

Využití Ramanovy spektroskopie v potravinářství

Applications of Raman Spectroscopy in Food Science

Romana Čapáková

Bakalářská práce
2012



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie a mikrobiologie potravin
akademický rok: 2011/2012

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Romana ČAPÁKOVÁ**
Osobní číslo: **T08925**
Studijní program: **B 2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Chemie a technologie potravin**

Téma práce: **Využití Ramanovy spektroskopie v potravinářství.**

Zásady pro vypracování:

1. Charakteristika Ramanovy spektroskopie (RS).
2. Použití RS pro studium základních potravinářských matric.
3. Použití RS pro studium vybraných složek potravin.
4. Aplikace metody RS v praxi.

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1] SMITH, E., DENT, G. *Modern Raman Spectroscopy: A Practical Approach*. Chichester: Wiley, 2005. ISBN 0-471-49794-0.

[2] MOJZEŠ, P., PALACKÝ, J., BAUEROVÁ, V., BEDNÁROVÁ, L. Ramanova mikrospektroskopie a mapování buněk a tkání. *Československý časopis pro fyziku*. 2011, 61 (3-4), 178-184. ISSN 0009-0700.

[3] LI-CHAN, E.C.Y. The applications of Raman spectroscopy in food science. *Trends in Food Science and Technology*. 1996, 7, 361-370.

[4] *Journal of Raman Spectroscopy*. Wiley. ISSN 0377-0486.

Vedoucí bakalářské práce:

Mgr. Martina Bučková, Ph.D.

Ústav technologie a mikrobiologie potravin

Datum zadání bakalářské práce:

1. února 2012

Termín odevzdání bakalářské práce:

25. května 2012

Ve Zlíně dne 10. února 2012



doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan



doc. Ing. František Buňka, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: Čapáková Romana

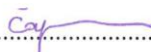
Obor: Chemie a technologie potravin

PROHLÁŠENÍ

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 ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB 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 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ 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 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování 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.

Ve Zlíně 14.5.2012...


.....

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevdělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) *Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.*

(3) *Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.*

²⁾ *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, § 35 odst. 3:*

(3) *Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).*

³⁾ *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, § 60 Školní dílo:*

(1) *Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.*

(2) *Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.*

(3) *Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.*

ABSTRAKT

Tato práce se zaměřuje na využití Ramanovy spektroskopie v potravinářském průmyslu. I když se jedná o poměrně novou metodu, je vypracováno již několik studií s ukázkami jejího praktického využití. Je zde stručně charakterizován samotný princip Ramanova jevu, jeho výhody i nevýhody a také techniky jeho zesílení. Stěžejní část práce je pak zaměřena na seznámení se se studii základních i vedlejších potravinových složek. V rámci srovnání aplikačních možností je stručně shrnuto využití Ramanovy spektroskopie v ostatních vědních disciplínách.

Klíčová slova: Ramanova spektroskopie, Vibrační spektroskopie, Ramanovo spektrum, Identifikace potravinových složek

ABSTRACT

This work is focused on application of Raman spectroscopy in food science. Although this is a rather new method a several study with practical using have been interpreted. First, I describe a principle of Raman effect, advantages or disadvantages and the technology of increase. The main part of this work is direct to introduce basic and minor food components. At the end there are a possibility practical using of Raman spectroscopy in the next sciences.

Keywords: Raman spectroscopy, Vibration, Raman spectrum, Identification of food components

Poděkování,

Na tomto místě chci poděkovat rodině za podporu ve studiu a také mé vedoucí bakalářské práce Mgr. Martině Bučkové Ph.D. za odborné vedení a cenné rady při vypracovávání. Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské/diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

„Radost z uvažování a z chápání je nejkrásnějším darem přírody.“

Albert Einstein, Vědec (1879 – 1955)

OBSAH

ÚVOD.....	10
1 CHARAKTERISTIKA RAMANOVY SPEKTROSKOPIE.....	11
1.1 VÝVOJ METODY.....	11
1.2 POPIS METODY.....	12
1.3 VIBRACE MOLEKUL	13
1.3.1 Dvouatomová molekula	14
1.3.2 Víceatomová molekula.....	14
1.4 RAMANŮV ROZPTYL	14
1.4.1 Rezonanční Ramanův rozptyl (RRS)	16
1.4.2 Povrchem zesílený Ramanův rozptyl (SERS).....	16
1.4.3 Povrchem zesílený rezonanční Ramanův rozptyl SER(R)S.....	17
1.5 RAMANOVÉ SPEKTRUM	17
1.6 VÝHODY A NEVÝHODY RAMANOVY SPEKTROSKOPIE	18
1.7 PŘÍPRAVA A CHARAKTERIZACE VZORKU	20
2 ZÁKLADNÍ POTRAVINOVÉ SLOŽKY.....	21
2.1 BÍLKOVINY	23
2.1.1 Bílkoviny vejce.....	25
2.1.2 Bílkoviny mléka	25
2.2 TUKY.....	28
2.3 SACHARIDY	30
3 DALŠÍ POTRAVINOVÉ SLOŽKY	34
3.1 BARVIVA	34
3.1.1 Karotenoidy	34
3.2 VITAMINY	36
3.3 ETANOL.....	38
4 RAMANOVA SPEKTROSKOPIE V PRAXI	39

4.1	FARMACIE	39
4.2	BIOLOGIE, LÉKAŘSTVÍ	40
4.3	MIKROBIOLOGIE	41
4.4	OBALOVÉ MATERIÁLY	42
4.5	CHEMICKÝ PRŮMYSL	43
4.6	GEMOLOGIE, GEOLOGIE, MINERALOGIE	44
4.7	STROJÍRENSKÝ PRŮMYSL	45
4.8	POLOVODIČE A NANOTECHNOLOGIE	46
4.9	UMĚNÍ	46
4.10	KRIMINALISTIKA, FORÉZNÍ VĚDY	49
ZÁVĚR		50
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY		51
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK		57
SEZNAM OBRÁZKŮ		58
SEZNAM TABULEK		59

ÚVOD

Téma své bakalářské práce jsem si zvolila s ohledem na fakt, že potraviny provází člověka celým životem. Úměrně se zvyšováním životní úrovně obyvatelstva rostou i nároky na kvalitu potravin. Ramanova spektroskopie se jeví pro účely kontroly jakosti jako velmi vhodná a proto chci čtenáře seznámit s jejími aplikačními možnostmi v potravinářském průmyslu. Jedná se o spektrofotometrickou metodu, využívající k analýze látek neelastický rozptyl monochromatického světla, tzv. Ramanův rozptyl. Vznik metody je datován do 30. let 20. století, avšak teprve v posledních desetiletích dochází k jejímu znatelnému rozvoji a využití důsledkem modernizace technologií. Ramanova spektroskopie nachází uplatnění v mnoha vědních oborech. Předními výhodami jsou rychlost analýzy, žádná nebo pouze minimální příprava vzorku, nedestruktivní a bezkontaktní možnost měření.

Protože jsem před vypracováním bakalářské práce nebyla detailněji seznámena s Ramanovou spektroskopií, pokusím se srozumitelným způsobem uvést čtenáře do dané problematiky. Zároveň vysvětlím interpretaci spekter, které sestávají z vrcholů (*peaků*). Každému vrcholu v Ramanově spektru odpovídá určitý vibrační stav nebo typ chemické vazby mezi molekulami. V hlavní části své práce příkladově popíšu použití Ramanovy spektroskopie pro stanovení či studium majoritních a minoritních složek potravin. Závěr práce je věnován několika dalším oborům, kde byla metoda také využita.

Mým cílem je vytvořit přehled aplikačních možností Ramanovy spektroskopie v rozličných vědních oblastech, zejména pak v potravinářském průmyslu.

1 CHARAKTERISTIKA RAMANOVY SPEKTROSKOPIE

1.1 Vývoj metody

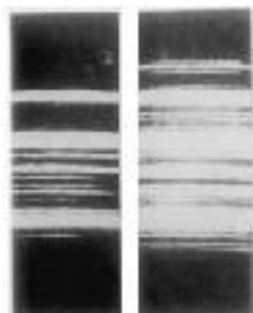
Objev Ramanova jevu je připisován indickému fyzikovi Čandrašékharu Venkata Ramanovi (1888-1970), podle něhož metoda dostala název.



Obr. 1. - C. V. Raman [1]

Některé zdroje tvrdí, že možnost sledování změn polarizovatelnosti molekuly při vibračním přechodu předpověděl již o pět let dříve rakouský vědec A. Smekal, ale jeho práce byla bohužel zapomenuta.

Profesor C. V. Raman ve spolupráci s K. S. Krišnanem roku 1928 teoreticky i experimentálně popsali jev neelastického optického rozptylu, což je základní princip celé metody. V roce 1930 pak obdržel C. V. Raman za svůj objev a celkový přínos fyzice Nobelovu cenu. Ukázka prvních naměřených výsledků je na obrázku 2. Levá část zachycuje situaci, kdy světlo obloukové rtuťové lampy dopadá přes modrý filtr, pravá část obrázku znázorňuje stejné spektrum zachycené přes kapalný benzen. [2]

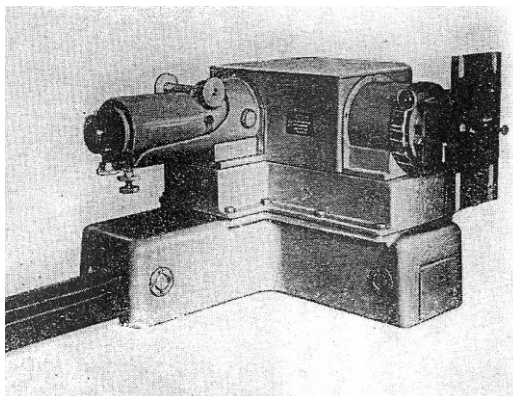


Obr. 2 - První spektra pořízena C. V. Ramanem a K. S. Krišnanem [2]

Později tato metoda upadla v zapomnění a teprve v posledních desetiletích se opět dostává do popředí zájmu díky svým nesporným výhodám při analýze a kontrole nejrůznějších látek. To vše především díky rychlému rozvoji technologií používaných v instrumentální analýze (nové lasery, filtry nebo detektory).

U nás jsou její první zásadnější zmínky datovány do 70. let 20. století, kdy se touto metodou v oblasti anorganické chemie začal na Ústavu organické chemie a biochemie ČSAV detailněji zabývat Bohuslav Strauch. V té době samozřejmě analýza nebyla natolik kompaktní jako nyní. Na úplném začátku výzkumů měl k dispozici rozměrný přístroj, snímky byly pořizovány na speciální fotografické desky a měření mnohdy trvalo i několik desítek hodin. Později začal využívat spektrometry, které pracovaly na základě laserového záření.

Přístrojová technika se ve 21. století stále modernizuje, zlepšují se softwarové programy a technologie. Nezanedbatelná je minimalizace přístrojového vybavení i časových nároků. [3]



Obr. 3 - Tříhranolový skleněný spektrograf ISP 51 (1959) [3]

1.2 Popis metody

Ramanova spektroskopie se řadí mezi významné vibrační metody. Zkoumá neelastický rozptyl fotonů ultrafialového (vlnčet 25 000–40 000 cm^{-1}) a viditelného (vlnčet 14 300–5 000 cm^{-1}) záření, vyvolaného excitací světelným paprskem laseru. [6] Rozdíl mezi energií dopadajícího fotonu a energií rozptýleného fotonu odpovídá vždy některému z vibračních energetických přechodů v molekule. Tento jev lze matematicky popsat následovně:

$$\Delta E = h(\nu_0 - \nu_r), \quad (1)$$

kdy $h\nu_0$ vyjadřuje energii dopadajícího fotonu a $h\nu_r$ energii rozptýleného fotonu.

Energetické přechody jsou zaznamenány pomocí spektrometrů. Tyto přechody se nazývají Ramanova spektra a jsou specifická pro jednotlivé látky. Ke snadnějšímu pochopení metody si lze představit každou látku jako člověka. Není na světě dvou jedinců, kteří by měli totožné otisky prstů a totéž můžeme použít i zde. Není prozatím na světě objevena látka, jež by byla chemicky totožná s jakoukoli jinou. Pásky, nazývané „otisky prstů“ (*fingerprints*), se nachází v oblasti vlnočtu 1500–400 cm^{-1} . [4]

Ramanova metoda je nedestruktivní a poskytuje především rychlou identifikaci materiálů se zaměřením na složení látek, jejich vlastnosti a strukturální změny. Vhodnými analyty je celá řada látek včetně makromolekul (bílkoviny, lipidy, sacharidy), menších molekul (karotenoidní pigmenty nebo syntetická barviva), mikroorganismů nebo obalových materiálů v přímém kontaktu s potravinami. Analýza může být používána i jako nástroj pro kontrolu kvality, detekci falšování, a zároveň jako nástroj pro základní výzkum při objasnění strukturálních nebo konformačních změn, které nastávají při zpracování potravin. [5]

1.3 Vibrace molekul

Fyzikální zákon říká, že svět molekul je neustále v pohybu. Pohyb se děje rotováním elektronů okolo jader, kmitáním jader kolem rovnovážných poloh a přesunem molekul. Rozpoznáváme dva typy základních vibrací. Prvním typem jsou vibrace valenční, kdy dochází k prodlužování a zkracování vzdálenosti mezi atomy. Vazebné osy nebo vazebné úhly se nemění. Druhý typ vibrací se označuje jako deformační. Typická je pro ně změna vazebných úhlů.

K získání požadovaného výsledku je nutno analyzovat všechny normální vibrační módy s dobře definovanými geometrickými charakteristikami (délka vazby, vazebné úhly, apod.). Zkušeným analytikům pak správně přiřazený pás slouží jako jednoznačný poznávací kód strukturního rysu. K identifikaci funkčních skupin (např. $-\text{OH}$, $\text{C}=\text{O}$, $\text{N}-\text{H}$, CH_3 , aj.) slouží absorpční pásy s vrcholy v oblasti vlnočtu 4000–1500 cm^{-1} . Využitím databází a knihoven, ať už komerčních či veřejných, můžeme porovnat námi získaná data se standardy a pojmenovat neznámou zkoumanou látku.

1.3.1 Dvouatomová molekula

Vibrace molekul, projevující se roztahováním a stahováním, mění vliv jader na elektrony a způsobují pohyb jader v molekulách, který je periodický. Interakce mezi molekulami a zářením se projeví vibračním přechodem. Samotnou vibraci molekul si lze představit jako harmonický oscilátor tvořený dvěma body a pružinou mezi nimi.



Pro harmonický oscilátor platí, že možné jsou pouze přechody molekul mezi sousedními vibračními hladinami. Přechod nastane dodáním energie ve formě elektromagnetického záření s energií rovnou rozdílu energetických hladin. Vstřebáním energie vzroste amplituda vibrací, avšak frekvence je beze změny.

