

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE

## BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Šárka Dominiková

Stanovení methanolu v lihovinách metodami molekulové  
spektrometrie

**vedoucí diplomové práce:**

PharmDr. Ludmila Matysová, Ph.D.

**konzultant:**

RNDr. František Kesner, Ph.D.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové

## **Poděkování**

Ráda bych vyslovila poděkování paní PharmDr. Ludmile Matysové, Ph.D. za věcné připomínky, odborné rady, trpělivost a hlavně skvělou komunikaci při vypracovávání této bakalářské práce.

Velké díky patří také mým konzultantům panu RNDr. Františku Kesnerovi, Ph.D., Ing. Karlu Šecovi, Ph.D. a Ing. Ladislavu Tenklovi za odborné rady a pomoc ve chvílích, kdy tato práce vznikala.

Děkuji také celé své rodině a obzvláště svému manželovi Markovi za velkou podporu, pomoc, pochopení a trpělivost v období mého studia.

# Obsah

1. Cíl a zadání práce.....	6
2. Abstrakt.....	7
Abstract.....	8
3. Seznam zkratk.....	9
4. Úvod.....	10
5. Teoretická část.....	11
5.1 Co je methanol.....	11
5.2 Biotransformace ethanolu a methanolu.....	12
5.3 Doporučení při intoxikaci methanolem.....	13
5.3.1 Příznaky otravy.....	13
5.3.2 Lehká intoxikace.....	13
5.3.3 Těžká otrava.....	13
5.4 Základní informace o destilátech.....	14
6. Základní pojmy a instrumentace.....	16
6.1 Infračervená spektrometrie.....	16
6.1.1 Princip metody.....	16
6.1.2 Infračervené spektrum.....	16
6.1.3 Instrumentace.....	17
6.1.4 Analytické využití.....	18
6.1.5 Měřicí techniky.....	19
6.2 Ramanova spektrometrie.....	20
6.2.1 Rayleighův rozptyl záření.....	20
6.2.2 Ramanův rozptyl záření a princip metody.....	20
6.2.3 Kvantitativní analýza.....	21
6.2.4 Instrumentace.....	21
7. Experimentální část.....	23
7.1 Příprava kalibračních vzorků.....	23

8.	Měření, výsledky a diskuse.....	24
8.1	Měření vzorků - FT-IR spektrometrie .....	24
8.1.1	Metoda používající k výpočtu Lambertova-Beerova zákona. ....	24
8.1.2	Metoda používající k výpočtu větší část infračerveného spektra .....	26
8.2	Měření vzorků Ramanovou spektrometrií .....	29
8.3	Diskuse .....	32
9.	Závěr.....	32
10.	Seznam obrázků .....	33
11.	Seznam tabulek .....	33
12.	Použitá literatura.....	34

## **1. Cíl a zadání práce**

Nejčastěji používanou analytickou technikou pro stanovení obsahu methanolu je plynová chromatografie. Tato technika je velice přesná a citlivá i pro nízké obsahy methanolu. Pro zamýšlený účel rychlého stanovení v lihovinách je však tato metoda relativně časově i finančně náročná. Cílem a zadáním mé bakalářské práce bylo vyhledání a shromáždění informací o spektroskopických metodách, použitých v kauze methanolové aféry – pro kontrolu lihovin na trhu a odhalení možné kontaminace methanolem. Spektroskopické metody jsou ve srovnání s plynovou chromatografií rychlé a levné.

## 2. Abstrakt

Téma mojí předkládané bakalářské práce se zabývá použitím dvou metod vibrační spektrometrie a to infračervené ( IR) a Ramanovy, použitých při analýzách u stanovení methanolu v lihovinách.

Spektroskopické metody mohou velice efektivně pomoci v případech kontroly neznámých, či podezřelých lihovin. Stanovení nebezpečného methanolu v jednotkách až desítkách procent je velice rychlé a pro daný účel i dostatečně přesné.

V praktické části bylo připraveno několik vzorků s různými objemovými koncentracemi methanolu v ethanolu tak, aby výsledná objemová koncentrace alkoholů (methanol a ethanol) byla 40 objemových % a byla změřena jejich spektra výše uvedenými metodami. Pro kvantitativní stanovení byly vybrány hodnoty absorbance v charakteristických oblastech pro methanol. Dále byl pro ilustraci proměřen neznámý vzorek čisté a kontaminované lihoviny.

Pro vyhodnocení spekter bylo využito spektroskopických programů společnosti Thermo Scientific : OMNIC a TQ Analyst.

Klíčová slova : FT-IR spektrometrie, Ramanova spektrometrie, Omnic a TQ Analyst.

## **Abstract**

The topic of my bachelor's thesis is using of two methods of vibrational spectroscopy – infrared and Raman spectroscopy, which were used for determination of methanol in liquors.

Spectroscopic methods should very effectively help in cases of control of unknown or suspect liquors. Determination of dangerous methanol from units to tens percentage is very quick and appropriately precise for the reason.

There were prepared several samples with difference volume assay of methanol and ethanol in practical part of thesis to receive of total volume concentration of alcohol (methanol and ethanol) – 40 % V/V. The spectrum of each prepared samples were measured by the both methods. For quantitative determination was chosen values of absorbance in characteristic areas for methanol. Furthermore were determined unknown samples of liquor. Unknown samples of liquor with addition of methanol were tested at last.

There was used software OMNIC and TQ Analyst of company Thermo Scientific for quantitative determination.

Keywords : FT-IR spectroscopy, Raman spectroscopy, Omnic a TQ Analyst.



### 3. Seznam zkratk

<b>zkratka</b>	<b>význam zkratky</b>	<b>český význam</b>
<b>FT</b>	<i>Fourier Transform</i>	Fourierova transformace
<b>IR</b>	<i>Infrared</i>	infračervený
<b>GC</b>	<i>Gas Chromatography</i>	Plynová chromatografie
<b>ATR</b>	<i>Attenuated Total Reflectance</i>	Celkově zeslabený odraz
<b>ZnSe</b>		Materiál krystalu selenid zinečnatý

## 4. Úvod

Na podzim roku 2012 došlo v Česku k sérii otrav methanolem. Do 29. ledna 2013 na otravu methanolem zemřelo již 47 osob na různých místech republiky a desítky dalších byly hospitalizovány. Mnozí utrpěli trvalé poškození zraku. Policejní pátrání vyústilo v případ s největším počtem obviněných v dějinách české kriminalistiky.

Po 18 dnech od první otravy policie 24. září 2012 oznámila, že kriminalisté objevili zdroj jedovatého methanolu. Methanol podle nich pocházel z ČR, byl řádně zakoupený a dodaný do opavské firmy, odkud putoval na černý trh [1].

V tuto inkriminovanou dobu bylo nutno spotřebitele ochránit před fatálními následky otrav methanolem.

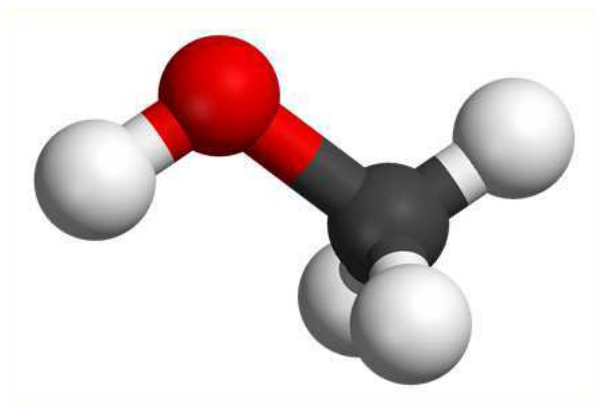
Spektroskopické metody se jevily jako velmi vhodné a rychlé a proto je začali používat vysoké školy, hygienické stanice, policie a týmy lidí, kteří se vydali měřit přímo do terénu.

## 5. Teoretická část

### 5.1 Co je methanol

**Methanol** (*methylalkohol*, triviálně označovaný jako *dřevný líh*) je nejjednodušší jednosytný alkohol. Methanol je čirá bezbarvá, hořlavá kapalina plně mísitelná s vodou a ethanolem. Průmyslově se používá jako rozpouštědlo, palivo, součást nemrznoucích směsí a surovina pro chemický průmysl. V biomedicínských oborech se také používá jako součást fixačních tekutin [2].

Jeho chemický vzorec je **CH<sub>3</sub>OH**.



Obrázek 1 Molekula methanolu

## 5.2 Biotransformace ethanolu a methanolu

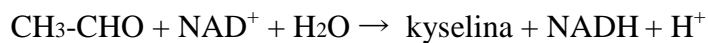
### Ethanol

Klíčovými enzymy alkoholdehydrogenázové cesty odbourávání ethanolu jsou dva jaterní enzymy: cytozolová alkoholdehydrogenáza a mitochondriální aldehyddehydrogenáza. Jejich koenzymy jsou nikotinamidadenindinukleotidy.

**Alkoholdehydrogenáza (ADH)** je oxidoreduktáza katalyzující dehydrogenaci alkoholu na příslušný aldehyd:



**Aldehyddehydrogenáza (ALD)** je oxidoreduktáza katalyzující dehydrogenaci aldehydu na příslušnou karboxylovou kyselinu:



Vzniklý acetaldehyd se přeměňuje acetaldehyddehydrogenázou na octan, který je aerobně odbouráván Krebsovým cyklem až na oxid uhličitý a vodu [3].

### Methanol

Sám o sobě jedovatý není. Jako jiné alkoholy působí excitačně a po velké dávce narkoticky na CNS, ale závažnější je toxicita jeho metabolitů, především kumulace kyseliny mravenčí v sítnici, očním nervu a bazálních gangliích mozku.

Enzymatickou přeměnou alkoholdehydrogenázou vzniká z methanolu formaldehyd a z něho pak aldehyddehydrogenázou kyselina mravenčí. Ta se velmi pomalu oxiduje na oxid uhličitý a vodu, proto se významně kumuluje ve tkáních. Toxická kyselina mravenčí způsobuje nekompensovanou metabolickou acidózu.

