

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta  
Katedra analytické chemie

**Infračervená a Ramanova spektroskopie v analýze  
biologicky aktivních látek v potravinách**

DISERTAČNÍ PRÁCE

Autor práce:	Mgr. Jana Prešerová
Studijní obor:	Analytická chemie
Školitel:	Doc. RNDr. Petr Barták, Ph.D.
Konzultanti:	Ing. David Milde, Ph.D. RNDr. Václav Ranc, Ph.D.

**Olomouc 2014**

## SOUHRN

Disertační práce se zabývá analýzou biologicky aktivních látek ve vybraných potravinách pomocí metod infračervené a Ramanovy spektroskopie. Cílem této práce bylo uplatnění těchto metod v kontrole kvality.

Metody infračervené a Ramanovy spektroskopie jsou hojně používané v potravinářském průmyslu. Mezi přední výhody těchto metod patří nedestruktivnost vůči vzorku, rychlost analýzy a použitelnost pro různé typy vzorků v pevném, kapalném i plynném skupenství. Slouží ke kontrole surovin, výrobních procesů a hotových výrobků. V potravinářském průmyslu se používají zejména ke stanovení a identifikaci hlavních a vedlejších složek potravin, k detekci pančování a kontaminace potravin a dále k charakterizaci, prokázání pravosti nebo klasifikaci potravin. Chemometrické zpracování naměřených spekter usnadňuje vyhodnocení výsledků analýz komplexních systémů, mezi něž se potraviny bezesporu řadí. Techniky vícerozměrné kalibrace, které jsou pro infračervená a Ramanova spektra nutností, či diskriminační analýzy se používají ke kvantitativní analýze složitých směsí anebo ke klasifikaci vzorků.

Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací byla využita pro kontrolu kvality a pravosti sýrů typu Tvarůžek a Romadúr. Tato metoda byla založena na měření infračervených spekter plynné fáze jednotlivých druhů zrajících sýrů po jejich kontrolovaném zahřívání. Kvalitativní vyhodnocení infračervených spekter bylo provedeno pomocí diskriminační analýzy, pomocí které se podařilo rozdělit jednotlivé druhy zrajících sýrů. Tato rychlá a relativně levná metoda by mohla být použita ke kontrole pravosti vybraných typů sýrů.

Pomocí infračervené a Ramanovy spektroskopie byly studovány biogenní aminy v uzených a neuzených tvrdých sýrech vyráběných z různých druhů mléka. Pomocí infračervené spektroskopie byla získána spektra extraktů z jednotlivých tvrdých sýrů technikou zeslabeného úplného odrazu (ATR). Ramanovou spektroskopií byla měřena spektra lyofilizovaných tvrdých sýrů. Využitím diskriminační analýzy, se podařilo charakterizovat jednotlivé druhy tvrdých sýrů podle jejich konečné úpravy a podle mléka použitého k jejich výrobě.

Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací byla použita k analýze červeného, růžového a bílého vína, které bylo odebíráno v různých technologických fázích výroby. Tato metoda byla založena na měření vzorků vín pomocí odrazové techniky ATR. U jednotlivých vzorků vín byl sledován obsah celkových fenolických látek (TPC) a celkové antioxidační aktivity (TAA), jejichž stanovení bylo provedeno pomocí vícerozměrné statistické metody částečných nejmenších čtverců (PLS). Tyto parametry vín (TPC, TAA) lze využít pro sledování změn v průběhu výrobního procesu, což může být přínosné pro výslednou kvalitu. Dále byla provedena charakterizace vzorků vín podle výrobního procesu pomocí diskriminační analýzy. Toto kvalitativní vyhodnocení by mohlo být užitečné pro kontrolu výrobního procesu.

## SUMMARY

Presented dissertation thesis deals with analysis of biological active compounds in selected foodstuffs using infrared and Raman spectroscopies. The application of these techniques for quality control was the main aim of this thesis.

Infrared and Raman spectroscopies are widely used in food industry. Nondestructiveness, speed of analysis and possibility to analyse different types of samples in solid, liquid, or gaseous state belong to the main advantages of these techniques, which are commonly used for control of raw materials, final products and process control. These spectroscopic techniques are used in food industry for the determination and identification of major and minor constituents, for the detection of adulteration and contamination, and also for characterization, authentication and classification of foods. Statistical processing of measured spectra facilitates the evaluation of results of analysis of complex systems, among which foodstuffs undoubtedly belong. Techniques of multivariate calibration, which are essential for evaluation of infrared and Raman spectra, or discriminant analysis are used for quantitative analysis of complex mixtures or for samples classification.

Fourier transform infrared spectroscopy was applied for quality control and authentication of cheeses like Tvarůžek and Romadúr. This technique was based on the measurement of infrared spectra of gaseous phase of individual kind of ripening cheeses after their controlled heating. Qualitative evaluation of infrared spectra was carried out using discriminant analysis, which successfully classified individual type of ripening cheeses. This rapid and relatively cheap method could be used for control of authenticity of selected cheeses types.

Biogenic amines were studied using infrared and Raman spectroscopy in smoked and non-smoked cheeses, which were manufactured from different kinds of milk. Spectra of extracts of individual hard cheeses were obtained using infrared spectroscopy with attenuated total reflection (ATR). Spectra of lyophilized hard cheeses were measured using Raman spectroscopy. Utilization of discriminant analysis on particular hard cheeses succeeded in characterizing according to their finishing and milk used for their production.

Fourier transform infrared spectroscopy was used for analysis of red, rose and white wine, which was collected in different stages of production process. This method was based on the measurement of wine samples using ATR reflection technique. Content of total phenolic compounds (TPC) and total antioxidant activity (TAA) was monitored at individual wine samples and their determination was performed by multivariate statistical method partial least squares (PLS). These wine parameters (TPC, TAA) can be applied for monitoring of changes during production process, which can be useful for the final quality. Furthermore, characterization of wine samples with respect to production process was performed using the discriminant analysis. This qualitative evaluation can be useful for control of manufacturing process.

Prohlašuji, že jsem tuto disertační práci vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci použila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Souhlasím s tím, aby má práce byla prezenčně zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne .....

.....

Mgr. Jana Prešerová

Děkuji svému školiteli doc. RNDr. Petru Bartákovi, Ph.D. za cenné rady, které mi v průběhu mého studia poskytl. Dále chci poděkovat svým konzultantům Ing. Davidu Mildemu, Ph.D. a RNDr. Václavu Rancovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a podporu během mého studia. Mé poděkování patří také všem členům Katedry analytické chemie.

Dále bych také ráda poděkovala svému manželovi Petrovi a mým rodičům za trpělivost a podporu v průběhu celého mého doktorského studia.

## OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>2</b>
2.1.1	Historický přehled metod vibrační spektroskopie .....	2
2.1.2	Vývoj infračervené spektroskopie .....	2
2.1.3	Vývoj Ramanovy spektroskopie.....	4
2.2	Teoretická východiska vibrační spektroskopie .....	5
2.2.1	Vibrační spektroskopie .....	5
2.2.2	Infračervená spektroskopie.....	8
2.2.3	Ramanova spektroskopie .....	13
2.3	Aplikace vibrační spektroskopie v potravinářství .....	18
2.3.1	Analýza mléčných výrobků .....	22
2.3.2	Analýza vína .....	26
2.4	Vibrační spektroskopie a chemometrie.....	28
<b>3</b>	<b>CÍLE PRÁCE</b> .....	<b>31</b>
<b>4</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>32</b>
4.1	Chemikálie a přístrojové vybavení .....	32
4.2	Použité vzorky, postupy a metody v analýze mléčných výrobků.....	33
4.2.1	Zrající sýry.....	33
4.2.2	Tvrdé sýry.....	35
4.3	Použité vzorky, postupy a metody v analýze vína.....	36
4.4	Vyhodnocení experimentálních dat .....	38
<b>5</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE</b> .....	<b>40</b>
5.1	Analýza mléčných výrobků .....	40
5.1.1	Kontrola kvality a pravosti sýrů typu Tvarůžek a Romadúr .....	40



5.1.2	Analýza biogenních aminů v tvrdých sýrech .....	47
5.2	Analýza vína .....	54
5.2.1	Analýza vín v různých technologických fázích výroby .....	54
<b>6</b>	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>67</b>
<b>7</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....</b>	<b>69</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURA .....</b>	<b>71</b>
	<b>CURRICULUM VITAE .....</b>	<b>88</b>
	<b>PŘÍLOHY .....</b>	<b>91</b>

# 1 ÚVOD

V poslední době je stále více skloňováno slovní spojení „kvalita potravin“. Kvalita potravin je posuzována z mnoha hledisek (výrobce, prodejce, spotřebitel, odborník na výživu) a je primárně definována příslušnými vyhláškami a normami. Jakost potravin je závislá na kvalitě surovin a jejich složek, na jejich zpracování a technologických postupech, dále na obalech, délce a podmínkách skladování a v neposlední řadě také na zacházení spotřebitele s potravinou doma. Celková kvalita potravin je popisována bezpečností potravin a jakostí potravin, která zahrnuje senzorickou jakost (vzhled, textura, barva, chuť, vůně), nutriční hodnoty a faktory ovlivňující spotřebitele (trvanlivost, balení, způsob zpracování). Pro lepší orientaci spotřebitelů jsou potraviny označovány příslušnými označeními, která deklarují jejich kvalitu (Klasa, Regionální potravina) či zeměpisný původ (potraviny s chráněným zeměpisným označením).

Kontrola kvality potravin, ať už z hlediska stanovení obsahu hlavních a vedlejších složek, kontaminantů či přídavných látek, je velice důležitá a je zabezpečována různými analytickými metodami. Vedle běžně používaných separačních metod se v potravinářském průmyslu používají také metody spektroskopické, např. metody infračervené spektroskopie. Tyto metody mají několik výhod a to zejména nedestruktivnost, rychlost analýzy a použitelnost pro různé typy vzorků. Stejně jako jiné analytické metody mají i tyto svá omezení, například komplikovaná kvantitativní analýza.

Tato práce ukazuje některé možnosti použití metod vibrační spektroskopie (infračervené a Ramanovy spektroskopie) v potravinářském průmyslu jako nástroje kontroly kvality potravin, zejména mléčných výrobků (sýrů) a alkoholických nápojů (víno). Infračervená spektroskopie byla použita pro kontrolu pravosti vybraných druhů sýrů, ke studiu biogenních aminů v sýrech a k analýze vín v různých technologických fázích jejich výroby. Ramanova spektroskopie byla použita k charakterizaci sýrů.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1.1 Historický přehled metod vibrační spektroskopie

### 2.1.2 Vývoj infračervené spektroskopie<sup>1,2</sup>

Počátky infračervené (IR) spektroskopie jsou spojovány s astronomem sirem Williamem Herschelem, který v roce 1800 stál za objevem infračerveného záření<sup>1</sup>. Herschel studoval spektrum slunečního záření, které procházelo přes skleněný hranol. Měřením teploty každé barvy pomocí teploměrů zjistil, že největší teplotu má právě červená barva. Od této doby byla snaha vyvinout citlivější teplotní měření, najít materiály s lepšími infračervenými transmisními vlastnostmi a zdroje tepelného záření pro laboratorní účely. V roce 1835 zkonstruoval Melloni první infračervený spektrometr pro střední infračervenou oblast. V roce 1881 Langley vynalezl detektor bolometr, který použil do vlastního IR spektrometru a detegoval oxid siřičitý v atmosféře. V tomtéž roce Abney a Festing zaznamenali první spektrum molekulových vibrací<sup>3</sup>. V průběhu 19. století byly pomocí IR spektroskopie studovány plyny, kapaliny a organické sloučeniny<sup>3,4</sup>. V roce 1905 Coblentz publikoval atlas obsahující absorpční spektra 120 organických látek a sestavil 15 skupinově-charakteristických pásů pro většinu typů XH skupin, polárních skupin a benzenového jádra<sup>5</sup>. Po této práci již nebylo pochyb o tom, že IR spektroskopie je užitečný nástroj pro strukturní diagnózu.

K největšímu rozmachu infračervené spektroskopie došlo během 2. světové války v důsledku rozvoje elektroniky, citlivějších detektorů a vývoje dvoupraskových spektrometrů. Stala se nesmírně důležitou pro analýzu molekulové struktury a byla dostupná pro široké použití nejprve ve všech organických a později i anorganických preparativních laboratořích. Kromě toho byla IR spektroskopie také používána ke kvantitativní analýze a ke studiu fyzikálních interakcí mezi molekulami. Obecný růst vědeckých aktivit jak na univerzitách, tak v průmyslu vedl přirozeně k růstu požadavků na přístrojové vybavení a ve 40. letech 20. století se setkáváme s prvním komerčním disperzním spektrometrem s automatickým záznamem (Lehrer). Další zlepšení instrumentace v průběhu 60. let 20. století vedly k tomu, že se IR spektroskopie stala velmi užitečným nástrojem používaným v analytických laboratořích stejně jako v mnoha vědních oborech.

Zásadní obrat ve vývoji infračervené spektroskopie přineslo zavedení interferometrů namísto disperzního prvku (hranol, mřížka). V roce 1881 A. Michelson vynalezl interferometr, který poprvé použil pro spektroskopii. Z počátku (30. léta 20. stol.) zavedení interferometrů do IR spektrometrů pro vzdálenou IR oblast nepřineslo zlepšení, jedním z nedostatků bylo složité převedení interferogramů na rozpoznatelná spektra. Až v 60. letech 20. století byl vyvinut rychle skenující Michelsonův interferometr pro střední IR oblast, který spolu s laserem (pro kontrolu polohy zrcadla), počítačem a Fourierovou transformací (FT) byl využit pro výrobu prvního komerčního FTIR spektrometru. Tento spektrometr se stal inspirací pro ostatní výrobce a od 70. let 20. století až doposud se setkáváme se spektrometry s Fourierovou transformací, které mají několik výhod oproti dřívějším disperzním spektrometrům. První je multiplexová ( Fellgettova) výhoda<sup>6</sup> – celé spektrum vlnových délek je měřeno během jedné periody pohybu zrcadla, což vede k značné úspoře času a zvýšení poměru signálu k šumu. Druhá je výhoda světelnosti (Jacquinotova)<sup>6,7</sup> – FTIR spektrometrem prochází celý svazek o vysoké intenzitě, a to díky kruhovým otvorům a absenci štěrbin což přispívá ke zvýšení citlivosti zařízení. Třetí je výhoda jednoduché kalibrace (výhoda Connésové)<sup>8</sup> – pro výpočet spektra stačí znát rozdíl optických drah v obou ramenech, ke kterému se používá laser pro kontrolu polohy zrcadla. Laser má známou vlnovou délku, která je velmi stabilní, a tak není třeba žádné kalibrace. S nástupem počítačové revoluce v 80. letech 20. století se staly FTIR spektrometry zcela dominantní a dnes již mluvíme pouze o infračervené spektroskopii s Fourierovou transformací. Během této doby došlo k převedení spekter z analogové formy na digitální, k miniaturizaci přístrojů, zlepšení instrumentace (zlepšení optiky, citlivější detektory) a dále k zavedení softwarů, které umožnily například zpracování dat, kontrolu přístroje a tvorbu spektrálních databází.

Současně s vývojem IR spektrometrů se vyvíjely také vzorkovací techniky infračervené spektroskopie, mezi které patří transmisní techniky, odrazové techniky a mikrospektroskopie. Nejstarší a tradiční vzorkovací technikou je transmisní měření. Nejpoužívanější transmisní technikou pro pevné vzorky je technika KBr tablety, která byla navržena v roce 1952. Měření kapalných vzorků transmisní technikou je uskutečňováno pomocí různých typů kyvet.

V posledních letech však stoupá obliba odrazových technik, zejména technika zeslabeného úplného odrazu (ATR), která je nejpoužívanější ze všech odrazných technik díky

jednoduchému a rychlému měření. Používá se k měření kapalin a pevných vzorků, a je hojně používaná například v potravinářském a farmaceutickém průmyslu. Novým trendem je spojení ATR s vláknovou optikou, která umožňuje měření vzorků mimo vzorkovací prostor přístroje. Dalším trendem je infračervená mikroskopie s Fourierovou transformací, která umožňuje měřit vzorky až do velikosti několika mikrometrů.

### 2.1.3 Vývoj Ramanovy spektroskopie<sup>1,2</sup>

Počátky Ramanovy spektroskopie jsou spjaty s objevem neelastického optického rozptylu, který byl objeven Ramanem a Krishnan v roce 1928<sup>9</sup>. Nicméně tento efekt byl již předpovězen Smékalem v roce 1923<sup>10</sup>. Zajímavostí tohoto objevu bylo, že koncem roku 1928 bylo publikováno okolo 70 prací na toto téma, kromě Smékala popsal tento efekt také Landsberg a Mandelstam, ale Nobelovu cenu za jeho objevení dostal pouze Raman, po kterém je také tento jev pojmenován. Záhy po objevu Ramanova jevu v roce 1934, Placzek vypracoval teorii Ramanova efektu, kde pro popis jevu připisoval zásadní roli symetrii a teorii grup<sup>11</sup>.

Jednoduché požadavky na experimentální vybavení vedly k rychlému a zvýšenému zájmu o tuto techniku. Jako zdroj monochromatického záření se používaly komerčně dostupné rtuťové výbojky, disperzním prvkem byl buď skleněný hranol, nebo difrakční mřížka a jako detektor se používal fotografický film. Během 2. světové války (1942) Rank vyvinul fotoelektrický Ramanův spektrometr pro kvantitativní analýzu uhlovodíků, kde použil fotonásobič jako detektor.