1.3.2 Víceatomová molekula

Víceatomová molekula je v podstatě soustava hmotných bodů (atomů) vázaných silami chemických vazeb. Vibrace víceatomových molekul jsou složité, proto můžeme tento kmitavý pohyb popsat součtem jednoduchých harmonických pohybů. Uplatňuje se zde více vibračních režimů, jelikož s vibracemi se mění všechny úhly a vazby v molekule. Musíme rozlišovat, zda se jedná o lineární nebo nelineární molekulu. [6,7]

1.4 Ramanův rozptyl

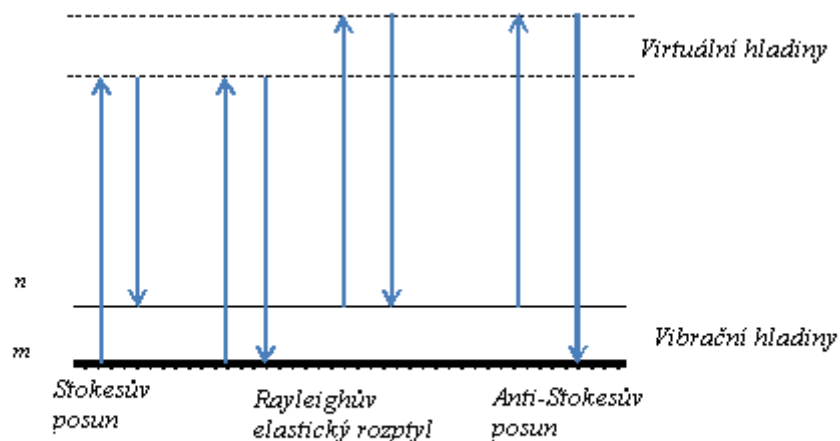
Ramanův rozptyl se popisuje jako neelastický rozptyl světla. Světlo dopadající na vzorek se částečně rozptýlí beze změny frekvence (Rayleighův elastický rozptyl), část se absorbuje a pouze minimální část je rozptýlena neelasticky. V posledním zmiňovaném případě dochází k zářivému dvoufotonovému přechodu mezi dvěma stacionárními vibračními stavy molekuly, jejichž energie jsou E_1 a E_2 . Přechod vyvolaný interakcí molekuly s fotonem dopadajícího záření s frekvencí f_0 je matematicky vyjádřen:

$$f_0 > \frac{|E_2 - E_1|}{h}, \quad (2)$$

kde h je Planckova konstanta, se současným vyzařením fotonu rozptýleného záření. [6]

Při pokojové teplotě se většina molekul nachází v nejnižší energetické vibrační úrovni. Excitací elektronů laserovým paprskem mohou nastat tři situace. Nejčastěji laserový paprsek excituje elektron ze základní hladiny do virtuální hladiny, a při návratu z virtuální hladiny zpět se vyzáří foton se stejnou vlnovou délkou, jakou měl původní foton - tzv. Rayleighův rozptyl. Během elastické srážky elektron mění směr, avšak nepředává energii molekule, tím pádem nenese žádnou analytickou informaci.

Pokud dochází k neelastické srážce fotonu s molekulou, foton interaguje s molekulou. Ta pak vyše foton s menší energií (delší λ), protože část energie byla spotřebována na zvýšení vibrační energie molekuly. Elektron se vrací do vyšší vibrační hladiny, než z které byl předtím vyražen a jde o tzv. Stokesův posun. Méně pravděpodobný je případ, kdy foton převezme vibrační energii od molekuly. Vyslaný foton má pak větší energii (kratší λ). Elektron se původně nenacházel na základní ale na vyšší hladině a vrací se na základní hladinu. Tento jev nazýváme anti-Stokesův posun. Posuny frekvencí u Stokesových a anti-Stokesových fotonů od frekvence použitého laserového zdroje pak nesou analytickou informaci o rozdílech jednotlivých kvantových hladin (nejčastěji vibračních). Pro demonstraci výše zmíněných přechodů fotonů uvádím obrázek 4. [8]



Obr. 4 – Schéma rozptylu světla v Ramanově spektroskopii

Metoda je již dobře zavedena v oblasti fyziky materiálů. V biologických vědách rozvoj omezuje skutečnost, že z $10^6 - 10^8$ fotonů je zhruba jeden rozptýlen neelasticky. Také intenzita Ramanova rozptylu je velmi slabá a vyžaduje citlivý detekční systém, který neregistruje dopadající záření laseru. To vede k rozvoji technik zesilujících signál, ať už se jedná o rezonanční Ramanův rozptyl nebo o povrchem zesílený Ramanův rozptyl, jež jsou využitelné právě v těchto situacích. [6]

1.4.1 Rezonanční Ramanův rozptyl (RRS)

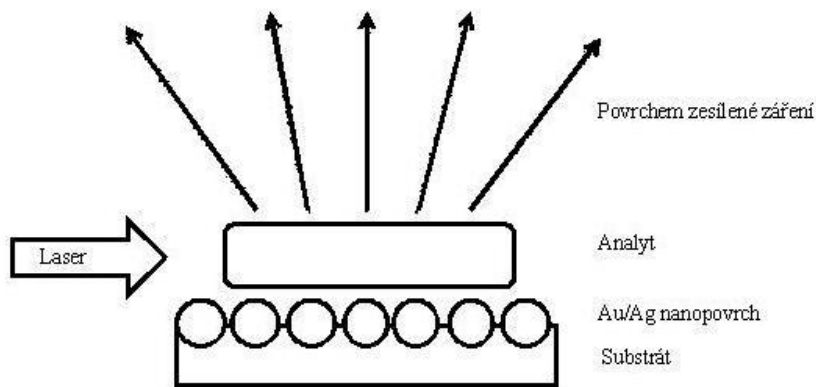
Rezonanční Ramanův rozptyl užívá ke studiu strukturovanějších látek laser s vlnovou délkou, při níž dochází k absorpci záření. Základem rezonančního Ramanova efektu je přiblížení vlnové délky záření k maximu absorpčního pásu vzorku. Tím dochází ke zvýšení intenzity Ramanových čar v některých případech až o tři řády. Běžně dokážeme Ramanovou spektrometrií analyzovat vzorky $>0,1M$, zde hovoříme o $10^{-8}M$. Excitací do absorpčního pásu molekuly však hrozí fotodegradace a rušení výsledného Ramanova signálu fluorescencí.

1.4.2 Povrchem zesílený Ramanův rozptyl (SERS)

O metodu SERS se jedná v případě, že je signál zesílený díky adsorpci vzorku na povrchu stříbra, zlata a mědi. Faktor zesílení je více než 10^4 (lokálně i více než 10^{12}). Slouží k detekci jednotlivých molekul. I když se SERS používá už řadu let, přesný mechanismus této metody není ještě zcela definován. Existují dvě hypotézy:

- 1) Elektromagnetická - zabývá se indukovaným dipólem p , který při Ramanově rozptylu vzniká působením elektromagnetického světelného pole E na molekulu s polarizovatelností ($p=E$). Tento jev je popsán jako zvýšení intenzity elektromagnetického pole adsorbátu na kovovém povrchu.
- 2) Chemická - předpokládá, že v důsledku chemisorpce studované molekuly na povrchu kovu dochází k velkému zvýšení molekulové polarizace adsorbátu.

Samotné zesílení závisí na morfologii povrchu, tzn. "hrubý (nerovný) povrch" – nanostrukturovaný, který mají nanočástice. Příkladem SERS aktivních povrchů je zdrsněná elektroda, kovové koloidy nebo ostrůvkovité filmy. Na intenzitu vyzařovaného signálu má vliv druh kovu, morfologie povrchu a pokrytí adsorbátem.



Obr. 5 – Schéma povrchem zesíleného Ramanova rozptylu

1.4.3 Povrchem zesílený rezonanční Ramanův rozptyl SER(R)S

SER(R)S vzniká spojením dvou výše zmíněných metod. Opět dochází k rezonančnímu efektu (citlivost metody je zvýšena o dalších několik řádů). Koncentrace konečného vzorku může být až 10^{-12} M. U metody lze užít dvou substrátů a to elektrod nebo roztoků nanočástic (koloidy).

Elektrody jsou zhotoveny z ušlechtilých kovů; nejpoužívanějšího stříbra, dále pak zlata, mědi, platiny, rtuti, niklu apod. Před použitím musí být povrch elektrod vyhlazen a následně podroben jednomu nebo několika oxidačně-redukčním cyklům.

Koloidy jsou připravovány chemickou redukcí solí příslušných kovů ve vodném nebo některých v bezvodém prostředí, např. Ag koloid ve vodném prostředí, Ag koloid v prostředí glycerolu, Ag koloid v prostředí ethanolu_B, Ag koloid stabilizovaný polyvinylalkoholem apod. Výhody koloidu spočívají zejména ve snadné přípravě a pohodlném monitorování stupně agregace koloidu pomocí spektroskopie. Nevýhody koloidů oproti elektrodám jsou v nemožnosti přímé regulace potenciálu a v tendenci koloidu k agregaci. [9,10]

1.5 Ramanovo spektrum

Ramanova spektra jsou získávána vynesáním intenzity rozptýleného světla v závislosti na Ramanově posunu, $\Delta\nu$ v cm^{-1} . Každé ramanovsky aktivní vibraci molekuly přísluší pás ve spektru Ramanova rozptylu. Často spektra slouží jako doplňková metoda k rozšířenějším analytickým metodám, především k infračervené spektroskopii. Poskytují informace o struktuře a vlastnostech molekul z jejich vibračních vlastností.

Každý druh molekuly má vlastní, jedinečný, set vibračních pohybů a Ramanovo spektrum konkrétní molekuly je složeno z řady vrcholů, které odpovídají charakteristickým vibračním frekvencím. Ať už se jedná o směs různých chemických složek nebo směsi léčivých látek, vždy dostaneme onen „otisk prstu“ umožňující určit povahu jednotlivých součástí substance. V posledních letech, kdy dochází k pozvolnému přesunu metody také do běžné praxe, vznikají kombinované tabulky charakteristických vibračních frekvencí funkčních skupin.

Ramanova spektra, jak bylo nastíněno v úvodu této kapitoly, v podstatě doplňují infračervenou spektroskopii. Analýza infračervenou spektroskopii je určena zejména pro identifikaci a strukturní charakterizaci organických sloučenin a současně pro stanovení anorganických látek. Měří se pohlcení infračerveného záření o různé vlnové délce analyzovaným materiálem. Jedná se oblast elektromagnetického záření v rozsahu vlnočtů $12800 - 10 \text{ cm}^{-1}$. Oblast infračerveného záření bývá rozdělena na blízkou ($13000 - 4000 \text{ cm}^{-1}$), střední ($4000 - 200 \text{ cm}^{-1}$) a vzdálenou ($200 - 10 \text{ cm}^{-1}$). Nejužívanější je střední oblast. Ramanova spektroskopie popisuje vibrace molekul v oblasti ultrafialového a viditelného záření, viz kapitola 1.2.

Pro danou funkční skupinu tedy získáváme společný údaj o poloze pásu (vlnočtu, cm^{-1}), odděleně pak údaje o intenzitě pásu, kterými se tyto dvě metody od sebe liší. U infračervených spekter jsou intenzivní pásy pro polární vibrace s výraznou změnou dipólového momentu (vibrace polárních skupin, např. $-\text{OH}$, $-\text{C}=\text{O}$, $-\text{NO}_2$) a intenzita je úměrná druhé mocnině změny dipólového momentu. Intenzity pásů v Ramanových spektrech souvisejí se změnou polarizovatelnosti a jsou úměrné druhé mocnině změny polarizovatelnosti během vibračního pohybu. Intenzivnější pásy mají nepolární symetrické vibrace a vibrace ve fázi než vibrace antisymetrické a v protifázi. Obzvláště intenzivní jsou pásy vícenásobných symetrických vazeb (např. $-\text{C}\equiv\text{C}-$, $-\text{C}=\text{C}-$, $-\text{N}=\text{N}-$). Také anorganické látky, např. soli mají vysokou citlivost vůči Ramanovu signálu. Soubor naměřených vrcholů, které korespondují s charakteristickými energiemi vibrací látky, poskytuje tzv. „otisk prstu“. Tato část spektra slouží k identifikaci látky pomocí databáze nebo k porovnání s referenčním spektrem získaným jinou analýzou. [8,10,11]

1.6 Výhody a nevýhody Ramanovy spektroskopie

Ramanova spektroskopie jako nedestruktivní a nekontaktní metoda umožňuje studovat široké spektrum látek. Lze analyzovat vzorky různého skupenství a povahy,

organické i anorganické molekuly, roztoky, pevné látky, plyny, gely, povrchové filmy, vlákna, prášky, krystaly, buňky či tkáně. Tyto vzorky nepotřebují žádnou nebo pouze minimální přípravu. Voda má v oblasti vlnočtu $500 - 2000\text{cm}^{-1}$ slabý Ramanův signál a je tedy vhodným rozpouštědlem zatímco v IČ spektroskopii má voda negativní vliv. Je tedy možno studovat vodné roztoky analytů, aniž by docházelo ke zkreslení výsledků. Ideální je jakákoli velikost molekuly jelikož schopnost laserového svazku fokusovat vzorek umožňuje analyzovat rozměrné části i minimální množství vzorku. Pro roztoky je typický objem v řádu jednotek mikrolitrů. Vzorek je možné měřit přes obalové materiály (např. sklo nebo polymer) a je tedy k dispozici i pro další experimentální studie.

Zásadní výhodou je časová nenáročnost. Měření se pohybuje v řádu několika sekund a přenos signálu optickými vlákny umožňuje vzdálené měření ve výrobních či skladovacích prostorách. Naměřené informace tvoří rozsáhlé databáze a spekter. U prozkoumaných molekul jsou k dispozici jednoznačně přiřazené pásy Ramanových i infračervených spekter, popis vibrací a také nalezená korelace mezi strukturou a spektrálními rysy. Tato korelace je využitelná pro nově zkoumané systémy. K tomu se pojí možnost, že u některých stanovení nebude třeba používat standardy při každém měření, použijí se pouze srovnávací spektra z databází. (viz. kapitola 3.2). Konečné výsledky poskytují vysokou specifičnost a detailní informace o chemickém složení (tzv. „otisk“ látky). [12]

Nejčastěji se vyskytujícími problémy u Ramanovy spektroskopie jsou fluorescence a zahřívání. Fluorescence se vyznačuje specifickou absorpcí světla, bývá přítomna u nečistých vzorků a může být odstraněna zahřátím vzorku na několik minut. U barevných vzorků dochází použitím tohoto způsobu k vratné degradaci vzorku. Alternativní cestou, jak zamezit zahřívání vzorku je použít média, např. KCl nebo KBr. V takovém případě je vhodné znát charakteristické rysy samotného analytu a vedlejší látky. V případě kontaminace se objevuje několik chyb. Široké spektrum pro nečisté látky nebo mnohem širší pás jedné sloučeniny vůči druhé a proto je samozřejmě nutno intenzity sloučenin zkontrolovat před interpretací Ramanových spekter.

Zahřívání vzorku v důsledku velké intenzity dopadajícího excitačního záření je řešeno rotací nebo cirkulací vzorku a chlazením. Ramanův jev je poměrně slabý, a proto vyžaduje analýza poměrně vysokou koncentraci vzorku – pro nerezonanční Ramanovu spektroskopii 0,01-0,1M. U některých biologických či špatně rozpustných vzorků může

tato skutečnost činit potíže. Nízká intenzita Ramanova rozptylu (vzhledem k fluorescenci) a vysoká koncentrace vzorku klade značné nároky na čistotu a optickou homogenitu vzorku. V rámci strojírenského využití je třeba zmínit, že mnoho kovů a slitin nejeví Ramanovskou aktivitu.

1.7 Příprava a charakterizace vzorku

Měření Ramanovou metodou je stále populárnější díky své nenáročnosti, co se týče přípravy vzorku. Tato jednoduchost je s oblibou demonstrována měřením Ramanova spektra gumové kachničky pro děti. Téměř okamžitě bylo vyhodnoceno Ramanovo spektrum pro materiál polyethylen. [8]

Vzhledem k tomu, že Ramanova spektroskopie je technika založena na jednom paprsku, jakákoliv změna vzorku či instrumentace musí být zohledněna v kvantitativní analýze. Potenciální zdroje instrumentálních a vzorkových změn jsou laser, detektor stability, depolarizační efekty nebo redukce šumu. Vhodnějšími vzorky pro kvantitativní analýzu jsou jednoznačně tekutiny. Jsou více homogenní a nevznikají zde potíže, spojené s proměnlivou velikostí částic a tvarů. Relativní koncentrace složek ve směsi se hodnotí metodami poměru pásů a je doporučeno měřit standard referenční směsi v rámci každé analýzy. Tímto způsobem dostáváme snadno informace o stabilitě systému. Vzorkem může být téměř jakákoliv anorganická i organická látka. Mohou to být pevné látky, tekutiny, polymery nebo páry. V průmyslu se nejčastěji vyskytují práškové nebo tekuté vzorky a je možno je měřit přímo při pokojové teplotě. Pro tuhé materiály bývá typické měření ve formě neředěného prášku nebo polymorfního filmu. Pro tekuté materiály se využívají skleněné nebo polymorfní nádoby, květy, vialky apod. [8,12]

2 ZÁKLADNÍ POTRAVINOVÉ SLOŽKY

Potenciál pro analytické aplikace Ramanovy spektroskopie v potravinářství je obrovský. Přehled vytvořený v roce 1996 v časopisu *Analytical Chemistry* ukázal, že v období dvou let, od konce roku 1991 do konce roku 1993, bylo vydáno přes 6000 publikací, které se zabývaly všemi aspekty teorie a aplikace Ramanovy spektroskopie. Před samotným výběrem Ramanovy techniky pro určitou analýzu je vhodné provést srovnání s dalšími analytickými metodami, tzn. zvážit omezení založené na koncentraci cílového analytu, náročnost na provedení, optické vlastnosti sledovaného analytu a fyzický charakter okolní matrice.

