

**Univerzita Karlova  
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové  
Katedra analytické chemie**

**Využití Ramanovy spektrometrie pro analýzu vybraných  
směsí**

(diplomová práce)

Vedoucí diplomové práce: Doc. PharmDr. Hana Sklenářová, Ph.D.

Hradec Králové 2017

Bc. Martina Procházková

Prohlášení:

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 .....

.....

Bc. Martina Procházková

**Poděkování:**

Na tomto místě bych ráda poděkovala doc. PharmDr. Haně Sklenářové, Ph.D. za cenné rady, trpělivost a odborné vedení této diplomové práce.

Dále bych chtěla poděkovat své rodině za podporu a umožnění studia na farmaceutické fakultě, a v neposlední řadě i svým spolužákům a přátelům, kteří mi byli během studia významnou oporou.

# Abstrakt

Univerzita Karlova  
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové  
Katedra analytické chemie

Kandidát: Bc. Martina Procházková

Školitel: Doc. PharmDr. Hana Sklenářová, Ph.D.

Název diplomové práce: Využití Ramanovy spektrometrie pro analýzu vybraných směsí

Byla testována identifikace a stanovení obsahu methanolu a ethanolu pomocí Ramanovy spektroskopie. Pro toto testování byly připraveny dva typy kalibračních standardů. Objemy použitých chemikálií byly nastaveny tak, aby výsledná koncentrace alkoholů odpovídala 40 objemovým %. U prvního typu kalibrace se lišilo množství methanolu a ethanolu, v druhém případě bylo odlišné jen množství methanolu.

Měření probíhalo na disperzním přenosném Ramanově spektrometru s excitační vlnovou délkou laseru 785 nm. Byl testován vliv podmínek měření na linearitu získaných kalibračních závislostí při hodnocení intenzitou signálu a plochou daného pásu ve spektru. Takto byl testován vliv integračního času (1000 ms, 2500 ms, 5000 ms a 7500 ms), intenzity laseru (100 a 75 %) a teploty (laboratorní a 4-8 °C). Kalibrační standardy a vzorky byly měřeny ve skleněných vialkách.

Pro identifikaci byla porovnávána celá spektra analyzovaných látek. Pro vyhodnocení linearitu kalibračních závislostí byla použita metoda nejmenších čtverců a kalibrační závislosti byly vyhodnoceny plochou vybraného intenzivního pásu a jeho intenzitou. Linearitu pro všechny podmínky měření splňovala pouze závislost plochy pásu. Pro stanovení analytů byly zvoleny následující podmínky: integrační čas 5000 ms, 100 % intenzita laseru a laboratorní teplota.

U sedmi testovaných lihovin bylo stanoven množství ethanolu. Obsah methanolu a dalších nejčastějších příměsí stanoven nebyl, žádná z testovaných látek (ethylacetát, isoamylalkohol, isobutanol) nebyla při porovnání se standardy ve spektru nalezena.

Dále byla testována identifikace a stanovení obsahu cukrů (glukóza, fruktóza) v sirupech. U sedmi vybraných vzorků byly identifikovány a stanoveny obě látky. V domácím višňovém likéru byl identifikován a stanoven ethanol a identifikovány oba typy cukrů.

## Abstract

Charles University  
Faculty of Pharmacy in Hradec Králové  
Department of Analytical Chemistry

Candidate: Bc. Martina Procházková

Supervisor: Doc. PharmDr. Hana Sklenářová, Ph.D.

Title of diploma thesis: Application of Raman spectrometry for analysis of selected mixtures

The identification and determination of methanol and ethanol using Raman spectroscopy was tested. For such tests two types of calibration standards were prepared. The volumes of analytes used were adjusted to get the final concentration of the alcohols corresponding to 40 volume %. In the first type of calibration varied amounts of methanol and ethanol were applied, in the second different amount of methanol was used.

Measurement was carried out using portable dispersive Raman spectrometer with laser with an excitation wavelength of 785 nm. The effect of the measurement conditions to linearity of the calibration obtained in the evaluation of the signal intensity and the area of the intense band in the spectrum were tested in detail. Measurement conditions included the integration time (1000 ms, 2500 ms, 5000 ms and 7500 ms), the laser intensity (100 and 75%) and temperature (laboratory and 4-8 °C). Calibration standards and samples were measured in glass vials.

To identify the analytes whole Raman spectrum was compared. To compare the linearity of the calibration using the partial least squares the calibration curves were evaluated by an area of selected intense band and its intensity. Linearity for all measurement conditions met only evaluation by band area. Following conditions were chosen for the determination of analytes: integration time of 5000 ms, 100% laser intensity and laboratory temperature.

The amount of ethanol was determined in seven tested spirits. The content of methanol and other impurities was not determined, none of the tested substances (ethyl acetate, isoamyl alcohol, isobutanol) was found in the spectrum.

The identification and determination of sugars (glucose, fructose) in syrups were tested too. Seven selected samples were analyzed, sugars were identified and determined. In the house-made cherry liqueur sugars were identified and ethanol determined.

## Obsah

1	Úvod.....	1
2	Cíl a popis zadání práce .....	2
3	Teoretická část .....	3
3.1	Ramanova spektroskopie .....	3
3.2	Interpretace Ramanových spekter .....	4
3.2.1	Identifikace vybraných látek stanovovaných v této práci.....	5
3.3	Instrumentace .....	5
3.4	Princip měření .....	6
3.5	Využití v analýze různých druhů látek.....	7
3.5.1	Výhody Ramanovy spektrometrie .....	7
3.5.2	Nevýhody Ramanovy spektrometrie .....	7
3.6	Základní informace o methanolu v destilátech .....	8
3.7	Výroba ovocných destilátů a výskyt nežádoucích složek v destilátech.....	9
3.8	Přehled stanovení vybraných látek pomocí Ramanovy spektrometrie .....	10
4	Experimentální část.....	13
4.1	Použité chemikálie .....	13
4.2	Přístrojové vybavení.....	13
4.3	Příprava kalibračních roztoků .....	13
4.4	Postup měření.....	15
5	Výsledky a diskuze .....	16
5.1	Testování měření Ramanova spektra methanolu a ethanolu v odměrných baňkách a ve skleněných vialkách .....	16
5.2	Kalibrace methanolu a ethanolu-změna obsahu obou látek.....	17
5.2.1	Kalibrace methanolu a ethanolu při 100 % intenzitě laseru a integračním čase 1000 ms.....	17
5.2.2	Kalibrace methanolu a ethanolu při 100 % intenzitě laseru a integračním čase 2500 ms při laboratorní teplotě .....	20
5.2.3	Kalibrace methanolu a ethanolu při 100 % intenzitě laseru a integračním čase 2500 ms za teploty 4-8 °C.....	21
5.2.4	Kalibrace methanolu a ethanolu při 100 % intenzitě laseru a integračním čase 5000 ms.....	25
5.2.5	Kalibrace methanolu a ethanolu při 75 % intenzitě laseru a integračním čase 5000 ms.....	27

5.2.6	Kalibrace standardů methanolu a ethanolu při 100 % intenzitě laseru a integračním čase 7500 ms .....	29
5.2.7	Výběr optimálních podmínek pro uvedené kalibrační závislosti.....	31
5.3	Kalibrace methanolu a ethanolu - změna obsahu methanolu.....	32
5.3.1	Kalibrace methanolu při 100 % intenzitě laseru a integračním čase 1000 ms .....	32
5.3.2	Kalibrace standardu methanolu při 100 % intenzitě laseru a čase 2500 ms . .....	34
5.3.3	Kalibrace standardu methanolu při 75 % intenzitě laseru a integračním čase 2500 ms .....	35
5.3.4	Kalibrace standardu methanolu při 100 % intenzitě laseru a integračním čase 5000 ms .....	37
5.3.5	Kalibrace standardu methanolu při 100 % intenzitě laseru a integračním čase 7500 ms .....	39
5.3.6	Výběr optimálních podmínek pro uvedené kalibrační závislosti.....	40
5.4	Stanovení ethanolu ve vybraných alkoholických nápojích.....	41
5.4.1	Nejčastěji se vyskytující nečistoty ve vybraných alkoholických nápojích.....	42
5.5	Souhrn výsledků.....	45
5.6	Přesnost kvantitativní Ramanovy spektrometrie.....	46
5.7	Identifikace a stanovení glukózy a fruktózy ve vybraných vzorcích sirupů ....	48
5.7.1	Identifikace Ramanových spekter standardů glukózy a fruktózy.....	48
5.7.1.1	Kalibrace standardu glukózy při 100 % intenzitě laseru a integračním čase 5000 ms .....	48
5.7.1.2	Kalibrace standardu fruktózy při 100 % intenzitě laseru a integračním čase 5000 ms .....	50
5.7.2	Stanovení glukózy a fruktózy ve vybraných sirupech .....	51
6	Závěr .....	54
7	Použitá literatura .....	55

## **Seznam použitých zkratk:**

CCD	plošný, obrazový detektor (charge coupled device)
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie (high performance liquid chromatography)
GC	plynová chromatografie (gas chromatography)
ES	Evropské společenství
CNS	centrální nervová soustava
PLS	metoda nejmenších čtverců (partial least squares)
PSA	analýza hlavních komponent (principal component analysis)
SD	směrodatná odchylka (standard deviation)
RSD	relativní směrodatná odchylka (relative standard deviation)



## 1 Úvod

Praktické aplikace spektroskopických metod zahrnujících i Ramanovu spektroskopii musí splňovat citlivost a selektivitu pro dané analytické použití. Ramanova spektrometrie je proto nejvíce využívána pro snadnou a rychlou identifikaci látek. V oblasti citlivých stanovení není možné stanovovat velmi nízké koncentrace, většinou se citlivost i přesnost pohybuje řádově v procentech. Proto je Ramanova spektroskopie vhodnou alternativní metodou pro stanovení ethanolu a vyššího obsahu methanolu v alkoholických nápojích na rozdíl od časově a finančně náročnější plynové chromatografie, protože je velmi rychlá, levná a lze ji využít i pro měření v terénu.

Největší uplatnění našla Ramanova spektroskopie v methanolové aféře, která se odehrála v České republice na podzim 2012. Ve výrobcích bylo obsaženo vysoké množství methanolu, a to v poměru ethanol:methanol 1:1 až 1:2. Pro tuto aplikaci byla Ramanova spektroskopie první volbou pro snadné a rychlé rozlišení lihovin s vyšším obsahem methanolu bez nutnosti odběru a úpravy analyzovaných vzorků.

## **2 Cíl a popis zadání práce**

Cílem této diplomové práce je prokázat, že Ramanova spektroskopie je vhodnou analytickou technikou pro identifikaci a stanovení methanolu a ethanolu v ovocných destilátech, které byly vyrobeny palírnami v ČR, a také u lihovin, které byly zakoupeny v obchodě. Pro stanovení methanolu a ethanolu bude nutné nalézt optimální podmínky pro měření i vyhodnocení kalibrace pomocí Ramanovy spektroskopie, bude testován vliv různých podmínek měření (integrační čas, intenzita laseru, teplota). Dále bude zvoleno vyhodnocení kalibrace, splňující požadavky pro linearitu. U vybraných lihovin bude testována také identifikace příměsí, které se nejčastěji v destilátech vyskytují. V druhé části bude testována identifikace a stanovení vybraných cukrů (glukóza a fruktóza), vyskytujících se v ovocných sirupech.

## 3 Teoretická část

### 3.1 Ramanova spektroskopie

Jedná se o optickou metodu vibrační molekulové spektroskopie, která je založena na jevu neelastického optického rozptylu. Byla pojmenována po jejím vynálezci, indickém fyzikovi Čandrašékharu Venkatau Ramanovi. Slouží pro identifikaci látek, při určování jejich složení a struktury.

Princip metody spočívá v tom, že na analyzovaný vzorek dopadá světelné záření. Část záření je látkou absorbováno, další část látkou pronikne a poslední část je rozptýlena. Rozptyl záření způsobí v molekule změnu energetických hladin vazebných elektronů. Vzniká při elastických srážkách fotonů s molekulami vzorku a s jejich vibrujícími kovalentními chemickými vazbami, tak při neelastických srážkách, kdy dochází k poklesu frekvence rozptýleného záření, které vzniklo těmito srážkami [1, 2, 3, 4, 5].

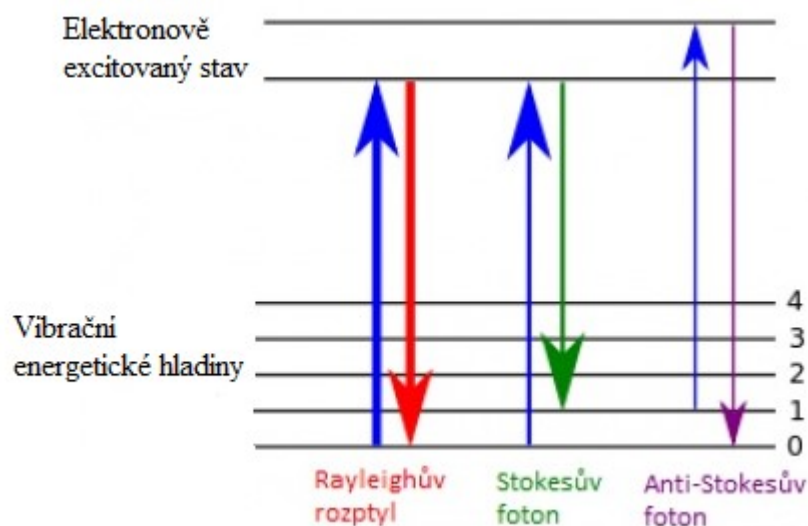
Rayleighův rozptyl spočívá v tom, že foton z monochromatického záření laseru se srazí s molekulou analyzované látky, a dochází tak k rozptylu záření. Během srážky molekula dosáhne excitovaného stavu, ale téměř okamžitě se vrací na základní energetickou hladinu. Vše je způsobeno tzv. pružnou (elastickou) srážkou mezi fotonem vstupujícího záření a molekulou látky, kdy se energie nemění a u vzniklého rozptýleného záření nedochází ke změně vlnové délky.

Pro analýzu je tento druh záření nevyhovující, proto musí být potlačeno pomocí holografických filtrů, nebo premonochromátorů [2, 6, 7].

U malé části vstupujícího záření se foton neelasticky (nepružně) srazí s molekulou. Dopadající foton předá část své energie molekule, nebo naopak energii přijme od molekuly. Při tomto typu srážky se mění pouze vnitřní energie, která způsobuje přechod z nižšího do vyššího vibračně-rotacího stavu, nebo z vyššího do nižšího energetického stavu molekuly. Rozptýlené záření má rozdílnou vlnovou délku od původního záření. Tento jev se nazývá Ramanův rozptyl. Rozdíl frekvencí vstupujícího tzv. budícího záření a rozptýleného je označován termínem Ramanův posun. Ve spektru ho najdeme pod určitou vlnovou délkou příslušného pásu.

Nepružná srážka fotonu vstupujícího záření s molekulou způsobí snížení, nebo zvýšení energie fotonu. Jestliže foton má nižší energii, předal takové kvantum své energie molekule, aby mohla přejít do vyššího vibračně-rotacího stavu. Nižší energie i frekvence fotonu se ve spektru projeví pásem směrem k větším vlnovým délkám v tzv. Stokesově oblasti.

V opačné situaci má foton po srážce s molekulou vyšší energii i frekvenci. Molekula uvolnila kvantum při přechodu z vyšší vibračně-rotací energetické hladiny na nižší. V Ramanově spektru bude daný pás s vyšší energií posunut k vyšším vlnovým délkám, neboli ke kratším vlnovým délkám (tzv. anti-Stokesový posun) [2, 3, 5, 7].



**Obrázek 1** Přechody mezi vibračními hladinami excitovaných molekul [8]

### 3.2 Interpretace Ramanových spekter

Měřenou látku určují ve spektru intenzivní charakteristické pásy, které odpovídají vibracím vyvolaných specifickými funkčními skupinami a jejich vazbami.

Tvar pásu je ovlivněn chemickými vazbami funkčních skupin v analyzované látce. Intenzita a výskyt pásů je dán změnou polarizovatelnosti během vibrace. Čím je polarizovatelnost větší, tím je dosaženo vyšší intenzity Ramanova signálu.

Polarizovatelnost udává míru snadnosti, kdy vnější elektrické pole může vyvolat dočasný dipólový moment v molekule látky. Molekuly s vysokou koncentrací elektronů (například molekuly s násobnými vazbami) vykazují v Ramanově spektru silnou intenzitu signálu. Vysokou intenzitu mají i látky, které mají atomy ve vnější slupce, a dochází tak v elektrickém poli ke snadnému posunu (například Cl, Br, I, těžké kovy). U silně polárních vazeb, kdy jsou elektrony drženy elektronegativním atomem, intenzita klesá. Jedná se o látky s funkčními skupinami O-H, C-F.

Přičemž energie molekulárních vibrací závisí na množství atomů, geometrickém uspořádání a na síle jejich chemických vazeb v dané molekule.

Ramanovy spektra se nacházejí v oblasti „otisku palce.“ Jedná se o rozsah spektra s Ramanovým posunem od 200 do 2000  $\text{cm}^{-1}$ , kde se nacházejí pásy, které popisují celkovou strukturu molekuly. Spektra tak poskytují informaci o molekulární struktuře, dynamice a chemickém prostředí látky. Určité oblasti spektra odpovídají daným funkčním skupinám zkoumaných látek [4, 9, 10].

Důležité pro zobrazení pásu ve spektru je skupenství, ve kterém se analyzovaná látka nachází. V pevném stavu látky ovlivňuje uspořádání pásů ve spektru krystalická mřížka. V její přítomnosti pozorujeme ve spektru ostré úzké pásy. Rozrušení vazeb v krystalické mřížce, a tudíž přechod z pevného skupenství do kapalného způsobuje ztrátu signálu se slabými pásy. V plynném stavu není molekula spojena pevnými vazbami, ale volně rotuje. V tomto případě záleží na struktuře a symetrii molekuly. Velké (objemné) molekuly mají typické nejasné široké pásy. Daná konfigurace molekuly mění dipólový moment a molekula se může ohýbat a rotovat. Ve spektru jsou viditelné ostré silné pásy. Jiná konfigurace molekuly ale tento jev nezpůsobuje.

Svou roli ve vibračně-rotacní spektrometrii mají vodíkové vazby. Způsobují široké, méně jasné pásy než u molekul, které vodíkové můstky nemají. Čím více vodíkových vazeb molekula obsahuje, tím více klesá intenzita Ramanova signálu a ve spektru najdeme široké pásy. Proto Ramanova spektrometrie není vhodná pro stanovení vody s velkým počtem vodíkových vazeb, ale dokáže výborně rozpoznat a stanovit sloučeniny ve vodném roztoku, které již tolik vodíkových vazeb neobsahují [10,11].

### 3.2.1 Identifikace vybraných látek stanovovaných v této práci

Spektrum ethanolu se projevuje silným pásem v Ramanově posunu  $879\text{ cm}^{-1}$  představující vazbu C-C a dvěma malými pásy při  $1030$  a  $1079\text{ cm}^{-1}$ , které zodpovídají za vazbu C-O a skupinu  $\text{CH}_3$ . Methanol se vyznačuje ve spektru jediným silným pásem v  $1019\text{ cm}^{-1}$ , který koresponduje s vazbou C-O [12].

Molekula glukózy se projevuje v Ramanově spektru v různých oblastech podle funkčních skupin. Pro vazby C-C-C, C-C-O, C-O a C-C je hlavní oblast projevující se skeletálními vibracemi od  $200\text{--}500\text{ cm}^{-1}$ . Dále v pásech  $415$  a  $437\text{ cm}^{-1}$  pro  $\text{C}_2\text{-C}_1\text{-O}_1$ , v  $523\text{ cm}^{-1}$  se vyskytují skeletální vibrace glukózy. Pásky  $838$  a  $856\text{ cm}^{-1}$  jsou spojeny s vazbami C-C a  $\text{C}_1\text{-H}_1$ . V pásech  $820$  a  $950\text{ cm}^{-1}$  odpovídají vibrace funkčním skupinám C-O, C-C-H, C-C a C-C-O, které jsou charakteristické jak pro molekulu glukózy, tak i fruktózy.

Fruktózu specifikují pásy v oblastech  $314$  a  $353\text{ cm}^{-1}$  pro vazbu C-C-C a  $631\text{ cm}^{-1}$  odpovídající uzavřenému řetězci molekuly. Pro skeletální vibrace molekuly je typický pás v  $709\text{ cm}^{-1}$ . V  $800\text{ cm}^{-1}$  je pás spojen s fruktopyranózou s vazbami C-C a pás v  $870\text{ cm}^{-1}$  je zodpovědný za vibrace skupiny C-O-C cyklického alkylového etheru. Pásky v  $1028$  a  $1054\text{ cm}^{-1}$  jsou spojeny se skupinami C-O uzavřených řetězců fruktofuranózy a fruktopyranózy. V  $1074\text{ cm}^{-1}$  se nacházejí skupiny C-O-C cyklických alkylových etherů.

V nealkoholických nápojích najdeme v Ramanových spektrech fruktózu, a to v pásech  $627$ ,  $707$ ,  $870$ ,  $819$  a  $1071\text{ cm}^{-1}$  a glukózu v pásech  $517$ ,  $849$ ,  $913$  a  $1124\text{ cm}^{-1}$  [13].