### **Toxicita**

Minimální toxická dávka čistého methanolu je asi 0,1 ml/kg, v průměru se udává 10 ml pro dospělého člověka, ale bylo popsáno i oslepnutí po 10 ml a smrt dokonce po 6-10 ml. Hladina methanolu v krvi 200 mg /l již nutně vyžaduje léčbu antidotem. (ethanol, Fomepizol) [4].

## **5.3 Doporučení při intoxikaci methanolem**

### **5.3.1 Příznaky otravy**

Časné neurotoxické působení methanolu podobné alkoholu je sporné. Lokální dráždění sliznic je silnější, hlavní toxické projevy metabolitů nastupují později- za několik hodin (6-12 hod), v kombinaci s alkoholem až za 36 hodin.

### **5.3.2 Lehká intoxikace**

Alkoholové opojení je pozorovatelné již 30 minut po požití kontaminovaného alkoholu. Objevuje se špatná koordinace pohybů, ospalost, útlum, ztížená artikulace.

#### **Projevy v centrální nervové soustavě**

Bolesti hlavy, závratě, slabost, zmatenost, poruchy paměti.

#### **Oční poruchy**

Mlhavé vidění, fotofobie, rozšířené zornice, porucha barevných vjemů.

#### **Metabolické poruchy**

Dochází k poklesu pH, acidóza se rozvíjí již v období latence (podle tvorby metabolitů). Tato doba se ale někdy prodlouží až na 24-48 hod. Nastává hyperventilace, zvýšení nejprve osmolálního, později aniontového gapu. Acidóza znamená závažnější intoxikaci.

#### **Projevy poškození trávicího traktu**

Nauzea, zvracení, bolesti břicha, průjem.

### **5.3.3 Těžká otrava**

#### **Projevy v centrální nervové soustavě**

Poruchy vědomí až kóma, křeče následkem edému mozku nebo plic.

#### **Oční poruchy**

Po vysokých dávkách vzácně už během několika hodin dochází ke snížené ostrosti a ztrátě barevného vidění, k tzv. vizi „sněžného pole“, ztrátě zorného pole - slepotě a k degradaci zrakového nervu.

### **Metabolické poruchy**

Pokračuje prohlubování metabolické acidózy (není-li zároveň podán ethanol), v těžkých případech dochází k renálnímu selhání i multiorgánovým dysfunkcím.

### **Projevy poškození trávicího traktu**

Někdy akutní pankreatitida, přechodná lehká porucha jaterních funkcí.

### **Oběhové projevy**

Hypotenze, tachykardie, bradykardie, dysrytmie, dušnost, cyanóza, edém plic. Bylo popsáno i těžké, ale reverzibilní srdeční selhání a EKG abnormality. U těžkých otrav hrozí smrt dechovým, méně často cirkulačním selháním.

### **Možné následky při přežití otravy**

Poruchy zraku až slepota, neurologické extrapyramidové poruchy jako jsou: parkinsonismus-třes, ztuhlost, bradykineze, změny osobnosti a jiné.

### **Špatné prognostické známky při otravě**

Křeče, kóma, šok, přetrvávající acidóza, bradykardie, renální selhání, jestliže je terapie zahájena až za 8-10 hodin nebo více po požití methanolu, je-li hladina kyseliny mravenčí v krvi nad 500 mg/l [4].

## **5.4 Základní informace o destilátech**

Methanol je v nízkých koncentracích přirozenou složkou lihovin, vyrobených řádným způsobem, jeho obsah v lihovinách je závislý na typu lihoviny. Lihoviny vyrobené z jemného nebo velejemného lihu mohou obsahovat stopy methanolu, oproti tomu lihoviny typu ovocných destilátů mají maximální obsah methanolu stanoven zněním nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č.110/2008. Methanol vzniká hydrolýzou pektinů ovoce, které bylo použito ke kvašení. Jiným významným zdrojem methanolu v destilátech může být rozklad dalších přirozených složek ovoce, zejména anthokyanových barviv a podobných látek při kvašení zejména barevného ovoce. Obsah methanolu v destilátu může být také ovlivněn způsobem destilace, kdy oddělením většího objemu první části destilátu, tzv. úkapu, dochází ke snížení obsahu methanolu v destilátu.

Kvasné lihy, potravinářské lihy se připravují kvašením surovin obsahujících cukry nebo škrob, např. cukrové řepy, cukrové třtiny, brambor nebo obilí. Kvasný líh také obsahuje nízké koncentrace methanolu, které se ještě snižují dalším čištěním (destilací, použitím aktivního uhlí), rafinované lihy jemný a velejemný obsahují jen stopy methanolu.

V ovocných destilátech vyrobených ze sliv, mirabelek, švestek, jablek, hrušek, malin, ostružin, meruněk a broskví je přirozený obsah methanolu vyšší, může být podle výše uvedeného nařízení okolo 12 g na litr čistého lihu (100%). Pro ovocné destiláty vyrobené z hrušek odrůd "Williams", červeného a černého rybízu, jeřabin, kdoulí, bezinek, bobulí jalovce platí norma pro obsah methanolu do 13,5 g na litr čistého lihu. Ostatní ovocné pálenky musí obsahovat nižší množství methanolu než 1g na litr čistého lihu. Limity s výjimkou ostatních ovocných pálenek jsou poměrně vysoké a vyhoví jim i ne úplně správně vyrobený destilát s podílem „úkapu“.

Hranice nebezpečnosti pro člověka je individuální, ale v destilátech významně převládá ethanol, který je metabolizován přednostně. Případy úmrtí nebo významného poškození zdraví nemohou být způsobeny lihovinami vyrobenými kvasnou cestou, ale přidavkem methanolu do lihoviny nebo úplnou záměnou kvasného lihu za methanol při výrobě lihovin.

Pokud se pomine negativní vliv samotného ethanolu na zdraví, jsou destiláty z ověřených zdrojů (kvalifikovaná výroba, destilace v pěstitelských pálenicích) bezpečné a není nutné je analyzovat.

Jiná situace je u tzv. ostatních lihovin, které se vyrábějí z kvasného lihu ředěním vodou na přijatelný obsah lihu, přidavkem trestí a dalších složek jako jsou vodka, rum, zelená a podobné produkty. Výroba nezahrnuje destilaci, ale jenom míchání dovezených surovin. Příčinou současných problémů je s největší pravděpodobností záměna kvasného lihu (ethanolu) za methanol ve výrobnách černého trhu lihovin. V oficiálních výrobnách lihovin- v likérkách, v pěstitelských pálenicích, lihovarech se vůbec s methanolem nepracuje, nepoužívá se, tudíž nemůže dojít k záměně ani přidavku. Ale výrobný černého trhu pracují na jiných principech, podle jiných postupů, obvykle nevyhovují požadavkům na podobné provozy.

V tomto smyslu je jediným vodítkem znalost zdroje lihoviny a zejména ostražitost k levným výrobkům, rozlévaným lihovinám, lihovinám v podezřelých obalech. V minulých letech byly zachyceny i okolkované láhve ve stejných lahvích se stejnou falšovanou etiketou i s falšovaným kolkem, které pro laika jsou k nerozeznání od výrobku poškozené likérky [5].

## 6. Základní pojmy a instrumentace

### 6.1 *Infračervená spektrometrie*

#### 6.1.1 Princip metody

Principem infračervené spektrometrie je absorpce infračerveného záření molekulami látek.

Abychom získali infračervené spektrum analyzované látky, musí být splněno základní výběrové pravidlo což je změna dipólového momentu.

Jestliže není toto pravidlo splněno, analyzovaná látka neposkytuje infračervené spektrum.

Příkladem takovýchto látek jsou biatomické molekuly např.  $O_2$ ,  $N_2$ , atd.

Infračervené záření má větší vlnovou délku a nižší energii než záření ultrafialové a viditelné. Pokrývá část elektromagnetického spektra v intervalu vlnových délek od 0,75 do 1000  $\mu\text{m}$ . V případě infračervené spektrometrie se jako jednotky vlnové délky používají její reciproké hodnoty tzv. vlnčet.

Infračervenou oblast zpravidla rozdělujeme na tři části:

- Blízkou infračervenou oblast v rozsahu 12800 – 4000  $\text{cm}^{-1}$
- Střední infračervenou oblast v rozsahu 4000 – 400  $\text{cm}^{-1}$
- Vzdálenou infračervenou oblast v rozsahu 400 – 10  $\text{cm}^{-1}$

Pro použití v praxi je nejdůležitější střední infračervená oblast v intervalu 4000 – 400  $\text{cm}^{-1}$ . [6]

#### 6.1.2 *Infračervené spektrum*

Energie infračerveného záření již nestačí na změny elektronových stavů, jako je to v případě ultrafialového a viditelného záření. Záření způsobuje pouze změny stavů vibračních a rotačních, které se pohybují na nižší energetické hladině. Proto infračervená absorpční spektra jsou spektra vibračně rotační.

V infračervených spektrech sledujeme závislost transmitance nebo absorbance na vlnočtu absorbovaného záření. Spektrum je pásové, kde jednotlivé absorpční pásy odpovídají jednotlivým vibračním nebo rotačním přechodům. [6]



Transmittance (propustnost) při průchodu světelného paprsku o intenzitě ( $I_0$ ) vrstvou absorbujícího prostředí tloušťky ( $d$ ) se část absorbuje a část o intenzitě ( $I$ ) vychází. Mezi uvedenými veličinami platí vztahy:

$$T = I/I_0$$

T=transmittance

100.T=propustnost v %

$$A = \log 1/T$$

A=absorbance

[12]

Pro kvantitativní účely využíváme absorbanci, která je lineární funkcí koncentrace.