Příklady využití Ramanovy spektroskopie při studiu základních složek potravin v roztoku, v pevné fázi a zakalených nebo neprůhledných materiálech, stejně jako její potenciál při zkoumání potravinových systémů *in situ* ukazuje tabulka 1. Některé ze studií a jejich výsledky jsou podrobněji uvedeny v dalších kapitolách. [5]

Tabulka 1: Příklady využití Ramanovy spektroskopie v potravinách [5]

Analyt	Aplikace
Proteiny	struktura lysozomu v roztoku, neprůhledném koagulátu a gelu struktura α -laktalbuminu a β -laktoglobulinu v roztoku a transparentních gelech struktura avidinu v krystalické a tekuté formě interakce kontraktálních proteinů a vnitřní pochody ve svalových vláknech během kontrakce struktura fosvitinu vaječného žloutku v roztoku a pevném stavu studium sekundární struktury devíti proteinů mléka a jiných potravin změny sekundární struktury kaseinu při zmrazování sýru konformační změny myosinu způsobené anorganickými solemi přirozené interakce proteinů v roztocích, gelech a sraženinách ve směsích proteinů
Lipidy	cis a trans izomery, stupně nasycení olejů a tuků
Lipidy/proteiny	detekce hydrofobních interakcí mezi lipidy a proteiny
Sacharidy	struktura α - a β -anomerů glukózy studium molekul škrobu během technologických úprav struktura β -cyklodextrinu jako hostitelské molekuly
Sacharidy/voda	interakce mezi sacharidy a rozpouštědlem a účast na vnímání sladké chuti
Potr. barviva	identifikace červených barviv
Pigmenty	anthokyaniny a anthokyanidiny v roztoku astaxanthin a kanthaxanthin ve svalu lososa a modelových systémech
Etanol aj.	sledování produktů fermentace cukru

Vhodnost použití Ramanovy spektroskopie v potravinářství názorně ukazuje studie z roku 2005, kdy bylo provedeno experimentální měření vzorků cereálních výrobků a jejich rozdělení na základě obsahu nejvýznamnějších nutričních složek, tj. celkového obsahu vlákniny, tuků, bílkovin a cukrů. K získání stěžejních informací byla použita principiální analýza složek (PAS) a již dříve vytvořený kalibrační model pro kvantitativní analýzy nutričních složek. Naměřené výsledky byly seřazeny vzestupně od nejnižšího po nejvyšší obsah do variabilních spekter.

Použitím PAS bylo zjištěno, že všechny složky v obilninách se vzájemně ovlivňují. Ramanovy posuny odpovídaly klasifikaci každé složky, a to $1600-1630\text{cm}^{-1}$ pro celkový obsah vlákniny, 1440 a 2853cm^{-1} pro tuky, 2910 a 1660cm^{-1} pro bílkoviny a 401 a 848cm^{-1} pro cukry. Vyhodnocení jednotlivých oblastí pro každou složku mělo 85-95% úspěšnost, což jsou lepší výsledky než původní klasifikace užívané pro tyto účely. Tato a mnoho dalších předností činí tuto metodu velmi vhodnou pro rutinní analýzy v potravinářském průmyslu. [13]

2.1 Bílkoviny

Základní stavební jednotkou každé bílkoviny je aminokyselina. Nejčastěji se v potravinách vyskytuje 20 kódovaných aminokyselin. Všechny kromě glycinu jsou opticky aktivní. Hlavní řetězec tvoří aminoskupina $-NH_2$ a karboxylová skupina $-COOH$. Postranní řetězec může obsahovat další aminoskupinu, karboxylovou kyselinu, alkoholovou skupinu $-OH$, $-SH$ apod. Proteosyntézou více než 100 aminokyselin vznikají polymery vázané mezi sebou hlavně peptidovou vazbou. Dále se v makromolekule vyskytují disulfidové, esterové a amidové vazby, které jsou schopny navázat anorganické (voda, anorganické ionty) i organické sloučeniny (lipidy, sacharidy, nukleové kyseliny).

Bílkoviny jsou základní chemickou složkou živých buněk a vykonávají strukturní, katalytické (enzymy, hormony), transportní (hemoglobin), pohybové (svalové proteiny – aktin a myosin), obranné (imunoglobuliny), zásobní (ferritin), senzorické (rodopsin), regulační (hormony) a výživové (esenciální aminokyseliny) funkce uvnitř buňky.

Vlivem tepla, kyselin, záření, solí apod. nastává denaturace bílkovin. Při denaturaci dochází k rozrušení prostorového uspořádání, zániku sekundárních a vyšších struktur a neporušená zůstává pouze primární struktura. Výsledkem denaturace je ztráta biologických funkcí dané bílkoviny. Klasickým příkladem procesu denaturace je změna kolagenu na želatinu. Technologické úpravy dále způsobují pokles odolnosti bílkovin vůči proteolytickým enzymům, vzniku dipeptidů, ztrátě aktivity některých enzymů či degradaci některých aminokyselin (např. sirné aminokyseliny, lysin) vlivem skladování a zpracování za vyšších teplot.[14]

Bílkoviny patří mezi biomolekuly, které jsou metodou Ramanovy spektroskopie studovány nejčastěji. Informace poskytuje jak chemické složení vedlejších řetězců, tak konformace základního polypeptidového řetězce. V tabulce 2 je uveden přehled vlnočtů charakteristických pro některé typické vazebné vibrace, jež jsou užitečné při výkladu struktury proteinů. [5]

Tabulka 2: Charakteristické Ramanovy vibrace užitečné pro výklad struktury bílkovin [5]

zdroj	vlnočet ($\Delta \text{ cm}^{-1}$)	Vazba	získané strukturní informace
Cystin, cystein, methionin	510	S-S	přítomnost <i>gauche-gauche-gauche</i> konformaci, rozšiřování či změny pásů mohou indikovat heterogenitu cystinových zbytků
	525	S-S	<i>gauche-gauche-trans</i> konformace
	545	S-S	<i>trans-gauche-trans</i> konformace
	630-670	C-S	<i>gauche</i> konformace
	700-745	C-S	trans konformace
	2550- 2580	S-H	přítomnost thiolových nebo cysteinových zbytků
	760,880,		vrchol intenzivního pásu ukazuje skryté zbytky
Tryptofan	1360	indolový kruh	zbytky, citlivé na polaritu prostředí vyhledávání ionizačních stavů, metalproteinových struktur, přenos protonu do deuteratizovaného roztoku
Histidin Kyselina asparagová a glutamová	1409	N-deuteroimidazol	
Alifatické zbytky	1400- 1430	C=O z COO ⁻	ionizované karboxylové skupiny
	1700- 1750	C=O z COOH nebo COOR	nedisociované karboxyly, komplexy esterů nebo kovů
	1450, 1456	C-H	mikroprostředí, polarita
Amid I	2800- 3000	C-H	mikroprostředí, polarita
	1655±5	C=O, N-H	α -helix
	1670±3 1665±3	C=O, N-H C=O, N-H	anti-paralelní β -list neuspořádané struktury (rozpuštěné) neuspořádané struktury (bez vodíkových vazeb)
Amid III	1685	C=O, N-H	α -helix
	>1275	N-H, C-N	
	1235±5 (ostrý)	N-H, C-N	anti-paralelní β -list
	1245±4 (široký)	N-H, C-N	neuspořádané struktury neuspořádané struktury (bez vodíkových vazeb)
	1235	N-H, C-N	

2.1.1 Bílkoviny vejce

Lysozym obsažený v bílku slepičího vejce je termostabilní bílkovina s enzymatickými vlastnostmi a antibakteriálním účinkem. Tepelná inaktivace lysozymu závisí nejen na teplotě, ale i na pH. Je stálý zejména při kyselém pH. Zahříváním při teplotě 62,5°C a neutrálním pH se lysozym inaktivuje do 10 minut. Inaktivace probíhá i ve směsi bílek-žloutek. Z toho důvodu dochází u vaječné směsi k rychlejšímu mikrobiálnímu rozkladu než u samotného bílku. Dlouhodobým skladováním vajec lysozym ztrácí své antibakteriální vlastnosti. Silný pás v oblasti 507 cm^{-1} a slabý pás v blízkosti hodnoty 525 cm^{-1} ukazuje, že tři ze čtyř disulfidických vazeb v tomto proteinu se nacházely v konformaci s nejnižší potenciální energií (konformace *gauche*), takže jsou všechny konformace *gauche* a čtvrtá vazba v konformaci *gauche-gauche-trans*. Při zahřívání bílkoviny došlo současně s koagulací bílkoviny a vznikem gelu ke změně poměru konformací ze 3:1 na 1:1, což odpovídá změně konformace jedné disulfidické vazby.

Aromatické aminokyseliny vykazují několik charakteristických pásů, které mohou být vyhodnocovány při sledování vlivu polaritativního prostředí, případně sledování vzniku vodíkových můstků. U avidinu byl pozorován neobvykle vysoký poměr intenzit tyrosinových zbytků, což bylo přisuzováno vodíkovým interakcím.

Fosvitin je bílkovina vaječného žloutku. Charakteristický pás kladně nabitých iontů v oblasti 1406 cm^{-1} ukazuje rozsáhlé párové interakce s částí funkční skupiny molekuly proteinu fosfoserinu. [5]

2.1.2 Bílkoviny mléka

Mléko je nutričně významná potravina. Obsahuje látky, potřebné pro správný vývoj člověka a konzumuje se tedy po celém světě. Podobně sušené mléko, které se vyrábí pro dobrou údržnost, transport a skladování, je významná komodita pro výživu a světovou ekonomiku. Sušené mléko využíváme především v období, kdy je čerstvé mléko nedostatečně produkováno.

Kontrola pravosti sušeného mléka používaného pro přípravu kolektivního stravování je důležitá z hlediska nutričního, kdy může dojít k poškození konzumentů. Nejohroženějšími skupinami jsou kojenci, školáci, kojící ženy, zotavující se lidé nebo starší populace. Příčinou jsou soutěže mezi výrobci hnané různými nelegálními odměnami. Pomocí příměsí mohou výrobci dosáhnout nižší ceny výrobku, čímž dojde k nerovnováze legálního obchodu.

Pro představu uvádím příklad z Brazílské studie, kde často přidávají příměs syrovátky, meziproduct výroby sýrů, obsahující 70% laktózy. Obvykle příměsí tvoří 20-25% celkového obsahu a spotřebitel nezaznamená senzorické změny. Tady ale hovoříme o příměsích v hodnotách i 60% celkového obsahu.

Současné analytické metody se zaměřují na zkoumání makromolekul kaseinu, charakteristické látky syrovátky. Analýzy jsou zdlouhavé a finančně náročné. Moderní doba vyžaduje v rámci možností levné a rychlé kvalitativní metody schopné získávat výsledky z běžně dostupných potravinářských výrobků. Z toho důvodu se v potravinářství začíná rozvíjet FT- Ramanova spektroskopie schopná rychle, bez nutnosti přípravy vzorků stanovovat jednu i více složek najednou. Analýzy neovlivňuje ani přítomnost vodného prostředí.

Analýza byla provedena pro 32 komerčních vzorků čistého, odtučněného, odstředěného a modifikovaného sušeného mléka v rámci Jižní Ameriky. Všechny testované vzorky byly dle výrobce bez fyzických nebo chemických zásahů.

Práce ukazuje potenciál FT-Ramannovy spektroskopie pro rychlé a snadné analýzy sušeného mléka a poskytování stejně uspokojivých výsledků jako u konvenčních metod. Před samotným zařazením „do terénu“ je ještě nutné posílit základní modely. Ramanova spektra komerčních a smíšených sušených mléčných vzorků byly rozlišeny pečlivým spektroskopickým výkladem, přítomnosti nejméně 10% přimíchaného syrovátkového prášku způsobilo změny vibračních pásů Ramanových spekter v oblasti (2978 a 2888 cm^{-1}) v oblasti pásů, charakteristických pro syrovátku (1120 – 850 cm^{-1}). Výsledky potvrzují výhodnost Ramanovy spektroskopie v kombinaci s chemometrickými metodami. Nejenom, že poskytuje rozdíly mezi vzorky sušeného mléka, navíc poskytuje identifikační spektra různých typů sušeného mléka. Pásky 2885, 1778 a 1303 cm^{-1} značí

přítomnost tuků v čistém a odtučněném sušeném mléce a mohlo by se užívat pro účely potvrzení přítomnosti resp. nepřítomnosti těchto látek.[15]

Kasein je bílkovinný základ mnoha mléčných výrobků. Obsahuje relativně vysoký podíl prolinu a hydrofobních aminokyselin a nemá stabilizovanou strukturu disulfidovými můstky. Při výrobě sýrů se nejčastěji využívá proces sladkého srážení. Srážení probíhá enzymaticky, kdy se kasein štěpí na specifickém místě. Produktem je sraženina a syrovátka. Kasein je termostabilní, což znamená, že zvýšením teploty se kasein nesráží (proto lze mléko vařit, aniž by došlo k jeho sražení). U výroby sýrů se přidávají ionty vápníku, aby nastal požadovaný efekt. Zásadní informací pro výzkum je fakt, že má proměnlivou sekundární a terciární strukturu. Byla provedena studie, zaměřená na chování kaseinu v ovčím sýru při změnách teploty. Části spektra, odpovídající změnám sekundární struktury kaseinu, byly nalezeny oblasti 1720-1550 cm^{-1} . K výzkumu byly použity vzorky kaseinu z mléka, kontrolovaných sýrů, zmrazených a okamžitě poté tavených sýrů a sýrů zmrazených, skladovaných v tomto stavu a později tavených a dozrálých.

Zmrazování tvarohu a čerstvých sýrů je sledováno hlavně ve výrobnách sýrů z ovčího nebo kozího mléka k zajištění regulace stupně zralosti sýrových výrobků a k překonání sezónních výkyvů v produkci. Také může sloužit k vyvarování se přežrání tvrdých sýrů, např. Camembertu, Ementálu a jiných výrobků z kravského mléka.

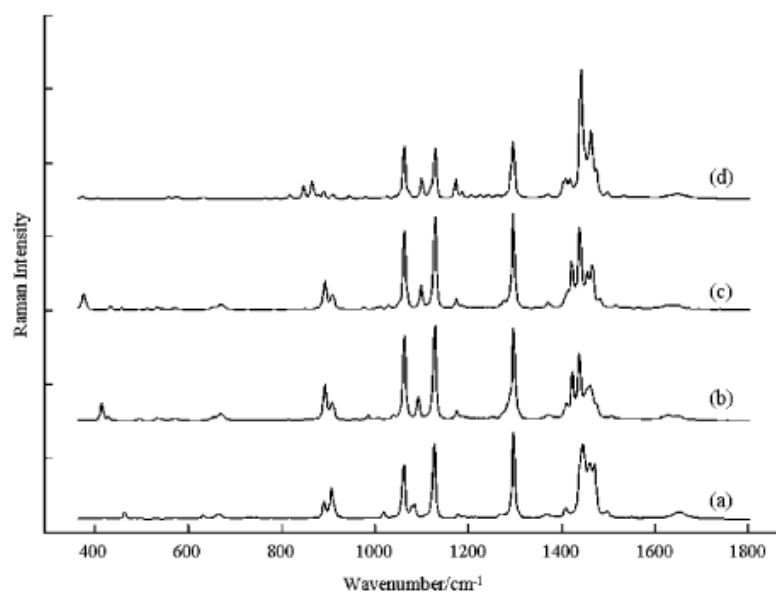
Jedním z nepříznivých efektů během zmrazování je změna textury sýrů. Vznik ledových krystalků má dopad na spotřebitele a snížení kvality. Existují předpoklady, že tyto úpravy textury způsobuje změna struktury proteinů, jako je porušení vodíkových vazeb v polypeptidickém řetězci či změny ve schopnosti vázat vodu. Takové změny mají vliv na proteolýzu v předem zmrazených sýrech. Možnost jak tomuto efektu zamezit by mohla být ve změně struktury.

