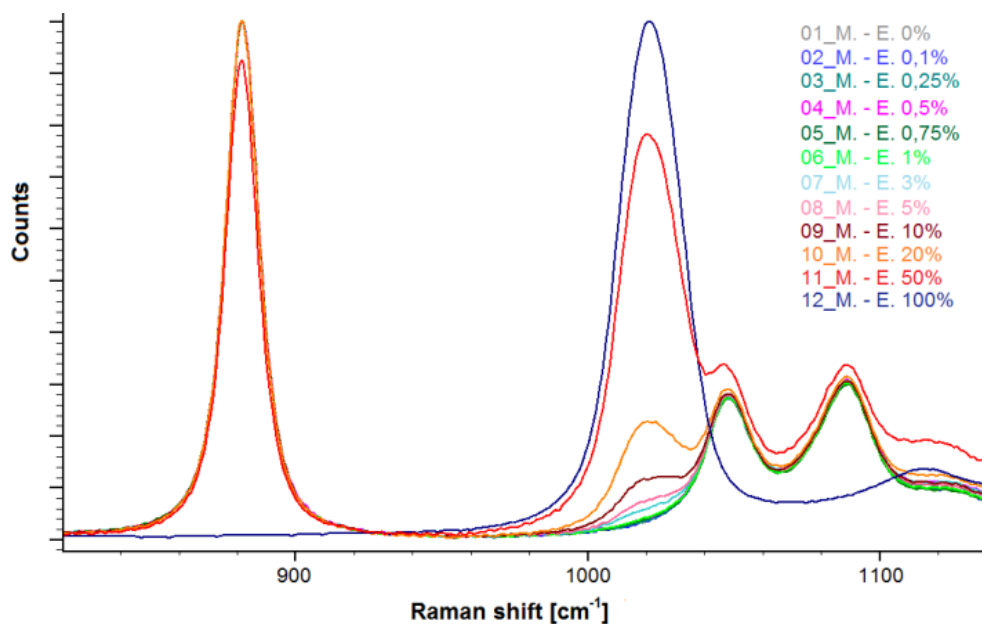
Pík s hodnotou vlnočtu 2838  $\text{cm}^{-1}$  se posunul na hodnotu 2845  $\text{cm}^{-1}$ . Tato vibrace odpovídá symetrickým změnám vazby C-H (C-H Symetric Stretching). Pík s hodnotou vlnočtu 2946  $\text{cm}^{-1}$  se posunul na hodnotu 2955  $\text{cm}^{-1}$ , což odpovídá nesymetrickým změnám vazby C-H (C-H Antisymmetric Stretching). [15]



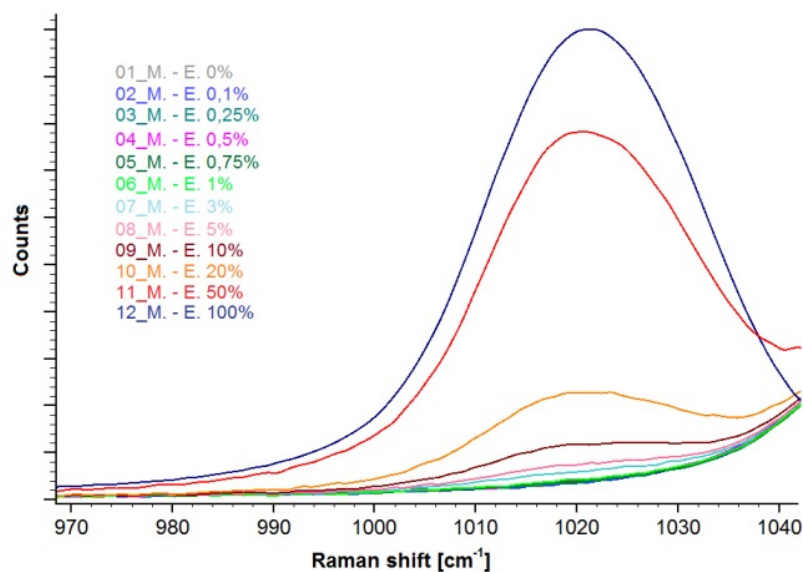
Obr. 22. Znázornění změny spektra v druhé měřené oblasti

### 7.3.1 Kalibrační křivky z první měřené oblasti

V oblasti se středem vlnočtu  $1350\text{ cm}^{-1}$  byla tedy pozornost soustředěna na pík  $1021\text{ cm}^{-1}$ . Zde docházelo k jednoznačným změnám intenzity tohoto píku v závislosti na změně koncentrace methanolu v analyzované směsi. Před analýzou bylo všech 12 spekter upraveno funkcemi s jednotným nastavením pro všechna spektra. K tomuto účelu byla použita funkce BASELINE SUBTRACTION s typem základny nastaveným na Cubic Spline Interpolation a v použitém módu Explicit X positions. Upravená spektra všech dvanácti vzorků jsou na obrázcích (Obr. 23) a (Obr. 24) s detailem na oblast vlnočtu kolem  $1021\text{ cm}^{-1}$ .



Obr. 23. Ramanova spektra vzorků pro kalibrační křivku - první oblast



Obr. 24. Detail na klíčovou oblast -  $1021\text{ cm}^{-1}$

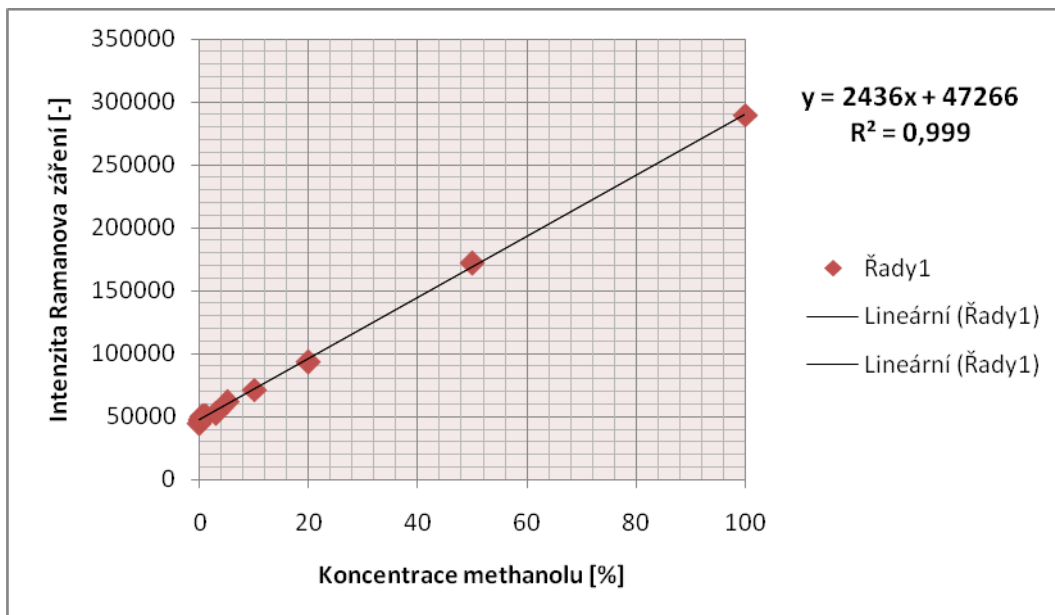
Z programu WiRE<sup>TM</sup> byly po úpravě spekter všech dvanácti vzorků vyčteny hodnoty intenzity Ramanova záření pro pík s hodnotou  $1021\text{ cm}^{-1}$ , a to pro každé spektrum. K tomuto účelu byla využita funkce PEAK PICK. Pro další hodnotu, která se měnila v závislosti na změně koncentrace methanolu, byla využita funkce INTEGRATE DATA. Ta slouží pro výpočet plochy ve zvolené oblasti ve spektru. Pro tento účel byla zvolena oblast pod píkem o hodnotě  $1021\text{ cm}^{-1}$  a rozsah vlnočtu byl nastaven od  $1000\text{ cm}^{-1}$  do  $1040\text{ cm}^{-1}$ . Jako typ integrace byla použita Trapezoid Area (lichoběžníková oblast). Tyto hodnoty získané z programu WiRE<sup>TM</sup> spolu s odpovídajícími hodnotami koncentrací methanolu ve všech dvanácti vzorcích obsahuje tabulka (Tab. 6).

Tab. 6. Data pro sestavení kalibračních křivek - první měřená oblast

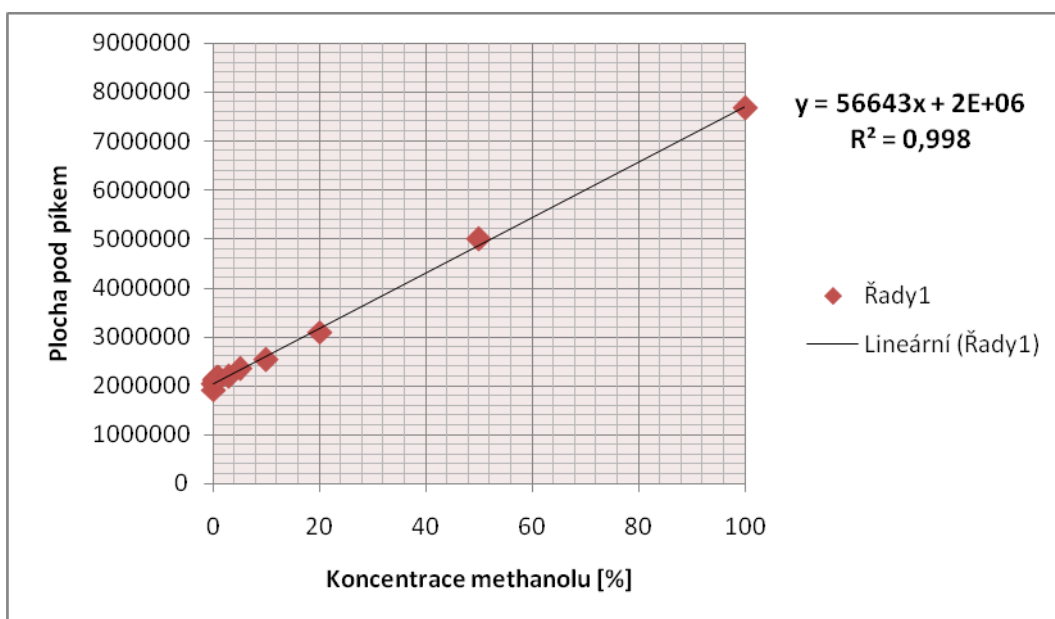
Číslo vzorku	Koncentrace methanolu [%]	Intenzita Ramanova záření	Plocha pod píkem $1021\text{ cm}^{-1}$
1	0	46386	1916639
2	0,1	46960	2042142
3	0,25	48162	2123174
4	0,5	49555	2153768
5	0,75	50338	2159024
6	1	50508	2164928
7	3	52776	2199685
8	5	62232	2346454
9	10	71561	2535037
10	20	93263	3101986
11	50	171832	5007608
12	100	289930	7679652

Pomocí hodnot v Tab. 6 byly sestaveny první dvě kalibrační křivky v programu Microsoft Excel. Na obrázku (Obr. 25) je výsledný graf závislosti intenzity Ramanova záření na koncentraci methanolu v ethanolu obsažených ve směsi s vodou. Na obrázku (Obr. 26) je graf závislosti plochy pod píkem na koncentraci methanolu.