Infračervené spektrum ve střední infračervené oblasti rozdělujeme na dvě základní části.

- Oblast skupinových vibrací

Mezi vlnočty  $4000 - 2500 \text{ cm}^{-1}$  nacházíme absorpční pásy různých funkčních skupin, proto tuto oblast využíváme pro identifikaci těchto skupin v molekule organické látky. Hodnoty těchto vibrací jsou ovlivněny strukturním okolím dané skupiny, např. přítomností konjugovaných násobných vazeb, pnutím cyklických systémů, přítomností jiných vibrujících skupin stejného atomu, interakcemi vodíkových vazeb apod.

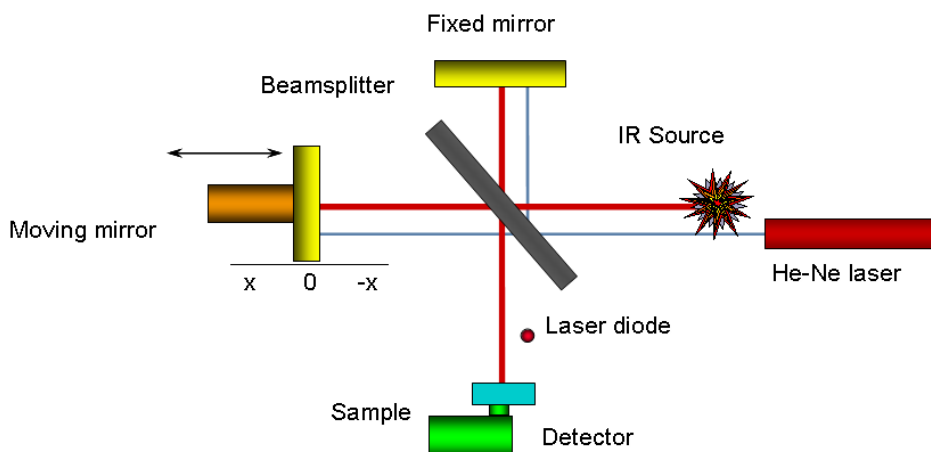
- Oblast otisků prstů

Mezi vlnočty  $2000$  až  $400 \text{ cm}^{-1}$  nacházíme pásy deformačních a kombinačních vibrací funkčních skupin, které jsou velmi silně ovlivněny okolními vazbami a celou strukturou molekuly. Protože jsou tyto vibrace určeny vibračním chováním celé molekuly, nenajdeme dvě látky se shodným spektrem v této oblasti - z toho vzniká pojmenování oblast otisků prstů[6].

### 6.1.3 Instrumentace

Pro měření infračervených spekter ve střední infračervené oblasti se v současnosti téměř výhradně používají spektrometry s Fourierovou transformací (FTIR spektrometry). Základní součástí tohoto spektrometru je tzv. interferometr Michelsonova typu. Ten pracuje na principu interference záření z polychromatického zdroje. Jedna část paprsku, který dopadá na polopropustný dělič paprsků (pro střední infračervenou oblast se používá jako materiál KBr/Ge), se od něj odráží na pevné zrcadlo pod definovaným úhlem. Z pevného zrcadla se odráží a vrací zpět k děliči paprsků. Druhá část paprsku prochází přes polopropustný dělič a dopadá na pohyblivé zrcadlo. Opět se odráží zpět a na děliči se setkává s paprskem odraženým od pevného

zrcadla, kde s ním interferuje. Interferující se paprsky zesilují, či zeslabují podle frekvence záření, která je dána polohou pohyblivého zrcadla. Zpracovaný signál – interferogram je matematickým postupem, kterému se říká Fourierova transformace (FT) přepočítán na jednopaprskové infračervené spektrum[6]. Poměr jednopaprskových spekter pozadí a analyzovaného vzorku potom dává klasické absorpční infračervené spektrum.



**Obrázek 2 Schéma FTIR spektrometru**



Single Reflection ATR Plate

**Obrázek 3 Detailní fotografie ATR krystalu [10]**

### 6.1.4 Analytické využití

Infračervená spektrometrie se používá v kvalitativní i kvantitativní analýze. Nejdůležitější je použití ve strukturní analýze a identifikaci organických i anorganických sloučenin. Knihovna spekter je zpravidla součástí používaného software a program s ní porovnává spektrum naměřeného vzorku. Jednotlivé pásy se přiřazují vibračním funkčním skupinám podle vlnočtů, zkoumají se různé vlivy struktury molekuly a

charakteru vzorku na polohu a tvar pásu. V kvantitativní analýze se pak využívá Lambertova-Beerova zákona.[6]

$$A = \epsilon \cdot c \cdot l$$

**A - absorbance**

$\epsilon$  = molární absorpční koeficient [L.cm<sup>-1</sup>.mol<sup>-1</sup>]

c = molární koncentrace [mol.L<sup>-1</sup>]

l = tloušťka vrstvy [cm] [12]

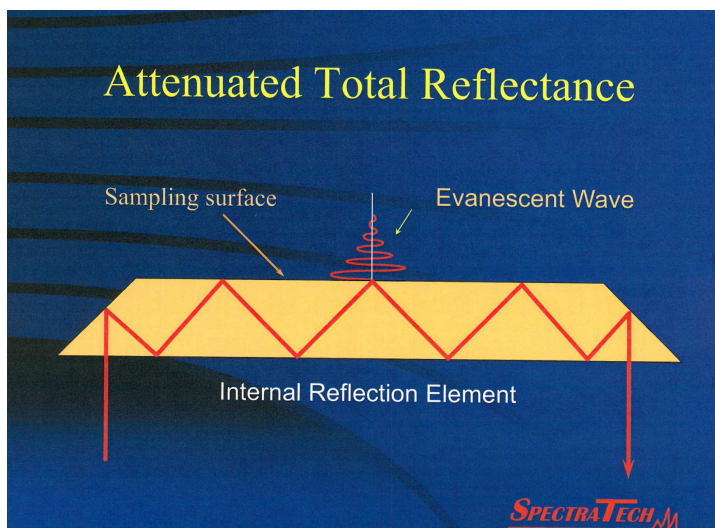
Mohou být využity i jiné chemometrické metody, které nepracují s jednotlivými izolovanými pásy, ale s celými spektrálními regiony, kde se mohou jednotlivé absorpční pásy ovlivňovat.

U techniky FTIR s využitím počítačového zpracování dat lze kvantitativně analyzovat i vícesložkovou směs změřením jednoho spektra.

### 6.1.5 Měřicí techniky

Pro měření lze použít buď klasického průniku záření vzorkem, který je připraven smísením se zhruba stonásobným množstvím bromidu draselného a vylisováním tablety. Ta je pak umístěna v kyvetovém prostoru do dráhy paprsku. Podobně lze použít pro kapalně vzorky speciálních kyvet vyrobených lisováním bromidu draselného, či chloridu sodného. Vzorek v takovéto kyvetě pak tvoří tenkou zhruba milimetrovou vrstvu.

Dále byla vypracována řada technik na odraz, které dovolují analýzu materiálů, jimiž infračervené záření neprochází. Rozšířenou technikou je zeslabená úplná reflektance (Attenuated Total Reflectance – ATR). Vzorek pokrývá povrch krystalu propustného pro infračervené záření ( SeZn, AgCl, Si, safír atp.). Do krystalu vstupuje paprsek infračerveného záření pod takovým úhlem, který zajišťuje totální odraz na jeho protilehlých plochách. Paprsek odrazy prostupuje krystalem na druhý konec, kde krystal opouští. Je-li horní plocha krystalu pokryta vzorkem, proniká záření částečně do něj. Absorbuje-li určité vlnové délky, ochuzuje příslušnou složku infračerveného záření při jeho cestě krystalem a vzniká klasické infračervené spektrum měřeného vzorku. Toto technikou lze měřit vzorky jak kapalného, tak pevného skupenství. U pevných látek je nutno zajistit dobrý kontakt vzorku s krystalem jeho přitisknutím na krystal [6].



Obrázek 4 Schéma průniku záření ATR krystalem [11]

## 6.2 Ramanova spektrometrie

### 6.2.1 Rayleighův rozptyl záření

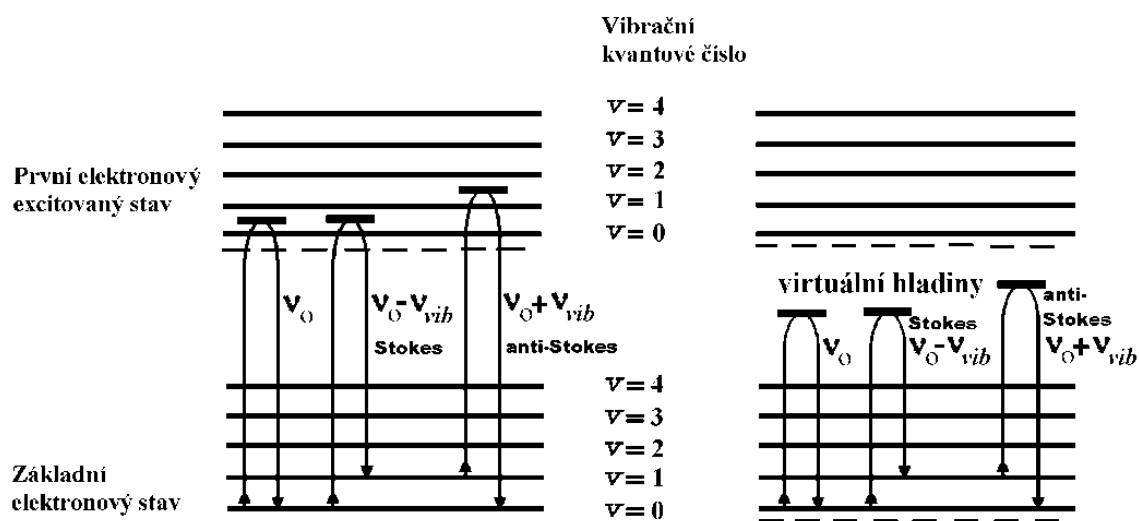
Pokud je zvoleno monochromatické záření o takové vlnové délce, které není vzorkem absorbováno a není tedy schopno excitovat elektron. Průchod tohoto záření ale může rozkmitat molekulu. Nepochopitelná molekula je schopna se v elektrickém poli polarizovat a vytvořit indukovaný dipól. Svým polem tak může účinkovat na molekulu i elektromagnetické záření. Molekula převezme energii fotonu. Přebytkovou energii pak ihned ztrácí vyzářením záření stejné frekvence, ale nižších amplitud a vrací se do původního energetického stavu. Toto se nazývá Rayleighův rozptyl. Tento druh rozptýlené záření je dominantní a pro naše účely nevhodné a proto se ho snažíme co nejlépe odfiltrovat. [6].