Kontrolou vlnočtu a intenzit charakteristických pásů jsou získávány informace o sekundární struktuře bílkovin, takže strukturální změny přináší informace o změně vnitřního prostředí biomolekul. Výsledkem analýzy byl zvýšený výskyt sekundární struktury β -skládáního listu a neuspořádaných struktur během zrání sýrů. U sýrů zmrazených dříve byl růst okamžitě po tavení. Na konci zrání byly vidět změny ve spektrech v β -ohybu. Rozdíly neuspořádaných struktur mezi kontrolovanými a

zmraženými sýry byly nižší. Proporce neuspořádaných a otáčivých struktur byl zdánlivě vyšší v sýrech mražených pomalu než v sýry mražených rychle tekutým dusíkem. Celkově neuspořádané struktury extrémně vzrostly především na konci procesu zrání. Po devadesátidenním procesu zrání rozdíly v podílu neuspořádaných struktur mezi zmraženou a kontrolovanou sérií byly nižší než mezi dvěma sériemi zmražených sýrů. Při pořízení hodnot došlo k vyššímu poškození mikrostruktur a také bylo poukázáno na vyšší proteolýzu, než prezentovaly záznamy u pomalého zmrazování sýrů. [17]

2.2 Tuky

Tuky jsou estery vyšších karboxylových kyselin s trojmocným alkoholem (glycerolem). Zpravidla dochází k esterifikaci všech tří hydroxyskupin glycerolu, proto jde o triacylglyceroly. Triacylglyceroly mohou obsahovat tři shodné acylové zbytky, nebo může být každá hydroxyskupina esterifikována rozdílnými kyselinami. Přírodní tuky jsou tvořeny hlavně třemi mastnými kyselinami, a to kyselinou olejovou, linolovou a palmitovou. Dalšími poměrně častými kyselinami jsou kyselina stearová, arachová a myristová, jejichž spektra demonstruje obrázek 6, a různé trans mastné kyseliny. Trans mastné kyseliny se podílejí na zvýšení hladiny cholesterolu v krvi a mají negativní vliv na náš srdečně-cévní systém. Vznikaly při starších technologických postupech výroby tuků hydrogenací (také známé pod názvem ztužování). [18]



Obr. 6 – Ramanova spektra nasycených mastných kyselin (a) kys. laurová, (b) kys. myristová, (c) kys. palmitová, (d) kys. stearová [17]

Běžnou reakcí nenasycených mastných kyselin, přítomných v olejích, je oxidace. Oxidací vícenásobně nenasycených mastných kyselin a jejich následnou polymerací dochází ke vzniku tvrdého filmu. Tento jev se nazývá vysychání olejů. Dvojně vazby nenasycených mastných kyselin mohou být také hydrogenovány, čímž dochází ke vzniku polotuhých a tuhých tuků. Tento proces se nazývá ztužování.

Ve farmacii se tuky využívají zejména jako základ mastí, jelikož svým hydrofobním charakterem podporují vstřebávání některých látek. V technickém odvětví slouží k výrobě barviv, laků a mýdel. Přesto jsou tuky především potravinami. Nenasycené mastné kyseliny, zejména kyselina linolová a linolenová, jsou samy o sobě nepostradatelnou součástí potravy. Patří mezi tzv. esenciální mastné kyseliny. Člověk není schopen je sám syntetizovat a přijímá je potravou. Tuky často obsahují některé příměsi, jako jsou steroly, lecitiny, vitamíny rozpustné v tucích a jiné látky.

Podle skupenství rozlišujeme pevné tuky, u nichž převažují zejména nasycené mastné kyseliny, a oleje, jejichž skupenství je kapalné a které obsahují větší množství nenasycených mastných kyselin. Další možností je dělení na tuky rostlinné a tuky živočišné. Zatímco oleje jsou 100% tuky, u rostlinných tuků - margarínů lze vybírat ze široké škály výrobků, které obsahují již od 20 % tuku.[14]

Velká část běžně prodávaných olejů označovaných jako extra panenské v sobě obsahují příměsi levnějších, chemicky podobných, jedlých olejů. Rozdíl oproti ostatním, běžně dostupným rostlinným olejům, je především ve výrobě. Olej se vyrábí za studena lisováním nebo odstředováním, díky čemuž i po zpracování obsahuje nutričně významné a zdraví prospěšné nenasycené mastné kyseliny, zejména kys. olejovou, linolovou nebo palmitovou. To se samozřejmě odráží na ceně. Stejně množství extra panenského oleje obchodní řetězce poskytují za čtyřnásobnou cenu nežli klasický rostlinný olej. Proto může docházet, a vskutku dochází, k mísení s levnějšími jedlými oleji, přičemž etiketa stále tvrdí, že se jedná o olej nejvyšší kvality. Pro ochranu zákazníka se olej kontroluje, avšak současné metody prováděné v laboratořích jsou zdlouhavé, finančně náročné, využívající rozpouštědla a jiné látky škodlivé pro životní prostředí.

K účelu detekce přítomnosti kukuřičného, slunečnicového a sojového oleje v olivovém oleji byla použita Ramanova spektra v oblasti $1000-1800\text{ cm}^{-1}$. Tyto oleje jsou téměř totožné s olivovým, ale olivový olej obsahuje nižší množství polynenasycených mastných kyselin. Pro kvantitativní analýzu byla využita základní intenzita Ramanova spektra s vibračními pásy standardizovanými v oblasti 1441 cm^{-1} (CH_2) a ESM (externí standardizační metoda). Získané výsledky byly ještě srovnány s další nezávislou metodou. Položením obsažených příměsí extra panenského olivového oleje vůči jeho intenzivnímu pásu 1265 cm^{-1} v Ramanově spektru byla vytvořena kalibrační křivka. Předpokládaná přesnost ukazuje že ESM založená na RS je slibnou technikou pro ověřování extra panenských olejů. Metoda zkoumající a zaznamenávající Ramanova spektra je tedy výhodná především pro svou jednoduchost, žádnou náročnost na přípravu vzorku, rychlosti a hlavně možnosti kontroly v provozu. Společně s klasickými metodami se tedy jeví jako vhodná pro již zmíněné analýzy.

Studie poukázala na fakt, že měření založeno na Ramanových spektrech má budoucnost v průmyslu zpracovávající oleje a dokáže detekovat nežádoucí příměsi třech testovaných jedlých olejů již od 2% celkového obsahu avšak je ještě otázkou času, než bude plně využit potenciál Ramanových spekter kvůli náročnosti na systémy a databáze. Ramanovou metodou byly také studovány interakce mezi lipidy a proteiny nebo lipidy a vodou, kde lze využít právě možnosti použití pro opaleskující nebo zakalené vzorky. [19]

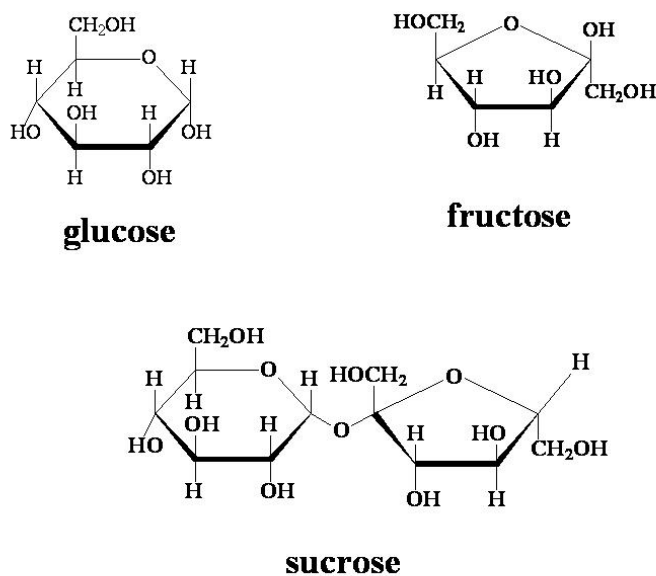
2.3 Sacharidy

Sacharidy jsou organické sloučeniny, které se řadí do skupiny polyhydroxyderivátů karbonylových sloučenin (aldehydů nebo ketonů). Část sacharidů tvoří významné přírodní látky, jiné jsou vyráběny synteticky. Charakteristickým znakem je sladká chuť o různé intenzitě. Sacharidy rozpustné ve vodě označujeme jako cukry (mono- a oligosacharidy). Polysacharidy většinou nezpůsobují chuťové vjemy a jsou buď omezeně rozpustné ve vodě (škrob, agar) či zcela nerozpustné (celulóza a jiné neškrobové polysacharidy z vlákniny).

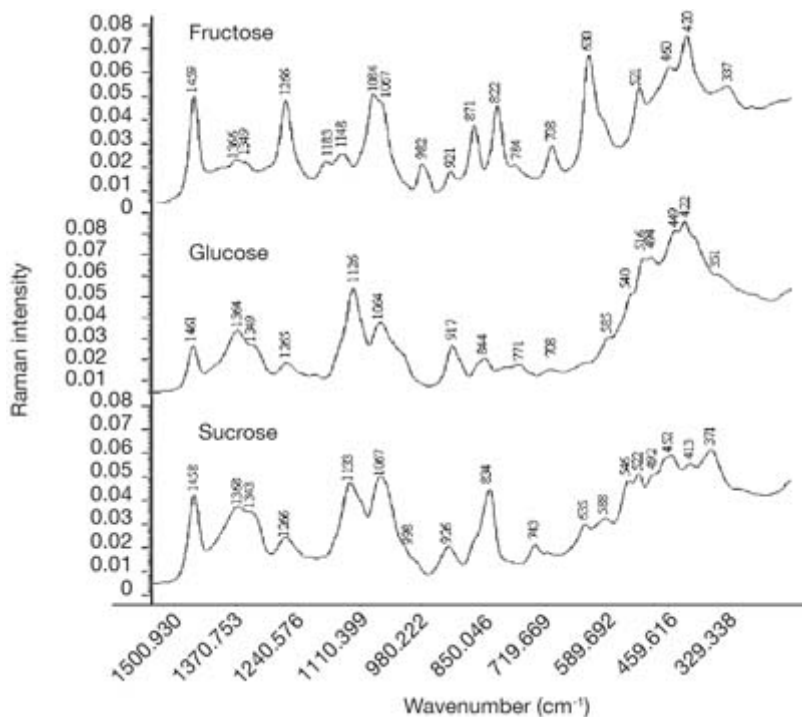
Nejvýznamnějším potravinářským sacharidem je sacharóza. Jedná se o disacharid složený z jedné molekuly glukózy a jedné molekuly fruktózy – obrázek 7. V čistém stavu je sacharóza bílá krystalická látka sladké chuti. Používá se především jako

sladidlo ale může být také konzervantem, protože její vysoká koncentrace inhibuje mikroorganismy. Poměrně častá je kvasná výroba etanolu, výroba pekařského droždí, fermentační způsob výroby kyseliny citrónové a jiné. [14]

Pro detekci těchto sacharidů v potravinách (např. medu) jsou zaznamenány charakteristické Ramanova spektra, tzv. „otisky“ látek (obrázek 8).[44]



Obr. 7 – Sacharóza [20]



Obr. 8 – Ramanova spektra pro fruktózu, glukózu a sacharózu [44]

Ve srovnání s ostatními biologickými makromolekulami, např. proteiny a nukleovými kyselinami, o sacharidech bylo zveřejněno poměrně málo publikací v souvislosti s Ramanovou spektroskopií.

Průmyslové uplatnění Ramanových metod laserového optického vlákna bylo popsáno pro selektivní analýzu monosacharidů (glukóza, fruktóza a sacharóza) v melounové dužině. FT-Ramanova spektra ukazují jasné rozdíly mezi úzce související krystalickými strukturami D-glukózy, D-galaktózy a D-fruktózy, nebo mezi α a β izomery. Strukturální složení di-, oligo- a polysacharidů lze také objasnit z charakteristických pásů Ramanova spektra. Spektrum sacharózy vykazuje pásy charakteristické pro anomery obou monosacharidových součástí: α -glukózy (847 cm^{-1}) a β -fruktózy (868 cm^{-1}). Sladový cukr projevil pásy charakteristické pro α -glukózu (847 cm^{-1}) a β -glukózu (898 cm^{-1}), ve spektru celobiózy lze nalézt pás pouze v oblasti 885 cm^{-1} , charakterizující β -anomer.

Charakteristické pásy přidělené vibračním pohybům sacharidů je možno využít ke zkoumání distribuce těchto složek v potravinách. Projev větší intenzity pásů ve středu mrkve, které jsou připisovány sacharidům v oblasti 1462 cm^{-1} , 1126 cm^{-1} a 840 cm^{-1} naznačuje přítomnost mnohem vyšší hladiny sacharidů ve středu mrkve než v jejich okrajových částech.

Studie Ramanových spekter sacharidových materiálů (celulóza, kukuřičný škrob, agaróza, dextrin, dextran, Sephadex a syntetický polymer sacharózy Ficoll) mají svůj význam při identifikaci polysacharidů a sledování změn během zpracování, včetně vzniku gelu. Byly zaznamenány rozdíly ve spektrech bramborové amylosy, bramborového amylopektinu a kukuřičného škrobu, stejně jako v systému kukuřičný škrob-voda, a to především v oblasti vazeb C-H ($2700-3100\text{ cm}^{-1}$) a v základním skeletu řetězce při 480 cm^{-1} . Do budoucna lze uvažovat nad efektivním a jasným porovnáním Ramanových spekter pro škrobové materiály v různých formách. Tato spektra odráží stupeň krystalinity vzorků. Změny v Ramanových spektrech byly také zjištěny při procesu vzniku gelu a následné degradace při zpracování směsi kukuřičný škrob-voda. [5]

Interakce sacharidů s ostatními složkami v potravinových systémech je další potenciální aplikací. Změny v charakteristických pásech β -cyklodextrinu, kdy působí jako molekulární hostitel a reaguje s molekulami interkalovaných látek, již byly experimentálně zkoumány. Ramanova spektroskopie byla použita také pro studium úlohy struktury vody ve sladké chuti chemorecepce stejně jako rozlišení mezi cukry a umělými sladidly. [5]

Potenciál Ramanovy spektroskopie byl také využit pro zjišťování obsahu glukózy v komerčních sportovních nápojích. Za tímto účelem byly zaznamenány pásy v oblasti $600-1600\text{ cm}^{-1}$ pro čtyři sportovní nápoje. Výsledkem byly dobře definované a oddělené vibrační spektra různých obsažených cukrů (glukóza, fruktóza a sacharóza). Pro srovnání výsledných dat byla sestavena kalibrační křivka s pomocí vodných roztoků glukózy o známé koncentraci. Tento model byl následně aplikován na spektra sportovního nápoje a dal předpokládané koncentrace glukózy v dobré shodě s hodnotami získanými pomocí nezávislých metod. Výsledky představují významný krok směrem k rozvoji rychlé a jednoduché metody pro on-line kvantifikaci glukózy v potravinách a nápojích [21]

3 DALŠÍ POTRAVINOVÉ SLOŽKY

3.1 Barviva

Použití rezonanční Ramanovy spektroskopie při stanovení potravinářských barviv bylo studováno u žlutých, oranžových a červených barviv. Experimentální měření ukazuje kvalitní rezonanční Ramanova spektra pro přírodní barviva. Většina umělých barviv se neprojevila spektrem, které by sloužilo analytickému stanovení. U identifikace potravinových barviv v roztoku, pevných látkách i emulzích ukazuje Ramanova spektroskopie velký potenciál, protože každá barvicí složka má jedinečný „otisk“. Navíc umožňuje identifikaci v minimálních koncentracích a krátkém časovém úseku. Porovnáním s jinými kvantitativními metodami byla potvrzena překvapivě vysoká přesnost ve výsledcích. [22,23]

Studie zabývající se známým potravinářským barvivem E102 provedla měření ve vodných roztocích pomocí povrchově zesíleného Ramanova rozptylu (SERS). E102 je označení pro antrazin a jedná se o žlutý prášek dobře rozpustný ve vodě a v alkoholu. Používá se k barvení ovocných džusů, čokolád, konzervovaného ovoce, hrášku, plechovkových omáček, v koření, polévkách, hořčici, cukrovinkách či zmrzlině. V posledních letech je snaha jeho používání omezit, jelikož může u citlivých jedinců způsobovat alergie. Při analýze byly pozorovány jeho mikromolární a nanomolární koncentrace v oblasti pásu 1365 cm^{-1} . Jedná se o charakteristický pás režimu azo chromoforových skupin ($-N=N-$) a umožnil stanovit přítomné druhy azo barviv. Změny azo skupiny byly registrovány při kyselém pH <3 . V rozmezí pH 3-8 nebyly pozorovány žádné změny molekuly. [24]

3.1.1 Karotenoidy

Účinky glykosylace byly jasně viditelné v rezonančním Ramanově spektru antokyanů a antokyanidinů ve vodných roztocích. Bylo provedeno srovnání Ramanových spekter pro vzorek astaxanthinu a izolovaného aktomyosinu ze svalů lososa vůči standardizovaným roztokům astaxanthinu a kanthaxanthinu. Výsledky ukázaly, že oproti silným interakcím pozorovaným u karotenoproteinů, karotenoid-proteinové interakce v lososu jsou slabé. Dále byla popsána *in vivo* konfigurace *trans* pro astaxanthin a kanthaxanthin.[5]

Absorpční spektra volných karotenoidů zahrnují téměř celé viditelné elektromagnetické spektrum. Kromě uhlovodíků a karotenů, patří mezi karotenoidy i široká škála xanthofylů obsahující kyslíkové radikály, nejčastěji hydroxy nebo keto skupiny. Ty se všeobecně vyskytují ve většině přírodních pigmentů. Spektroskopické vlastnosti jsou závislé na počtu konjugovaných dvojných vazeb v polyenovém řetězci a povaze substituentů na koncových kruzích.