Zásadní posun ve vývoji instrumentace nastal v 60. letech 20. století, kdy byly dostupné plynové lasery pracující ve viditelné oblasti (He-Ne, Ar<sup>+</sup> a Kr<sup>+</sup> laser). Velmi brzy se ukázalo, že se jedná o ideální zdroje monochromatického záření pro Ramanovu spektroskopii, které dramaticky zvyšují citlivost této techniky. Současně docházelo k zlepšování instrumentace spektrometrů, fotografická detekce byla změněna na fotoelektrickou detekci pomocí fotonásobičů a hranolové spektrometry byly vyměněny za skenující mřížkové spektrometry. Hlavní nevýhodou Ramanovy spektroskopie byla fluorescence některých barevných vzorků nebo nečistot, která snadno překrývala slabý Ramanův signál. Tato fluorescence byla také hlavní překážkou použití této techniky jako běžné analytické metody v praxi. Tato situace se dramaticky změnila v 80. letech 20. století, kdy Chase a Hirschfeld

ukázali použitelnost Fourierovy transformace pro Ramanovu spektroskopii<sup>12</sup>. Vyrobili velmi úspěšný FT Ramanův spektrometr, ve kterém použili Nd/YAG laser pracující v blízké infračervené oblasti, který minimalizoval pravděpodobnost fluorescence většiny vzorků, dále účinné filtry, pro efektivní eliminaci elastického rozptylu a citlivější detektory (Ge a InGaAs).

Téměř současně se zavedením FT spektrometrů, byly vyvinuty velmi citlivé CCD (charge-coupled device) detektory, pracující ve viditelné oblasti, které značně přispěly k vývoji Ramanovy spektroskopie.

V průběhu vývoje Ramanovy spektroskopie bylo vyvinuto několik variant této techniky, mezi které patří například rezonanční ramanova spektroskopie RRS (1947), koherentní anti-Stokesova Ramanova spektroskopie CARS (1965), povrchem zesílená Ramanova spektroskopie SERS (1974) a další.

V současné době se stále více setkáváme se spojením Ramanovy spektroskopie a mikroskopie – konfokální Ramanova mikrospektroskopie. Tato metoda umožňuje 3D mapování a měření hloubkových profilů s možností chemické diferenciaci. S rozvojem nanotechnologií stoupá v oblibě také metoda SERS, která se využívá například ve forenzní analýze, v potravinářství, umění a biologii. Miniaturizace přístroje je dalším trendem v instrumentaci Ramanovy spektroskopie. V dnešní době jsou dostupné jak přenosné, tak ruční Ramanovy spektrometry, které mohou být použity přímo v terénu (viz „methanolová aféra“ v roce 2012). Přenosné spektrometry jsou vybaveny vláknovou optikou a některé typy mohou být kombinovány také s mikroskopem.

## **2.2 Teoretická východiska vibrační spektroskopie**

### **2.2.1 Vibrační spektroskopie<sup>13,14</sup>**

Vibrační spektroskopii lze označit jako souhrnný název pro analytické spektroskopické metody zabývajícími se molekulárními vibracemi. Molekuly jsou tvořeny atomy, které jsou spojeny pružnými vazbami, a proto mohou vykonávat periodický pohyb – mají vibrační stupně volnosti. Obecně N-atomová nelineární molekula má  $3N - 6$  stupňů volnosti neboli normálních vibrací ( $3N - 5$  pro lineární molekulu), které tvoří její vibrační

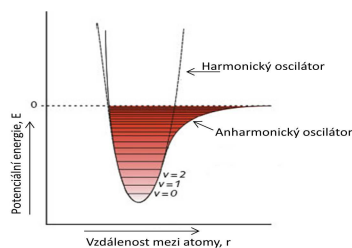
spektrum. Každá čára vibračního spektra je svými vlastnostmi závislá jak na počtu a hmotnosti společně kmitajících atomů molekuly, tak na jejich prostorovém uspořádání a vnitřně molekulovém silovém poli<sup>15</sup>. Za normální vibrace označujeme ty vibrace molekuly, při kterých atomy nebo funkční skupiny vibrují ve stejné fázi a se stejnou frekvencí. Normální vibrace jsou na sobě nezávislé a nedochází při nich ke změně těžiště molekuly. Toto přiblížení je v praxi poněkud nereálné, jelikož vibrace molekul nejsou vždy úplně harmonické. Anharmonicitu se projeví ve vibračním spektru, ve kterém kromě fundamentálních vibrací máme i vyšší harmonické (overtony) a kombinační vibrace. Normální vibrace dvouatomové molekuly se podle mechanického modelu popisuje pomocí harmonického oscilátoru, pro jehož frekvenci  $\nu_{vib}$  platí vztah:

$$\nu_{vib} = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}}, \quad (1)$$

kde  $k$  je silová konstanta oscilátoru (charakteristika vazby) a  $\mu$  je redukovaná hmotnost atomů s hmotnostmi  $m_1$  a  $m_2$  spojených vazbou,  $\mu = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2}$ . Z pohledu kvantové mechaniky platí pro potenciální energii harmonického oscilátoru vztah:

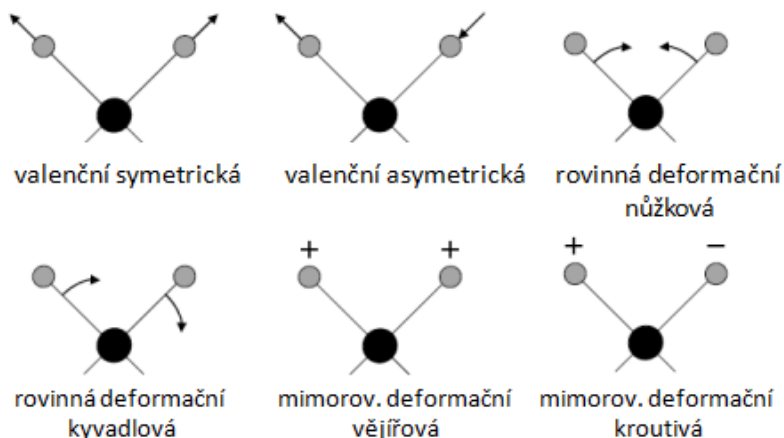
$$E = \left(v + \frac{1}{2}\right) \frac{h}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} = \left(v + \frac{1}{2}\right) h\nu_{vib}, \quad (2)$$

kde  $v$  je vibrační kvantové číslo, které může nabývat pouze kladných celočíselných hodnot a pro které platí výběrové pravidlo  $\Delta v = \pm 1$ <sup>14</sup>,  $h$  je Planckova konstanta. Reálné molekuly nevibrují jako harmonický oscilátor, ale jako anharmonický (Obr. 1). Rovnice potenciální energie anharmonického oscilátoru je podobná rovnici (2) s tím rozdílem, že navíc zahrnuje konstantu anharmonicity  $x_{vib}$ . Efekt anharmonicity zmírňuje výběrové pravidlo pro vibrační kvantové číslo, které může nabývat hodnot  $\Delta v = \pm 2$  nebo  $\Delta v = \pm 3$ .



**Obrázek 1** Křivka potenciální energie harmonického a anharmonického oscilátoru

Vibrace dělíme na dvě základní skupiny a to na valenční vibrace, při kterých dochází k změně délky vazby mezi atomy a dále se klasifikují na symetrické a antisymetrické; a deformační vibrace, při kterých dochází k deformaci valenčních úhlů a dále se dělí na rovinné a mimorovinné (Obr. 2).



**Obrázek 2** Typy molekulárních vibrací<sup>16</sup>

Současně se změnou vibračního stavu dvouatomové molekuly dochází ke změnám jejich rotačních stavů, kdy rotační energie ( $E_J$ ) potřebná k této změně je docela malá v porovnání s vibrační energií. Rotační energie je dána vztahem:

$$E_J = BJ(J + 1), \quad (3)$$

kde  $B$  je rotační konstanta a  $J$  je rotační kvantové číslo, pro které platí výběrové pravidlo  $\Delta J = \pm 1$ . V IR spektru plynné fáze (plynu) jsou pozorovány rotační přechody, které jsou tvořeny sérií blízkých oddělených linií (jemná struktura vibračních pásů), v IR spektru kapalin a pevných látek nejsou tyto přechody pozorovány.

Analytické metody vibrační spektroskopie jsou infračervená a Ramanova spektroskopie. Tyto metody jsou založeny na dvou rozdílných fyzikálních jevech – absorpci a rozptylu, avšak obě umožňují studovat přechody mezi vibračními stavy molekul v základním elektronovém stavu.



## 2.2.2 Infračervená spektroskopie<sup>17,18</sup>

Infračervená spektroskopie je analytická spektroskopická metoda určená především k identifikaci a strukturní charakterizaci organických sloučenin a anorganických látek. Tato metoda je založena na interakci hmoty s infračerveným zářením. Infračervené záření je elektromagnetické záření v rozsahu vlnových délek 0,78 – 1000  $\mu\text{m}$ , což odpovídá rozsahu vlnočtů 12 800 – 10  $\text{cm}^{-1}$ . Celá oblast infračerveného záření se rozděluje na tři části: blízkou infračervenou oblast (12 800 – 4000  $\text{cm}^{-1}$ ; NIR), střední infračervenou oblast (4000 – 200  $\text{cm}^{-1}$ ; MIR) a vzdálenou infračervenou oblast (200 – 10  $\text{cm}^{-1}$ ; FAR). V analytické chemii je nejpoužívanější střední oblast v rozsahu 4000 – 400  $\text{cm}^{-1}$ . Infračervené záření má vyšší vlnovou délku a nižší energii než záření ultrafialové a viditelné, tudíž nestačí na změny elektronových stavů a způsobuje pouze změny vibračních a rotačních stavů molekuly.

Principem infračervené spektroskopie je absorpce IR záření molekulou, při které dochází k jednofotonovému přechodu mezi dvěma vibračními (vibračně-rotačními) stavy molekuly, jejichž energie jsou  $E_1$  a  $E_2$ , který je vyvolaný interakcí s fotonem dopadajícího záření<sup>19</sup>. Molekula může absorbovat jen takové frekvence IR záření, jejichž energie odpovídají příslušným vibračním a rotačním přechodům, které se v IR spektru projeví jako absorpční pásy (rov. (4),(5)). Vibračně-rotační přechody jsou u různých skupin atomů různé, proto z vlnočtu absorbovaného záření získáme informace pro kvalitativní analýzu.

$$\Delta E_{abs} = h\nu_{abs} = (E_2 - E_1) \quad (4)$$

$$\Delta E_{vib} = h\nu_{vib} = (E_2 - E_1) \quad (5)$$

Aktivita vibrace v IR spektru je dána určitým výběrovým pravidlem. Základní výběrové pravidlo infračervené absorpce je změna dipólového momentu vazby nebo celé molekuly během interakce s IR zářením (rov.(6)). Intenzita absorpčních pásů je úměrná druhé mocnině změny dipólového momentu během vibračního pohybu. Na základě této podmínky je definována aktivita vibrace v IR spektru pro všechny druhy molekul. V infračerveném spektru jsou aktivní pouze ty vibrace vazeb, u kterých dochází ke změně dipólového momentu. Nedochozí-li k jeho změně (např. u molekul  $\text{O}_2$ ,  $\text{N}_2$ ,  $\text{H}_2$ ) molekula neabsorbuje IR záření a je neaktivní v IR spektru. Změna dipólového momentu u polyatomické molekuly úzce souvisí

s její symetrií<sup>20</sup>. Symetrii molekuly popisujeme tzv. operacemi symetrie<sup>21</sup>. Symetrické valenční vibrace jsou neaktivní v IR spektru, naopak antisymetrické vibrace jsou aktivní.

$$\frac{\partial p}{\partial q} \neq 0, \quad (6)$$

kde  $p$  je dipólový moment a  $q$  je normální souřadnice vibračního módu.

Infračervené spektrum je pro každou látku charakteristické (unikátní). Neexistují dvě látky, které by měly do detailu stejné IR spektrum. V infračerveném spektru sledujeme závislost propustnosti (transmitance  $T$ ) nebo absorbance ( $A$ ) na vlnočtu ( $\tilde{\nu}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ) popř. vlnové délce ( $\lambda$ , nm). Absorpční pásy jsou charakterizovány polohou (vlnočtem) maxima resp. minima (při závislosti  $T$  na vlnočtu) a relativní intenzitou pásu. Infračervené spektrum ve střední infračervené oblasti rozdělujeme na dvě oblasti:

- oblast charakteristických (skupinových) vibrací ( $4000 - 1500 \text{ cm}^{-1}$ ), kde se vyskytují charakteristické absorpční pásy valenčních vibrací různých funkčních skupin (např. O-H, C=O, N-H, -CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub> aj.). Tato oblast je využívána pro identifikaci těchto skupin u organických látek
- oblast otisku palce ( $1500 - 200 \text{ cm}^{-1}$ ), kde nacházíme absorpční pásy deformačních vibrací, které jsou dány celkovou strukturou molekuly. Tato oblast je unikátní pro každou sloučeninu.

Infračervená spektroskopie se využívá jak v kvalitativní tak kvantitativní analýze. Nejdůležitější použití této metody je v identifikaci a strukturní analýze organických i anorganických sloučenin<sup>22</sup>. Dále se používá ke sledování rovnovážných dějů a ke studiu reakční kinetiky<sup>23</sup>. V kvantitativní analýze se využívá vztahu mezi koncentrací a měřenou veličinou (absorbancí), který je definován Lambert-Beerovým zákonem. Jelikož většina analyzovaných látek jsou složité organické sloučeniny a jejich IR spektra jsou velice komplexní, používají se pro vyhodnocení kvality a kvantity vícerozměrné chemometrické metody.

Velikou výhodou infračervené spektroskopie je, že je vhodná pro měření různých typů vzorků ve všech skupenstvích (plyny, kapaliny, roztoky, pevné látky, filmy, povrchy atd.) a tudíž má široké aplikační uplatnění od chemického průmyslu přes potravinářský,

farmaceutický průmysl až po biologii, medicínu a forenzní vědy. Příklady jednotlivých aplikací jsou uvedeny v tabulce 1.

**Tabulka 1** Přehled aplikací infračervené spektroskopie<sup>17,24,25,26</sup>

<b>Odvětví</b>	<b>Příklady aplikací</b>
Chemický průmysl	Analýza polymerů, olejů, odpadních vod, hnojiv
Potravinářský průmysl	Stanovení hlavních složek potravy (voda, bílkoviny, tuky, sacharidy) stanovení methanolu a ethanolu v alkoholických nápojích
Farmaceutický průmysl	Kontrola čistoty farmaceuticky účinných látek a pomocných látek, charakterizace polymorfů, identifikace léčivých látek
Biologie	Identifikace bakterií, analýza proteinů, peptidů, nukleových kyselin
Medicína	Diagnostika zhoubných nádorů, složení ledvinových kamenů, stanovení sacharidů v krvi
Forenzní vědy	Důkaz drog a zneužívaných léčiv, analýza vláken, barev, inkoustů

### **Techniky měření**

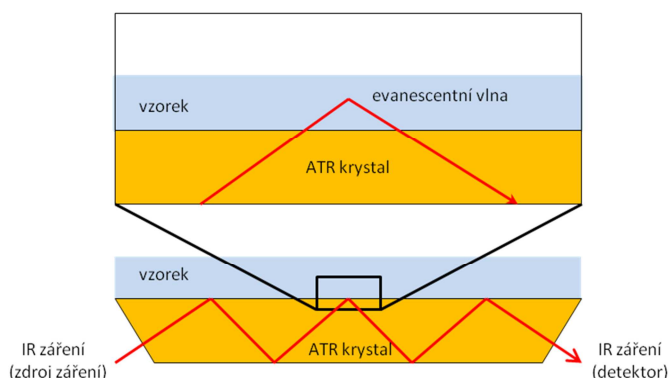
K měření IR spekter můžeme využít různé úpravy vzorků a použít různé techniky měření. Základním kriteriem výběru vhodné techniky je zabezpečit, aby nedocházelo během přípravy a měření vzorku k jeho reakci anebo jiným změnám. Nejrozšířenější a tradiční technikou je transmisní měření, které lze uskutečnit v plynném, kapalném a pevném stavu. K měření plynných vzorků se používají plynové kyvety s různou optickou délkou, pro kapaliny a roztoky se využívají různé druhy kapalinových kyvet. K měření pevných látek může být použita buď nujolová technika (suspenze s Nujolem) nebo technika KBr tablety (lisování tablet s KBr).

Další technikou je odrazové měření, které se využívá pro vzorky ve formě past, povrchových laků, barev, lepidel, atd. Odrazové techniky dělíme do dvou kategorií: první kategorie využívá vnitřní reflexe, kdy krystal je v kontaktu se vzorkem a druhá kategorie využívá vnější reflexe, kdy se IR paprsek odráží přímo od povrchu vzorku a to buď zrcadlově (Specular Reflectance Spectroscopy) nebo difuzně (Diffuse Reflectance Infrared Fourier

Transform Spectroscopy, DRIFTS). V dnešní době je velice oblíbenou vzorkovací technikou zeslabená úplná reflektance neboli ATR (Attenuated Total Reflectance), využívající jevu jednoduchého či vícenásobného úplného vnitřního odrazu na fázovém rozhraní měřeného vzorku a měřicího krystalu z materiálu o vysokém indexu lomu. Princip ATR techniky je zobrazen na obrázku 3, kde je znázorněn průnik záření ve formě evanescentní vlny do vzorku. Bude-li vzorkem absorbována některá z frekvencí záření, bude tato frekvence v úplném odrazu zeslabena, zatímco ostatní budou odraženy bez zeslabení. I když je analýza ATR technikou jednoduchá, nesmíme opomenout několik experimentálních faktorů, které ji ovlivňují:

- indexy lomu ATR krystalu a vzorku
- kritický úhel (funkcí indexů lomu vzorku a ATR krystalu)
- úhel dopadu IR paprsku
- hloubka průniku (dp) IR paprsku do vzorku
- vlnová délka IR paprsku
- efektivní délka dráhy
- počet odrazů
- účinnost kontaktu ATR krystalu se vzorkem
- materiál ATR krystalu (ZnSe, Ge, diamant)

Tato moderní technika umožňuje měření pevných a kapalných vzorků (pasty, gely, polymerní vrstvy, práškové vzorky) a je vhodná pro vzorky, které silně absorbují IR záření (kapalné a viskózní vzorky).