### 6.2.2 Ramanův rozptyl záření a princip metody

Ramanova spektrometrie se zabývá rozptýleným světlem, které vznikne po ozáření analyzované látky intenzivním monochromatickým světlem. Tímto zdrojem bývá zpravidla laser. V Ramanově spektrometrii se jedná o nepružný rozptyl světla. Po interakci záření se vzorkem se molekuly vzorku rozkmitají a zaujmou jiný vibrační a rotační stav. Tato změna však nastane jiným mechanismem než v případě infračervené spektrometrie, v níž dojde k tomuto stavu přímo absorpcí záření.

V Ramanově spektrometrii si jev lze představit také tak, že došlo k nepružné srážce fotonu s molekulou, při které si foton ponechal část energie molekuly. Polarizovatelnost molekuly je tedy podmínkou pro aktivity vibrace v Ramanově spektrometrii.

V Ramanově spektru se nacházejí pásy s nižší energií rozptýleného záření než je energie dopadajícího záření, které souvisí s návratem molekuly na vyšší vibrační hladinu, než byla původní (Stokesův pás) a pásy s vyšší energií než byla energie dopadajícího záření (Anti-Stokesův pás) [6].



**Excitace ve viditelné oblasti      v blízké infračervené oblasti**

Obrázek 5 Schématické znázornění energetických přechodů - Ramanův a Rayleighův rozptyl[10]

### 6.2.3 Kvantitativní analýza

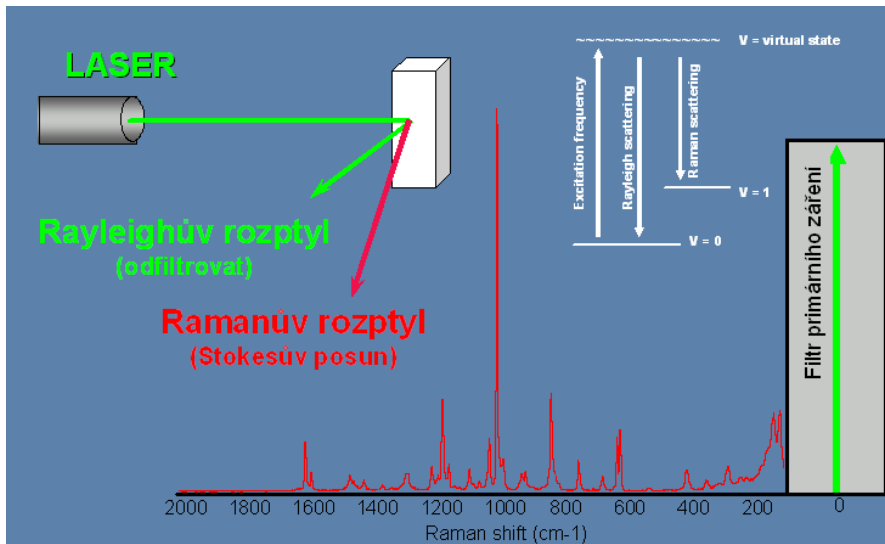
Při využití Ramanovy spektrometrie v kvantitativní analýze je potřeba počítat s řadou specifických faktorů jako například stabilní hodnota výkonu laseru, vlivy reabsorpce rozptýleného záření, hloubka průniku excitujícího záření do vzorku. Velmi často se korigované hodnoty ploch pásů vztahují k hodnotě plochy pásu vnitřního standardu nebo poměr pásů jednotlivých složek směsi [8].

### 6.2.4 Instrumentace

Pro Ramanovu spektrometrii se využívá spektrometrů disperzních, nebo spektrometrů s Fourierovou transformací (FT). Hlavními součástmi takovýchto spektrometrů jsou: zdroj excitujícího záření (laser), vzorkový prostor, sběrná optika (monochromátor nebo filtr), disperzní prvek (mřížka nebo hranolový monochromátor) nebo interferometr (FT spektrometry) a detektor.

Ramanova spektra se nejčastěji měří se vzorky umístěnými v uzavřené vzorkové komoře. Vzorky můžeme měřit pomocí nejrůznějších nástavců v různých držácích vzorků (mikrotablety, skleněné vzorkovnice). Takto se dají měřit jak vzorky kapalného, plynného, či pevného skupenství.

Z rozptýleného záření je nutno nejprve odfiltrovat pružný Rayleighův rozptyl. Pro potlačení tohoto rozptylu se zpravidla používají holografické filtry, nebo premonochromátory [8].



Obrázek 6 Schématické znázornění principu Ramanovy spektroskopie [11]



Obrázek 7 Disperzní Ramanův spektrometr – NICOLET DXR [9]

## 7. Experimentální část

### 7.1 Příprava kalibračních vzorků

Předpokládáme, že při výrobě pančovaných lihovin dochází k smísení podílu methanolu a ethanolu tak, aby výsledná koncentrace obsahu celkového alkoholu byla přibližně 40 objemových %. Připravili jsme tedy celkově 9 kalibračních standardů obsahujících různé množství methanolu. Do 100 ml odměrné baňky jsme vždy pipetovali přesné množství čistého methanolu a ethanolu. Poté jsme odměrnou baňku doplnili vodou po značku. Výsledné koncentrace standardních vzorků jsou uvedeny v následující tabulce 1. Vzhledem k požadované přesnosti jsme při výpočtu koncentrace nezohledňovali skutečný obsah alkoholů, ale počítali jsme je jako 100 %.

Tabulka 1 Tabulka kalibračních standardů

Analytická data pro sestavení kalibrační křivky obsahu methanolu v testovaném vzorku		
objemový obsah složky v kalibračním roztoku		
Methanol (≥99,5% extra pure Ph Eur, Merck, šarže I682718 317)	Ethanol ( ≥96 %, Merck, šarže 3403380)	Destilovaná voda
0	40	60
2	38	60
5	35	60
8	32	60
10	30	60
12	28	60
14	26	60
16	24	60
20	20	60

## 8. Měření, výsledky a diskuse

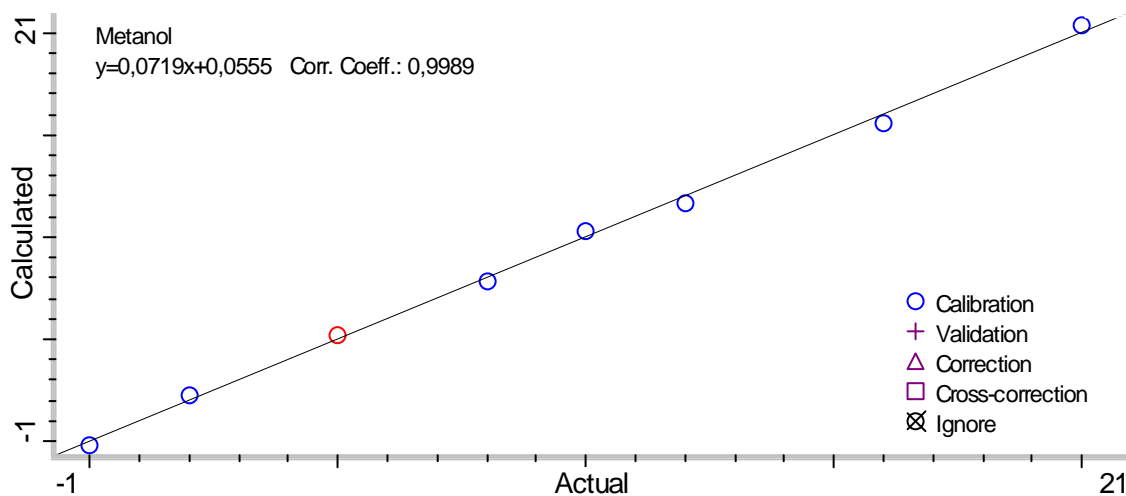
### 8.1 Měření vzorků - FT-IR spektrometrie

Pro měření vzorků byl použit jednodrazový ATR nástavec se ZnSe krystalem. Kvantitativní stanovení jsme provedli za pomoci programu TQ Analyst společnosti Thermo Scientific. Naměřené kalibrační standardy jsme vyhodnotili dvěma zvolenými metodami a porovnali jejich vhodnost.

#### 8.1.1 Metoda používající k výpočtu Lambertova-Beerova zákona.

Pro sestavení kalibrační křivky se využívá závislosti hodnoty absorbance ve zvolené oblasti na koncentraci stanovované látky (Lambertův – Beerův zákon). Hodnota absorbance je korigována na základní linii, jejíž parametry jsou v metodě rovněž zadány (Obrázek 9).

Korelační koeficient křivky Actual versus Calculated = 0,9989.