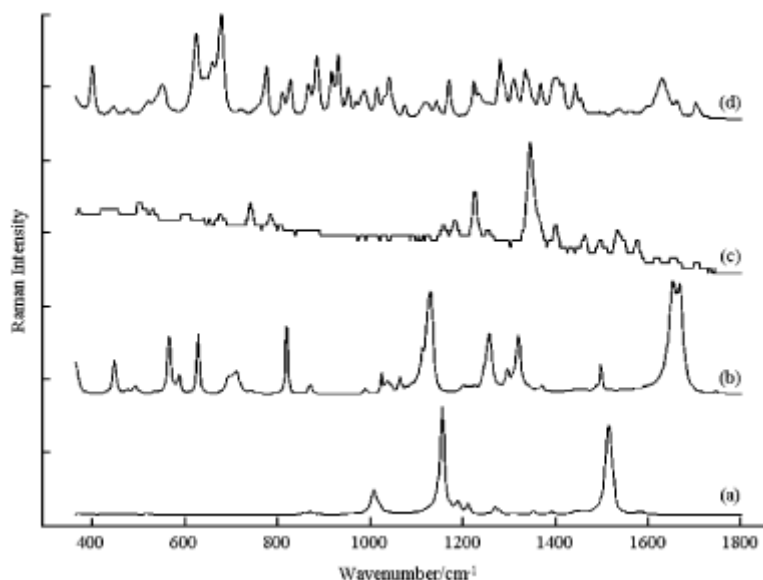
β -karoten a xantofyly (zeaxanthin, kanthaxanthin a astaxanthin), obsahující hydroxy / keto skupiny nacházející se ve většině přírodních pigmentů. Analýza struktury β -karotenu a kanthaxanthinu ukázala, že substituce na koncových kruzích mají minimální vliv na konformaci chromoforem. Data ukazují značné množství informací o propojení mezi vibračními spektry a analýzou rozsáhlé experimentální ověření teoretických normálních souřadnic analýzy provedené na polyenových molekulách. Hodnoty porovnané s dříve získanými referenčními databázemi poskytly shodu a proto se i nadále pokračuje ve výzkumu pomocí zesílených Ramanových metod. [25]

Karotenoidy obecně mají absorpční maximum pod 500nm. Tyto pigmenty dávají na základě vibračních přechodů NIR-FT Ramanova spektra intenzivní pásy na 1064nm. Čerstvé listy japonského čaje obsahují pouze okolo 0,027% (w/w) karotenoidů, tvoří silné pásy na 1529 cm^{-1} , 1161 cm^{-1} a 1007 cm^{-1} . Listy černého čaje, který obsahuje pouze 0,008% (w/w) karotenoidů, také ukázaly tyto pásy, ale slabší intenzity. Intenzita pásů karotenoidů okolo 1529 cm^{-1} , poblíž bílkovinného pásma (1444 cm^{-1}), by mohla být praktickým ukazatelem relativního obsahu karotenoidů v různých typech čajů. Přímá detekce (*in situ*) karotenoidů na základě NIR-FT-Ramanova spektra je také zaznamenána u listového špenátu, kůry mandarinky a u žloutku slepičích a křepelčích vajíček. [5]

Ramanova mikrospektrometrie byla zaměřena na 3 významné potravinové složky - β -karoten, kyselinu askorbovou a riboflavin. Měřeno bylo spektrum mezi 115-3500 cm^{-1} , ale k následné identifikaci bylo využito pouze oblast mezi 365 a 1800 cm^{-1} . Zde lze vyzdvihnout časovou nenáročnost, jelikož celkové měření zabralo pouze 60 s.

Spektrum β -karotenu je charakterizováno dvěma intenzivními pásy u 1156 a 1515 cm^{-1} což může být způsobeno kombinací vibrace vazby C-C na jedné straně a vazby C-H na straně druhé. Spektrum kyseliny askorbové ukazuje široký pás v 1653-1667 cm^{-1} v

důsledku vibrace vazby C=O laktonu. U spektra riboflavinu sledujeme silný pás při 1226 cm^{-1} , jež způsobují aromatické vibrace polycyklických struktur. Pro ilustraci je zde přiřazen obrázek 9 s naměřenými spektry. [26]



Obr. 9 – Ramanova spektra pro (a) β -karoten, (b) kys. askorbovou, (c) riboflavin, (d) glutathion [26]

3.2 Vitaminy

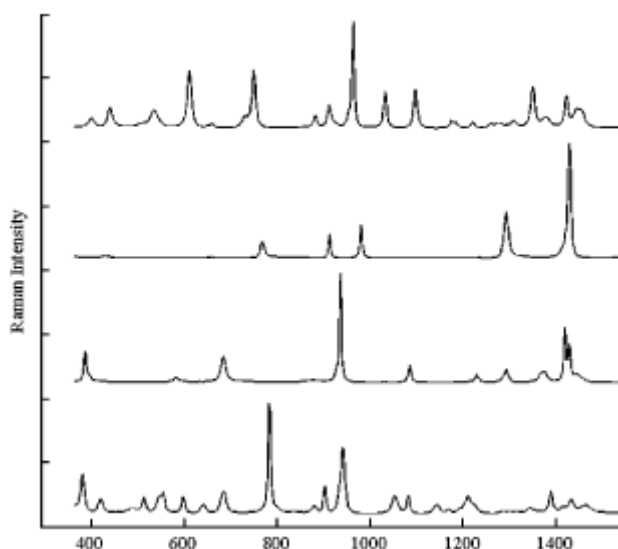
Vitaminy jsou nízkomolekulární organické látky, nezbytné pro lidské zdraví a růst organismu, jež mají katalytický účinek při biochemických reakcích. Získáváme je stravou a ve výživových doplncích. Jejich nedostatek ve výživě často vede k nejrůznějším nemocem, např. berri-berri, anémie apod.

Rozdělení na dvě skupiny je dáno jejich rozpustností ve vodě a tucích. Hydrofilní vitaminy (komplex vitamínů B, C) tělem prochází poměrně rychle a jsou vylučovány močí, lipofilní vitaminy (A, D, E, K) jsou v organismu ukládány pro pozdější využití. [14]

Detekce hydrofilních vitamínů je důležitá právě díky faktu, že je organismus neschopný skladovat. Avšak doposud nejsou vytvořeny běžně využitelné metody pro jejich analýzu. Pouze několik studií se problematikou stanovení vitamínů Ramanovou spektroskopií zabývá, a to v rozsahu stanovení maximálně pěti vitamínů. Spojením

chromatografických metod a Ramanovy spektrometrie lze získat detailnější informace o látkách.

Detekce hydrofilních vitaminů Ramanovou spektroskopií byla užita ve snaze získat vhodnou metodu pro identifikaci vitaminových složek z různých vzorků. Analyzované složky byly následující: B₁ – thiamin, B₂ – riboflavin, B₃ – kys. nikotinová, B₅ – kys. pantotenová (jako vápenatá sůl), B₆ – pyridoxin, B₉ – kys. folová, B₁₂ – kyanokobalamin a C – kys. askorbová. Roztoky uvedených hydrofilních vitaminů byly připraveny v metanolu. Vzorek byl excitován laserovým paprskem při 1064nm a pro každé spektrum bylo zpracováno 500 snímků. Identifikace látek byla založena na znalosti spekter jednotlivých chemických složek každého vitaminu. Například spektra pro vitamin B byly zaznamenány v čistém pevném stavu a také na chromatografický kovový plát. Na základě porovnání spekter čistých sloučenin a sloučenin po chromatografické separaci nebyly zaznamenány žádné zásadní rozdíly.

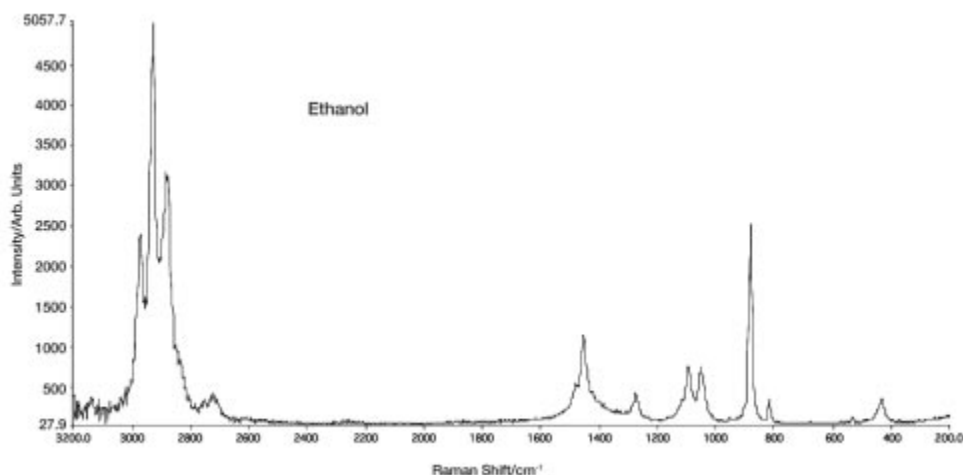


Obr. 10 – Ramanova spektra (a) vitamínu B3 a (b) pyridoxinu v čistém stavu (25 °C)

Využití Ramanovy spektroskopie společně s chromatografickou metodou umožní identifikaci neznámých sloučenin při doteku nebo překrývání. Navíc se stane užitečnou při kontrole vitaminů obsažených v reálných vzorcích. Je tedy jen otázkou času, kdy pro analýzu nebude nezbytné využívat standardy vitaminů. K identifikaci mohou být využita Ramanova spektra čistých složek, uložená ve spektrální knihovně. [27]

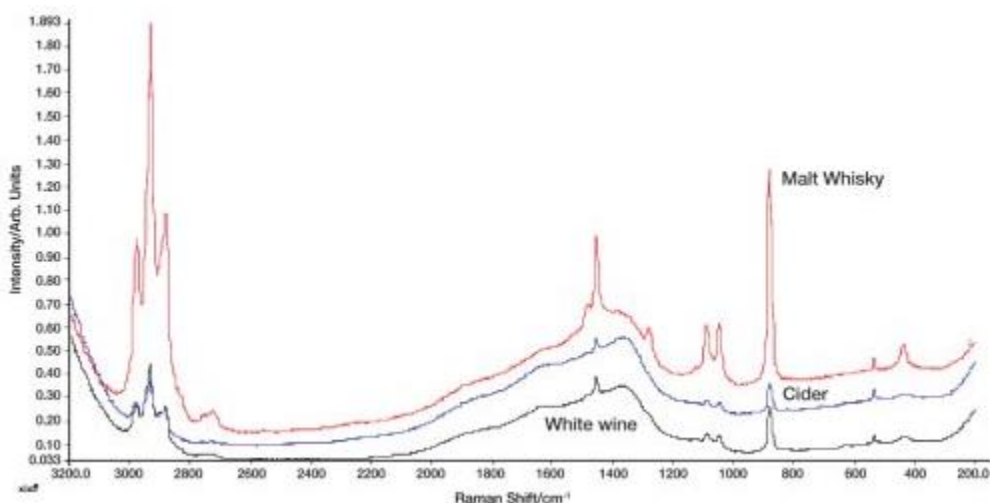
3.3 Etanol

Ramanova spektra několika alkoholických nápojů byla měřena za stejných podmínek. Na obrázku 11 je vzorek vodného roztoku etanolu, měřený ve skleněné nádobě Ramanovou spektrometrií. Poskytl charakteristický pás v oblasti 880 cm^{-1} .



Obr. 11 - Ramanovo spektrum pro etanol s vrcholem pásu (880 cm^{-1})

Na obrázku 12 jsou spektra pro bílé víno (9% obj. alk.), slabé jablečné víno, tzv. cider (6% obj. alk.) a skotskou whisky (40% obj. alk.). U všech tří vzorků je patrný vrchol v oblasti 880 cm^{-1} , charakteristický pro etanol. Vrcholy nám poskytují dobrou srovnatelnost se známým obsahem alkoholu u nápojů. Přesnější kvantitativní analýza těchto nápojů by vyžadovala samostatnou kalibraci každého typu nápoje a ohledy na rozdíly jejich složení.



Obr. 12 - Ramanova spektra pro bílé víno, slabé jablečné víno a whisky

4 RAMANOVA SPEKTROSKOPIE V PRAXI

Ramanovou spektroskopií lze analyzovat pevné látky (krystalické i amorfni materiály, kovy, polovodiče, polymery apod.), kapaliny (čisté látky, roztoky vodné i nevodné), plyny, povrchy (např. sorbenty, elektrody, senzory) či biologické systémy (od biomolekul až po organismy). Její využitelnost je v přesunu měření přímo na pracoviště či do skladovacích prostor, čímž odpadá vzorkování materiálů v čistých prostorech, nutné pro další úpravy. Jde o metodu bezkontaktní, schopnou podávat výsledky i přes transparentní a semitransparentní obalové materiály. Dalšími nespornými výhodami jsou rychlý zisk výsledku při relativně nízkých nákladech, měření směsí látek bez nutnosti jejich separace. Také neustálý vývoj přístrojové techniky předurčuje další zjednodušení a přizpůsobení měřící aparatury pro použití v praxi. Pro snadnou manipulaci jsou již v dnešní době komerčně vytvořeny knihovny spekter např. pro hořlavé látky, výbušniny, narkotika apod. Jelikož knihovny obsahují mnohdy i tisíce takových spekter je nutné vytvářet specifické knihovny s vlastními naměřenými daty. [5, 28]

Ramanova spektroskopie nachází praktické uplatnění v mnoha vědních oborech, od mineralogie a geochemie, přes chemický, farmaceutický a potravinářský průmysl až po biologii a lékařství. Pro přiblížení jsou zde uvedeny vybrané příklady v jednotlivých oborech.