**Obrázek 3** Schéma principu úplné zeslabené reflektance (ATR)<sup>27</sup>

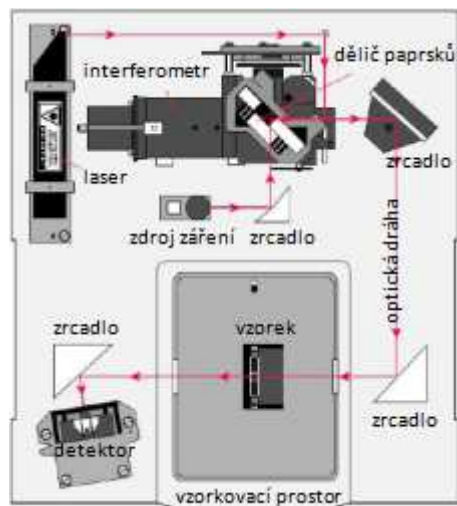
## Instrumentace

K měření IR spekter se používají dva druhy infračervených spektrometrů: disperzní spektrometry a spektrometry s Fourierovou transformací. Dříve (do konce 80. let) byly hojně používané konstrukčně starší disperzní spektrometry, které k rozkladu IR záření využívají disperzního prvku - hranolu nebo mřížky. V současné době se v infračervené spektroskopii setkáváme se spektrometry s Fourierovou transformací (FTIR spektrometry), které namísto disperzního prvku mají interferometr. Ve srovnání s disperzními spektrometry jsou tyto rychlejší, spolehlivější, mají lepší poměr signál/šum.

Základní části FTIR spektrometru jsou zdroj IR záření, interferometr, vzorkovací prostor a detektor (Obr. 4). Jako zdroj IR záření se používají keramické tyčinky, které jsou žhavené na teplotu 1000 – 1200 °C (Globalar – z SiC, Nernstova tyčinka – oxidy kovů vzácných zemin). Dále se používá rtuťová výbojka pro měření ve vzdálené IR oblasti a wolframová, wolfram-halogenidová žárovka pro měření v blízké IR oblasti.

Hlavní částí FTIR spektrometru je interferometr, který pracuje nejčastěji na principu Michelsonova interferometru, který se skládá z děliče paprsků, pohyblivého a pevného zrcadla. Úkolem Michelsonova interferometru je zeslabení nebo zesílení záření pomocí interference. Polopropustný dělič paprsku, který se používá pro střední IR oblast, je tvořen polopropustným zrcadlem tvořeným depozicí tenké germaniové vrstvy na destičce z bromidu draselného. Výstupem interferometru je tzv. interferogram, který obsahuje veškeré spektrální informace. Pomocí matematické Fourierovy transformace a digitalizace je interferogram převeden na infračervené spektrum jako funkce intenzity absorpance na vlnočtu.

Jako detektory se u FTIR spektrometrů standardně používají pyroelektrické detektory – deuterovaný triglycinsulfát (DTGS) nebo fotovoltaiický detektor z telluridu rtuti-kadmia (MCT) pro měření ve střední IR oblasti. V NIR oblasti se používají například PbSe, PbS, Ge detektory a ve FAR oblasti se používá DTGS detektor či GaAs-Zn detektor.



Obrázek 4 Schéma FTIR spektrometru<sup>28</sup>

### 2.2.3 Ramanova spektroskopie<sup>29,30,31</sup>

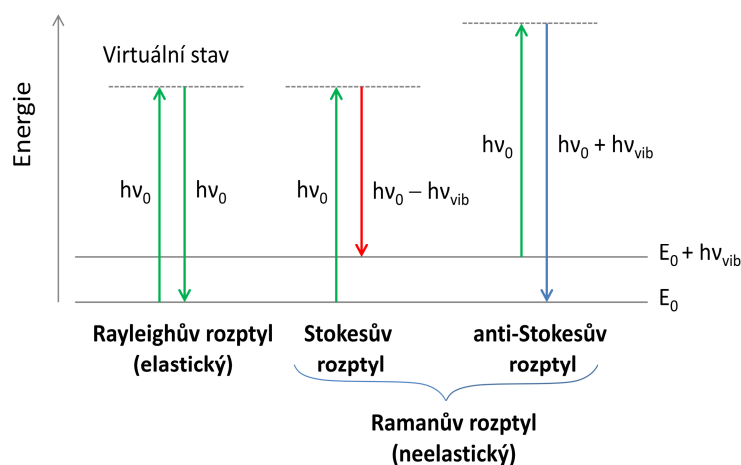
Ramanova spektroskopie je spektroskopická metoda, která je pojmenována po indickém fyzikovi Čandrašékara Venkata Ramanovi, který v roce 1930 obdržel Nobelovu cenu za popsání neelastického optického rozptylu (tzv. Ramanův rozptyl).

Principem této metody je právě zmíněný Ramanův rozptyl, jehož fyzikální původ spočívá v neelastických srážkách molekul vzorku s fotony excitujícího monochromatického záření v oblasti viditelné až blízké infračervené. Jednou z možností popisu Ramanova rozptylu je kvantově mechanický model, který zahrnuje vlnově-částicovou povahu kvant záření (fotonů), a kvantování energetických hladin molekuly. Podstatou Ramanova rozptylu je zářivý dvoufotonový přechod mezi dvěma stacionárními vibračními stavy molekuly, jejichž energie jsou  $E_1$  a  $E_2$ . V první fázi dochází k interakci molekuly s fotonem dopadajícího záření o frekvenci  $\nu_0$  a následně k přechodu do vyššího energetického stavu. Tento “kvaziexcitovaný” virtuální stav má extrémně krátkou dobu života a proto v následném kroku dochází k přechodu molekuly na nižší energetickou hladinu za současného vyzáření rozptýleného fotonu o frekvenci  $\nu_{vib}$ , za splnění podmínky zachování energie:

$$h\nu_{vib} = h\nu_0 \pm (E_2 - E_1), \quad (7)$$

kde  $h$  je Planckova konstanta.

Celý proces může mít několik možností, které jsou znázorněny na obrázku 5. Jestliže je energie dopadajících a rozptýlených fotonů stejná, jedná se o elastický rozptyl a hovoříme o tzv. Rayleighově rozptylu. V případě, že je energie dopadajících a rozptýlených fotonů rozdílná, jedná se o neelastický rozptyl tzv. Ramanův rozptyl. Jestliže má rozptýlené záření nižší frekvenci než excitační záření ( $\nu_0 - \nu_{vib}$ ) nazývá se Stokesův rozptyl a naopak pokud má vyšší frekvenci než excitační záření ( $\nu_0 + \nu_{vib}$ ) nazývá se anti-Stokesův rozptyl.



**Obrázek 5** Schéma Rayleighova a Ramanova rozptylu

Pro vznik anti-Stokesových linií je nutné, aby se molekula již na počátku celého procesu nacházela v některém z vyšších vibračních energetických stavů v rámci základního elektronického stavu (Obr. 5). Většina molekul je při pokojové teplotě v základním vibračním stavu ( $N_0$ ) a jen několik molekul je v prvním excitovaném vibračním stavu ( $N_1$ ). Vzhledem k tomu, že populace těchto vyšších vibračních stavů se řídí Boltzmanovým rozdělením (rov. (8)), je procento molekul nacházejících se v takovém stavu malé. Tomu také odpovídají mnohem nižší intenzity anti-Stokesových linií ve srovnání se Stokesovými liniemi, proto se v běžné praxi Ramanova spektroskopie zabývá pouze studiem Stokesových linií.

$$\frac{N_1}{N_0} = \exp\left(\frac{-h\nu_{vib}}{kT}\right) \quad (8)$$

Ramanův jev je možné popsat též klasickým přiblížením, kdy pro molekulu interagující se zářením platí, že v molekule je indukován dipólový moment  $p$ :

$$p = \alpha E \cos(2\pi\nu_0 t) + \frac{1}{2} \frac{\partial \alpha}{\partial q} q E \{ \cos[2\pi(\nu_0 - \nu_{vib})t] + \cos[2\pi(\nu_0 + \nu_{vib})t] \}, \quad (9)$$

Rayleighův rozptyl

Stokesův rozptyl

anti-Stokesův rozptyl

kde  $\nu_0$  je frekvence budícího záření,  $\nu_{vib}$  je vibrační frekvence,  $E$  je vektor intenzity elektrického pole dopadajícího záření,  $q$  jsou vnitřní souřadnice molekuly a  $\alpha$  je polarizovatelnost molekuly. Z rovnice 9 vyplývají 2 závěry. První, že molekula emituje záření s nezměněnou frekvencí (Rayleighův rozptyl) a změněnou frekvencí – Ramanův rozptyl (Stokesův a anti-Stokesův rozptyl). Druhý, že pro vznik Ramanovy linie je nutné, aby při daném vibračním pohybu docházelo ke změně polarizovatelnosti, tedy  $\frac{\partial \alpha}{\partial q} \neq 0$ . Změna polarizovatelnosti (tj. schopnosti posunu elektrických nábojů v molekule vlivem elektrického pole) během vibračního pohybu je základním výběrovým pravidlem pro Ramanovu spektroskopii.

Analytickým výstupem této metody je Ramanovo spektrum, které vyjadřuje závislost intenzity rozptýleného záření na Ramanově posunu  $\Delta\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) a stejně jako infračervené spektrum poskytuje informace o vibračních (popř. rotačních) pohybech polyatomických molekul (částic, krystalů, atd.). Frekvence normálních vibračních módů závisí na základních parametrech popisujících strukturu molekuly, tj. hmotnostech zúčastněných atomů a síle vazby mezi nimi. Vibrační frekvence molekul jsou nezávislé na tom, zda je studujeme infračervenou nebo Ramanovou spektroskopií, ale intenzity spektrálních pásů jsou zcela odlišné. V Ramanově spektru je intenzita pásů úměrná druhé mocnině změny polarizovatelnosti během vibračního pohybu, zatímco v infračerveném spektru je úměrná druhé mocnině změny dipólového momentu<sup>32</sup>. Interpretace Ramanova spektra je podobná jako u infračerveného spektra a provádí se pomocí kombinovaných tabulek charakteristických vibračních frekvencí funkčních skupin<sup>33</sup>. Jak již bylo zmíněno, podmínkou pro aktivitu vibrace v Ramanově spektru je změna polarizovatelnosti molekuly během vibračního pohybu. Tuto schopnost mají především nepolární symetrické vazby (např.  $-\text{C}\equiv\text{C}-$ ,  $-\text{C}=\text{C}-$ ,  $-\text{N}=\text{N}-$ ), které jsou v Ramanově spektru velmi intenzivní. Symetrické vibrace a vibrace ve fázi jsou intenzivnější v Ramanově spektru než antisymetrické vibrace a vibrace v protifázi, které jsou naopak intenzivní v infračerveném spektru (komplementarita metod).



Ramanova spektroskopie se stejně jako infračervená spektroskopie využívá jak v kvalitativní tak kvantitativní analýze. Umožňuje analýzu pevných látek (krystalické i amorfní materiály, kovy, polovodiče, polymery atp.), kapalin (čisté látky, roztoky vodné i nevodné), plynů, dále analýzu povrchů (např. sorbenty, elektrody, senzory) či biologických systémů (od biomolekul až po organismy). V kvalitativní analýze je Ramanovo spektrum výborným „otiskem palce“ využívajícím se pro identifikaci látek, zejména je-li při porovnávání změřených a databázových dat dodržena podmínka, že Ramanova spektra byla získána pro stejný fyzikální stav látky. Dále se využívá k strukturní charakterizaci látek, jako doplňková metoda k infračervené spektroskopii. Své uplatnění nachází například při analýzách životního prostředí, v medicíně, farmaceutickém průmyslu, potravinářském průmyslu, kriminalistice, geologii. Při použití Ramanovy spektroskopie pro kvantitativní analýzu je nutné počítat s řadou specifických faktorů, kterými jsou například stabilní hodnota výkonu laseru, vliv reabsorbce rozptýleného záření, hloubka průniku excitujícího záření do vzorku, které je nutné brát v úvahu. Nejčastěji se kvantitativní vyhodnocení provádí pomocí složitých kalibračních modelů využívajících chemometrických algoritmů.

Ramanův rozptyl je při standardním experimentálním uspořádání velmi slabý (z  $10^6$  –  $10^8$  dopadajících fotonů je jeden rozptýlen neelasticky), a proto byla snaha vyvinout techniky zesilující jeho signál. K zesílení Ramanova rozptylu se využívá rezonanční Ramanova spektroskopie (RRS) a povrchem zesílená Ramanova spektroskopie (SERS).

RRS využívá rezonančního Ramanova efektu, který nastane, když frekvence použitého excitačního laseru odpovídá frekvenci záření potřebného na přechod elektronu v molekule zkoumané látky do elektronového excitovaného stavu a rezonuje s ním. Tohoto efektu se využívá hlavně u barevných látek, které mohou absorbovat záření laseru (chromofory) a generovat tak silný Ramanův rozptyl nebo silnou fluorescenci, která je v tomto případě nežádoucím efektem. Intenzita Ramanových pásů se může zvýšit  $10^3$  –  $10^6$  násobně. Běžně lze Ramanovou spektroskopií analyzovat roztoky o koncentraci  $> 0,1 \text{ mol l}^{-1}$ , zde hovoříme o  $10^{-8} \text{ mol l}^{-1}$ . Nevýhodou této metody je již zmíněná fluorescence a fotodegradace vzorku.

SERS je povrchově citlivá technika, využívající k zesílení Ramanova signálu molekulu adsorbovanou na zdrsňeném povrchu kovu (Ag, Au, Cu). Faktor zesílení je více než  $10^4$

(lokálně i více než  $10^{12}$ ), až k detekci jednotlivých molekul. Jsou popisovány dva mechanismy zesílení Ramanova rozptylu:

1. Elektromagnetický mechanismus – je spojen s existencí povrchového plasmonu<sup>34</sup>, který vzniká při interakci laserového paprsku s nepravidelnostmi na povrchu kovu. Laserový paprsek excituje volné elektrony na povrchu kovu, což způsobí lokální excitaci plazmonů na povrchu a zvýšení intenzity elektrického pole.
2. Chemický mechanismus – je spojen s přenosem náboje, anebo vznikem částečně chemické vazby mezi adsorbovanou molekulou a kovovým povrchem<sup>35</sup>.

Zesílení značně závisí na morfologii povrchu, tzn. hrubý (nerovný) povrch – nanostrukturovaný, které mají nanočástice, dále na druhu kovu a pokrytí adsorbátem. Příkladem SERS aktivních povrchů je zdrsňená elektroda, kovové koloidy nebo ostrůvkové filmy.

SERS se používá jak ke kvalitativní tak kvantitativní analýze široké škály analytů, např. deoxyribonukleové kyseliny (DNA), drog, výbušnin, potravinových přísad či inkoustů<sup>36</sup>. Během mého doktorského studia jsme se zabývali kvantitativní analýzou purinových bází pomocí FT-SERS<sup>37</sup>.

## **Instrumentace**

K měření Ramanova spektra se používají dva základní typy Ramanových spektrometrů a to disperzní a nedisperzní (s Fourierovou transformací). Základní části Ramanova spektrometru jsou zdroj záření, vzorkovací prostor, sběrná optika, monochromátor a detektor.

Jako zdroje záření se používají různé druhy laseru (plynové nebo pevnolátkové), které emitují monochromatické záření v ultrafialové, viditelné nebo blízké infračervené oblasti. V praxi se setkáváme nejčastěji s He-Ne (632,8 nm), Kr (647,1 nm), Ar (488 a 514,5 nm) a Nd:YAG (532 a 1064 nm) laserem. Dalším zdrojem záření je laserová dioda (785 nm a 830 nm).

Hlavní úlohou vzorkovacího prostoru a sběrné optiky je zabezpečit sběr rozptýleného záření tak, aby se do monochromátoru dostalo co nejvíce rozptýleného Ramanova záření ze vzorku. Rozptýlené záření je pozorováno nejčastěji po úhlem  $90^\circ$  (disperzní přístroje) nebo

180° (Ramanův spektrometr v kombinaci s optickým mikroskopem). Vzorkovací prostor je uzpůsoben pro měření vzorků pomocí různých nástavců a speciálních držáků, které umožňují měření ve skleněných vzorkovnicích (ampulky, vialky, zkumavky pro UV/VIS, NMR), makroskopické měření pevných vzorků či měření vzorků na kapkovacích destičkách. Analýza povrchů a jejich mapování je uskutečněna pomocí mikrospektroskopického měření, kdy je Ramanův spektrometr propojen s optickým mikroskopem.

Jako monochromátory se u disperzních přístrojů používají mřížky s vyšší rozlišovací schopností a nastavitelnou štěrbinou (s dvojitou nebo trojitou mřížkou) a interferometry u nedisperzních přístrojů. Pro odfiltrování nežádoucího Rayleighova rozptylu se používají holografické filtry nebo jednoduché prechromátory.

Volba detektoru závisí na použitém zdroji záření, tj. laseru. K detekci rozptýleného záření se využívají fotonásobiče a vícekanálové CCD detektory při použití laseru ve VIS (popř. UV, NIR) oblasti. U nedisperzních spektrometrů se používají jednocanálové detektory, nejčastěji polovodičové detektory z germania (Ge) a arsenidu india a galia (InGaAs).