Obrázek 8 Kalibrační křivka sestavená z infračervených spekter s výpočtem podle Lambertova-Beerova zákona

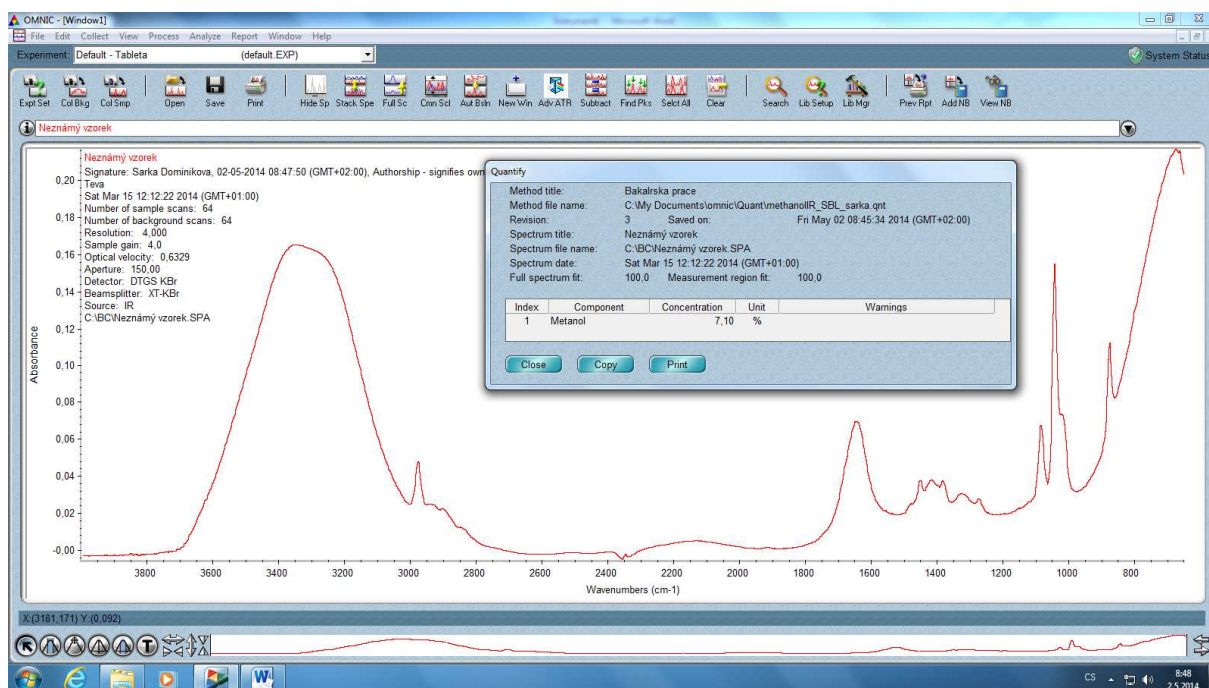


Pro výpočet byl zvolen výběr pásu methanolu v oblasti 1006,26– 1031,09 cm<sup>-1</sup>.

Region								
Index	Region Type	Location	% or Ht	Baseline Type	Point 1	Point 2	Offset	Baseline ID
1	Spectrum Range	1 006.26		Two points	939.16	1 062.59		
		1 031.09		Average in range	983.52	1 072.23		

**Obrázek 9** Spektrální rozsah pro výpočet podle Lambertova- Beerova zákona

Pro ověření správnosti stanovení byl stejným postupem jako u kalibračních standardů připraven vzorek o koncentraci 7,0 objemových % a následně proměřen. Výsledek 7,1 objemových % potvrdil vhodnost metody pro měření methanolem kontaminované lihoviny [13].

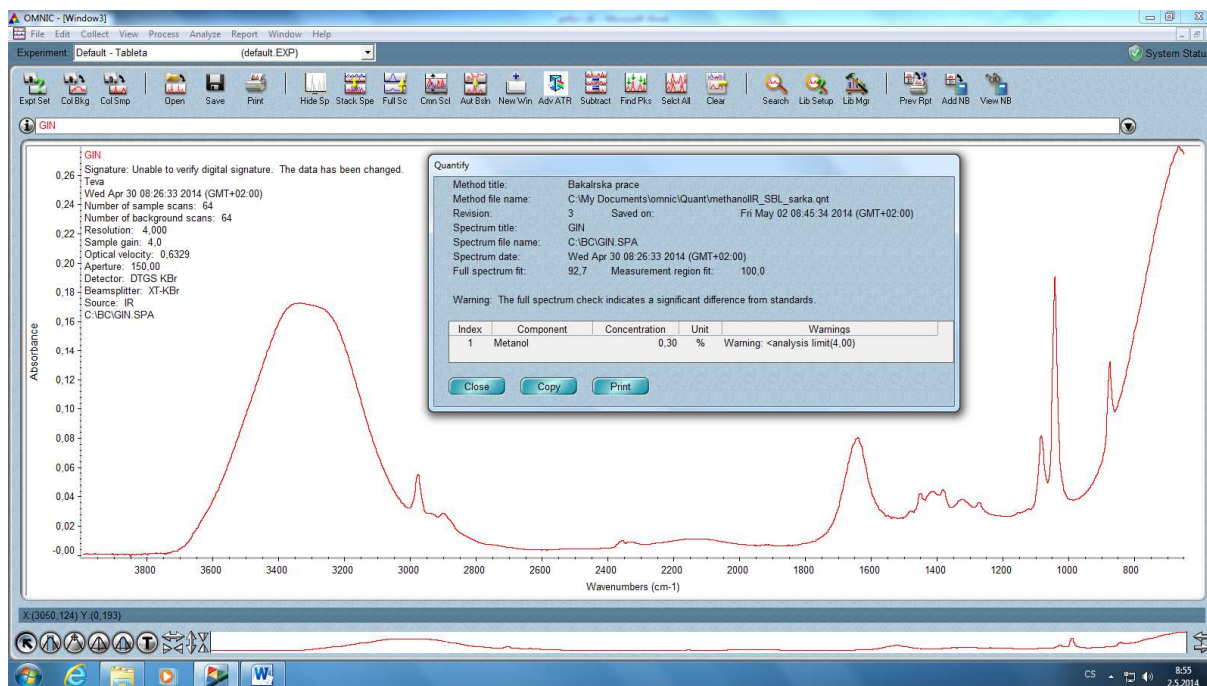


**Obrázek 10** Kvantifikace ověřeného vzorku podle Lambertova- Beerova zákona

Dále byl analyzován vzorek 40% okolkované lihoviny – Gin. Nalezená koncentrace methanolu byla 0,3 objemová %. Nepřesnost této spektrometrické metody se projeví u měření nízkých koncentrací pod cca 2%. Ke zpřesnění metody by mohlo částečně přispět použití víceodrazové ATR, které má intenzivnější spektra než jednoobrazové ATR. U víceodrazového ATR je mez detekce a chybovost metody menší než u jednorázového ATR.

Metoda s jednorázovým ATR není tedy vhodná pro stanovení nízkých koncentrací methanolu v destilátech, protože i dávky, které jsou pod mezí detekce mohou být smrtelné. Metoda byla připravena pouze jako ukázková.

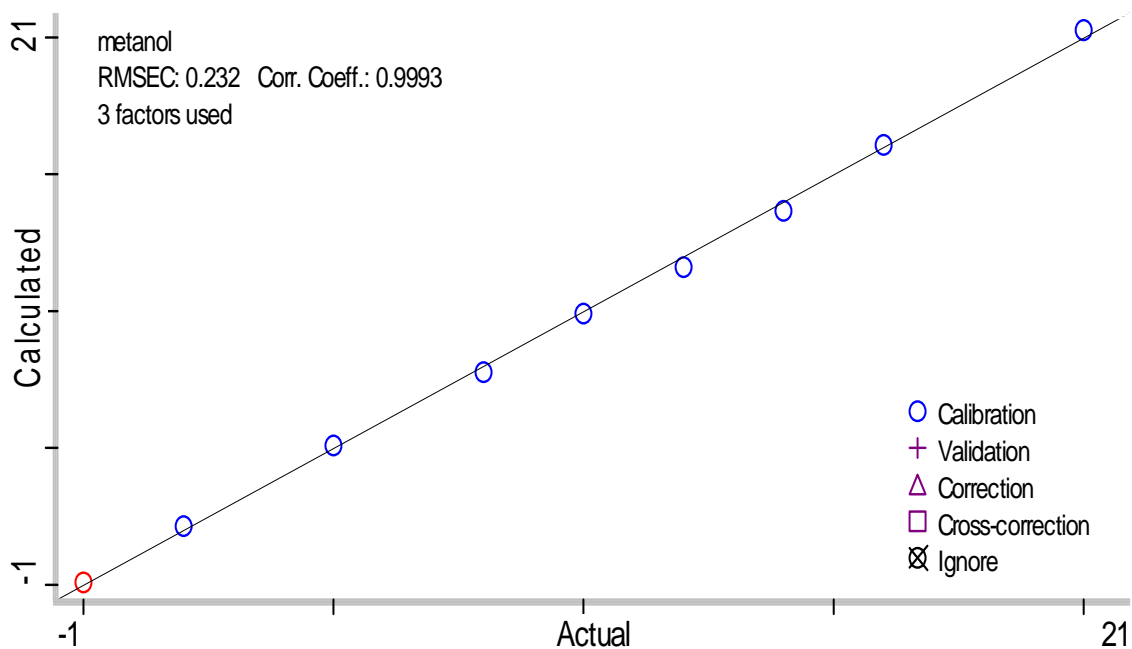
V praxi, při testování methanolu v lihovinách, bylo použito víceodrazové ATR.