4.1 Farmacie

U léčiv je nutno, snad více než v jiných oborech, dbát na přesnost a kvalitu. Samozřejmě ruku v ruce s výrobou léčiv jde i jejich padělání, které se v posledních letech rozmáhá. Aby nedocházelo k poškozování a v extrémních případech i k úmrtí konečného uživatele, již během výrobního procesu je možno kontrolovat polymorfni formy farmaceutických sloučenin, aktivní účinné látky, různé příměsi i stabilitu konečného složení. Důležitá je také kontrola obalových a pomocných materiálů nebo odhad tloušťky potahových materiálů. [43]

Světová zdravotnické organizace definuje padělek jako: „*přípravek, jehož identita a /nebo původ jsou úmyslně a podvodně špatně označeny. Padělky mohou obsahovat správnou nebo nesprávnou účinnou látku anebo ji neobsahovat vůbec, případně jí*

neobsahovat deklarované množství. Padělkem je i originální přípravek, jehož obal je falešnou napodobeninou.“[29] Dělení padělků léčiv dle WHO do šesti skupin:

- 1) Produkty bez aktivních látek
- 2) Produkty s nesprávnými látkami
- 3) Produkty s nesprávným množstvím aktivních látek
- 4) Produkty se správným množstvím aktivních látek ale falešným obalem
- 5) Kopie originálních produktů
- 6) Produkty s vysokou úrovní nečistot a kontaminantů

Ramanova spektroskopie se pro potřeby farmaceutického průmyslu jeví jako velmi vhodná. Splňuje vysoké požadavky na kvalitu a kontrolu výrobního procesu. Měření základních vibračních molekul poskytuje vysokou selektivitu, je však méně citlivé pro polární vazby a více pro vazby nepolární. Rychlá kontrola při relativně nízkých nákladech je tím víc účinná, že ve většině případů není třeba vzorek připravovat. Bezkontaktní měření polymorfních vzorků, tekutých i pevných, nebo měření přímo přes transparentní a semitransparentní obalové materiály předchází kontaminaci, ke které by mohlo dojít neopatrnou manipulací při odběru a přípravě vzorku. Vhodná je také v kombinaci s dalšími analytickými technikami vzhledem k tomu, že umožňuje nedestruktivní analýzu.

V minulosti využití této metody bránila především vysoká pořizovací technika rozměrné přístrojové techniky ale i časová náročnost v porovnání s mid-IR nebo NIR spektrometrií. Nejnovější studie však představily mobilní přístroje se softwarovým vybavením, které umožňují přenesení laboratoře přímo do místa analýzy.[30]

4.2 Biologie, lékařství

Pro zkoumání živých organismů a všech náležitostí s ním spojených, je pro nás důležité zachování přirozené formy studovaného objektu. Tu můžeme zachovat díky Ramanově spektroskopii, která umožňuje podrobnou analýzu i sledování časových změn buněk, bakterií i eukaryot v jejich přirozeném prostředí. Jak buňky, tak biologické tkáně jsou složeny z aminokyselin, proteinů, nukleotidů, lipidů, sacharidů aj. a jejich komplexů. Každá skupina látek vykazuje vlastní strukturní a konformační proměnlivost promítající se do jejich spekter. Díky lokalizaci některých vibračních módů na určité

chemické skupiny pozorujeme ve spektrech rozdílných látek řadu podobných Ramanových pásů.

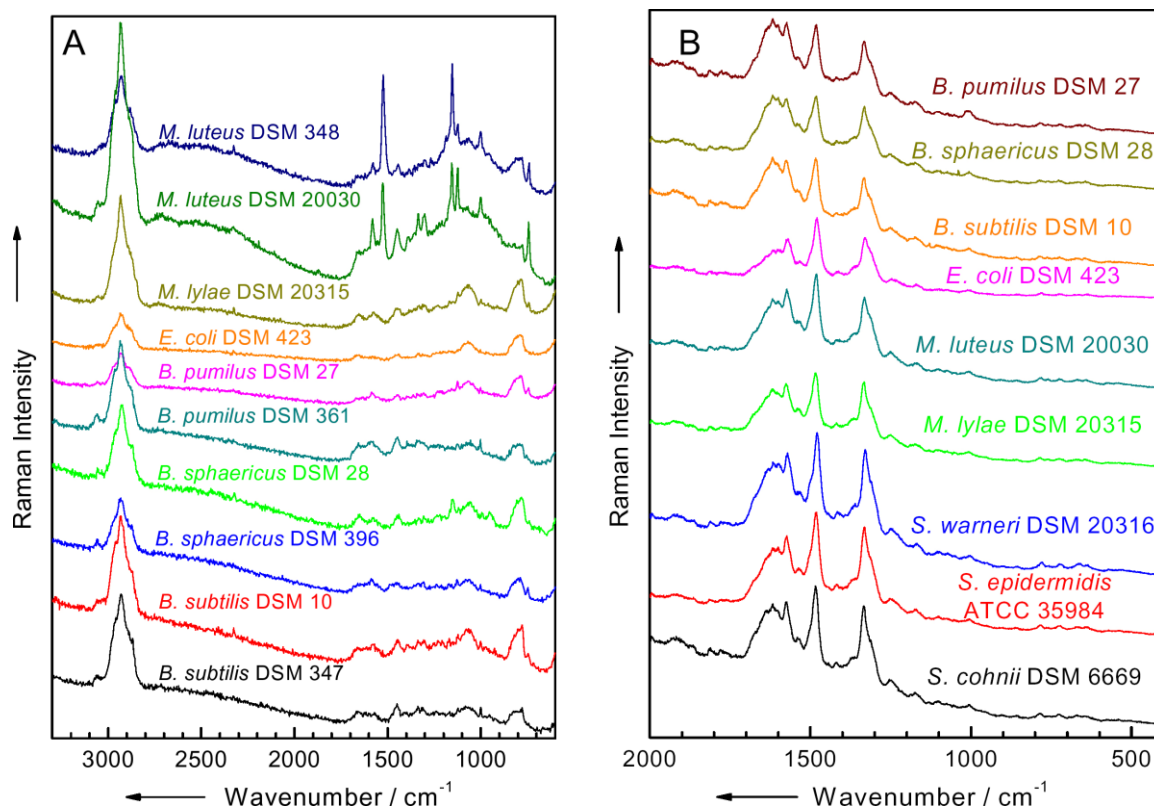
Dále jsme touto metodou schopni detailního rozboru nukleotidů a aromasloučenin jako zásadních složek genetické informace. Ramanova spektroskopie prokázala citlivost při rozlišování mezi kancerózními, prekancerózními a normálními tkáněmi a díky své citlivosti na změny v buněčných metabolitech a bílkovinných strukturách je výkonnější než konkurenční spektroskopické techniky. Fluorescence, běžně se vyskytující u biologických vzorků, je eliminována použitím Ramanových mikroskopů s ultrafialovými (UV) a blízkými infračervenými (NIR) laserovými excitacemi.

Ke studiu mikrostruktury biomolekul a živých buněk (*Candida*, *Trachydiscus minutus*) je nejvhodnější Ramanova mikrospektrometrie. Pro fixaci biologického vzorku lze použít běžné podložní i krycí sklíčka s nízkou autofluoresencí. Podobně zkoumání biomolekul a živých buněk v jejich přirozeném prostředí je možné, jelikož Ramanův signál skla i vody je slabý a obě látky se vyznačují nízkou autofluoresencí. [30,31]

Ramanova spektroskopie a spektroskopie blízké infračervené oblasti byla využita ke studiu rakoviny žaludku *in vivo*. Analyzovala se jak zdravá tkáň tak také oblast zasažená maligními procesy, a to v oblasti 800-1800 cm^{-1} . V této oblasti tkáně vykazují autofluorescenci způsobenou kontaminanty. K odstínění se užívá speciální odfiltrování (např. separace, vlnění, Fourierova transformace apod.) Analýza „otisků“ běžně přítomných látek v žaludku (elastin, pepsinogen, mucin, glykogen, kolagen, DNA) byla vyhodnocena dalšími analytickými metodami a vznikly diagnostické informace o maligních procesech. Obrovským přínosem je rychlost analýzy. Ramanova spektra lze běžně z žaludku získat za 0,5 s. Vyhodnocená data Ramanových spekter ukázala 92,2% přesnost (citlivost 97,9 a specifita 91,5%) mezi rozeznáním zdravé a napadené tkáně. Studie demonstruje komplementaritu těchto metod a zařazení do diagnostických postupů při diagnostice rakoviny žaludku. Prozatím je hlavní metodou endoskopie. [32]

4.3 Mikrobiologie

Spojení Ramanovy spektroskopie a chemometrických metod poskytuje rychlou identifikaci mikroorganismů (obrázek 13) bez nutnosti zdlouhavých kultivačních postupů.



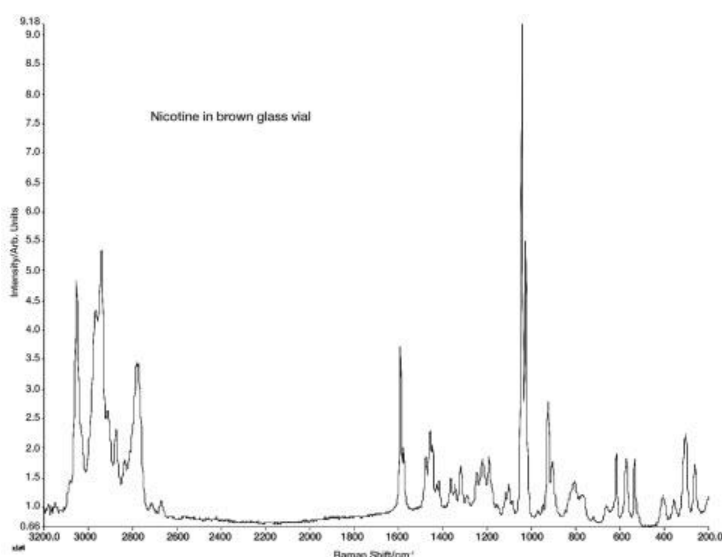
Obr. 13 - Mikro-Ramanova spektra jednotlivých bakteriálních buněk [33]

Rychlé a jednoznačné identifikace mikroorganismů se stala důležitým požadavkem nejen v klinické analýze, ale také v různých hygieny monitorujících systémech, jako jsou farmaceutické výroby nebo potravinářské procesy. Ve všech aplikacích je nanejvýš žádoucí, aby se co nejefektivněji poskytla vhodná léčba pacientům nebo se minimalizovaly výrobní prostoje. Základem je získání informací o molekulách přímo uvnitř buňky a identifikace fenotypu bakterie. Přítomnost mikroorganismů v přirozeném prostředí jako je půda, vzduch nebo potraviny jsou v nízkých koncentracích, a proto jednou z možností jak zvýšit úspěšnost analýzy je užití fluorescenčních štítků. Ty mají absorpční maxima daleko od Ramanovy excitační vlnové délky. [33]

4.4 Obalové materiály

Testování materiálů v přímém kontaktu s potravinou nebo potravinářskými tekutinami je v současnosti prioritou z důvodu bezpečnostního hodnocení obalových materiálů. V určitých případech, kdy vzorek potenciálně vykazuje nebezpečí pro člověka, je užitečné měření materiálů v obalu. Pro obal i materiál vznikají dva stejné

obrazy, avšak pro detekci materiálu využíváme spektrum se silnějším Ramanovým rozptylem. Různá skla (v souvislosti s barvou a vlastnostmi) mají různá spektra a všechny vykazují slabý rozptyl. Díky slabému rozptylu můžeme měřit látky i přes silně zabarvené skleněné materiály. Obrázek 14 ukazuje spektrum kapalného nikotinu (jedná se o silný toxin, do těla se dostává vdechováním), měřeného v tmavě hnědé uzavřené skleněné lahvičce. Výsledkem je spektrum čistého nikotinu bez významného projevu skla.



Obr. 14 – Spektrum zkapalněného nikotinu měřeného v tmavě hnědé lahvičce

Co se týče polymerních obalů, většina polymerů i polyetylen se projevuje spektry. Ve formě tenkého filmu nebo vrstvy vykazuje pouze minimální Ramanův rozptyl. Díky tomu je možno analyzovat sytké hmoty v polymerních kontejnerech s žádným nebo minimálním projevem.

Měření přímo přes obalové materiály je zejména vhodné pokud je nutná rychlá analýza, vzorky jsou toxické nebo zapáchají, dochází k degradaci vzorku působením vnějších vlivů (vlhkost, záření, vzduch apod.), existuje riziko vlivu na zdraví analytika nebo se jedná o látky neznámé (důkazy, stopy). [12]

4.5 Chemický průmysl

V chemickém průmyslu je pro nás důležitý zisk informací o chemických systémech a procesech uvnitř molekuly. Pomocí Ramanovy spektroskopie je možno sledovat změny při kontaktu anorganických (organických) molekul látek s kovy. Navíc tvorbou

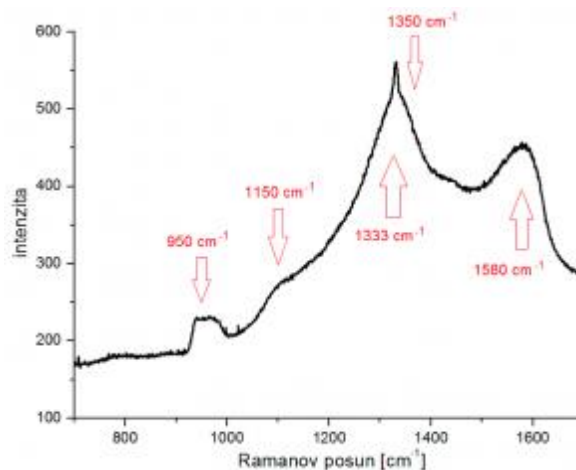
databázi a knihoven pro komerční využití dochází k celkové časové a finanční úspoře. Již nyní existují veřejné a soukromé databáze, obsahující informace o vibračních režimech, chemických vazbách a symetrii jednotlivých molekul. [25]

4.6 Gemologie, geologie, mineralogie

V oboru gemologie se užívá Ramanova spektroskopie k rozlišení diamantových a grafitových struktur a identifikaci uměle vytvořených diamantů. Ty v důsledku výroby za vysoké teploty a tlaku nevykazují barevný standard, který určuje hodnotu diamantů. Také je možnost zjišťovat přítomné inkluze, výplně, vosky a další úpravy. Klasifikace na základě těchto informací má přímý vliv na tržní cenu drahokamů. [34]

Hlavní strukturu diamantu tvoří atomy uhlíku. Případnou tvorbou chemických vazeb s dalšími čtyřmi atomy vznikají různé chemické struktury. Nejčastěji se jedná o grafit, diamant nebo amorfni uhlík. Diamant vzniká ve vrstvách a právě tato skutečnost umožňuje analyzovat jeho chemické vlastnosti. Umělé diamanty se často tvoří na křemíkovém substrátu. Má vysokou teplotu tání, podobnou krystalickou strukturu i hodnotu koeficientu teplotní roztažnosti jako diamant.