### 3.3 Instrumentace

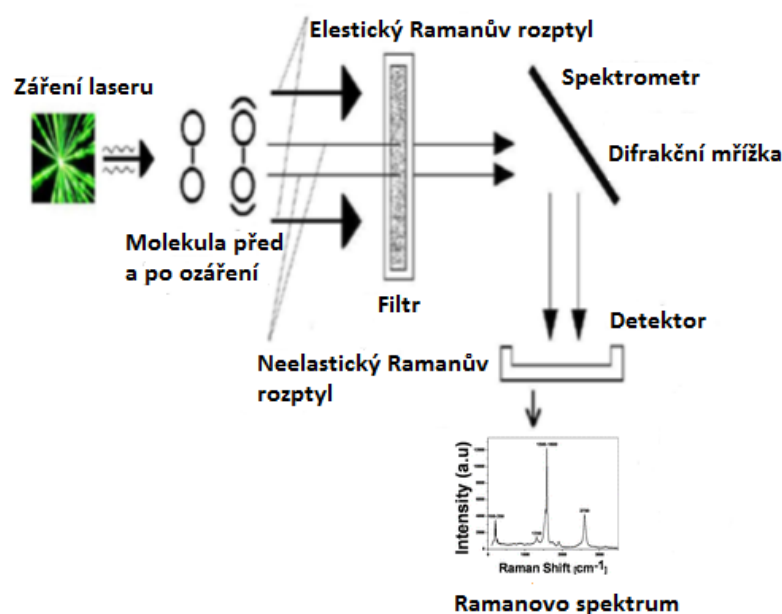
Ramanův spektrometr je sestaven ze zdroje monochromatického záření, který představuje laser se stabilizovanou vlnovou délkou. Měřený vzorek je umístěn do dráhy laseru. Záření, které vzorek rozptýlí je pomocí sběrné a přenosové optiky dopravováno přes monochromátor, skládající se ze vstupní štěrbin, následně zrcadla pro zajištění paralelního světla, difrakční mřížky, která propouští paprsky jen o určité vlnové délce a ohniskového zrcadla, které přivádí rozptýlené světelné záření jen o určité vlnové délce výstupní štěrbinou na detektor. Pro získání různých vlnových délek světelného záření se používají filtry. Jejich úloha spočívá v nastavitelném selektivním propuštění vlnových délek světelného záření.

Dále musí být eliminován nežádoucí Rayleighův rozptyl. Tento systém zajišťuje přístroji selektivitu a citlivost měření, jelikož na detektor dopadá jen omezeně malé množství rozsahu spektrální oblasti světla. Volba optického materiálu a typu detektoru závisí na druhu excitaci vlnových délek laseru.

Výsledky měření jsou velmi ovlivněny instrumentačními vlastnostmi přístroje, jako je optický výkon a spektrální rozlišení. Pro měření ve viditelné oblasti laserové excitace se většinou používají dvojité monochromátory pro zajištění přesnějšího výsledku.

Upřednostněno je používání dvou typů selektivních filtrů, kdy se jedná o dielektrické široké filtry nebo filtry obsahující holografickou mřížku. Jako detektory se používají fotodiody nebo CCD kamery. Pomocí multikanálového nastavení měřeného signálu umožňují nastavit rozdílné spektrální rozlišení pásů ve spektru.

Výsledkem měření je spektrum, vzniklé z naměřených hodnot Ramanova posunu a k nim odpovídajících intenzit [9, 10].



**Obrázek 2** Schéma elastického Ramanova rozptylu v optické dráze Ramanova spektrometru [14, 15]

### 3.4 Princip měření

Analyzovaná látka vykazuje danou intenzitu Ramanova rozptylu a fluorescence, na kterých závisí rychlost měření. Kapaliny se stanovují rychleji a snadněji. Pevné látky se analyzují většinou obtížněji a pomaleji, což vyplývá z polohy ohniska laserového paprsku. U kapalin se nachází ohnisko laseru uvnitř látky, ale u pevných je na povrchu. Charakter pevné látky velmi ovlivňuje měření. Je-li látka lesklejší a tmavší, tak více odráží excitační záření a doba měření je delší.

Odborné studie se zabývaly porovnáním měření vzorku ve skleněné láhvi, ve skleněné odměrné baňce a ve vialce u stolního laboratorního Ramanova spektrometru. Při použití průhledné skleněné láhve a průhledné skleněné odměrné baňky bylo dosaženo spektra s příliš vysokou intenzitou signálu z pozadí a nebylo možné identifikovat látky ve vzorku. Záleželo ale i na poloze láhve nebo odměrné baňky. Měření z hrdla nádob vykazovalo nižší intenzitu signálu, kde byly ve spektru velmi slabě zobrazeny charakteristické pásy dané látky. Naopak při umístění laseru na spodní nejširší část nádoby nebyly ve spektru žádné charakteristické pásy přes vysokou

intenzitu signálu. U vialky bylo vždy naměřeno spektrum s dobře rozlišitelnými pásy, které odpovídaly knihovně spekter dané látky [16, 17].

### 3.5 Využití v analýze různých druhů látek

Využití má v chemickém a farmaceutickém průmyslu, v mineralogii a geochemii, v biologii a lékařství. A to v analýze pevných látek (krystalické, amorfny materiály, kovy, polovodiče, polymery, aj.), kapalin (čisté roztoky, vodné i nevodné roztoky), plynů, povrchů (při analýze senzorů, elektrod, sorbentů, atd.), biologických systémů (přes biomolekuly až po organismy).

V analýze potravin a nápojů má Ramanova spektrometrie uplatnění v kontrole kvality potravin. Touto metodou lze rychle určit, zda se jedná o pančované výrobky nebo o kvalitní potraviny, nápoje. V praxi byla úspěšně použita při bezpečnostní kontrole kvality lihovin, olivového oleje, džusů, kávy, medu, zeleniny, ovoce, vepřového a hovězího masa [1, 18].

#### 3.5.1 Výhody Ramanovy spektrometrie

Jak vyplývá z využití, tato analytická metoda je vhodná pro rychlou identifikaci neznámých chemických látek. Obsluha přístroje je jednoduchá. Vzorek nevyžaduje složitý odběr pro analýzu a nemusí se na rozdíl od časově náročnějších chromatografických metod (HPLC, GC) před analýzou upravovat, čímž se výrazně zamezí systematickým chybám, které vznikají u úprav vzorku před vlastním měřením. Samotná analýza vzorku je rychlá, měření proběhne během několika sekund až minut.

Na Ramanových přístrojích můžeme analyzovat vzorky v pevném a v kapalném stavu. Identifikovat je možné i jednotlivé složky ve směsi. Jelikož přístroj neprovádí detekci vody, lze tak stanovit koncentrované vodné roztoky. Spektrometr je vhodný i pro rozlišování izomerů daných látek, a to díky jejich odlišné konformaci.

Analýza látek je nedestruktivní, dochází tak k minimálnímu kontaktu se vzorkem a s toxickými látkami obsažených ve vzorku. Měření probíhá v bezpečném praktickém a snadno dostupném materiálu jako je plast a sklo. Po přístrojové úpravě je možné detekovat látky ve vzorku přímo ze skleněných lahví, což je výhodné uplatňovat u různých typů nápojů.

Ramanova spektrometrie slouží jako doplňková metoda k infračervené spektroskopii. Kromě stanovení analytů ve vodných roztocích, se používá pro detekci látek s nepolárními vazbami a s nízkou frekvencí vibrací molekul, kdy se pás látky projeví ve spektru v oblasti Ramanova posunu  $< 600 \text{ cm}^{-1}$  [10, 16, 19].

#### 3.5.2 Nevýhody Ramanovy spektrometrie

Omezení této metody spočívá v neschopnosti identifikovat všechny typy látek. Nelze analyzovat bioatomové molekuly s iontovými či s iontově polárními vazbami, některé kovy a většinu nekovových prvků, vodu, bílkoviny, vysoce fluoreskující sloučeniny, plyny, B-agens. U pevných látek jsou neměřitelné vzorky tvořící černé krystaly, nebo mající tmavomodré a tmavozelené zbarvení.

Metoda dokáže rychle a snadno stanovit methanol a ethanol v alkoholických nápojích, které jsou bezbarvé a bez zápachu a vůně. U lihovin, které mají

charakteristickou barvu, a aromatickou vůni vyžaduje měření touto metodou úpravy v získaných spektrech. Důvod spočívá v tom, že daný druh alkoholických nápojů obsahuje větší množství uhlovodíkových sloučenin, kdy aktivovaný uhlík zvyšuje intenzitu signálu. V Ramanově spektru se tento jev projeví příliš širokými pásy, podle kterých nelze ethanol a methanol stanovit [16, 20].

### 3.6 Základní informace o methanolu v destilátech

V lihovinách, které jsou vyrobeny řádným způsobem, je methanol v nízkých koncentracích přirozenou složkou. Jeho obsah je však závislý na typu lihoviny. Destiláty vyrobené z jemného nebo velejmeného lihu mohou obsahovat stopové koncentrace methanolu. Oproti tomu lihoviny typu ovocných destilátů obsahují vyšší množství methanolu. Jeho maximální obsah je stanoven zněním nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 110/2008 o maximálním obsahu methanolu v lihovinách.

Důvodem vyššího obsahu methanolu je jeho vznik při procesu kvašení ovoce. Dochází k němu při hydrolýze pektinů ovoce, rozkladem přirozených složek ovoce, zejména anthokyanových barviv a podobných látek v barevném ovoci. 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 a potravinářské lihy, které se připravují kvašením surovin obsahující cukry nebo škrob (cukrová řepa, cukrové třtina, brambory, obilí) mají nízké koncentrace methanolu. Jeho množství se snižuje v daných lihovinách dalším čištěním (destilací, použitím aktivního uhlí). Rafinovaný jemný a velejmený líc obsahuje jen stopy methanolu.

Pro ovocné destiláty vyrobené ze sliv, mirabelek, švestek, jablek, hrušek, malin, ostružin, meruněk a broskví je obsah methanolu podle uvedeného nařízení do 12 g na litr čistého lihu (100 %). Destiláty vyrobené z hrušek odrůd "Williams", červeného a černého rybízu, jeřabin, kdoulí, bezinek, bobulí jalovce mají obsah methanolu do 13,5 g na litr čistého lihu. Pro ostatní ovocné destiláty platí norma obsahu methanolu nižší než 1 g na litr čistého lihu. Ostatní lihoviny, vyrobené z kvasného lihu, které jsou naředěny vodou na přijatelný obsah lihu s přídavkem trestí a dalších složek, jako jsou vodka, rum, zelená a podobné produkty, nevznikají procesem destilace, ale jenom mícháním surovin. V oficiálních výrobnách lihovin, v likérkách, v pěstitelských pálenicích, v lihovarech se s methanolem nepracuje, a nemůže tak dojít k záměně za ethanol a ani k jeho přídavku.

Ve výrobnách lihovin černého trhu dané postupy podle nařízení nejsou často dodržovány a může dojít k záměně kvasného lihu (ethanolu) za methanol. Jedná se například o methanolovou aféru v Česku, kdy koncem roku 2012 v České republice a v Polsku došlo k sérii otrav methanolem po úmyslné záměně za ethanol v lihovinách. Na následky toxicity methanolu zemřelo v ČR 47 občanů a v Polsku podlehlí otravě tři občané. Desítky dalších byly hospitalizovány a mnozí lidé utrpěli trvalé poškození zraku. V minulých letech také došlo k záchytu okolokovaných lahví ve stejných lahvích s falšovanou etiketou a korkem, které jsou pro laickou veřejnost k nerozeznání od výrobku poškozené likérky. Proto je nutné dbát ostražitosti k levným výrobkům,



rozlévaným lihovinám, lihovinám v podezřelých obalech. Lihoviny, které nemají známý původ, by se neměly konzumovat [21, 22].

### 3.7 Výroba ovocných destilátů a výskyt nežádoucích složek v destilátech

Ovocné lihoviny vznikají kvašením ovoce a následně destilací. Principem je oddělení první a poslední frakce destilace od prostřední frakce, která obsahuje nejvyšší množství žádaného alkoholu (ethanolu).

První frakce destilace se nazývá úkap neboli předek. Obsahuje látky těkavější než ethanol. Například methanol, aromatické látky a další nežádoucí směsi. Základem jejich vzniku jsou biochemické reakce kontaminujících mikroorganismů, které se do kvasu dostaly z nahnílého, plesnivého ovoce, z nečistot, jako jsou stopky, listí a další látky. Z nežádoucích látek se jedná například o nižší alifatické alkoholy, jako methanol, 1-propanol, 1-butanol. Ze skupiny aromatických a heterocyklických alkoholů vzniká benzylalkohol, 2-fenylethanol, z heterocyklických alkoholů pak furfurylalkohol, z vícemocných alkoholů se v destilátech vyskytují 2,3-butandiol, glycerol a aceton.

Další skupinu tvoří aldehydy, které vznikají nejen procesem kvašení, ale i destilací. Mezi zástupce patří acetaldehyd, benzaldehyd a furankarbaldehyd. V ovocných destilátech se nachází i těkavé alifatické kyseliny, jako je kyselina octová, mravenčí, máselná a z vyšších kyselin se vyskytují kyselina kapronová, kaprylová, aj. Dalšími látkami vyskytujícími se v ovoci jsou aminy, amidy, estery (například ethylacetát), terpeny, acetaly. V ovoci s pečkou je typickým zástupcem kyanovodík. Zmíněné látky způsobují poškození sensorických vlastností destilátu (nepříjemný čichový vjem připomínající vůni rozpouštědel), a proto musí dojít k včasnému oddělení frakce od destilátu. Významnou složkou první frakce destilace je methanol. Nachází se ve všech frakcích destilátu. V úkapu musí dojít k oddělení methanolu, aby jeho množství nestouplo nad povolené množství pro daný destilát dle daného nařízení [23, 24].

Methanol působí podobně jako jiné alkoholy excitačně a po větší dávce narkoticky na CNS. Samotná sloučenina není jedovatá, ale jeho metabolity, především kyselina mravenčí, mají závažné toxické účinky na organismus. Nejprve dochází ke kumulaci kyseliny mravenčí v sítnici, očním nervu a bazálních gangliích mozku. Pomalu je oxidována na oxid uhličitý a vodu, hromadí se v tkáních a způsobuje nekompenzovanou metabolickou acidózu. Následně dochází k poruchám CNS, očí, trávicího traktu a oběhové soustavy vedoucím k smrtelné otravě organismu.

Minimální toxická dávka čistého methanolu je kolem 0,1 ml/kg. V průměru se udává pro dospělého člověka 10 ml, ale k smrtelné otravě může dojít i při konzumaci menšího množství než 10 ml.

Pro léčbu intoxikací methanolem se používá podání antidot ethanolu nebo fomepizolu, kteří minimalizují tvorbu toxických metabolitů. Je potřeba zahájit terapii co nejdříve po konzumaci methanolu. Podání antidota za 8-10 hodin a později po intoxikaci zvyšuje morbiditu a mortalitu jedince [25].

Druhou částí destilace je jádro, které obsahuje žádaný ethanol s ovocným aroma. Koncentrace ethanolu bývá okolo 50 % obj. nebo i vyšší. Záleží na množství alkoholu v kvasu.

Poslední frakci tvoří dokap s nízkým obsahem ethanolu okolo 20-30 % obj. Musí být co nejrychleji oddělen od jádra, jelikož v probíhající destilaci za vysoké teploty intenzivně těká poslední díl methanolu. Kromě methanolu se v dokapu nachází převážně látky s vyšším bodem varu než voda. Nazývají se přiboudliny a patří do skupin vyšších alkoholů a organických kyselin. V nižším množství dodávají pálenice typickou chuť a aroma. Ale při nedostatečném oddělení dokapu s vyšším obsahem přiboudlin má výsledný destilát nepříjemný zápach a mdlou chuť ve srovnání s ovocným, aromatickým jádrem.

Vyšší alkoholy vznikají již během procesu kvašení činností bakterií a kvasinek a dále jejich produkce probíhá při destilaci. Zástupci aromatických látek jako jsou ethylkarbamát, estery a acetaly vznikají nejen během destilace, ale i při skladování destilátu.

Vyšší množství těchto látek působí narkoticky, což se projevuje bolestí hlavy a podrážděním pokožky a sliznic. Výsledkem může být až otrava organismu. Mezi vyšší alkoholy patří například butylalkohol, propylalkohol, isobutanol a isoamylkohol.

Aromatické látky by se měly částečně vyskytovat v destilátech jen v malé koncentraci (pod 0,01 mg/100 ml) [23, 24].

### **3.8 Přehled stanovení vybraných látek pomocí Ramanovy spektrometrie**

Z deseti vybraných odborných studií jsou v tabulkách č. 1 a č. 2 uvedeny pro porovnání získaných výsledků stejné analyty, které byly stanovované v této diplomové práci.

**Tabulka 1** Stanovení alkoholů methanolu, ethanolu a cukrů glukózy a fruktózy pomocí Ramanovy spektrometrie

Vlnová délka laseru (nm)	Spektrální rozsah (cm <sup>-1</sup> )	Analyt	Matrice	Korelační koeficient kalibrace	Kalibrační metoda	Přesnost (%)	Správnost (%)	Výtěžnost (%)	Zdroj
785	950-1200	methanol	alkoholické nápoje blíže neurčeny	0,997	PLS	neuveдена	neuveдена	neuveдена	[26]
785	200-2000	methanol, ethanol	whisky, vodka, gin, raki	0,998 (methanol) 0,997 (ethanol)	PLS	0,5-3,2 (methanol) 2,9-5,9 (ethanol)	neuveдена	96,7-104,1 (methanol) 96,7-104,1 (ethanol)	[12]
514,5	450-4000	ethanol	tequila	neuveден	PCA	neuveдена	neuveдена	neuveдена	[19]
785	200-1800	ethanol	whisky, vodka, sladké alkoholické nápoje	neuveден	PLS	0,2-0,7	2,0-3,6	neuveдена	[17]
785	100-3200	methanol	alkoholické nápoje blíže neurčeny	0,9902	neuveдена	neuveдена	neuveдена	neuveдена	[14]
785	780-1050	ethanol	rum, gin, vodka, ostatní alkoholické nápoje	neuveден	neuveдена	neuveдена	neuveдена	neuveдена	[20]

**Tabulka 2** Stanovení alkoholů methanolu, ethanolu a cukrů glukózy a fruktózy pomocí Ramanovy spektrometrie

Vlnová délka laseru (nm)	Spektrální rozsah (cm <sup>-1</sup> )	Analyt	Matrice	Korelační koeficient kalibrace	Kalibrační metoda	Přesnost (%)	Správnost (%)	Výtěžnost (%)	Zdroj
488 a 514	2600-3600	methanol, ethanol	vodné roztoky se směsí methanolu a ethanolu	0,9999 (methanol) 0,9992 (ethanol)	neuveдена	neuveдена	neuveдена	neuveдена	[11]
785	200-2000	glukóza, fruktóza	jablečný, pomerančový džus, ovocná min. voda	0,913 (glukóza) 0,998 (fruktóza)	PLS	neuveдена	neuveдена	neuveдена	[13]
785	200-2000	glukóza, fruktóza	med	0,964 (glukóza) 0,965 (fruktóza)	PLS	neuveдена	neuveдена	neuveдена	[27]
785	175-2600	fruktóza	příměsi sirupů v medu	neuveđen	PLS	neuveдена	neuveдена	95,8	[18]

Ve vybraných studiích byla zvolena vlnová délka laseru 785 nm. Ve dvou studiích byl použit argonový laser s vlnovou délkou 488 a 514 nm. Spektrální rozsah se lišil u jedné studie. Byly stanovovány směsi methanolu a ethanolu, kdy došlo ke změně hodnot charakteristických pásů Ramanova posunu. Z uvedených hodnot korelačních koeficientů kalibračních závislostí nebylo splněno u všech vybraných studií linearity. Pro stanovení analytů se kalibrace hodnotily nejvíce podle metody nejmenších čtverců (PLS). V jednom případě se jednalo o analýzu hlavních komponent (PCA). U jedné studie byly hodnoty parametrů přesnosti a výtěžnosti mírně překročeny od mezních hodnot.

## 4 Experimentální část

### 4.1 Použité chemikálie

Demineralizovaná voda (připravená na katedře analytické chemie)

D-(-) Fruktóza,  $\geq 99$  %, celkový obsah nečistot:  $\geq 0,05$  % Glukózy (enzymaticky), Sigma Aldrich (Praha, Česká republika)

D-(+) Glukóza,  $\geq 99,5$  % (GC), Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika)

Ethanol: absolutní, Fisher Chemical (Pardubice, Česká republika)

Methanol: pro HPLC-Gradient Grade; VWR Chemicals Prolabo (Stříbrná Skalice, Česká republika)

Methanol:  $\geq 99,9$  %, pro HPLC, CHROMASOLV<sup>®</sup>; Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika)

### 4.2 Přístrojové vybavení

Ramanova spektrometrie:

Disperzní přenosný Ramanův spektrometr i-Raman Plus (B&W Tek inc., Nicolet CZ s.r.o., Praha, Česká republika)

Excitační laser s vlnovou délkou 785 nm

Vláknó optické sondy

Držák na optickou sondu a držák na kyvetu

Detektor CCD pole

Software pro zpracování dat: Spektroskopický program BWSpec, Spektroskopický software OMNIC - obojí od firmy B&W Tek inc.; Spektroskopický software TQ Analyst EZ Edition od firmy Thermo Scientific, Microsoft Excel 2010

### 4.3 Příprava kalibračních roztoků

U měření obsahu ethanolu a methanolu v alkoholických nápojích byly připraveny dva typy kalibrací. Množství použitých chemikálií bylo rozvrženo tak, aby výsledná koncentrace obsahu alkoholu byla 40 objemových %. U každé kalibrace bylo použito 11 kalibračních standardů.

V prvním případě bylo odlišné množství methanolu i ethanolu. Do 50 ml odměrné baňky bylo vždy napipetováno přesné množství methanolu a ethanolu. Dále byla odměrná baňka doplněna demineralizovanou vodou po značku. Druhý způsob spočíval v tom, že bylo odlišné pouze množství methanolu. Do 25 ml odměrné baňky bylo napipetováno vždy 10 ml ethanolu a přesné množství methanolu a následně doplněno demineralizovanou vodou po značku. Výsledné koncentrace kalibračních standardů jsou uvedeny v tabulkách č. 3 a č. 4.

**Tabulka 3** Tabulka kalibračních standardů (změna obsahu methanolu a ethanolu)

Číslo	Methanol		Ethanol		Voda objem (ml)
	objem (ml), obsah (%)		objem (ml), obsah (%)		
1.	0	0	20	40	30
2.	2	4	18	36	30
3.	4	8	16	32	30
4.	6	12	14	28	30
5.	8	16	12	24	30
6.	10	20	10	20	30
7.	12	24	8	16	30
8.	14	28	6	12	30
9.	16	32	4	8	30
10.	18	36	2	4	30
11.	20	40	0	0	30

**Tabulka 4** Tabulka kalibračních standardů (změna obsahu methanolu)

Číslo	Methanol objem (ml), obsah (%)		Ethanol objem (ml), obsah (%)		Voda objem (ml)
1.	0	0	10	40	15
2.	1	4	10	40	14
3.	2	8	10	40	13
4.	3	12	10	40	12
5.	4	16	10	40	11
6.	5	20	10	40	10
7.	6	24	10	40	9
8.	7	28	10	40	8
9.	8	32	10	40	7
10.	9	36	10	40	6
11.	10	40	10	40	5

U identifikace/stanovení obsahu glukózy a fruktózy v sirupech bylo použito 7 standardů. Navážky obou chemikálií, byly rozpuštěny v 10 ml odměrné baňce a doplněny demineralizovanou vodou po značku. Množství obou chemikálií se u každé navážky měnilo ve stejném poměru (1:1). Výsledné koncentrace kalibračních standardů jsou opět zaznamenány v tabulce č. 5.

