

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta elektrotechniky  
a komunikačních technologií

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE



# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

## FAKULTA ELEKTROTECHNIKY A KOMUNIKAČNÍCH TECHNOLOGIÍ

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION

## ÚSTAV BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING

## BIOLOGICKÁ ANALÝZA V BLÍZKÉ IR OBLASTI

BIOLOGICAL ANALYSIS IN NIR

### BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

### AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Petr Pirkl

### VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Vratislav Čmiel, Ph.D.

BRNO 2020

# Bakalářská práce

bakalářský studijní obor **Biomedicínská technika a bioinformatika**

Ústav biomedicínského inženýrství

**Student:** Petr Pírk

**ID:** 203682

**Ročník:** 3

**Akademický rok:** 2019/20

**NÁZEV TÉMATU:**

## Biologická analýza v blízké IR oblasti

### POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:

1) Proveďte rešerši v oblasti analýzy složení biologických látek a potravin optickými metodami. Zaměřte se zejména na optické analýzy v blízké IR oblasti. 2) Proveďte rešerši v oblasti přístrojového vybavení a přístrojové konstrukce pro provádění optických analýz s využitím IR záření v blízké IR oblasti. 3) Zabývejte se složením látek, jejichž struktura ovlivňuje záření v blízké IR oblasti. 4) Vyberte vhodnou skupinu látek a navrhnete laboratorní postup pro ověření složení vybraných vzorků s využitím FTIR-IR optického analyzátoru a zvolte jejich vlastnosti k měření. 5) Proveďte laboratorní přípravu, zahrnující vhodnou úpravu měřicí sestavy, a realizujte měření na vybraných vzorcích v dostatečném počtu. 6) Proveďte zpracování naměřených hodnot a statistické zpracování získaných dat. 7) Proveďte diskusi nad výsledky a porovnání s teoretickými předpoklady.

### DOPORUČENÁ LITERATURA:

[1]Tkachenko, V. N.: Optical Spectroscopy - Methods and Instrumentations. Elsevier, 2006. ISBN

978-0-444-52126-2

[2] Roduner, E., Forbes, P., Krüger, T.: Optical Spectroscopy: Fundamentals and Advanced Applications. WSPC, 2018. ISBN-13: 978-1786346100

**Termín zadání:** 3.2.2020

**Termín odevzdání:** 5.6.2020

**Vedoucí práce:** Ing. Vratislav Čmiel, Ph.D.

**prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D.**  
předseda oborové rady

### UPOZORNĚNÍ:

Autor bakalářské práce nesmí při vytváření bakalářské práce porušit autorská práva třetích osob, zejména nesmí zasahovat nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a musí si být plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č.40/2009 Sb.

## **ABSTRAKT**

Tato bakalářská práce je zaměřená na získání informací o analýzách pomocí IR záření. Také se zabývá vlivem IR záření na látky a principy fungování IR spektrometrů. V rámci práce jsou zkoumány vzorky kávy. Zjišťuje se využitelnost k rozlišení mezi kofeinovou a bezkofeinovou kávou. Dále se zkoumají vzorky mouk. Zde se zkoumá přítomnost či absence lepku.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

IR záření, NIR spektroskopie, NeoSpectra, analýza potravin

## **ABSTRACT**

This bachelor thesis is focused on obtaining information about analyzes by IR radiation. It also deals with the effect of IR radiation on substances and the principles of functioning of IR spectrometers. There are examined coffee samples in the work. Usefulness for discrimination caffeine and decaffeinated coffee is tested. Next, flour samples are researched. There is examination of presence or absence of gluten.

## **KEYWORDS**

IR radiation, NIR spectroscopy, NeoSpectra, food analysis

PIRKL, Petr. *Biologická analýza v blízké IR oblasti*. Brno, 2020, 64 s. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, Ústav biomedicínského inženýrství. Vedoucí práce: Ing. Vratislav Čmiel, Ph.D.

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci na téma „Biologická analýza v blízké IR oblasti“ jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

Jako autor uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že v souvislosti s vytvořením této bakalářské práce jsem neporušil autorská práva třetích osob, zejména jsem nezasáhl nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a/nebo majetkových a jsem si plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č. 40/2009 Sb.

Brno .....

.....

podpis autora

## PODĚKOVÁNÍ

Chtěl bych poděkovat Ing. Vratislavu Harabišovi, Ph.D. za navrhnutí a vytištění 3D modelu stojanu na spektrometr a kyvetu, rodině a známým za podporu a pomoc a hlavně vedoucímu bakalářské práce panu Ing. Vratislavu Čmielovi, Ph.D. za odborné vedení, konzultace, podnětné návrhy k práci, volbě a nákupu komponent k měření a zapůjčení přístroje k provedení potřebných měření.

Brno .....

.....

podpis autora

# Obsah

Úvod	10
<b>1 ANALYTICKÉ OPTICKÉ METODY</b>	<b>11</b>
1.1 Elektromagnetické záření . . . . .	11
1.2 Optické metody . . . . .	12
1.2.1 Optické spektroskopie v oblastech UV/VIS spektra . . . . .	12
1.2.2 Refraktometrie a interferometrie . . . . .	14
1.2.3 Turbidimetrie a nefelometrie . . . . .	14
1.2.4 IR spektroskopie . . . . .	15
1.2.5 Ramanova spektroskopie . . . . .	15
<b>2 Vliv IR záření na struktury látek</b>	<b>16</b>
2.1 Vlastnosti IR záření . . . . .	16
2.2 Typy vibrací . . . . .	16
2.3 Vliv podmínek experimentu na tvar pásů . . . . .	19
<b>3 Přístrojové vybavení pro analýzu pomocí infračerveného záření</b>	<b>20</b>
3.1 Základní schéma IR spektrometru . . . . .	20
3.2 Disperzní IR spektroskopie . . . . .	20
3.3 Nedisperzní IR spektroskopie . . . . .	21
3.4 Interferometrická IR spektroskopie . . . . .	21
<b>4 Analýza potravin IR spektroskopii</b>	<b>23</b>
4.1 Aplikace NIR a MIR spektroskopie při výrobě sýru . . . . .	23
4.2 Využití při určování alergenů v potravinách . . . . .	24
4.3 Sledování obsahu sacharidů v cereáliích . . . . .	24
<b>5 Vlastnosti zkoumaných látek</b>	<b>26</b>
5.1 Káva . . . . .	26
5.1.1 Kofein . . . . .	26
5.1.2 Výroba bezkofeinové kávy . . . . .	27
5.2 Lepek . . . . .	28
5.2.1 Problémy organismu s lepkem . . . . .	29
5.2.2 Způsoby odstranění lepku ze stravy . . . . .	29
<b>6 Analytické metody využívané při analýzách IR spekter</b>	<b>30</b>
6.1 Kvalitativní analýzy . . . . .	30
6.2 Analýza hlavních komponent . . . . .	30

6.3	Hierarchická shluková analýza . . . . .	30
<b>7</b>	<b>Postup měření</b>	<b>32</b>
7.1	Komponenty měřicí techniky . . . . .	32
7.1.1	NeoSpectra-Micro . . . . .	32
7.1.2	Software SpectroMOST_Micro_1.0 . . . . .	34
7.1.3	Stojan spektrometru a kyvety . . . . .	35
7.1.4	Kyvety . . . . .	35
7.1.5	Spektralon . . . . .	36
7.2	Volba proměřovaných látek . . . . .	37
7.2.1	Popis látek použitých v experimentu . . . . .	38
7.3	Postup měření a zpracování naměřených dat . . . . .	39
7.3.1	Příprava přístroje a zkoumané látky . . . . .	39
7.3.2	Získání dat a jejich předzpracování . . . . .	39
7.3.3	Zhodnocení využitelnosti získaných spekter . . . . .	40
<b>8</b>	<b>Naměřená data a diskuse výsledků</b>	<b>42</b>
8.1	Hypotézy a jejich diskuse . . . . .	42
	<b>Závěr</b>	<b>57</b>
	<b>Literatura</b>	<b>58</b>
	<b>Seznam symbolů a zkratk</b>	<b>61</b>
	<b>Seznam příloh</b>	<b>62</b>
<b>A</b>	<b>Obsah elektronické přílohy</b>	<b>63</b>
A.1	Soubory s daty . . . . .	63
A.2	Matlab skripty . . . . .	64

# Seznam obrázků

1.1	ATR krystal . . . . .	13
2.1	Vibrační stavy . . . . .	17
2.2	Energetické hladiny . . . . .	18
3.1	Michelsonův interferometr . . . . .	21
5.1	Vliv míry pražení kávy na IR spektrum . . . . .	26
5.2	NIR spektrum pšeničného lepku a škrobu . . . . .	28
7.1	Michelsonův interferometr vytvořený na MEMS čipu . . . . .	32
7.2	Blokové schéma . . . . .	33
7.3	NeoSpectra-Micro . . . . .	33
7.4	NIR spektrum . . . . .	34
7.5	Uživatelské prostředí softwaru SpectroMOST_Micro_1.0 . . . . .	34
7.6	Stojan spektrometru a kyvety . . . . .	35
7.7	Absorbance difúzní IR kyvety . . . . .	36
7.8	Reflektance spektralonu . . . . .	37
7.9	Naměřená a předzpracovaná data . . . . .	41
8.1	Dendrogram cukru a soli . . . . .	42
8.2	Detail dendrogramu cukru a soli . . . . .	43
8.3	Předzpracovaná spektra cukru a soli . . . . .	43
8.4	Dendrogram kávy připravené evropským procesem . . . . .	44
8.5	Detail dendrogramu kávy připravené evropským procesem . . . . .	44
8.6	Předzpracovaná spektra kávy připravené evropským procesem . . . . .	45
8.7	Dendrogram kávy připravené Švýcarským procesem . . . . .	46
8.8	Předzpracovaná spektra kávy připravené Švýcarským procesem . . . . .	46
8.9	Dendrogram 5 druhů káv . . . . .	48
8.10	Dendrogram pšeničné a lněné mouky . . . . .	49
8.11	Detail dendrogramu pšeničné a lněné mouky . . . . .	49
8.12	Předzpracovaná spektra pšeničné a lněné mouky . . . . .	50
8.13	Dendrogram pšeničné mouky a hrachové směsi . . . . .	50
8.14	Detail dendrogramu pšeničné mouky a hrachové směsi . . . . .	51
8.15	Předzpracovaná spektra pšeničné mouky a hrachové směsi . . . . .	51
8.16	Dendrogram lepkové a bezlepkové pšeničné mouky . . . . .	52
8.17	Detail dendrogramu lepkové a bezlepkové pšeničné mouky . . . . .	52
8.18	Předzpracovaná spektra lepkové a bezlepkové pšeničné mouky . . . . .	53
8.19	Dendrogram lepkové a bezlepkové ovesné mouky . . . . .	54
8.20	Předzpracovaná spektra lepkové a bezlepkové ovesné mouky . . . . .	54
8.21	Dendrogram 5 druhů mouk . . . . .	56

# Seznam tabulek

2.1	Rozdělení IR . . . . .	16
7.1	Duhy káv . . . . .	38
7.2	Duhy mouk . . . . .	38
A.1	Označení vzorků . . . . .	63

# Úvod

V bakalářské práci se zabývám tématem Biologická analýza v oblasti blízké IR. Tuto práci jsem si zvolil, jelikož analýza potravin je v dnešní době důležitou součástí výrobních procesů potravin a IR spektroskopie nabízí vhodný způsob provádění těchto analýz nedestruktivně. Nebo ji lze také použít k rychlé analýze některých alergenů v potravinách, což může být pro část populace vhodnou pomůckou do každodenního života a to v dnešní době i díky velmi malým rozměrům detektorů.

Úvodem bakalářské práce je teoretické seznámení s problematikou elektromagnetického záření a optických laboratorních metod. Následně jsem se zaměřil na vliv IR záření na struktury látek, na jakém principu fungují spektrometry a jak zpracovat IR spektra pomocí dnešních technologií.

V rámci této práce byla sestavena měřicí technika, kde hlavní komponentou byl spektrometr NeoSpectra. Následně byl podle literatury navrhnut postup ke zpracování naměřených dat a jejich vyhodnocování, k čemuž bylo využito hierarchické shlukové analýzy (HCA).

Cílem bylo zjistit, jestli je přístroj NeoSpectra vhodný k rozeznávání vlastností měřených látek. Konkrétně byl pozorován vzorek cukru s vzorkem soli. Následně několik druhů káv kofeinových a bezkofeinových připravených různými metodami odstraňování kofeinu. U kávy mělo být zjištěno, jestli je přístroj schopný v daných vlnových délkách rozlišit jestli káva obsahuje kofein. Poslední skupinou zkoumaných látek byla mouka a její náhrady v souvislosti s obsahem lepku. Měřeny byly jak moukové náhrady lepkových mouk, tak i klasické mouky zbavené lepku.

# 1 ANALYTICKÉ OPTICKÉ METODY

Optické analytické metody patří do skupiny takzvaných nedestruktivních metod. Takto jsou nazývány proto, že nepoškozují, ani nijak nepřeměňují zkoumaný vzorek. Tato skutečnost dává optickým metodám velkou výhodu oproti jiným analytickým metodám, kdy zkoumaná látka může být následně podrobena ještě jiným typům testů. Optické metody jsou velmi často součástí složitějších přístrojů jako analyzáto-ry. [3, 26] Nejdříve se seznámíme s elektromagnetickým zářením a jeho vlastnostmi a následně se zaměříme na některé základní optické analytické metody.

## 1.1 Elektromagnetické záření

Při popisu elektromagnetického záření narážíme na vlnově-korpuskulární dualismus. Při některých experimentech je pro nás výhodnější a jednodušší na elektromagnetické záření pohlížet jako na vlnění, v jiných případech je vhodnější elektromagnetické záření považovat za proud částic tzv. fotonů. [3]

V prvním případě pohlížíme na elektromagnetické záření jako na vlny, u kterých se mění elektrické a magnetické pole s určitou frekvencí. Tyto změny polí se vyskytují ve tvaru postupné vlny. K popisu vln používáme jednotku nazvanou vlnová délka, kterou označujeme řeckým písmenem  $\lambda$ . V některých případech se používá takzvaný vlnčet, který nám udává počet vln na jednotku délky. Pokud uvažujeme více frekvencí elektromagnetických vln, tak získáváme elektromagnetické spektrum. Každá frekvence, a tedy i jí příslušná vlnová délka, má určitou energii, kterou můžeme zapsat pomocí Poyntingova vektoru  $S$ : [7, 3]

$$S = \frac{1}{\mu_0} E \times B \quad (1.1)$$

Oproti tomu, pokud pohlížíme na elektromagnetické záření jako na částice, tak neuvažujeme, že by se energie například při absorpci nebo emisi předávala spojitě. V tomto případě uvažujeme, že se energie předává po částech diskrétně, takzvaně po kvantech. Tato kvanta jsou označována jako fotony. [3] Právě tyto fotony používáme k charakteristice záření. Pokud má elektromagnetická vlna frekvenci  $f$ , tak pomocí této teorie je energie  $E$  předaná jedním fotonem rovna:

$$E = hf \quad (1.2)$$

To je energie fotonu. Zde  $h$  je Planckova konstanta a má hodnotu  $h = 6,6310^{-34} Js = 4,1410^{-15} eVs$ . [7, 3]

## 1.2 Optické metody

V této kapitole se podíváme na základní optické metody a trochu si přiblížíme veličiny, které využívají k charakteristikám zkoumaných látek.

### 1.2.1 Optické spektroskopie v oblastech UV/VIS spektra

Tato metoda využívá specifické odezvy zkoumané látky na určité spektrální složení dopadajícího spektra. Látky mohou záření o určitých vlnových délkách absorbovat nebo vyzařovat. [15]

Pokud látky vyzařují určité záření, tak se tato analýza jmenuje emisní spektrální analýza. Vzorek se nechá pomocí vysoké teploty vypařit, tím se atomy uvedou do excitovaného stavu a při deexcitaci se stávají zdrojem záření, které může být na vlnových délkách od NIR přes viditelnou oblast až po UV záření. [3] Každý prvek má charakteristické emisní čáry, díky nimž lze stanovit, o jaký prvek se jedná pomocí intenzity vyzářeného záření můžeme určit množství těchto atomů. [15] Jejich využití je menší oproti absorpčním spektrometrům. [14]

Zatímco pomocí absorpční spektrální analýzy zkoumáme látku pomocí absorbovaných vlnových délek, kdy původní spojité spektrum bude obsahovat soustavu barevných a tmavých pásů, pomocí nichž budeme zjišťovat složení zkoumané látky. [15] Veličina, která udává míru absorbovaného světla se jmenuje absorpce a je definována vztahem:

$$A = \log \frac{I_0}{I}, \quad (1.3)$$

kde  $I$  je intenzita propuštěného záření měřeným vzorkem a  $I_0$  je intenzita záření vyzářená ze zářiče. Ovšem prošlé záření je závislé i na tloušťce vrstvy  $d$ , ve které může být záření absorbováno, a také na součiniteli absorpce  $\alpha$ , který nezávisí na intenzitě. [15] Poté můžeme napsat, že:

$$A = \alpha d \quad (1.4)$$

Součinitel absorpce lze nahradit epsilonem, což je molární absorpční koeficient a koncentrací vzorku  $C$ . Pokud tento vztah dosadíme do rovnice 1.4 místo součinitele absorpce, tak získáme tzv. Lambert-Beerův zákon:

$$A = \epsilon C d \quad (1.5)$$

ten se dá využít k výpočtům neznámé koncentrace roztoků. [15]

Velmi často se ovšem také měří takzvaná propustnost záření  $T$  neboli transmittance, která je definována poměrem záření vstupujícího a vystupujícího z měřeného vzorku [15]

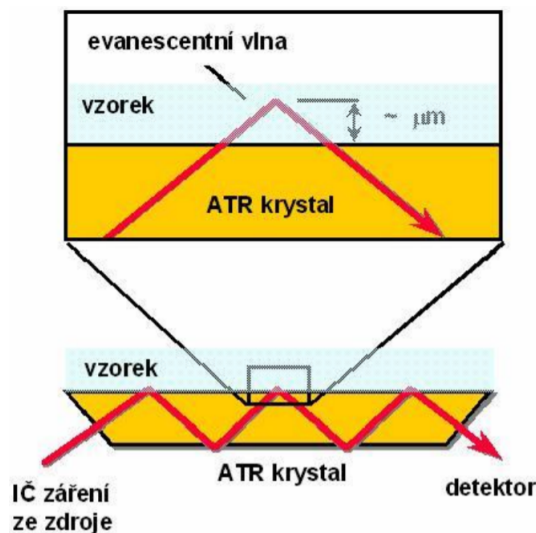
$$T = \frac{I}{I_0}. \quad (1.6)$$

Při analýze pevných netransparentních vzorků se často využívá reflektanční technika. Mezi reflektanční techniku řadíme techniku zeslabeného totálního odrazu tzv. ATR a difúzní reflexe. [5]

Zeslabený totální odraz (ATR technika) funguje na principu fázového úplného odrazu na rozhraní ATR krystalu a měřeného vzorku. ATR krystal je vyroben z materiálu o vysokém indexu lomu. [5] ATR krystaly jsou většinou vyrobeny například ze ZnSe (selenid zinečnatý), z germania, křemíku nebo KRS-5 (jedná se o směs bromidu a jodidu thallného). [8] Totální odraz na rozhraní opticky hustšího  $n_2$  a řidšího  $n_1$  (zkoumaný vzorek) je doprovázen evanescentním polem, které penetruje do vzorku. Evanescentní pole penetruje do tzv. penetrační hloubky  $z_p$ , která se vypočítá pomocí vzorce:

$$z_p = \frac{\lambda_0}{2\pi n_2 \sqrt{\sin^2 \alpha - \left(\frac{n_1}{n_2}\right)^2}} \quad (1.7)$$

zde  $\lambda_0$  je vlnová délka záření ve vakuu. [26] Obvykle je penetrační hloubka do vzorku jen několik  $\mu\text{m}$ . [5] Spektrum zeslabeného totálního odrazu je podobné jako spektrum absorpční, ovšem zde roste efektivní měřená tloušťka vzorku s vlnovou délkou. [26]



Obr. 1.1: Schéma principu zeslabeného totálního odrazu (ATR technika) [8]

Při difúzní reflexi je vzorek smíchán s KBr a je zde měřeno odražené záření od kovového zrcátka. [5] Odraz od opticky nehladkého povrchu probíhá částečně podle Snellova zákona, částečně se odrazí do všech směrů, částečně vstupuje do vzorku a částečně je absorbováno. [26]

Výše zmíněné vzorce lze uplatnit na spektrum záření od IR záření přes viditelnou oblast až po UV záření. [15]

## 1.2.2 Refraktometrie a interferometrie

Při těchto metodách se uplatňuje lámavosti záření na rozhraní dvou prostředí, tyto metody tedy využívají k analýze vzorků rozdílných indexů lomu prostředí a zkoumané látky.