Obr. 25. Kalibrační křivka č. 1 - závislost intenzity na koncentraci - první oblast

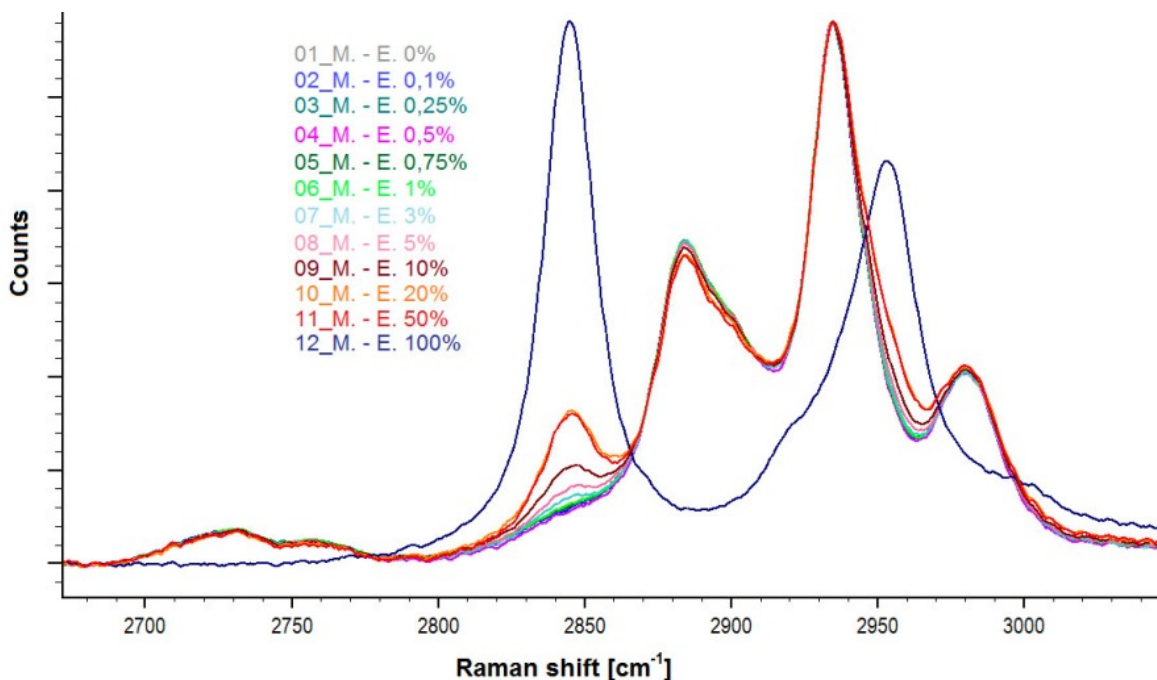


Obr. 26. Kalibrační křivka č. 2 - závislost plochy na koncentraci - první oblast

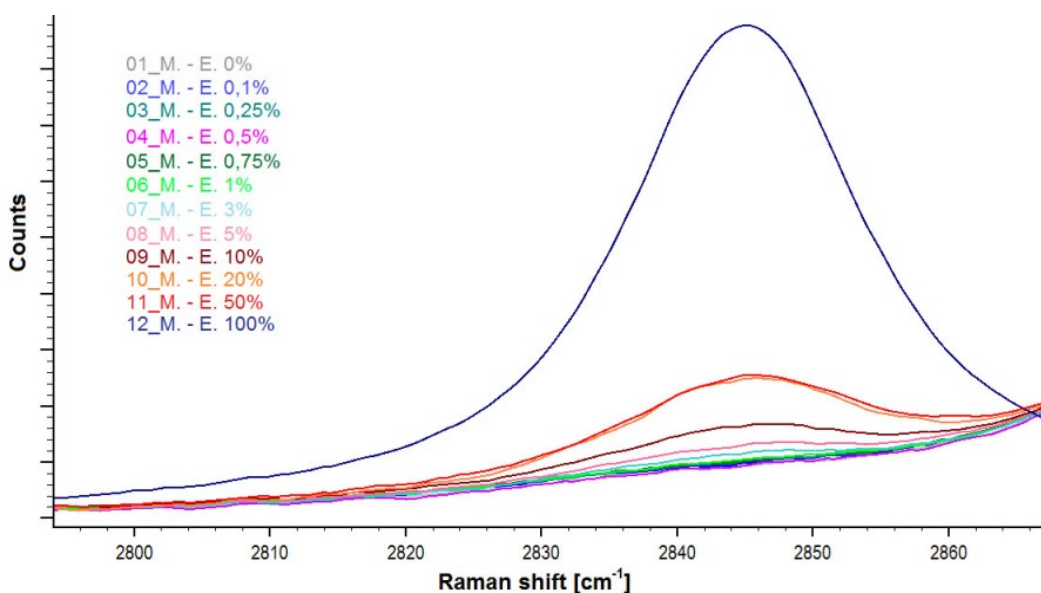
Z grafů je zřejmé, že závislost intenzity Ramanova záření na koncentraci methanolu a závislost plochy pod píkem na koncentraci methanolu jsou lineární. Všechny body v grafu však neleží přesně na přímce. Hodnoty na ose x jsou přesně stanoveny. Předpoklad je tedy takový, že odchylky plynoucí z hodnot na ose y vznikly při měření. V programu Microsoft Excel byla využita matematická metoda lineární regrese pro aproximaci naměřených hodnot, pomocí níž byla vypočtena rovnice lineární regrese a hodnota spolehlivosti  $R^2$ .

### 7.3.2 Kalibrační křivky z druhé měřené oblasti

Stejným způsobem jako v první oblasti byly provedeny úpravy i pro druhou oblast. V oblasti se středem vlnočtu  $2900\text{ cm}^{-1}$  byla pozornost soustředěna na pík o hodnotě  $2845\text{ cm}^{-1}$  kde rovněž docházelo k jednoznačným změnám tvaru spektra v závislosti na změně koncentrace methanolu v analyzované směsi. Upravená spektra všech dvanácti vzorků jsou na obrázcích (Obr. 27) a (Obr. 28) s detailem na oblastí vlnočtu kolem  $2900\text{ cm}^{-1}$ .



Obr. 27. Ramanova spektra vzorků pro kalibrační křivku - druhá oblast



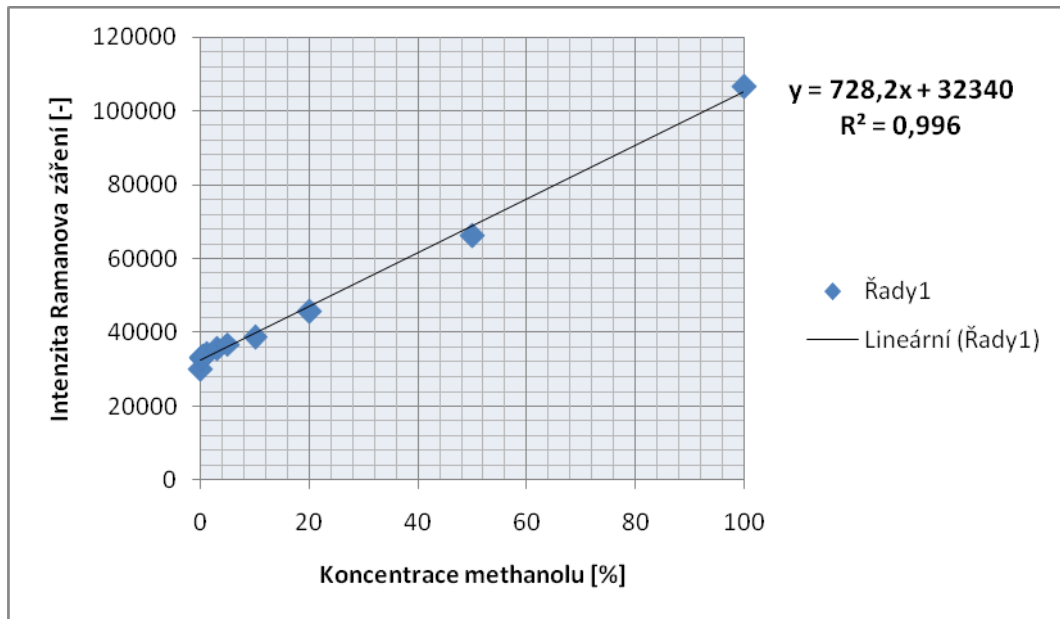
Obr. 28. Detail na klíčovou oblast -  $2845\text{ cm}^{-1}$

Z programu WiRE™ byly po úpravě spekter všech dvanácti vzorků opět vyčteny hodnoty intenzity Ramanova záření tentokrát pro pík s hodnotou  $2845\text{ cm}^{-1}$ . Tato hodnota vlnočtu vykazovala pro všechna spektra odpovídající změny a mohla být dále analyzována podobně jako pík  $1021\text{ cm}^{-1}$  v první oblasti. Pro výpočet plochy ve zvolené oblasti ve spektru pomocí funkce INTEGRATE DATA byl nastaven rozsah vlnočtu od  $2820\text{ cm}^{-1}$  do  $2860\text{ cm}^{-1}$ . Hodnoty získané z programu WiRE™ spolu s odpovídajícími hodnotami koncentrací methanolu v ethanolu ze všech dvanácti vzorků jsou uvedeny v tabulce (Tab. 7).

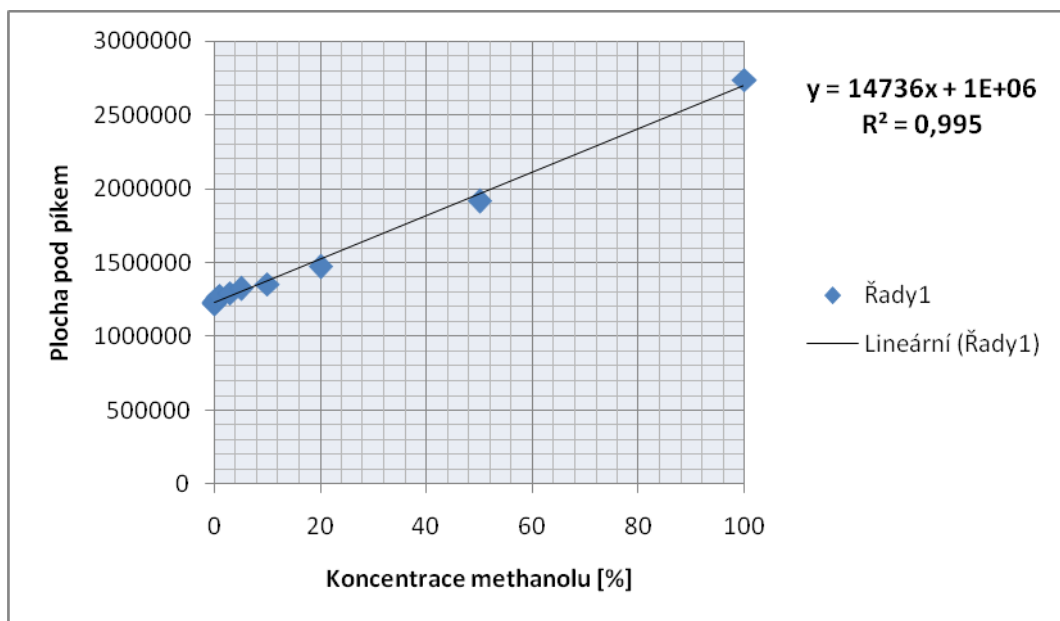
Tab. 7. Data pro sestavení kalibračních křivek - druhá měřená oblast

Číslo vzorku	Koncentrace methanolu [%]	Intenzita Ramanova záření	Plocha pod píkem $2845\text{ cm}^{-1}$
1	0	30056	1219254
2	0,1	32706	1228144
3	0,25	33104	1236938
4	0,5	33515	1246437
5	0,75	33654	1268874
6	1	34237	1276226
7	3	35584	1293661
8	5	36782	1325410
9	10	38638	1355995
10	20	45780	1472956
11	50	66119	1919351
12	100	106708	2739881

Pomocí hodnot z tabulky (Tab. 7) byly sestaveny další dvě kalibrační křivky v programu Microsoft Excel. Na obrázku (Obr. 29) je výsledný graf závislosti intenzity Ramanova záření na koncentraci methanolu v ethanolu obsažených ve směsi s vodou. Na obrázku (Obr. 30) je graf závislosti plochy pod píkem na koncentraci methanolu.