**Tabulka 5** Tabulka kalibračních standardů (změna obsahu glukózy a fruktózy)

Číslo	Glukóza		Fruktóza	
	navážka (g), obsah (%)		navážka (g), obsah (%)	
1.	0,2	2	0,2	2
2.	0,4	4	0,4	4
3.	0,6	6	0,6	6
4.	0,8	8	0,8	8
5.	1,0	10	1,0	10
6.	1,2	12	1,2	12
7.	1,4	14	1,4	14

#### 4.4 Postup měření

Nejprve byl změřen kalibrační standard ve vialce a bylo zaznamenáno příslušné spektrum v programu BWSpec. Podle příslušných pásů v zobrazeném spektru byla provedena identifikace zkoumaných látek. Spektrum bylo následně uloženo ve formátu .spc. V dalším programu OMNIC, který také umožňuje kvalitativní analýzu látek, bylo spektrum otevřeno a uloženo ve formátu .spa pro kompatibilitu s programem TQ Analyst, který umožňuje stanovení obsahu na základě plochy vybraného pásu. Pomocí tohoto programu byly naměřené standardy z programu OMNIC použity pro vyhodnocení kalibrace metodou nejmenších čtverců. Model může být založen na nejvyšší intenzitě pásů nebo ploše pásů, ale lze také použít soubor mnoha bodů v širším spektrálním rozsahu než je izolovaný pás. Byl zvolen poměr plochy dvou vybraných pásů (s maximální a minimální intenzitou pro danou látku), kdy kalibrační křivka představuje přímou závislost hodnot bezrozměrné veličiny poměru plochy dvou pásů na koncentraci standardů.

Výběr odpovídajících oblastí ploch pásů pro methanol a ethanol byl zaznamenán do tabulky. Pokud není uvedeno jinak, jsou hodnoty pro různá měření shodné s uvedenou tabulkou.

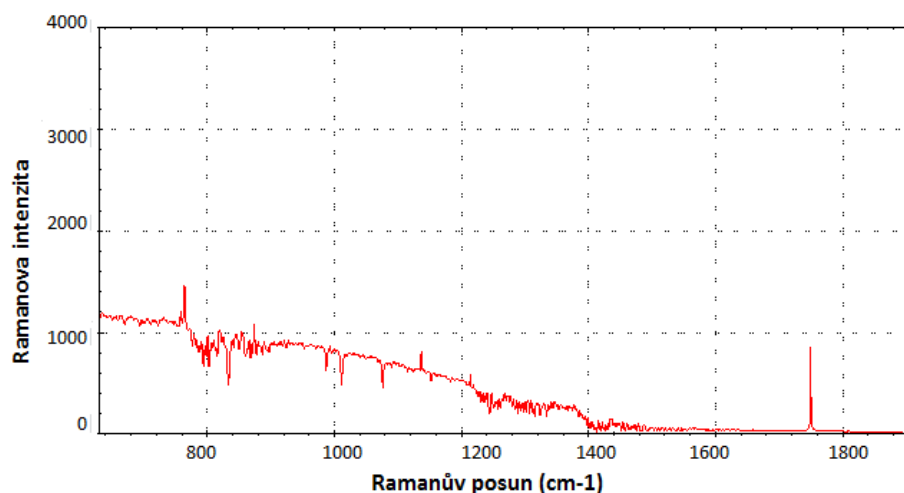
Postup měření vzorků probíhal vždy stejným způsobem. Při stanovení látek se v programu TQ Analyst vycházelo ze získaných kalibrací a naměřených spekter. Pro druhý typ kalibrační křivky byly zaznamenány v programu BWSpec nejvyšší intenzity jednotlivých pásů v závislosti na koncentraci dané látky a byly vyhodnoceny v programu Excel. Cílem bylo porovnání jednoduché kalibrace s využitím intenzity vybraného pásu a poměru plochy vybraného pásu a oblasti s nízkou intenzitou měřeného signálu. Porovnány byly korelační koeficienty obou kalibrací.

## 5 Výsledky a diskuze

Cílem této práce bylo identifikovat a stanovit množství ethanolu a methanolu ve vybraných alkoholických nápojích a množství glukózy a fruktózy ve vybraných sirupech. Nejprve bylo potřeba nalézt optimální podmínky analýzy. Měření probíhalo při různě zvolených integračních časech: 1000 ms, 2500 ms, 5000 ms a 7500 ms při 100 % a 75 % intenzitě laseru. Spektrální rozsah Ramanova posunu v programu BWSpec byl nastaven od 64 do 3280  $\text{cm}^{-1}$ . Připravené kalibrační standardy a vzorky byly měřeny ve skleněných vialkách za laboratorní teploty. V rámci optimalizace metody bylo vyzkoušeno měření methanolu a ethanolu i v odměrných baňkách a při teplotě 4-8 °C.

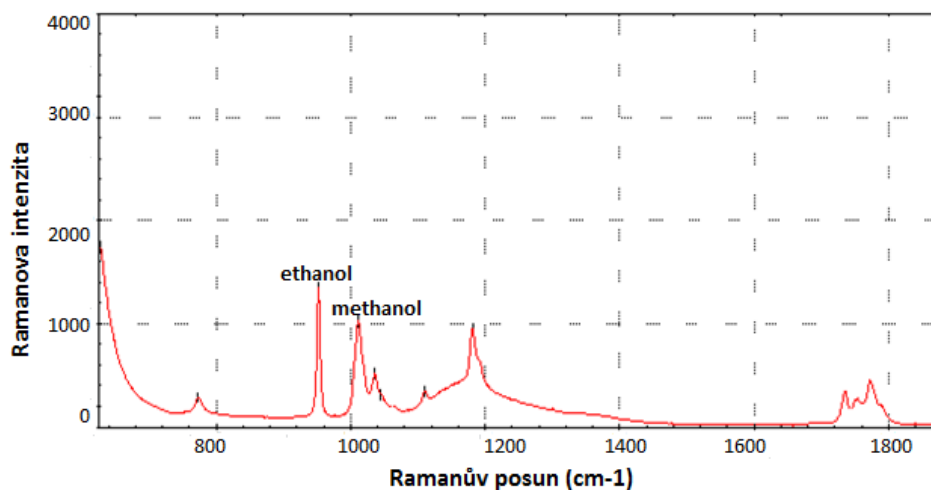
### 5.1 Testování měření Ramanova spektra methanolu a ethanolu v odměrných baňkách a ve skleněných vialkách

Skleněná baňka byla uchycena držákem ke stojanu a kolem ní byl prázdný vzduchový prostor. Na skleněnou baňku s měřeným vzorkem nedopadalo jen excitační záření z laseru, ale i okolní záření z prostředí laboratoře. Naměřené Ramanovo spektrum nebylo možno vyhodnotit, jelikož neobsahovalo viditelné pásy methanolu a ethanolu (viz obr. 3). Nebylo tedy možné měřit spektra roztoků v odměrné baňce, a to z důvodu velkého šumu díky vlivu vnějšího světla a zakřivení povrchu odměrné baňky. Ve skleněné vialce v držáku odstíněném od okolního světla byly vždy ve spektrech identifikovatelné pásy daných látek, a proto bylo měření ve vialkách zvoleno pro testování kalibračních podmínek.



**Obrázek 3** Měření methanolu a ethanolu v odměrné baňce (neměřitelný Ramanův signál); (BWSpec)

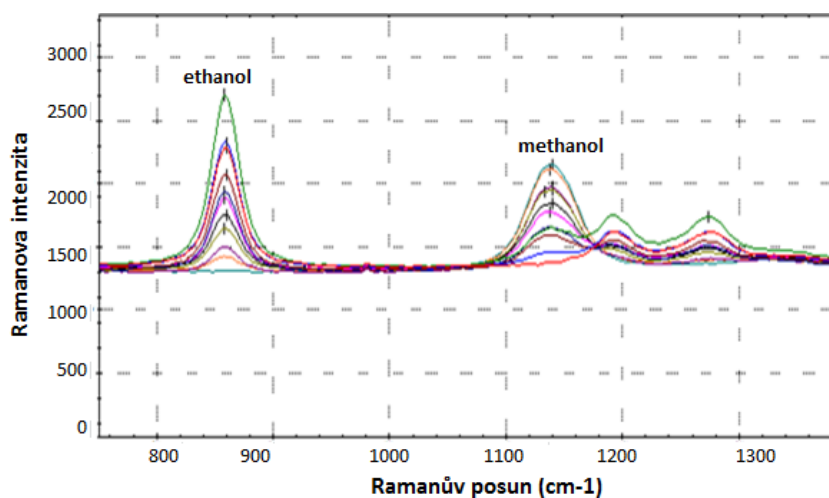




**Obrázek 4** Měření methanolu a ethanolu ve skleněné vialce - pásy methanolu a ethanolu ve spektru (BWSpec)

## 5.2 Kalibrace methanolu a ethanolu-změna obsahu obou látek

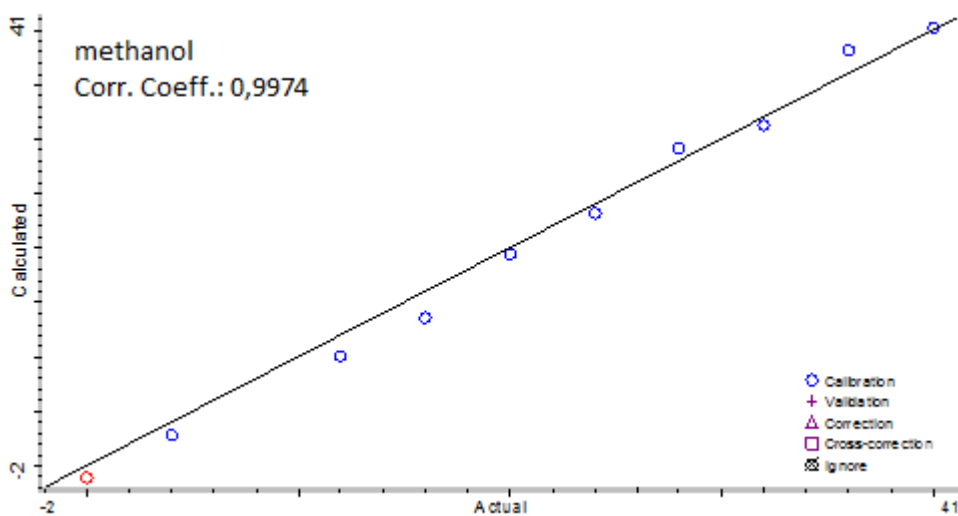
### 5.2.1 Kalibrace methanolu a ethanolu při 100 % intenzitě laseru a integračním čase 1000 ms



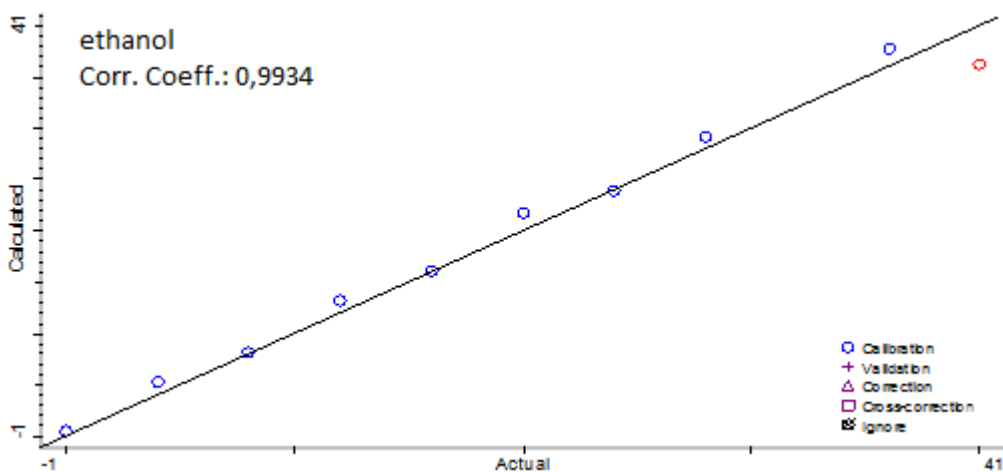
**Obrázek 5** Ramanova spektra methanolu a ethanolu při 100 % intenzitě laseru a integračním čase 1000 ms (BWSpec)

**Tabulka 6** Výběr odpovídajících oblastí ploch pásů Ramanových spekter methanolu a ethanolu pro vyhodnocení kalibrace

Methanol (cm <sup>-1</sup> )		
Plocha pásu	1 036,00	1 005,00
Hraniční body	1 060,00	924,00
Minimum v rozsahu	1 070,00	973,00
Ethanol (cm <sup>-1</sup> )		
Plocha pásu	900,00	877,00
Hraniční body	950,00	850,00
Minimum v rozsahu	970,00	925,00



**Obrázek 6** Kalibrační závislost plochy pásu methanolu, 1000 ms (hodnoceno v TQ-Analystu)

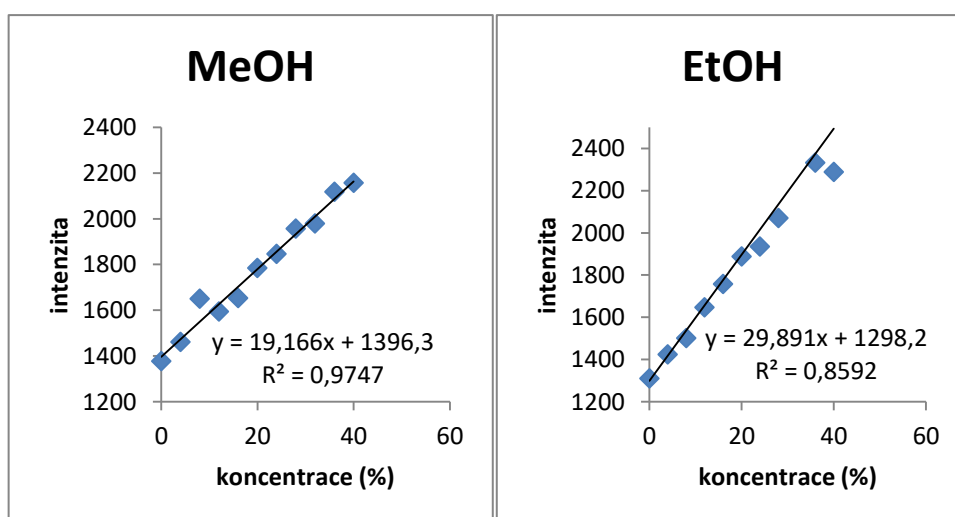


**Obrázek 7** Kalibrační závislost plochy pásu ethanolu, 1000 ms (hodnoceno v TQ-Analystu)

Z grafů, podle hodnot korelačních koeficientů vyplývá, že linearita při hodnocení ploch pásů byla dosažena pro obě látky methanol i ethanol.

**Tabulka 7** Intenzita pásů Ramanových spekter methanolu a ethanolu – 1000 ms

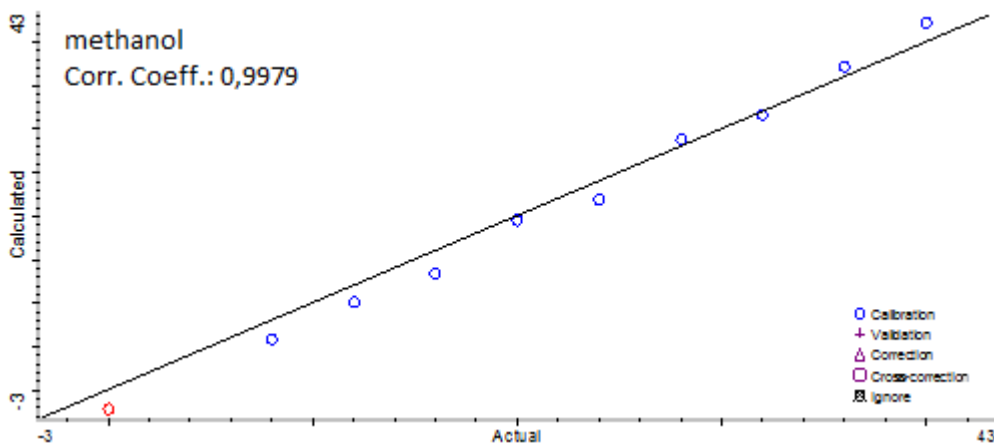
Číslo měření	Obsah MeOH (%)	Obsah EtOH (%)	Intenzita MeOH (Ramanův posun 1019 cm <sup>-1</sup> )	Intenzita EtOH (Ramanův posun 880 cm <sup>-1</sup> )
1.	0	40	1377,32	2287,77
2.	4	36	1460,66	2332,46
3.	8	32	1650,05	2702,94
4.	12	28	1594,10	2070,28
5.	16	24	1653,07	1935,47
6.	20	20	1784,08	1888,29
7.	24	16	1845,85	1756,95
8.	28	12	1956,98	1646,40
9.	32	8	1979,50	1501,20
10.	36	4	2118,00	1424,60
11.	40	0	2156,65	1309,96



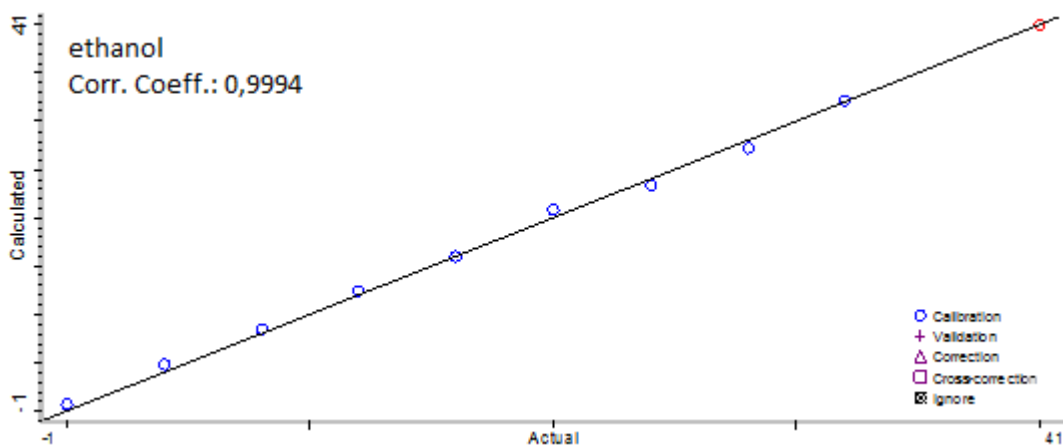
**Obrázek 8 a Obrázek 9** Kalibrační závislosti intenzity pásů methanolu a ethanolu, 1000 ms (hodnoceno v Excelu)

Podle hodnot korelačních koeficientů nespĺňuje linearitu při hodnocení intenzit pásu ani jedna látka.

### 5.2.2 Kalibrace methanolu a ethanolu při 100 % intenzitě laseru a integračním čase 2500 ms při laboratorní teplotě



**Obrázek 10** Kalibrační závislost plochy pásu methanolu, 2500 ms (hodnoceno v TQ-Analystu)



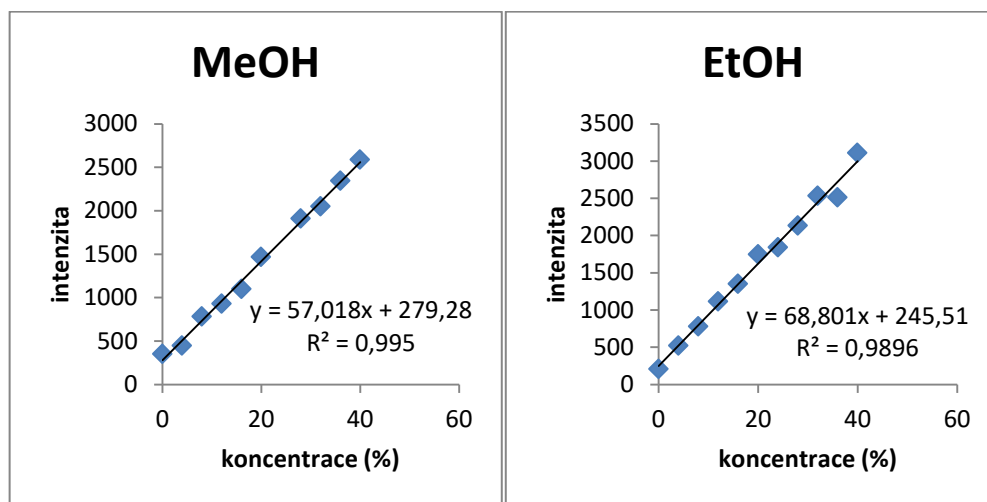
**Obrázek 11** Kalibrační závislost plochy pásu ethanolu, 2500 ms (hodnoceno v TQ-Analystu)

Podle hodnot korelačních koeficientů byla linearita pro hodnocení ploch pásů dosažena u obou látek methanolu a ethanolu.