Refraktometrie funguje bez závislosti na vlnové délce světla a využívá Snellova zákona:

$$n_1 \sin\alpha_1 = n_2 \sin\alpha_2 , \quad (1.8)$$

Jedna strana rovnice znázorňuje, odkud paprsek vstupuje do vzorku, a druhá, jak se šíří dále ve zkoumané látce. Tato metoda se často používá ke stanovení čistoty a koncentrace látek. [3]

Zatímco interferometrie využívá vlnové povahy záření a jeho interakce mezi sebou. Pokud jsou dvě vlny ve fázi, dojde ke konstruktivní interferometrii anebo v opačné fázi, tak nastává destruktivní interferometrie, tedy dojde k zeslabení, nebo zesílení vln. Jelikož se záření pohybuje jinou rychlostí v různých látkách, tak můžeme pomocí interferometrie určovat také čistotu a koncentrace vzorků pomocí standardu s větší přesností než refraktometrie. Tato metoda využívá jako zdroj světla laser. [3]

## 1.2.3 Turbidimetrie a nefelometrie

Tyto metody jsou založeny na principu Rayleighova rozptylu světla:

$$R_\theta = \frac{r^2 I_R^\theta}{I_0} = K M c, \quad (1.9)$$

kde  $I_0$  je původní intenzita záření,  $r$  je vzdálenost detektoru od vzorku a  $I_R^\theta$  je intenzita rozptýleného záření pod úhlem  $\theta$ . Rayleighův poměr je přímo úměrný koncentraci  $c$  a hmotnosti části  $M$ . Konstanta  $K$  zahrnuje další parametry jako například úhel, pod kterým bylo záření detekováno, indexy lomu či vlnové délky záření. [3]

V případě turbidimetrie snímá detektor záření ve směru záření, tudíž zde Rayleighův rozptyl způsobuje úbytek intenzity záření oproti původnímu záření s narůstající koncentrací. Tato metoda je vhodná pro analyzování více koncentrovaných roztoků.

Zatímco detektor při nefelometrii je v úhlu mezi  $0^\circ$  až  $90^\circ$  ke směru záření a pozorujeme zde nárůst intenzity signálu po zvýšení koncentrace vzorku. Obecně je nefelometrie citlivější než turbidimetrie a využívá se v imunologii jako imunonefelometrie. [3]

#### 1.2.4 IR spektroskopie

Infračervená spektroskopie se používá k analýze makroskopických objektů, ale přitom zde interagují molekuly tvořící vzorek s infračerveným zářením. Fotony IR záření nemají dostatek energie k excitaci molekul, ovšem mají energii dostačující ke změně vibračního či rotačního stavu molekul. Každá vazba reaguje na IR záření specifickými vibracemi a tudíž neexistují 2 různé molekuly se stejným IR spektrem. Více ve 3. kapitole.[3] IR spektroskopie je fyzikální přesná a rychlá nedestruktivní technologie, která je vhodná pro využití při online kontrole vzorků. Její použití je široké a dá se uplatnit v mnoha odvětvích. Příprava vzorků obecně není nutná, nebo je velice jednoduchá a přístroje tohoto typu jsou snadné k obsluze po odborném zkalibrování. [25, 16]

#### 1.2.5 Ramanova spektroskopie

Tato metoda funguje na principu Ramanova jevu, při němž dochází k neelastickému rozptylu světla. Při působení světla na vzorek dochází k přechodům molekul do vyšších vibračních stavů, a tedy k následné ztrátě energie fotonu a kvůli tomu k nárůstu vlnové délky. Tedy pomocí Ramanova jevu tato spektroskopie zkoumá vzorek pomocí vibračních stavů molekul. Často je doplňující technikou k IR spektroskopii, jelikož se do analýzy připojí vibrační stavy, které IR spektroskopie nedokáže zaznamenat. Někdy se Ramanova spektroskopie využívá společně s cirkulárním dichroismem, jako takzvaná Ramanova optická aktivita, díky které můžeme pozorovat chemické vazby a chiralitu. [3]

## 2 Vliv IR záření na struktury látek

### 2.1 Vlastnosti IR záření

IR spektroskopie získává při měření vzorku hodnoty vibračních energií. Tyto energie vznikají při interakci IR záření s molekulami vzorku a nabývají hodnot podle molekulové struktury a pevnosti vazeb. Díky těmto vlastnostem je IR spektrometrie vhodná pro kvalitativní i kvantitativní analýzy vzorků například pro zjištění chemických vlastností molekul, množství dané látky ve studovaném vzorku, vlivu prostředí na molekuly a další. [8]

IR záření je elektromagnetické záření v rozsahu přibližně od 0,4 mm do 790 nm vlnové délky. [15] S nižšími vlnovými délkami navazuje na IR záření viditelné světlo a s vyššími vlnovými délkami pokračují po IR záření mikrovlny. IR záření dále rozdělujeme na daleké FIR záření (angl. far infrared), střední MIR (angl. middle infrared) a blízké NIR (angl. near infrared). IR spektroskopie v MIR je jednou z nejuniverzálnějších analytických metod, jelikož většina látek se zářením s touto vlnovou délkou má nejvíce specifických vibračních pásem a také umožňuje kvalitativní i kvantitativní analýzu látek ve všech skupenstvích. Zatímco IR spektroskopie v daleké infračervené oblasti nemá velký přínos pro analýzu látek. [26]

Tab. 2.1: Rozdělení infračerveného záření podle vlnových délek [14, 26]

Viditelné světlo	$\lambda = 330 - 790nm$
Blízké infračervené záření (NIR)	$\lambda = 790 - 2500nm$
Střední infračervené záření (MIR)	$\lambda = 2,5 - 15\mu m$
Daleké infračervené záření (FIR)	$\lambda = 15 - 1000\mu m$
Mikrovlny	$\lambda = 0,1 - 30cm$

### 2.2 Typy vibrací

Molekuly, které tvoří zkoumanou látku jsou tvořeny atomy a ty jsou mezi sebou spojeny chemickými vazbami. Každá nelineární molekula o N počtu atomů vykazuje  $3N-6$  vibračních stupňů volnosti. Lineární molekula s N atomy vykazuje  $3N-5$  stupňů volnosti. To znamená, že se chová jako určitý počet ( $3N-6$ , nebo  $3N-5$ ) osciloskopů. To je způsobeno tím, že vazby jsou schopné určité pružnosti či vibrace, ovšem poloha těžiště molekuly zůstává neměnná. Díky tomu, že energie IR záření je nedostatečná k excitaci elektronů z orbitalů molekul, je schopná na molekuly působit pouze změnou jejich vibračního nebo rotačního stavu. [3, 26] V idealizované

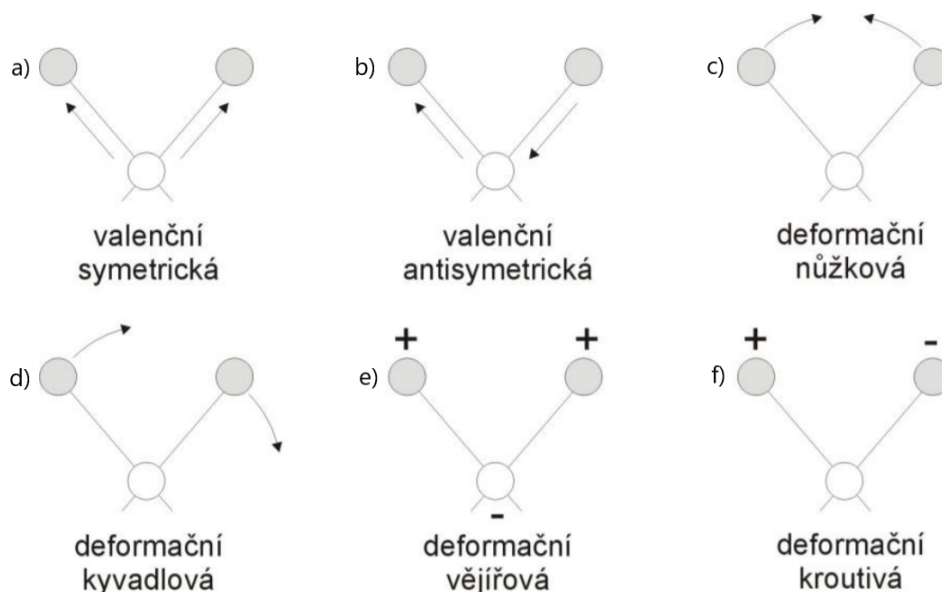
molekule jsou všechny stavy popsány  $3N-6$  popř.  $3N-5$  rovnicemi. Frekvenci vibračních pohybů lze v harmonickém přiblížení vypočítat z kinetické (T) a potenciální (V) energie molekuly:

$$T = \sum_i m_i \dot{x}_i^2 \quad (2.1)$$

$$V = \frac{1}{2} \sum_{i,j} f_{ij} r_i f r_j \quad (2.2)$$

zde je  $m_i$  hmotnost  $i$ -tého atomu a  $x_i$  jeho rychlost odvozená z kartézské souřadnice,  $r$  značí souřadnici, která popisuje vychýlení z rovnovážné polohy v minimu potenciálové energie,  $f_{ij}$  tzv. silové konstanty, popisující pružnost vazby pro  $i=j$ , a interakční silové konstanty pro  $i \neq j$  popisující změny pružnosti jedné vazby při deformaci vazby druhé. [26]

Všechny atomy v molekule vibrují vždy se stejnou frekvencí. Různit se můžou atomy ve výchylce od rovnovážné polohy, a tím se mění i jejich potenciální energie. Někdy se může využít takzvaných grupových frekvencí, kdy je potenciální energie pro nějakou skupinu atomů převládající. Tyto charakteristické frekvence jsou tabulovány. [26]



Obr. 2.1: Znázornění některých vibračních pohybů molekuly z pohledu klasické fyziky [8]

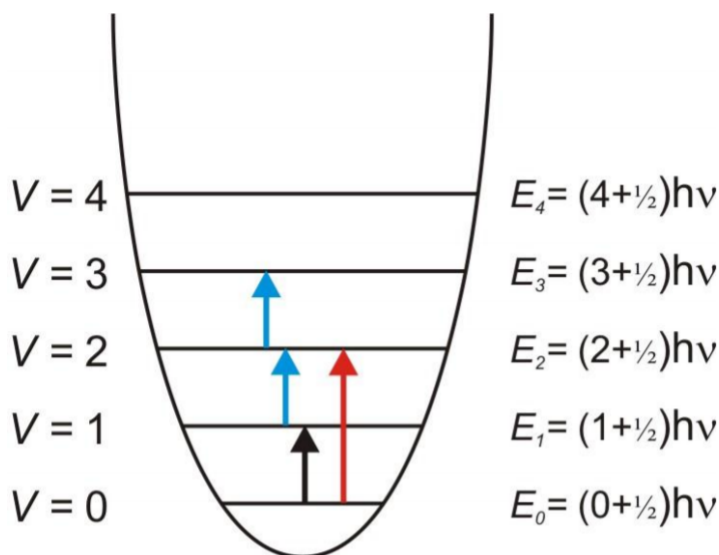
Můžeme pozorovat 2 skupiny vibrací: valenční a deformační, přičemž deformační rozdělujeme ještě na rovinné a mimorovinné. Mezi valenční vibrace patří vibrace,

u kterých se mění délky vazeb. Zde můžeme vibrace klasifikovat jako symetrické a) a asymetrické b).

Pokud se mění úhel mezi atomy, tak hovoříme o vibracích deformačních. Mezi vibrace deformační rovinné patří deformace nůžkové c) (scissoring) a kyvadlové d) (rocking). A poslední skupina vibrací deformačních mimorovinných, kde atom vibruje mimo rovinu ostatních atomů, zahrnuje vibrace deformační vějířové e) (wagging) a deformační kroutivé f) (twisting). [26]

Frekvence valenčních vibrací jsou vždy vyšší než frekvence deformační, jelikož k natažení vazby je zapotřebí více energie než k jejímu ohnutí.

Vibrace jsou ve skutečnosti anharmonické. Mezi energetickými hladinami každého oscilátoru může docházet k fundamentálním, horkým, svrchním nebo kombinacím přechodům. [26, 8]



Obr. 2.2: Znázornění energických hladin a vibračních přechodů harmonického oscilátoru Černá – fundamentální přechod, modrá – horký přechod, červená – svrchní přechod [26]

$V$  je vibrační kvantové číslo, které může nabývat pouze diskrétních hodnot 0, 1, 2... A právě změny vibračního čísla nám udávají, o jaký přechod se jedná. Pokud se vibrační kvantové číslo změní z  $0 \rightarrow 1$ , tak se jedná o fundamentální přechod. Horký přechod potom znamená změna vibračního čísla z  $1 \rightarrow 2$ , a pak vždy změna vrstvy ve vyšších energetických vrstvách o jednu vrstvu. Svrchní přechod je pak změna kvantového vibračního čísla o 2, 3, 4. Při kombinacích přechodech jsou aktivní dva (binární), tři (ternární) nebo čtyři přechody zároveň. Anharmonicitu vibrací dovoluje změnu vibračního kvantového čísla o více než  $\pm 1$ . Velkou anharmonicitu

vykazují vazby vodíku, a proto jsou pásy vodíkových vazeb nejintenzivnější.[26]

U molekul v plynném stavu dochází současně k přechodům rotačním, které se projeví rotační strukturou pásů. Tohle není možné u molekul v pevném stavu, jelikož se nemohou pohybovat ani rotovat. Zde stupně volnosti přechází na pohyby celku.[26]

## 2.3 Vliv podmínek experimentu na tvar pásů

Počet pásů ve vibračním spektru (infračervené spektrum) není v jednoduchém vztahu k vibračním stupňům volnosti. O aktivitě vibračních přechodů a jejich intenzitě rozhoduje symetrie molekuly. Při analýze vibračních spekter se využívá teorie bodových grup. Na základě této analýzy lze rozhodnout, pro které vibrační módy dojde ke změně dipólového momentu nebo polarizovatelnosti molekuly a tím k aktivnímu přechodu, které vibrační módy budou degenerované (více módům bude odpovídat stejná frekvence) a které budou neaktivní. [26]

Jak již bylo zmíněno v kapitole 2.2.1, většina látek, které jsou zkoumány pomocí IR spektroskopie vykazují charakteristické absorbance v IR oblasti spektra. Tato absorbance se vypočítává například pomocí Lambert-Beerova zákona (1.5), který nám říká, že absorbance je závislá na koncentraci a tloušťce prozařované vrstvy. Zde nastává problém se zkreslením, obzvláště peaků spektra, které nastává při saturaci. [8] Proto je nutné mít zkoumanou látku ve velmi tenké vrstvě, nebo použít rozpouštědla či ředidla. Volba rozpouštědla případně ředidla je velmi důležitá. Rozpouštědlo musí být propustné pro záření v určité vlnové délce ideálně v co největším rozsahu, aby nepřekrývalo spektrální rysy zkoumané látky. Dále je důležité, aby rozpouštědlo nebo ředidlo neovlivňovalo a neměnilo vlastnosti studované látky. Vhodným rozpouštědlem může být například  $CCl_4$  (tetrachlormethan), který má svůj absorpční pás pouze jeden v oblasti  $820 - 700\text{cm}^{-1}$ . Jiná rozpouštědla mohou mít i více absorpčních pásů. Ovšem pro získání celého spektra je vždy nutné zkombinovat při měření několik rozpouštědel. Látky, které jsou nerozpustné, lze měřit pomocí suspenze v parafinovém oleji, nebo metodou KBr tablety či technikou difúzní reflexe. [8]

IR spektroskopie je fyzikální přesná a rychlá nedestruktivní technologie, která je vhodná pro využití při online kontrole vzorků. Příprava vzorků obecně není nutná, nebo je velice jednoduchá a přístroje tohoto typu jsou snadné k obsluze po odborném zkalibrování. [25]

## 3 Přístrojové vybavení pro analýzu pomocí infračerveného záření

### 3.1 Základní schéma IR spektrometru

IR spektrometry jsou přístroje, které mají široké použití v laboratořích, ale také se používají jako přístroje procesní. Tyto přístroje mají podobnou konstrukci, jako přístroje používané pro UV-VIS oblast. Do nejvíce zjednodušeného popisu bychom mohli zahrnout zdroj záření, kyvetu na zkoumanou látku a detektor, ovšem každá z těchto částí je podle způsobu měření upravována, doplňována a specifikována. [26] Každé měření začíná proměřením pozadí, kdy se do kyvetového prostoru vloží referenční kyveta a následně probíhá proměňování zkoumaného vzorku. Teprve až z poměru získaných hodnot při měření pozadí a měření vzorku získáváme tíženou hodnotu absorbance, případně transmitance. [8]

Měření infračervených spekter se provádí na třech základních typech přístrojů: disperzních, nedisperzních a interferometrických. [8]

### 3.2 Disperzní IR spektroskopie

Zdroj IR záření je zde keramická tyčinka, na kterou je navinut, nebo uvnitř ní je navinut odporový drát žhavený na velmi vysoké teploty okolo 1000 - 1400 °C. Tento zdroj má být imitací černého tělesa. Následně je záření směřováno na kyvetu, do které se umísťuje vzorek. Kyvety použité v IR spektroskopii, by měly být propustné v dané spektrální oblasti. Toto pravidlo splňují například halogenidy kovů (NaCl, KBr, CsI. . .). Následně je paprsek přiveden na monochromát, který se skládá ze vstupní a výstupní štěrbin, difrakční mřížky a kolimačních zrcadel. Funkce monochromátu je rozklad IR záření. Pomocí otáčení difrakční mřížky se na detektoru získává požadovaný vlnočet. [8] Poslední částí spektroskopu je nutně detektor. Při disperzní spektroskopii se používají 2 typy detektorů, a to termoelektrický nebo pyroelektrický. U termoelektrických vzniká elektrické napětí důsledkem dopadu IR záření na spoj 2 kovů, které ohřívá a díky Seebeckovu jevu se zde vytváří napětí. [15] Zatímco u pyroelektrického detektoru dochází dopadem IR záření na dielektrikum, které se nachází mezi dvěma elektrodami kondenzátoru, a tím dochází ke změně jeho vlastností. [8]

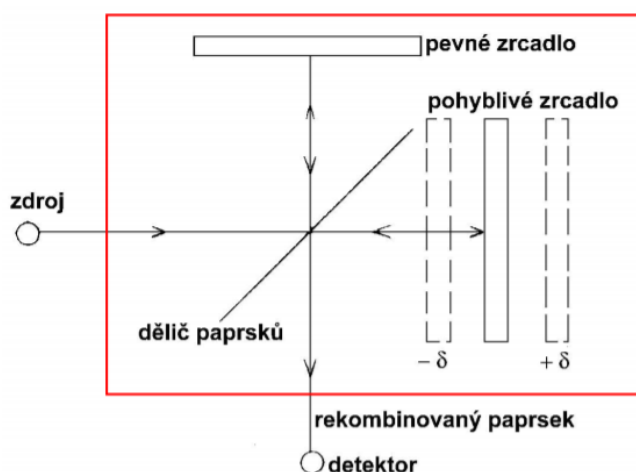
### 3.3 Nedisperzní IR spektroskopie

Nedisperzní IR spektrometry mají principálně stejnou strukturu jako disperzní spektrometry. Avšak zde se nevyužívá monochromátu k disperzi paprsku, ale využívá se k zisku monochromatického záření již pomocí zdroje. Tedy jako zdroje se zde využívají například plynové lasery, které jsou schopné dosáhnout vysoce monochromatického záření. Ovšem v poslední době s rozvojem techniky se začínají využívat takzvané pevnolátkové lasery, čímž se myslí laserové diody, které produkují záření na určitých vlnových délkách pomocí příměsí na diodách. [8]