### **2.3 Aplikace vibrační spektroskopie v potravinářství**

Metody vibrační spektroskopie (NIR, MIR a Ramanova spektroskopie) jsou hojně používané jak v potravinářském průmyslu, tak ve výzkumné oblasti. V porovnání s jinými metodami, mají tyto metody několik výhod a to zejména použitelnost pro všechna skupenství vzorku, minimální nebo žádné požadavky na úpravu vzorků a rychlost analýzy. Kromě toho jsou metody vibrační spektroskopie šetrné k životnímu prostředí v porovnání s klasickými referenčními metodami „wet chemistry“<sup>38</sup>. Tyto metody mohou být použity pro kvalitativní a kvantitativní analýzu potravin, nápojů a potravinových doplňků<sup>39</sup>. Obecně se využívají ke stanovení a charakterizaci hlavních složek potravin (bílkoviny, tuky, uhlovodíky a voda) a vedlejších složek potravin (vitamíny, minerály, potravinové přísady, bioaktivní a nutriční sloučeniny). Obsah hlavních složek potravin se využívá v tzv. nutričních tabulkách, které bývají uvedeny na jejich obalech. Předmětem intenzivního výzkumu je stanovení a charakterizace vedlejších složek, protože tyto složky mohou mít příznivé účinky na lidské zdraví a mohou poskytnout ochranu nebo snížit riziko vznikající chronické nemoci.

Příkladem těchto „bioaktivních“ složek je například resveratrol ve víně, polyfenoly v zeleném čaji či isoflavonoidy v sojových bobech. Dále se metody vibrační spektroskopie používají ke sledování změn potravin ve složení a vlastnostech během zrání, výroby, uchovávání či jejich vaření. V potravinářském průmyslu se využívají zejména ke kontrole surovin, výrobních procesů a finálních výrobků; ve výzkumu se zaměřují na stanovení různých biologických látek v potravinách, k potvrzení pravosti potravin, k určení geografického původu potravin či jejich pančování. Infračervená a Ramanova spektroskopie byla použita v analýze masa a masných výrobků<sup>40-43</sup>, ryb<sup>44-47</sup>, mléka a mléčných výrobků<sup>48-51</sup>, obilovin a cereálních výrobků<sup>52-55</sup>, ovoce a zeleniny<sup>56-59</sup>, zeleninových šťáv<sup>60,61</sup>, piva<sup>62,63</sup>, vína<sup>64,65</sup>, vajec a vaječných produktů<sup>66-69</sup>. Nedílnou součástí těchto metod je jejich propojení s chemometrickými metodami, které jsou zmíněny v kapitole 2.4.

Infračervená spektroskopie v blízké IR oblasti (NIR spektroskopie) byla první metodou, která byla použita Norrisem v 60. letech 20. století pro kvantitativní stanovení vody v potravinách<sup>68</sup>. Po této práci, mnoho vědců použilo tuto techniku jako analytický nástroj pro charakterizaci potravinářských a zemědělských produktů<sup>71,72</sup>. NIR spektroskopie, jako rutinní analytická metoda, je nejběžnější používanou spektroskopickou metodou v potravinářském průmyslu, která se používá ke kvantifikaci hlavních biochemických složek<sup>73</sup>. Hlavní výhody této metody jsou jednoduchost a rychlost měření, které může být uskutečňováno v transmisním nebo reflexním módu (nejčastěji difuzní reflektance) a použitelnost pro širokou škálu vzorků ve formě prášků, pevných látek, polotuhých látek a kapalin. NIR spektrum je tvořeno absorpčními pásy vyšších harmonických vibrací a kombinačních pásů základních vibrací (C-H, O-H, N-H), které se vyskytují ve střední infračervené oblasti. Jelikož jsou absorpční pásy široké a často značně překryté, interpretace NIR spekter potravin je velice obtížná, což tuto metodu do jisté míry limituje. NIR spektroskopie se uplatňuje především pro kvantitativní analýzu potravin a méně pro kvalitativní analýzu za účelem identifikace, ověření pravosti a diskriminace potravin. Nejvýznamnější aplikace této metody jsou kvantitativní měření obsahu vlhkosti (nejstarší aplikace), tuků, proteinů a sacharidů (ve formě cukrů, škrobů a celulosy), používané například v analýze obilovin a cereálních výrobků, mléka a mléčných výrobků, masa, ryb, ovoce a zeleniny<sup>74</sup>. V kvalitativní analýze se využívá jako rychlá a spolehlivá metoda k identifikaci kvality a původu potravin, k detekci kontaminovaných nebo pančovaných výrobků anebo k diskriminaci mezi různými typy potravin. NIR spektroskopie je velmi

používanou metodou v potravinářském průmyslu a díky vývoji instrumentace, vzorkovacích technik (zahrnující FT-NIR mikroskopii a optická vlákna) a chemometrie rozšiřuje své možnosti aplikace nejen pro laboratorní analýzu, ale také pro online monitorování a kontrolu výrobního procesu<sup>75,76</sup>.

Infračervená spektroskopie ve střední IR oblasti (MIR spektroskopie) je jednou z nejpoužívanějších metod vibrační spektroskopie. V analýze potravin se hojně uplatňuje jak v kvantitativní tak kvalitativní analýze<sup>77,78</sup>. V potravinářském průmyslu je to vysoce ceněná technika jak pro výzkum potravin, tak pro účely kontroly kvality díky tomu, že MIR spektroskopie může poskytnout informace nejen o strukturně-funkčních vztazích, ale také může sloužit jako nástroj kvantitativní analýzy. Výhody této techniky jsou stejné jako u ostatních metod, to znamená, že se jedná o rychlou, nedestruktivní metodu, která vyžaduje minimální nebo žádnou úpravu vzorků. Nicméně, aplikace MIR spektroskopie má v analýze potravin svá určitá omezení v podobě složitých spekter, které složky potravin poskytují, nemožností měření některých typů potravinových vzorků (neprůhledné prášky, viskózní kapaliny či pasty), problémů se vzorkováním a přítomností vody v potravinách, která silně absorbuje ve střední IR oblasti. V posledních letech byla tato omezení zmírněna díky vývoji infračervených spektrometrů s Fourierovou transformací společně se vzorkovacími technikami, mezi které patří ATR (pro měření pevných, polotuhých a kapalných látek), difúzní reflektance (DRIFTS) a fotoakustická spektroskopie (PAS) (pro měření práškových vzorků), a pokrokům v technikách vícesložkové analýzy a chemometrie. Díky těmto výhodám byl také oživen zájem o studium a analýzu potravin pomocí MIR spektroskopie. Stejně jako NIR spektroskopie se tato metoda využívá ke kvantitativnímu stanovení hlavních složek potravy. MIR spektroskopie byla použita pro stanovení jednotlivých cukrů (glukózy, fruktózy, sacharózy) a celkového obsahu cukrů v různých džusech a nápojích<sup>79</sup>. Široké použití má tato metoda v analýze tuků a olejů, kde se používá ke stanovení izolovaných dvojných vazeb trans izomerů, což je oficiální metoda AOCS (American Oil Chemists Society), AOAC (Association of Official Analytical Chemists) a IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry)<sup>74</sup>. V průmyslu se dále hodně používá k monitorování katalytických hydrogenačních procesů, k charakterizaci částečně hydrogenovaných olejů a jako alternativní metoda pro stanovení peroxidového čísla tuku. MIR spektroskopie byla použita pro kvantitativní stanovení minoritních složek olejů, jako jsou volné mastné kyseliny v rafinovaných a surových olejích,  $\beta$ -karoten v palmovém oleji nebo fosfolipidy v rostlinných

olejích. Z kvalitativního hlediska byla tato metoda uplatněna například ke studiu polymorfních přeměn olejů, k charakterizaci a ověření pravosti tuků a olejů z různých zdrojů. MIR spektroskopie se používá ke studiu syrovátky, kaseinu, sojových a vaječných bílkovin. Využívá se ke studiu sekundární struktury proteinů<sup>80</sup> a k monitorování změn sekundární struktury proteinů během tvorby gelu jako jedné z vlastností, která se u těchto potravinových proteinů sleduje vzhledem k tomu, že se hojně používají v potravinářském průmyslu jako přísady<sup>74</sup>. Dále se používá ke kvantitativnímu stanovení celkového obsahu proteinů v potravinách (mléko, ryby, maso) a také ke stanovení různých druhů proteinů v potravinářských výrobcích. MIR spektroskopie se kromě uvedených příkladů analýz čtyř hlavních složek používá také k analýze minoritních složek potravy, k ověření pravosti a pančování potravinových výrobků<sup>81</sup>.

Ramanova spektroskopie stejně jako MIR spektroskopie poskytuje informace o základních vibračních módech specifických funkčních skupin, které molekula vzorku obsahuje, a tudíž podává užitečné informace pro kvalitativní identifikaci potravin a potravinových doplňků jakož i pro monitorování změn vyvolaných interakcí s jinými složkami nebo za různých podmínek zpracování. Hlavní výhodou Ramanovy spektroskopie pro studium potravin je její všestrannost pokud jde o vzorkování a použitelnost pro studium molekul ve vodných roztocích, nevodných kapalinách, vláknech, tenkých vrstvách, prášcích, gelech nebo krystalických formách<sup>74</sup>. K získání Ramanova spektra je vyžadována malá nebo žádná příprava vzorku a vzorky mohou být analyzovány přímo ve skleněných nádobách. Voda, která je všudypřítomná ve většině potravin, není silně Ramanově rozptylující, čili nezpůsobuje významné interference u většiny analýz. Ramanova spektroskopie nebyla doposud přijata jako rutinní analytická metoda pro potraviny, ale současné pokroky v posledních 10-15 letech vedly rozhodně k jejímu rostoucímu použití jak pro základní výzkum k objasnění strukturních a konformačních změn, vyskytujících se během zpracování potravin, tak pro kontrolu kvality potravin, identifikaci složení, k zjištění pančování a ověření pravosti potravin<sup>82</sup>. Ramanova spektroskopie se stejně jako předešlé metody primárně používá k analýze hlavních složek potravin a to tuků, proteinů, sacharidů a vody. Dále se využívá k analýze minoritních složek, jako jsou karotenoidové pigmenty, potravinová a syntetická barviva, anthokyaniny, a dokonce také k analýze mikroorganismů a obalového materiálu, který je v kontaktu s potravinami.

### 2.3.1 Analýza mléčných výrobků

V posledních letech je zaznamenáván mírný růst spotřeby mléčných výrobků, které jsou jednou ze součástí zdravé výživy, protože populace mění své stravovací návyky a dále se více zajímá o kvalitu potravin a složení výrobků. Zvýšený zájem o kvalitu potravin a metod výroby je také v důsledku industrializace a globalizace obchodních řetězců<sup>83</sup>. Požadavky na vysokou kvalitu a bezpečnost potravinových výrobků mohou být splněny díky precizní výrobní kontrole a monitorování jak kvalitativních indikátorů, tak faktorů, které mají vliv na konečnou kvalitu výrobků. K naplnění těchto požadavků se používají vhodné analytické metody s požadovanými vlastnostmi, mezi které patří rychlost, jednoduché použití, minimální nebo žádná úprava vzorku a nedestruktivnost. Uvedené vlastnosti jsou charakteristické pro metody vibrační spektroskopie, které se používají jako užitečný nástroj v analýze a zabezpečení kvality sýrů, jogurtů a dalších fermentovaných mléčných výrobků. Někteří výrobci musí také prokazovat původ svých výrobků a právě aplikace vibrační spektroskopie jeví vynikající potenciál pro řešení této problematiky. Metody vibrační spektroskopie (NIR, MIR, Ramanova spektroskopie) se hojně používají v mlékárenském průmyslu, kde se, mimo jiné, uplatňují k charakterizaci mléčných výrobků (mléka, sýrů, jogurtů, atd.). Metoda infračervené spektroskopie je standardní AOAC metoda používaná v analýze mléka<sup>84</sup>. Tato práce je zaměřena pouze na použití vibrační spektroskopie v analýze sýrů.

Jak již bylo zmíněno v předchozí kapitole, vibrační spektroskopie (MIR, NIR) se nejvíce využívá k analýze hlavních složek potravin a ne jinak tomu je i u mléčných výrobků, resp. sýrů. Infračervená spektroskopie je dobře prozkoumanou technikou používanou k analýze složení různých druhů sýrů, která zahrnuje stanovení vlhkosti, tuků a proteinů<sup>85</sup>. K analýze složení sýrů je mnohem více používána NIR spektroskopie než MIR spektroskopie. McQueen a kol. použili odrazovou techniku ATR pro predikci obsahu proteinů, tuků a vlhkosti u 24 vzorků sýrů<sup>86</sup>. MIR spektroskopie byla rovněž použita pro stanovení tuků a proteinů plnotučného a odtučněného sýru Čedar během jeho zrání<sup>87</sup>. Rovněž technika ATR byla využita k rychlému stanovení složení 20 švýcarských sýrů v různých stupních zralosti<sup>88</sup>.

Témata objevující se v potravinářském sektoru jsou originalnost produktu a ověřování pravosti<sup>89</sup>. Tyto oblasti jsou hlavním zájmem nejen pro spotřebitele, ale také pro výrobce a distributory<sup>90</sup>. Například v Evropě je několik sýrů, které jsou chráněny Evropskou komisí

pro regulace, která chrání produkty uznávané kvality a původu pod chráněným označením původu (Protected Designation of Origin, PDO), chráněným zeměpisným označením (Protected Geographical Indication, PGI) a označením zaručená tradiční specialita (Traditional Specialities Guaranteed, TSG). Metody infračervené spektroskopie jsou využívány ke studiu této problematiky, tj. ke kontrole pravosti a určení geografického původu různých druhů zrajících sýrů. Karoui a kol. použili MIR spektroskopii v transmisním módu k rozlišení 166 vzorků sýrů Ementál vyráběného během léta (72 vzorků) a zimy (93 vzorků) v Německu, Rakousku, Finsku, Francii a Švýcarsku<sup>91</sup>. Karoui a kol. publikovali, že MIR spektroskopie podává významné (relevantní) informace o zeměpisném původu jak experimentálního francouzského tvrdého sýru Jura, tak švýcarských sýrů Gruyère a l'Etivaz PDO<sup>92</sup>. NIR (difuzní reflektance) a MIR (ATR a transmisní měření) spektroskopie byly použity k rozlišení malého počtu sýrů Ementál z pěti různých zemí (Švýcarsko, Německo, Francie, Rakousko a Finsko)<sup>93</sup>. V této disertační práci byla použita MIR spektroskopie pro kontrolu pravosti a rozlišení různých druhů sýrů typu Tvarůžek a Romadúr<sup>94</sup>.

Kvalita sýrů je jedním z důležitých znaků ovlivňujících spotřebitelský zájem. Textura, stupeň zrání a organoleptické vlastnosti (barva, senzorická analýza) v průběhu zrání sýrů jsou příklady znaků, které byly studovány metodami vibrační spektroskopie a publikovány mnoha autory. MIR spektroskopie byla použita Martínem-del-Campem a kol. k monitorování procesu zrání měkkých sýrů typu Camembert<sup>95</sup>. Další studie ukázaly, že MIR spektroskopie je vhodnou metodou pro charakterizaci změn proteinů během zrání sýrů<sup>96</sup>, k rozlišení sýrů v různých stádiích zrání<sup>97</sup> či k predikci obsahu ve vodě rozpustného dusíku, jako indikátoru zrání sýru<sup>98</sup>. Downey a kol. použili NIR spektroskopii k odhadu zralosti a senzorických vlastností sýru Čedar<sup>99</sup>. FTIR technika byla aplikována také k rychlé analýze kvality vůně sýru Čedar<sup>100</sup>. Mikroflóra sýrů během jejich zrání má značný vliv na vůni a texturu sýrů. Lefier a kol. ukázali, že MIR spektroskopie může být použita jako rychlá a robustní metoda pro kvantitativní analýzu mikroflóry sýrů<sup>101</sup>. Metody infračervené spektroskopie byly dále využity k studiu různých kmenů *Yarrowia Lipolytica* a jejich příspěvků na zrání sýru (proteolytická aktivita)<sup>102</sup>, k monitorování účinků přidaných kultur během zrání švýcarského sýru<sup>103</sup> a k monitorování populací mikroorganismů<sup>104</sup>. Pillonel a kol. využili NIR spektroskopii k předpovědi barvy evropského sýru Ementál<sup>105</sup>.



Sýry obsahují kromě majoritních složek také minoritní složky, které mají vliv na kvalitu sýrů. Během zrání sýrů byl pomocí metod vibrační spektroskopie studován například obsah vybraných aminokyselin<sup>106</sup>, obsah kaseinu v ovčím sýru<sup>107</sup> a celkových trans mastných kyselin<sup>108</sup>. Dále byly metody použity pro monitorování volných mastných kyselin ve švýcarských sýrech<sup>109</sup>, k měření organického fosforu a vázaného vápníku v sýru čedar<sup>110</sup>, ke stanovení pH, různých forem dusíku a kyseliny mléčné<sup>111</sup> a k analýze sýřeniny<sup>112</sup>. NIR a MIR spektroskopie byly také aplikovány ke studiu doby skladování vzhledem k zachování čerstvosti sýru Crescenza<sup>113</sup>.

V této disertační práci byla infračervená a Ramanova spektroskopie použita pro studium biogenních aminů v různých druzích sýrů.

### **2.3.1.1 Charakteristika studovaných látek**

V této kapitole je stručně charakterizován mléčný výrobek (Olomoucké tvarůžky) a biologicky aktivní látky (biogenní aminy), které byly studovány v rámci této práce.