**Tabulka 8** Intenzita pásů Ramanových spekter methanolu a ethanolu – 2500 ms

Číslo měření	Obsah MeOH (%)	Obsah EtOH (%)	Intenzita MeOH (Ramanův posun 1019 cm <sup>-1</sup> )	Intenzita EtOH (Ramanův posun 880 cm <sup>-1</sup> )
1.	0	40	351,82	3108,22
2.	4	36	445,46	2510,87
3.	8	32	783,30	2531,08
4.	12	28	928,17	2133,45
5.	16	24	1099,41	1842,20

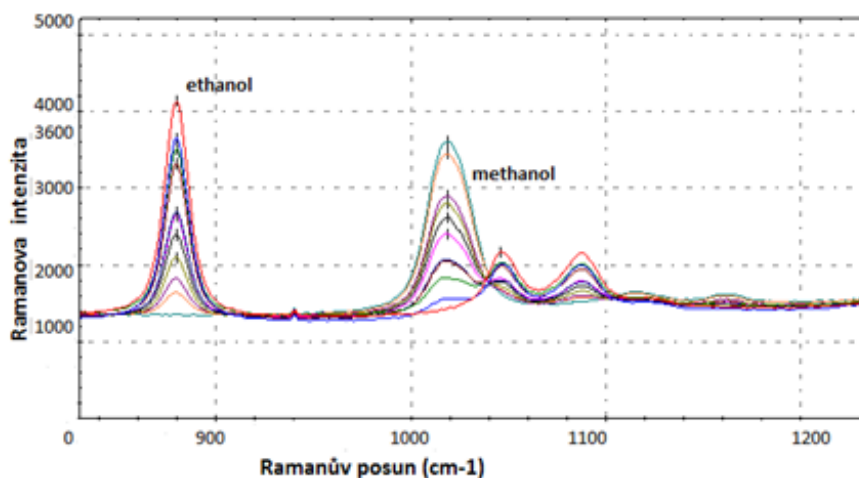
6.	20	20	1467,68	1745,91
7.	24	16	odlehlá hodnota	1349,25
8.	28	12	1910,00	1113,00
9.	32	8	2050,99	777,85
10.	36	4	2343,39	518,81
11.	40	0	2588,05	206,13



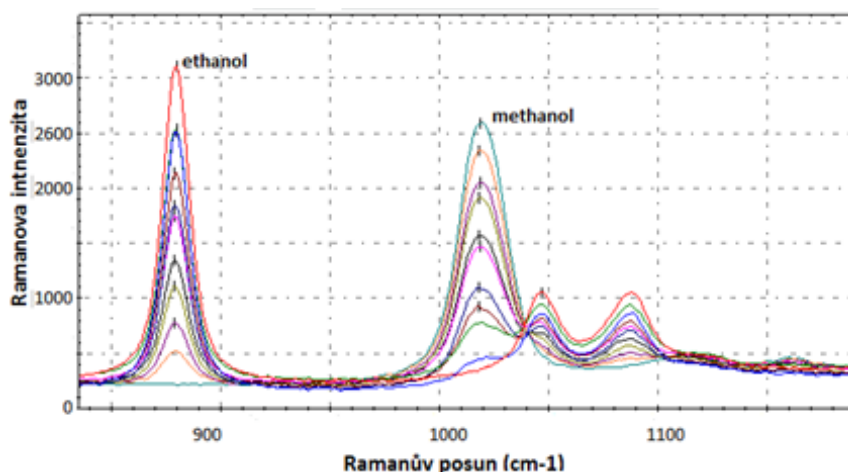
**Obrázek 12 a Obrázek 13** Kalibrační závislosti intenzity pásu methanolu a ethanolu 2500 ms (hodnoceno v Excelu)

Podle hodnoty korelačního koeficientu vykazuje linearitu pro hodnocení intenzity pásu látka methanol, ale pouze v případě, že je jedna z hodnot nezahrnuta do kalibrační závislosti, jelikož se nachází mimo oblast kalibrační křivky. Látka ethanol linearitu pro hodnocení intenzity pásu nesplňuje.

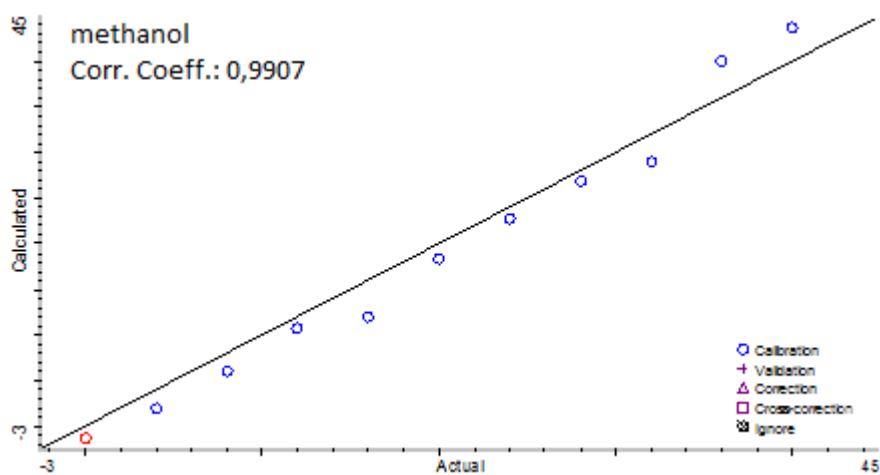
### 5.2.3 Kalibrace methanolu a ethanolu při 100 % intenzitě laseru a integračním čase 2500 ms za teploty 4-8 °C



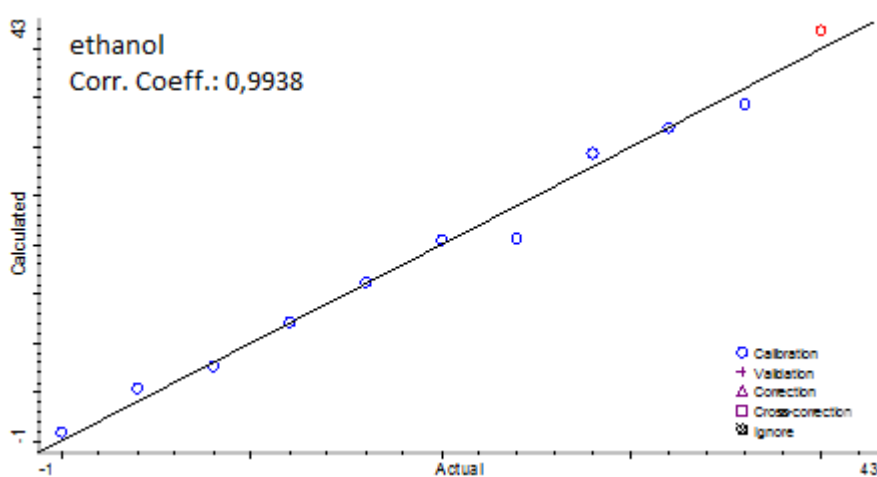
**Obrázek 14** Ramanova spektra methanolu a ethanolu při 100 % intenzitě laseru a integračním čase 2500 ms za teploty 4-8 °C (BWSpec)



**Obrázek 15** Ramanova spektra methanolu a ethanolu při 100 % intenzitě laseru a integračním čase 2500 ms za laboratorní teploty (BWSpec)



**Obrázek 16** Kalibrační závislost plochy pásu methanolu, 4-8°C, 2500 ms (hodnoceno v TQ-Analystu)

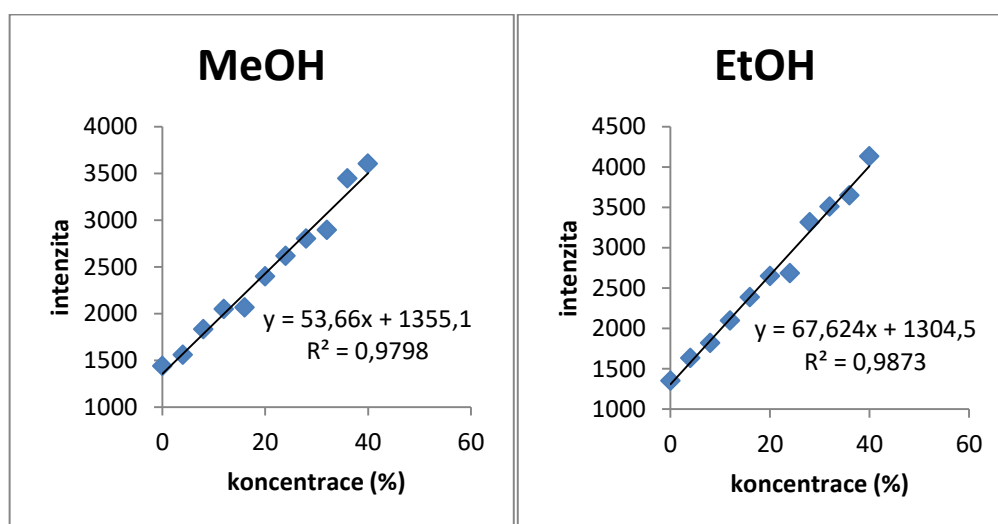


**Obrázek 17** Kalibrační závislost plochy pásu ethanolu, 4-8°C, 2500 ms (hodnoceno v TQ-Analystu)

Obě látky methanol a ethanol splňují linearitu pro hodnocení ploch pásu.

**Tabulka 9** Intenzita pásů methanolu a ethanolu, 4-8°C, 2500 ms

Číslo měření	Obsah MeOH (%)	Obsah EtOH (%)	Intenzita MeOH (Ramanův posun 1019 cm <sup>-1</sup> )	Intenzita EtOH (Ramanův posun 880 cm <sup>-1</sup> )
1.	0	40	1439,03	4131,68
2.	4	36	1559,58	3648,89
3.	8	32	1833,00	3508,93
4.	12	28	2048,48	3312,99
5.	16	24	2067,18	2684,48
6.	20	20	2399,56	2647,62
7.	24	16	2617,63	2388,84
8.	28	12	2802,35	2096,72
9.	32	8	2895,87	1821,58
10.	36	4	3445,96	1634,30
11.	40	0	3602,63	1350,50



**Obrázek 18 a Obrázek 19** Kalibrační závislosti intenzity pásů methanolu a ethanolu, 4-8°C, 2500 ms (hodnoceno v Excelu)

Linearitu pro hodnocení intenzit pásů nevykazuje ani jedna látka.

**Tabulka 10** Porovnání intenzity signálu při 4-8 °C a laboratorní teplotě (2500 ms)

Číslo měření	Laboratorní teplota (20-25 °C)		Teplota (4-8 °C)		Procentuální porovnání-nárůst intenzit (%)	
	Intenzita MeOH (Ramanův posun 1019 cm <sup>-1</sup> )	Intenzita EtOH (Ramanův posun 880 cm <sup>-1</sup> )	Intenzita MeOH (Ramanův posun 1019 cm <sup>-1</sup> )	Intenzita EtOH (Ramanův posun 880 cm <sup>-1</sup> )	Intenzita MeOH (Ramanův posun 1019 cm <sup>-1</sup> )	Intenzita EtOH (Ramanův posun 880 cm <sup>-1</sup> )
1.	351,82	3108,22	1439,03	4131,68	75,55	24,77
2.	445,16	2510,87	1559,58	3648,89	71,46	31,19
3.	783,30	2531,08	1833,00	3508,93	57,27	27,87
4.	928,17	2133,45	2048,48	3312,99	54,69	35,60
5.	1099,41	1842,20	2067,18	2684,48	46,82	31,38
6.	1467,68	1745,91	2399,56	2647,62	38,84	34,06
7.	1568,38	1349,25	2617,63	2388,84	40,08	43,52
8.	1910,00	1113,00	2802,35	2096,72	31,84	46,92
9.	2050,99	777,85	2895,87	1821,58	29,18	57,30
10.	2343,39	518,81	3445,96	1634,30	32,00	68,25
11.	2588,05	206,13	3602,63	1350,50	28,16	84,74

**Výpočet nárůstu intenzity signálu v pásu methanolu:**

Intenzita pásu při 1. měření za laboratorní teploty.....351,82

Intenzita pásu při 1. měření za teploty 4-8 °C.....1439,03

Rozdíl intenzity: 1439,03 - 351,82 = 1087,21

1493,03.....100 %

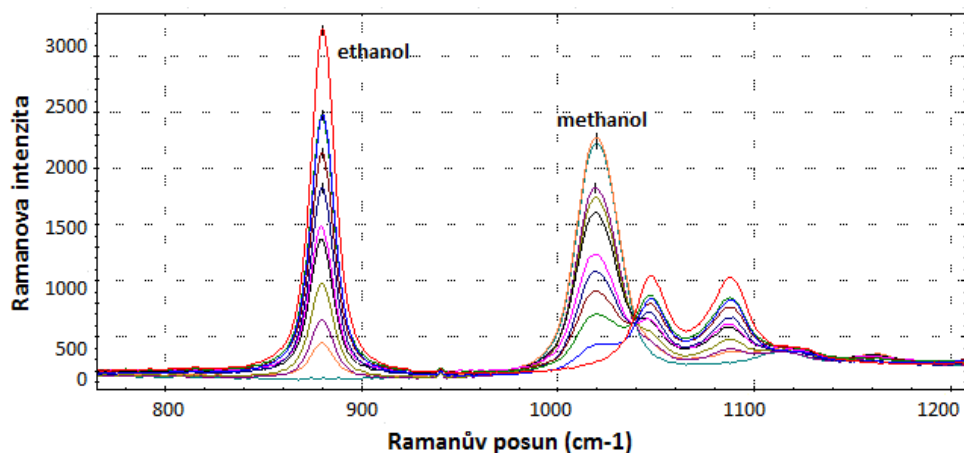
1087,21..... x %

x = 75,55 %

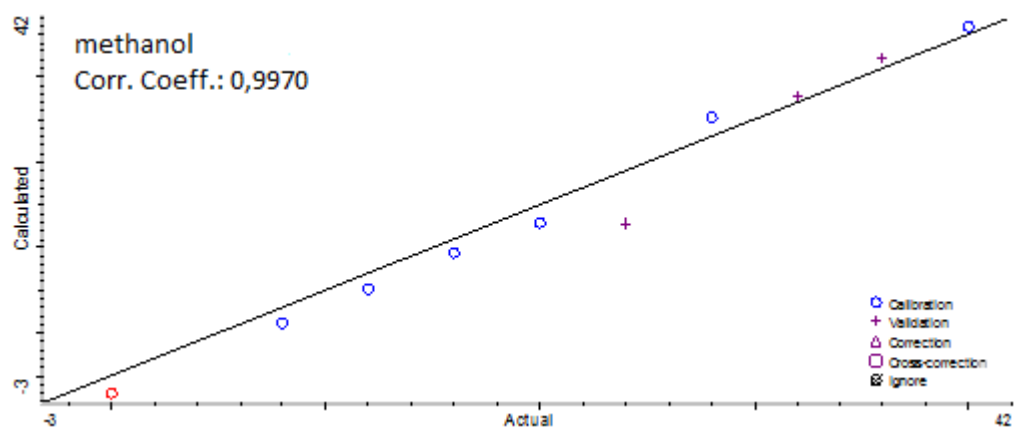
Stejným způsobem byly vypočítány rozdíly pro všechny měřené standardy, rozdíly obou intenzit jsou uvedeny v tabulce č. 10, ze které vyplývá, že nižší teplota ovlivnila nárůst intenzity signálu v pásu methanolu v průměru o 45,99 % a ethanolu v průměru o 44,15 %, přičemž jsou ale mezi jednotlivými hodnotami poměrně velké rozdíly.



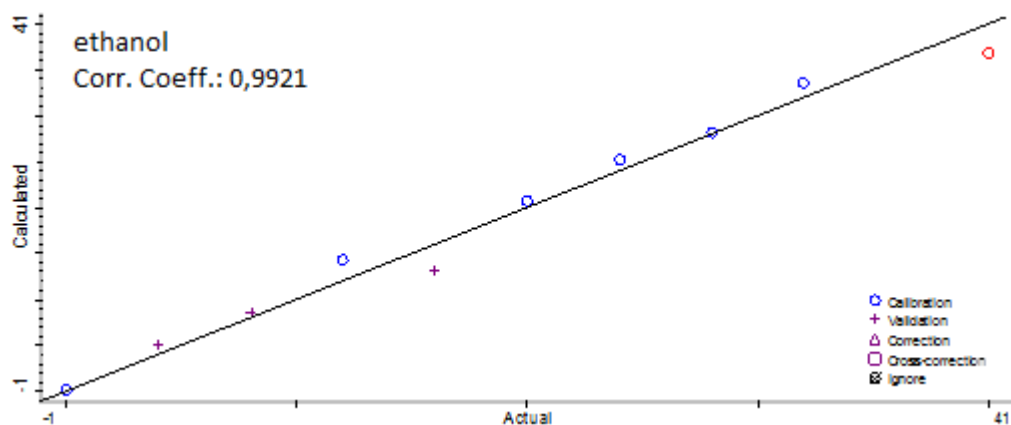
## 5.2.4 Kalibrace methanolu a ethanolu při 100 % intenzitě laseru a integračním čase 5000 ms



Obrázek 20 Ramanova spektra methanolu a ethanolu při 100 % intenzitě laseru a integračním čase 5000 ms (BWSpec)



Obrázek 21 Kalibrační závislost plochy pásu methanolu, 5000 ms (hodnoceno v TQ-Analystu)

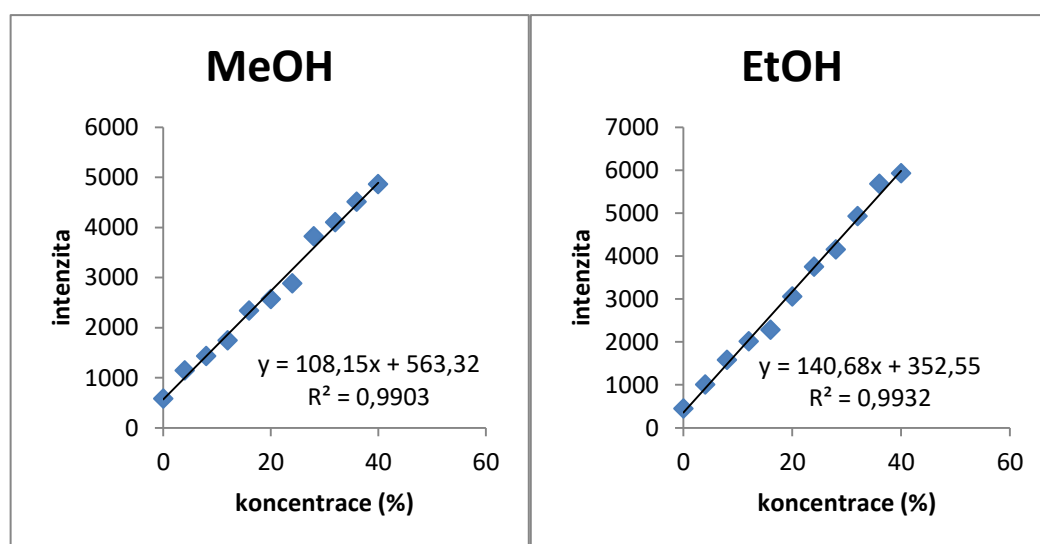


Obrázek 22 Kalibrační závislost plochy pásu ethanolu, 5000 ms (hodnoceno v TQ-Analystu)

Linearita pro hodnocení ploch pásů pro obě látky splněna.

**Tabulka 11** Intenzita pásů methanolu a ethanolu – 5000 ms

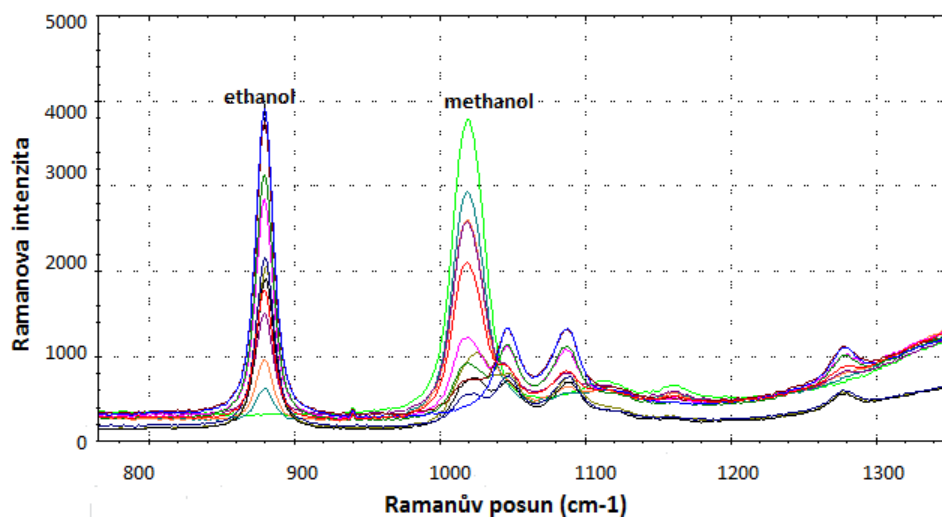
Číslo měření	Obsah MeOH (%)	Obsah EtOH (%)	Intenzita MeOH (Ramanův posun 1019 cm <sup>-1</sup> )	Intenzita EtOH (Ramanův posun 880 cm <sup>-1</sup> )
1.	0	40	579,15	5928,30
2.	4	36	1144,94	5678,50
3.	8	32	1428,49	4928,03
4.	12	28	1747,42	4155,75
5.	16	24	2341,42	3752,49
6.	20	20	2570,31	3058,17
7.	24	16	2880,81	2283,23
8.	28	12	3821,15	2010,54
9.	32	8	4102,97	1581,30
10.	36	4	4510,70	1007,63
11.	40	0	4861,25	444,74



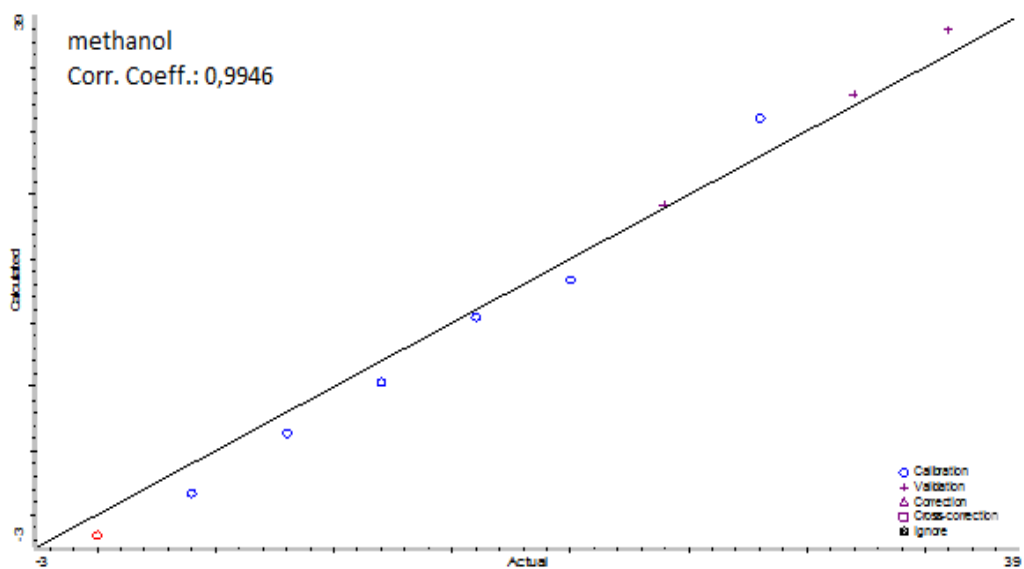
**Obrázek 23 a Obrázek 24** Kalibrační závislosti intenzit pásů methanolu a ethanolu, 5000 ms (hodnoceno v Excelu)

Podle hodnot korelačních koeficientů obě látky methanol a ethanol splňují linearitu pro hodnocení intenzit pásů.