Výsledkem měření uhlíkových struktur bylo spektrum na obrázku 15. Je vidět závislost intenzity záření na Ramanově posunu, což je základní identifikační prostředek pro určení přítomných vazeb v materiálech. Ostrý vrchol v oblasti 1333 cm^{-1} a méně výrazné vrcholy v oblasti 1150 cm^{-1} a 1350 cm^{-1} potvrzují přítomnost diamantu. Poměrně rozložitý vrchol (1580 cm^{-1}) detekuje přítomnost grafitové vazby. Méně výrazný vrchol (925 cm^{-1}) je připisován křemíku. Výskyt je logický z důvodu použití křemíkového substrátu při výrobě. [35]



Obr. 15 – Ramanovo spektrum diamantové struktury [35]

Geologové a mineralogové používají Ramanovu spektroskopii společně s dalšími analytickými metodami ke strukturální a chemické charakterizaci minerálů. Příkladem použití Ramanovy analýzy společně s elementární disperzní spektroskopií (EDS) je identifikace části pískovce vytěženého z jezera Loch Torridon ve Skotsku. Bylo možno okamžitě určit chemické složení a polymorfní formy zkoumaného vzorku a jednoznačně identifikovat složkové fáze na makro a mikro úrovni. [34]

4.7 Strojírenský průmysl

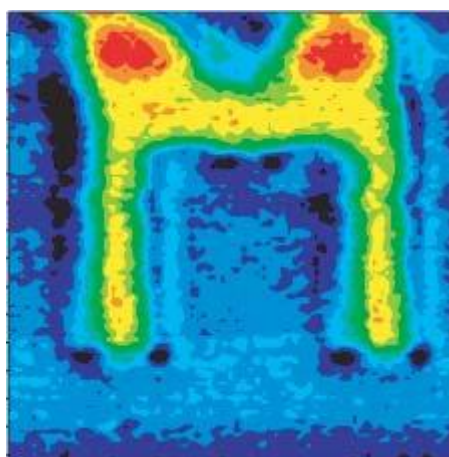
Díky multifunkčnosti Ramanovy spektroskopie můžeme zkoumat a analyzovat snad všechny druhy materiálů, od pevných látek, kapalin, plynů, přes krystalické látky, gely, průhledné i neprůhledné vzorky, až po směsi. Konkrétním příkladem je charakterizace významných prvkových materiálů. Uhlík vyskytující se ve vrstvách grafitu, sazích, přírodních nebo umělých diamantech nebo křemík se hojně užívají v elektronice. Korozní materiálů ve výrobě nebo v přírodě se snažíme omezit studiem anorganických materiálů obsahujících těžké kovy. Dochází k rozvoji korozně oxidických a di-sulfidických vrstev pro slitiny těžkých kovů. [36]

Konkrétní případová studie popisuje využití Ramanovy spektroskopie při zkoumání praskliny v ocelové součásti jaderného reaktoru. Byla vyslovena domněnka, že prasklina byla způsobena křehkostí způsobenou oxidací použitého materiálu a tuto domněnku potvrdila právě Ramanova metoda. Poté se uskutečnily podrobnější analýzy a preventivní opatření. [34]

4.8 Polovodiče a nanotechnologie

Ramanova spektroskopie poskytuje kontrolu kvality při výrobě a používání polovodičů. Na základě měření dokáže stanovit poškození povrchu materiálu či nečistoty v silikonových substrátech a uhlíkových vrstvách materiálů. Rozvoj mikroelektroniky v posledních letech rapidně roste, a proto je nutná řádná kvalita kontroly miniaturizace. Zároveň je nutno kontrolovat dostatečné propojení různých vrstev materiálů. Ramanova mikrospektrometrie je schopná sledovat namáhání (tlak, tah) i další vlivy působící na materiál, např. teplota povrchu nebo zařízení. Umožňuje sledování polovodičů od výzkumu až po výrobní proces.

Níže uvedený Ramanův obrázek izolační prohlubně v tvaru M zobrazuje mapu polohy pásu křemíku 520 cm^{-1} , který je zatížen tlakem a tahem. Tahu odpovídá červená barva, tlaku černá.



Obr. 16 – Izolační prohlubeň polovodiče [34]

V nanotechnologiích je možná klasifikace průměru uhlíkových nanotrubek. Vyhodnocuje se dle frekvence, která odpovídá danému průměru nanotrubky. [34,37]

4.9 Umění

Cílem restaurátorů je co nejšetrnější obnova historických předmětů a uměleckých děl a samozřejmě zachování celkového dojmu originality. V dřívějších dobách se stávalo, že nekorektní postupy při restaurování znehodnotili množství uměleckých děl, které jsou pro nás nenahraditelné. Ramanovou spektroskopií je možno zkoumat procesy degradace i použité materiály (barvy, pigmenty, laky atd.). Ziskem těchto informací

umožňuje restaurátorům zvolit vhodný typ opravy cenných uměleckých děl. Výhody, uvedené společně s dalšími v kapitole 1.4.1, jsou v této oblasti také zohledněny.

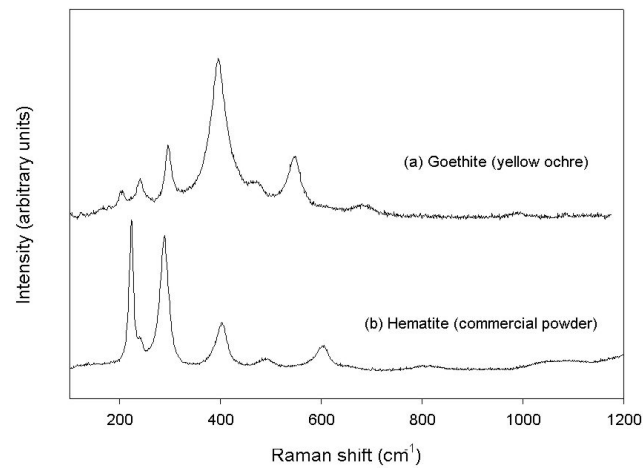
Ramanova analýza je nedestruktivní a použitím vláknových sond umožňuje provést analýzu téměř všech vzdálených vzorků *in-situ*. Pomocí metody již proběhla analýza vzácného Turínského plátna nebo identifikace drahokamů na vzácném historickém předmětu z 11. století. [34]

Ramanova spektroskopie je schopna identifikovat pigmenty na malbách, spisech nebo keramice, čímž umožňuje detekovat původ děl a ověřovat pravost. První úspěchy popisuje článek z roku 2007. Ve spojitosti s analýzou pigmentů v nástěnných malbách a ikonách na území dnešní Makedonie bylo prokázáno využití barviv jak tradičních anorganických, tak také přítomnost novějších, syntetických. V souvislosti s glazovanou keramikou pak vědci dospěli k závěru, že pro její výrobu byly využity dvě teploty, většina byla vypálena při teplotě 700 °C, minimum pak při 800 °C. [38]

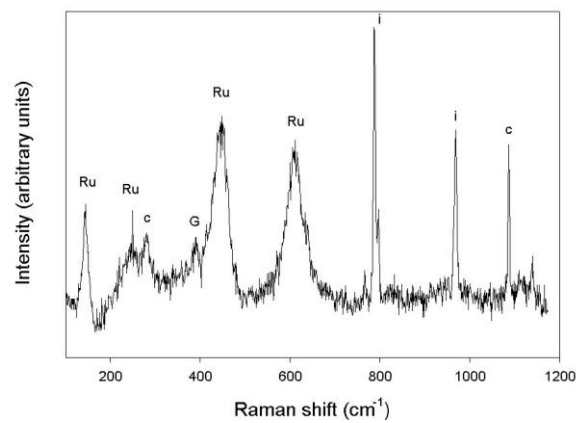
Nedestruktivní charakter metody umožnil analyzovat vnější malované omítky historických staveb ve městě Parma (Itálie). Tyto budovy jsou charakteristické žlutým zbarvením často užívaným v 18. století. Přesný barevný charakter „giallo“ Parma není zcela popsán, i když se předpokládá, že hlavní pigment je žlutá okrová. Z historického odkazu je známo, že Ennemonde Petitot, slavný francouzský architekt, který žil a pracoval v Parmě z roku 1760, chtěl reprodukovat zlatožlutou Versailles na některých budovách v Parmě.

Cílem byla identifikace pigmentů přítomných v různých vrstvách série žlutých staveb a určení datového období pro pozdější restaurování a konzervaci staveb. Byly odebrány vzorky z fasád některých staveb v Parmě a provincii, kterým bylo historicky uznáno „giallo“ zbarvení. Pro srovnání byla zkoumána také červená budova z 19. století a novější žlutá budova ("Scuola Giordani", 1930).

Pro žluté zbarvení historických budov v Parmě a okolí byla potvrzena přítomnost částic uhličitanu vápenatého, který se vyskytuje v okrově žluté. V některých případech byl pozorován lehce oranžový nádech získaný přidáním červeného okru (obsahuje hematit). V červených omítkách se nacházel pouze pigment hematit. [39]



Obr. 17 - Ramanova spektra a) žlutého okru (goethite) a b) hematitu (červeného barviva)



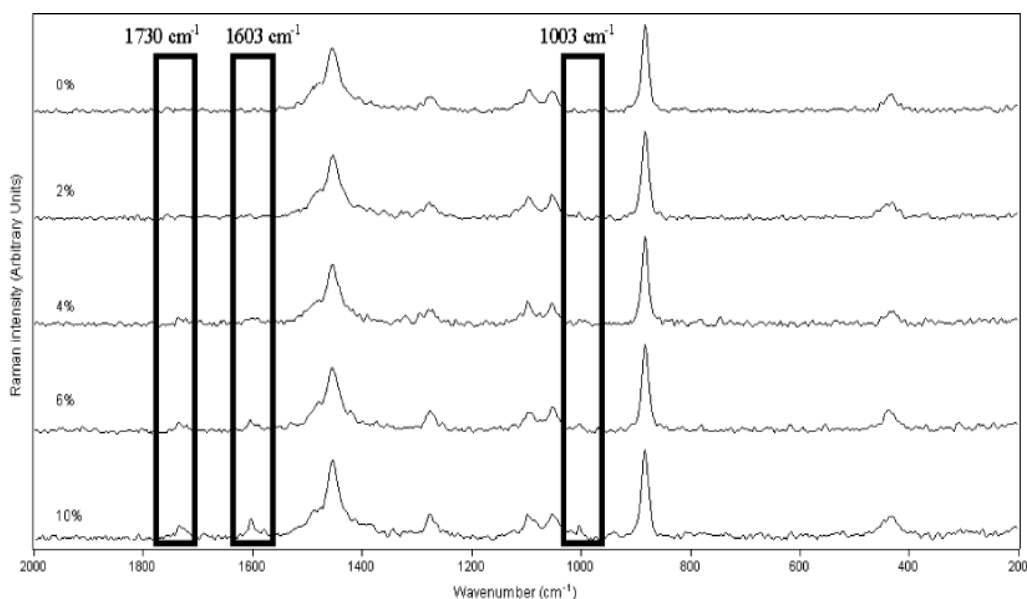
Obr. 18 - Ramanovo spektrum vzorku "Scuola Giordani": goethite (G), calcite (C) and rutile (R)



Obr. 19 – Scuola Giordani [39]

4.10 Kriminalistika, forézní vědy

Ramanova analýza umožňuje detekci neznámých nebo nebezpečných látek, jako jsou narkotika nebo výbušniny. Využívá se zejména při letištní kontrole, kde je vysoké ohrožení a jak už bylo zmíněno ve výhodách Ramanovy spektroskopie, tato metoda je schopna analýzy i přes neprůhledný obal. Prakticky se užívá pro hledání drog v šatech a taškách. Stále častěji se pašují drogy rozpuštěné v alkoholu, např. kokain hydrochlorid rozpuštěný v rumu, jehož charakteristické vrcholy jsou demonstrovány na obrázku 20.



Obr. 20 – Ramanova spektra pro kokain rozpuštěný v rumu (různé koncentrace)

[42]

U závažných dopravních nehod se po vizuálním porovnání částí s autolakem a mikroskopickém zkoumání, což jsou analýzy spíše orientační, ještě jednoznačně určuje druh nátěrové hmoty právě Ramanovou spektroskopií.

U střelného prachu, jehož základem je nitrocelulóza nebo nitroglycein, zůstávají po výstřelu zbytkové stopy v oblasti zhruba 1 metru. V této oblasti lze detekovat rezidua uhlikatých sazí, dusičnanů a dusitanů nebo sloučeniny antimonu a bária. Jelikož částice nedegradují v čase jsme schopni určit specifikaci střelného prachu. Analýza může probíhat přímo na “místě činu”. Poskytuje tedy rychlé výsledky a je eliminováno znehodnocení stop další manipulací. Mezi další praktické využití se řadí kontrola pravosti dokumentů, analýza inkoustu, barev nebo drog.[41]

ZÁVĚR

V rámci této práce jsem se snažila pro čtenáře vytvořit ucelený přehled studií, výzkumu i praktického využití Ramanovy spektroskopie v rámci potravinářského průmyslu i ostatních vědních disciplín. Zároveň jsem pro pochopení metody uvedla historický základ i související termíny jako vibrace molekul, Ramanova spektra či techniky zesílení Ramanova jevu. Právě díky svým fyzikálním vlastnostem a mnoha výhodám ji lze mimo potraviny využít v biologii, mikrobiologii, kriminalistice a průmyslu. Opravdovou budoucnost pak vidím v mobilních měřicích přístrojích, které rychle, přes obalové materiály a v kterékoli části výrobního procesu mohou zajistit bezpečnost a kvalitu pro koncové zákazníky.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Chandrasekhara Venkata Raman. In: *NNDDB: Tracking the entire world*. 2012. [online]. [cit. 2012-05-14]. Dostupné z: <<http://www.nndb.com/people/724/000099427/>>.
- [2] SINGH, R. C. V. Raman and the Discovery of the Raman Effect. *Physics in Perspective (PIP)*. 2002-12-1, roč. 4, č. 4, s. 399-420. ISSN 1422-6944. DOI: 10.1007/s000160200002. [online]. [cit. 2012-04-19]. Dostupné z: <<http://www.springerlink.com/Index/10.1007/s000160200002>>.
- [3] STRAUCH, B., B. VLČKOVÁ a I. NĚMEC. Infračervená a Ramanova spektroskopie na katedrách chemie Přírodovědné fakulty Univerzity Karlovy v Praze – od historie k současnosti. *Chemické listy*. Praha: Česká společnost chemická, 2010, č. 104, s. 1210-1219. ISSN 0009-2770. [online]. [cit. 2012-04-19]. Dostupné z: <http://chemicke-listy.cz/docs/full/2010_12_1210-1219.pdf>.
- [4] DENDISOVÁ, M., P. ŽVÁTORA a P. MATĚJKA. VYSOKÁ ŠKOLA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ V PRAZE. Ramanova spektroskopie. [online]. [cit. 2012-04-19]. Dostupné z: <<http://www.vscht.cz/anl/lach2/RAMAN.pdf>>.
- [5] LI-CHAN, E. C. Y. The applications of Raman spectroscopy in food science. *Trends in food science*. 1996, roč. 7, č. 11, s. 361-370. ISSN 0924-2244.
- [6] TRCHOVÁ, M. Jak vibrují atomy v molekulách. Ústav makromolekulární chemie, Akademie věd ČR. [online]. [cit. 2012-04-19]. Dostupné z: <<http://archiv.otevrena-veda.cz/users/Image/default/C1Kurzy/NH2006pdf/15.pdf>>.
- [7] Typy vibrací. [online]. [cit. 2012-04-19]. Dostupné z: <<http://web.natur.cuni.cz/~agnemec/Prednasky%20Uvod%20do%20vibracni/Vibracni%20spektroskopie%203.pdf>>.
- [8] SMITH, E. a G. DENT. *Modern Raman Spectroscopy: A Practical Approach*. Chichester: Wiley, 2005. ISBN 0-471-49794-0.
- [9] VÁCLAVÍKOVÁ, S. Analýza DNA modifikované protinádorově účinnými látkami pomocí Ramanovy spektroskopie. Brno, 2006. Bakalářská práce. Masarykova univerzita v Brně. [online]. [cit. 2012-04-19]. Dostupné z: <http://is.muni.cz/th/78366/prif_b/Vaclavikova_S.-_bakalarka.txt>.