### 3.4 Interferometrická IR spektroskopie

V současné době většina přístrojů pracuje především s využitím Michelsonova interferometru, který nahradil disperzní mřížkové přístroje. Tuto skupinu přístrojů souhrnně nazýváme FTIR spektrometry (spektrometry s Fourierovou transformací) a vyrábějí se podle účelu v různých variantách (rutinní, laboratorní, přenosné, stolní, jednoúčelové, modulární. . .). Přístroj může být pomocí využití více komponent použit k proměření většího rozsahu a díky použití více zdrojů, detektorů a děličů svazku lze obsáhnout celé IR spektrum. Při připojení dalších modulů lze spektrometr upravit na Ramanův spektrometr či mikroskop. [26]

Ve většině případů se jedná o zařízení jednopaprskové, kdy se měření srovnávacího vzorku provede odděleně. Následně se provede měření a všechny další operace jsou prováděny pouze matematicky (odečítání srovnávacího měření). Toto je možné díky rychlosti skenování, kdy předpokládáme, že pozadí je v průběhu měření dostatečně stabilní. [26]



Obr. 3.1: Schéma Michelsonova interferometru [8]

Na obrázku můžeme vidět, že na děliči paprsku, který tvoří polopropustné zrcadlo, dopadá záření pod úhlem  $45^\circ$ . Polovina záření projde skrz zrcadlo k pohyblivému zrcadlu a druhá polovina se odrazí směrem k pevnému zrcadlu. Pevné zrcadlo je kolmé k pohyblivému zrcadlu. Paprsek, který dopadne na obě zrcadla se odrazí zpět k děliči paprsků, kde dochází k interferenci. Podle polohy pohyblivého zrcadla dochází ke konstruktivní, pokud je dráhový rozdíl obou paprsků celistvým násobkem vlnové délky, nebo destruktivní interferenci, pokud není.[8]

$$\text{dráhový rozdíl} = n\lambda \quad (3.1)$$

Destruktivní interference vede k snížení intenzity záření paprsku. Takto rekombinovaný paprsek je odražen směrem k detektoru skrz kyvetový prostor. Signál je snímán v závislosti na poloze zrcadla. Na vstupu máme polychromatické záření, takže na detektor dopadá záření, které je součtem všech interferencí. Ze získaného interferogramu můžeme furierovou transformací získat již výsledné spektrum. [8]

Zdroj záření se volí podle oblasti, ve které chceme experiment provádět. V NIR oblasti se tak běžně používá wolframová žárovka a v MIR oblasti se využívá žhavená tyčinka karbidů, oxidů vzácných zemin nebo keramická tyčinka. Jak již bylo zmíněno nejdůležitější roli hraje dělič svazku, který má rozdělit paprsek na dva stejné svazky paprsků. Jedná se o reflexní vrstvu nanesenou na vhodně zvoleném nosiči, i zde se volí materiál podle rozsahu zkoumaného IR spektra. Vliv nosiče je nutno kompenzovat, a proto se k děliči přidá ještě kompenzátor vyrobený ze stejného materiálu jako nosič. [26] Poslední částí je detektor, který je stejně jako zdroj i dělič svazku záření zvolen podle použití přístroje a podle toho, v které oblasti chceme signál získávat. Jsou jimi například fotovodivostní detektor MCT (mercury cadmium telluride) pro oblast  $12500 - 400 \text{ cm}^{-1}$ , který obsáhne téměř celé IR spektrum, dále pak InSb (fotovodivostní nebo fotodioda) pro  $10000 - 1500 \text{ cm}^{-1}$ . Tyto detektory mají velkou výhodu díky rychlé odezvě, ovšem kvůli tomu musí být chlazené například kapalným dusíkem. V neposlední řadě se využívají také pyroelektrické detektory. Směr, kterým paprsek prochází je usměrňován pomocí zrcadel. [26]

## 4 Analýza potravin IR spektroskopii

Analýza potravin je v dnešní době velice kýžená. To je způsobeno vysokou konstantní kvalitou potravin v obchodních řetězcích, kdy si zákazník vybírá mezi nejlepšími produkty. Proto bylo nutné do výroby potravin zařadit metody, které by byly efektivnější a méně pracovně náročné než metody užívané původně. Díky technickému vývoji NIR a MIR spektroskopie je tato metoda stále velice používanou z důvodů vhodných nedestruktivních vlastností IR záření, rychlosti odezvy systému a relativně nepříliš finančně náročné pořizovací ceně. Díky těmto vlastnostem se stává dokonalou součástí procesů analytických technologií (PAT). [25] Pro výrobce je velice důležité sledovat složení potravin online při výrobě, aby výrobce mohl kontrolovat kvalitu jednotlivých surovin. Mimo jiné se v poslední době pro výrobce potravin stává povinností prokázat přesné složení potravin a metody IR spektroskopie jim mohou pomoci v dodržování norem a předpisů. Tedy je důležité sledování procesů výroby a kvality produktů. Samozřejmě těchto metod se nevyužívá pouze v potravinářském průmyslu, ale i v jiných odvětvích. [25]

### 4.1 Aplikace NIR a MIR spektroskopie při výrobě sýru

Podle článku Woodcocka a jeho spolupracovníků [25], kteří provedli podrobnou literární rešerši v oblasti využití IR spektroskopie (NIR a MIR) při výrobě a kontrole kvality sýrů, jsme se mohli dozvědět, že IR spektroskopie má, kromě klasického určení složení a ověřování pravosti sýrů, využití od první výrobních postupů až po určování kvality sýru.

Hned na začátku výrobního procesu, kdy je z mléka pomocí koagulace potřeba vytvořit hmotu gelovitého stavu. Tu je potřeba nařezat přesně v okamžiku, kdy gel je již dostatečně tuhý k řezání. Pokud by se řezání provedlo dříve, výsledný produkt by obsahoval velké množství vody. Naopak pokud by řezání bylo provedeno později a gel by byl příliš pevný, tak by docházelo k velkým ztrátám na výsledném produktu. Dříve byl tento čas definován a kontrolován. [25] Postupně v rámci snahy o automatizaci systému byla snaha o vývoj senzorů, které by tento čas určily automaticky. Zprvu bylo využíváno UV/VIS spektroskopie a absorbance gelu. Ačkoliv tyto metody měly dobré výsledky, tak nenašly v praxi přílišné využití. To se změnilo až s vývojem optických vláken, kdy bylo možné přenášet záření pomocí těchto vláken a mohla být měřena transmitance, nebo reflektance, která stoupá tím, jak je gel formován. [25] Následně byla provedena snaha o využití NIR spektroskopie, která ve výsledku ukazovala velmi přesné výsledky v určení času řezání na méně než 100 s podle výzkumu O'Callaghan a kol. [18]. Ti ve svém výzkumu porovnávali NIR

senzory a schopnosti teplotních („hot wire“) a vibračních senzorů, kde nejlepších výsledků dosahovaly právě NIR senzory. [25]

Dále se IR spektroskopie využívá také při určování doby zrání sýrů. Zde se podle článku Woodcocka a jeho spolupracovníků [25] obecně využívá spíše MIR spektroskopie, přesněji tedy FTIR, kdy při zrání sýru dochází k nárůstu hladiny rozpustného dusíku v sýru a tudíž se může detekování této hladiny považovat za přímý ukazatel zralosti sýrů. [25]

## 4.2 Využití při určování alergenů v potravinách

Firma NeoSpectra nabízí velké množství využití IR spektrometrů, jako například kontroly čerstvosti potravin nebo například obsah alergenů v potravinách. Touto oblastí se budeme dále okrajově zabývat.

Neospectra společně s firmou GreenTropism vyvinuly aplikaci vhodnou k zjišťování některých základních alergenů v potravinách pomocí detektoru NeoSpectra Micro, který je zabudovaný ve speciálně vyrobeném obalu pro mobilní telefony. [16] Právě díky mobilní aplikaci a obalu NeoSpectra je možné kdekoliv detekovat vybrané alergeny, což může být v budoucnu hojně využíváno mezi alergiky. V současné době je tato aplikace stále ve vývoji a momentálně funguje pouze pro mobilní telefony značky iPhone. Ovšem již nyní se dají pomocí této aplikace zjistit 2 látky. Aplikace zjistí, zda káva (mletá zrna) obsahuje kofein nebo ne. Druhou látkou, kterou umí tato aplikace rozpoznat je lepek a to buď v mouce, nebo v už upečeném pečivu. Další připravovanou částí této aplikace je detekce proteinů obsažených v ořechách. [16]

## 4.3 Sledování obsahu sacharidů v cereáliích

Další aplikací, kterou nabízí NeoSpectra, je využití při sledování obsahu sacharidů v cereáliích. V dnešní době se z cereálií stává populární potravina ke snídani, a to i v mnoha dietních jídelnících díky dobrým nutričním hodnotám. Nicméně dle přehledu na stránce NeoSpectra [16] upozorňují v návaznosti na zprávy od Ventury a kol. z roku 2011 a Walkera a kol. z roku 2014, že ne vždy je ve složení vytištěném na obalu potravin správně uvedené množství sacharidů. Sacharidy se využívají v cereáliích ke zlepšení chuti a jako potahový materiál, který není tak lepivý jako například fruktózový kukuřičný sirup. Bohužel velké množství přijímaných sacharidů způsobuje obezitu, čímž se dostáváme do konfliktu s výše zmiňovanými dietními jídelníčky. [16]

K zjišťování obsahu sacharidů se dá využít hned několika metod. Například se využívá vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), enzymatická a elektrochemická analýza a v neposlední řadě i spektroskopická analýza. Všechny tyto metody jsou účinné a přesné, ovšem při HPLC a enzymatické analýze se objevuje několik komplikací. Jedna z nich je vysoká cena takovéto analýzy a další problém je potřeba velkého množství vzorku. Oproti tomu výhodou NIR spektroskopie tyto nevýhody nemá a nabízí výsledky, které jsou srovnatelné s výsledky HPLC. [16]

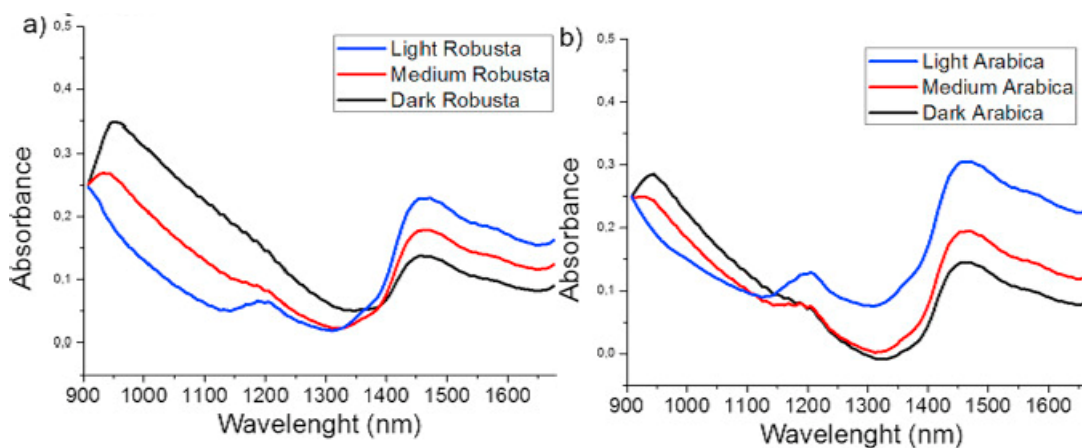
## 5 Vlastnosti zkoumaných látek

### 5.1 Káva

Káva je důležitou součástí života mnoha lidí. Mnozí lidé pijí kávu, aby nabudili svůj organismus a potlačili tak pocit únavy. Tento efekt na lidský organismus má káva díky kofeinu.

Na světě existuje několik druhů kávovníků, ovšem nejrozšířenější jsou 2 typy. Nečastější je arabica, která se pěstuje v hornatých, chladných oblastech. Její chuť je jemnější a více aromatická oproti dalšímu velmi rozšířenému druhu robustě. Robusta byla vypěstovaná na Jávě a její chuť je více hořká a mnohem silnější. [20]

Velký vliv na kvalitu kávy má její zpracování a to konkrétně pražení. Pražení je velmi důležitý proces při zpracování kávových zrn. Celý proces pražení musí probíhat určitou dobu. Pokud bychom kávu pražili déle nebo i kratší dobu, chuť by byla výrazně negativně ovlivněna. Aby byla dodržena co nejlépe doba pražení, využívá se také infračervené spektroskopie, kde můžeme podle spektra poznat, jak byla káva pražena (viz. Obr. 5.1), či jaké množství cizorodých látek obsahuje. [2]



Obr. 5.1: Vliv míry pražení a druhu kávy na IR spektrum [2]

#### 5.1.1 Kofein

Kofein je důležitou látkou v kávě, díky které se káva často užívá. Její obsah v kávě je 0,5 – 2,5 % [20]. Chemicky se jedná o alkaloid s purinovým jádrem [10]. Kofein má charakteristické peaky v IR spektru na vlnočtech mezi 1600 - 1700  $\text{cm}^{-1}$  (6250 - 5882 nm). Ty se nacházejí v MIR a tudíž nejsou pro tuto práci použitelné [22].

Tato látka slouží k ochraně semen proti parazitujícím organismům, když se dostanou do půdy. Pro člověka je smrtelná dávka 150 mg kofeinu na 1 kg lidské váhy [20].

Jeho účinek při únavě je v jeho schopnosti vázat se na receptory citlivé na adenosin, který zpomaluje přenos nervových vzruchů. Tím, že se kofein naváže na místa pro adenosin, tak omezí jeho účinek. Působí také na nadledviny, které začnou produkovat adrenalin. Ten působí povzbudivě na organismus (zrychluje srdeční činnost, zvýší se krevní tlak, prohloubí se dýchání). Vyplavuje se také do krve dopamin, jenž navozuje pocit štěstí. Kvůli těmto vlastnostem působí podobně jako některé drogy a lze si na něj vybudovat závislost. [20]

### 5.1.2 Výroba bezkofeinové kávy

Káva bez kofeinu je často žádaná u lidí s jistými zdravotními problémy. Ovšem ani bezkofeinová káva není zcela zbavena kofeinu a i tak určité mále množství kávy obsahuje. Při výrobě bezkofeinové kávy se uplatňují především 2 metody odstraňování kofeinu a to evropský proces a Švýcarský vodní proces. [1, 9]

#### Evropský proces

Jedná se o častější způsob odstraňování kofeinu z nepražených kávových zrn. Zelená kávová zrna jsou namáčena do vody, dokud se nerozevřou [1] a následně jsou promývána chemickým rozpouštědlem. Nejběžnějším rozpouštědlem je methylenchlorid. Právě dichlormethan má své charakteristické peaky i v námi využívané oblasti IR. Tyto peaky se nacházejí při vlnových délkách 1417 nm, 1690 nm, 1838 nm, 2068 nm, 2245 nm [13]. Rozpouštědlo do sebe absorbuje kofein z kávových zrn. Poslední fází odstraňování kofeinu je promytí zrn vodou, aby byla odstraněna veškerá chemikálie a zrna se suší. Tato metoda zachová kávě chuť a aroma, přičemž použitá chemikálie zanechává na chuti pouze drobnou stopu. [1, 9]

#### Švýcarský vodní proces

Tato metoda oproti evropskému procesu nevyužívá žádná organická rozpouštědla. Prvním krokem je zde vytvoření zeleného kávového extraktu. Ten vzniká namočením zelených kávových zrn do horké vody. Do vody se z kávových zrn vyloučí kofein, aromatické oleje a další látky ovlivňující chuť kávy. Takto vylouhovaná zrna jsou odstraněna a dále se již nepoužijí. Ze vzniklého roztoku je odstraněn kofein pomocí uhlíkového filtru. Díky jeho pórovitosti je odstraněn právě pouze kofein. Následně je vzata nová dávka zelených kávových zrn, která jsou namočená do zeleného kávového roztoku vyrobeného v předchozích krocích. Díky tomu, že tento roztok již obsahuje

ze zrn rozpustné aromatické látky, ale kofeinu byl zbaven, tak difúzí do roztoku proniká pouze kofein. Ten je následně z roztoku opět odstraňován uhlíkovým filtrem a zrna jsou promývána, dokud není odstraněn téměř všechen kofein. [1]

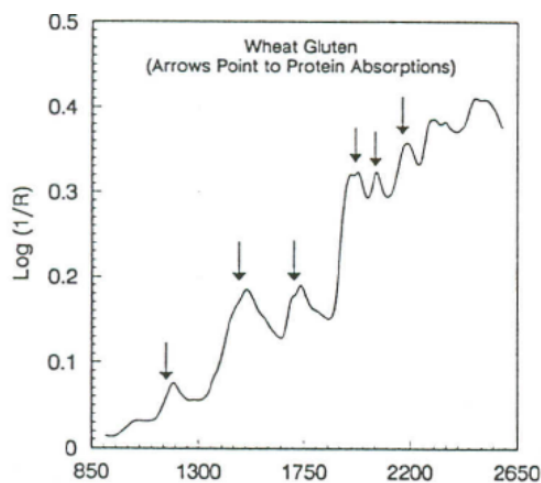
Takto připravená bezkofeinová káva oproti evropskému procesu má méně výraznou chuť a aroma, ale ovšem není zde chuť poškozena chutí rozpouštědla. Tento proces odstraňování kofeinu není vhodný pro odrůdy kávy Robusta. [9]

## 5.2 Lepek

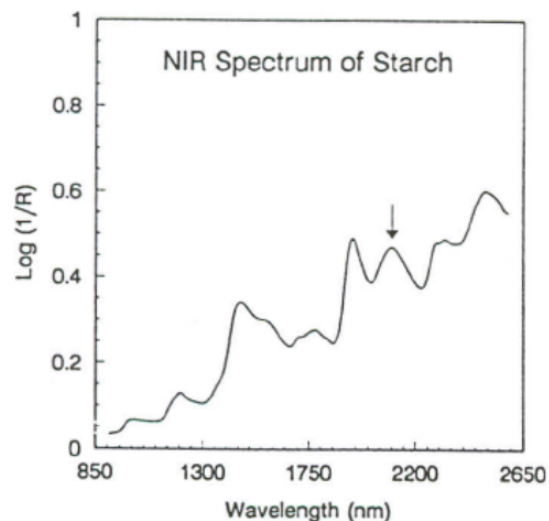
Lepek (gluten) je protein obilovin. Obsah bílkovin udává takzvanou sílu mouky. Velký vliv na sílu mouky má právě lepek. To znamená, že těsto vyrobené z této mouky, je schopné vázat velké množství vody a také je schopné zadržovat velký objem plynů. Pečivo si tak zachovává svůj objem a tvar. [11]

Pod název lepek může být zahrnuto více možných variant proteinů. Dříve označení lepek patřilo pouze struktuře, která vznikla vyhnětením pšeničného těsta. Později již byly pod pojem lepek shrnuty proteiny endospermu obilovin obecně. [23]

Běžný pšeničný lepek má v NIR oblasti několik charakteristických peaků a to při vlnových délkách 1190, 1488, 1735, 1974, 2054, 2162 nm [6].



NIR spektrum pšeničného lepku  
signály bílkovin:  
1190, 1488, 1735, 1974, 2054, 2162 nm



NIR spektrum škrobu  
hlavní signál 2100 nm

Obr. 5.2: NIR spektrum pšeničného lepku a škrobu [6]

Na obr. 5.2 můžeme pozorovat 2 spektra pšeničného lepku a škrobu, který se při

odstraňování lepku z mouky používá jako jeho náhrada, která zastupuje potřebné vlastnosti lepku. [23]

### **5.2.1 Problémy organismu s lepkem**

Základními komplikacemi lidského organismu s lepkem mohou být alergie a nebo celiakie. Celiakie je závažné onemocnění, při kterém lidský organismus při kontaktu s určitou sekvencí aminokyselin obsažených v lepku způsobuje závažnou autoimunitní reakci. Oproti alergiím je zde nutné zcela omezit příjem lepku.[23]

### **5.2.2 Způsoby odstranění lepku ze stravy**

Obiloviny obsahující lepek jsou v lidské stravě nahraditelné. Máme několik možností jak potraviny obsahující lepek nahradit.

Jednou z možností je lepek z mouky vyprat. Ovšem pokud je lepek takto z mouky odstraněn, musí být jeho vlastnosti nahrazeny jinou látkou, jako například přípravkem ze skupiny hydrokoloidů, škrobem a dalšími. [23]

Můžeme používat potraviny, které lepek neobsahují. Zde musí být při výrobě těchto potravin dodrženo, aby se do tohoto procesu nemohla dostat žádná jiná potravina lepek obsahující, aby nekontaminovala bezpečný výrobek. To samé platí i pro prostory, kde se takové potraviny balí a skladují.