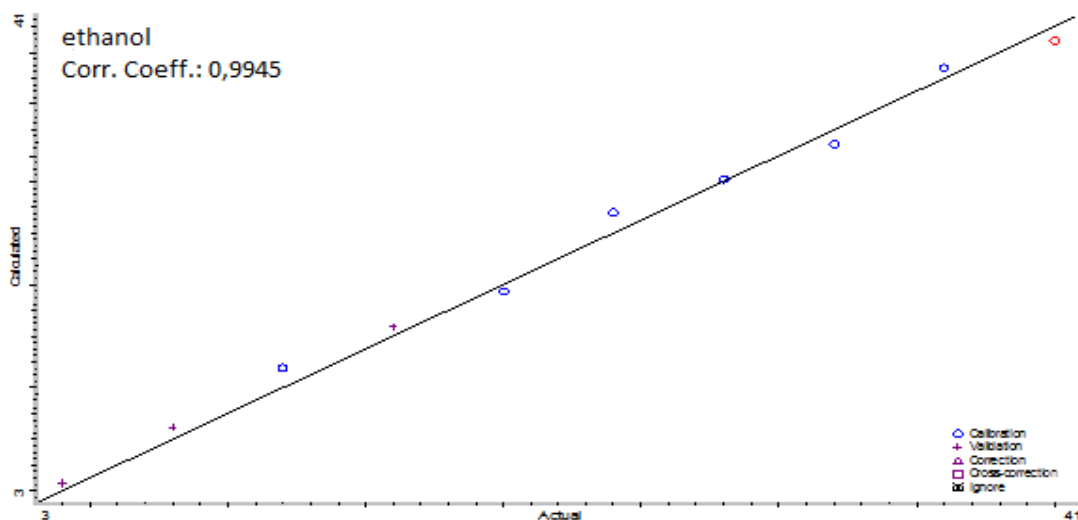
### 5.2.5 Kalibrace methanolu a ethanolu při 75 % intenzitě laseru a integračním čase 5000 ms



**Obrázek 25** Ramanova spektra methanolu a ethanolu při 75 % intenzitě laseru a integračním čase 5000 ms (BWSpec)



**Obrázek 26** Kalibrační závislost plochy pásu methanolu, 5000 ms (hodnoceno v TQ-Analystu)

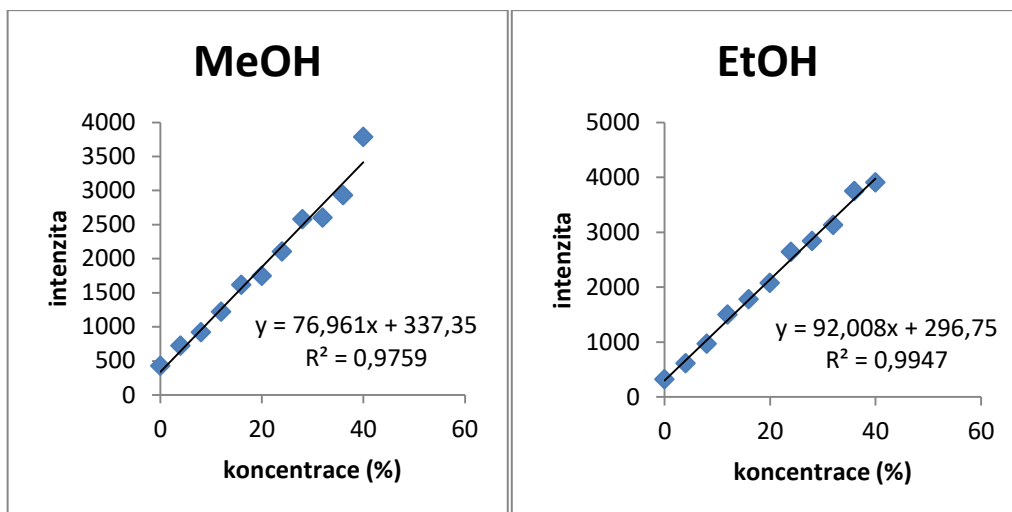


**Obrázek 27** Kalibrační závislost plochy pásu ethanolu, 5000 ms (hodnoceno v TQ-Analystu)

Při hodnocení ploch pásů dosahují linearitu obě látky.

**Tabulka 12** Intenzita pásů methanolu a ethanolu – 5000 ms, 75% intenzity laseru

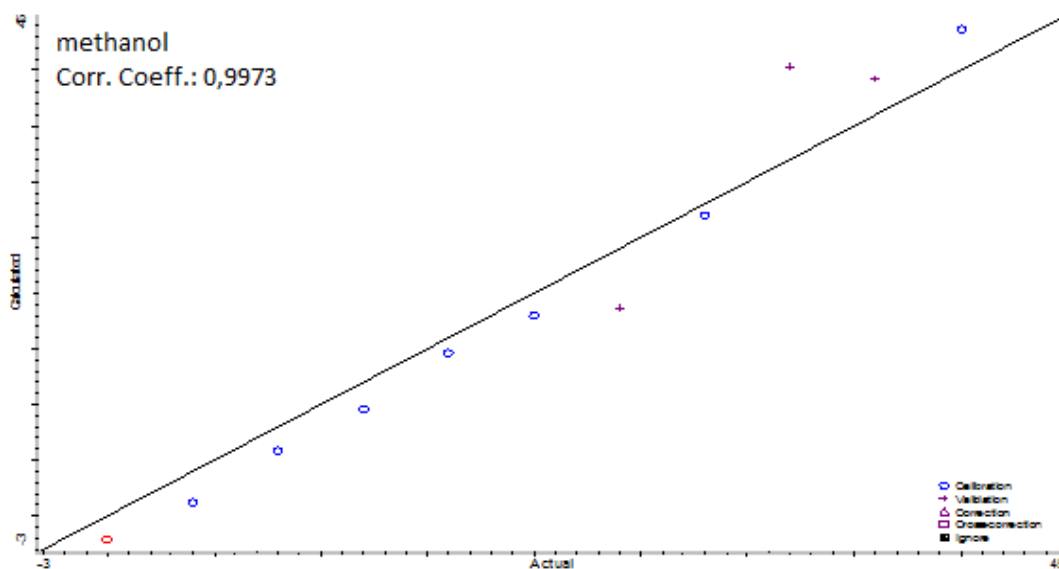
Číslo měření	Obsah MeOH (%)	Obsah EtOH (%)	Intenzita MeOH (Ramanův posun 1019 cm <sup>-1</sup> )	Intenzita EtOH (Ramanův posun 880 cm <sup>-1</sup> )
1.	0	40	427,16	3904,82
2.	4	36	721,08	3746,33
3.	8	32	917,71	3128,38
4.	12	28	1221,67	2837,01
5.	16	24	1613,65	2642,49
6.	20	20	1747,45	2071,66
7.	24	16	2102,03	1777,26
8.	28	12	2578,69	1499,68
9.	32	8	2601,74	963,98
10.	36	4	2927,16	612,75
11.	40	0	3783,97	321,60



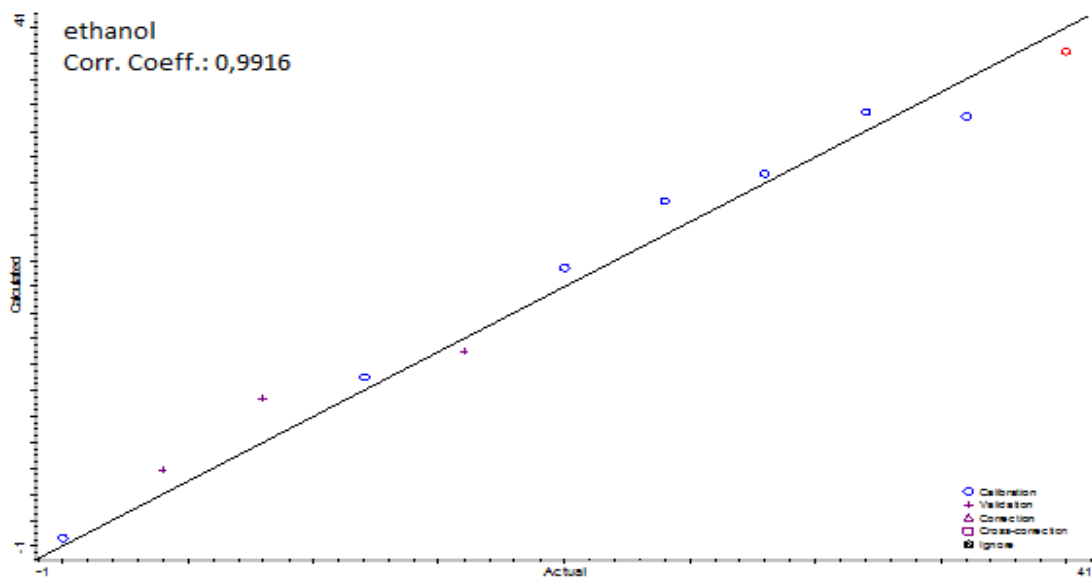
**Obrázek 28 a Obrázek 29** Kalibrační závislosti intenzit pásů methanolu a ethanolu, 5000 ms, 75% intenzita laseru (hodnoceno v Excelu)

Při hodnocení intenzit pásů methanolu linearitu nesplňuje, ale u ethanolu je linearita dosažena.

### 5.2.6 Kalibrace standardů methanolu a ethanolu při 100 % intenzitě laseru a integračním čase 7500 ms



**Obrázek 30** Kalibrační závislost plochy pásů methanolu, 7500 ms (hodnoceno v TQ-Analystu)

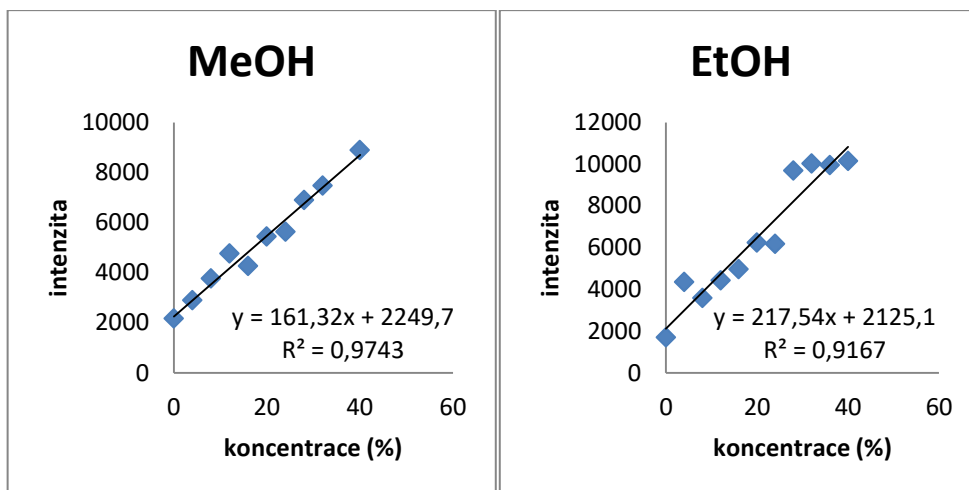


**Obrázek 31** Kalibrační závislost plochy pásu methanolu, 7500 ms (hodnoceno v TQ-Analystu)

Obě látky splňují linearitu pro hodnocení ploch pásů.

**Tabulka 13** Intenzita pásů methanolu a ethanolu – 7500 ms

Číslo měření	Obsah MeOH (%)	Obsah EtOH (%)	Intenzita MeOH (Ramanův posun 1019 cm <sup>-1</sup> )	Intenzita EtOH (Ramanův posun 880 cm <sup>-1</sup> )
1.	0	40	2166,00	10150,30
2.	4	36	2893,50	9945,10
3.	8	32	3771,40	10025,80
4.	12	28	4764,90	9693,50
5.	16	24	4266,50	6171,70
6.	20	20	5435,90	6239,50
7.	24	16	5627,10	4957,40
8.	28	12	6894,20	4423,00
9.	32	8	7474,80	3577,50
10.	36	4	14198,10	4348,10
11.	40	0	8885,40	1704,00



**Obrázek 32 a Obrázek 33** Kalibrační závislosti intenzit pásu methanolu a ethanolu, 7500 ms (hodnoceno v Excelu)

Linearita pro hodnocení intenzit pásu nedosažena ani v jednom případě.

### 5.2.7 Výběr optimálních podmínek pro uvedené kalibrační závislosti

**Tabulka 14** Porovnání linearit uvedených kalibrací za různých podmínek měření při změně obsahu methanolu a ethanolu

Měření – integrační časy, intenzita laseru, teplota	MeOH		EtOH	
	Plocha pásu	Intenzita pásu	Plocha pásu	Intenzita pásu
1000 ms, 100 %, laboratorní teplota	+	-	+	-
2500 ms, 100 %, laboratorní teplota	+	-	+	-
2500 ms, 100 %, teplota 4-8 °C	+	-	+	-
5000 ms, 100 %, laboratorní teplota	+	+	+	+
5000 ms, 75 %, laboratorní teplota	+	-	+	+
7500 ms, 100 %, laboratorní teplota	+	-	+	-

+ linearita splněna

- linearita nesplněna

Z uvedené tabulky vyplývá, že linearita pro hodnocení plochy pásů byla dostatečná u všech testovaných podmínek. U hodnocení intenzit pásů byla linearita dosažena pouze u kalibrace v integračním čase 5000 za za 100 % intenzity laseru při

laboratorní teplotě. Při stejném integračním čase, ale za nižší intenzity laseru 75 %, byla splněna linearita intenzit pásů pouze pro ethanol. U ostatních podmínek linearita pro intenzitu pásů dosažena nebyla, proto je doporučeno používat pro kalibraci hodnocení plochou pásů.

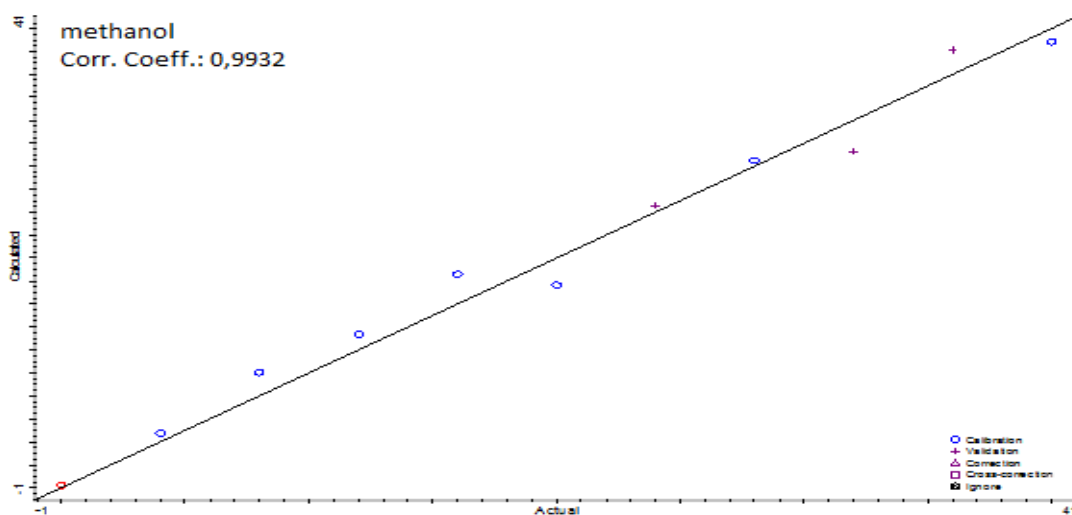
U kratších integračních časů byla zaznamenána nižší opakovatelnost a delší zase prodlužují měření. Proto byl vybrán jako kompromis integrační čas 5000 ms za 100 % intenzity laseru při laboratorní teplotě.

### 5.3 Kalibrace methanolu a ethanolu - změna obsahu methanolu

#### 5.3.1 Kalibrace methanolu při 100 % intenzitě laseru a integračním čase 1000 ms

**Tabulka 15** Výběr odpovídajících oblastí ploch pásů Ramanových spekter standardů methanolu a ethanolu pro vyhodnocení kalibrace

Methanol (cm <sup>-1</sup> )		
Plocha pásu	1 036,00	1 005,00
Hraniční body	1 060,00	986,00
Minimum v rozsahu	1 070,00	994,00
Ethanol (cm <sup>-1</sup> )		
Plocha pásu	900,00	860,00
Hraniční body	910,00	850,00
Minimum v rozsahu	970,00	825,00



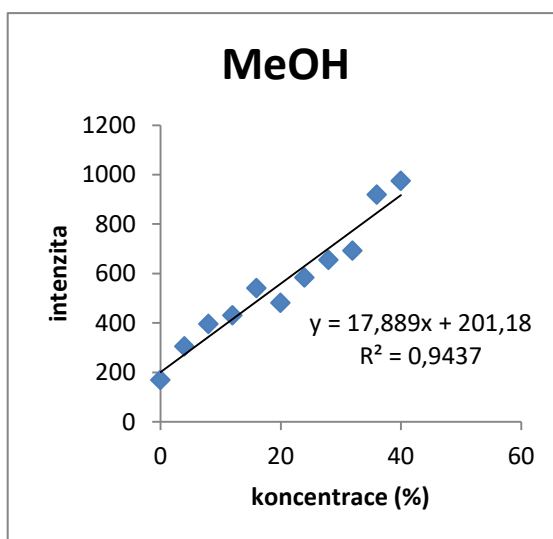
**Obrázek 34** Kalibrační závislost plochy pásu methanolu, 1000 ms, změna obsahu methanolu (hodnoceno v TQ-Analystu)

Pro hodnocení ploch pásů byla linearita pro methanol splněna.



**Tabulka 16** Intenzita pásů methanolu a ethanolu – 1000 ms, změna obsahu methanolu

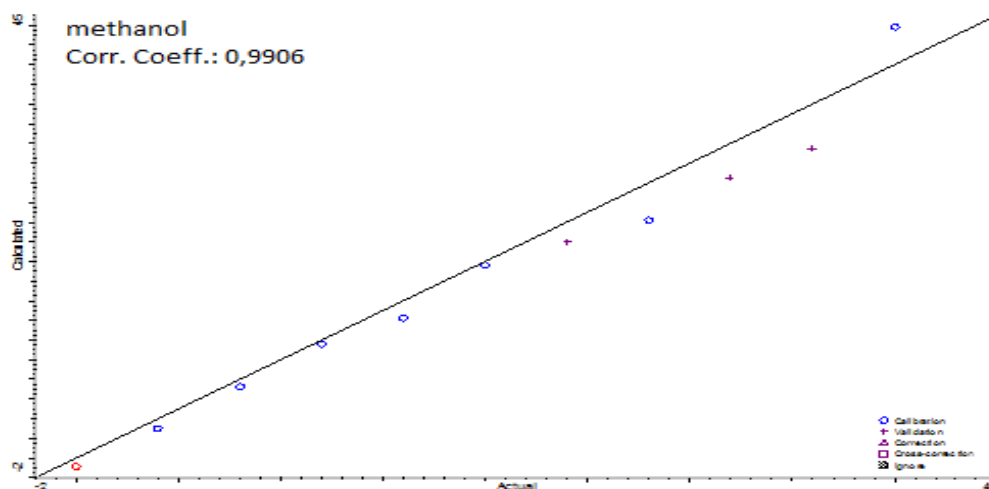
Číslo měření	Obsah MeOH (%)	Obsah EtOH (%)	Intenzita MeOH (Ramanův posun 1019 cm <sup>-1</sup> )	Intenzita EtOH (Ramanův posun 880 cm <sup>-1</sup> )
1.	0	40	168,62	1171,33
2.	4	40	304,45	1362,71
3.	8	40	396,10	1349,32
4.	12	40	430,68	1226,71
5.	16	40	541,05	1229,59
6.	20	40	481,77	1006,41
7.	24	40	584,15	1130,30
8.	28	40	655,42	1151,62
9.	32	40	692,34	1062,89
10.	36	40	919,54	1306,40
11.	40	40	974,54	1265,35



**Obrázek 35** Kalibrační závislost intenzity pásů methanolu, 1000 ms, změna obsahu methanolu

Linearitu pro hodnocení intenzit pásů methanol nespĺňuje.

### 5.3.2 Kalibrace standardu methanolu při 100 % intenzitě laseru a čase 2500 ms

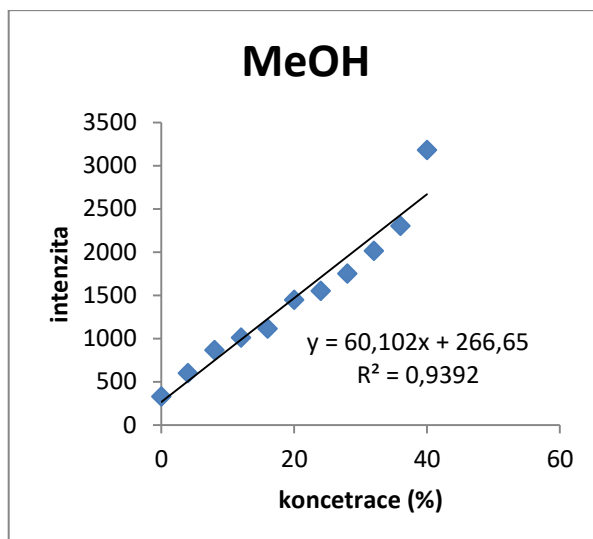


**Obrázek 36** Kalibrační závislost plochy pásu methanolu, 2500 ms, změna obsahu methanolu (hodnoceno v TQ-Analystu)

Opětovně při hodnocení ploch pásu methanolu linearita dosažena.