Obrázek 11 Kvantifikace lihoviny - GIN podle Lambertova- Beerova zákona

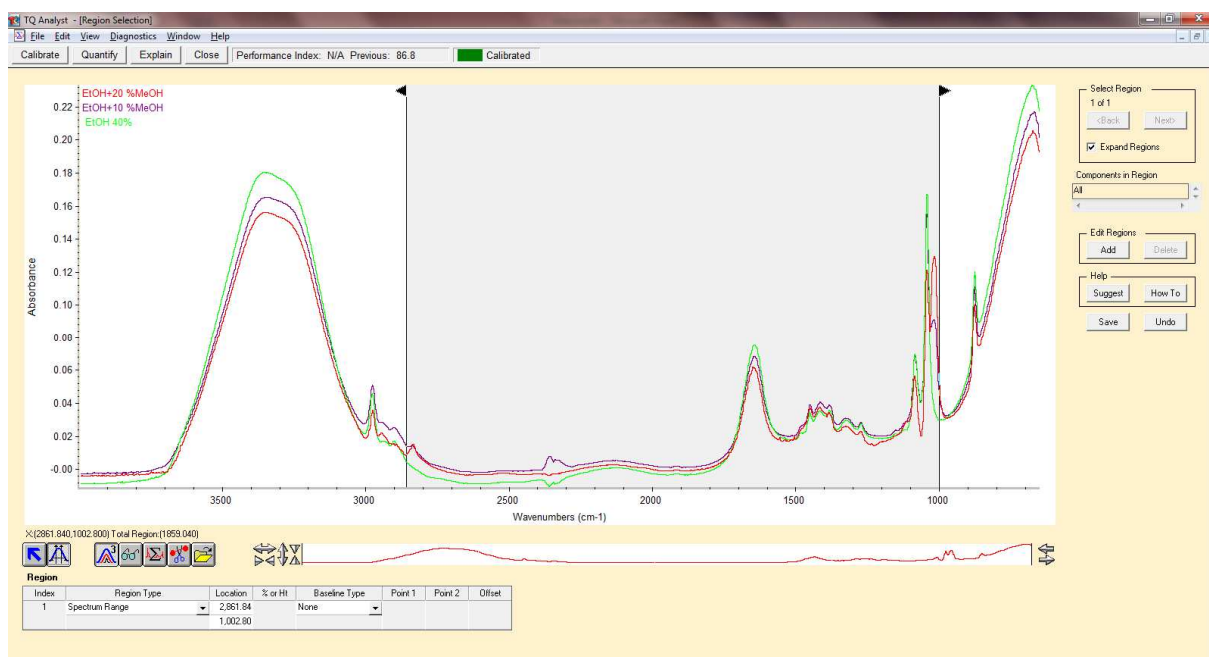
### 8.1.2 Metoda používající k výpočtu větší část infračerveného spektra

Jinou kvantitativní metodou, kterou program TQ Analyst umožňuje provést kalibraci a následně kvantifikovat množství nežádoucího methanolu v lihovinách, je metoda, která využívá většího rozsahu změřeného spektra ve vztahu s definovanou koncentrací stanovované látky daného vzorku. Místo hodnoty absorbance se vytvoří matice změřených datových bodů vybrané části spektra. Tato matice bodů je pak vztažena ke koncentraci analytu. Pro výpočet jsme použili stejné naměřené kalibrační vzorky jako v předchozím případě za použití metody podle Lambertova-Beerova zákona. Jak je zřejmé z přiložené kalibrační křivky hodnota korelačního koeficientu je 0,9993, z čehož vyplývá, že zvolená metodika vykazuje ještě lineárnější výsledky.



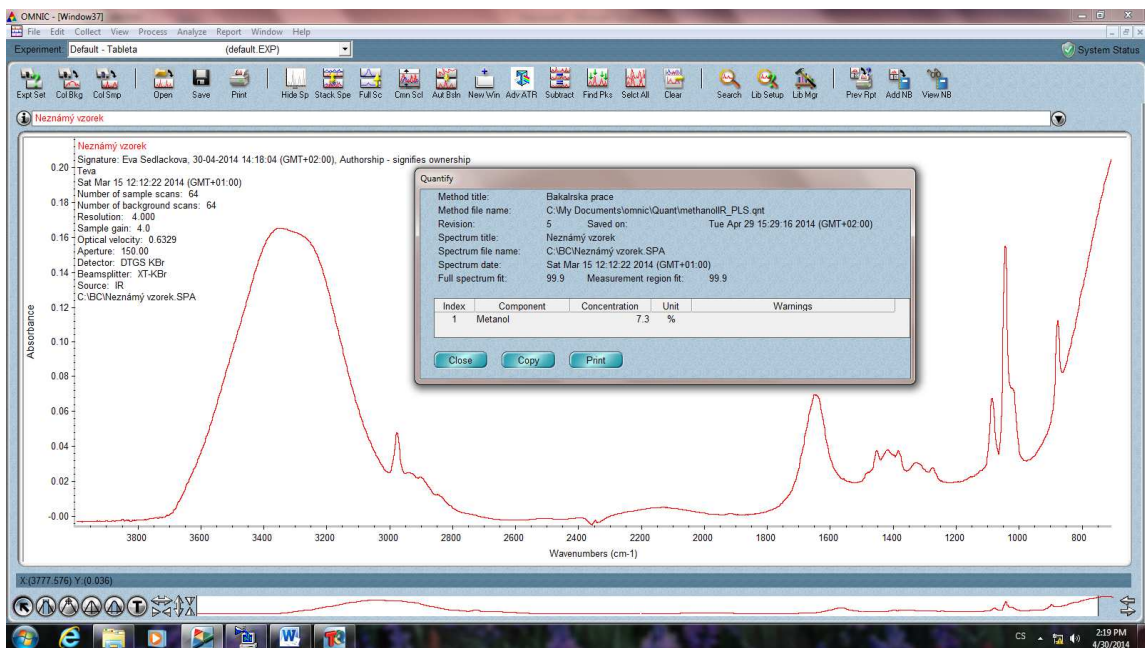
**Obrázek 12** kalibrační křivka FTIR sestavená z infračervených spekter podle matice datových bodů

Pro vytvoření kalibračního modelu se použily data v rozsahu spektra 2861,84 - 1002,8 cm<sup>-1</sup>.



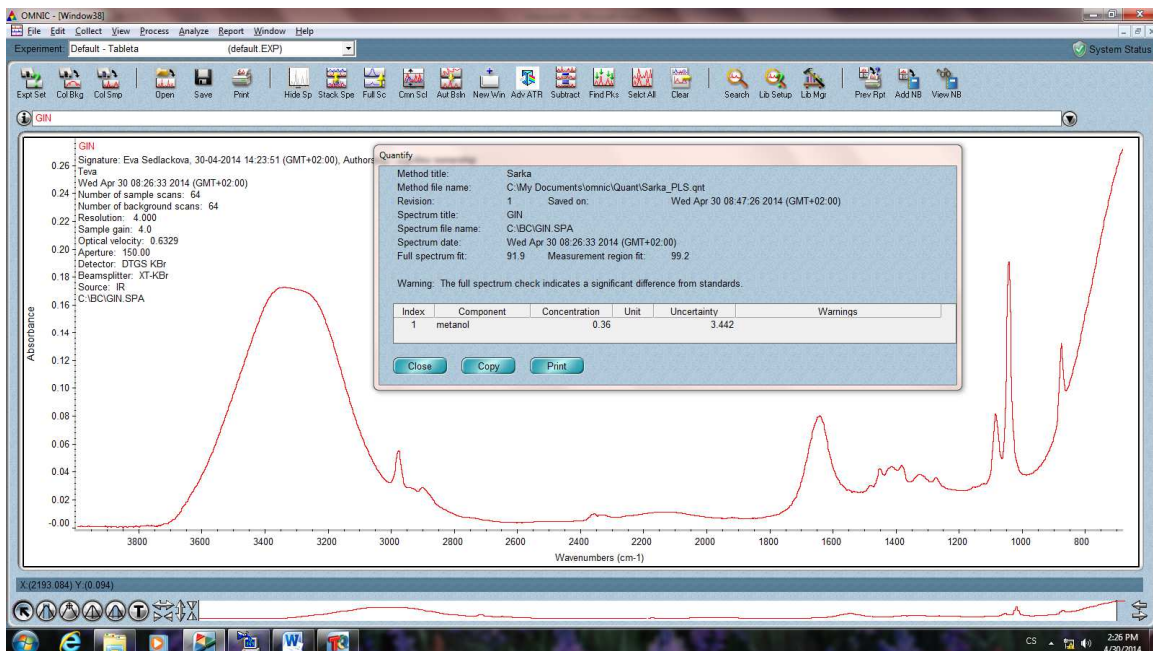
**Obrázek 13** Spektrální rozsah pro vytvoření kalibračního modelu podle matice datových bodů

Opět bylo provedeno stanovení obsahu vzorku o připravené koncentraci 7,0 objemových %. Výsledek 7,3 objemových % opět potvrdil vhodnost metody pro methanolem kontaminované lihoviny jako v kvantitativním modelu vytvořeném pomocí Lambertova-Beerova zákona.



Obrázek 14 Kvantifikace ověřeného vzorku podle matice datových bodů.

Naměřené infračervené spektrum čisté lihoviny – GIN bylo rovněž podrobena kvantifikaci touto metodou s výsledkem 0,4 objemových %. Tento výsledek lze použít k demonstraci toho, že zvolená spektrometrická metoda je vhodná pro odhalení pančovaných lihovin vyšším obsahem methanolu. Postrádá však přesnost v nízkých koncentracích na úrovni jednotek procent a níže.