Obr. 29. Kalibrační křivka č. 3 - závislost intenzity na koncentraci - druhá oblast



Obr. 30. Kalibrační křivka č. 4 - závislost plochy na koncentraci - druhá oblast

### 7.3.3 Sestavení kalibračních křivek - dílčí závěr

Ve výsledných spektrech z obou naměřených oblastí byly dobře patrné rozdíly charakteristické pro různé koncentrace methanolu a ethanolu. Z kalibračních křivek byly v programu Microsoft Excel vygenerovány čtyři rovnice lineární regrese a k nim hodnoty spolehlivosti. Další možnost jak sestavit kalibrační křivku nabízí v programu WiRE<sup>TM</sup> funkce CURVE FIT. Pomocí této funkce lze určit plochu pod píkem podobně jako při použití funkce

INTEGRATE DATA. Rozdíl je však v přesnosti získaných hodnot. Při použití funkce CURVE FIT je nutné analyzované spektrum vhodně nahradit křivkou, což není prováděno automaticky programem ale ručně. U funkce INTEGRATE DATA je oblast ze které je vypočítána hodnota plochy pod píkem volena přesně nastavením vhodného rozsahu vlnočtu. Funkce CURVE FIT pro výpočet plochy pod píkem byla použita, ale výsledky z ní nejsou v praktické části prezentovány.

#### 7.4 Využití kalibrační křivky k analýze testovacích vzorků

V tabulce (Tab. 8) jsou uvedeny upravené rovnice lineární regrese pro výpočet hodnoty koncentrace a k nim hodnoty spolehlivosti získané pomocí programu Microsoft Excel. Čím více se hodnota spolehlivosti blíží k hodnotě 1, tím lépe je kalibrační křivka (v tomto případě přímka) přizpůsobena vstupním datům a vypočítané hodnoty koncentrací methanolu ve vzorcích pro test kalibrační křivky budou přesnější.

Tab. 8. Rovnice lineární regrese a hodnoty spolehlivosti

Oblast měření	Zkoumaná závislost na koncentraci X	Rovnice pro výpočet koncentrace methanolu	Hodnota spolehlivosti R <sup>2</sup>
První oblast	Intenzita Ramanova záření	$x = \frac{y - 47266}{2436}$	0,999
	Plocha pod píkem	$x = \frac{y - 2 \cdot 10^6}{56643}$	0,998
Druhá oblast	Intenzita Ramanova záření	$x = \frac{y - 32340}{728,2}$	0,996
	Plocha pod píkem	$x = \frac{y - 1 \cdot 10^6}{14736}$	0,995

Do uvedených čtyř rovnic lineární regrese byly postupně za Y dosazovány hodnoty intenzity Ramanova záření a plochy pod píkem. Dosazované hodnoty jsou uvedeny v tabulce (Tab. 9). Jedná se o data získaná z programu WiRE<sup>TM</sup> ze vzorků pro test kalibrační křivky (vzorky A-D). Byly opět využity funkce PEAK PICK a INTEGRATE DATA.

Tab. 9. Naměřená data vzorků pro test kalibrační křivky

Označení vzorku	První měřená oblast		Druhá měřená oblast	
	Intenzita Ramanova záření	Plocha pod píkem	Intenzita Ramanova záření	Plocha pod píkem
A	83585	2992579	41798	1154672
B	55592	2305250	33488	1007576
C	49258	2084978	33155	1002962
D	48427	2050985	32556	1001841

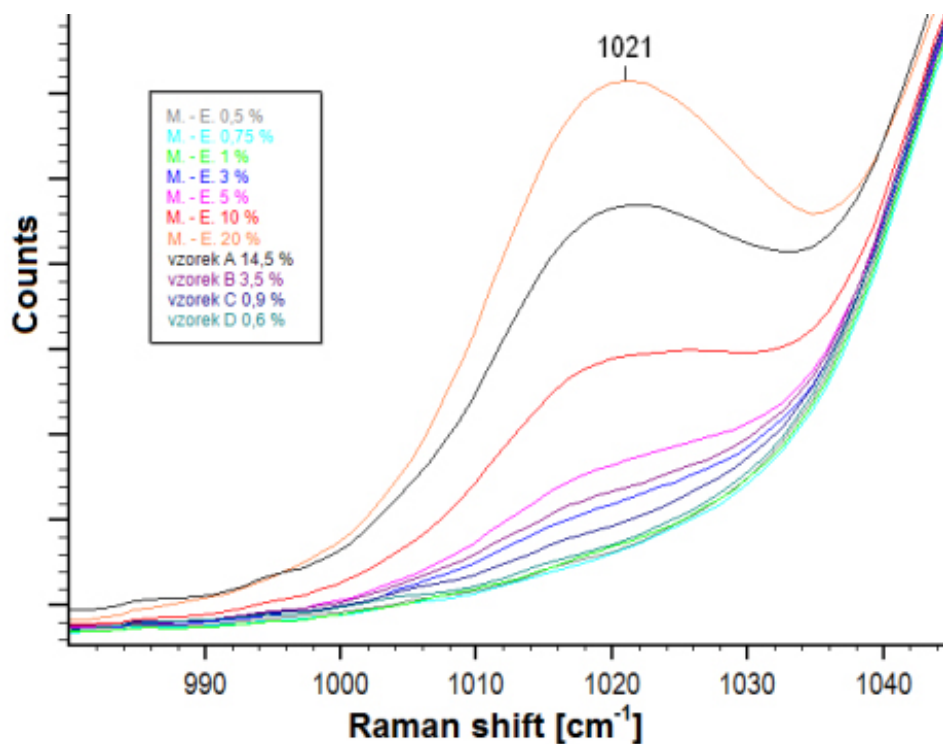
#### 7.4.1 Výsledky a závěry spektrální analýzy

Postupným dosazováním do rovnic byly získány různé hodnoty koncentrace methanolu ve vzorcích pro test kalibrační křivky. Získána data jsou uvedena v tabulce (Tab. 10).

Tab. 10. Vypočtené hodnoty koncentrace

Označení vzorku / skutečná koncentrace methanolu [%]	První měřená oblast		Druhá měřená oblast	
	Koncentrace methanolu vypočtená z intenzity Ramanova záření	Koncentrace methanolu vypočtená z plochy pod píkem	Koncentrace methanolu vypočtená z intenzity Ramanova záření	Koncentrace methanolu vypočtená z plochy pod píkem
A / <b>14,5</b>	14,9 %	17,5 %	13 %	10,5 %
B / <b>3,5</b>	3,4 %	5,4 %	1,6 %	0,5 %
C / <b>0,9</b>	0,8 %	1,5 %	1,1 %	0,2 %
D / <b>0,6</b>	0,5 %	0,9 %	0,3 %	0,1 %

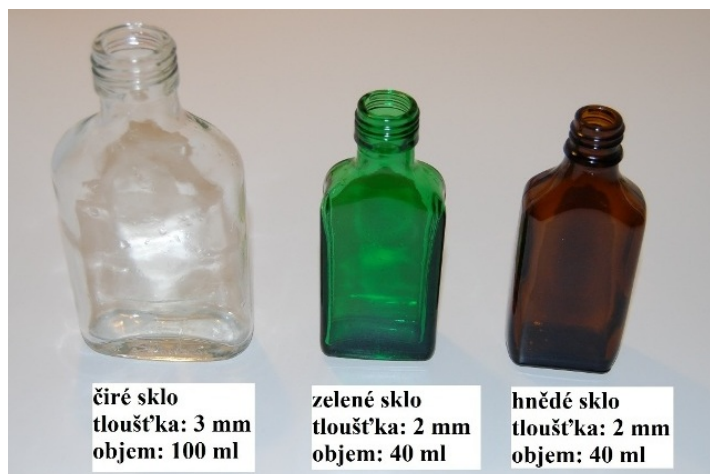
V tabulce jsou též uvedeny skutečné hodnoty koncentrace methanolu. Při porovnání výsledků je zřejmé, že nejvíce se ke skutečným hodnotám blíží koncentrace methanolu vypočtená z intenzity Ramanova záření, a to z první měřené oblasti. Tato skutečnost byla předpokládána i porovnáním hodnot spolehlivosti kalibračních křivek  $R^2$ . Koncentrace methanolu ve směsi methanol-ethanol-voda byla tedy určena s nejvyšší přesností 2,7 % a pro výpočet byly použity hodnoty intenzity Ramanova záření pro pík s vlnčtem  $1021 \text{ cm}^{-1}$ . Uvedeným způsobem je tedy možné provést kvantitativní analýzu konzumních liho- vin (vzorků o neznámé koncentraci methanolu) a určit koncentraci methanolu. Na obrázku (Obr. 31) jsou pro názornost uvedena spektra vzorků A-D v první oblasti s detailem na pík  $1021 \text{ cm}^{-1}$ . Na obrázku jsou též některá spektra vzorků pro kalibrační křivku. Tato spektra mají podobnou koncentraci methanolu jako spektra vzorků A-D a slouží k porovnání. Je zřejmé, že spektrum zvýrazněné černou barvou se nachází mezi 10 % koncentrací methanolu (červené spektrum) a 20 % koncentrací (oranžové spektrum). Odhadem by se tedy dalo říci, že hodnota koncentrace bude kolem 15 %. Podobně například tmavě fialové spektrum se nachází mezi 3 % koncentrací methanolu (světle modré spektrum) a 5 % koncentrací (ružové spektrum). Lze odhadnout, že koncentrace methanolu bude 3,5 %. Tento způsob je možné označit jako kvalitativní analýzu, kterou je možno použít pro přibližné určení koncentrace nebo jako hrubou kontrolu.