#### **Olomoucké Tvarůžky**

Olomoucký tvarůžek je originální český sýr vyráběný podle tradiční receptury již od roku 1876 firmou A.W. v Lošticích. Pravý olomoucký tvarůžek (zvaný též olomoucký syreček) je odtučněný, měkký a pod mazem zrající sýr, který se vyrábí z netučného tvarohu, mlékárenských kultur, jedlé soli a regulátorů kyselosti<sup>114</sup>. Tento stolní sýr má zcela ojedinělou pikantní chuť, typickou vůni, povrch se zlatožlutým mazem a soudržnou poloměkkou až měkkou konzistencí s patrným světlejším jádrem. Vyrábí se z nesýřeného speciálně upraveného tvarohu ve dvou stupních zrání, během kterého dochází k proteolytickému rozkladu bílkovin, dávající tvarůžkům jejich charakteristickou a nezaměnitelnou chuť a vůni. Díky svým nutričním hodnotám, především nízkému obsahu tuku, se olomoucké tvarůžky řadí na první místo mezi sýry. V roce 2010 získaly pravé olomoucké tvarůžky chráněné zeměpisné označení (PGI) Evropské Unie.

Ramanova spektroskopie byla použita pro studium chemického složení povrchové a vnitřní části olomouckého tvarůžku<sup>115</sup>.

## Biogenní aminy

Biogenní aminy (BA) jsou nízkomolekulární dusíkaté organické látky, které se přirozeně vyskytují u živočichů, rostlin a mikroorganismů, kde plní významné fyziologické funkce.

V potravinách vznikají především dekarboxylací přirozených aminokyselin působením bakteriálních dekarboxyláz, kterými jsou vybaveny četné druhy hnilobných bakterií, ale také řada druhů bakterií mléčného kvašení<sup>116</sup>. Dále vznikají při výrobě, zrání a skladování fermentovaných potravin, jako jsou sýry, ryby, masné výrobky, pivo, víno a kysané zelí. V mléčných produktech, zejména sýrech, lze nalézt vysoká množství biogenních aminů, protože představují ideální prostředí pro jejich tvorbu. Nejčastějšími BA vyskytujícími se v mléčných výrobcích jsou tyramin, histamin, putrescin, kadaverin, tryptamin a fenylethylamin. Biogenní aminy jsou řazeny mezi přirozené toxické látky. V nižších koncentracích jsou pro organismus nepostradatelné, podílejí se na zajištění správného fungování organismu. Ve vyšších koncentracích mají naopak nepříznivý vliv na organismus, stávají se tak toxickými a mohou se projevovat jako psychoaktivní a vasoaktivní látky<sup>117</sup>. Tyramin a histamin se z toxikologického hlediska řadí mezi nejdůležitější BA, které mohou mít ve vysokých koncentracích negativní vliv na lidské zdraví.

Stanovení biogenních aminů v potravinách je důležité jednak z důvodu jejich potenciální toxicity a jednak z důvodu možnosti jejich použití jako ukazatelů kvality potravin, využívají se jako indikátory čerstvosti potravin<sup>117</sup>. Analytické metody, které se používají pro stanovení BA v potravinách, jsou tenkovrstvá chromatografie (TLC), plynová chromatografie (GC), kapilární elektroforéza (CE) a vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). HPLC pracující v systému reverzních fází (RP-HPLC) je v praxi nejpoužívanější metodou<sup>118</sup>. Dále byla pro stanovení BA v tvarůžcích použita infračervená spektroskopie v blízké infračervené oblasti<sup>119</sup>. Tato disertační práce se zabývala možností použití MIR a Ramanovy spektroskopie ke studiu BA v sýrech.

### 2.3.2 Analýza vína

Víno je v České republice stále oblíbenější alkoholický nápoj, což dokazuje průzkum Státního zdravotního ústavu provedený v roce 2012, podle kterého v ČR roste konzumace vína (z celkového objemu spotřeby alkoholu připadá 58 % pivu, 30 % vínu a 12 % lihovinám)<sup>120</sup>. Nejenže roste zájem i o vinařskou turistiku, ale také se konzumenti více zajímají o kvalitu konzumovaného vína<sup>121</sup>. Vyrobit kvalitní víno je bezesporu hlavní prioritou každého vinaře a vinařství. Kvalita vína je dána jak surovým materiálem (vinné hrozny), který je ovlivněn odrůdou, půdními a klimatickými podmínkami, tak technologií zpracování a výroby vína, která zahrnuje tyto operace: lisování, fermentaci a školení vína (síření, čištění, filtrace a zrání). Velký počet chemických parametrů, mezi které patří například obsah ethanolu, glycerolu, oxidu siřičitého, glukózy, fruktózy, celkových kyselin a fenolických látek, má významný vliv na kvalitu hotových vín<sup>122</sup>. Stanovení těchto parametrů je uskutečňováno pomocí analytických metod, které jsou dány příslušnou vyhláškou a tradičních metod, mezi které patří kapalinová chromatografie, plynová chromatografie a kapilární elektroforéza. Spektroskopické metody, zejména NIR a MIR spektroskopie, nacházejí uplatnění ve vinařském průmyslu díky jejich univerzálnosti a ekonomické nenáročnosti<sup>123</sup>. Používají se pro kvalitativní a kvantitativní analýzu. V analýze vína se využívají, jako nepřímé analytické metody, které jsou vhodné pro rychlý screening chemického složení hroznů a vína a dále pro monitorování změn chemického složení od začátku zrání hroznů, přes vinný mošt, fermentaci až pro hotové víno.

Jedním z nejdůležitějších faktorů určujících kvalitu hotových vín je chemické složení bobulí hroznů. Hotové víno kromě vody a ethanolu obsahuje také methanol, glycerol, sacharidy (glukóza, fruktóza), kyseliny (vinná, jablečná, mléčná, gallová, citrónová), minerální látky (K, Ca, Na, Mg), dusíkaté látky (aminokyseliny, amonné ionty, bílkoviny), aromatické látky, fenolické látky (flavonoidy, anthokyaniny, atd.), taniny a vitamíny (převážně vitamíny skupiny B). Metody vibrační spektroskopie se uplatňují k monitorování a stanovení chemického složení hroznů a vína. Měření obsahu ethanolu byla první aplikace NIR spektroskopie ve vinařském průmyslu<sup>124</sup>. Patz a kol. publikovali první výsledky porovnání FT-IR predikce s referenční metodou (měření hustoty destilátu)<sup>125</sup>. Několik publikací se věnuje stanovení vybraných chemických parametrů jako je například pH, obsah ethanolu, organických kyselin, redukujících cukrů, SO<sub>2</sub> u různých druhů vín pomocí metod NIR a MIR spektroskopie<sup>126,127</sup>. Shen a kol. použili MIR spektroskopii také k predikci cukrů a kyselin

v čínském rýžovém víně<sup>128</sup>. Pomocí MIR spektroskopie byly kvantifikovány také některé zajímavé sloučeniny vína, mezi které patří anthokyaniny, taniny a fenolické sloučeniny. Tyto sloučeniny se staly ve vinařství důležitým předmětem zájmu díky tomu, že mají vliv na organoleptické vlastnosti vína, které určují jeho výslednou kvalitu.

Fermentace vína (kvašení) je složitý proces, ve kterém je vinný mošt přeměněn v důsledku mikrobiální činnosti na vysoce hodnotný produkt, víno. Velmi důležitou fází během výroby vína je kontrola fermentačního procesu, během kterého je důležité sledovat jak koncentraci substrátů a produktů (přeměna cukrů na ethanol, jablečné kyseliny na mléčnou kyselinu), tak vyhodnocení dalších parametrů kvality finálního výrobku. NIR a MIR spektroskopie byla využita jako rychlá metoda k monitorování fermentace červeného vína<sup>129</sup>. Urtubia a kol. prozkoumali použitelnost MIR spektroskopie k detekci prvních náznaků problémů při kvašení vína<sup>130</sup>. Dále byla použita NIR spektroskopie k učení koncentrace fenolických sloučenin během fermentace červeného vína<sup>131</sup>.

Metody vibrační spektroskopie nacházejí také široké uplatnění v kvalitativní analýze vína, která zahrnuje rozlišování a ověření pravosti vín. ATR technika byla použita pro rozlišení řeckých červených vín na základě různého původu a odrůd hroznů<sup>132</sup>. Zhang a kol. použili MIR spektroskopii k rozlišení různých suchých červených vín od různých výrobců<sup>133</sup>. MIR spektroskopie byla také použita k diskriminaci různých odrůd červeného vína na základě extrakce fenolických sloučenin<sup>134</sup> a různých druhů australských vín<sup>135</sup>. Ve vinařském průmyslu se setkáváme s problémem pančování vína, které spočívá například v ředění vín vodou, přidávání alkoholu, barviv a aromatických látek nebo v záměrném zkreslení údajů na etiketách o odrůdě či zeměpisném původu. Hlavní aplikace spektroskopických metod v oblasti pančování vína je klasifikace vína podle zeměpisného původu, odrůd hroznů a podmínek zrání. Cozzolino a kol. použili metody vibrační spektroskopie k rozlišení vína Sauvignon Blanc z Nového Zélandu a Austrálie<sup>136</sup>. MIR spektroskopie byla aplikována k diskriminaci australských vín podle jejich odrůd<sup>137</sup>. Na základě MIR a NIR spekter byla rozlišena červená vína, která zrála za různých podmínek (dubové sudy, nerezové sudy a ocelové tanky s přidavkem dubových třísek)<sup>138</sup>.

O tom, že má víno pozitivní vliv na lidské zdraví, se vědělo už od nejstarších dob. Je to zejména díky obsahu velké skupiny fenolických látek, kterou tvoří z 85 % flavonoidní látky (katechin, quercetin, anthokyaniny, taniny) a zbytek tvoří látky neflavonoidní (fenolické

kyseliny, resveratrol). Z pohledu vinařského průmyslu, hrají fenolické látky důležitou roli, jelikož jsou zodpovědné za organoleptické vlastnosti vína (barva, chuť, trpkost) a mají tak vliv na kvalitu hroznů i hotových vín. Metody vibrační spektroskopie se využívají jak ke kvantitativní analýze fenolických látek, tak kvalitativní analýze. MIR spektroskopie byla využita pro monitorování obsahu fenolických látek v hroznech během jejich zrání a ve víně, které bylo připraveno experimentálně<sup>139,140</sup>. NIR spektroskopie byla použita ke stanovení fenolických látek v červených vínech<sup>141</sup> a ve slupkách hroznů během zrání<sup>142</sup>. Aplikace ATR metody byla využita pro predikci obsahu celkových fenolů a flavonoidů dezertních vín<sup>143</sup>. Extrakty fenolických látek byly využity k rozlišení různých odrůd červených vín pomocí MIR spektroskopie<sup>134</sup>. Některé fenolické látky, které jsou obsažené ve víně, patří mezi přírodní antioxidanty, a proto se u vín sleduje také jejich antioxidační kapacita. Versari a kol. aplikovali MIR spektra k predikci celkové antioxidační kapacity červených vín<sup>144</sup>.

## 2.4 Vibrační spektroskopie a chemometrie

Metody vibrační spektroskopie jsou velice úzce spjaty s chemometrií, což je aplikace statistiky pro chemická měření neboli statistické zpracování experimentálních dat. Díky rozvoji počítačové techniky a multivariačních statistických metod, si vyhodnocení spektrální dat bez těchto pomocníků dnes neumíme již představit. Spojení vibrační spektroskopie a chemometrických metod vytváří velmi užitečný nástroj jak pro kvantitativní tak kvalitativní analýzu nejen v potravinářském průmyslu, ale ve všech odvětvích (farmacie, kriminalistika, medicína, atd.). Multivariační kalibrace a klasifikační metody využívají předchozích znalostí o objektech (vzorcích) k vytvoření přenosových funkcí, které přemění spektra na kvantitativní predikce analytů nebo tříd<sup>145</sup>. Vibrační spektra komplexních vzorků, jako jsou třeba potraviny, poskytují bohaté spektrální informace o jejich kvantitě, kvalitě a struktuře. Nejúspěšnější přístup k extrahování těchto informací z vibračních spekter je použití multivariačních statistických metod. Nejběžnější metody používané v kvantitativní analýze jsou metoda částečných nejmenších čtverců (partial least-squares; PLS) a regrese hlavních komponent (principal component regression; PCR). V kvalitativní analýze se k rozlišení či diskriminaci využívají například metody diskriminační analýzy (DA) a PLS.

V kvantitativní analýze lze využít jednoduchého Lambertova-Beerova zákona, pro stanovení koncentrace látky, která je přímo úměrná její absorpční při dané vlnové délce, resp. vlnočtu. Tento vztah je však ovlivněn přítomností jiných látek, které absorbují při stejné vlnové délce. Z tohoto důvodu se více využívají chemometrické metody, zejména PLS, pro vyhodnocení kvantity komplexních spekter s překrývajícími se pásy. Metoda PLS je robustní statistická metoda, která byla vyvinuta v 70. letech 20. století Hermanem Woldem<sup>146</sup>. V infračervené spektroskopii se velmi často využívá, neboť umožňuje komprimovat obsáhlou matici spektrálních dat, ve které je počet spektrálních proměnných převeden na mnohem menší počet hlavních komponent (tzv. PLS faktorů)<sup>147</sup>. Komprimovaná spektrální resp. kvantitativní matice je ortogonální transformací převedena na matici latentních proměnných. Výsledkem této metody je regresní závislost mezi oběma maticemi latentních proměnných, tj. závislost mezi spektrálními daty (nezávislá proměnná) a např. koncentrací (závislá proměnná). Ke konstrukci kalibračního modelu jsou používána naměřená infračervená spektra kalibračních a validačních standardů a kvantitativní hodnoty získané pomocí referenčních metod. Výstupem PLS metody je lineární regrese mezi vloženými kvantitativními hodnotami a hodnotami vypočtenými kalibračním modelem. Kvalita kalibračního modelu je charakterizována korelačním koeficientem lineární regrese (*Corr. Coeff.*) a chybou kalibrace (*Root Mean Square Error of Calibration – RMSEC*), která je dána vztahem:

$$RMSEC = \sqrt{\left(\sum (C_{ie} - C_{ir})^2 / m_c\right)}, \quad (10)$$

kde  $C_{ie}$  je vypočtená koncentrace i-tého kalibračního standardu,  $C_{ir}$  je zadaná hodnota i-tého kalibračního standardu a  $m_c$  je počet kalibračních standardů<sup>147</sup>.

Výsledky analýzy validačních standardů slouží k výpočtu chyby predikce (*Root Mean Square Error of Prediction – RMSEP*), která charakterizuje kvalitu predikční schopnosti vytvořeného kalibračního modelu a je dána vztahem:

$$RMSEP = \sqrt{\left(\sum (C_{iev} - C_{irv})^2 / m_v\right)}, \quad (11)$$

kde  $C_{iev}$  je vypočtená koncentrace i-tého validačního standardu,  $C_{irv}$  je zadaná hodnota i-tého validačního standardu a  $m_v$  je počet použitých validačních standardů<sup>147</sup>.

Metoda PLS je vhodná v případě, kdy matrice analyzovaných vzorků není přesně definována nebo dochází k překrytí spektrálních pásů. Mezi výhody této multivariační metody patří

stanovení více analytů z jednoho spektra a umožnění kalibrace za použití pásů nebo regionů komponent, které se silně překrývají. Složitý matematický algoritmus a potřeba značného množství standardů nutných k vytvoření spolehlivého kalibračního modelu jsou naopak nevýhody této metody.

Multivariační statistické metody se ve vibrační spektroskopii využívají také k účelu rozřídění analyzovaných látek, například podle zeměpisného původu či odrůd. Jednou z těchto spektrálních klasifikačních metod je diskriminační analýza (DA), která hodnotí rozdíly mezi dvěma nebo více skupinami objektů charakterizovaných pomocí několika znaků, tzn., určuje třídu (nebo třídy), které jsou nejpodobnější neznámému materiálu. Klasifikace pomocí DA vyžaduje sestavení kalibračního modelu, ve kterém je specifikováno více tříd, které jsou popsány libovolným počtem standardů. Klasifikační pravidla (matematický algoritmus), která jsou používána k vytvoření kalibračního modelu, interpretují vibrační spektrum jako bod v dimensionálně redukovaném faktorovém prostoru. Výsledkem této metody je jméno třídy (nebo tříd), které jsou nejpodobnější posuzovanému vzorku, a graf vyjadřující závislost Mahalanobisovy vzdálenosti mezi jednotlivými třídami. Mahalanobisova vzdálenost je vzdálenost hodnoceného spektra od těžiště každé třídy; takto lze „kvantifikovat“ kvalitu neznámého materiálu.

### 3 CÍLE PRÁCE

Cílem disertační práce byla aplikace infračervené a Ramanovy spektroskopie v analýze biologicky aktivních látek ve vybraných potravinách. Konkrétně byly naplánovány tyto cíle:

- aplikace obou metod v analýze mléčných výrobků
  - o Kontrola kvality a pravosti sýrů typu Tvarůžek a Romadúr
  - o Analýza biogenních aminů v tvrdých sýrech
- aplikace FTIR v analýze vín
  - o Analýza vín v různých technologických fázích výroby

Některé výsledky této disertační práce jsou obsahem 2 publikací v impaktovaných časopisech:

- **Hruziková J.**, Milde D., Krajancova P., Ranc V.: *Discrimination of cheese products for an authenticity control by infrared spectroscopy*. J.Agric.Food Chem. 60, 1845 - 1849 (2012).
- **Preserova J.**, Ranc V., Milde D., Kubistova V., Stavek J.: *Study of phenolic profile and antioxidant activity in selected Moravian wines during winemaking process by FT-IT spectroscopy*. J. Food Sci. Technol. doi: 10.1007/s13197-014-1644-8 (2014).



## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Chemikálie a přístrojové vybavení

#### Chemikálie

Použity byly následující chemikálie:

- gallová kyselina, p.a., Fluka, Buchs, Švýcarsko
- askorbová kyselina, p.a., LACH-NER, Neratovice, ČR
- kyselina chlorovodíková 36 %, p.a., Fluka, Buchs, Švýcarsko
- hydroxid amonný 24%, p.a., Fluka, Buchs, Švýcarsko
- diethylether, p.a., Penta, Praha, ČR
- deionizovaná voda, Milli-Q, Millipore, USA

#### Přístrojové vybavení

- Infračervená a Ramanova spektroskopie

Měření infračervených spekter bylo provedeno na FTIR spektrometru Nicolet 6700 (Thermo Scientific, USA), umožňujícím i odrazové měření pomocí ATR nástavce. FTIR spektrometr je vybaven zdrojem záření ETC EverGlo, detektorem DTGS KBR a KBr děličem paprsků. Jednoodrazový ATR krystal je vyroben ze ZnSe.