- [10] ŠIŠKOVÁ, K. Povrchem zesílená Ramanova spektroskopie s využitím nanočástic stříbra. 2009. [online]. [cit. 2012-04-19]. Dostupné z: <<http://nanosystemy.upol.cz/upload/1/siskova.pdf>>.
- [11] MATĚJKA, P. a M. DENDISOVÁ. Ramanova a infračervená spektrometrie vzorků v pevné fázi. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2010. Dostupné z: <<http://www.vscht.cz/anl/josef/LabMolSpek/RamanIR%202010.pdf>>.
- [12] ROBERT, A. Advantages of Raman Spectroscopy when Analyzing Materials Through Glass or Polymer Containers and in Aqueous Solution. [online]. [cit. 2012-05-05]. Dostupné z: <http://www.perkinelmer.com/CMSResources/Images/44-74250APP_RamanAnalysisThrougGlassPolymerAqueous.pdf>.
- [13] SOHN, M., D. S. HIMMELSBACH, S. E. KAYS, ARCHIBALD a F. E. BARTON. NIR-FT/Raman Spectroscopy for Nutritional Classification of Cereal Foods. *Cereal Chemistry*. 2005, roč. 82, č. 6, s. 660-665. [online]. [cit. 2012-04-19] Dostupné z: <<http://cerealchemistry.aaccnet.org/doi/abs/10.1094/CC-82-0660?journalCode=cchem>>.
- [14] VELÍŠEK, J.. Chemie potravin 1, 2, 3. 1. vyd. Tábor: OSSIS, 1999.
- [15] ALMEIDA, M. R., K. DE S. OLIVEIRA, R. STEPHANI, L. F. C. DE OLIVEIRA a F. E. BARTON. Fourier-transform Raman analysis of milk powder: a potential method for rapid quality screening. *Journal of Raman Spectroscopy*. 2011, roč. 42, č. 7, s. 1548-1552. ISSN 03770486. DOI: 10.1002/jrs.2893. [online]. [cit. 2012-04-19]. Dostupné z: <<http://doi.wiley.com/10.1002/jrs.2893>>.
- [16] Kasein. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 8. 1. 2012 [cit. 2012-05-07]. Dostupné z: <<http://cs.wikipedia.org/wiki/Kasein>>.
- [17] FONTECHA, J., J. BELLANATO a M. JUAREZ. Infrared and Raman Spectroscopic Study of Casein in Cheese: Effect of Freezing and Frozen Storage. *Journal of Dairy Science*. 1993, roč. 76, č. 11, 3303–3309. [online]. [cit. 2012-04-19]. Dostupné z: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030293776675>>.

- [18] Tuky. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation [cit. 2012-05-07]. Dostupné z: <<http://cs.wikipedia.org/wiki/Tuky>>.
- [19] ZHANG, Xiao-Fang, Ming-Qiang ZOU, Xiao-Hua QI, Feng LIU, Cheng ZHANG a Feng YIN. Quantitative detection of adulterated olive oil by Raman spectroscopy and chemometrics. *Journal of Raman Spectroscopy*. 2011, roč. 42, č. 9, s. 1784-1788. ISSN 03770486. DOI: 10.1002/jrs.2933. [online]. [cit. 2012-04-19]. Dostupné z: <<http://doi.wiley.com/10.1002/jrs.2933>>.
- [20] Simple Sugars: Fructose, glucose and sucrose. 2009. [online]. [cit. 2012-05-04]. Dostupné z: <<http://cdavies.wordpress.com/2009/01/27/simple-sugars-fructose-glucose-and-sucrose/>>.
- [21] DELFINO, C., B. CAMERLINGO, M. PORTACCIO, B. DELLA VENTURA, L. MITA, D.G. MITA a M. LEPORE. Visiblemicro-Raman spectroscopy for determining glucose content in beverage industry. *Food Chemistry*. 2011, roč. 127, č. 2, 735–742. [online]. [cit. 2012-04-19]. Dostupné z: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814611000409>>.
- [22] STOBBAERTS, R. F., L. VAN HAVERBEKE a M. A. HERMAN. Qualitative and Quantitative Determination of Some Yellow, Orange and Red Food Dyes by Resonance Raman Spectroscopy. *Journal of Food Science*. 1983, roč. 48, č. 2, s. 521-525. ISSN 0022-1147. DOI: 10.1111/j.1365-2621.1983.tb10780.x. [online]. [cit. 2012-04-19]. Dostupné z: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2621.1983.tb10780.x>>.
- [23] BROWN, CHRIS W., PATRICIA F. LYNCH a M. A. HERMAN. IDENTIFICATION OF FD&C DYES BY RESONANCE RAMAN SPECTROSCOPY. *Journal of Food Science*. 1976, roč. 41, č. 5, s. 1231-1232. ISSN 0022-1147. DOI: 10.1111/j.1365-2621.1976.tb14425.x. [online]. [cit. 2012-04-19]. Dostupné z: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2621.1976.tb14425.x>>.
- [24] PEICA, N., I. PAVEL, S. CÎNTA PÎNZARU, V. K. RASTOGI a W. KIEFER. Vibrational characterization of E102 food additive by Raman and surface-enhanced Raman spectroscopy and theoretical studies. *Journal of Raman Spectroscopy*. 2005, roč. 36, 6-7, s. 657-666. ISSN 0377-0486. DOI: 10.1002/jrs.1354. [online]. [cit. 2012-04-19]. Dostupné z: <<http://doi.wiley.com/10.1002/jrs.1354>>.

- [25] WEESIE, MERLIN, J. LUGTENBURG, G. BRITTON, F. J. H. M. JANSEN a J. P. CORNARD. Semiempirical and Raman spectroscopic studies of carotenoids. *Biospectroscopy*. 1999, roč. 5, č. 1, 19–33. DOI: 10.1002/(SICI)1520-6343(1999)5:1<19::AID-BSPY4>3.0. [online]. [cit. 2012-04-19]. Dostupné z: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/%28SICI%291520-6343%281999%295:1%3C19::AID-BSPY4%3E3.0.CO;2-E/abstract>>.
- [26] DE GELDER, J., K. DE GUSSEM, P. VANDENABEELE, L. MOENS, F. J. H. M. JANSEN a J. P. CORNARD. Reference database of Raman spectra of biological molecules. *Journal of Raman Spectroscopy*. 2007, roč. 38, č. 9, s. 1133-1147. ISSN 03770486. DOI: 10.1002/jrs.1734 [online]. [cit. 2012-04-19]. Dostupné z: <<http://doi.wiley.com/10.1002/jrs.1734>>.
- [27] CIMPOIU, C., D. CASONI, A. HOSU, V. MICLAUS, T. HODISAN a G. DAMIAN. Separation and Identification of Eight Hydrophilic Vitamins Using a New TLC Method and Raman Spectroscopy. *Journal of Liquid Chromatography*. 2005, roč. 28, č. 16, s. 2551-2559. ISSN 1082-6076. DOI: 10.1080/10826070500189737. [online]. [cit. 2012-04-19]. Dostupné z: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10826070500189737>>.
- [28] PITT, G.D., D. N. BATCHELDER, R. BENNETT, R. W. BORMETT a I. P. HAYWARD. Engineering aspects and applications of the new Raman instrumentation. *IEE proceedings. Science, measurement and technology*. roč. 153, č. 6, 241 - 318. ISSN 1350-2344. [online]. [cit. 2012-04-19]. Dostupné z: <http://ieeexplore.ieee.org/xpl/login.jsp?tp=&arnumber=1541352&url=http%3A%2F%2Fieeexplore.ieee.org%2Fxppls%2Fabs_all.jsp%3Farnumber%3D1541352>.
- [29] Světová zdravotnická organizace: Definice padělku. [online]. [cit. 2012-04-19]. Dostupné z: <http://whqlibdoc.who.int/hq/1999/WHO_EDM_QSM_99.1.pdf>.
- [30] ČERNOHORSKÝ, T. VYUŽITÍ RAMANOVY SPEKTROMETRIE PŘI TESTECH SHODY VE FARMACEUTICKÉM PRŮMYSLU A PŘI DETEKCI PADĚLKŮ LÉČIV – NOVÉ MOŽNOSTI MOBILNÍCH ZAŘÍZENÍ. *CHEMagazin: časopis pro chemicko-technologickou a laboratorní praxi*. Pardubice, 2011, roč. 11, č. 5, s.19-22. ISSN 1210-7409. [online]. [cit. 2012-04-19]. Dostupné z: <http://www.chemagazin.cz/userdata/chemagazin_2010/file/CHEMAGAZIN_XXI_5_c17.pdf>.

- [31] MOJZEŠ, P., J. PALACKÝ, V. BAUEROVÁ a L. BEDNÁROVÁ. Ramanova mikrospektroskopie a mapování buněk a tkán. *Československý časopis pro fyziku*. Česká republika: Akademie věd České republiky, 2011, roč. 61, 3/4, s. 178-184. ISSN 0009-0700. [online]. [cit. 2012-04-19]. Dostupné z: <<http://www.library.sk/arl-cav/epca/ramanova-mikrospektroskopie-a-mapovani-bunek-a-tkani>>.
- [32] BERGHOLT, M. S., W. ZHENG, K. LIN, K. Y. HO, M. TEH, K. G. YEOH, J. B. Y. SO a Z. HUANG. Combining near-infrared-excited autofluorescence and Raman spectroscopy improves in vivo diagnosis of gastric cancer. *Biosensors and Bioelectronics*. 2011, roč. 26, č. 10, s. 4104-4110. ISSN 09565663. DOI: 10.1016/j.bios.2011.04.005. [online]. [cit. 2012-04-19]. Dostupné z: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956566311002016>>.
- [33] POPP, J. Identification of micro-organisms by Raman spectroscopy. *Spie newsroom*. 2007, s. -. ISSN 18182259. DOI: 10.1117/2.1200708.0856. [online]. [cit. 2012-04-19]. Dostupné z: <<http://www.spie.org/x16083.xml>>.
- [34] RENISHAW. *Ramanova spektroskopie*. 2011. [online]. [cit. 2012-05-06]. Dostupné z: <<http://www.renishaw.cz/cs/ramanova-spektroskopie--6150>>.
- [35] Posterus. MICHNIAK. Příprava a analýza diamantové štruktúry. 2012. [online]. [cit. 2012-05-05]. Dostupné z: <<http://www.posterus.sk/?p=12893>>.
- [36] POLKOVÁ, P. Ramanova spektroskopie v bezpečnostních aplikacích. Zlín, 2011. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně.
- [37] Kaiser Optical Systems, Inc. - A Rockwell Collins Company. 2011. [online]. [cit. 2012-04-19]. Raman Spectroscopy : Raman Applications : Nanotechnology. Dostupné z: <http://www.kosi.com/Raman_Spectroscopy/nanotechnology.php?ss=100>.
- [38] MINČEVA-ŠUKAROVA, O., V. TANEVSKA, L. ROBEVA-ČUKOVSKA a S. MAMUČEVSKA-MILJKOVIĆ. MICRO-RAMAN SPECTROSCOPIC STUDIES OF BYZANTINE CULTURAL HERITAGE IN REPUBLIC OF MACEDONIA. *Macedonian journal of chemistry and chemical engineering*. 2007, roč. 26, č. 2, 103–110. ISSN 1857-5552. [online]. [cit. 2012-04-19]. Dostupný z: <http://www.mjcce.org.mk/PDF/26_2_374.pdf>.

- [39] SCARDOVA, S., P. P. LOTTICI, D. BERSANI a G. ANTONIOLI. A study of the external coloration of historical buildings in Parma (Italy) and surroundings by micro-Raman technique. *Studies in Conservation*. 2002. [online]. [cit. 2012-04-21]. Dostupné z: <<http://www.fis.unipr.it/beni/gialloarticolo.html>>.
- [40] Raman spectroscopy helps law enforcement take a bite out of crime, 2008. [online]. [cit. 2012-04-19]. Dostupné z: <<http://www.bioopticsworld.com/articles/print/volume-1/issue-3/features/feature-focus/raman-spectroscopy-helps-law-enforcement-take-a-bite-out-of-crime.html>>.
- [41] Raman and FT-IR analysis of a forensic paint chip sample. SPD/AN/104 Issue 1.0 September 2006. [online]. [cit. 2012-04-19]. Dostupné z: <[http://resources.renishaw.com/en/details/download\(10069\)](http://resources.renishaw.com/en/details/download(10069))>.
- [42] BURNETT, A. D., H. G. M. EDWARDS, M. D. HARGREAVES, T. MUNSHI a K. PAGE. A forensic case study: the detection of contraband drugs in carrier solutions by Raman spectroscopy. *Drug Testing and Analysis*. 2011, roč. 3, č. 9, s. 539-543. ISSN 19427603. DOI: 10.1002/dta.169. [online]. [cit. 2012-04-19]. Dostupné z: <<http://doi.wiley.com/10.1002/dta.169>>.
- [43] PEKÁREK, T. IR a Ramanova spektroskopie ve farmaceutickém průmyslu. VFU Brno. 2012. [online]. [cit. 2012-04-19]. Dostupné z: <http://faf.vfu.cz/export/struktura-fakulty/sekce_ustavy/ustav_chemickyh_leciv/vyuka/molekularni-zaklady-vyvoje-leciv/Studium-biologicky-aktivnich-latek-pomoci-spektroskopie.pdf>.
- [44] PIERNA, J. A. F., O. ABBAS, P. DARDENNE a V. BAETEN. Discrimination of Corsican honey by FT-Raman spectroscopy and chemometrics. *Biotechnologie, agronomie, société et environnement = Biotechnology, agronomy, society and environment: BASE / CRA, Gembloux [et] Gembloux, Faculté universitaire des sciences agronomiques*. 2011, roč. 15, č. 1. ISSN 1370-6233. [online]. [cit. 2012-04-19]. Dostupné z: <<http://popups.ulg.ac.be/Base/document.php?id=6895>>.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

λ	Vlnová délka
E	Energie
f	Frekvence
h	Planckova konstanta
k	Boltzmanova konstanta
m	Hmotnost
p	Indukovaný dipól
μ	Redukovaná hmotnost
v	Vlnočet

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obr. 1. - C. V. Raman [1].....</i>	<i>11</i>
<i>Obr. 2 - První spektra pořizena C. V. Ramanem a K. S. Krišnanem [2]</i>	<i>11</i>
<i>Obr. 3 - Tříhranolový skleněný spektrograf ISP 51 (1959) [3].....</i>	<i>12</i>
<i>Obr. 4 – Schéma rozptylu světla v Ramanově spektroskopii</i>	<i>15</i>
<i>Obr. 5 – Schéma povrchem zesíleného Ramanova rozptylu</i>	<i>17</i>
<i>Obr. 6 – Ramanova spektra nasycených mastných kyselin (a) kys. laurová, (b) kys. myristová, (c) kys. palmitová, (d) kys. stearová [17]</i>	<i>29</i>
<i>Obr. 7 – Sacharóza [20].....</i>	<i>31</i>
<i>Obr. 8 – Ramanova spektra pro fruktózu, glukózu a sacharózu [44]</i>	<i>32</i>
<i>Obr. 9 – Ramanova spektra pro (a) β-karoten, (b) kys. askorbovou, (c) riboflavin, (d) glutathion [26]</i>	<i>36</i>
<i>Obr. 10 – Ramanova spektra (a) vitamínu B3 a (b) pyridoxinu v čistém stavu (25 °C)</i>	<i>37</i>
<i>Obr. 11 - Ramanovo spektrum pro etanol s vrcholem pásu (880 cm^{-1}).....</i>	<i>38</i>
<i>Obr. 12 - Ramanova spektra pro bílé víno, slabé jablečné víno a whisky.....</i>	<i>38</i>
<i>Obr. 13 - Mikro-Ramanova spektra jednotlivých bakteriálních buněk [33]</i>	<i>42</i>
<i>Obr. 14 – Spektrum zkapalněného nikotinu měřeného v tmavě hnědé lahvičce</i>	<i>43</i>
<i>Obr. 15 – Ramanovo spektrum diamantové struktury [35]</i>	<i>45</i>
<i>Obr. 16 – Izolační prohlubeň polovodiče [34]</i>	<i>46</i>
<i>Obr. 17 - Ramanova spektra a) žlutého okru (goethite) a b) hematitu (červeného barviva).....</i>	<i>48</i>
<i>Obr. 18 - Ramanovo spektrum vzorku "Scuola Giordani": goethite (G), calcite (C) and rutile (R)</i>	<i>48</i>
<i>Obr. 19 – Scuola Giordani [39]</i>	<i>48</i>
<i>Obr. 20 – Ramanova spektra pro kokain rozpuštěný v rumu (různé koncentrace) [42]</i>	<i>49</i>

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Příklady využití Ramanovy spektroskopie v potravinách [5].....	21
Tabulka 2: Charakteristické Ramanovy vibrace užitečné pro výklad struktury bílkovin [5].....	24