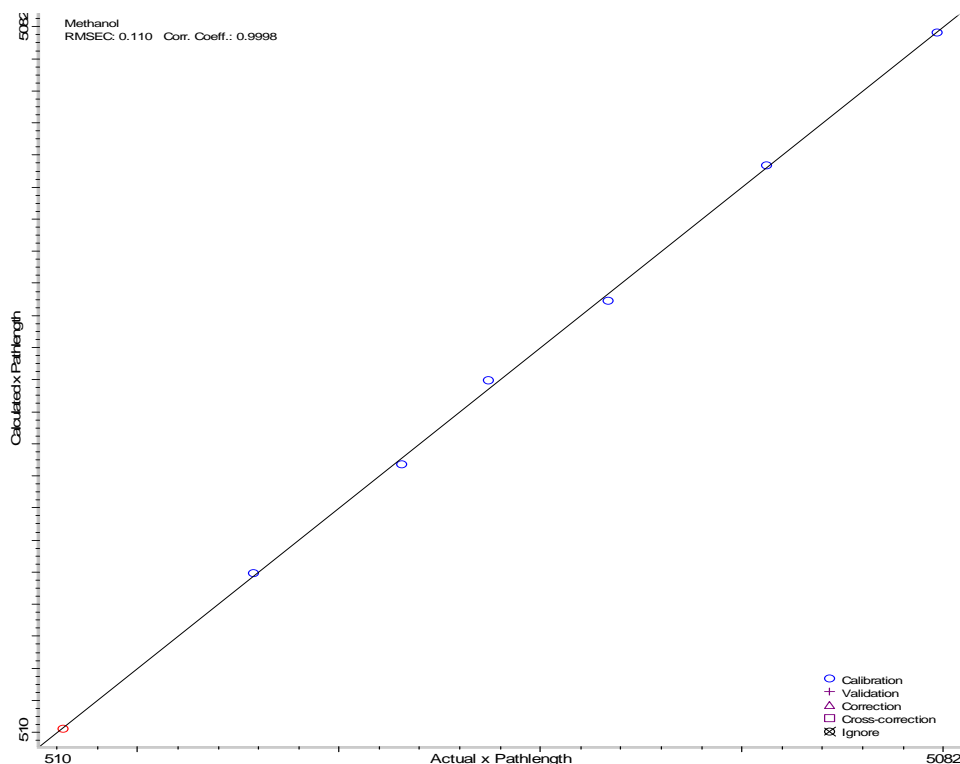


Obrázek 15 Kvantifikace lihoviny - GIN podle matice datových bodů.

## 8.2 Měření vzorků Ramanovou spektrometrií

Na rozdíl od FT-IR spektrometrie (kde výška pásu je přímo úměrná koncentraci) v Ramanově spektroskopii hraje roli několik dalších faktorů, např.: intenzita excitačního laseru, fokuse na vzorek, velikost dopadajícího paprsku na vzorek atd. Pro kvantitativní Ramanovu spektroskopii se tedy většinou nepoužívá jeden vybraný pás, ale poměr dvou pásů. Výsledkem dělení dvou pásů je pak bezrozměrná veličina, která je přímo úměrná koncentraci.

Stejně jako v případech infračervené spektrometrie jsme použili předem připravené kalibrační standardy uvedené v kapitole 8.1. Pro měření jsme už neměli k dispozici vzorky o nulové koncentraci methanolu a koncentraci 14 objemových %. Z vypočítané kalibrační křivky ale můžeme vidět opět podobnou přesnost metody jako v případech IR spektrometrie. Korelační koeficient, jako ukazatel přesnosti, je 0,9998 [8].



Obrázek 16 kalibrační závislost Ramanových spekter vzorků etanolu kontaminovaných metanolem

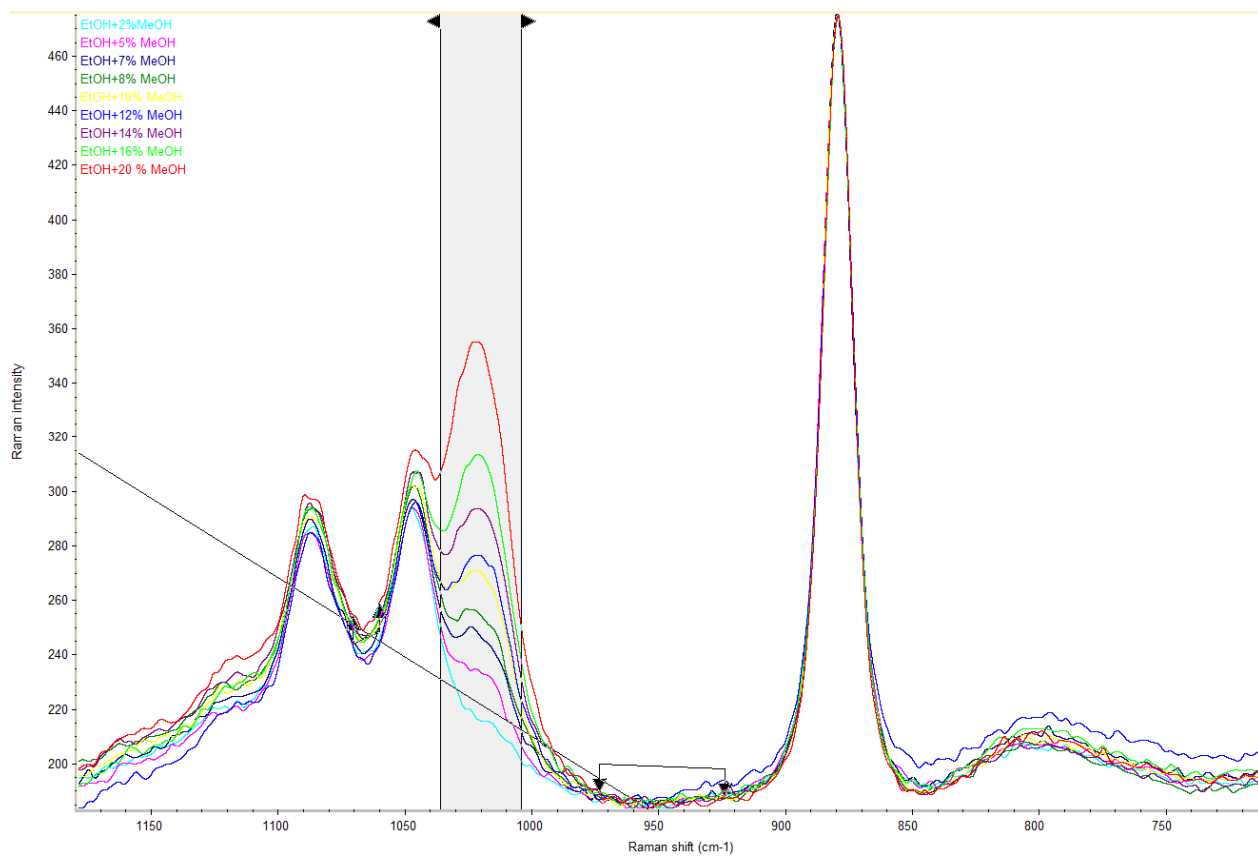
Pro výpočet kalibrační křivky je v této metodě vybrána korigovaná plocha charakteristického pásu methanolu  $1036,28 - 1004,46 \text{ cm}^{-1}$ s normalizací na pás ethanolu  $889,89 - 874,29 \text{ cm}^{-1}$  [13].

**Region**

Index	Region Type	Location	% or Ht	Baseline Type	Point 1	Point 2	Offset	Baseline ID
1	Area	1 036.28		Two points	1 060.38	924.43		
		1 004.46		Minimum in range	1 070.99	973.60		

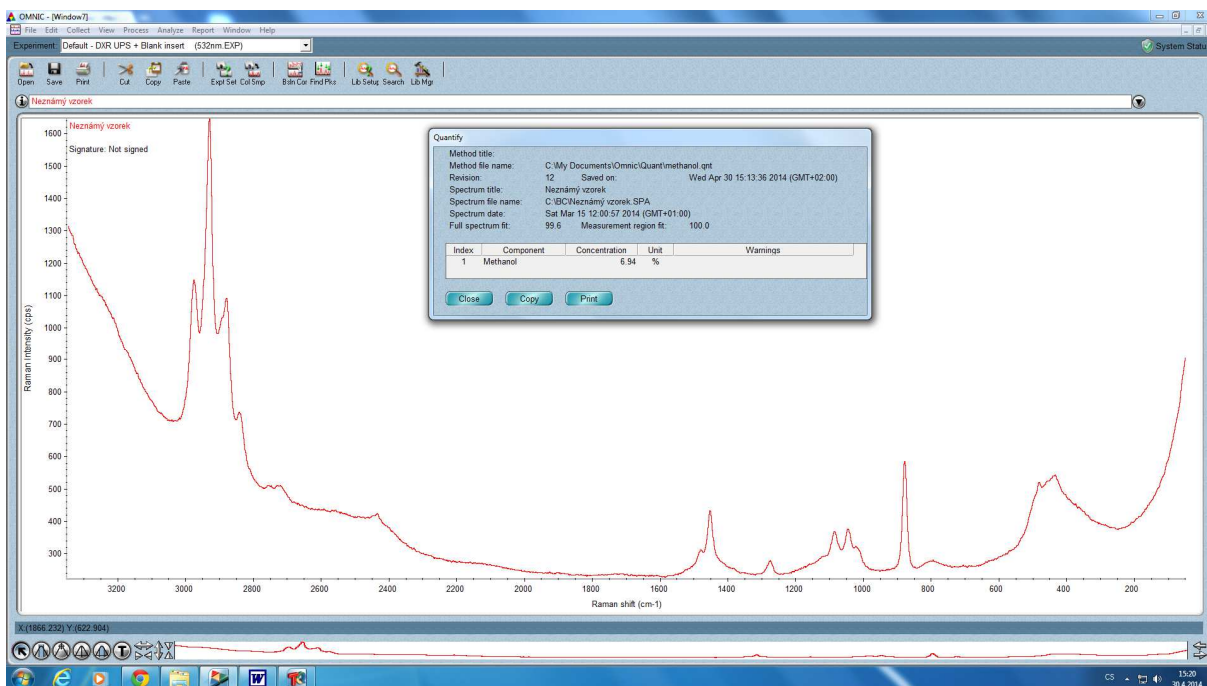
**Region**

Index	Region Type	Location	% or Ht	Baseline Type	Point 1	Point 2	Offset	Baseline ID
1	Ave height in range	874.29		Two points	923.46	825.11		
		884.89		Minimum in range	964.92	854.04		