Měření Ramanových spekter bylo provedeno na Nicolet NXR FT-Raman modulu, vybaveném zdrojem záření Nd:YAG (1064 nm), detektorem InGaAs a CaF<sub>2</sub> děličem paprsků.

Experimentální parametry měření k jednotlivým metodám jsou uvedeny níže, v kapitole 4.2.

- Lyofilizátor (ALFA 1-2 LD plus, Christ, SciQuip Ltd.)
- UV/VIS spektrometr Lambda 25 (Perkin Elmer, USA)

## 4.2 Použité vzorky, postupy a metody v analýze mléčných výrobků

### 4.2.1 Zrající sýry

#### Vzorky

Ke kvalitativní analýze bylo použito čtyř druhů sýrů typu Tvarůžek a čtyř druhů sýrů typu Romadúr, které byly zakoupeny v různých lokálních supermarketech. Jednotlivé zrající sýry jsou popsány v tabulce 2.

**Tabulka 2** Vzorky zrajících sýrů

Název výrobku	Země původu	Název třídy
Olomoucké tvarůžky	Česká republika	Olomoucké tvarůžky (A1)
Jemné tvarůžky Loose	Německo	Jemné tvarůžky 1 (A2)
Jemné tvarůžky	Německo	Jemné tvarůžky 2 (A3)
Quargel natur	Rakousko	Rakouské tvarůžky (A4)
Romadúr	Česká republika	Romadúr 1 (B1)
Original Rahm-Romadur (St. Mang)	Německo	Romadúr 2 (B2)
Jarošovský dezertní pivní sýr	Česká republika	Pivní sýr (B3)
Sedlčanský Romadůžek	Česká republika	Romadůžek (B4)

#### Postup přípravy vzorků

Jednotlivé vzorky zrajících sýrů byly nakrájeny na kostičky o velikosti přibližně 0,5 cm. Takto připravené vzorky byly dvěma různými způsoby vysušeny, z důvodu eliminace vody. První způsob sušení spočíval v umístění vzorků sýrů do exsikátoru, kde byly sušeny za laboratorní teploty po dobu 6 dní. Druhým způsobem byla lyofilizace, pomocí které byly vzorky sýrů sušeny po dobu 24 hod. Lyofilizace vzorků probíhala ve dvou krocích – hlavní sušení, které probíhalo při teplotě -42 °C a tlaku 0,097 mbar a konečné dosušování probíhajícího při teplotě -55 °C a tlaku 0,0049 mbar.

## **Pracovní postup – podmínky měření**

Infračervená spektra jednotlivých vzorků zrajících sýrů byla získána na základě měření jejich plynné fáze. Pro měření odpovídající plynné fáze bylo nutné vysušené zrající sýry zahřát. Pro zjištění optimálních podmínek zahřívání byly studovány dva parametry - teplota a doba zahřívání.

Optimální podmínky zahřívání byly zjištěny na základě měření plynné fáze Olomouckého tvarůžku, který byl zvolen jako modelový vzorek. Na základě interpretace FTIR spekter plynné fáze byly vybrány dva nejintenzivnější spektrální pásy ( $966$  a  $930\text{ cm}^{-1}$ ) jako indikátory zahřívacího procesu. Pro studium experimentálních podmínek byly tvarůžky kontrolovaně zahřívány při teplotě od  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$  do  $150\text{ }^{\circ}\text{C}$  v 30 minutových časových rozestupech v časovém intervalu 30 – 300 minut. Na základě plochy spektrálního píku ( $966\text{ cm}^{-1}$ ), za různých experimentálních podmínek, bylo provedeno vyhodnocení optimálních podmínek zahřívání (kap. 5.1.1, Obr. 6). Průměrné hodnoty plochy spektrálního pásu jsou uvedeny v tabulce 5 (kap. 5.1.1).

## **Použitá metoda**

Měření infračervených spekter plynné fáze jednotlivých vzorků zrajících sýrů bylo provedeno pomocí infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací. Transmisní měření plynné fáze bylo provedeno ve skleněné plynové kyvetě s efektivní délkou 10 cm a průměrem 2,5 cm opatřenou ZnSe okénky, ve které byly vysušené sýry (2 g) kontrolovaně zahřívány při teplotě  $120\text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu 90 minut. Infračervená spektra byla měřena v rozsahu  $4000 - 650\text{ cm}^{-1}$  při spektrálním rozlišení  $4\text{ cm}^{-1}$ . Měření infračervených spekter jednotlivých druhů zrajících sýrů bylo provedeno celkem třikrát po 64 skenech. Jako pozadí bylo použito spektrum prázdné skleněné kyvety s ZnSe okénky, které bylo zaznamenáno před každým měřením vzorku.

Kvalitativní vyhodnocení infračervených spekter plynné fáze bylo provedeno pomocí diskriminační analýzy.

## 4.2.2 Tvrdé sýry

### Vzorky

Ke kvalitativní analýze bylo použito šest druhů neuzených a uzených tvrdých sýrů, které byly vyrobeny z různých druhů mléka. Charakteristika jednotlivých sýrů je popsána v tabulce 3.

**Tabulka 3** Vzorky neuzených a uzených tvrdých sýrů

Název výrobku	Druh mléka	Země původu
<i>Neuzené tvrdé sýry</i>		
Pecorino prato sardo stagionato	kravské	Itálie
Montasio in quarti	kozí	Itálie
Caprottino Fresco	ovčí	Itálie
<i>Uzené tvrdé sýry</i>		
Uzený sýr přírodní	kravské	Španělsko
Uzený sýr kozí	kozí	Španělsko
Manchego DOP	ovčí	Holandsko

### Postup přípravy vzorků

Jednotlivé vzorky tvrdých sýrů byly nakrájeny na kostičky (přibližně o velikosti 0,5 cm) a vysušeny lyofilizací. Celková doba lyofilizace byla přibližně 20 hodin a probíhala ve dvou krocích – hlavní sušení, které probíhalo při teplotě -42 °C a tlaku 0,097 mbar a konečné dosušování probíhajícího při teplotě -66 °C a tlaku 0,0049 mbar.

### Postup extrakce biogenních aminů

Při analýze biogenních aminů byly tyto ze složité matrice vyextrahovány pomocí dále popsaného postupu. K extrakci bylo naváženo vždy 5 g lyofilizovaného tvrdého sýru, ke kterému bylo přidáno 20 ml deionizované vody upravené na pH 8, pomocí přídavku hydroxidu amonného. Zvolené pH bylo vybráno na základě předchozí studie vlivu pH na výsledná spektra. Tato směs byla dána do ultrazvukové lázně na 15 minut a poté byla dekantována do 50 ml dělicí nálevky. Vodná fáze byla v dělicí nálevce třepána s 10 ml

diethyletheru za laboratorní teploty po dobu 10 minut. Po oddělení fází a ustálení rovnováhy byla horní diethyletherová fáze použita k měření pomocí infračervené spektroskopie.

#### **Použitá metoda – Infračervená spektroskopie**

Měření jednotlivých extraktů všech druhů tvrdých sýrů bylo provedeno pomocí odrazové techniky ATR. Diethyletherový extrakt (20  $\mu$ l) byl nakápnut na ZnSe krystal pomocí pipety a po vysušení byla snímána infračervená spektra v rozsahu 4000 – 650  $\text{cm}^{-1}$  při spektrálním rozlišení 4  $\text{cm}^{-1}$ . Každý vzorek tvrdého sýru byl měřen třikrát a výsledné infračervené spektrum bylo průměrem 64 skenů. Jako pozadí byl brán referenční sken čistého ZnSe krystalu, který byl proveden před každým měřením.

#### **Použitá metoda – Ramanova spektroskopie**

Měření Ramanových spekter všech druhů tvrdých sýrů bylo provedeno na NXR FT-Raman modulu s 180 ° reflexní optikou. Jednotlivé vysušené vzorky sýrů byly rozetřeny (na prášek) v třecí misce s tloučkem a z takto upravených vzorků byly připraveny tablety pomocí speciálního nástavce. Ramanova spektra každého druhu tvrdého sýru byla zaznamenávána v oblasti 2500 – 400  $\text{cm}^{-1}$  s rozlišením 8  $\text{cm}^{-1}$  při 128 skenech. Jednotlivé druhy sýrů byly měřeny celkem třikrát.

### **4.3 Použité vzorky, postupy a metody v analýze vína**

#### **Vzorky**

Ke kvantitativní a kvalitativní analýze byly použity tři různé druhy vín: červené víno Frankovka, rosé víno Frankovka a cuveé bílé víno odrůd Rulandské bílé, Tramín červený a Sauvignon. Vzorky vín byly odebírány v různých fázích výrobního procesu do plastových nádobek a byly uchovávány v mrazáku při teplotě -20 °C. Popis jednotlivých vzorků vín s příslušným datem odběru a technologickou operací je uveden v tabulce 4. Vína byla získána z vinařství Víno J. Stávek, které sídlí ve vinařské obci Němčičky, okres Břeclav, Česká republika.

**Tabulka 4** Vzorky moravských vín v různých fázích technologické přípravy

Datum odběru	Červené víno		Růžové víno		Bílé víno	
	Označení vzorku	Technologická operace	Označení vzorku	Technologická operace	Označení vzorku	Technologická operace
16.10. 2011	C1	rmut	R1	rmut	B1	rmut
17.10. 2011	C2	Macerace slupek	R2	Mošt po maceraci	B2	Mošt po maceraci
22.10.;			R3	Fermentace	B3	Fermentace
23.10. 2011	C3	Fermentace	R4	Ukončení fermentace	B4	Fermentace, <sup>SO2</sup>
1.11. 2011	C4	Fermentace				
15.11. 2011	C5	Fermentace	R5_1	Školení vína	B5_1	Školení vína
			R5_2	Školení vína <sup>DF</sup>	B5_2	Školení vína <sup>DF</sup>
			R5_3	Školení vína <sup>CF</sup>	B5_3	Školení vína <sup>CF</sup>
11.3. 2012	C6	Zrání	R6	Zrání	B6	Zrání
25.6. 2012	C7	Hotové víno	R7	Hotové víno	B7	Hotové víno

<sup>SO2</sup> přídavek SO<sub>2</sub>

<sup>DF</sup> desková filtrace

<sup>CF</sup> cross-flow filtrace

### Použitá metoda

Měření infračervených spekter jednotlivých vzorků vín bylo provedeno pomocí odrazové techniky ATR. Na ZnSe krystal bylo nadávkováno 60 µl rozmraženého vzorku vína pomocí automatické pipety a následně bylo provedeno měření při pokojové teplotě. Infračervená spektra byla snímána v rozsahu 4000 – 650 cm<sup>-1</sup> a spektrálním rozlišením 2 cm<sup>-1</sup>. Každý vzorek vína byl měřen celkem třikrát a výsledné spektrum bylo průměrem 32 skenů. Jako pozadí byl brán referenční sken čistého ZnSe krystalu, který byl proveden před každým měřením.

Kvantitativní vyhodnocení infračervených spekter bylo provedeno pomocí chemometrické metody PLS. Pomocí této metody byl vyhodnocen obsah celkových fenolických látek (TPC) a celkové antioxidační aktivity (TAA) u jednotlivých vzorků vín. K vytvoření kalibračního modelu byla použita jednotlivá FTIR spektra vín a hodnoty TPC a TAA získané příslušnou spektrofotometrickou referenční metodou. Kalibrační modely byly také vytvořeny pro různé úpravy FTIR spekter – 1. a 2. derivace.

Diskriminační analýza byla použita pro kvalitativní vyhodnocení FTIR spekter všech druhů vín. Pomocí této metody byly vzorky jednotlivých druhů vín (červené, růžové a bílé víno) rozlišeny na základě jednotlivých technologických operací výrobního procesu, které byly rozděleny do 3 skupin. Jako indikátor rozdílnosti mezi jednotlivými skupinami byla použita Mahalanobisova vzdálenost.

## **Pracovní postupy – referenční metody**

### **Stanovení celkových fenolických látek**

Stanovení obsahu celkových fenolických látek u jednotlivých vzorků vín bylo provedeno na základě měření absorbance při vlnové délce 280 nm, vhodně zředěných vzorků vín, v 1 cm křemenné kyvetě<sup>148</sup>. Jako standard byla použita gallová kyselina, která byla použita pro přípravu kalibračních standardů v rozmezí koncentrací 2 – 14 mg l<sup>-1</sup>. Vyhodnocení obsahu TPC bylo provedeno na základě kalibrační křivky a rovnice lineární regrese a vypočtené obsahy TPC přepočítané na neředěné víno byly vyjádřeny v ekvivalentech standardu gallové kyseliny (v mg l<sup>-1</sup> GAE). Stanovení obsahu jednotlivých vzorků vín bylo provedeno v tripletech.

### **Stanovení celkové antioxidační aktivity**

Metoda FRAP (Ferric reducing-antioxidant potencial<sup>149</sup>) byla použita pro stanovení celkové antioxidační aktivity jednotlivých vzorků vín, na základě měření změny absorbance při vlnové délce 593 nm, vhodně zředěných vzorků vín, v 1 cm křemenné kyvetě<sup>150</sup>. Jako standard byla použita askorbová kyselina, ze které byly připraveny kalibrační standardy v rozmezí koncentrací  $1 \cdot 10^{-3}$  –  $5 \cdot 10^{-5}$  mol l<sup>-1</sup>. Vyhodnocení TAA bylo provedeno pomocí kalibrační křivky a rovnice lineární regrese. Hodnoty TAA přepočtené na neředěné víno byly vyjádřeny v jednotkách standardu askorbové kyseliny (v mmol l<sup>-1</sup> AAE).

## **4.4 Vyhodnocení experimentálních dat**

### **Použitý software**

K vyhodnocení experimentální dat a vibračních spekter byly použity následující programy:

Microsoft Excel, OriginPro 7.5G SR6 (OriginLab Corporation, USA) a QC. Expert 2.7 (TriloByte, Česká republika)

Měření a zpracování vibračních spekter bylo provedeno pomocí softwaru OMNIC 8 (Thermo Fisher Scientific Inc., Madison, USA) a statistické vyhodnocení experimentálních dat pomocí softwaru TQ Analyst 8 (Thermo Fisher Scientific Inc., Madison, USA).



## 5 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 5.1 Analýza mléčných výrobků

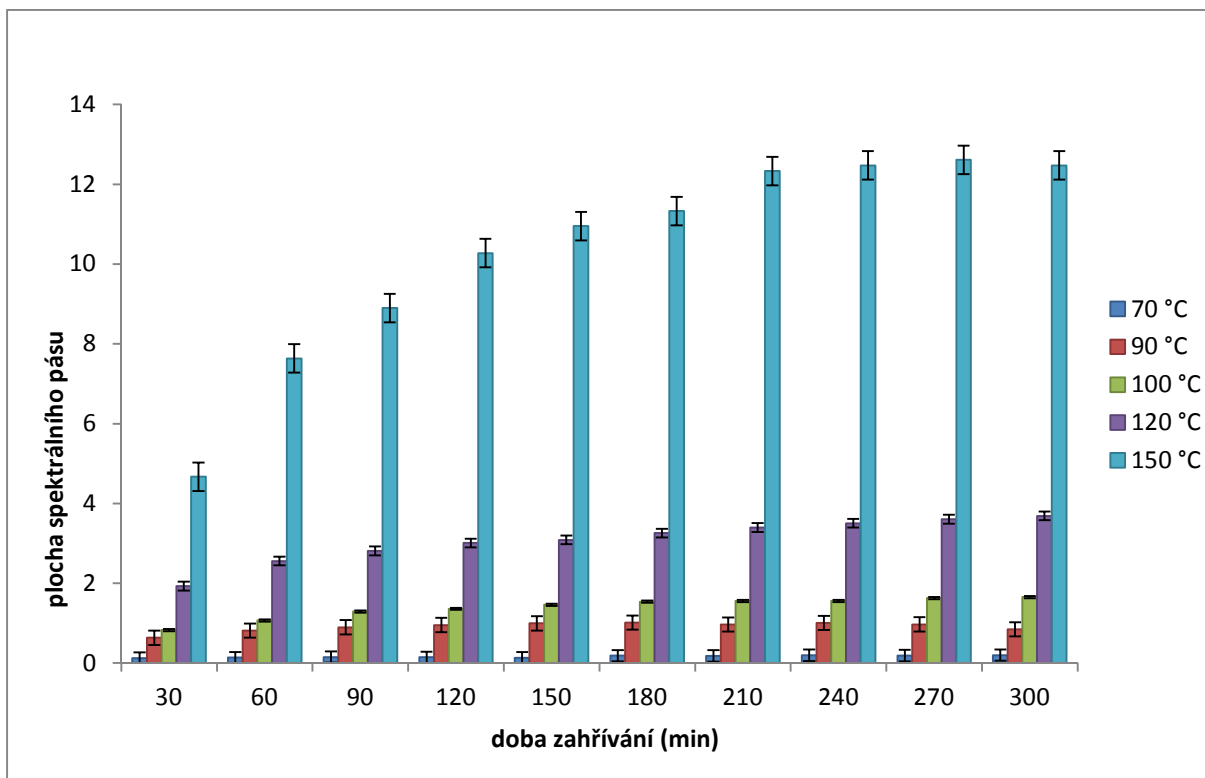
#### 5.1.1 Kontrola kvality a pravosti sýrů typu Tvarůžek a Romadúr

Tato kapitola se zabývá studiem vybraných zrajících sýrů typu Tvarůžek a Romadúr. Tyto sýry jsou charakteristické svou typickou vůní, na které se podílejí jak těkavé tak netěkavé sloučeniny, například mastné kyseliny s krátkým řetězcem, alkoholy, aldehydy, ketony a organické kyseliny. Jednou z důležitých charakteristik sýrů je jejich vůně, která spolu s jejich složením a výrobním procesem, hraje velmi důležitou roli v určení jejich kvality. Předmětem této práce bylo studium „vůně sýrů“ (plynné fáze), která byla použita jako diskriminační ukazatel mezi originálním výrobkem a jeho napodobeninou.