Obr. 31. Spektra vzorků A-D se spektry vzorků pro kalibrační křivku

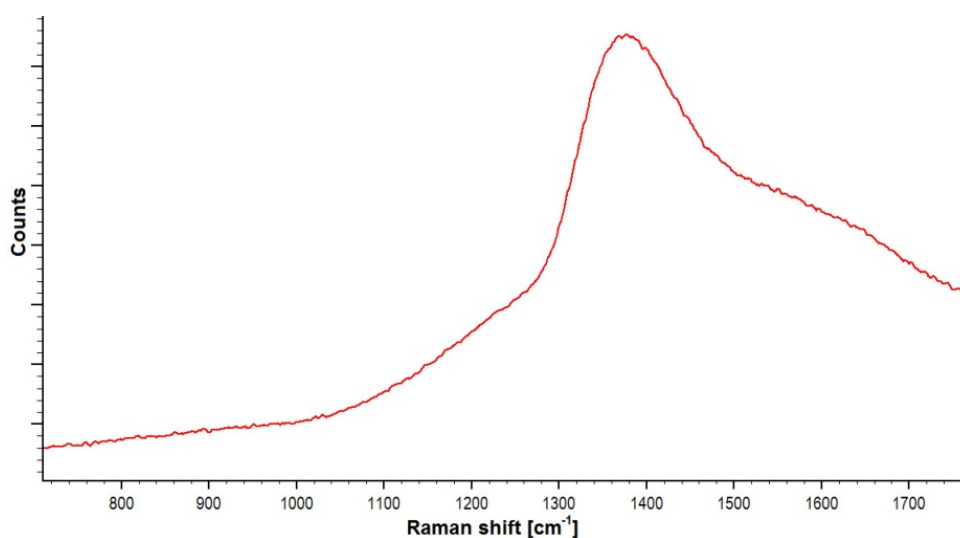
## 7.5 Vliv obalových materiálů na výsledky měření

Pro analýzu vlivu obalových materiálů na výsledky měření bylo namícháno 25 ml směsi (methanol-ethanol-voda), která byla postupně přelévána do lahvíček z čírého, zeleného a hnědého skla. Co se týká analyzované směsi, jednalo se o 40 % alkohol, v němž methanol a ethanol byly v poměru 1:1, což odpovídá vzorku číslo 11 z tabulky (Tab. 1). V naměřených spektrech této směsi byly odezvy methanolu i ethanolu dobře patrné.



Obr. 32. Různé druhy skel použitých při analýze

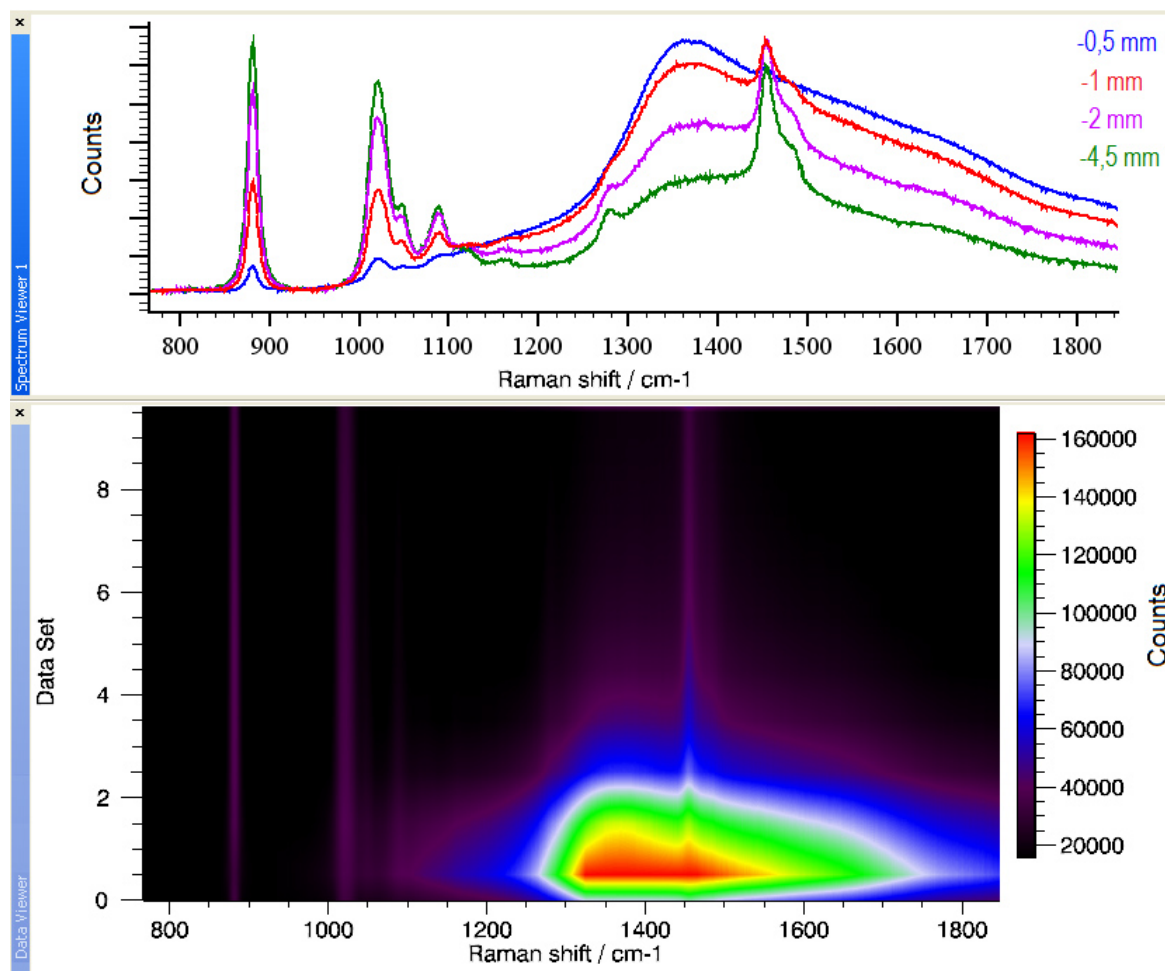
Bylo provedeno několik měření s různými hodnotami posuvu v ose Z. Pomocí funkce „Set origin“ a „Go to origin“ byly vzorky měřeny od povrchu lahvičky až do hloubky 4,5 mm pod její povrch. Nakonec byla provedena hloubková analýza. Krok (automatický posuv) byl nastaven na 0,5 mm. Získáno bylo 10 spekter. Na obrázku (Obr. 33) je naměřené spektrum prázdné lahvičky z čírého skla se zaostřením na její povrch.



Obr. 33. Ramanovo spektrum prázdné lahvičky 100 ml - čiré sklo

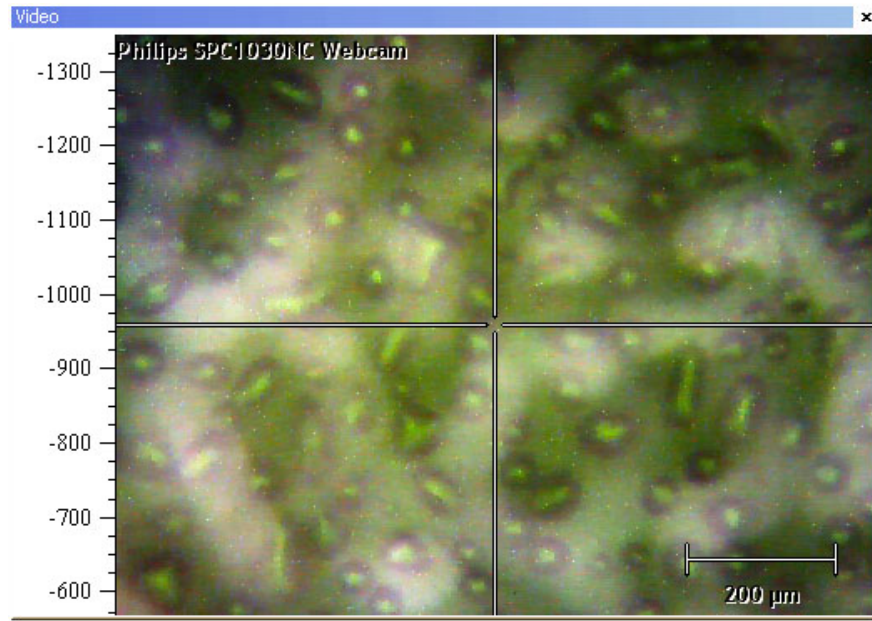


Ve výše uvedeném Ramanově spektru je patrná odezva skla v oblasti vlnočtu od  $1250\text{ cm}^{-1}$  do  $1600\text{ cm}^{-1}$ . Tato odezva se též projevila při hloubkové analýze, jejíž výsledky jsou na obrázku (Obr. 34). Pro prezentaci výsledků bylo v programu WiRE<sup>TM</sup> použito 3D znázornění hloubkového skenování.



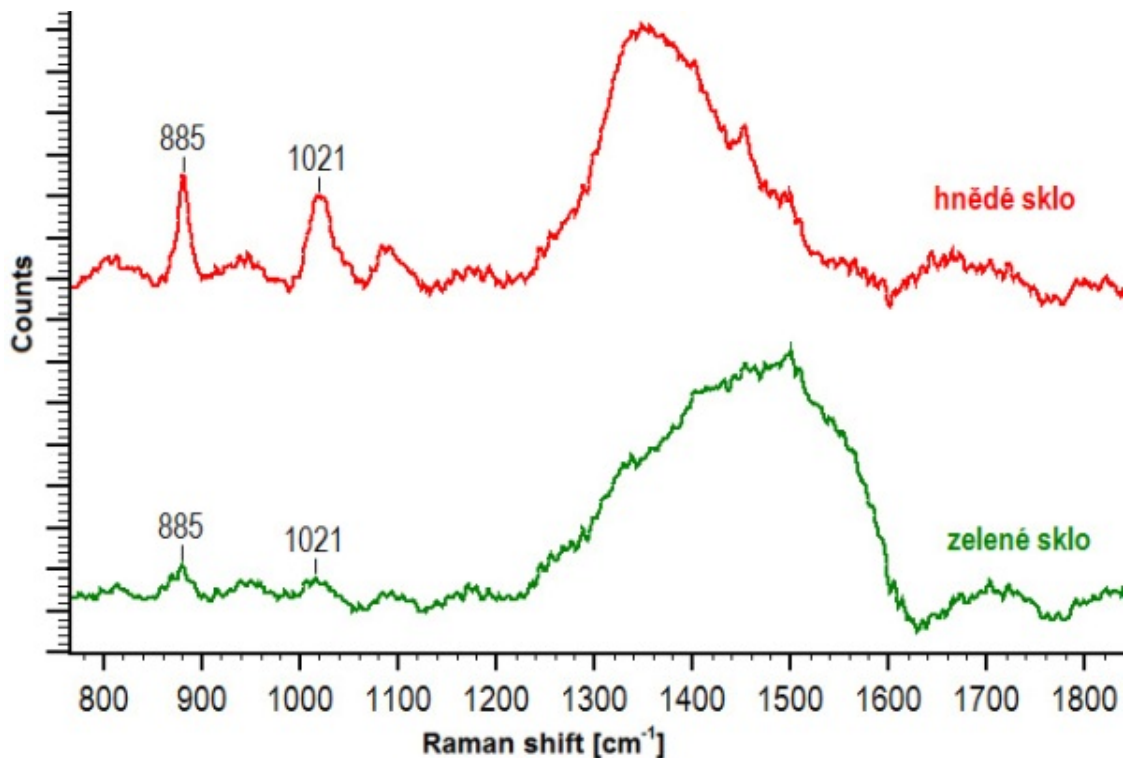
Obr. 34. Grafické výsledky hloubkové analýzy

Na obrázku (Obr. 34) nahoře jsou pro názornost uvedena čtyři spektra z celkových deseti akvizicí s různou hloubkou měření (0,5 mm, 1 mm, 2 mm a 4,5 mm). Ve spodní části obrázku je barevné znázornění závislosti intenzity na aktuálně sledované hloubce měření (Data Set). Z uvedených výsledků je zřejmé, že intenzita Ramanova záření v oblasti vlnočtu od  $1250\text{ cm}^{-1}$  do  $1600\text{ cm}^{-1}$  se při větší hloubce měření snižuje a naopak se zvyšuje intenzita spekter zkoumané směsi (methanol-ethanol-voda) uvnitř lahvičky. Čím jde excitační paprsek hlouběji do zkoumaného vzorku, tím se ve výsledném spektru méně projevuje obalový materiál ale i při maximální nastavené hloubce (-4,5 mm) je ve spektru vliv skla patrný, i když tloušťka skla lahvičky byla 3 mm.