Existují obiloviny lepek neobsahující jako například kukuřice, rýže a další. Případně lze obiloviny nahradit zcela jinými surovinami jako jsou například brambory.

Specifickou obilovinou je oves, který lepek obsahuje ve velmi malém množství oproti ostatním lepek obsahujícím obilovinám. Proto je pro některé pacienty možné oves použít jako náhradu lepkových mouk. [23]

## 6 Analytické metody využívané při analýzách IR spekter

### 6.1 Kvalitativní analýzy

Při kvalitativních analýzách jsou využívány data banky, které obsahují informace, jaké vazby a na kterých vlnových délkách záření mají největší absorpční. Tím pádem se v absorpčním spektru na dané vlnové délce vyskytuje peak. Tyto tzv. funkční skupiny následně vyhledáváme v celkovém spektru zkoumané látky. Existují některé softwary, které tuto analýzu provádějí. [19]

Tyto metody se nazývají metody pod dohledem. Oproti tomu, pokud nemáme dostatek nezávislých dat, abychom mohli provést validaci naměřených dat, používáme metody bez dozoru, jako jsou například PCA a HCA. [4]

### 6.2 Analýza hlavních komponent

Při analýze spekter se velmi často také využívá analýza hlavních komponent (PCA) [2, 4, 19, 21, 24, 25]. PCA má za úkol provést na velkoobjemových datech redukcii těchto dat a vytvoření sady hlavních komponent (PC), které charakterizují variabilitu naměřených dat. [24] První komponenta vždy zobrazuje největší rozptyl v datech, druhá poté druhý největší atd. [4]. Díky PCA lze rozpoznat, jak se různé materiály od sebe odlišují. [19] Hlavní komponenty jsou lépe a lehčeji interpretovatelné než původní data a přitom mají dostačující vypovídající hodnotu o měřených vzorcích. [24]

### 6.3 Hierarchická shluková analýza

Hierarchická shluková analýza (HCA) je analýza fungující na principu vytváření shluků podle vzdáleností spekter a shluků mezi sebou. Přičemž shlukování probíhá nejdříve mezi jednotlivými spektry a následně i mezi již vytvořenými shluky. Tento proces probíhá neustále dokola, dokud se nevytvoří 2 velké poslední shluky, mezi kterými je vypočítána vzdálenost. Ze získaných dat může být vytvořen dendrogram podle vypočítaných vzdáleností. Často se k výpočtům HCA využívá Wardova algoritmu společně s výpočtem Euklidovské vzdálenosti. [4, 21] Wardova metoda funguje na principu nalezení a shlukování co nejhomogennějších dat, přičemž dochází ke ztrátě informace. Kritériem je součet druhých mocnin vzdáleností mezi objekty [12].

K vyhodnocení testu je následně dle literatury Severcan použito porovnávání senzitivity a specificity testů. Senzitivita nám udává kolik procent pozitivních vzorků bylo testem označeno jako pozitivních, zatímco specificita nám dává hodnotu, kolik procent skutečně negativních vzorků bylo označeno testem jako negativní. [21]

## 7 Postup měření

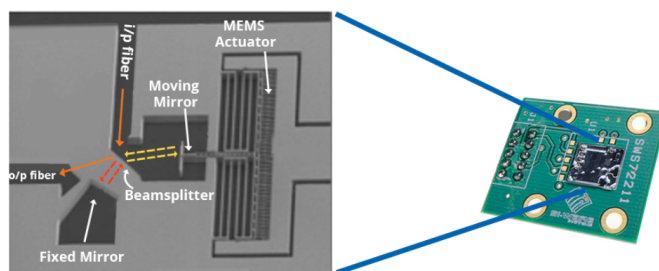
V praktické části bylo změřeno několik vzorků různých potravin. Bylo provedeno předzpracování a analýza jejich spekter za účelem zjištění využitelnosti přístroje NeoSpectra při rozlišování kvality potravin v NIR oblasti.

### 7.1 Komponenty měřící techniky

#### 7.1.1 NeoSpectra-Micro

Hlavní komponentou měřící techniky je integrovaný senzor NeoSpectra-Micro od firmy Si-Ware Systems, který by měl nabízet při svých malých rozměrech podobné vlastnosti jako laboratorní spektrometry.

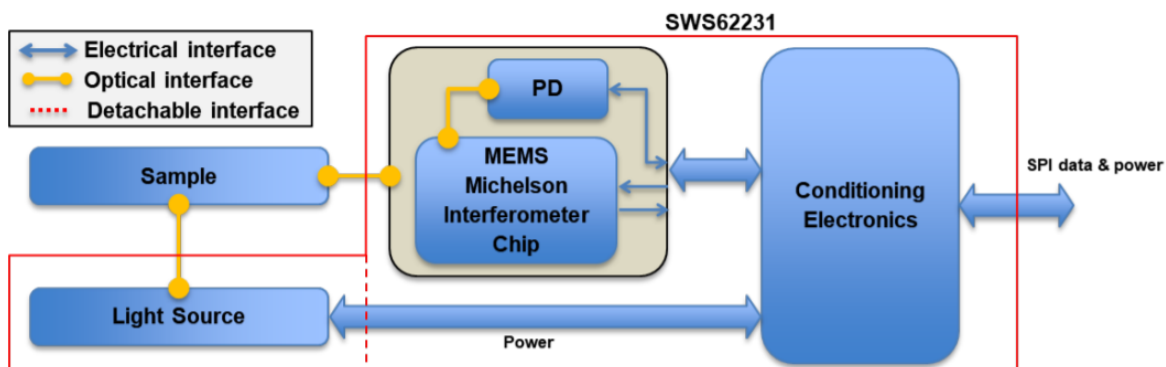
Tento spektrometr je schopný pracovat v oblasti NIR mezi vlnovými délkami 1350 – 2500 nm. Základním principem fungování spektrometru je FTIR, která je běžně využívána v laboratorních spektrometrech sloužících k přesnému kvantitativnímu i kvalitativnímu určování. Spektrometr funguje na principu Michelsonova interferometru vytvořeném na MEMS čipu.



Obr. 7.1: Provedení Michelsonova spectrometru na MEMS čipu [16]

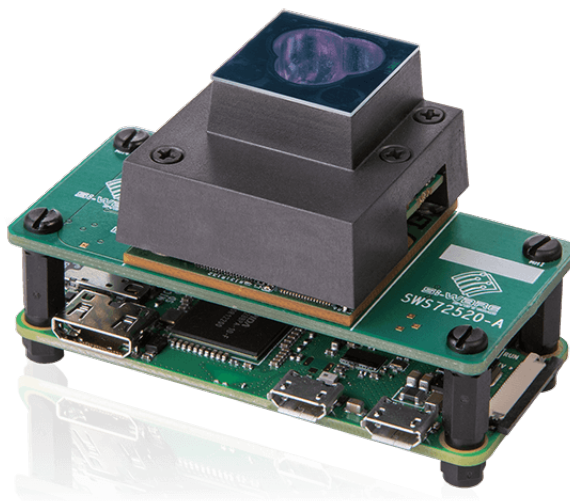
Jako zdroj záření jsou zde umístěny 3 lampy v takzvané optické hlavě přístroje. Je zde možnost využití pouze 2 lamp, pokud to vyžaduje provedení experimentu. Lampy jsou umístěny do vrcholů trojúhelníku a ve středu trojúhelníku je průzor, který přivádí odražené záření k detektoru. Optická hlava má na svém výstupu keramické okénko, které je přizpůsobeno přímému kontaktu se vzorkem.

Celé zařízení je konstruováno na Raspberry Pi desce, která může fungovat jako samostatný ovladač spektrometru, nebo slouží ke komunikaci s jiným zařízením. Deska Raspberry Pi zároveň disponuje uložištěm, na které lze ukládat výsledky experimentů. K ovládání zařízení existuje software, pomocí kterého lze ovládat spektrometr a základně si nastavovat vzhled spektrogramu.

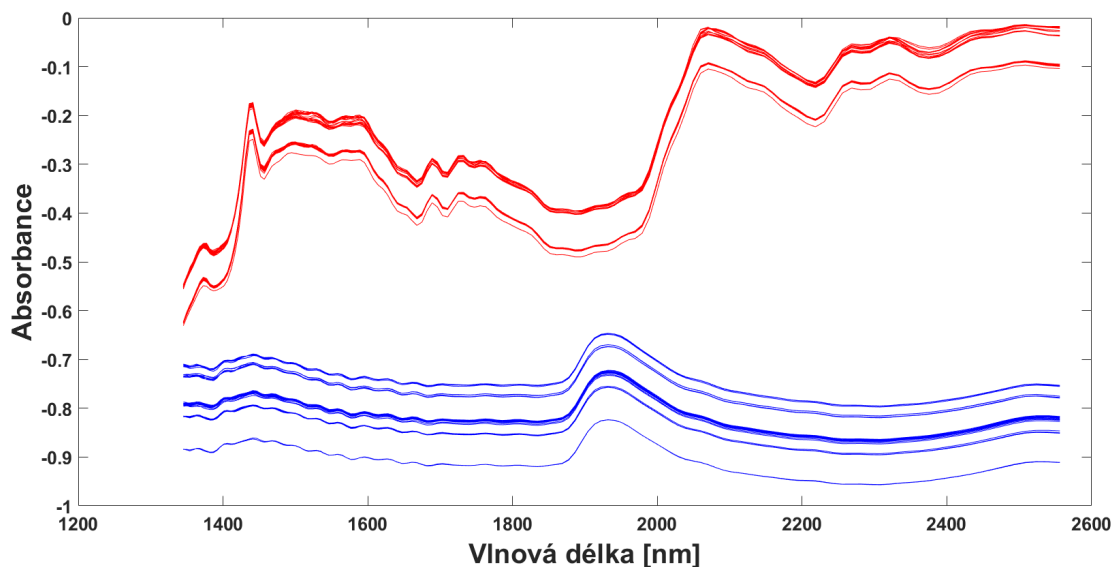


Obr. 7.2: Blokové schéma použitého spektrometru NeoSpectra [17]

V programu NeoSpectra lze nastavit specifikace měření. Lze měřit Výkonovou spektrální hustotu (PSD), reflektanci a transmitanci nebo absorbanci v závislosti na vlnové délce, nebo vlnočtu. Lze zde také nastavit kontinuální mód, kdy přístroj proměřuje vzorek v určitých intervalech, nebo mód, kdy je vzorek proměřen jednou. Poslední možností, kterou lze nastavit, je doba záření lampami, kde lze nastavit rozmezí několika sekund.



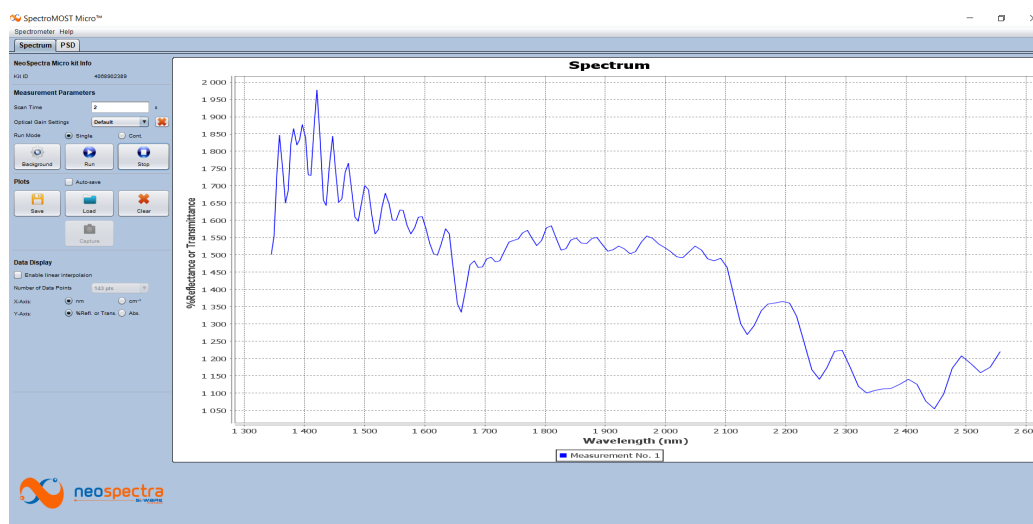
Obr. 7.3: Celkový vzhled zařízení NeoSpectra na Raspberry Pi [16]



Obr. 7.4: Ukázka absorpčního spektra získaného z aplikace NeoSpectra-Micro. Modrá křivka znázorňuje IR spektrum sypané soli. Červená křivka znázorňuje IR spektrum sypaného cukru.

## 7.1.2 Software SpectroMOST\_Micro\_1.0

K ovládání přístroje se využívá software SpectroMOST\_Micro\_1.0 od firmy Si-Ware Systems. Software nabízí přehledné uživatelské prostředí k ovládání spektrometru, ve kterém lze jednoduše nastavovat jednotlivé parametry měření a zobrazuje v grafu jednotlivá změřená spektra.

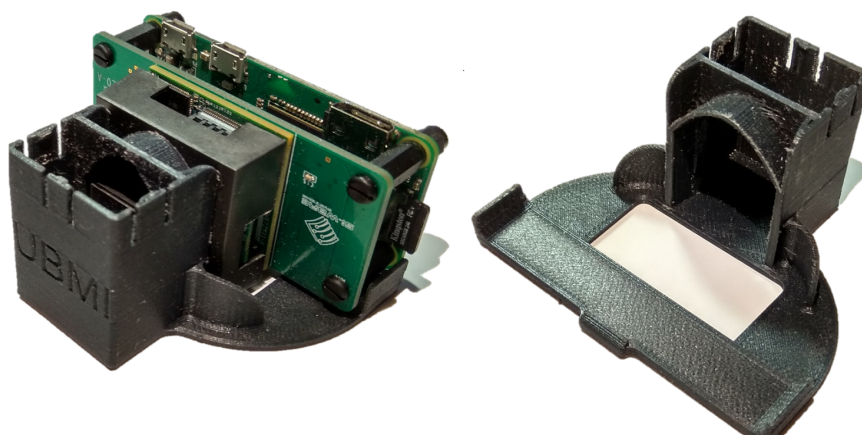


Obr. 7.5: Uživatelské prostředí softwaru SpectroMOST\_Micro\_1.0

Pomocí přístroje lze měřit buď spektrum zvolené látky, nebo případně výkonovou spektrální hustotu. Dále zde v levé části programu můžeme zvolit, jestli chceme měřit absorpenci, či reflektanci/transmitanci a to závislou na vlnové délce, či na vlnočísle. Je možné také nastavovat dobu osvitů vzorku. Dále jsou zde tlačítka k ovládání přístroje jako Background, Start, Stop a tlačítka k ukládání a nahrávání získaných spekter. Možné tu jsou i 2 režimy snímání. První z nich získá spektrum, které nahraje a vykreslí na obrazovce. Případně jde postupně získat a zobrazit více spekter do jednoho grafu. Druhým režimem získáváme spektra online, kdy spektrometr opakuje měření každé 3 sekundy a naměřená data přepisuje.

### 7.1.3 Stojan spektrometru a kyvety

Spektrometr NeoSpectra a kyveta byly při měření uchyceny v plastovém stojanu. Stojan byl vyroben proto, aby při měření nedocházelo ke změnám pozic kyvety a spektrometru vůči sobě, což by mohlo vytvořit různé nežádoucí artefakty ve spektrech a tím i chyby v měření. Stojan byl navrhnout panem Ing. Vratislavem Harabišem, Ph.D. a následně vytisknut na 3D tiskárně Ústavu biomedicínského inženýrství.



Obr. 7.6: Stojan spektrometru a kyvety

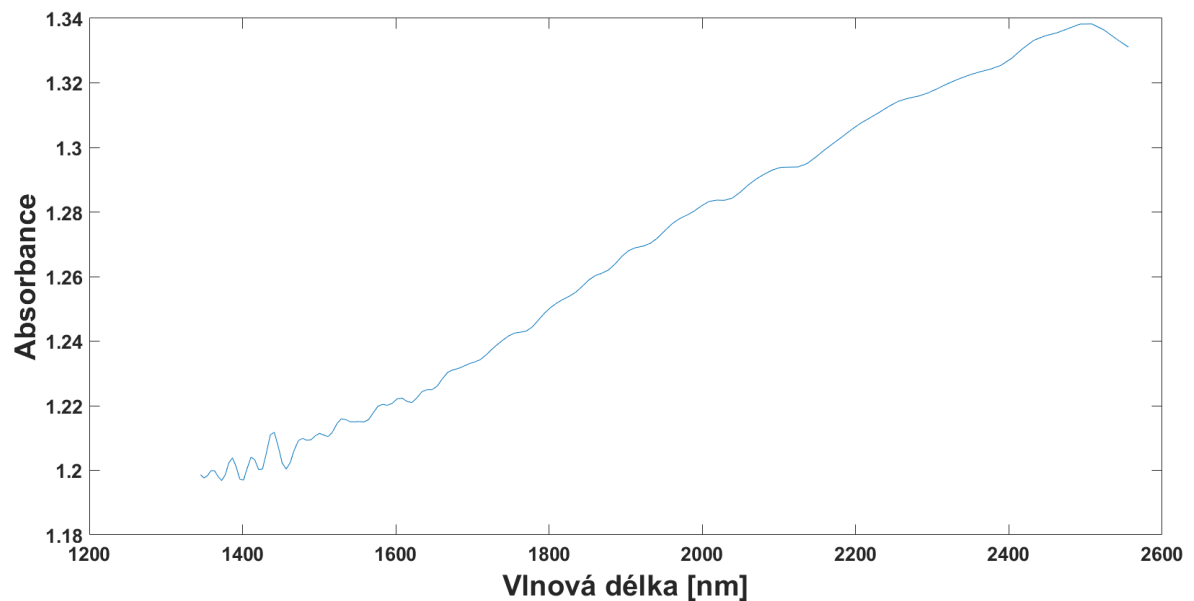
### 7.1.4 Kyvety

Aby experiment správně fungoval a výsledky získané z něj byly validní, musíme uvažovat i o volbě kyvet k experimentu použitých. Při volbě kyvet, ve kterých se bude proměřovat, je zapotřebí zjistit, jaké je jejich absorpční spektrum. Materiál, ze kterého jsou vyrobeny, by neměl mít ve zkoumaném rozmezí vlnových délek výrazné

absorpční peaky. Jeho spektrum by mělo být co nejvíce konstantní, aby záření tlumil rovnoměrně při všech vlnových délkách stejně a signál se pouze tlumil, ale nezkresloval. V ideálním případě by měla být absorbance nulová, čehož v praxi nelze zcela dosáhnout.

Nejvhodnější materiály, které jsou vhodné pro použití při analýze v NIR oblasti jsou sklo, nebo křemenné sklo. [6]

K provedení experimentu v této bakalářské práci byla zvolena kyveta anglické firmy Lightpath Optical. Použitá kyveta má obdélníkový tvar s optickou drahou 10 mm. Jedná se o kyvetu vyrobenou z difúzního křemenného skla. Její absorpční spektrum je možné vidět na obrázku Obr. 7.7.