Cílem tohoto studia bylo použití FTIR spektroskopie pro kontrolu kvality a pravosti zrajících sýrů typu Tvarůžek a Romadúr. Tato metoda je založena na měření infračervených spekter plynné fáze jednotlivých druhů zrajících sýrů (Tab. 2, kap. 4.2.1), která byla získána po jejich kontrolovaném zahřívání. Dále byly studovány dvě různé přípravy vzorků (sušení v exsikátoru a lyofilizace) a dva parametry zahřívání vzorků (teplota a doba zahřívání). Výsledná kontrola pravosti byla založena na provedené diskriminační analýze.

#### Volba vhodných podmínek měření

Plynná fáze osmi různých druhů zrajících sýrů byla studována infračervenou spektroskopií. Pro studium plynné fáze bylo nutné vzorky vysušených sýrů zahřát. K získání nejlepších spektrálních výsledků byly studovány vybrané experimentální podmínky zahřívání tj. teplota a doba zahřívání. Vysušené Olomoucké tvarůžky byly zahřívány při teplotách 70, 90, 100, 120 a 150 °C a FTIR spektra byla měřena v 30 minutových intervalech. Celková doba zahřívání byla v časovém intervalu 30 – 300 minut. Experimentální podmínky byly vyhodnoceny na základě plochy nejintenzivnějšího spektrálního pásu ( $966\text{ cm}^{-1}$ ) pro všechny teploty a doby zahřívání. Výsledné plochy v závislosti na době zahřívání jsou uvedeny na obrázku 6.



**Obrázek 6** Sloupcový graf závislosti plochy píku na době zahřívání pro teploty 70, 90, 100, 120 a 150 °C. Chybové úsečky vyjadřují směrodatnou odchylku.

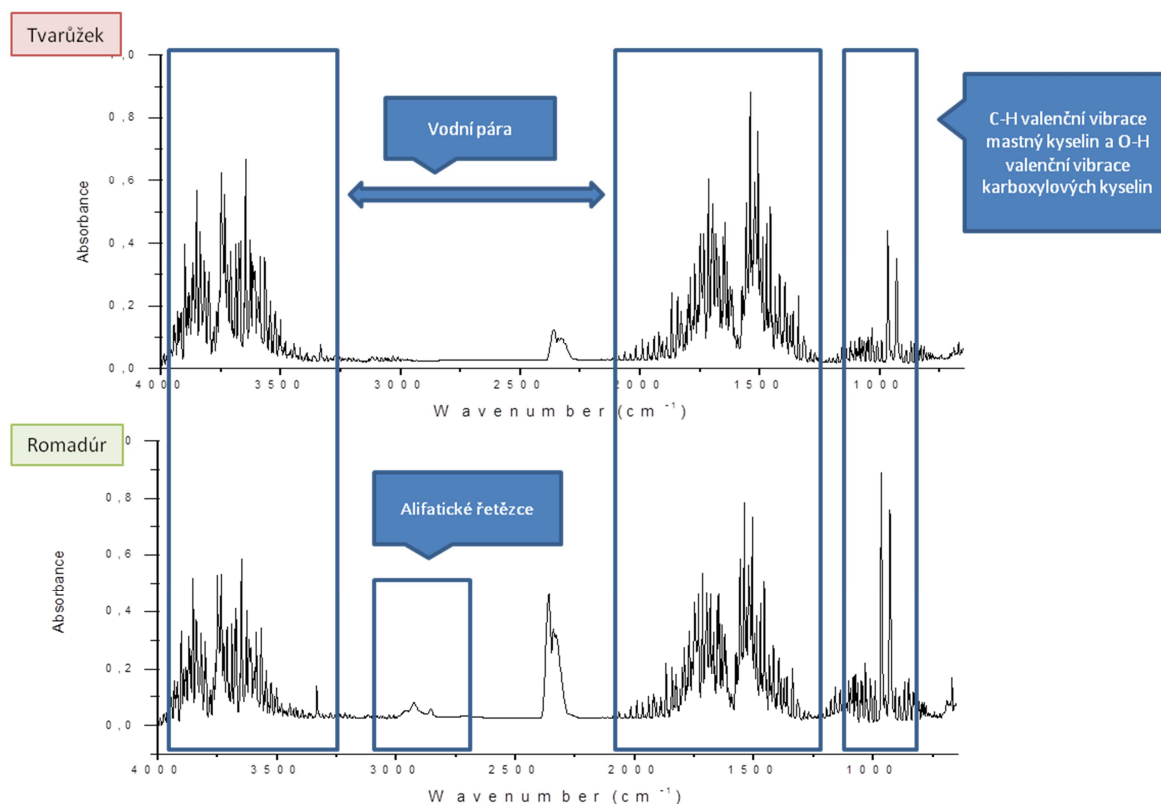
Ze sloupcového grafu (Obr. 6) je patrné, že plochy spektrálních pásů při teplotách 70, 90 a 100 °C jsou významně nižší než při teplotách 120 a 150 °C. Největší plochy byly dosaženy při teplotě 150 °C, při které však opakovatelnost měření byla nejhorší v porovnání s ostatními teplotami (Tab. 5). Nejmenší hodnota RSD byla vypočítána pro teplotu 100 °C, nicméně plocha píku při této teplotě byla menší než při teplotě 120 °C a pro dosažení srovnatelné plochy by vyžadovala delší dobu zahřívání. Na základě výše uvedených skutečností byla vybrána teplota 120 °C, která byla následně použita u všech dalších experimentů. Na základě růstu plochy spektrálního pásu při této teplotě (120 °C) byla vyhodnocena doba zahřívání. Největší nárůst plochy sledovaného pásu byl pozorován v časovém intervalu 30 – 90 minut. Naopak, méně významný nárůst byl v časovém intervalu 120 – 300 minut. Výsledné experimentální podmínky zahřívání (teplota 120 °C a doba zahřívání 90 minut) byly vybrány na základě dosažených výsledků měření a byly použity pro měření plynné fáze všech vzorků zrajících sýrů.

**Tabulka 5** Hodnoty plochy spektrálního pásu a relativní směrodatné odchylky plochy pro každou teplotu

Teplota (°C)	Průměrná plocha píku	RSD (%)
70	0,16	14,42
90	0,91	17,93
100	1,39	2,85
120	3,08	10,87
150	10,37	35,89

### Infračervená spektra zrajících sýrů

Plynná fáze jednotlivých vzorků sýrů byla měřena pomocí FTIR spektrometru za zvolených optimálních podmínek zahřívání v plynové skleněné kyvetě. Příklad infračerveného spektra plynné fáze Olomouckého tvarůžku a Romadúru je zobrazeno na obrázku 7. Dva spektrální regiony v rozsahu vlnočtů  $4000 - 3500 \text{ cm}^{-1}$  a  $2000 - 1300 \text{ cm}^{-1}$  obsahují intenzivní vibrační pásy odpovídající O-H skupinám, které mohou pravděpodobně náležet přítomné vodní páře. Absorpční pásy O-H skupin jsou intenzivní i po předešlém vysušení vzorků a mohou překrývat pásy jiných funkčních skupin. Ve spektrálním regionu  $1300 - 650 \text{ cm}^{-1}$  se vyskytují dva intenzivní pásy při vlnočtech  $966 \text{ cm}^{-1}$  a  $930 \text{ cm}^{-1}$ , které byly interpretovány jako valenční vibrace C-H skupin mastných kyselin a O-H skupin karboxylových kyselin. V infračerveném spektru Olomouckého tvarůžku měřeného bez předchozího zahřívání se tyto pásy nenacházely. Jak nízkomolekulární mastné kyseliny, tak karboxylové kyseliny jsou klíčovými faktory, které se podílejí na výsledné vůni zrajících sýrů. Při porovnání FTIR spektra tvarůžku a Romadúru, spektrum zrajícího sýru Romadúr obsahuje navíc valenční vibrace C-H skupin (alifatické skupiny:  $-\text{CH}_3$  a  $>\text{CH}_2$ ) mastných kyselin, které se vyskytují ve spektrálním rozsahu  $3000 - 2800 \text{ cm}^{-1}$ . Sýry typu Romadúr mohou obsahovat až 40 % tuku, zatímco tvarůžky obsahují maximálně 2 % tuku. Z tohoto důvodu se tyto pásy vyskytují ve vyšších intenzitách ve spektrech sýrů typu Romadúr a naopak ve spektrech sýrů typu Tvarůžek tyto pásy chybí.



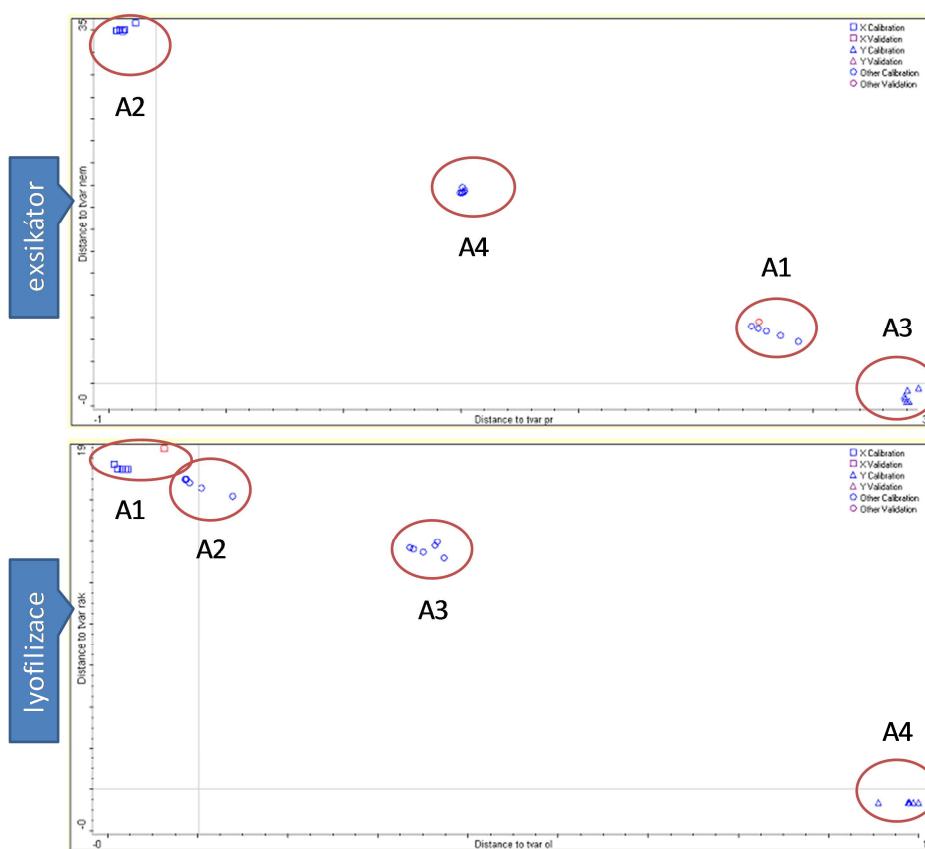
**Obrázek 7** FTIR spektra Olomouckého tvarůžku a Romadůru 1, měřená po 90 minutovém zahřívání při 120 °C v rozsahu 4000 – 600 cm<sup>-1</sup>

### Diskriminační analýza

Diskriminační analýza (DA) byla použita pro klasifikaci dvou skupin zrajících sýrů, typu Tvarůžek a Romadůr, v infračervené oblasti 4000 – 700 cm<sup>-1</sup>. Obě skupiny zrajících sýrů byly reprezentovány čtyřmi druhy sýrů, z nichž každý vzorek byl upraven pomocí dvou různých předúprav vzorku (sušení v exsikátoru a lyofilizátoru). Výsledkem DA je rozlišení jednotlivých tříd vzorků, které mohou být graficky znázorněny pomocí Mahalanobisovy vzdálenosti, která popisuje vzdálenost mezi těžišti dvou tříd.

Na obrázku 8 je zobrazena klasifikace zrajících sýrů typu Tvarůžek, které byly vysušeny v exsikátoru, používající 6 hlavních komponent (faktorů) pro vývoj kalibračního modelu pro rozřídění. Na ose *x* je vynesena Mahalanobisova vzdálenost od Olomouckého tvarůžku, zatímco na ose *y* je Mahalanobisova vzdálenost od Jemného tvarůžku 2. Z obrázku 8 je patrné, že jednotlivé vzorky zrajících sýrů tvoří oddělené shluky, které mají různé

meziklastrové Mahalanobisovy vzdálenosti, jejichž průměrné hodnoty jsou uvedeny v tabulce 6. Významné rozdíly ve vzdálenostech byly nalezeny pro třídy Olomoucké tvarůžky (A1) – Jemné tvarůžky 1 (A2) a Jemné tvarůžky 2 (A3) – Jemné tvarůžky 1 (A2). Podobné výsledky DA byly získány pro klasifikaci zrajících sýrů typu Tvarůžek, které byly vysušeny v lyofilizátoru (Obr. 8). Ke klasifikaci takto upravených sýrů bylo použito 9 hlavních komponent (osa x: vzdálenost od Olomouckých tvarůžků, osa y: vzdálenost od Rakouských tvarůžků) a výsledné průměrné meziklastrové Mahalanobisovy vzdálenosti jsou uvedeny v tabulce 6. Rozdíly ve vzdálenostech byly významné pro tyto třídy: Olomoucké tvarůžky (A1) – Rakouské tvarůžky (A4) a Jemné tvarůžky 1 (A2) – Rakouské tvarůžky (A4).



**Obrázek 8** Klasifikace zrajících sýrů typu Tvarůžek podle DA (A1, Olomoucký tvarůžek; A2, Jemné tvarůžky 1; A3, Jemné tvarůžky 2; A4, Rakouské tvarůžky)

**Tabulka 6** Mahalanobisovy vzdálenosti mezi třídami zrajících sýrů typu Tvarůžek (A1, Olomoucký tvarůžek; A2, Jemné tvarůžky 1; A3, Jemné tvarůžky 2; A4, Rakouské tvarůžky)

<b>Třídy</b>	<b>A1</b>	<b>A2</b>	<b>A3</b>	<b>A4</b>
A1		1,98 <sup>b</sup>	7,03 <sup>b</sup>	17,73 <sup>b</sup>
A2	28,13 <sup>a</sup>		5,27 <sup>b</sup>	16,75 <sup>b</sup>
A3	6,77 <sup>a</sup>	34,07 <sup>a</sup>		13,65 <sup>b</sup>
A4	13,70 <sup>a</sup>	15,06 <sup>a</sup>	19,46 <sup>a</sup>	

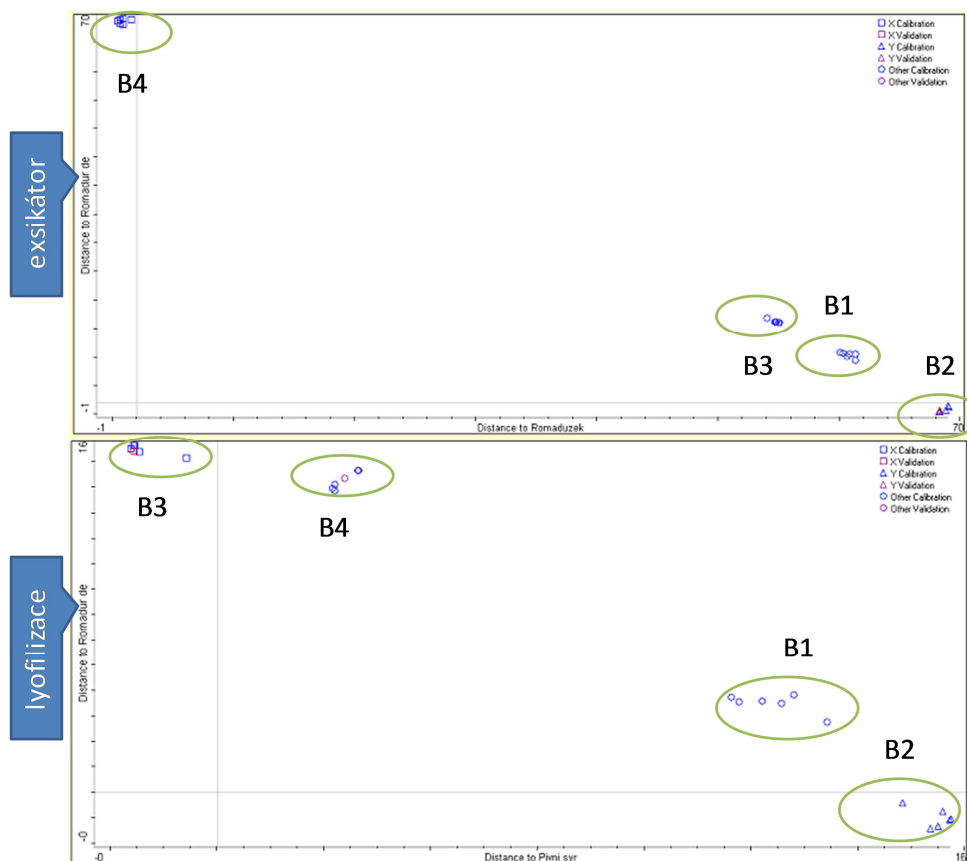
<sup>a</sup> exsikátor, <sup>b</sup> lyofilizátor

Pomocí DA byla rovněž provedena klasifikace zrajících sýrů typu Romadúr a výsledné Mahalanobisovy vzdálenosti jsou shrnuty v tabulce 7. Klasifikace těchto sýrů, které byly sušeny v exsikátoru, používající 6 faktorů pro vývoj kalibračního modelu je zobrazena na obrázku 9. Na ose *x* je vynesena Mahalanobisova vzdálenost od Romadůžku a na ose *y* vzdálenost od Romadúru 2. Největší rozdíly ve vzdálenostech byly nalezeny mezi Romadůžkem (B4) a ostatními druhy sýrů, tj. B2, B1 a B3. Ke klasifikaci sýrů vysušených v lyofilizátoru (Obr. 9) bylo použito 6 faktorů pro vývoj kalibračního modelu. Osa *x* popisuje Mahalanobisovu vzdálenost od Pivního sýru a osa *y* vzdálenost od Romadúru 2. Významné vzdálenosti jsou mezi třídami: Romadúr 2 (B2) – Pivní sýr (B3) a Romadúr 2 (B2) – Romadůžek (B4).