Obr. 35. Pohled z kamery zaostřený na plochu zelené lahvičky

Podobným způsobem byl analyzován vliv lahviček ze zeleného a hnědého skla na výsledky měření. Na obrázku (Obr. 36) jsou uvedena výsledná spektra. Hloubka měření byla nastavena na -4 mm. Ve spektru lahvičky z hnědého skla obsahující zkoumanou směs jsou zřetelně vidět odezvy methanolu i ethanolu. V případě spektra zelené lahvičky je intenzita o poznání nižší.



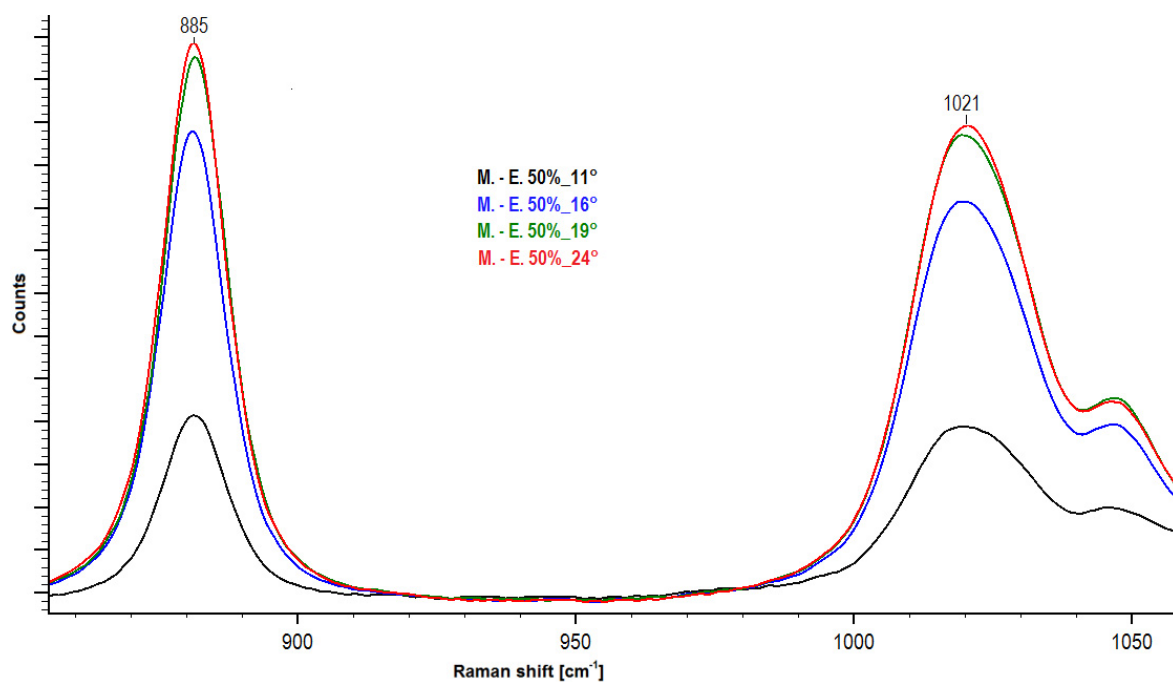
Obr. 36. Srovnání spekter lahviček obsahující vzorek

### 7.5.1 Vliv obalových materiálů na výsledky měření - dílčí závěr

Při analýze vlivu obalových materiálů byla nejprve měřena lahvička z čirého skla obsahující směs (methanol-ethanol-voda). Výkon laseru byl snížen na 0,5 % až 1 %. Při vyšším výkonu byla výsledná spektra dosti zkreslená. Naopak při analýze vlivu hnědého a zeleného skla byl výkon navýšen na 50 %. Pro všechna měření byl nastaven střed vlnočtu na  $1350 \text{ cm}^{-1}$ . Z uvedených výsledků vyplývá, že při měření směsi přes čiré sklo o tloušťce 3 mm nejsou výsledná spektra zásadně znehodnocena a hodnoty vlnočtů charakteristické pro methanol i ethanol jsou dobře patrné. Při měření směsi přes lahvičku z barevného skla byly výsledky horší. Lze tedy říci, že pro analýzu alkoholických nápojů v zelených a hnědých lahvích by bylo vhodnější odebrat vzorek a měřit jej například v průhledné vialce, která odezvu skla téměř nevykazuje.

### 7.6 Vliv teploty vzorku na výsledky měření

Měření všech vzorků probíhalo při okolní teplotě  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ . Vzorky v laboratoři spektrální analýzy měly tedy tuto uvedenou teplotu. Spektrální analýza však může být v praxi měřena při různých teplotách podezřelých lihovin o neznámé koncentraci methanolu. Cílem v této části diplomové práce bylo experimentálně zjistit, jestli se bude měnit naměřené Ramanovo spektrum v závislosti na změnách teploty. Pro měření byl použit bezdotykový infračervený měřič teploty.

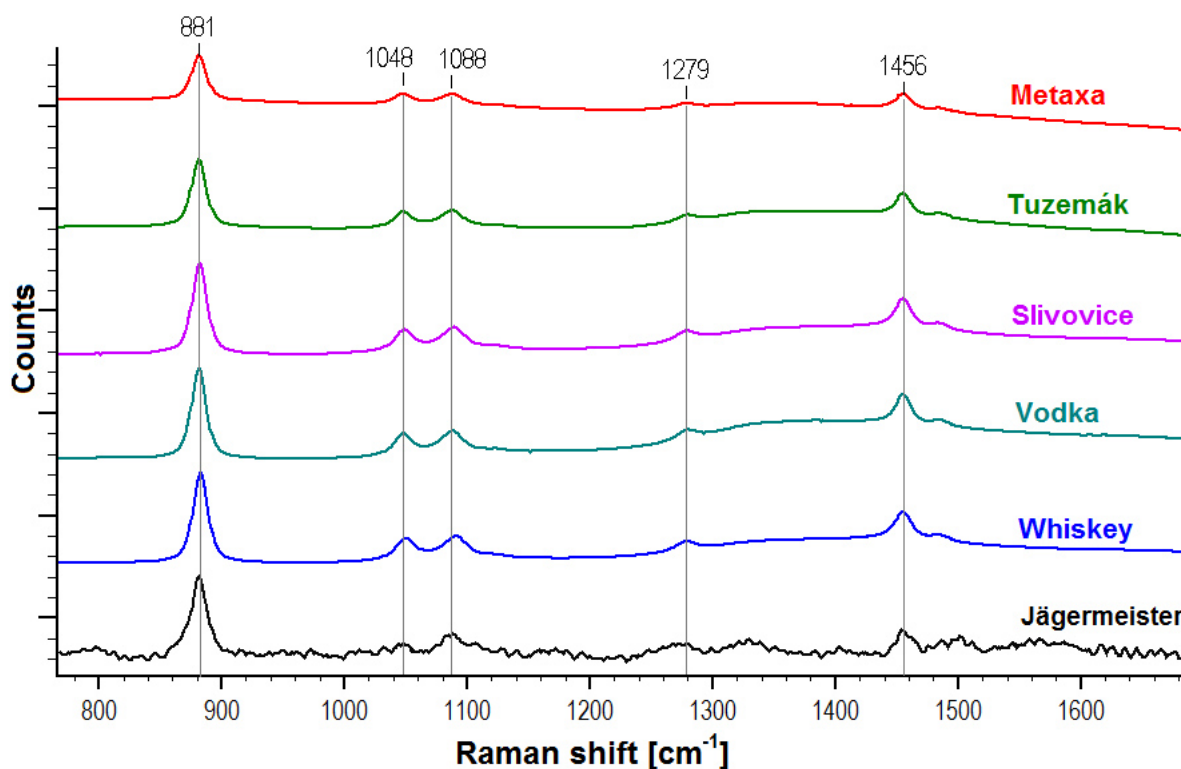


Obr. 37. Naměřená Ramanova spektra jednoho vzorku s různou teplotou

Na obrázku (Obr. 37) jsou výsledky měření. Střed vlnočtu byl nastaven na  $950\text{ cm}^{-1}$ . Z uvedených spekter je patrné, že se intenzita Ramanova záření zvětšovala s narůstající teplotou. Tato závislost však není lineární. Nad hodnotu  $20\text{ °C}$  se intenzita významněji neměnila. Během měření vzorků Ramanovým spektrometrem nebylo možné změřit aktuální teplotu vzorku z důvodu negativního ovlivnění výsledků. Teplota vzorku byla tedy změřena těsně před započítáním spektrální analýzy, během níž se změnila, a těsně po provedeném měření. Uvedené výsledky, zejména údaje o teplotě vzorku jsou tedy přibližné.