**Tabulka 17** Intenzita pásů methanolu a ethanolu – 2500 ms, změna obsahu methanolu

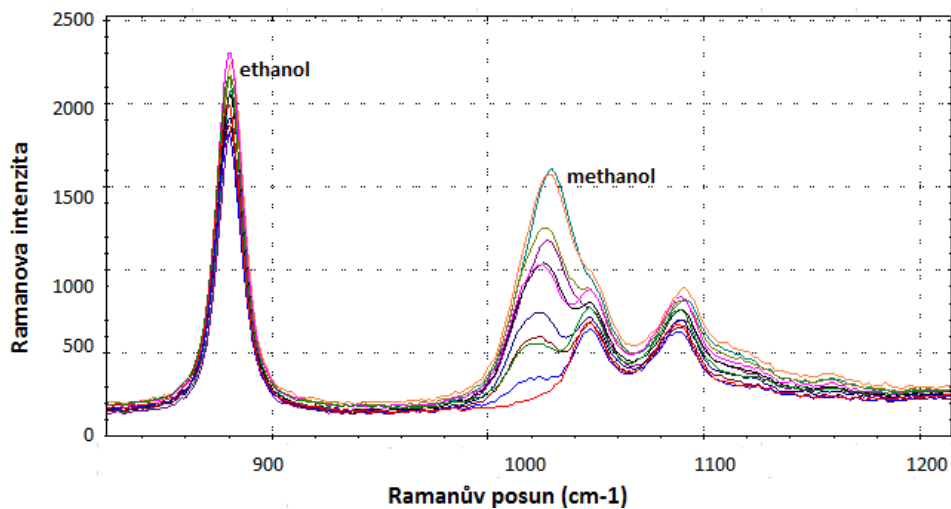
Číslo měření	Obsah MeOH (%)	Obsah EtOH (%)	Intenzita MeOH (Ramanův posun 1019 cm <sup>-1</sup> )	Intenzita EtOH (Ramanův posun 880 cm <sup>-1</sup> )
1.	0	40	327,11	2880,40
2.	4	40	598,10	3050,16
3.	8	40	864,34	3196,71
4.	12	40	1010,07	3154,11
5.	16	40	1113,51	2898,83
6.	20	40	1446,93	3249,60
7.	24	40	1549,81	3071,31
8.	28	40	1749,77	3001,72
9.	32	40	2013,45	3133,98
10.	36	40	2302,56	3238,83
11.	40	40	3179,92	4157,86



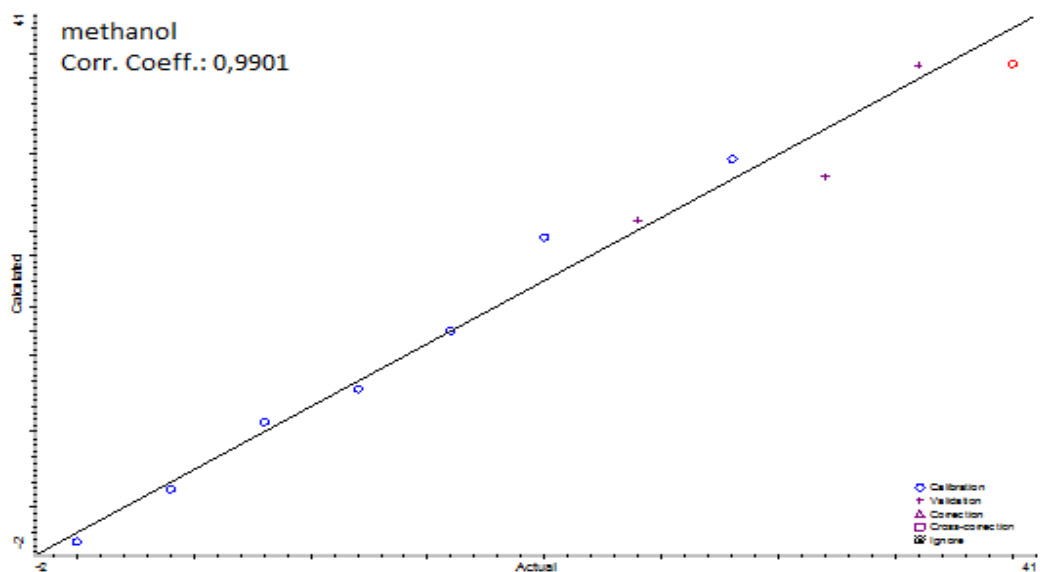
**Obrázek 37** Kalibrační závislost intenzity pásu methanolu, 2500 ms, změna obsahu methanolu

Při hodnocení intenzit pásu methanolu linearita opět nedosažena.

### 5.3.3 Kalibrace standardu methanolu při 75 % intenzitě laseru a integračním čase 2500 ms



**Obrázek 38** Ramanova spektra methanolu a ethanolu při 75 % intenzitě laseru a integračním čase 2500 ms (BWSpec)

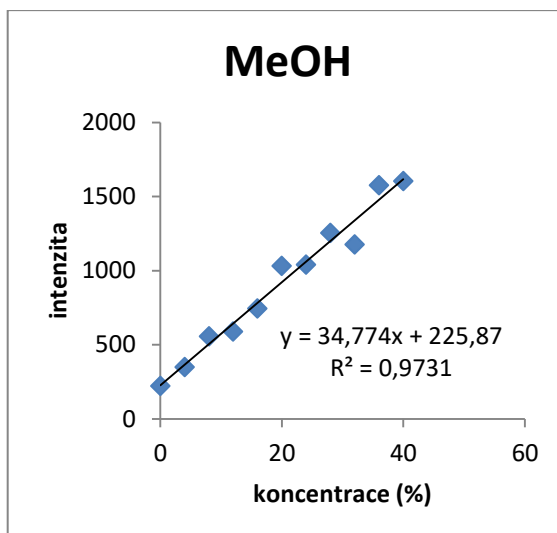


**Obrázek 39** Kalibrační závislost plochy pásu methanolu, 2500 ms, 75% intenzita laseru, změna obsahu methanolu (hodnoceno v TQ-Analystu)

Opětovně při hodnocení ploch pásu methanolu linearita dosažena.

**Tabulka 18** Intenzita pásů methanolu a ethanolu – 2500 ms, 75% intenzita laseru, změna obsahu methanolu

Číslo měření	Obsah MeOH (%)	Obsah EtOH (%)	Intenzita MeOH (Ramanův posun 1019 cm <sup>-1</sup> )	Intenzita EtOH (Ramanův posun 880 cm <sup>-1</sup> )
1.	0	40	221,08	2000,77
2.	4	40	347,93	1816,53
3.	8	40	557,02	2156,67
4.	12	40	588,39	1869,48
5.	16	40	742,84	1906,54
6.	20	40	1030,38	2305,17
7.	24	40	1040,36	2056,02
8.	28	40	1253,14	2169,68
9.	32	40	1176,13	1843,33
10.	36	40	1574,48	2248,75
11.	40	40	1603,09	2084,27

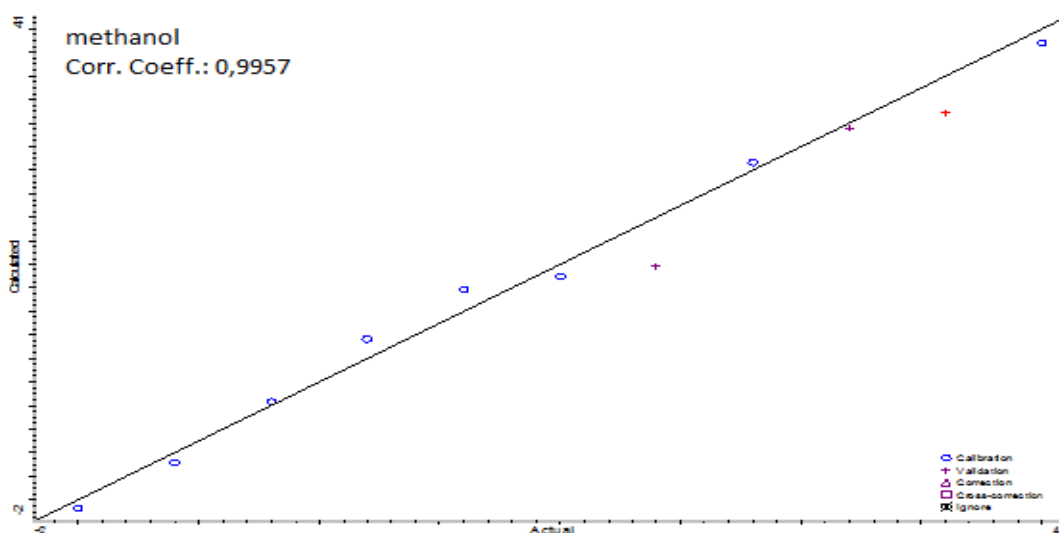


**Obrázek 40** Kalibrační závislost intenzit pásu methanolu, 2500 ms, 75% intenzita laseru, změna obsahu methanolu

Při hodnocení intenzit pásu methanolu linearita opět nedosažena.

Při měření změny obsahu methanolu za integračního času 2500 ms byly použity dvě rozdílné intenzity laseru 100 % a 75 %. Podle porovnání hodnot korelačních koeficientů kalibračních závislostí pro plochy pásu methanolu je linearita splněna v obou případech a pro intenzity pásu methanolu v obou případech nesplněna.

#### 5.3.4 Kalibrace standardu methanolu při 100 % intenzitě laseru a integračním čase 5000 ms

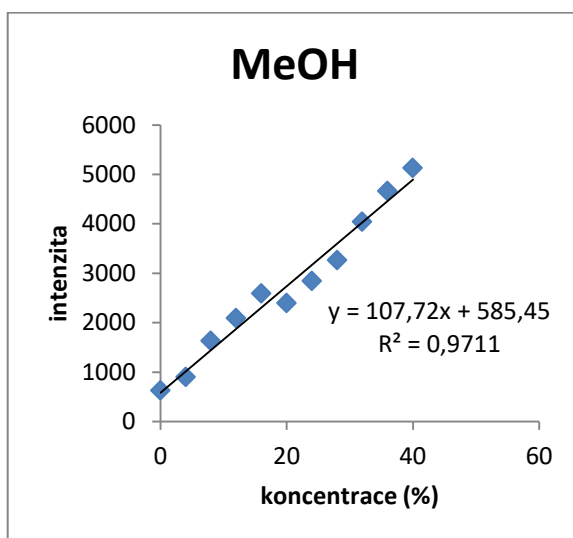


**Obrázek 41** Kalibrační závislost plochy pásu methanolu, 5000 ms, změna obsahu methanolu

Při hodnocení ploch pásu methanolu linearita dosažena.

**Tabulka 19** Intenzita pásů methanolu a ethanolu – 5000 ms, změna obsahu methanolu

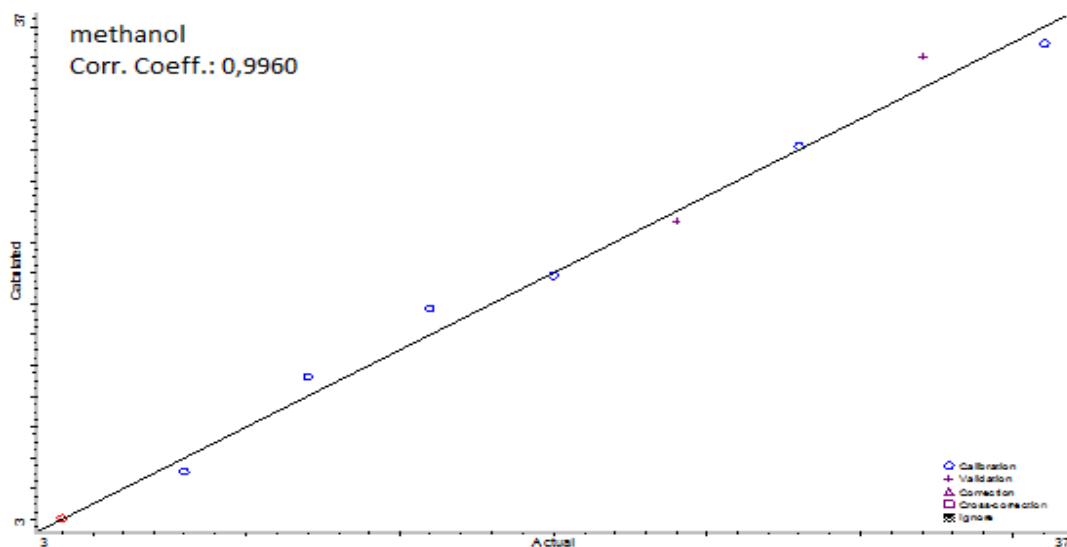
Číslo měření	Obsah MeOH (%)	Obsah EtOH (%)	Intenzita MeOH (Ramanův posun 1019 cm <sup>-1</sup> )	Intenzita EtOH (Ramanův posun 880 cm <sup>-1</sup> )
1.	0	40	625,66	5650,31
2.	4	40	894,67	5101,09
3.	8	40	1625,93	6317,41
4.	12	40	2090,52	6719,89
5.	16	40	2584,52	6587,06
6.	20	40	2390,36	5321,46
7.	24	40	2840,55	5600,66
8.	28	40	3263,54	5663,71
9.	32	40	4035,44	6333,71
10.	36	40	4659,73	6535,13
11.	40	40	5126,48	6713,50



**Obrázek 42** Kalibrační závislost intenzity pásů methanolu, 5000 ms, změna obsahu methanolu (hodnoceno v Excelu)

Při hodnocení intenzit pásů methanolu linearita nedosažena.

### 5.3.5 Kalibrace standardu methanolu při 100 % intenzitě laseru a integračním čase 7500 ms

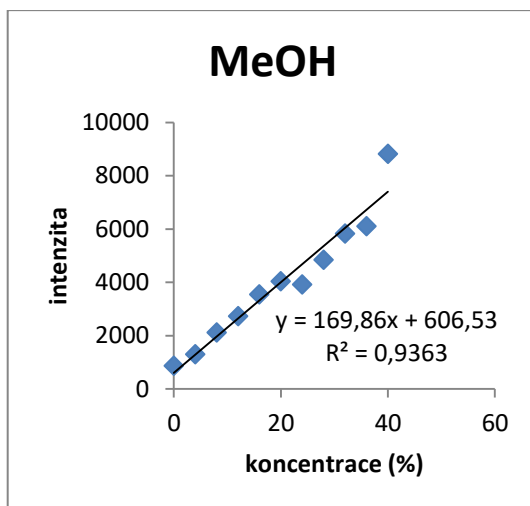


**Obrázek 43** Kalibrační závislost plochy pásu methanolu, 7500 ms, změna obsahu methanolu

Při hodnocení ploch pásu methanolu linearita dosažena.

**Tabulka 20** Intenzita pásů methanolu a ethanolu – 7500 ms, změna obsahu methanolu

Číslo měření	Obsah MeOH (%)	Obsah EtOH (%)	Intenzita MeOH (Ramanův posun 1019 cm <sup>-1</sup> )	Intenzita EtOH (Ramanův posun 880 cm <sup>-1</sup> )
1.	0	40	858,77	7973,15
2.	4	40	1291,22	7025,16
3.	8	40	2110,94	7220,64
4.	12	40	2726,28	6271,87
5.	16	40	3536,79	5846,81
6.	20	40	4036,46	4774,83
7.	24	40	3908,01	3312,76
8.	28	40	4833,33	8382,61
9.	32	40	5825,74	9094,98
10.	36	40	6097,03	8645,83
11.	40	40	8815,49	11535,85



**Obrázek 44** Kalibrační závislost intenzity pásu methanolu, 7500 ms, změna obsahu methanolu

Při hodnocení intenzit pásu methanolu linearita nedosažena.

### 5.3.6 Výběr optimálních podmínek pro uvedené kalibrační závislosti

**Tabulka 21** Porovnání linearit uvedených kalibrací za různých podmínek měření při změně obsahu methanolu

Měření – integrační časy, intenzita laseru, teplota	MeOH	
	Plocha pásu	Intenzita pásu
1000ms, 100 %, laboratorní teplota	+	-
2500 ms, 100 %, laboratorní teplota	+	-
2500 ms, 75 %, laboratorní teplota	+	-
5000ms, 100 %, laboratorní teplota	+	-
7500 ms, 100 %, laboratorní teplota	+	-

+ linearita splněna

- linearita nesplněna

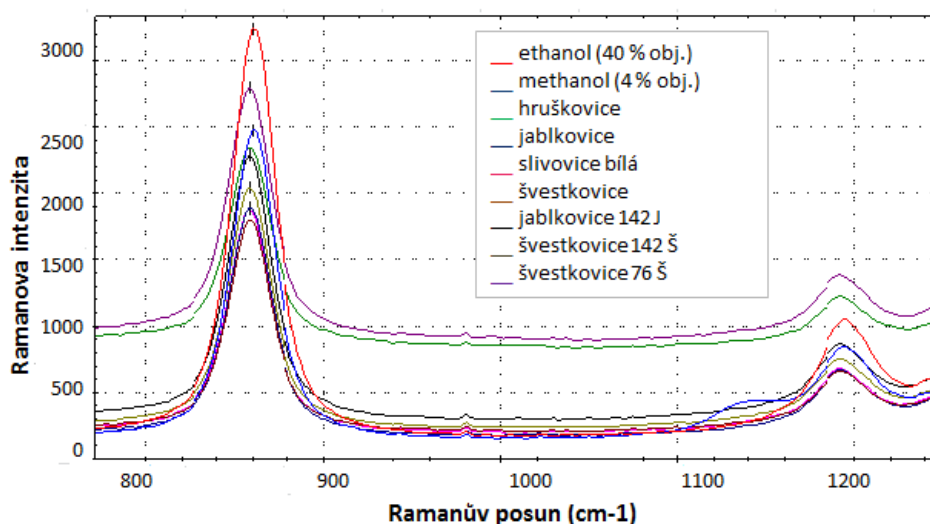
Linearita pro hodnocení plochy pásů byla opět dostatečná u všech testovaných podmínek stanovení methanolu. Žádné z testovaných podmínek pro hodnocení intenzit pásů methanolu nespĺňovaly linearitu, a proto je opět doporučeno používat pro kalibraci hodnocení plochou pásů.



Opět byl vybrán jako kompromis integrační čas 5000 ms za 100 % intenzity laseru při laboratorní teplotě pro stabilitu signálu a lepší opakovatelnost. Při ostatních testovaných podmínkách kalibrací při změně methanolu nebyla ani v jednom případě zaznamenána odlehlá hodnota při kalibrační závislosti intenzit pásů, z čehož vyplývá vyšší stabilita signálu a opakovatelnost pro uvedený typ kalibrace změnou obsahu pouze jedné látky (methanolu) oproti změně obsahu obou látek (methanolu a ethanolu).

#### 5.4 Stanovení ethanolu ve vybraných alkoholických nápojích

Pro stanovení ethanolu bylo vybráno 7 vzorků alkoholických nápojů. Do 1 ml skleněných vialek bylo napipetováno 0,5 ml vybraného vzorku alkoholického nápoje a doplněno do 1ml demineralizovanou vodou. Takto naředěné vzorky ve vialkách byly změřeny při integračním čase 5000 ms za 100 % intenzity laseru. Ve vzorcích byly ve spektru v programu BWSpec identifikovány pásy ethanolu a porovnány s pásem standardu ethanolu při integračním čase 5000 ms a intenzity laseru 100 % při laboratorní teplotě. Dále bylo provedeno stanovení ethanolu ve vzorcích. V programu TQ Analyst byla použita kalibrační závislost při integračním čase 5000 ms a 100 % intenzity laseru při laboratorní teplotě za změny obsahu methanolu a ethanolu. Výsledky měření jsou uvedeny v tabulce č. 22.



**Obrázek 45** Ramanova spektra vybraných vzorků alkoholických nápojů s porovnáním se standardy ethanolu při nejvyšší koncentraci (40 % obj.) a methanolu při nejnižší koncentraci (4 % obj.)

Na obrázku č. 45 lze vidět, že při identifikaci ethanolu se pásy Ramanových spekter testovaných vzorků shodují s pásem standardu ethanolu. Při identifikaci methanolu nebyl pás nalezen u žádného z testovaných vzorků. Methanol tak nemohl být identifikován a ani nemohlo být stanoveno jeho množství a porovnáno s výsledky plynové chromatografie, a to z důvodu, že v této práci byla zvolena nejnižší koncentrace standardu methanolu 4 % obj. Nejvyšší obsah methanolu ve vybraných alkoholických nápojích byl pouze 0,5 % obj. (stanoveno pomocí plynové chromatografie, není součástí diplomové práce).

**Tabulka 22** Přehled vybraných vzorků alkoholických nápojů

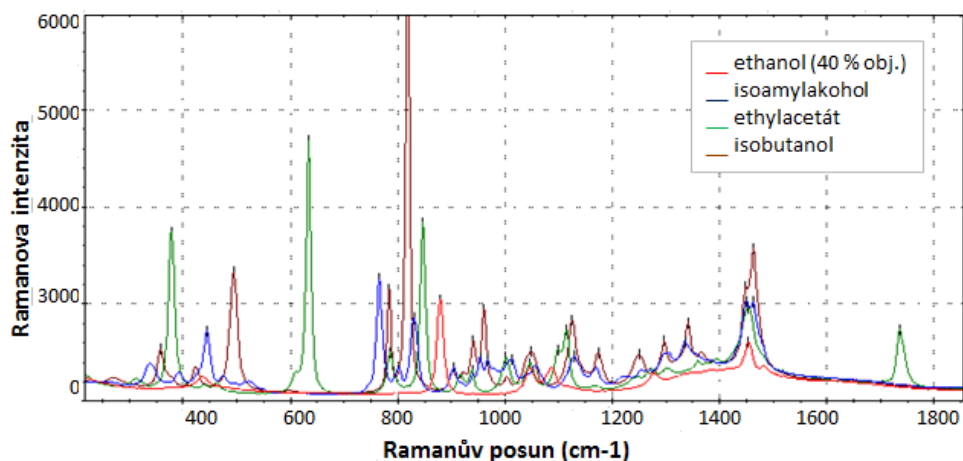
Vzorky	Množství ethanolu uvedeného na obalu (% obj.)	Změřená hodnota ethanolu lihoměrem (% obj.)	Stanovení ethanolu pomocí Ramanovy spektrometrie (%)
Hruškovice	36	38	45,26
Jablkovice	neuveďeno	malé množství pro změření lihoměrem	51,40
Slivovice bílá	45	48	49,92
Slivovice	50	malé množství pro změření lihoměrem	47,72
Jablkovice (BAB 142 J)	neuveďeno	malé množství pro změření lihoměrem	60,26
Slivovice (BAB 142 Š)	neuveďeno	malé množství pro změření lihoměrem	56,46
Slivovice (BAB 76 Š)	neuveďeno	malé množství pro změření lihoměrem	55,84

Pozn. měření lihoměrem prováděno za laboratorní teploty. U některých testovaných vzorků alkoholických nápojů bylo uvedeno množství ethanolu na obalu. Ve dvou případech bylo změřeno množství ethanolu lihoměrem. Ostatní vzorky měření neumožňovaly kvůli nedostatečnému objemu.