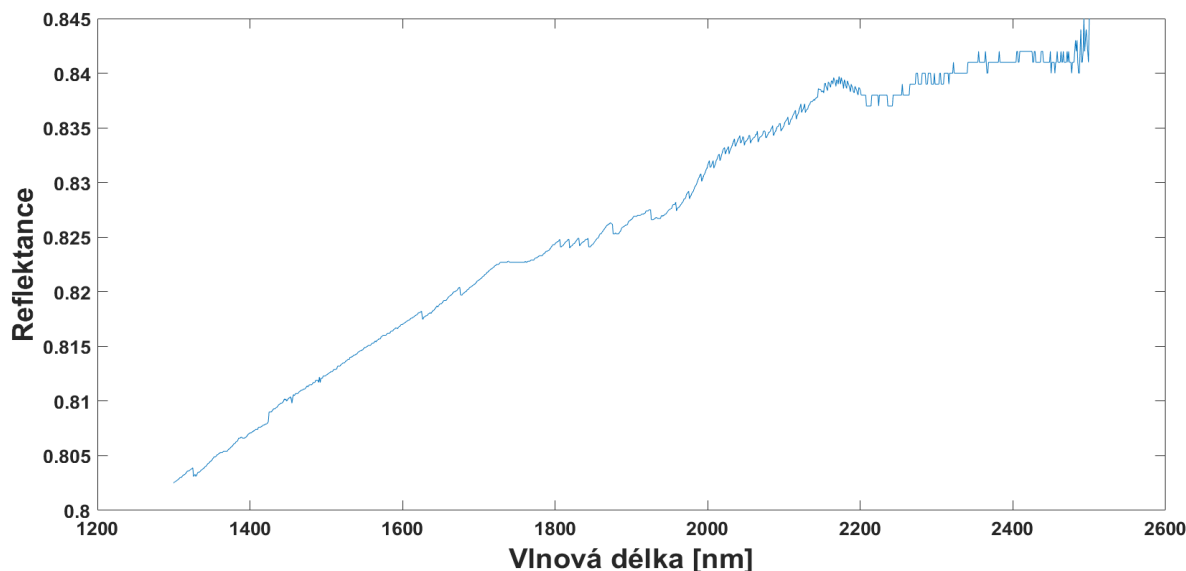
Obr. 7.7: Závislost absorbance difúzní IR kyvety na vlnové délce

Na obrázku můžeme vidět, že absorpční křivka kyvety je v rozmezí přibližně 0,15 absorbance a má tendenci více pohlcovat IR záření o větších vlnových délkách. Ovšem tuto změnu můžeme považovat za téměř minimální a takto malý rozdíl se snažíme potlačit při předzpracování dat.

### 7.1.5 Spektralon

Aby přístroj správně fungoval, je potřeba před začátkem měření proměřit pozadí, aby přístroj mohl následně správně vypočítat skutečnou absorbanci. Spektralon je látka, která by měla mít co největší odrazivost pro rozsah, který si zvolíme. Abychom správně vybrali vhodný spektralon, tak při jeho výběru sledujeme křivku reflektance, kterou výrobce dokládá k danému typu. Při sestavování našeho experimentu jsme

zvolili spektralon od firmy Labshere, model SRS-75-020 Reflectance Standard, jehož reflektance pro naše zkoumané vlnové délky je znázorněna v grafu na Obr. 7.8. Můžeme zde vidět, že v našem sledovaném rozsahu se reflektance pohybuje mezi 80 až 85 %.



Obr. 7.8: Závislost reflektance spektralonu na vlnové délce

Spektralon byl použit pouze při kontrolních měřeních vzorků a v následném experimentu užít nebyl, jelikož byl vytvořen stojan spektrometru a kyvety. Sice nebylo dosaženo úplného odrazu všech složek IR záření rovnoměrně, ale jako pozadí byly zaznamenány optické vlastnosti kyvety a stojanu, které také ovlivňují výsledek měření. Mimo to smyslem této práce není zjistit přesná spektra zkoumaných látek, ale jejich rozdíly mezi sebou.

## 7.2 Volba proměřovaných látek

Vybrané látky, které byly v experimentu proměřeny, byly vybrány podle pokusů, které demonstrují funkčnost čipu NeoSpectra-Micro. [16]

Prvním experimentem bylo proměření a porovnání 2 vizuálně podobných látek. Těmito látkami byly cukr a sůl.

Hlavními látkami zkoumanými při experimentu byly káva a mouka. Konkrétně by se mělo jednat o rozpoznávání několika druhů kávy, která obsahuje kofein a kávy, která kofein neobsahuje. Dalším experimentem by mělo být proměření mouky, která lepek obsahuje a která neobsahuje.

Výsledkem by mělo být zjištění zda-li je NIR spektroskopie při použití zvolené měřicí techniky vhodná pro rozlišování 2 stejných látek s jiným obsahem sledované složky. To by mohlo pomoci například alergikům na lepek nebo lidem, kteří z různých důvodů nemohou pít kofeinovou kávu. V případě kladného výsledku by se mohlo uvažovat o zakomponování spektrometru NeoSpectra do chytré domácnosti. [16]

## 7.2.1 Popis látek použitých v experimentu

### Káva

Zrna kávy byla mleta na stejnou hrubost (používaná pro přípravu espressa).

Tab. 7.1: Druhy káv, jejich rozdělení a základní informace

Kofeinové	Bezkofeinové
Arabica Brasil Santos (Kafe Kodó)	Arabica Brasil Santos (Kafe Kodó) - evropský proces
Arabica Kolumbie (LamCafé) - Colombia Excelso Bilbao	Arabica Kolumbie (LamCafé) - Colombia Excelso Bilbao - Švýcarský vodní proces
Robusta (Bellarom)	

### Mouka

Tab. 7.2: Druhy mouk, jejich rozdělení a základní informace

Lepkové	Bezlepkové
pšeničná mouka polohrubá (Basic)	pšeničná mouka (Nomix) - deproteinovaný pšeničný škrob, lupinovou, kukuřičnou a lněnou mouku
ovesná mouka celozrnná (Natural Jihlava)	ovesná mouka celozrnná (Natural Jihlava)
	směs na chléb rustikální (Nomix) - deproteinovaný pšeničný škrob, lupinovou, jáhlovou mouku, bramborové vločky a vlákninu
	lněná mouka (Naturfarm)
	hrachová směs (Hraška) - hrách, směs obilovin, sůl

## 7.3 Postup měření a zpracování naměřených dat

Celý experiment probíhal v několika fázích pro každou měřenou látku.

### 7.3.1 Příprava přístroje a zkoumané látky

Na začátku měření musí být přístroj umístěn do stojanu a připojen pomocí USB kabelu do počítače, ve kterém je nainstalovaný software firmy Si-Ware Systems SpectraMOST\_Micro\_1.0. Po připojení přístroje do počítače a spuštění programu dojde k automatickému vyhledání a spárování zařízení se softwarem.

Software umožňuje některé možnosti nastavení měření. Pro účely tohoto experimentu bylo nastaveno měření absorpce v závislosti na vlnové délce, dále potom měření jednotlivých spekter a doba osvitů 1 s.

Pokud proběhlo veškeré nastavení, tak do stojanu, ve kterém již máme připravený spektrometr, vložíme prázdnou kyvetu a v softwaru necháme proměřit pozadí. Lampy zařízení NeoSpectra vyzařují při měření pozadí záření o stejné intenzitě jako při běžném měření. Proměřením pozadí zjistíme velikost intenzity dopadajícího NIR záření na detektor, která bude využita jako intenzita  $I_0$  k výpočtu absorpce podle rovnice 1.3. Do této intenzity je započítané záření vyzářené přístrojem a následně odražené od kyvety, plastového stojanu a dále se také přičte NIR záření z okolí. Toto záření bude minimální, jelikož vyrobený stojan slouží také k zamezení ovlivňování měření okolním elektromagnetickým zářením tím, že je pro kyvetu vytvořena neprůsvitná komůrka. Kyveta a stojan jsou také proměřeny společně s pozadím proto, aby jejich absorpce nebyla považována za absorpenci zkoumané látky.

Následně do kyvety nasympeme zkoumanou látku a mírně (tak aby nedošlo k poškození kyvety) udusáme, aby mezi sypkým vzorkem bylo co nejméně vzduchu.

### 7.3.2 Získání dat a jejich předzpracování

Nyní již můžeme přejít k proměřování připravených vzorků. Pokud již máme přístroj a kyvetu vloženou do stojanu, tak měření spektrometrem již ovládáme pouze pomocí softwaru. Software automaticky vykreslí získané spektrum dané látky. Získané spektrogramy lze uložit jako obrázek ve formátu .png, nebo ve formátu .SPECTRUM, kdy jeden soubor obsahuje data potřebná k vykreslení jednoho spektra. To znamená, že jeden soubor obsahuje vektor vlnových délek a k nim náležící vektor absorpance.

Soubory ve formátu .SPECTRUM byly načteny do Matlabu ve formátu matice pomocí automaticky vytvořené funkce, ve které byly provedeny drobné úpravy k urychlení načítání. Daná matice v každém sloupci obsahuje data k jednomu spektrogramu a pozice ve sloupci udává k jaké vlnové délce se daná hodnota vztahuje.

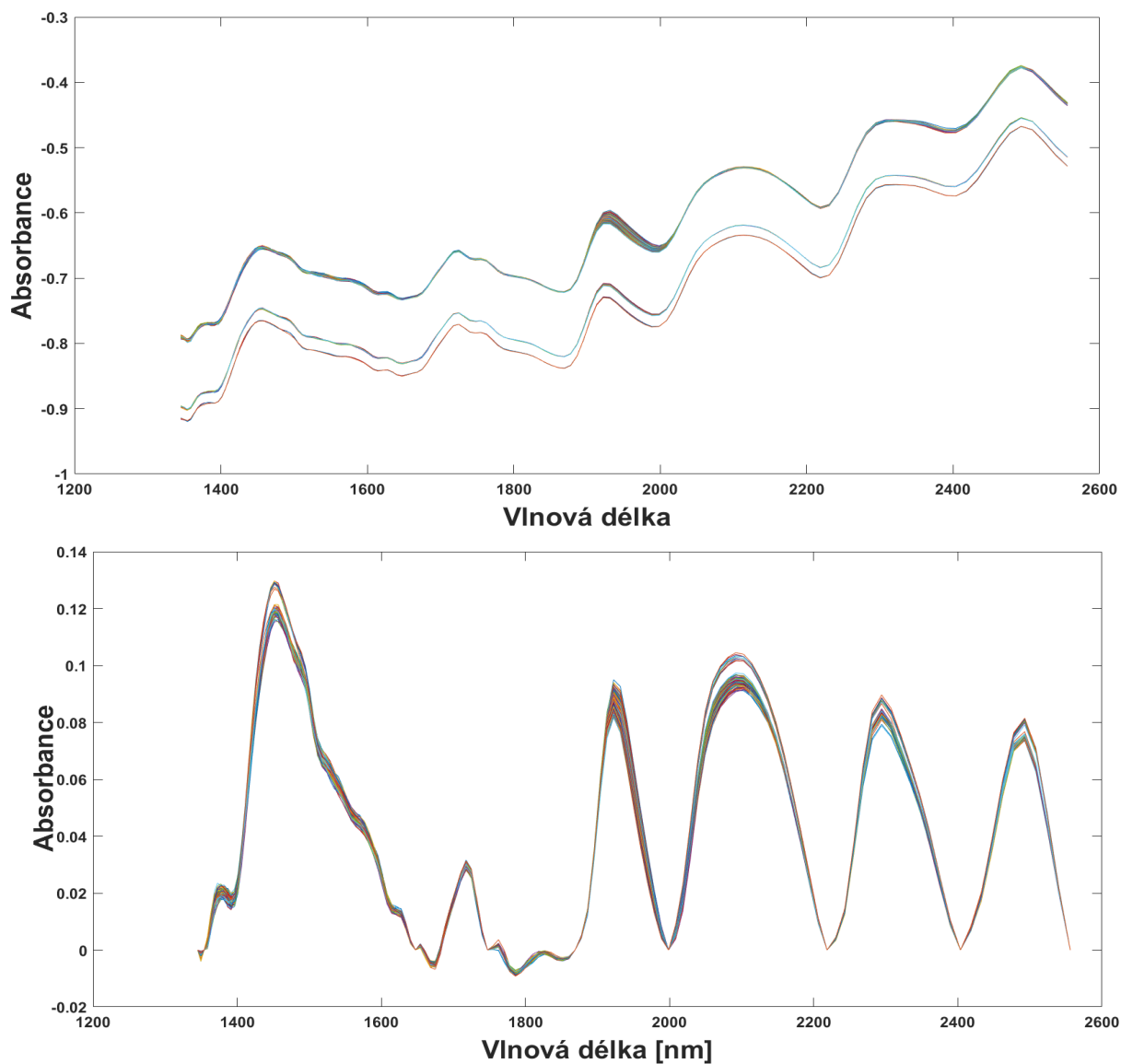
Vzorkovací frekvence přístroje je pevně nastavena, tudíž bylo možné vektor konkrétních vlnových délek uložit pouze jednou pro veškerá měření.

Následovalo předzpracování dat. Jedná se o velmi důležitou část práce s daty před samotnou analýzou. Nejdříve byla započata vizuální kontrolou naměřených dat. K dalšímu postupu předzpracování dat byla v Matlabu vytvořena funkce. Ta měla sloužit k omezení vlivu chyb a odstranění výchozích odchylek, které mohly vzniknout například použitými kyvetami, či nějakým posunem přístroje a tím i spekter. Ovšem předzpracování by mělo být prováděno co možná nejméně, aby nedocházelo k zavádění nežádoucích artefaktů do dat. [4]

V rámci předzpracování byla nejdříve veškerá naměřená spektra u jedné zkoumané látky zprůměrována, abychom získali co nejvěrnější obraz skutečného spektra dané látky. U tohoto zprůměrovaného spektrogramu byla nalezena nejnížší místa mezi peaky. Díky těmto získaným pozicím minim byla provedena lineární korekce na základní linii. To znamená, že byly vždy dva body ohraničující jeden peak využity k získání lineární závislosti mezi nimi. Díky této lineární závislosti jsme již byli schopni odečíst od všech spekter dané látky v konkrétním bodě správnou hodnotu k tomu, abychom získali přesnější obraz velikosti peaku. Ten by měl být mnohem méně ovlivněný posunem způsobeným nekonstantní absorpcí použité kyvety. [4]

### 7.3.3 Zhodnocení využitelnosti získaných spekter

K vyhodnocování získaných dat a jejich rozdílů bylo podle literatury [21, 4] využito hierarchické shlukové analýzy. K výpočtu vzdáleností mezi spektry byl využit Wardův algoritmus s Euklidovskými vzdálenostmi, který vytváří shluky podle nejpodobnějších spekter a dále pak i podle shluků. Následně je vytvořen dendrogram, kdy na ose y je zobrazena Euklidovská vzdálenost mezi shluky. Vykreslení dendrogramů bylo provedeno v Matlabu pomocí implementovaných funkcí. Poté byla vypočítána senzitivita a specifita [21, 4] daného testu, kdy jako pozitivní nález byly považovány vzorky obsahující inkriminovanou látku (kofein, lepek). Senzitivita je schopnost vzorek obsahující inkriminovanou látku zařadit správně mezi pozitivní nálezy. Specifita udává procento správně zařazených vzorků látek do negativního nálezu. Vyhodnocení, zda-li je rozdíl mezi zkoumanými látkami dostatečný, bylo určeno podle zobrazení předzpracovaných spekter vizuálně, vizuálně pomocí dendrogramů a také pomocí senzitivity, specifity a Euklidovské vzdálenosti mezi výslednými 2 shluky.



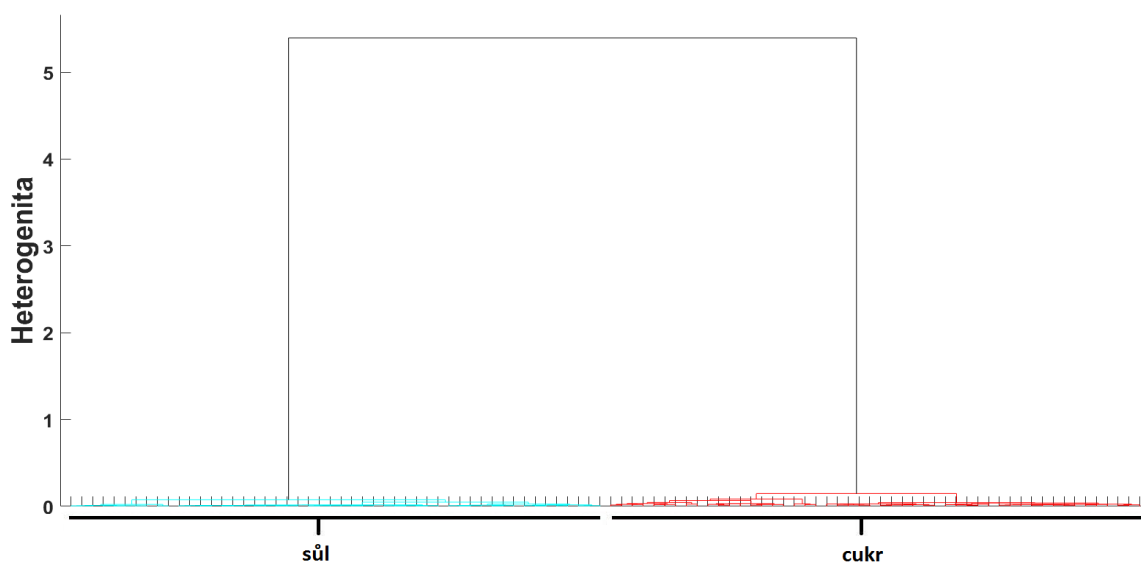
Obr. 7.9: Zobrazená spektra jsou spektra bezkofeinové kávy Brasil Santos. Vrchní spektrogram zobrazuje naměřená data. Spodní spektrogram zobrazuje data po provedení jejich předzpracování.

## 8 Naměřená data a diskuse výsledků

V rámci experimentu bylo navrženo 8 hypotéz, které měly zjistit využitelnost přístroje NeoSpectra při kontrole kvality potravin. Konkrétně byla testována rozlišovací schopnost přístroje v NIR.

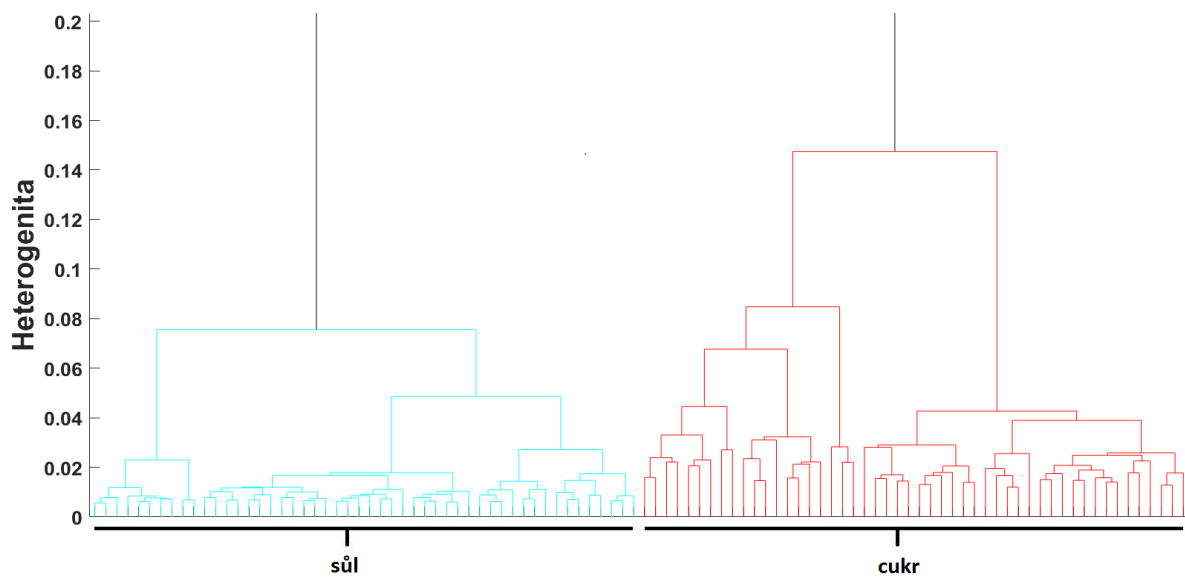
### 8.1 Hypotézy a jejich diskuse

**Dokážeme pomocí přístroje NeoSpectra od sebe odlišit cukr a sůl.**

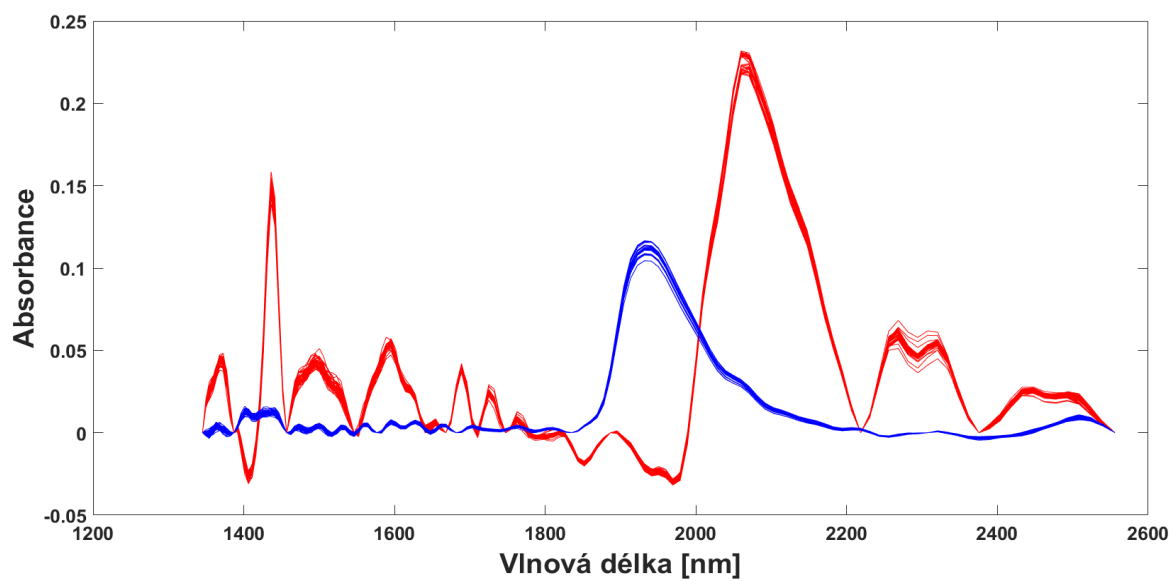


Obr. 8.1: Dendrogram cukru a soli

Při pozorování cukru a soli byly metodou HCA získány 2 shluky, jejichž Euklidovská vzdálenost mezi nimi byla 5,396, samotná spektra nemají žádné společné rysy. Senzitivita i specificita byly 100 %. Vizuálně je mezi spektry dat objeveno velké množství spolu nesouvisejících peaků mezi oběma vzorky. Z tohoto důvodu a také proto, že heterogenita byla 5,396 a žádná z jednotlivých měření nebyla zařazena chybně, můžeme tvrdit, že pomocí přístroje NeoSpectra můžeme rozeznat dvě zrakem obtížně rozlišitelné látky jako je cukr a sůl.