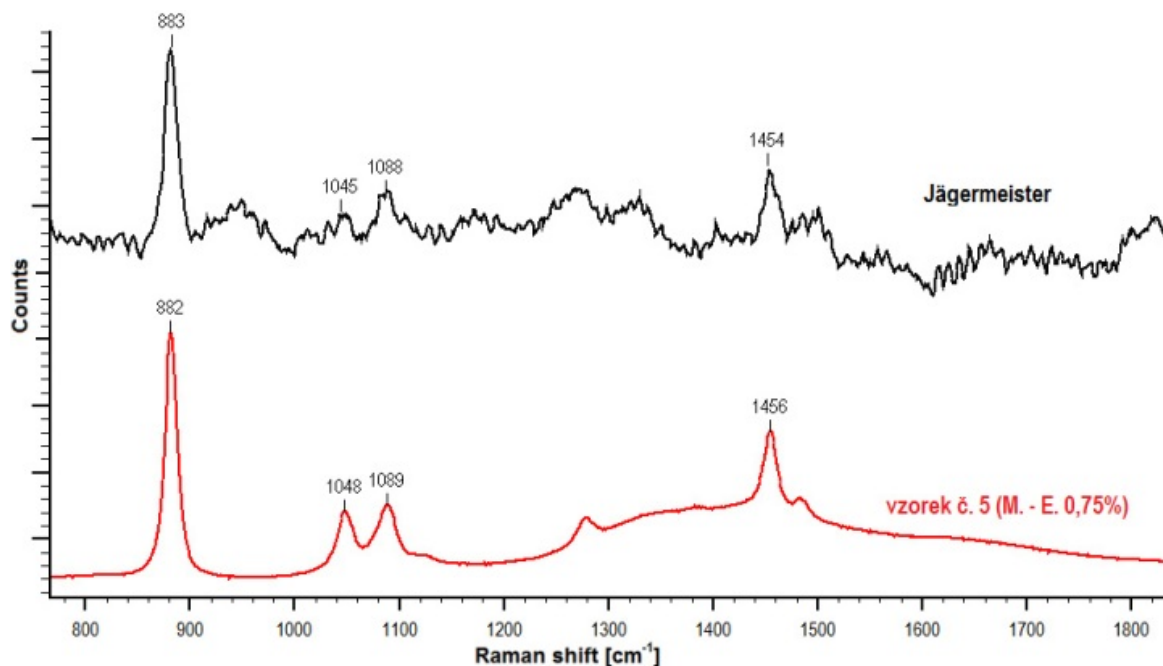
### 7.7 Analýza vzorků konzumních lihovin

V této části diplomové práce jsou uvedeny výsledky spektrální analýzy vybraných konzumních lihovin běžně dostupných na trhu. Jednalo se o Vodka ( $37,5\%$  obj.), Tuzemák ( $37,5\%$  obj.), Slivovici ( $40\%$  obj.), Whiskey ( $45\%$  obj.), Jägermeister ( $35\%$  obj.) a Metaxu ( $38\%$  obj.). Od jednotlivých lihovin byly odlity  $4\text{ ml}$  vzorku do skleněných vialek a postupně byla naměřena Ramanova spektra. Nastavení měření pro jednotlivé vzorky se mírně lišilo. Čiré nebo jemně zbarvené lihoviny byly měřeny při stejných parametrech, které byly nastaveny pro vzorky k sestavení kalibrační křivky. U nich tedy bylo možné provést analýzu obsahu methanolu.



Obr. 38. Naměřená Ramanova spektra vybraných lihovin

Na obrázku (Obr. 38) jsou pro porovnání uvedena Ramanova spektra všech vybraných lihovin. Spektrum Jägermeistera se od ostatních liší výrazným šumem. Lihoviny jako právě Jägermeister nebo Fernet obsahují příměsi a aromatické látky, které tekutinu specificky obarví. Barva těchto lihovin je poměrně tmavá což může být problém při zaostřování paprsku na povrch obalového materiálu (skleněné vialky).



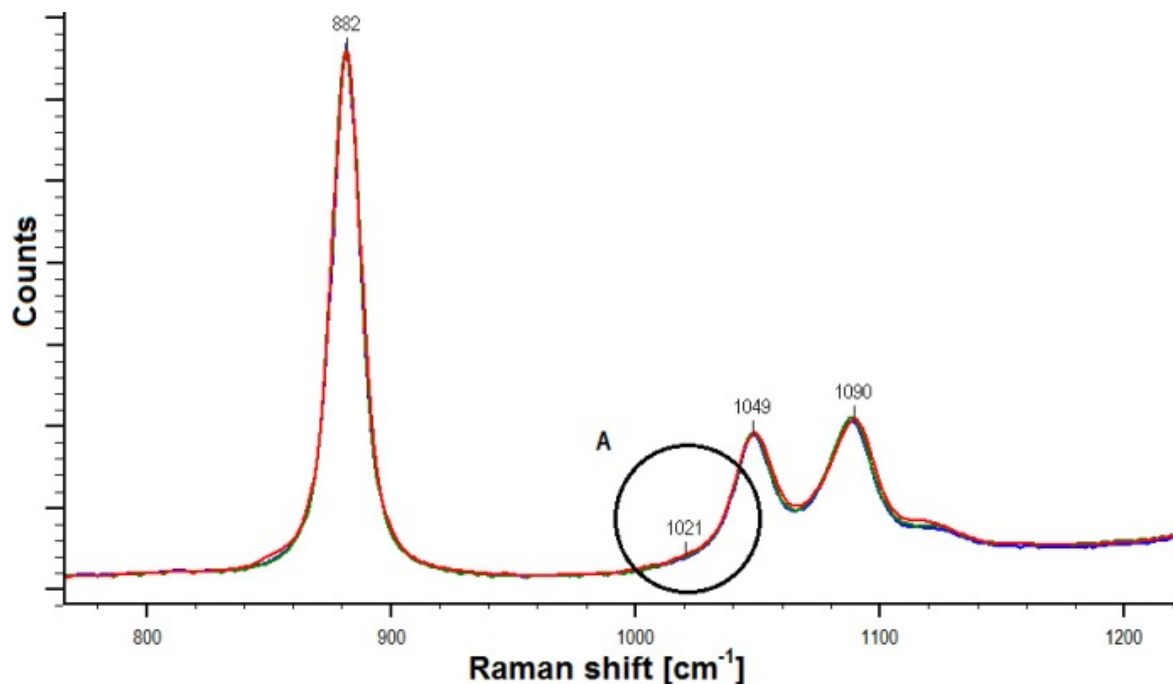
Obr. 39. Ramanovo spektrum Jägermeistera v porovnání se spektrem vzorku č. 5

Na obrázku (Obr. 39) je naměřené spektrum Jägermeistera v porovnání se spektrem vzorku číslo 5, což byla směs alkoholu (methanol-ethanol-voda) obsahující 0,75 % methanolu. Vzorek Jägermeistera byl nanesen v množství přibližně 0,5 ml na laboratorní destičku a tedy měření nebylo ovlivněno obalovým materiálem. Přesto, že při měření bylo vyzkoušeno několik různých nastavení parametrů, výsledná spektra nejsou optimální. Ve spektru Jägermeistera je patrný pík s hodnotou  $883\text{ cm}^{-1}$ , což je charakteristické pro ethanol. Spektrum dále vykazuje jisté zkreslení a objevují se zde některé píky, které mohou být jako odezva na přítomnost aromatických látek v této lihovině. Co se týká koncentrace methanolu v Jägermeisteru, výrazný šum znemožňuje jeho přesné určení.

### 7.7.1 Analýza obsahu methanolu ve vybraných lihovinách

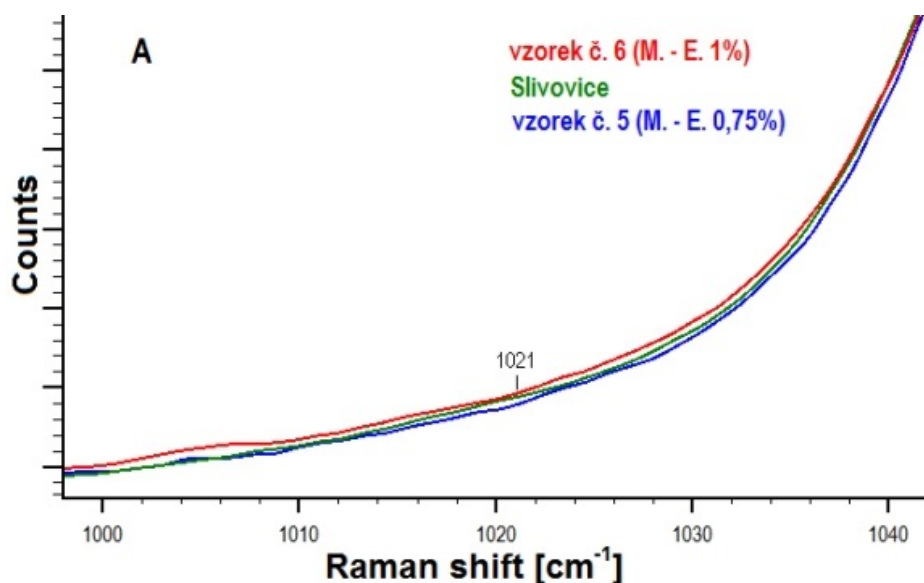
Pro analýzu obsahu methanolu byly vybrány vzorky Slivovice a Vodky. Parametry měření jsou shodné jako v případě vzorků pro sestavení kalibrační křivky. Střed vlnočtu byl nastaven na hodnotu  $1350\text{ cm}^{-1}$  pro oba vzorky.





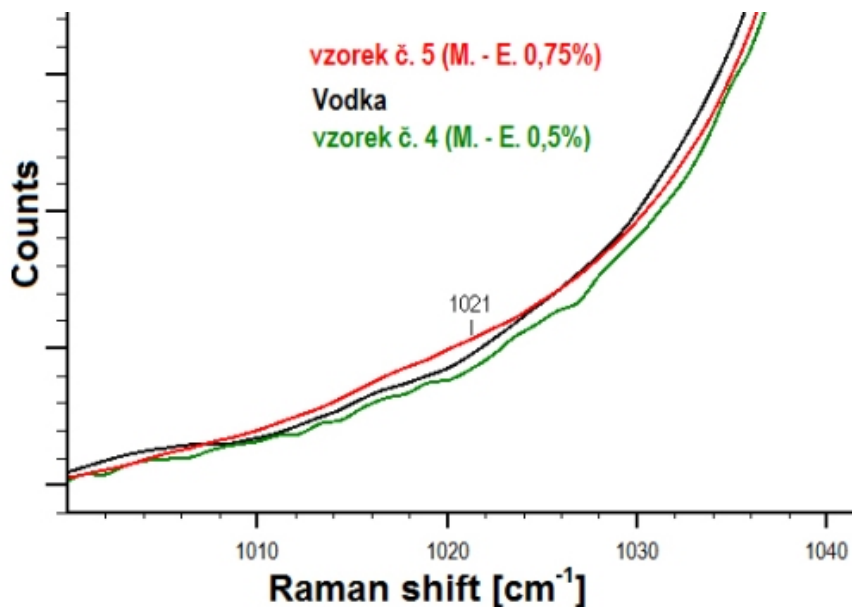
Obr. 40. Ramanova spektra slivovice a vzorků číslo 5 a 6

Na obrázku (Obr. 40) je naměřené Ramanovo spektrum Slivovice v porovnání se dvěma spektry z kalibrační křivky. Jsou to spektra vzorku číslo 5, které obsahuje 0,75 % methanolu a vzorku číslo 6 obsahující 1 % methanolu. Spektra jsou téměř shodná, ale při přiblížení na určité oblasti vlnočtu jsou patrné drobné rozdíly. Pozornost byla zaměřena na pík s hodnotou vlnočtu 1021 cm<sup>-1</sup> charakteristický pro methanol. Na obrázku (Obr. 41) je detailní pohled na zmíněnou oblast.



Obr. 41. Detailní pohled na porovnávaná spektra

Při provedení kvalitativní analýzy lze říci, že spektrum Slivovice v oblasti vlnočtu  $1021\text{ cm}^{-1}$  se nachází mezi spektry vzorků obsahující 0,75 % a 1 % methanolu. Dle výsledků se spektrum Slivovice nijak výrazně nevymyká a pík methanolu se zde neprojevuje.



Obr. 42. Detailní pohled na porovnávaná spektra

Na obrázku (Obr. 42) je detailní pohled na naměřené spektrum Vodky v porovnání se dvěma spektry z kalibrační křivky. V případě analýzy spektra Vodky byla jako okolní spektra zvolena ta ze vzorku číslo 4 obsahující 0,5 % methanolu a opět ze vzorku číslo 5. Po provedení kvalitativní analýzy lze uvést, že pík methanolu se ve spektru Vodky neprojevuje.