U vzorku slivovice se jedná o domácí pálenku, kdy palírna deklaruje, že vzorek obsahuje 50 % obj. ethanolu.

#### 5.4.1 Nejčastěji se vyskytující nečistoty ve vybraných alkoholických nápojích

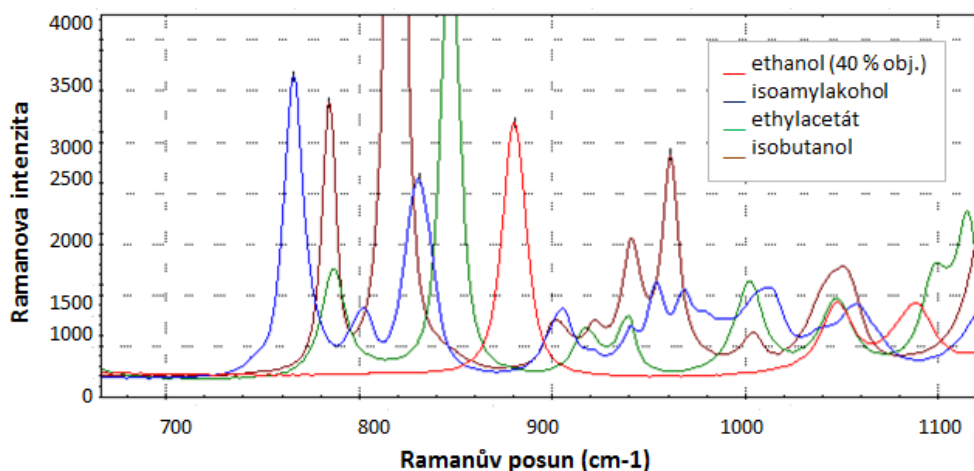
Byly vybrány standardy isoamylalkoholu, ethylacetátu a isobutanolu. Dále došlo k testování možností identifikace vybraných standardů alkoholových nečistot, kdy bylo zjištěno, že jejich pásy se nepřekrývají s pásem ethanolu. Ve spektru všech vzorků alkoholických nápojů však pásy nečistot nebyly nalezeny ani u jedné z testovaných látek.



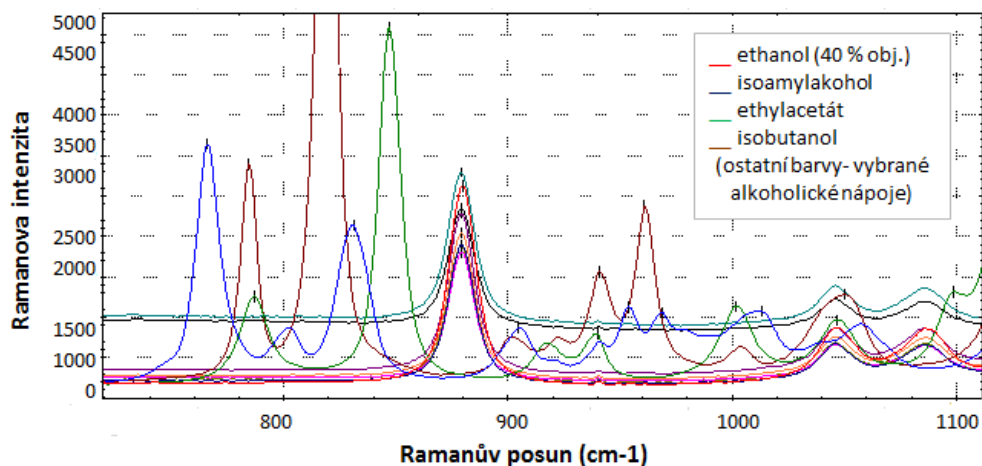
**Obrázek 46** Ramanova spektra standardů ethanolu a standardů vybraných nečistot při 100 % intenzitě laseru a integračním čase 5000 ms pro identifikaci pásů daných látek

Charakteristické pásy Ramanových spekter: (byly vybrány pásy z oblastí Ramanova posunu, které se vzájemně nepřekrývají s jinou látkou)

- ethanol ( $879\text{ cm}^{-1}$ ;  $1030\text{ cm}^{-1}$ ;  $1079\text{ cm}^{-1}$ )
- isoamylalcohol ( $339\text{ cm}^{-1}$ ;  $444\text{ cm}^{-1}$ ;  $446\text{ cm}^{-1}$ ;  $766\text{ cm}^{-1}$ ;  $831\text{ cm}^{-1}$ )
- ethylacetát ( $379\text{ cm}^{-1}$ ;  $635\text{ cm}^{-1}$ ;  $837\text{ cm}^{-1}$ )
- isobutanol ( $495\text{ cm}^{-1}$ ;  $820\text{ cm}^{-1}$ )

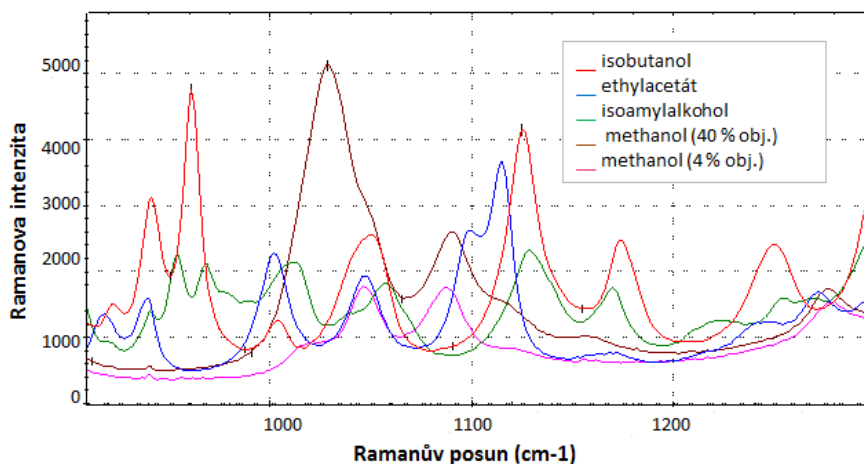


**Obrázek 47** Identifikace standardů nečistot a porovnání se standardem ethanolu při nejvyšší koncentraci (40% obj.)



**Obrázek 48** Porovnání spekter nečistot, vzorků vybraných alkoholických nápojů standardu ethanolu o nejvyšší koncentraci (40 % obj.)

Z obrázku č. 48 jednotlivých spekter je vidět, že vybrané alkoholické nápoje mají shodné pásy pouze s Ramanovým spektrem ethanolu, a to v oblasti Ramanova posunu  $879\text{ cm}^{-1}$ ,  $1030\text{ cm}^{-1}$  a  $1079\text{ cm}^{-1}$ . S vybranými nečistotami se ani v jednom pásu neshodují, proto nebyly dané nečistoty v měřených vzorcích identifikovány ani stanoveny.



**Obrázek 49** Porovnání Ramanových spekter standardů methanolu s nejvyšší koncentrací (40 % obj.) a nejnižší koncentrací (4 % obj.) se spektry standardů nečistot

V Ramanových spektrech interferují signály nečistot se signálem standardu methanolu. Intenzita signálu pásů isobutanolu a ethylacetátu je vyšší než nejnižší zvolená koncentrace standardu methanolu (viz obr. č. 49). Pokud by testované vzorky obsahovaly detekovatelné množství nečistot a methanolu nebylo by možné methanol stanovit.

## 5.5 Souhrn výsledků

Pro identifikaci a stanovení methanolu a ethanolu byly vybrány dva typy kalibrací. Jednalo se o kalibraci, kdy se měnil obsah methanolu a ethanolu a o kalibraci, kde se měnil pouze obsah methanolu.

Měření kalibrací probíhalo za různých zvolených parametrů (skleněná baňka a skleněná vialka, integrační čas, intenzita laseru, teplota), kdy bylo testováno, jestli změna integračního času, intenzity laseru nebo teploty způsobí významnou změnu linearitu stanovení methanolu a ethanolu. Rozhodujícími parametry při výběru optimálních podmínek metody byly hodnoty korelačních koeficientů kalibračních závislostí hodnoceny plochou a intenzitou pásů methanolu a ethanolu.

Byly vybrány integrační časy 1000 ms, 2500 ms, 5000 ms, 7500 ms. Nejvyšší linearitu měření pro plochu pásu v prvním typu kalibrace vykazoval podle hodnoty korelačního koeficientu integrační čas 2500 ms. Při vyhodnocování intenzity signálu ale nevykazoval dostatečnou stabilitu ve spektrech, proto byl zvolen za optimální integrační čas 5000 ms, který měl nejstabilnější intenzitu signálu. V druhém typu kalibrace měl nejvyšší linearitu pro plochu pásu a nejstabilnější intenzitu signálu také integrační čas 5000 ms.

Zvolené parametry intenzity laseru byly hodnoty 100 % a 75 %. V obou případech při hodnocení kalibrační závislosti ploch pásů bylo dosaženo linearitu. Nižší intenzita laseru je pro měření také použitelná.

Většina měření probíhala za laboratorní teploty. Při prvním typu kalibrace v integračním čase 2500 ms a 100 % intenzity laseru probíhalo měření za laboratorní a teploty 4-8 °C. Při porovnání obou typů Ramanových spekter je při měření za teploty 4-8 °C viditelný posun intenzity pásů jednotlivých spekter na ose y (Ramanova intenzita) o kladnou hodnotu 1000. Dále je možné si povšimnout, že podle dostatečných rozdílů v naměřených spektrech nemá teplota 4-8 °C vliv na hodnocení obsahu jednotlivých látek ve vzorku. Je ale nutné dodržet stejnou teplotu pro měření všech roztoků včetně hodnocených vzorků.

Výsledkem měření bylo zjištěno, že linearitu bylo dosaženo u všech podmínek pouze pro hodnocení kalibrační závislosti ploch pásů. Intenzita pásů linearitu nespĺňuje, proto je nevhodná pro hodnocení kalibrací uvedených látek.

Standardy methanolu a ethanolu byly identifikovány ve spektrech v programu BWSpec. Pro ethanol byl určen hlavní pás v oblasti Ramanova posunu  $880\text{ cm}^{-1}$  a pro methanol byl určen hlavní pás v oblasti Ramanova posunu  $1019\text{ cm}^{-1}$ . Obě hodnoty byly porovnány s odbornou literaturou [12] pro potvrzení, že se jedná o správnou identifikaci obou látek.

Stejným způsobem probíhala identifikace methanolu a ethanolu ve vybraných alkoholických nápojích. Vzorky byly měřeny za zvolených optimálních podmínek v integračním čase 5000 ms a 100 % intenzitě laseru za laboratorní teploty. Ethanol byl ve všech vybraných vzorcích identifikovatelný. Methanol nebyl identifikován ani v jednom vzorku. Jeho množství bylo ve vzorcích tak malé, že nebyly pásy na spektru za těchto daných podmínek viditelné.

Dále byla testována identifikace standardů vybraných alkoholických nečistot. Postupovalo se opět stejným způsobem. Ve spektru byly vybrány pásy, které se vzájemně nepřekrývaly a identifikovaly tak jednotlivé nečistoty. Jejich pásy se nepřekrývaly s pásem ethanolu, proto mohlo být množství ethanolu ve vzorcích stanoveno vybranou metodou. S pásem methanolu docházelo k interferencím, což by komplikovalo identifikaci i stanovení těchto vybraných látek, pokud by se nečistoty vyskytovaly v testovaných vzorcích v detekovatelném množství. Protože však v daném rozmezí spektra nebyl nalezen žádný pás, bylo potvrzeno, že se uvedené látky (včetně methanolu) ve vzorcích nevyskytují, resp. u methanolu nepřesahují 4 % obj.

Methanol nebyl ve vzorcích testovaných lihovin pomocí Ramanovy spektrometrie při těchto daných podmínkách stanoven. Nejnižší koncentrace, kterou bylo možné stanovit pomocí vytvořených kalibrací (nejnižší koncentrace methanolu 4 % obj. při obou typech kalibrací) odpovídala příliš vysokému množství, které se ve vzorcích nevyskytovalo. Nejvyšší naměřená koncentrace zjištěná u daných vzorků pomocí plynové chromatografie byla 0,5 %. Bylo zde tak ověřeno, že vybrané vzorky ovocných destilátů splňují již v této práci zmíněné znění nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 110/2008 o maximálním obsahu methanolu v lihovinách a nejedná se o pančované alkoholické nápoje. V případě, že by vzorek obsahoval vyšší množství methanolu 4 a více % obj., byla by metoda s našimi vytvořenými kalibracemi vhodná pro rychlé a snadné odlišení pančovaných lihovin.

Ethanol byl pomocí Ramanovy spektrometrie ve vybraných vzorcích stanoven. Měření probíhalo za optimálních podmínek podle prvního typu kalibrace za změny obsahu methanolu a ethanolu. Výsledky byly zaznamenány do tabulky č. 22 a odpovídají očekávanému obsahu ethanolu.

## 5.6 Přesnost kvantitativní Ramanovy spektrometrie

**Tabulka 23** Hodnocení relativní směrodatné odchylky (rozptylu jednotlivých naměřených hodnot pro ethanol v testovaných reálných vzorcích)

Typ vzorku	1. měření	2. měření	3. měření	Průměr	SD	RSD (%)
Hruškovice	45,26	43,62	46,54	45,14	1,20	2,66
Jablkovice	51,40	49,42	47,88	49,57	1,44	2,90
Slivovice bílá	49,92	48,40	48,62	48,98	0,67	1,37
Slivovice	47,72	46,50	47,23	47,15	0,50	1,06
BAB 142 J	60,26	58,02	60,28	59,52	1,06	1,78
BAB 142 Š	56,46	54,34	54,96	55,25	0,89	1,61
BAB 76 Š	55,84	53,82	57,09	55,58	1,35	2,44

SD směrodatná odchylka

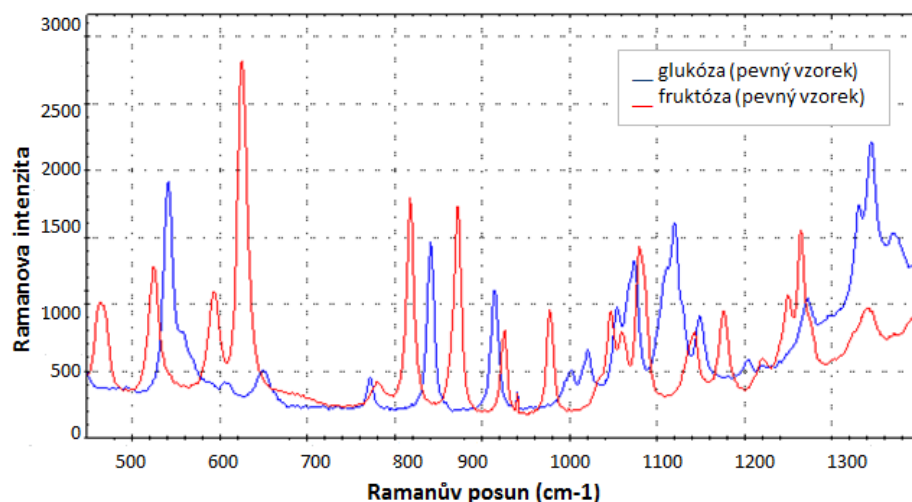
RSD relativní směrodatná odchylka (rozptyl jednotlivých naměřených hodnot)

$RSD (\%) = (SD / \text{průměr}) * 100$

Při porovnání s odbornými studii byla přesnost Ramanovy spektrometrie určena pro methanol od 0,5 do 3,2 % a pro ethanol od 2,5 do 3,9 % [12]. A v druhé studii pro ethanol se pohybovala v rozmezí 0,2 - 0,7 % [17]. Získané hodnoty jsou tedy porovnatelné s přesností měření nalezených v odborné literatuře.

## 5.7 Identifikace a stanovení glukózy a fruktózy ve vybraných vzorcích sirupů

### 5.7.1 Identifikace Ramanových spekter standardů glukózy a fruktózy

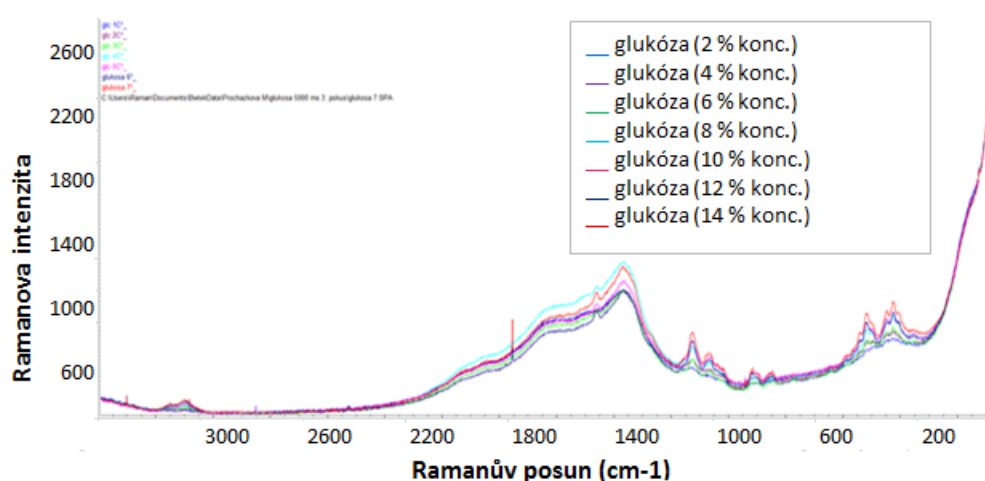


**Obrázek 50** Ramanova spektra standardů pevných vzorků glukózy a fruktózy při 100 % intenzitě laseru a čase 5000 ms pro identifikaci obou látek (BWSpec)

Charakteristické pásy Ramanových spekter: (byly vybrány pásy s oblastí Ramanova posunu, které se vzájemně nepřekrývají s druhou látkou)

- Glukóza: 848 cm<sup>-1</sup>; 918 cm<sup>-1</sup>; 1125 cm<sup>-1</sup>
- Fruktóza: 627 cm<sup>-1</sup>; 822 cm<sup>-1</sup>; 870 cm<sup>-1</sup>

#### 5.7.1.1 Kalibrace standardu glukózy při 100 % intenzitě laseru a integračním čase 5000 ms

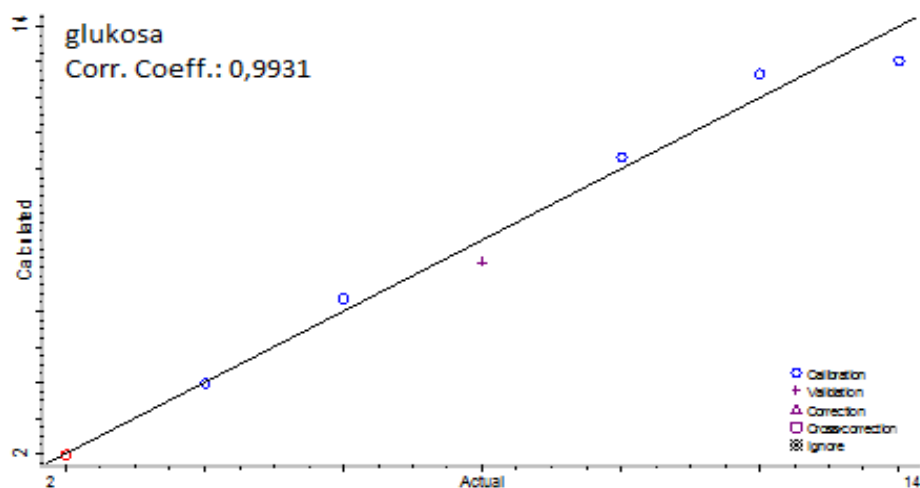


**Obrázek 51** Ramanova spektra glukózy v 7 postupně zvyšujících se koncentracích (Omnice)



**Tabulka 24** Výběr odpovídajících oblastí ploch pásů Ramanových spekter standardu glukózy pro vyhodnocení kalibrace

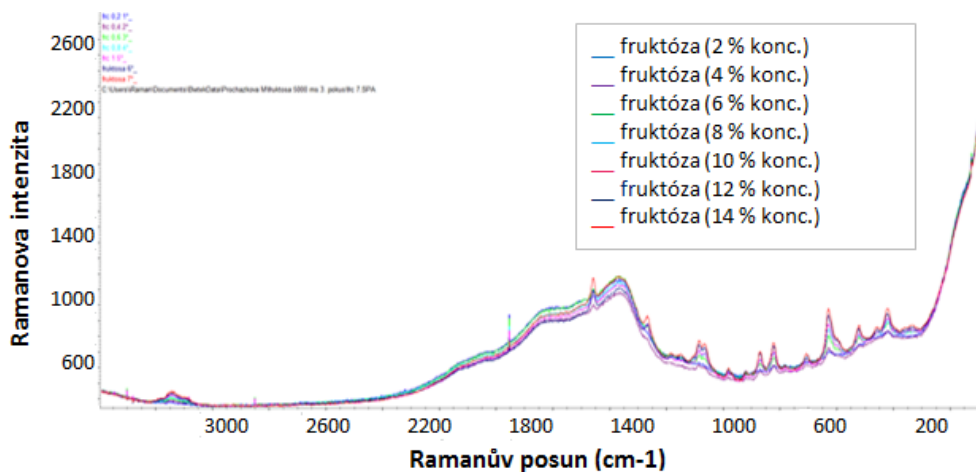
Glukóza (cm <sup>-1</sup> )		
Plocha pásu	873,00	836,00
Hraniční body	883,00	820,00
Minimum v rozsahu	876,00	818,00
Plocha pásu	930,00	899,00
Hraniční body	973,00	891,00
Minimum v rozsahu	938,00	884,00
Plocha pásu	1140,00	1113,00
Hraniční body	1161,00	1099,00
Minimum v rozsahu	1144,00	1093,00



**Obrázek 52** Kalibrační závislost plochy pásů glukózy (vyhodnoceno v TQ-Analystu)

Z vyplývající hodnoty korelačního koeficientu je pro plochu pásu u standardu glukózy splněna linearita.