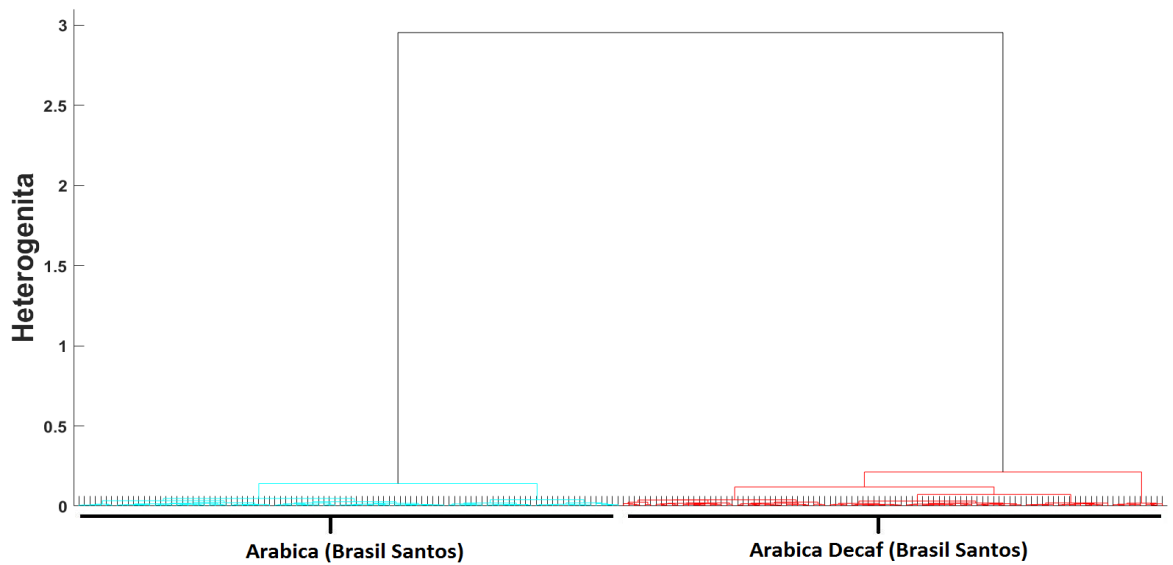


Obr. 8.2: Detail dendrogramu cukru a soli

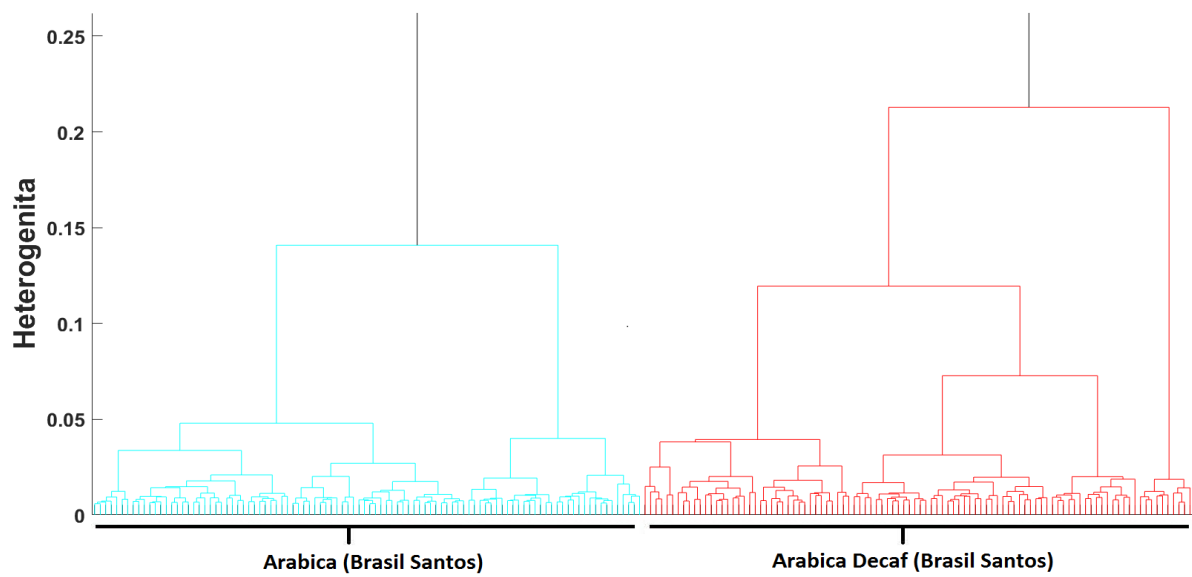


Obr. 8.3: Předzpracovaná spektra cukru a soli  
(červené křivky znázorňují cukr, modré křivky znázorňují sůl)

Dokážeme pomocí přístroje NeoSpectra rozlišit bezkofeinovou a kofeinovou kávu stejného druhu. Kofein byl z kávy odstraněn evropským procesem.

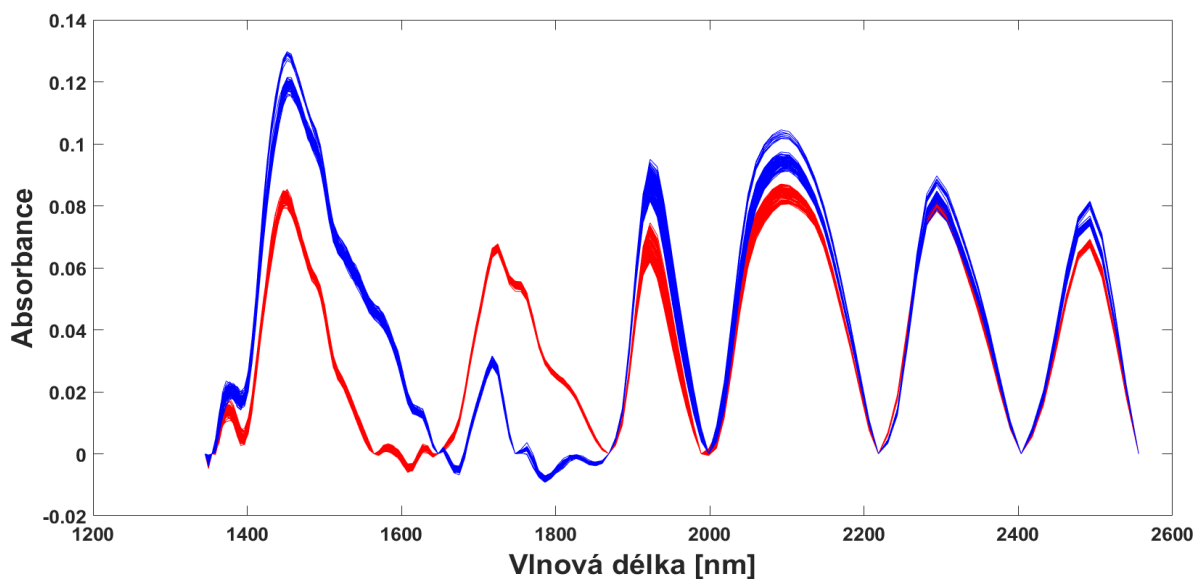


Obr. 8.4: Dendrogram kávy připravené evropským procesem



Obr. 8.5: Detail dendrogramu kávy připravené evropským procesem

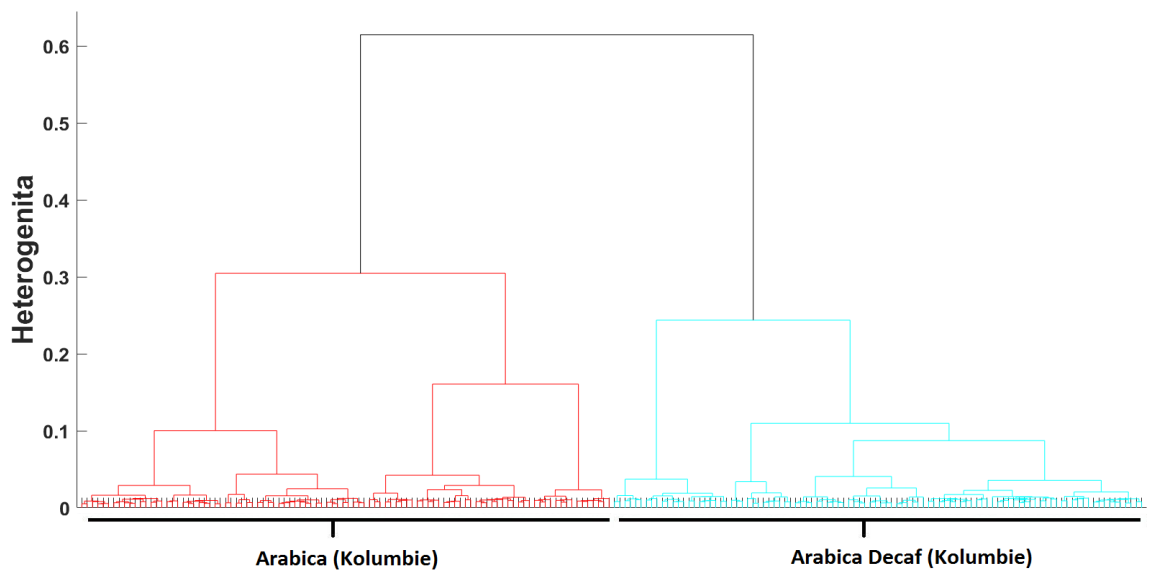
Měřením se snažíme zjistit, jestli přístroj NeoSpectra zjistí přítomnost kofeinu mezi dvěma kávami stejného druhu. Bezkofeinová káva byla vyrobena evropským procesem za použití dichlormethanu. I přesto, že je dichlormethan z kávy odstraněn



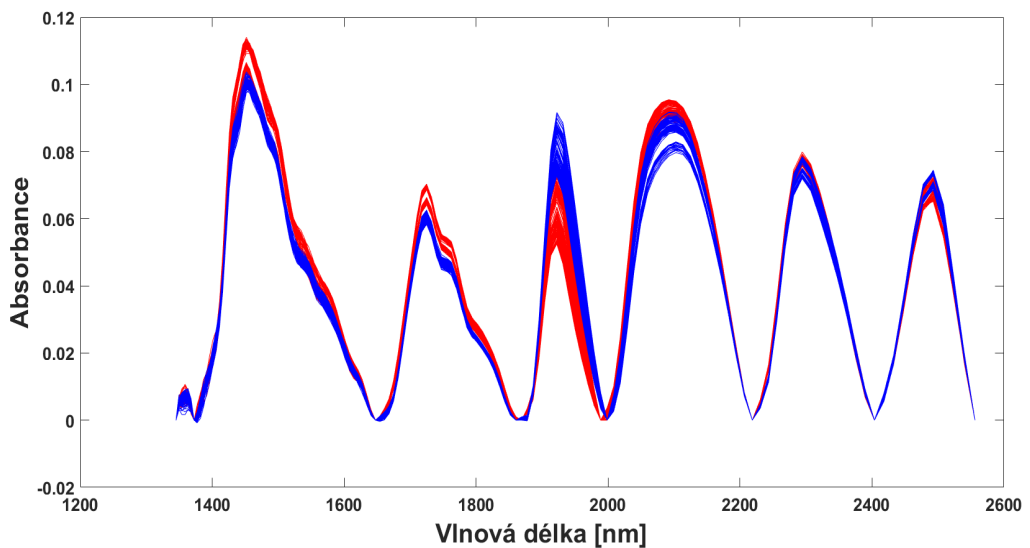
Obr. 8.6: Předzpracovaná spektra kofeinové kávy a kávy bezkofeinové připravené evropským procesem  
(červené křivky znázorňují kofeinovou kávu, modré křivky znázorňují bezkofeinovou kávu)

promýváním po procesu, nějaké stopové množství v kávě zůstane a ovlivní i jeho chuť. Díky tomu bychom mohli sledovat peaky tohoto organického rozpouštědla ve spektru. Pozice peaku dichlormethan jsou popsány v teorii v kapitole 5.1.2. Na vyobrazeném předzpracovaném spektru pozorujeme větší absorbanci u bezkofeinové kávy přibližně na vlnových délkách okolo 1500 nm. Tento peak by mohl být ovlivněn absorbancí rozpouštědla na pozici 1417 nm. Rozdíl vlnových délek mohl vzniknout, pokud přístroj nebyl dokonale kalibrován. Pomocí HCA byly vytvořeny dva clustery, které obsahovaly vždy pouze měření totožné látky. Senzitivita a specificita byly 100 %. Euklidovská vzdálenost mezi shluky byla menší než při vyhodnocování cukru a soli a byla 2,954. I zde ovšem byla pozorována velká rozlišnost a tudíž nevyvracíme hypotézu, že přístroj NeoSpectra rozliší bezkofeinovou kávu vyrobenou evropským procesem a kofeinovou kávu stejného druhu.

Dokážeme pomocí přístroje NeoSpectra rozlišit bezkofeinovou a kofeinovou kávu stejného druhu. Kofein byl z kávy odstraněn Švýcarským procesem.



Obr. 8.7: Dendrogram kávy připravené Švýcarským procesem

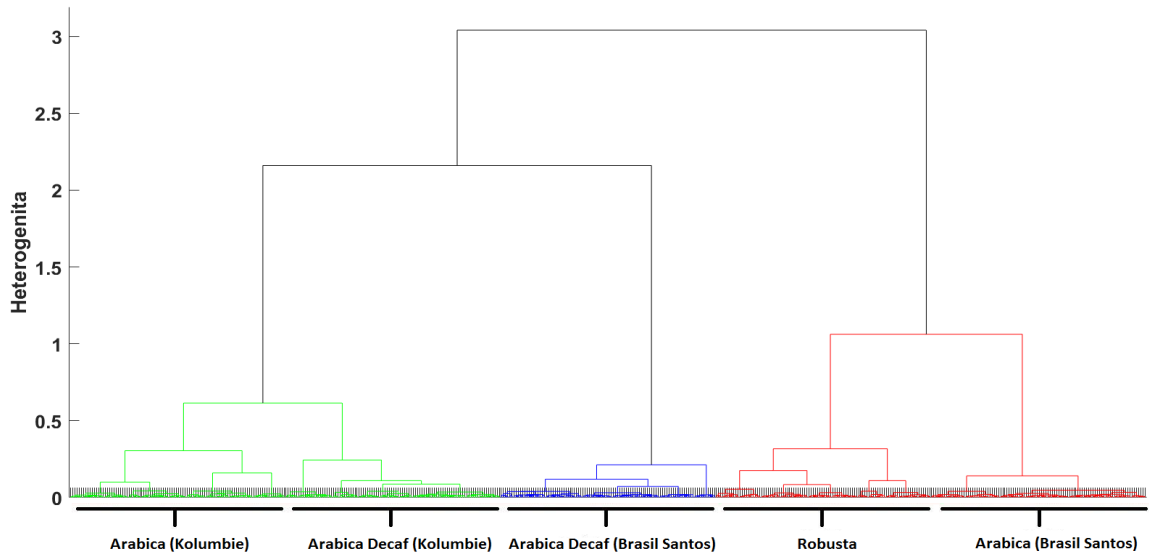


Obr. 8.8: Předzpracovaná spektra kofeinové kávy a kávy bezkofeinové připravené Švýcarským procesem (červené křivky znázorňují kofeinovou kávu, modré křivky znázorňují bezkofeinovou kávu)

Pokud byl přístrojem NeoSpectra měřen rozdíl mezi kávami stejného druhu, přičemž v jednom druhu kávy byl kofein odstraněn Švýcarskou vodní metodou, nebyly

rozdíly již tak velké. Jednotlivá měření byla přiřazena správně do 2 clusterů. Tudíž senzitivita i specificita zde byly 100 %. Ovšem rozdíl mezi 2 hlavními clustery byl velmi malý. Euklidovská vzdálenost je zde pouze 0,615 a také podle spektrogramu předzpracovaných dat obou druhů kávy můžeme zaznamenat, že rozdíl mezi jednotlivými spektry je velmi malý. Při této metodě se využívají pouze látky získané z kávy rozpuštěné ve vodě, která je následně vysušena a charakteristické peaky pro odstraněný kofein se vyskytují při jiných vlnových délkách, než které využívá NeoSpectra. Podle těchto výsledků spektrometr není příliš vhodný pro rozlišování kofeinové kávy a bezkofeinové kávy připravené Švýcarským vodním procesem.