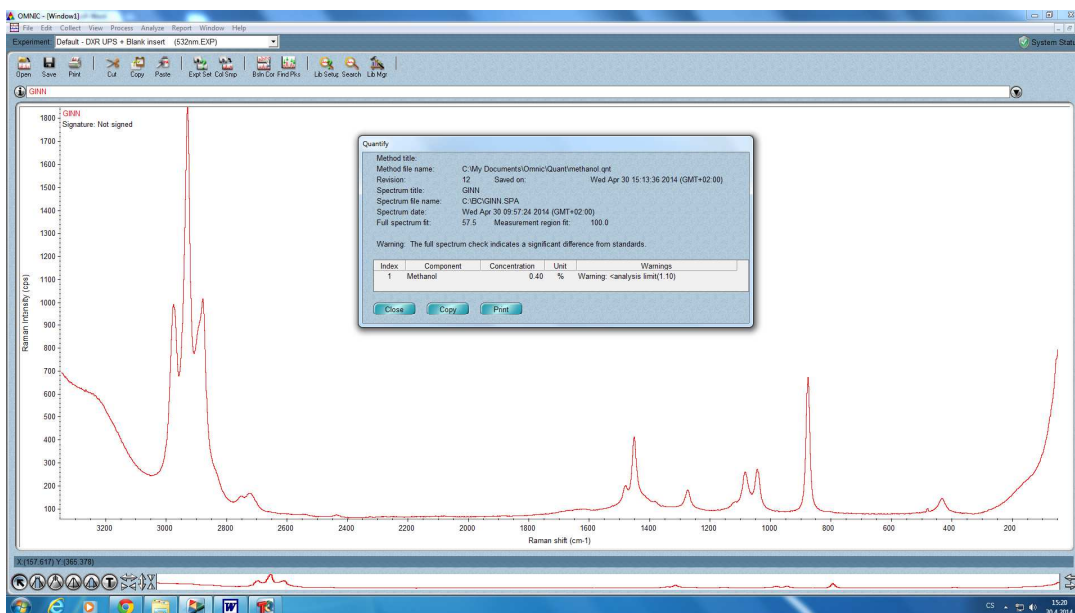
**Obrázek 17** Volba spektrálního regionu pro tvorbu kalibračního modelu z Ramanových spekter.

Měřením ověřovacího vzorku o připravené koncentraci 7,0 objemových % jsme obdrželi výsledek 6,9 objemových %. Můžeme tedy potvrdit, že i v případě použití Ramanovy spektrometrie dosahujeme obdobnou přesnost stanovení methanolu v kontaminovaných lihovinách.



**Obrázek 18** Kvantifikace ověřeného vzorku u Ramanovy spektrometrie.

Chtěli jsme ověřit i v případě Ramanovy spektrometrie, jak je metoda citlivá na čisté, nekontaminované vzorky proměřením spektra ověřené lihovin – GIN. I v tomto případě nám vyšel výsledek 0,40 objemových %. Dokazuje to i zde, že pro koncentrace v úrovních pod 2 objemová % je už metoda značně nepřesná.



**Obrázek 19** Kvantifikace ověřené lihoviny – GIN u Ramanovy spektrometrie.

### **8.3 Diskuse**

Cílem práce bylo ověřit vhodnost molekulární spektrometrie jako kvantitativní metody pro rychlé a levné identifikování pančovaných lihovin, které se objevily na trhu s fatálními následky. Obě metody, jak metoda infračervené spektrometrie, tak Ramanovy spektrometrie nám potvrdily, že je lze výhodně použít pro tyto zmiňované účely. Z výsledků experimentálních zkoušek můžeme konstatovat, že nejsou významné rozdíly u obou metod. Výhodou Ramanovy spektrometrie je možnost měření vzorku přes skleněný obal, tedy i přes samotnou láhev. U metody infračervené spektrometrie jsme měli k dispozici pouze jednodrazový krystal. Pro zcitlivění výsledků by určitě bylo vhodné použít jiný krystal s víceodrazovou plochou pronikající záření. Pro přesné stanovení nízkých až limitních koncentrací methanolu je bezesporu vhodnější metoda plynové chromatografie.

## **9. Závěr**

Metody předvedené v mojí bakalářské práci byly využity v době, kdy se na našem trhu objevilo množství alkoholu s příměsí různě velkých dávek methanolu. Normované chromatografické metody jsou přesné a citlivé, ale drahé. Spektroskopické metody jsou rychlé a levné avšak málo přesné. Vliv na přesnější spektroskopické stanovení mají např. cukry v likérech a jejich barva. Vzorky z poslední methanolové aféry obsahovaly vysoké koncentrace methanolu. Běžné byly poměry ethanol:methanol 1:1 až 1:2. Ve 40% lihovině se tudíž objevovalo např. 20 % methanolu. V této kauze našly spektroskopické metody své místo a využití a pomohly tak zkontrolovat velké množství lahví s nepředvídatelným obsahem.



## 10. Seznam obrázků

Obrázek 1 Molekula methanolu.....	11
Obrázek 2 Schéma FTIR spektrometru .....	18
Obrázek 3 Detailní fotografie ATR krystalu [10].....	18
Obrázek 4 Schéma průniku záření ATR krystalem [11] .....	20
Obrázek 5 Schématické znázornění energetických přechodů - Ramanův a Rayleighův rozptyl[10].....	21
Obrázek 6 Schématické znázornění principu Ramanovy spektroskopie [11] .....	22
Obrázek 7 Disperzní Ramanův spektrometr – NICOLET DXR [9].....	22
Obrázek 8 Kalibrační křivka sestavená z infračervených spekter s výpočtem podle Lambertova-Beerova zákona .....	24
Obrázek 9 Spektrální rozsah pro výpočet podle Lambertova- Beerova zákona .....	25
Obrázek 10 Kvantifikace ověřeného vzorku podle Lambertova- Beerova zákona.....	25
Obrázek 11 Kvantifikace lihoviny - GIN podle Lambertova- Beerova zákona .....	26
Obrázek 12 kalibrační křivka FTIR sestavená z infračervených spekter podle matice datových bodů .....	27
Obrázek 13 Spektrální rozsah pro vytvoření kalibračního modelu podle matice datových bodů .....	27
Obrázek 14 Kvantifikace ověřeného vzorku podle matice datových bodů.....	28
Obrázek 15 Kvantifikace lihoviny - GIN podle matice datových bodů. ....	28
Obrázek 16 kalibrační závislost Ramanových spekter vzorků etanolu kontaminovaných metanolem .....	29
Obrázek 17 Volba spektrálního regionu pro tvorbu kalibračního modelu z Ramanových spekter. ....	30
Obrázek 18 Kvantifikace ověřeného vzorku u Ramanovy spektrometrie.....	31
Obrázek 19 Kvantifikace ověřené lihoviny – GIN u Ramanovy spektrometrie. ....	31

## 11. Seznam tabulek

Tabulka 1 Tabulka kalibračních standardů.....	23
---	----

## 12. Použitá literatura

- [1]Methanolová aféra v Česku ) [\[online\]](#). [cit. 2014-04-015].Dostupný z www:  
[http://cs.wikipedia.org/wiki/Methanolova\\_afera\\_v\\_Cesku](http://cs.wikipedia.org/wiki/Methanolova_afera_v_Cesku)
- [2]Methanol wikiskripta [\[online\]](#). [cit. 2014-04-015]. Dostupný z www:  
<http://www.wikiskripta.eu/index.php/Methanol>
- [3]EHRMANN Jiří, SCHNEIDERKA Petr, EHRMANN Jiří. *Alkohol a játra*. 1. vyd. Praha: Grada, 2006, 166 s., [16] s. barev. obr. příl. Malá monografie (Grada). ISBN 80-247-1048-X.
- [4]Odborné doporučení TIS METHANOL-odborne-doporuceni-TIS-akt-10-10-2012.pdf [\[online\]](#).  
[cit. 2014-04-016].Dostupný z www: <http://www.tis-cz.cz/images/stories/PDFs/methanol2/METHANOL-odborne-doporuceni-TIS-akt-10-10-2012.pdf>
- [5]Základní informace o destilátech. [\[online\]](#). [cit. 2014-04-020].Dostupný z www:  
[http://www.vscht.cz/homepage/Aktuality\\_archiv/2012/vysvetleni\\_destilaty](http://www.vscht.cz/homepage/Aktuality_archiv/2012/vysvetleni_destilaty)
- [6]KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2003. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003, 132 s. ISBN [80-863-6907-2](#).
- [7]*Český lékopis 2009*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, 2009, 1176 s. ISBN 978-802-4729-947
- [8]RAMANOVA SPEKTROMETRIE Dendisová Marcela, Žvátora Pavel, Matějka Pavel  
[\[online\]](#). [cit. 2014-03-010]. Dostupný z www: <http://www.vscht.cz/anl/lach2/RAMAN.pdf>
- [9]Pokročilé spektroskopické metody analýzy léčiv [\[online\]](#). [cit. 2014-04-016].Dostupný z www: <http://www.vscht.cz/anl/matejka/Leciva-02-Raman-11.pdf>
- [10]Pokročilé spektroskopické metody analýzy léčiv [\[online\]](#). [cit. 2014-04-016].Dostupný z www: <http://www.vscht.cz/anl/matejka/Leciva-01-IR-11.pdf>
- [11]Stanovení methanolu v lihovinách metodami molekulové spektrometrie.pdf. Novotná Miroslava, Samsonek Jiří, Pásztor.Ján. Přednáška poskytnuta firmou NICOLET
- [12]KARLÍČEK, Rolf. *Analytická chemie pro farmaceuty*. 2. vyd. Praha: Karolinum, 2005, 281 s. ISBN 80-246-0348-9.
- [13]Spektroskopický software TQ Analyst stručný návod společnosti Thermo Scientific, Nicolet