## 8 SHRUTÍ PRAKTICKÉ ČÁSTI

Ramanova spektroskopie byla vybrána jako jedna z metod vibrační spektroskopie pro měření koncentrace methanolu v konzumních lihovinách. Zvolená metoda byla velmi efektivní. Co se týká časové náročnosti, změření jednoho vzorku trvalo přibližně 56 sekund. Příprava vzorků stejně jako zpracování naměřených dat však bylo časově náročnější. Koncentraci jakékoliv látky obsažené v určité směsi je možno určit na základě kalibrační křivky. Podmínkou pro měření je to, aby měl zkoumaný vzorek odezvu v Ramanově spektru. Případně se ve směsi nevyskytovala látka, která výsledné spektrum zkreslí. Vzorky pro sestavení kalibrační křivky je nutné namíchat s vysokou přesností a též velmi pečlivě zvolit parametry měření. Pro analýzu je nezbytné zaměřit se na pík o určité hodnotě vlnočtu, která je charakteristická pro částicový pohyb ve zkoumané látce. V případě methanolu to byla jednoznačně oblast kolem vlnočtu  $1021\text{ cm}^{-1}$ . V této oblasti vykazovaly změny koncentrace jasné odezvy ve spektru. Při měření je nutno též dobře zvážit vliv obalových materiálů, který je ve výsledných spektrech velmi patrný. Při měření vzorků a porovnání s kalibrační křivkou je nutné vzít v úvahu i okolní teplotu respektive teplotu vzorku. Výhody obecné i výhody pramenící z použití při analýze podezřelých lihovin jsou uvedeny níže.

### 8.1 Výhody použité metody

- dostatečná přesnost pro potřeby stanovení nadlimitního množství methanolu,
- cenově nenáročné měření (v porovnání s plynovou chromatografií),
- poměrně bezproblémová analýza přes transparentní obaly (sklo, plasty),
- při měření nedochází k poškození vzorku,
- pro měření stačí minimální množství vzorku,
- naměření Ramanových spekter probíhá velmi rychle,
- aplikovatelnost analýzy pro mnoho látek.

### 8.2 Nevýhody použité metody

- horší odezva při analýze barevných lihovin,
- špatná odezva při měření přes neprůhledné obaly,
- některé látky se v Ramanově spektru neprojeví.



## ZÁVĚR

Případy úmrtí nebo významného poškození zdraví na následky požití methanolu nejsou způsobeny lihovinami vyrobenými kvasnou cestou, ale přidáním methanolu do lihoviny nebo úplnou záměnou kvasného lihu za methanol při výrobě. Přítomnost methanolu v konzumních lihovinách nelze poznat podle chuti, barvy, či vůně. Pro ověření přítomnosti methanolu v konzumních lihovinách je tedy potřebné mít k dispozici vhodné prostředky. Cílem této práce bylo seznámit čtenáře s metodami použitelnými pro analýzu neznámých či podezřelých konzumních lihovin. V teoretické části jsou uvedeny metody používané pro stanovení přítomnosti methanolu s možností určení přesné koncentrace. Práce je hlouběji zaměřena na metody vibrační spektroskopie, zejména pak Ramanovy spektroskopie. Na rozdíl od plynové chromatografie není Ramanova spektroskopie certifikovanou metodou pro měření koncentrace methanolu v konzumních lihovinách. S jejím využitím lze však bezpečně určit nadlimitní množství methanolu v lihovinách. Praktická část této práce byla zaměřena na spektrální analýzu vzorků využitím metody Ramanovy spektroskopie. Jako hlavní cíl výzkumu bylo stanoveno ověření vhodnosti metody při měření koncentrace methanolu v konzumních lihovinách. V laboratoři spektrální analýzy bylo změřeno několik desítek vzorků. Naměřená spektrální data byla upravena pro sestavení kalibrační křivky, pomocí níž bylo možné stanovit koncentraci methanolu ve vzorcích o neznámé koncentraci methanolu. Metoda a postupy měření jsou v praktické části podrobně popsány a výsledky pro využití Ramanovy spektroskopie jsou velmi přesvědčivé. Jeden z hlavních cílů byl zaměřen na vliv obalových materiálů na výsledky měření a bylo zjištěno, že v případě měření přes transparentní obaly není výsledné spektrum zásadně ovlivněno. V potaz byla brána i možnost ovlivnění výsledků měření při různých teplotách vzorku. V závěru praktické části byly analyzovány vybrané konzumní lihoviny s cílem prověřit koncentraci methanolu. V tomto případě se došlo k přesvědčivým závěrům o vhodnosti použití Ramanova spektroskopie pro měření koncentrace methanolu v alkoholických nápojích. Kalibrační křivky a údaje uvedené v praktické části mohou být využity při analýze neznámých lihovin. Při měření podezřelých vzorků je ovšem nutné přesně dodržet uvedené parametry měření.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- [1] SVOBODA, Jiří. *Organická chemie I*. Vyd. 1. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2005, 291 s. ISBN 80-708-0561-7.
- [2] Alkoholy, fenoly a ethery. *E-ChemBook - Multimediální učebnice chemie* [online]. 2012 [cit. 2015-02-12]. Dostupné z: <http://www.e-chembook.eu/cs/alkoholy-fenoly-a-ethery>
- [3] PAVEL CZERNEK, Tomáš Krchňák. *Názvosloví a základní typy reakcí v organické chemii*. Vyd. 1. Ostrava: Wichterlovo gymnázium, 2006. ISBN 80-870-5801-1.
- [4] MALLE, Bettina a Helge SCHMICKL. *Domácí výroba lihovin*. Praha: Pavel Dobrovský - BETA, 2004, 160 s. ISBN 80-7306-144-9.
- [5] Life is Chemistry. *Chemistry in everyday life* [online]. 2012 [cit. 2015-03-31]. Dostupné z: <http://lifeischemistry.com/category/chemistry-in-everyday-life>
- [6] BIGELOW, Barbara C a Kathleen J EDGAR. *UXL encyclopedia of drugs*. Detroit: UXL, c2006, 5 v. ISBN 978-141-4404-448.
- [7] Imgarcade.com - online image arcade. *Gallery For Methyl Alcohol Structure* [online]. 2012 [cit. 2015-03-31]. Dostupné z: <http://imgarcade.com/1/methyl-alcohol-structure>
- [8] PAINE, A. J.; DAYAN, A. D. *Defining a tolerable concentration of methanol in alcoholic drinks*. *Human & experimental toxicology*, 2001, 20(11), 563-568.
- [9] MARTÍNKOVÁ, Markéta. *Vesmír: přírodovědecký časopis - Toxický účinek metanolu na lidský organismus*. 2014/2, *Vesmír* 93, 80, s. 80-83. ISBN 1214-4029. Dostupné z: <http://casopis.vesmir.cz/clanek/toxicky-ucinek-metanolu-na-lidsky-organismus>

- [10] Jedovatý alkohol zabil tři lidi, otrávených přibývá. *Deník.cz* [online]. 10.9.2012 [cit. 2015-02-17]. Dostupné z: [http://www.denik.cz/z\\_domova/jedovaty-alkohol-zabil-tri-lidi-otravenych-pribyva-20120910.html](http://www.denik.cz/z_domova/jedovaty-alkohol-zabil-tri-lidi-otravenych-pribyva-20120910.html)
- [11] VALACHOVÁ, Petra. *Hmotněprávní a procesněprávní aspekty kauzy "metanol" v České republice*. Brno, 2014. Diplomová práce. Masarykova univerzita, Právnická fakulta, Katedra trestního práva. Vedoucí diplomové práce Věra Kalvodová.
- [12] Soud tvrdě ztrestal metanolové zabijáky: Padly doživotní tresty. *Novinky.cz* [online]. 21.5.2014 [cit. 2015-02-19]. Dostupné z: <http://www.novinky.cz/krimi/336887-soud-tvrde-ztrestal-metanolove-zabijaky-padly-doivotni-tresty.html>
- [13] Soud pustil z vazby tři aktéry metanolové kauzy, předtím jim zrušil tresty. *IDNES.cz* [online]. 16.2.2015 [cit. 2015-02-19]. Dostupné z: [http://zlin.idnes.cz/vrchni-soud-propustil-z-vazby-jirouta-vanderku-a-kolacka-pzt-zlin-zpravy.aspx?c=A150216\\_102341\\_zlin-zpravy\\_ras](http://zlin.idnes.cz/vrchni-soud-propustil-z-vazby-jirouta-vanderku-a-kolacka-pzt-zlin-zpravy.aspx?c=A150216_102341_zlin-zpravy_ras)
- [14] Na otravu metanolem se umírá hlavně v Indii, evropským rekordmanem je Estonsko. *Novinky.cz* [online]. 11.9.2012 [cit. 2015-02-19]. Dostupné z: <http://www.novinky.cz/zahranicni/svet/278473-na-otravu-metanolem-se-umira-hlavne-v-indii-evropskym-rekordmanem-je-estonsko.html>
- [15] VAŠKOVÁ, Hana. *Spectroscopic Determination of Methanol Content in Alcoholic Drinks*. *International Journal of Biology and Biomedical Engineering*. 2014, vol. 8, 27-34. ISSN 1998-4510. Dostupné z: <http://www.naun.org/main/NAUN/bio/2014/a102001-300.pdf>
- [16] Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 110/2008 ze dne 15. ledna 2008 o definici, popisu, obchodní úpravě, označování a ochraně zeměpisných označení lihovin a o zrušení, ve znění Nařízení Rady (EHS) č. 1576/89, In: ASPI [právní informační systém]. Wolters Kluwer ČR [cit. 24. 02. 2015]

- [17] Seznámení s plynovou chromatografií. *ELDIAG s.r.o. Elektrotechnická diagnostika* [online]. © 2015 [cit. 2015-02-25]. Dostupné z: <http://www.eldiag.cz/cz/texty/seznameni-s-plynovou-chromatografií>
- [18] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody: Učebnice základů instrumentálních analytických metod*. 1. vyd. Ostrava: Nakladatelství Pavel Klouda, 1996, 203 s. ISBN 80-902-1550-5.
- [19] Vernier Software. *Vernier Mini GC Plus Compounds Gallery* [online]. 2015 [cit. 2015-03-31]. Dostupné z: <http://www.vernier.com/products/sensors/gc2-mini/compounds-gallery>
- [20] KUO, C. C., WEN, Y. H., HUANG, C. M. *A Removable Derivatization HPLC for Analysis of Methanol in Chinese Liquor Medicine*. *Journal of Food and Drug Analysis*, Vol. 10, No. 2, 2002, 101-106
- [21] HPLC (vysokoúčinná kapalinová chromatografie). *Vyšší odborná škola zdravotnická a Střední zdravotnická škola Hradec Králové: Laboratorní metody* [online]. [cit. 2015-03-02]. Dostupné z: <http://labmet.zshk.cz/vyuka/hplc.aspx>
- [22] BAREK, Jiří. *Elektroanalytická chemie*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2005, 188 s. ISBN 80-246-1146-5.
- [23] PEREIRA, Polyana, F., SOUSA, Raquel, M.F., MUNOZ, Rodrigo, A.A., RICHTER, Eduardo M. *Simultaneous determination of ethanol and methanol in fuel ethanol using cyclic voltammetry*. *Fuel*, 2013, 103, 725 - 729 s. [cit. 2015-03-03]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016236112005832>
- [24] ČSN 56 0210-9. *Metody zkoušení lihovin: Stanovení methanolu v brandy a viném destilátu*. Praha: ÚNMZ, 1986.
- [25] CHALMERS, John M, Howell G EDWARDS a Michael D HARGREAVES. *Infrared and Raman spectroscopy in forensic science*. 1. vyd. Hoboken: Wiley, 2012, p. cm. ISBN 978-047-0749-067.