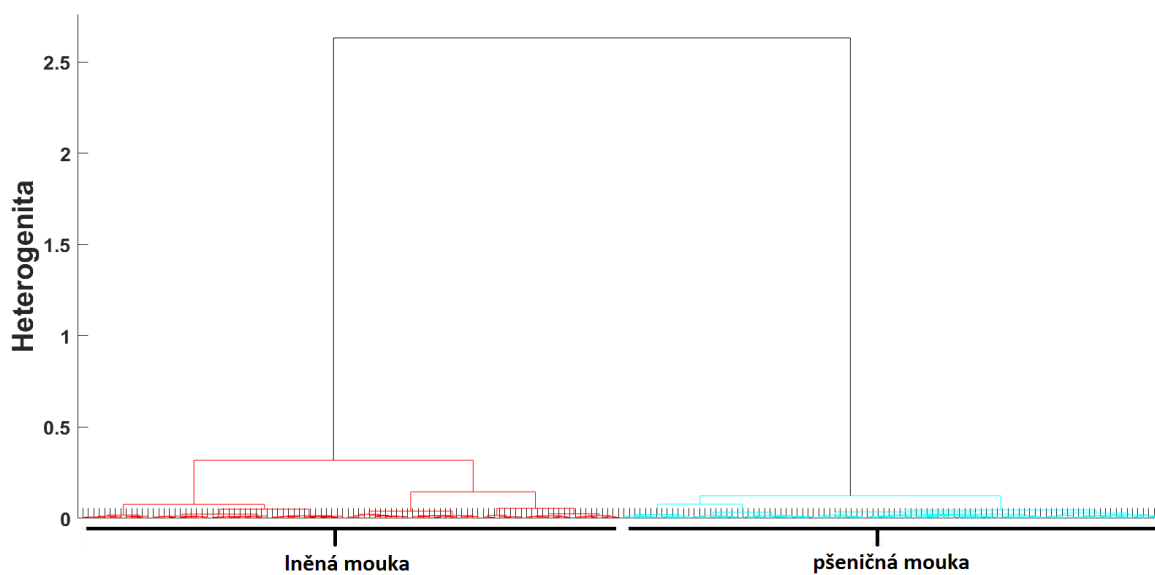
**Dokážeme pomocí přístroje NeoSpectra z několika vzorků káv rozlišit kávy bezkofeinové a kofeinové, nebereme-li ohled na druh kávy, ani na jejich zpracování včetně odstranění kofeinu a doby pražení.**



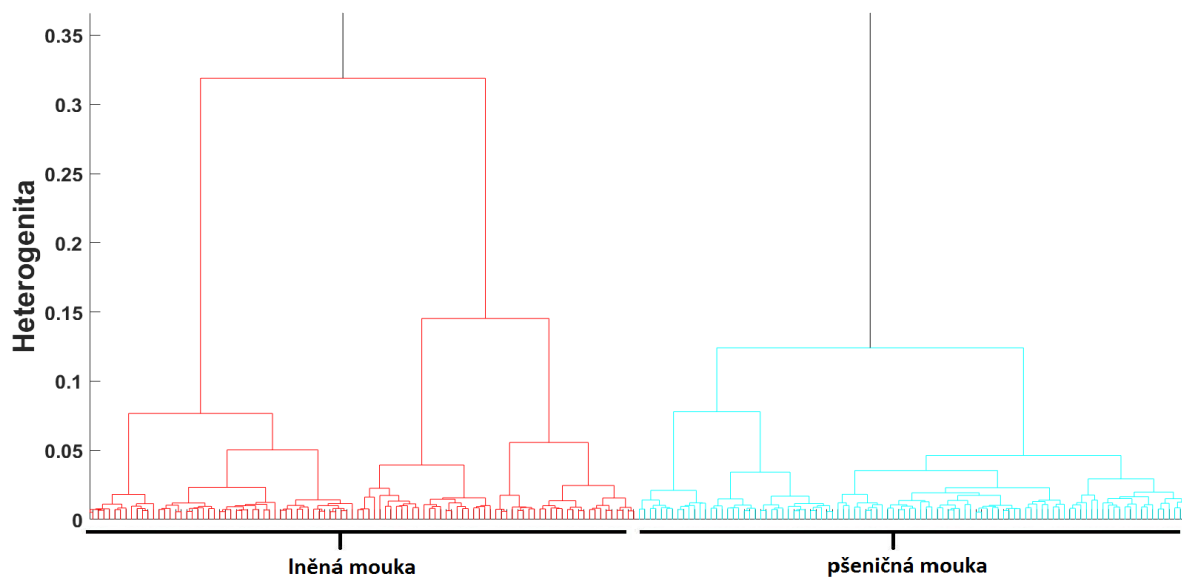
Obr. 8.9: Dendrogram 5 druhů káv

K testu hypotézy jsme použili 3 druhy kofeinové kávy a 2 druhy kávy bez kofeinu, kdy jeden vzorek byl připraven evropským procesem a druhý Švýcarským vodním procesem. Kofeinové kávy Robusta a Arabica Brasil Santos byly zařazeny do jednoho clusteru. Do druhého clusteru byly zařazeny bezkofeinové kávy a káva kofeinová Arabica Kolumbie, která byla přiřazena do shluku k bezkofeinové kávě stejného druhu. Senzitivita testu je zde 66,67 % a specificita 100 %. To znamená, že žádná bezkofeinová káva nebyla zařazena chybně jako kofein obsahující káva, ovšem 1/3 kofeinové kávy byla zařazena jako káva bezkofeinová. Euklidovská vzdálenost mezi clustery kofeinové a bezkofeinové kávy byla 3,04. Z testu této hypotézy jsme zjistili, že přístroj NeoSpectra a zvolená analýza nejsou vhodné pro rozpoznávání bezkofeinové kávy připravené Švýcarskou vodní metodou. Ovšem vzdálenos mezi oběma hlavními shluky byla poměrně velká 3,04. Tudíž k potvrzení či vyvrácení této hypotézy by bylo zapotřebí proměřit více vzorků káv připravených různými metodami.

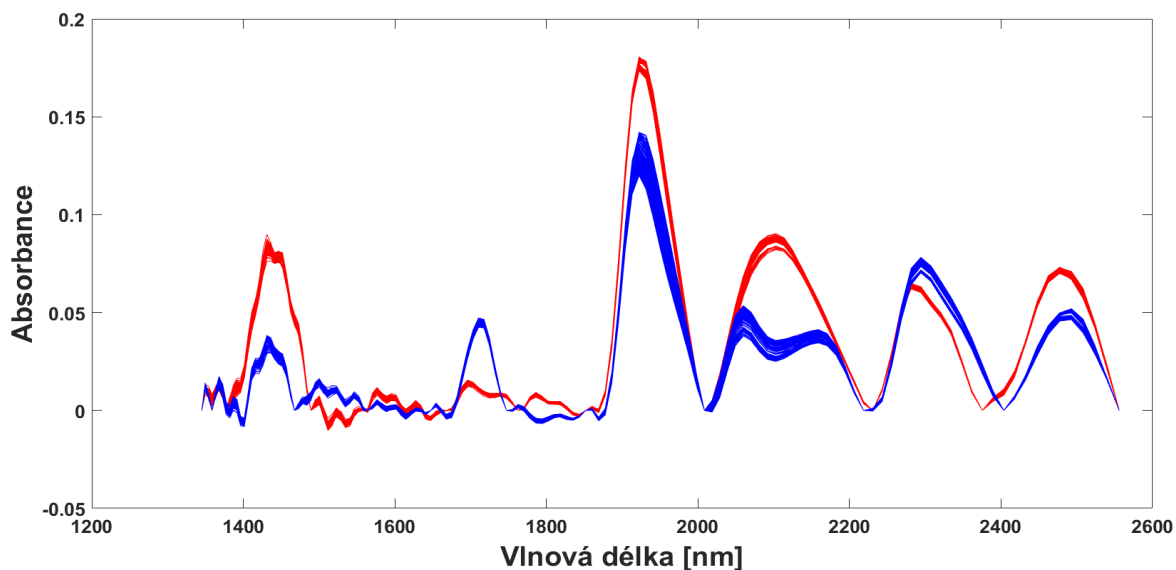
Lze určit, která z měřených mouk obsahuje lepek, pokud měříme obyčejnou mouku a mouky, které jsou náhradami lepkových mouk pomocí přístroje Neo-Spectra.



Obr. 8.10: Dendrogram pšeničné a lněné mouky

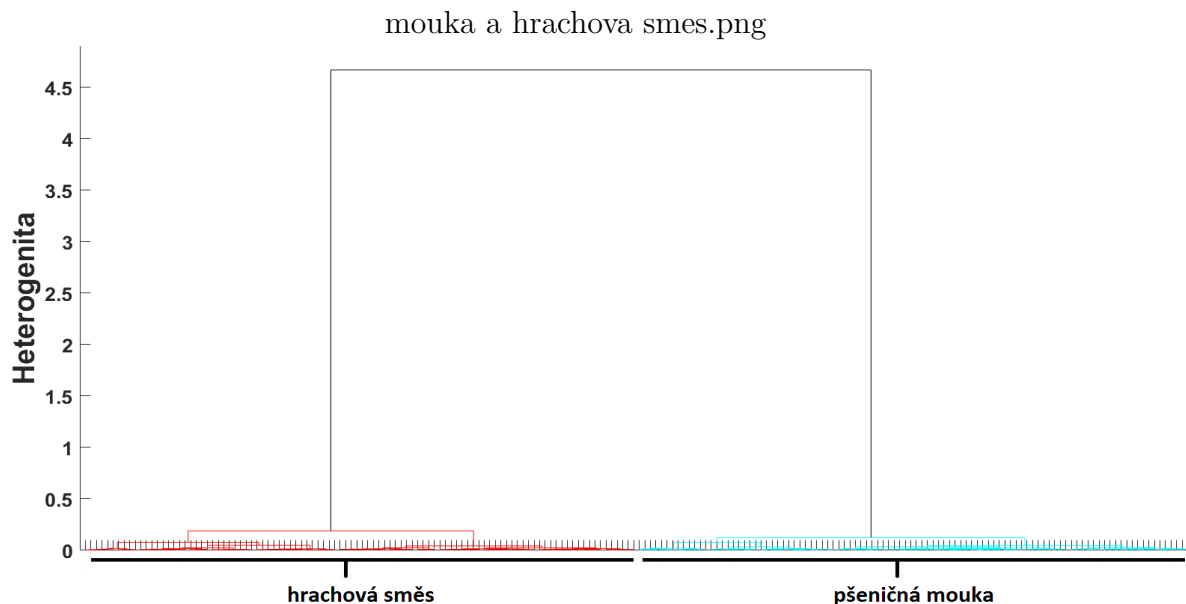


Obr. 8.11: Detail dendrogramu pšeničné a lněné mouky



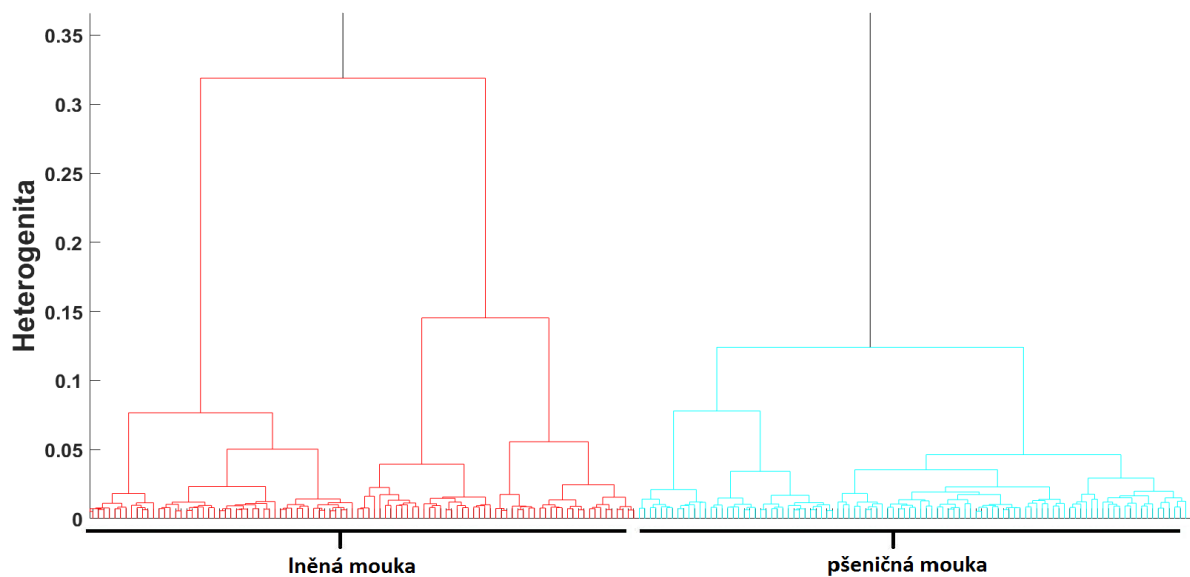
Obr. 8.12: Předzpracovaná spektra pšeničné a lněné mouky (červené křivky znázorňují pšeničnou mouku, modré křivky znázorňují lněnou mouku)

Při porovnání spekter lněné mouky a pšeničné mouky byl pozorován rozdíl už při vizualizaci předzpracovaných dat. Všechna měření byla určena do správných clusterů, tudíž senzitivita i specificita byly 100 %. Euklidovská vzdálenost byla 2,633.

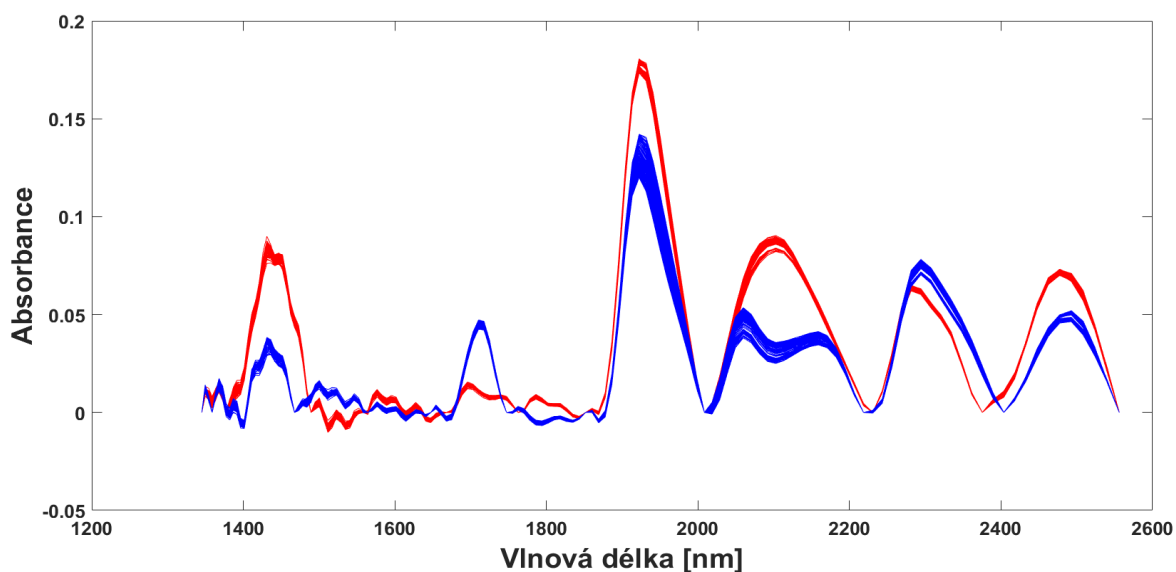


Obr. 8.13: Dendrogram pšeničné mouky a hrachové směsy

Následně při porovnání spekter totožné pšeničné mouky a Hrašky (hrachová náhrada mouky na zahušťování pokrmů) bylo opět dosaženo zahrnutí všech měření



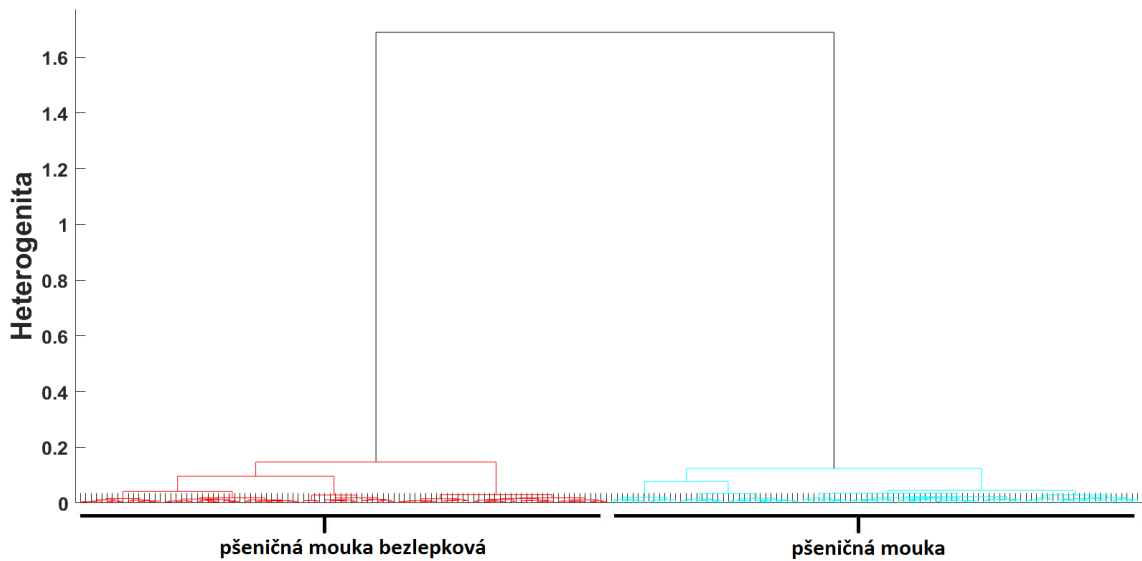
Obr. 8.14: Detail dendrogramu pšeničné mouky a hrachové směsi



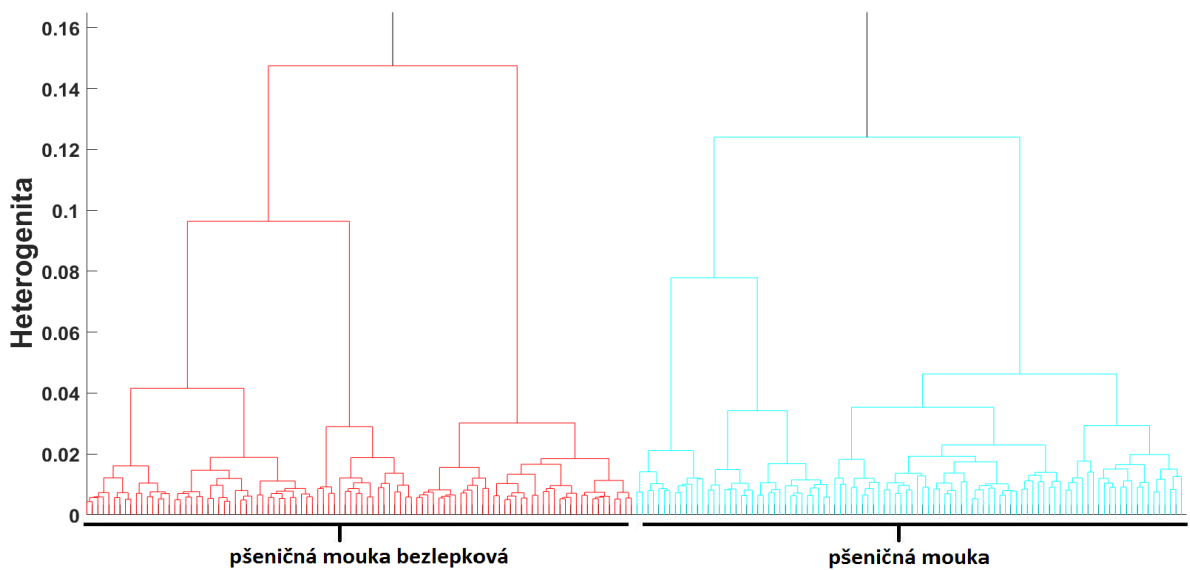
Obr. 8.15: Předzpracovaná spektra pšeničné mouky a hrachové směsi (červené křivky znázorňují pšeničnou mouku, modré křivky znázorňují hrachovou směs)

do správných clusterů. Senzitivita i specificita byly 100 %. Euklidovská vzdálenost byla téměř dvojnásobná oproti vzdálenosti spekter mezi lněnou moukou a pšeničnou moukou a její hodnota byla 4,668. To může být způsobeno tím, že Hraška obsahuje více složek, které rozdíly spekter způsobují. U obou experimentů bylo dosaženo dobrého rozlišení zkoumaných látek. Spektrometr můžeme použít k rozlišování těchto látek.

Můžeme pomocí přístroje NeoSpectra určit, jestli mouka obsahuje lepek, pokud měříme běžnou pšeničnou mouku a pšeničnou mouku, která byla zbavena lepku.