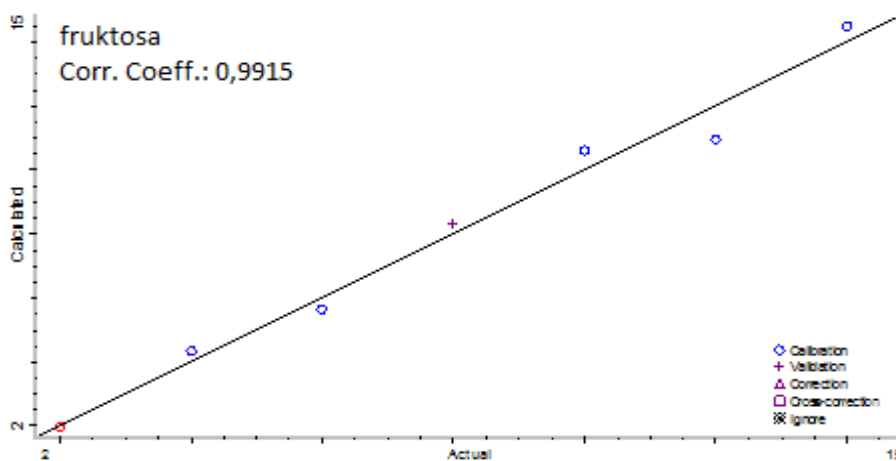
**5.7.1.2 Kalibrace standardu fruktózy při 100 % intenzitě laseru a integračním čase 5000 ms**



**Obrázek 53** Ramanova spektra fruktózy v 7 postupně zvyšujících se koncentracích (Omnice)

**Tabulka 25** Výběr odpovídajících oblastí ploch pásů Ramanových spekter standardu fruktózy pro vyhodnocení kalibrace

Fruktóza (cm <sup>-1</sup> )		
Plocha pásu	638,00	615,00
Hraniční body	650,00	612,00
Minimum v rozsahu	640,00	610,00
Plocha pásu	832,00	811,00
Hraniční body	853,00	806,00
Minimum v rozsahu	846,00	803,00
Plocha pásu	881,00	859,00
Hraniční body	899,00	855,00
Minimum v rozsahu	895,00	854,00

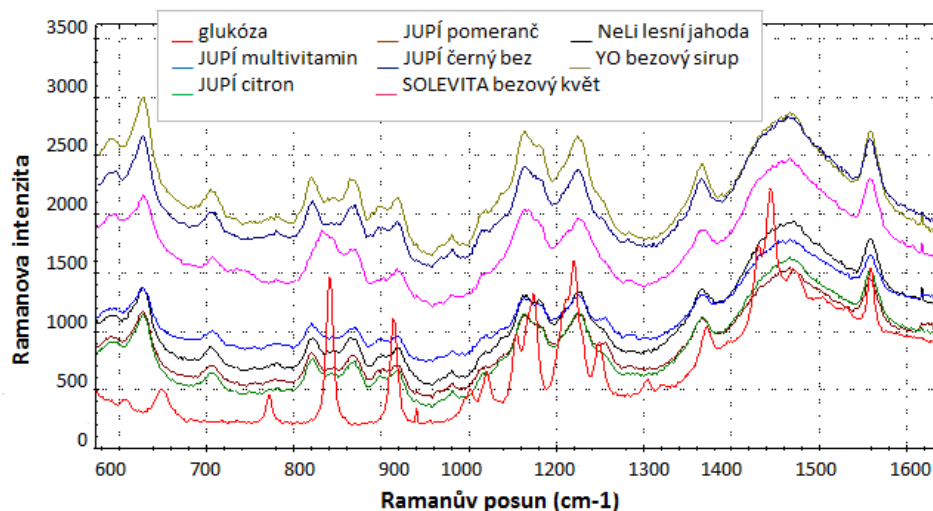


**Obrázek 54** Kalibrační závislost plochy pásů fruktózy (vyhodnoceno v TQ-Analystu)

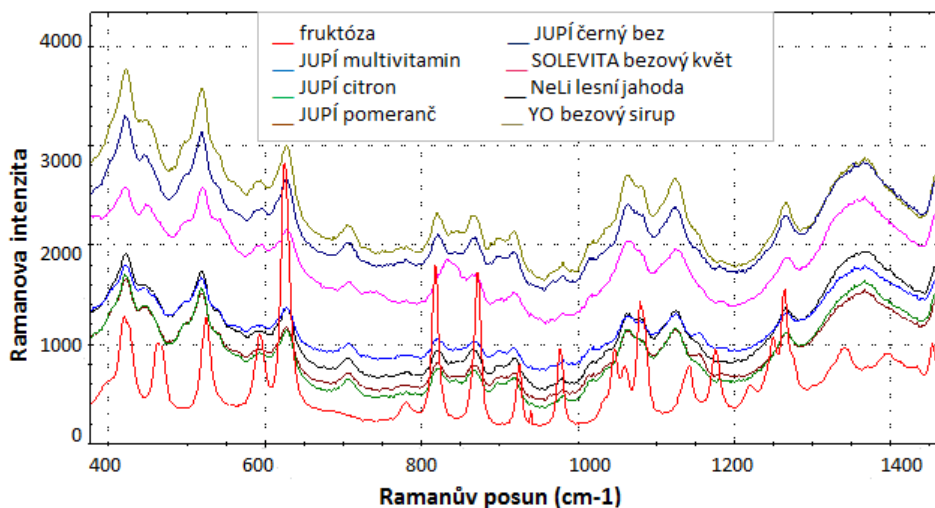
Z vyplývající hodnoty korelačního koeficientu je pro plochu pásu u standardu fruktózy také splněna linearita.

### 5.7.2 Stanovení glukózy a fruktózy ve vybraných sirupech

Bylo vybráno 7 vzorků sirupů. Vzorky byly naředěny na 50 objemových %. Do 1 ml skleněných vialek bylo jednotlivě napipetováno 0,5 ml vzorku sirupu a doplněno demineralizovanou vodou do 1 ml vialky. Následně byly vzorky změřeny Ramanovou spektrometrií v integračním času 5000 ms při 100 % intenzitě laseru a laboratorní teplotě.



**Obrázek 55** Ramanova spektra vybraných vzorků sirupů s porovnáním se standardem pevné látky glukózy (BWSpec)



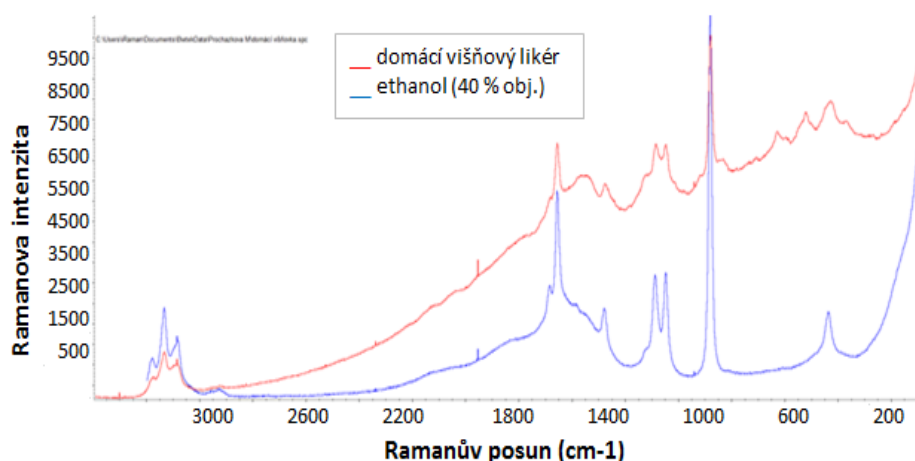
**Obrázek 56** Ramanova spektra vybraných vzorků sirupů s porovnáním se standardem pevné látky fruktózy (BWSpec)

Složení všech testovaných vzorků sirupů mělo stejné složení. Jednalo se o glukózo-fruktózové sirupy. Na obalu nebyl výrobcem ani u jednoho vzorku uvedený obsah cukrů.

**Tabulka 26** Stanovení glukózy a fruktózy pomocí Ramanovy spektrometrie

Typ vzorku	Obsah glukózy (%)	Obsah fruktózy (%)	Celkový obsah glukózy a fruktózy (%)
SOLEVITA bezový květ	29,32	18,40	47,72
NeLI a.s. Sirup s příchutí lesní jahody	25,24	20,40	45,64
JUPÍ-citron	24,98	20,34	45,32
JUPÍ-multivitamin	15,18	14,86	30,04
JUPÍ-pomeranč	19,94	19,04	38,98
JUPÍ-černý bez	27,90	25,70	53,60
YO bezový sirup	25,24	20,40	45,64

Dále bylo provedeno testování stanovení obsahu cukrů a ethanolu u domácího višňového likéru. Ředění vzorku probíhalo stejným způsobem, jako je popsáno u testovaných sirupů.



**Obrázek 57** Porovnání Ramanových spekter domácího višňového likéru a standardu ethanolu 40 % obj. (Omic)

Spektrum se shoduje se standardem ethanolu s pásy v oblasti Ramanova posunu:  $879 \text{ cm}^{-1}$  (nejvyšší intenzita pásu);  $1030 \text{ cm}^{-1}$  a  $1079 \text{ cm}^{-1}$ . Stanovení množství ethanolu pomocí Ramanovy spektrometrie: 20,93 %.

Při identifikaci glukózy se spektrum shoduje pouze s pásy v oblasti Ramanova posunu:  $940, 1125 \text{ cm}^{-1}$  a pro fruktózu má shodný pás pouze:  $628 \text{ cm}^{-1}$ . Stanovení množství obou látek pomocí Ramanovy spektrometrie tak nebylo možné (koncentrace látek byla příliš nízká).

Ramanovo spektrum domácího višňového likéru, které je uvedeno na obrázku č. 57, vykazuje vyšší intenzitu signálu než spektrum standardu ethanolu při 40 objemových %. Měřený vzorek likéru díky vyššímu obsahu cukrů a tmavší barvě

obsahuje více uhlíku, který způsobuje nárůst intenzity signálu. Stanovení analytů je tak zatíženo vyšší chybou.

## 6 Závěr

Podle výsledků měření bylo prokázáno, že Ramanova spektroskopie je vhodná pro rychlou a snadnou identifikaci a stanovení vyššího obsahu methanolu a ethanolu v různých lihovinách. Tato spektroskopická metoda ale není použitelná pro stanovení nízkých koncentrací (pod 4 %). Bylo zjištěno, že menší přesnost kvantitativní analýzy způsobuje například vyšší obsah cukrů a tmavší barva lihovin.

Dále byla provedena identifikace a stanovení cukrů glukózy a fruktózy ve vybraných sirupech. Opět bylo prokázáno, že touto metodou lze identifikovat a stanovit jejich obsah i ve vzorcích, které obsahují celou řadu dalších látek. Vždy je však nutné ověřit, že se pásy těchto látek ve spektru nepřekrývají a lze nalézt pásy jednoznačně identifikující vybrané analyty.

Podle těchto poznatků patří Ramanova spektroskopie do analytických metod, které slouží zejména k rychlé identifikaci surovin nebo kontrole kvality výrobků.

Pro přesné stanovení vybraných analytů je ale zapotřebí použít citlivější instrumentální techniky většinou spojené se separačními metodami.

## 7 Použitá literatura

[1] Dendisová, M.; Žvátora, P.; Matějka, P. RAMANOVA SPEKTROMETRIE [online]. 2011 [cit. 2017-24-02]

Dostupné z: <http://old.vscht.cz/anl/lach2/RAMAN.pdf>

[2] Hrdina, R. Identifikace látek v reálných vzorcích pomocí přenosného Ramanova spektrometru, Diplomová práce [online]. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, České Budějovice, CZ, 2012. 24-34. [cit. 2017-24-02]

Dostupné z:

[http://theses.cz/id/mv5gc5/Identifikace\\_ltek\\_v\\_relnch\\_vzorcich\\_pomoc\\_penosneho\\_Ram\\_anov.pdf](http://theses.cz/id/mv5gc5/Identifikace_ltek_v_relnch_vzorcich_pomoc_penosneho_Ram_anov.pdf)

[3] Šotkovský, J. Využití Ramanovy spektrometrie v oblasti prostředí se zaměřením na aerosoly a strusky z pyrometalurgických procesů, Bakalářská práce [online]. Univerzita Karlova v Praze, Praha, CZ, 2013. 2-3. [cit. 2017-01-03]

Dostupné z: <https://is.cuni.cz/webapps/zzp/download/130115079>

[4] Matějka, J. Pokročilé spektroskopické metody analýzy léčiv [online]. 2012 [cit. 2017-01-03]

Dostupné z: <http://old.vscht.cz/anl/matejka/Leciva-02-Raman-11.pdf>

[5] Turrell, G. *Raman Microscopy: Developments and Applications* [online]. 1996 [cit. 2017-24-02]

Dostupné z:

[https://books.google.cz/books?hl=cs&lr=&id=N3FA1xib8rEC&oi=fnd&pg=PA1&dq=The+Raman+effect+&ots=A7whXC2Zit&sig=IWNMJz12kFPUf6m080i\\_-TyFTNE&redir\\_esc=y#v=onepage&q=The%20Raman%20effect&f=false](https://books.google.cz/books?hl=cs&lr=&id=N3FA1xib8rEC&oi=fnd&pg=PA1&dq=The+Raman+effect+&ots=A7whXC2Zit&sig=IWNMJz12kFPUf6m080i_-TyFTNE&redir_esc=y#v=onepage&q=The%20Raman%20effect&f=false)

[6] Dominiková, Š. Stanovení methanolu v lihovinách metodami molekulové spektrometrie, Bakalářská práce [online]. Univerzita Karlova v Praze, Hradec Králové, CZ, 2014. 10; 20-22; 32. [cit. 2017-24-02]

Dostupné z: <https://is.cuni.cz/webapps/zzp/download/130128868>

[7] Ball, David W. Theory of Raman Spectroscopy [online]. 2001 [cit. 2017-24-02]

Dostupné z:

[http://images.alfresco.advanstar.com/alfresco\\_images/pharma/2014/08/26/f6a9eda3-e122-4585-b0a9-3881b808a0cd/article-836.pdf](http://images.alfresco.advanstar.com/alfresco_images/pharma/2014/08/26/f6a9eda3-e122-4585-b0a9-3881b808a0cd/article-836.pdf)

[8] *Lasery a Optika: Aplikace: Ramanova spektroskopie* [online]. 2014 [cit. 2016 – 18 - 9]

Dostupné z: <http://www.lao.cz/aplikace-79/mereni-spektralnich-charakteristik-98/ramanova-spektroskopie-216>

[9] Martinec, M. Praktické informace a didaktické využití Ramanovy spektrometrie, Diplomová práce [online]. Západočeská univerzita v Plzni, Plzeň, CZ, 2014. 6; 9-11; 34-35. [cit. 2017-24-02]

Dostupné z: <https://otik.uk.zcu.cz/handle/11025/12421>

[10] Larkin, Peter J. IR and Raman Spectroscopy: Principles and Spectral Interpretation, 1st Edition, Elsevier: USA. 2011. 1-29; 55-57. ISBN: 978-0-12-386984-5

[11] Numata, Y.; Iida, Y.; Tanaka, H. Quantitative analysis of alcohol–water Binary solutions using Raman spectroscopy, *Journal of Quantitative Spectroscopy & Radiative Transfer* 112 (2011) 1043-1049.

[12] Boyaci, I. H.; Genis, H. E.; Guven, B.; Tamer, U.; Alper, N. A novel method for quantification of ethanol and methanol in distilled alcoholic beverages using Raman spectroscopy, *Journal of Raman Spectroscopy* 43 (2012) 1171-1176.

[13] Ilaşlan, K.; Boyaci, I. H.; Topcu, A. Rapid analysis of glucose, fructose and sucrose contents of commercial soft drinks using Raman spectroscopy, *Food Control* 48 (2015) 56-61.

[14] Vašková, H.; *Mathematics and Computers in Biology and Biomedical Informatics: Quantitative Evaluation of Methanol Content in Beverages Based on Raman Spectral Data* [online]. 2013. 81-84. [cit. 2017-24-02]

Dostupné z: <http://www.wseas.us/e-library/conferences/2013/Baltimore/BEBIM/BEBIM-13.pdf>

[15] Biswas A.; Wang T.; Biris A. Single metal nanoparticle spectroscopy: Optical characterization of individual nanosystems for biomedical applications, *Nanoscale* 2 (2010) 1560-1572.

[16] Čapoun, T.; Matějka, J. *Oborový portál pro BOZP: Ramanův spektrometr* [online]. 2007 [cit. 2017-24-02]

Dostupné z: <http://www.bozpinfo.cz/ramanuv-spektrometr>

[17] Nordon, A.; Mills, A.; Burn, R. T.; Cusick, F. M.; Littlejohn, D. Comparison of non-invasive NIR and Raman spectrometries for determination of alcohol content of spirits, *Analytica Chimica Acta* 548 (2005) 148-158.

[18] Shuifang, L.; Yang, S.; Xiangrong, Z.; Xin, Z.; Guowei, L. Detection of honey adulteration by high fructose corn syrup and maltose syrup using Raman spectroscopy, *Journal of Food Composition and Analysis* 28 (2012) 69-74.



[19] Frausto-Reyes, C.; Medina-Gutiérrez, C.; Sato-Berrú, R.; Sahagún, L. R. Qualitative study of ethanol content in tequilas by Raman spectroscopy and principal component analysis, *Spectrochimica Acta Part A* 61 (2005) 2657-2662.

[20] Cleveland, D.; Carlson, M.; Hudspeth, E. D.; Quattrochi, L. E.; Batchler, K. L.; Balram, S. A.; Hong, S.; Michael, R. G. Raman Spectroscopy for the Undergraduate Teaching Laboratory: Quantification of Ethanol Concentration in Consumer Alcoholic Beverages and Qualitative Identification of Marine Diesels Using a Miniature Raman Spectrometer, *Spectroscopy Letters: An International Journal for Rapid Communication* 40 (2007) 903-916.

[21] Krajská hygienická stanice střeďočeského kraje se sídlem v Praze: Základní informace o destilátech [online]. 2009 [cit. 2017-24-02]

Dostupné z: [http://www.khsstc.cz/dokumenty/zakladni-informace-o-destilatech-2469\\_2469\\_480\\_1.html](http://www.khsstc.cz/dokumenty/zakladni-informace-o-destilatech-2469_2469_480_1.html)

[22] Methanolová aféra v Česku [online]. 2016 [cit. 2017-24-02]

Dostupné z: [https://cs.wikipedia.org/wiki/Metanolov%C3%A1\\_af%C3%A9ra\\_v\\_%C4%8Cesku](https://cs.wikipedia.org/wiki/Metanolov%C3%A1_af%C3%A9ra_v_%C4%8Cesku)

[23] Kleinová, J. Analýza ovocných kvasů a destilátů ve vztahu k finálnímu výrobku, Diplomová práce [online]. Mendelova univerzita v Brně, Brno, CZ, 2011. 23-24. [cit. 2017-24-02]

Dostupné z:

[http://www.google.cz/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0ahUKEwjL7ay676jSAhXJExoKHUr1Ca4QFggcMAA&url=http%3A%2F%2Fis.mendelu.cz%2Fzp%2Fportal\\_zp.pl%3Fprehled%3Dvyhledavani%3Bpodrobnosti%3D46256%3Bdownload\\_prace%3D1&usg=AFQjCNFKoiH5Jsow1ZwgXQzZU-IPWjVIOW&bvm=bv.148073327,bs.2,d.bGg](http://www.google.cz/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0ahUKEwjL7ay676jSAhXJExoKHUr1Ca4QFggcMAA&url=http%3A%2F%2Fis.mendelu.cz%2Fzp%2Fportal_zp.pl%3Fprehled%3Dvyhledavani%3Bpodrobnosti%3D46256%3Bdownload_prace%3D1&usg=AFQjCNFKoiH5Jsow1ZwgXQzZU-IPWjVIOW&bvm=bv.148073327,bs.2,d.bGg)

[24] Valná, M. Stanovení charakteristických aromatických látek vybraných destilátů, Diplomová práce [online]. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Zlín, CZ, 2010. 44-47. [cit. 2017-24-02]

Dostupné z:

[http://digilib.k.utb.cz/bitstream/handle/10563/13790/valn%C3%A1\\_2010\\_dp.pdf?sequence=1](http://digilib.k.utb.cz/bitstream/handle/10563/13790/valn%C3%A1_2010_dp.pdf?sequence=1)

[25] Toxikologické informační středisko: Odborné doporučení pro intoxikaci-metanol (methanol, metylalkohol, dřevný líh, CH<sub>3</sub>OH) [online]. 2012 [cit. 2017-24-02]

Dostupné z: <http://www.tis-cz.cz/images/stories/PDFs/methanol2/METANOL-odborne-doporuceni-TIS-akt-8-2-2015.pdf>

[26] Wu, E.; Nguyen, D. Determination of Low Concentration Methanol in Alcohol by an Affordable High Sensitivity Raman Instrument [online]. Enwave Optronics Inc., 2011. [cit. 2017-24-02]

Dostupné z: <http://www.spectroscopyonline.com/determination-low-concentration-methanol-alcohol-affordable-high-sensitivity-raman-instrument-3>

[27] Özbalci, B.; Boyaci, I. H.; Topcu, A.; Kadilar, C.; Tamer U. Rapid analysis of sugars in honey by processing Raman spectrum using chemometric methods and artificial neural networks, *Food Chemistry* 136 (2013) 1444-1452.