- [26] COLTHUP, Norman B, Lawrence H DALY a Stephen E WIBERLEY. *Introduction to infrared and Raman spectroscopy*. 3rd ed. Boston: Academic Press, c1990, xii, 547 p. ISBN 01-218-2554-X.
- [27] SCHRADER, Bernhard a D BOUGEARD. *Infrared and Raman spectroscopy: methods and applications*. New York: VCH, c1995, xx, 787 p. ISBN 35-272-6446-9.
- [28] LENG, Y. *Materials characterization: introduction to microscopic and spectroscopic methods*. Hoboken, NJ: J. Wiley, c2008, xii, 337 p. ISBN 04-708-2298-8.
- [29] TDLS200 Tunable Diode Laser Gas Analyzer and its Application to Industrial Process. *Yokogawa America* [online]. 2010 [cit. 2015-04-05]. Dostupné z: <http://www.yokogawa.com/us/technical-library/white-papers/tdls200-tunable-diode-laser-gas-analyzer-and-its-application-to-industrial-process.htm>
- [30] 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>
- [31] Theory of Raman Scattering. *Raman Spectroscopy, Modular Spectrometers, and OEM/OED Solutions* [online]. 2015 [cit. 2015-04-05]. Dostupné z: <http://bwtek.com/raman-theory-of-raman-scattering>
- [32] Microscopy. *Chair of Physical Chemistry II* [online]. 2014 [cit. 2015-04-05]. Dostupné z: <http://www.ruhr-uni-bochum.de/pc2/forschungdrei.html.en>
- [33] Spectra of plastics and polymeric materials, recorded with 532nm excitation. *Raman Systems: Raman Chemical Analyzers* [online]. 2008 [cit. 2015-04-05]. Dostupné z: <http://www.agiltron.com/raman/english/polymers%20&%20plastics.htm>
- [34] SMITH, Ewen a Geoffrey DENT. *Modern Raman spectroscopy: a practical approach*. Chichester: John Wiley, 2005, 210 s. ISBN 04-714-9794-0.

- [35] The Correct Material for Infrared (IR) Applications. *Optics - Imaging - Photonics - Optomechanics - Lasers* [online]. 2014 [cit. 2015-04-06]. Dostupné z: <http://www.edmundoptics.com/technical-resources-center/optics/the-correct-material-for-infrared-applications>
- [36] WHITE, Robert. *Chromatography/Fourier transform infrared spectroscopy and its applications*. New York: M. Dekker, c1990, vi, 328 p. ISBN 08-247-8191-0.
- [37] BRUNDERMANN, Erik, Heinz-Wilhelm HUBERS a M KIMMITT. *Terahertz techniques*. New York: Springer, 2010, xxi, 383 p. ISBN 978-3-642-02592-1.
- [38] SHARMA, K., SHARMA, S.P., LAHIRI, S.C. *Novel method for identification and quantification of methanol and ethanol in alcoholic beverages by gas chromatography-Fourier transform infrared spectroscopy and horizontal attenuated total reflectance-Fourier transform infrared spectroscopy*. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, 2009, 92(2), 518-526.
- [39] Novinky v oblasti rychlého screeningu obsahu methanolu v alkoholických nápojích. *RMI, s.r.o. – laboratorní technika* [online]. 2013 [cit. 2015-04-06]. Dostupné z: <http://www.rmi.cz/novinky/novinky-v-oblasti-rychleho-screeningu-obsahu-methanolu-v-alkoholickych-napojich>
- [40] MERBOLD, Hannes. *Terahertz Time-Domain Spectroscopy of Aqueous Systems in Reflection Geometry and Construction of Polarisation-Sensitive Photoconductive Terahertz Antennas*. Freiburg im Breisgau, 2006. Diplomarbeit. Albert-Ludwigs-Universität Freiburg.

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

$\alpha$	polarizovatelnost
$\tilde{\nu}$	vlnčet
$\mu$	dipólový moment
$A$	hmotnostní koncentrace methanolu v roztoku zjištěná z kalibračního grafu
CARS	Coherent Anti-Stokes Raman Scattering
CCD	Charge-Coupled Device
$\text{cm}^{-1}$	jednotka vlnčtu
DNA	Deoxyribonucleic Acid
$E$	Energie fotonu
ES	Evropské společenství
FIR	Far Infrared
FTIR	Fourier Transform Infrared Spectroscopy
GS	Gas Chromatography
GC-FTIR	Gas Chromatography - Fourier Transform Infrared Spectroscopy
GC-MS	Gas Chromatography-Mass Spectrometry
$h$	Planckova konstanta
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IR	Infrared
$K$	činitel ředění brandy nebo vinného destilátu
$k$	silová konstanta
$m_1, m_2$	hmotný bod
$m_R$	redukováná hmotnost
MWIR	Middle Wavelength Infrared
$n$	vibrační kvantové číslo

---

NIR	Near Infrared
$q$	anharmonická konstanta
$r$	vychýlení atomů
$r_0$	rovnovážný stav
RR	Resonance Raman
SERRS	Surface-Enhanced Resonance Raman Scattering
SERS	Surface-Enhanced Raman Scattering
TERS	Tip Enhanced Raman Scattering
$\nu$	frekvence
$\nu_0$	frekvence elektromagnetického záření dopadajícího na molekulu
$\nu_{vib}$	vibrační frekvence molekuly
$X$	hmotnostní koncentrace methanolu v brandy a vinném destilátu



## SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obr. 1. Prostorový model molekuly ethanolu [5] .....</i>	11
<i>Obr. 2. Prostorový model molekuly methanolu [7] .....</i>	12
<i>Obr. 3. Schématické znázornění plynového chromatografu [18, s. 11].....</i>	17
<i>Obr. 4. Chromatografická křivka methanolu [19].....</i>	18
<i>Obr. 5. Schématické znázornění kapalinového chromatografu [18, s. 25].....</i>	19
<i>Obr. 6. Model dvouatomové molekuly [27, s. 8].....</i>	22
<i>Obr. 7. Křivka potenciální energie harmonického oscilátoru [27, s. 11].....</i>	23
<i>Obr. 8. Křivka potenciální energie anharmonického oscilátoru [27, s. 11].....</i>	24
<i>Obr. 9. Vibrační módy dvouatomové molekuly [29].....</i>	25
<i>Obr. 10. Znázornění energetických přechodů pro Rayleighův a Ramanův rozptyl [31].....</i>	27
<i>Obr. 11. Systém pro Ramanovu spektroskopii [32] .....</i>	28
<i>Obr. 12. Ramanovo spektrum polyesteru [33].....</i>	29
<i>Obr. 13. Elektromagnetické spektrum [35].....</i>	31
<i>Obr. 14. Infračervené spektrum methanolu [7] .....</i>	32
<i>Obr. 15. Ramanův spektrometr inVia Basis - konfigurace .....</i>	37
<i>Obr. 16. Excitační zdroje v laboratoři spektrální analýzy .....</i>	38
<i>Obr. 17. Optická sonda RP10 od firmy Renishaw .....</i>	38
<i>Obr. 18. Komora v laboratoři FAI pro manipulaci s těkavými látkami .....</i>	41
<i>Obr. 19. Ramanovo spektrum čistého methanolu .....</i>	43
<i>Obr. 20. Ramanovo spektrum čistého ethanolu .....</i>	44
<i>Obr. 21. Znázornění změny spektra v první měřené oblasti .....</i>	46
<i>Obr. 22. Znázornění změny spektra v druhé měřené oblasti .....</i>	46
<i>Obr. 23. Ramanova spektra vzorků pro kalibrační křivku - první oblast.....</i>	47
<i>Obr. 24. Detail na klíčovou oblast - 1021 cm<sup>-1</sup> .....</i>	47
<i>Obr. 25. Kalibrační křivka č. 1 - závislost intenzity na koncentraci - první oblast.....</i>	49
<i>Obr. 26. Kalibrační křivka č. 2 - závislost plochy na koncentraci - první oblast.....</i>	49
<i>Obr. 27. Ramanova spektra vzorků pro kalibrační křivku - druhá oblast.....</i>	50
<i>Obr. 28. Detail na klíčovou oblast - 2845 cm<sup>-1</sup> .....</i>	50
<i>Obr. 29. Kalibrační křivka č. 3 - závislost intenzity na koncentraci - druhá oblast.....</i>	52
<i>Obr. 30. Kalibrační křivka č. 4 - závislost plochy na koncentraci - druhá oblast.....</i>	52
<i>Obr. 31. Spektra vzorků A-D se spektry vzorků pro kalibrační křivku.....</i>	55
<i>Obr. 32. Různé druhy skel použitých při analýze .....</i>	56

---

<i>Obr. 33. Ramanovo spektrum prázdné lahvičky 100 ml - čiré sklo .....</i>	<i>56</i>
<i>Obr. 34. Grafické výsledky hloubkové analýzy .....</i>	<i>57</i>
<i>Obr. 35. Pohled z kamery zaostřený na plochu zelené lahvičky .....</i>	<i>58</i>
<i>Obr. 36. Srovnání spekter lahviček obsahující vzorek .....</i>	<i>58</i>
<i>Obr. 37. Naměřená Ramanova spektra jednoho vzorku s různou teplotou .....</i>	<i>59</i>
<i>Obr. 38. Naměřená Ramanova spektra vybraných lihovin .....</i>	<i>60</i>
<i>Obr. 39. Ramanovo spektrum Jägermeistera v porovnání se spektrem vzorku č. 5 .....</i>	<i>61</i>
<i>Obr. 40. Ramanova spektra slivovice a vzorků číslo 5 a 6 .....</i>	<i>62</i>
<i>Obr. 41. Detailní pohled na porovnávaná spektra .....</i>	<i>62</i>
<i>Obr. 42. Detailní pohled na porovnávaná spektra .....</i>	<i>63</i>

**SEZNAM TABULEK**

<i>Tab. 1. Koncentrace a objem jednotlivých složek ve vzorcích pro kalibrační křivku.....</i>	40
<i>Tab. 2. Koncentrace a objem jednotlivých složek ve vzorcích pro test kalibrační křivky .....</i>	41
<i>Tab. 3. Nastavení parametrů měření .....</i>	43
<i>Tab. 4. Vlnočty methanolu a odpovídající částicový pohyb .....</i>	44
<i>Tab. 5. Vlnočty ethanolu a odpovídající částicový pohyb .....</i>	45
<i>Tab. 6. Data pro sestavení kalibračních křivek - první měřená oblast .....</i>	48
<i>Tab. 7. Data pro sestavení kalibračních křivek - druhá měřená oblast .....</i>	51
<i>Tab. 8. Rovnice lineární regrese a hodnoty spolehlivosti.....</i>	53
<i>Tab. 9. Naměřená data vzorků pro test kalibrační křivky .....</i>	54
<i>Tab. 10. Vypočtené hodnoty koncentrace .....</i>	54