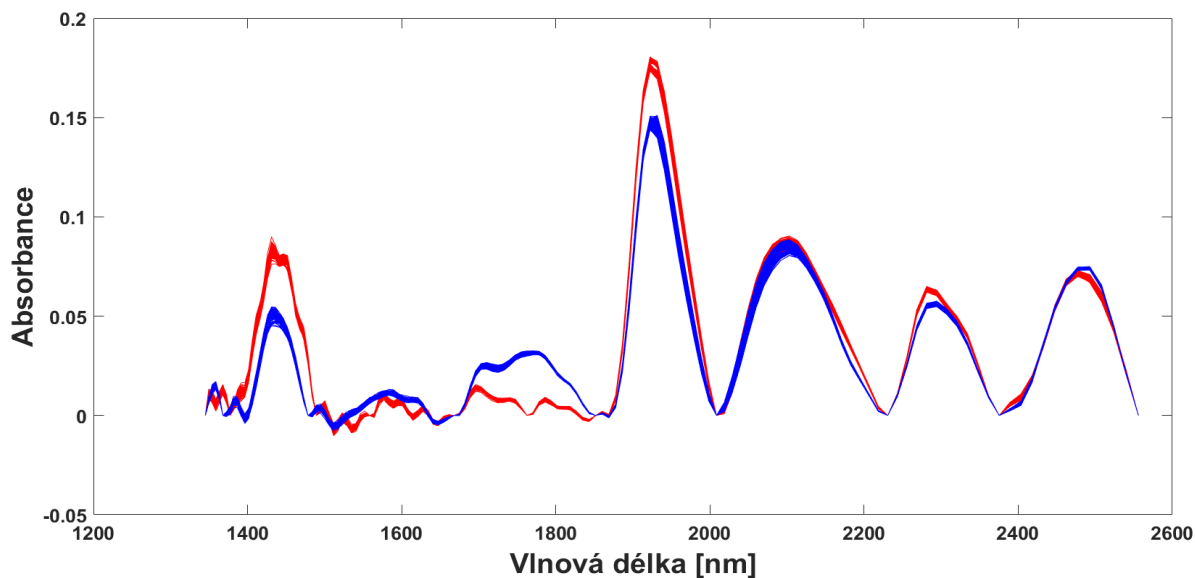


Obr. 8.16: Dendrogram lepkové a bezlepkové pšeničné mouky



Obr. 8.17: Detail dendrogramu lepkové a bezlepkové pšeničné mouky

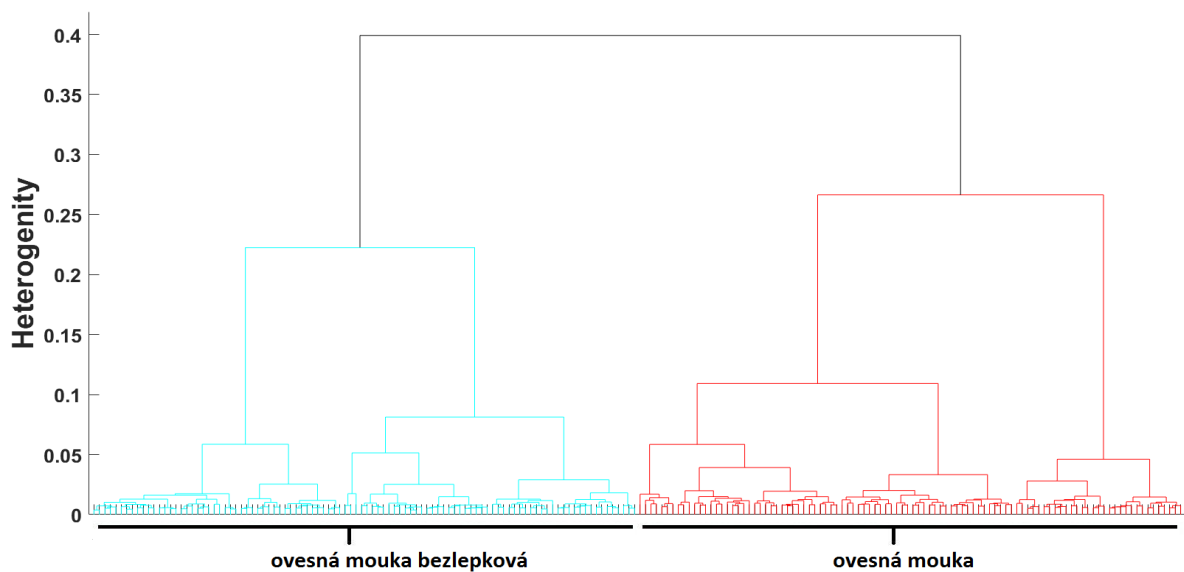
K potvrzení této hypotézy byla provedena měření pšeničné mouky a pšeničné mouky zbavené lepku. Opět i zde byla všechna měření zařazena do správných clusterů, tedy senzitivita i specificita testu byly 100 % a Euklidovská vzdálenost byla 1,69.



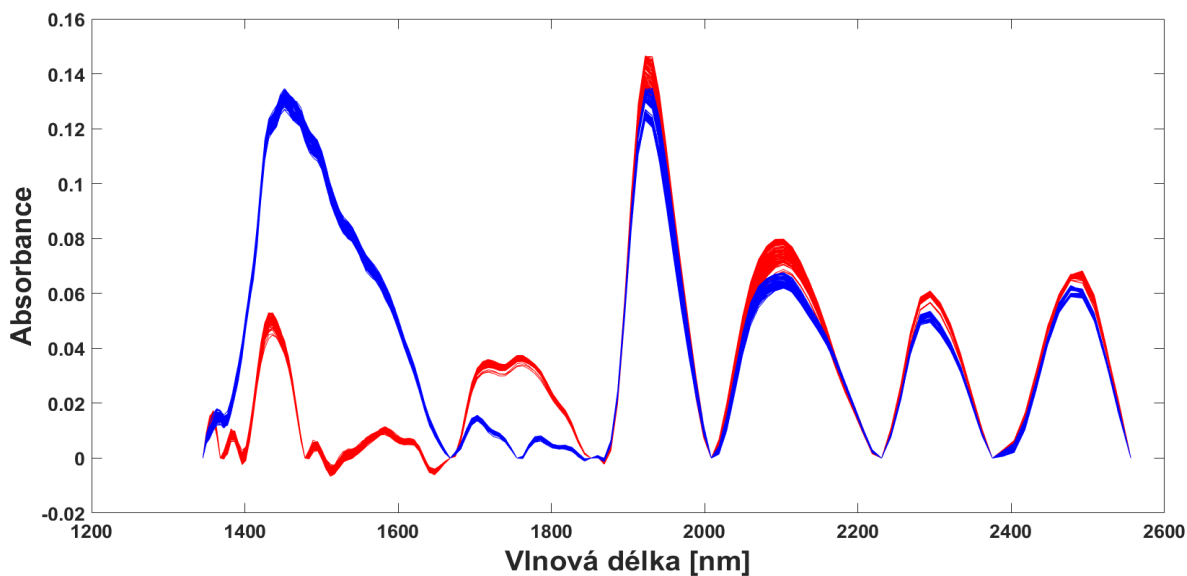
Obr. 8.18: Předzpracovaná spektra lepkové a bezlepkové pšeničné mouky (červené křivky znázorňují lepkovou mouku, modré křivky znázorňují bezlepkovou mouku)

Na vykreslených datech byl pozorován drobný rozdíl. Ten mohl být způsoben obsahem látek, které v bezlepkové mouce nahrazují lepek jako například jáhlová mouka, či zahušťovadlo nebo škrob viz. kapitola 5.2.3. K posouzení této hypotézy by bylo zapotřebí proměřit více druhů pšeničných mouk zbavených lepku.

Můžeme pomocí přístroje NeoSpectra určit, jestli mouka obsahuje lepek, pokud měříme běžnou ovesnou mouku a ovesnou mouku, která byla zbavena lepku.



Obr. 8.19: Dendrogram lepkové a bezlepkové ovesné mouky



Obr. 8.20: Předzpracovaná spektra lepkové a bezlepkové ovesné mouky (červené křivky znázorňují lepkovou mouku, modré křivky znázorňují bezlepkovou mouku)

Při zkoumání této hypotézy bylo opět dosaženo správného zařazení do 2 clusterů a senzitivita i specificita zde byly 100 %. Ale Euklidovská vzdálenost mezi clusterů

byla velmi malá a to 0,4. Dle teorie popsané v kapitole 5.2.2 je ovesná mouka u některých lehčích forem lepkových alergií snášena. Z toho důvodu je možné, že zde není pozorován tak velký rozdíl mezi lepkovou a bezlepkovou ovesnou moukou.



# Závěr

V bakalářské práci bylo teoreticky zpracováno téma optických laboratorních metod se zaměřením na IR spektrum. V literatuře bylo zjištěno, jaké vlastnosti by měly mít komponenty měřicí soupravy. To bylo také z části experimentálně prověřeno a měřicí souprava byla vytvořena.

Následně bylo nutné zvolit proměřované látky, které měly být přístrojem rozeznávány. Základní experiment proběhl na vzorcích dvou zcela odlišných látek, které jsou vizuálně podobné a to cukru a soli, kde došlo k rozeznání látek.

První větší skupinou zkoumaných látek byla káva u které se zkoumalo, zda-li jednotlivé vzorky kofein obsahují, či nikoliv. Zde bylo zjištěno, že znatelný rozdíl mezi naměřenými spektry je mezi kofeinovou kávou a bezkofeinovou kávou stejného druhu, pokud byl kofein odstraněn evropským procesem. U vzorku, kde byl kofein odstraněn Švýcarským procesem, nebyl rozdíl mezi spektry vzorků káv dostatečný.

Do další skupiny zkoumaných látek patřily mouky a jejich bezlepkové náhrady. Mělo být zjištěno, jestli je možné rozeznat, která z mouk lepek obsahuje a která jej neobsahuje. Byly proměřeny mouky pšeničné, ovesné a další alternativy bezlepkových mouk. Rozlišovací schopnost u mouk, které byly zcela zbaveny lepku byla nižší než u vzorků kávy bez kofeinu (evropský proces) a klasické kávy. Ovesná mouka měla menší heterogenitu než mouka pšeničná. Nedošlo u ní k rozeznání mezi lepkovou a bezlepkovou variantou. U mouky pšeničné je zapotřebí k rozhodnutí o použitelnosti spektrometru k rozeznávání lepkových a bezlepkových mouk provést další měření. Další náhrady lepkových mouk, jako lněná mouka a Hraška, byly spektrometrem rozeznatelné od lepkové pšeničné mouky.

V této práci bylo provedeno základní měření a k přesnějším výsledkům by bylo zapotřebí zaměřit se pouze na menší studovanou oblast a provést testem větší množství vzorků. V další práci se spektrometrem by se tedy dala podrobněji prostudovat pouze jedna ze zkoumaných oblastí (například určení obsahu kofeinu při použití Švýcarské vodní metody...). Případně by bylo vhodné vytvořit další testovací postup a provést testy na větším počtu vzorků, aby analýzy měly větší vypovídající schopnost, a nový postup a postup použitý v této práci porovnat.

## Literatura

- [1] *Bezkofeinová káva a její výroba*. In: MOTMOT [online]. 2018-01-17 [cit. 2020-05-15]. Dostupné z: <https://motmot.cz/zpracovani-kavy/decaf/>.
- [2] CORREIA, Radigya M., et al. *Portable near infrared spectroscopy applied to quality control of Brazilian coffee*. *Talanta*, 2018, 176: 59-68. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.08.009>
- [3] CIBIČEK, Norbert a Jan VACEK. *Principy a využití vybraných analytických metod v laboratorní medicíně*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2014. ISBN 978-80-244-3951-8.
- [4] DOGAN MOLLAOGLU, Ayca, Ipek OZYURT a Feride SEVERCAN. *Applications of Infrared Spectroscopy and Microscopy in Diagnosis of Obesity*. EL-AZAZY, Marwa, ed. *Infrared Spectroscopy - Principles, Advances, and Applications* [online]. Rijeka: IntechOpen, 2019, 2019-3-6. DOI: 10.5772/intechopen.81216. ISBN 978-1-78984-968-4.
- [5] *Identifikace neznámé organické látky pomocí infračervené spektrometrie* [online]. UPOL, 5 s. [cit. 2019-12-30]. Dostupné z: <http://ach.upol.cz/user-files/files/ir-identifikace-organicke-latky.pdf>.
- [6] *Infračervená spektrometrie* [online]. Praha: VŠCHT [cit. 2019-12-22]. Dostupné z: [https://web.vscht.cz/~koplikr/IR\\_4.pdf](https://web.vscht.cz/~koplikr/IR_4.pdf).
- [7] HALLIDAY, David, Robert RESNICK a Jearl WALKER. *Fyzika: vysokoškolská učebnice obecné fyziky*. Brno: VUTIUM, 2000. Překlady vysokoškolských učebnic. ISBN 80-214-1868-0.
- [8] KANIA, Patrik. *INFRAČERVENÁ SPEKTROMETRIE*. [online]. Praha: VŠCHT Praha [cit. 2019-11-29]. Dostupné z URL: <https://www.vscht.cz/files/uzel/0005766/Infračervená+spektrometrie.pdf?redirected>.
- [9] *Jak se vyrábí káva bez kofeinu a co to znamená*. In: Kavovnik.cz - Velkoobchod s kávou [online]. [cit. 2020-06-01]. Dostupné z: <https://www.kavovnik.cz/clanky/jak-se-vyrabi-kava-bez-kofeinu.-a-co-to-znamená/>.

- [10] *Kofein (Coffeinum)*. VITAinfo [online]. [cit. 2020-06-01]. Dostupné z: <https://www.nutrion.cz/info/detail.php?idzb=119-kofein-coffeinum>.
- [11] KOPLÍK, Richard. *BILOVINY (CEREÁLIE) A VÝROBKY Z NICH. VŠCHT.* Dostupné také z: [https://web.vscht.cz/~koplikr/2\\_Cereálie.pdf](https://web.vscht.cz/~koplikr/2_Cereálie.pdf).
- [12] KUČERA, Jiří. *Shluková analýza* [online]. In: . [cit. 2020-06-01]. Dostupné z: [https://is.muni.cz/th/172767/fi\\_b/5739129/web/web/hiermet.html#Shlukov%C3%A1\\_anal%C3%BDza](https://is.muni.cz/th/172767/fi_b/5739129/web/web/hiermet.html#Shlukov%C3%A1_anal%C3%BDza).
- [13] MINISTERSTVO ZDRAVOTNICTVÍ ČR. *Český lékopis 2009 – Doplněk 2014*. Grada Publishing, a.s., 2014, 1000 s. ISBN 8024751933, 9788024751931.
- [14] MORNSTEIN, Vojtěch. *Lékařská fyzika a biofyzika*. Brno: Masarykova univerzita, 2018. ISBN 978-80-210-8984-6.
- [15] NAVRÁTIL, Leoš a Jozef ROSINA *Medicínská biofyzika*. Praha: Grada, 2005. ISBN 80-247-1152-4.
- [16] *NeoSpectra* [online]. [cit. 2019-12-15]. Dostupné z: <https://www.neospectra.com/>.
- [17] *NeoSpectra SWS62231 Datasheet* [online]. 5 s. [cit. 2019-12-20]. Dostupné z: <https://662292468.r.worldcdn.net/wp-content/uploads/2019/09/NeoSpectra-SWS62231-Datasheet.v2-2.5-22-19.pdf>.
- [18] O'Callaghan, D. J., O'Donnell, C. P., & Payne, F. A. *On-line sensing techniques for coagulum setting in renneted milks*. Journal of Food Engineering 2000, 43, 155–165.
- [19] Pederson, C.G., Friedrich, D.M., Hsiung, C., von Gunten, M., O'Brien, N.A., Ramaker, H.-J., van Sprang, E., Dreischor, M. *Pocket-Size Near-Infrared Spectrometer for Narcotic Materials Identification*. Proc. SPIE 2014; 9101: 91010O.
- [20] PÉM, Martin. *Voňavé tajemství kávy*. In: ČESKÁ CHEMIE [online]. [cit. 2020-05-10]. Dostupné z: <http://www.ceskachemie.cz/svet-chemie/popularni-chemie/zajimavosti-ze-sveta-chemie/vonave-tajemstvi-kavy#.XtUH6TozZPZ>.
- [21] SEVERCAN, Feride, et al. *FT-IR spectroscopy in diagnosis of diabetes in rat animal model*. Journal of biophotonics, 2010, 3.8-9: 621-631.

- [22] SINGH, Bal Ram, et al. *Determination of caffeine content in coffee using Fourier transform infra-red spectroscopy in combination with attenuated total reflectance technique: a bioanalytical chemistry experiment for biochemists*. Biochemical Education, 1998, 26.3: 243-247. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0307-4412\(98\)00078-8](https://doi.org/10.1016/S0307-4412(98)00078-8)
- [23] SKŘIVAN P., SLUKOVÁ M., RYSOVÁ J., 2018. *Současný stav ve výrobě bezpečných potravin*. Výzkumný ústav potravinářský Praha - potraviny-bezlepku.cz, Praha: Ústav sacharidů a cereálií VŠCHT [cit. 2020-05-20]. Dostupné z:  
<[http://www.potravinybezlepku.cz/Upload/1/bezlepkove\\_potraviny\\_skr\\_ivan-slukova-rysova\\_.pdf](http://www.potravinybezlepku.cz/Upload/1/bezlepkove_potraviny_skr_ivan-slukova-rysova_.pdf)>.
- [24] SZYMANSKA-CHARGOT, Monika a Artur ZDUNEK. *Use of FT-IR Spectra and PCA to the Bulk Characterization of Cell Wall Residues of Fruits and Vegetables Along a Fraction Process*. Food Biophysics. 2013, 8(1), 29-42. DOI: 10.1007/s11483-012-9279-7. ISSN 1557-1858. Dostupné také z:  
<<http://link.springer.com/10.1007/s11483-012-9279-7>>.
- [25] WOODCOCK, T., Fagan, C.C., O'Donnell C.P. et al. *Food Bioprocess Technol* 2008 1: 117. DOI: <<https://doi.org/10.1007/s11947-007-0033-y>>.
- [26] ZÁRUBA, Kamil. *Analytická chemie*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2016. ISBN 978-80-7080-951-8.

# Seznam symbolů a zkratek

<b>A</b>	absorbance
$\alpha$	součinitel absorbance
<b>ATR</b>	technika zeslabené totální reflektance
$\epsilon$	molární absorpční koeficient
<b>FIR</b>	vzdálené infračervené záření
<b>FTIR</b>	infračervený spektrometr s Fourierovou transformací
<b>h</b>	Planckova konstanta
<b>HCA</b>	hierarchická shluková analýza
<b>HPLC</b>	vysokoučinná kapalinová chromatografie
<b>IR</b>	infračervené záření
$\lambda$	vlnová délka
<b>MCT</b>	fotovodivostní detektor
<b>MEMS</b>	Mikroelektromechanické systémy
<b>NIR</b>	střední infračervené záření
<b>PAT</b>	procesy analytických technologií
<b>PC</b>	sada hlavních komponent
<b>PCA</b>	analýza hlavních komponent
<b>S</b>	Poyntingův vektor
<b>T</b>	transmitance
<b>UV záření</b>	ultrafialové záření
<b>UV oblast</b>	ultrafialová oblast
<b>VIS</b>	viditelná oblast

# Seznam příloh

<b>A</b>	<b>Obsah elektronické přílohy</b>	<b>63</b>
A.1	Soubory s daty . . . . .	63
A.2	Matlab skripty . . . . .	64

# A Obsah elektronické přílohy

Příložený soubor obsahuje 3 soubory s daty a to namerena\_data, data\_nacitani\_matlab a predzpracovana\_data. Dále také obsahuje 3 skripty v Matlabu, které byly použity při práci s daty a soubor vlnova\_delka.mat, který obsahuje vektor vlnových délek používaný k načtení do Matlabu k předzpracování dat.

## A.1 Soubory s daty

Tab. A.1: Označení vzorků ve všech příložených souborech

cukr	vzorek cukru
sul	vzorek soli
kava1	vzorek kávy Robusta
kava2	vzorek kávy Arabica Brasil Santos
kava3	vzorek kávy Arabica Brasil Santos, bezkofeinová připravená evropským procesem
kava4	vzorek kávy Arabica Kolumbie
kava5	vzorek kávy Arabica Kolumbie, bezkofeinová připravená Švýcarským vodním procesem
mouka1	vzorek pšeničné mouky
mouka2	vzorek lněné mouky, bezlepková
mouka3	vzorek hrachové směsi Hraška, bezlepková
mouka4	vzorek ovesné mouky, bezlepková
mouka5	vzorek ovesné mouky
mouka6	vzorek pšeničné mouky, bezlepková
mouka7	vzorek chlebové směsi, bezlepková

### **namerena\_data**

Soubor obsahuje data ve formátu .SPECTRUM. Tato data byla uložena po měření vzorků v softwaru SpectroMOST\_Micro\_1.0.

### **data\_nacitani\_matlab**

Soubor obsahuje naměřená data, která byla pomocí Matlabu ve skriptu Import upravena do maticového tvaru a jsou připravena pro další zpracování.

## **predzpracovana\_data**

Do tohoto souboru byla uložena předzpracovaná data, která se využívala k výsledné analýze a vytváření dendrogramů.

## **A.2 Matlab skripty**

### **Import**

Tento skript slouží k převedení naměřených dat z formátu .SPECTRUM do matice .mat, se kterou už lze dále pracovat v Matlabu.

### **Predzpracovani**

Skript Predzpracovani slouží k předzpracování dat, která lze následně analyzovat. Vstupem jsou naměřená data, upravená pomocí skriptu Import.

### **Analyza**

Tento skript slouží k analýze dat. Jsou zde funkce k vypočítání a vykreslení dendrogramů. Vkládáme do vstupní matice veškerá data, která chceme spolu analyzovat.