**Tabulka 7** Mahalanobisovy vzdálenosti mezi třídami zrajících sýrů typu Romadúr (B1, Romadúr 1; B2, Romadúr 2; B3, Pivní sýr; B4, Romadůžek)

<b>Třídy</b>	<b>B1</b>	<b>B2</b>	<b>B3</b>	<b>B4</b>
B1		5,49 <sup>b</sup>	12,40 <sup>b</sup>	11,93 <sup>b</sup>
B2	10,32 <sup>a</sup>		15,44 <sup>b</sup>	14,26 <sup>b</sup>
B3	15,00 <sup>a</sup>	16,26 <sup>a</sup>		4,38 <sup>b</sup>
B4	60,78 <sup>a</sup>	68,65 <sup>a</sup>	54,73 <sup>a</sup>	

<sup>a</sup> exsikátor, <sup>b</sup> lyofilizátor



**Obrázek 9** Klasifikace zrajících sýrů typu Romadúr podle DA (B1, Romadúr 1; B2, Romadúr 2; B3, Pivní sýr; B4, Romadůžek)

V této práci byly porovnávány dva způsoby přípravy vzorků, tj. sušení v exsikátoru a lyofilizace a jejich vliv na statistické vyhodnocení. Na základě výsledků DA, můžeme konstatovat, že oba způsoby přípravy byly vhodné pro klasifikaci vzorků zrajících sýrů. Nicméně, při jejich vzájemném porovnání přinášejí oba způsoby své výhody i nevýhody. Sušení v exsikátoru vyžadovalo, pro vhodné vysušení vzorků, čas minimálně několika dní. Zvolený minimální čas 6 dnů byl vybrán jako nejvýhodnější poměr mezi dobou přípravy a získanými výsledky. Naproti tomu, lyofilizace vyžadovala pouze 24 hodin. Proces lyofilizace vzhledem ke svému uspořádání nabízí i možnost snadné automatizace. Z hlediska doby přípravy, je sušení v exsikátoru časově náročnější než proces lyofilizace. Pro oba způsoby přípravy vzorků byly pozorovány rozdílné hodnoty Mahalanobisových vzdáleností. Hodnoty vzdáleností u vzorků vysušených v exsikátoru byly větší než u lyofilizovaných vzorků. Důvodem rozdílných hodnot Mahalanobisových vzdáleností mohly být pravděpodobně

chemické změny a dodatečné zrání sýrů. Vzorky zrajících sýrů byly v exsikátoru sušeny při laboratorní teplotě po dobu 6 dní před analýzou. Během této doby mohlo dojít jak k dodatečnému zrání sýrů, tak i k nežádoucím rozkladným procesům. Na druhou stranu během lyofilizace nedochází k těmto změnám a vysušené sýry si ponechávají své původní vlastnosti (texturu, aroma). Z hlediska diskriminace, je lepší použití vzorků vysušených v exsikátoru, které měly větší hodnoty Mahalanobisových vzdáleností, než vzorků vysušených lyofilizací.

Na základě výsledků diskriminační analýzy byly zjištěny významné rozdíly mezi různými druhy zrajících sýrů typu Tvarůžek, resp. mezi originálními Olomouckými tvarůžky a jejich různými napodobenami (imitacemi). Tyto rozdíly mohou být dány jak různým složením a výrobou sýrů, které určují jejich kvalitu, tak změnami výrobku během doby expirace a předúpravy vzorku. Podobné výsledky diskriminační analýzy byly získány i pro zrající sýry typu Romadúr, mezi kterými byly statisticky relevantní rozdíly mezi čtyřmi druhy vybraných sýrů tohoto typu.

### **5.1.2 Analýza biogenních aminů v tvrdých sýrech**

Kapitola se zabývá analýzou vybraných druhů tvrdých sýrů z hlediska obsahu biogenních aminů a způsobu jejich úpravy (uzení). BA jsou nízkomolekulární dusíkaté organické látky přirozeně se vyskytující například ve fermentovaných potravinách (sýry, pivo, víno, kyselé zelí). V těchto potravinách se BA vyskytují přirozeně, nicméně vyšší koncentrace těchto látek mohou mít nežádoucí až toxické účinky<sup>117</sup>. Obsah BA závisí na mnoha faktorech (např. druh mikroorganismu, proces výroby, skladování) a je značně variabilní nejen mezi jednotlivými druhy sýrů, ale i v rámci jednoho druhu<sup>151</sup>. Sledování BA v potravinách je důležité jednak z hlediska jejich nežádoucích účinků na lidský organismus a jednak se využívají jako indikátory kvality potravin<sup>117</sup>.

Jedním ze způsobů konzervace potravin je uzení. Kromě konzervačních účinků má uzení také vliv na sensorické vlastnosti potravin (vůně, aroma) a tudíž na jejich výslednou kvalitu. Uzené sýry se vyrábějí v udírenských komorách pomocí kouře, vznikajícího spalováním dřeva nebo pomocí kouřových aromat (tzv. tekutý kouř), kterými se sýry



postřikují nebo se do nich namáčejí. Kouř a kouřová aromata obsahují mnoho chemických látek, například fenoly, organické kyseliny, alkoholy a estery.

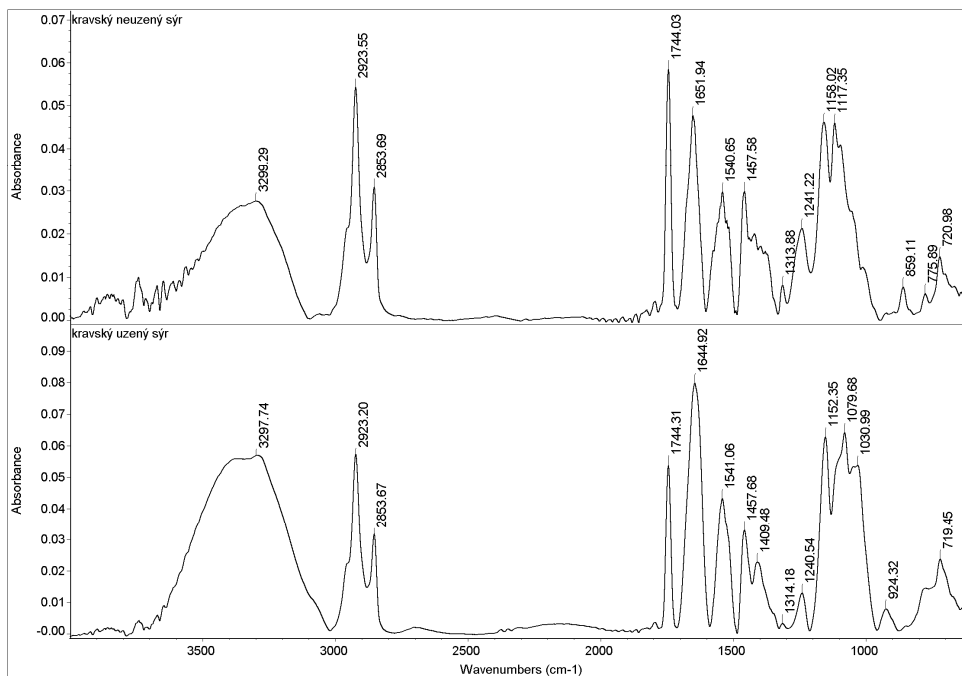
Cílem této práce bylo použití infračervené a Ramanovy spektroskopie v analýze tvrdých sýrů. Metoda ATR byla využita ke studiu biogenních aminů v extraktech tvrdých sýrů a jejich následné klasifikaci podle způsobu jejich úpravy a druhu mléka. Ramanova spektroskopie byla použita k charakterizaci jednotlivých druhů sýrů na základě jejich konečné úpravy. U obou metod byla ke statistickému vyhodnocení použita diskriminační analýza.

### **Studium tvrdých sýrů infračervenou spektroskopií**

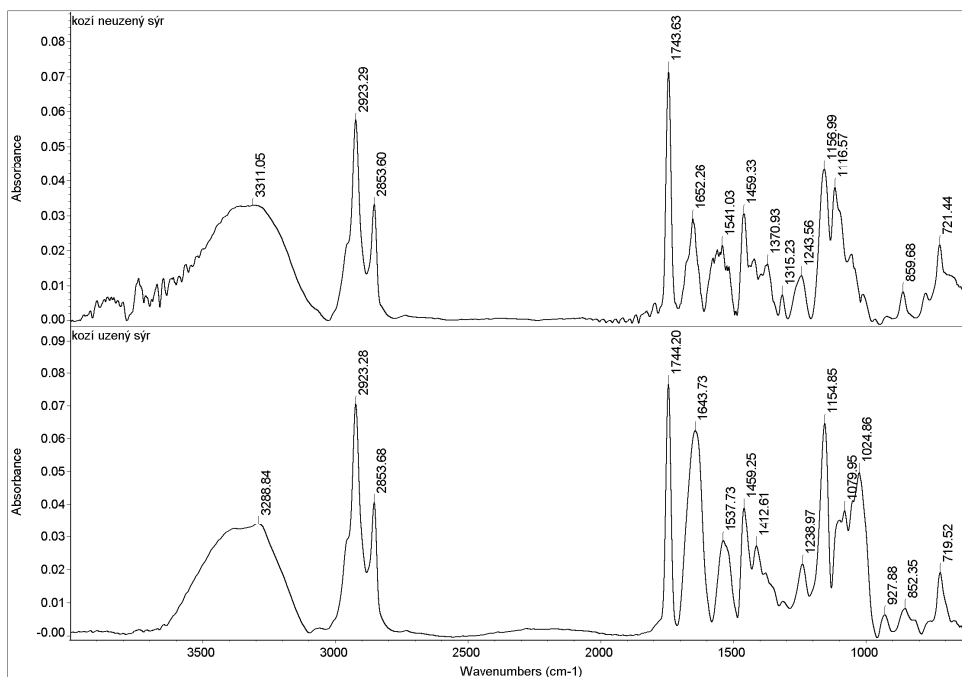
Analýza biogenních aminů v šesti druzích tvrdých sýrů, resp. jejich příslušných extraktů, byla provedena pomocí infračervené spektroskopie. Na začátku byly studovány vhodné podmínky extrakce BA a to volba extrakčního činidla a následně volba pH<sup>152</sup>. Byly provedeny extrakce sýrů různými extrakčními činidly a to kyselinou chlorovodíkovou, acetonem, tetrachlormetanem a diethyletherem. Na základě vyhodnocení infračervených spekter jednotlivých extrakcí byl vybrán diethylether jako vhodné extrakční činidlo, protože toto spektrum mělo nejintenzivnější spektrální pásy v oblasti okolo 1600 cm<sup>-1</sup>, které náleží funkčním skupinám NH<sub>2</sub>. Po výběru extrakčního činidla byl studován vliv různého pH. Extrakce uzeného sýru Eidam (Miltra) diethyletherem byla provedena při pH 3, 8, 9, 10 a 11. Na základě nejintenzivnějších spektrálních pásů v oblasti okolo 1600 cm<sup>-1</sup> bylo vybráno vhodné pH, a to pH = 8, při kterém byly provedeny extrakce všech vzorků tvrdých sýrů.

FTIR spektra extraktů jednotlivých druhů tvrdých sýrů jsou zobrazena na obrázku 10, 11 a 12. Všechna FTIR spektra příslušných extraktů obsahují spektrální pásy, které odpovídají základním složkám sýrů, tj. sacharidům, tukům ve formě mastných kyselin, proteinům, aminokyselinám a vodě. Široký spektrální pás v oblasti okolo 3200 cm<sup>-1</sup> přísluší valenční vibraci O-H skupin. Asymetrické a symetrické valenční vibrace C-H methylových skupin, odpovídající dlouhým řetězcům mastných kyselin, se vyskytují ve spektrální oblasti 3000 – 2800 cm<sup>-1</sup>. Výrazný spektrální pás okolo 1740 cm<sup>-1</sup> je přiřazen vibraci C=O skupiny, která přísluší mastným kyselinám a esterům. Deformační vibrace NH<sub>2</sub> a NH skupin se vyskytují v oblasti okolo 1650 cm<sup>-1</sup> (Amid I) a 1540 cm<sup>-1</sup> (Amid II) pocházející od proteinů a aminokyselin. Ve spektrální oblasti 1800 – 600 cm<sup>-1</sup> se dále nacházejí vibrace C-H, C=O,

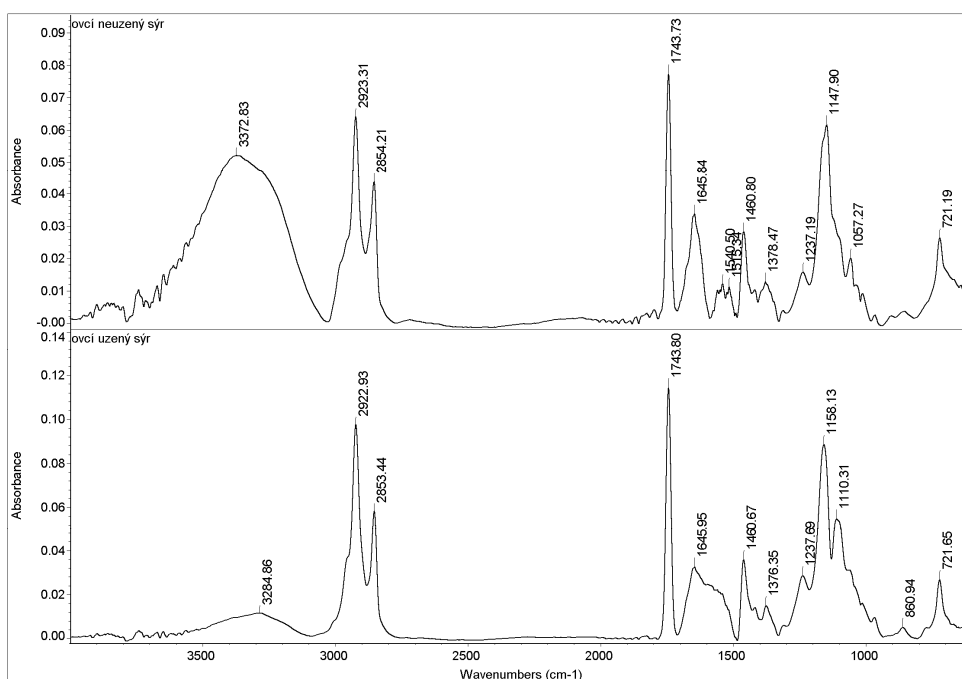
C-C skupin odpovídající polypeptidům, aminokyselinám, mastným kyselinám a jejich esterům.



Obrázek 10 FTIR spektra kravských sýrů po extrakci



Obrázek 11 FTIR spektra kozích sýrů po extrakci

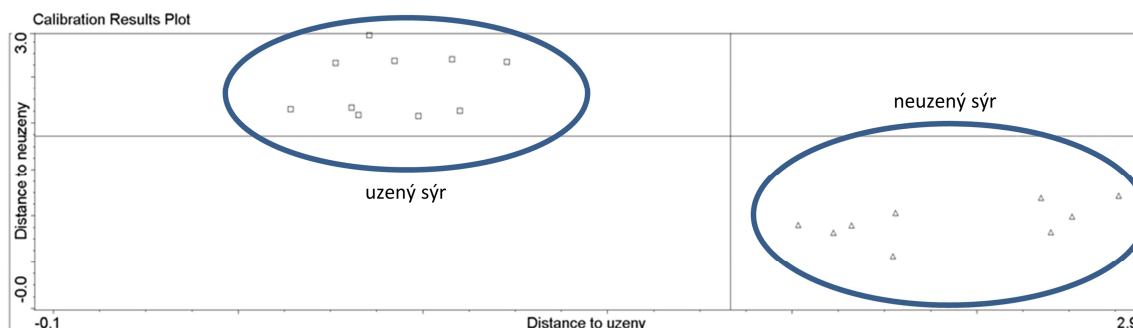


**Obrázek 12** FTIR spektra ovčích sýrů po extrakci

Bylo provedeno porovnání extraktů kravského, kozího a ovčího sýru z hlediska jejich konečné úpravy – uzený a neuzený sýr. FTIR spektra těchto sýrů mají charakteristické spektrální oblasti, kterými se neuzené a uzené sýry od sebe odlišují (Obr. 10,11,12). Spektrální oblast 1800 – 1600  $\text{cm}^{-1}$  prezentuje dva spektrální pásy (1744  $\text{cm}^{-1}$  a 1651  $\text{cm}^{-1}$ ). Spektrální pás okolo 1744  $\text{cm}^{-1}$  se liší zejména svou intenzitou, u neuzeného kravského sýru je tento pás mírně intenzivnější než u uzeného sýru, u kozího sýru jsou intenzity tohoto pásu srovnatelné a u uzeného ovčího sýru je intenzita mírně vyšší než u neuzeného sýru. Spektrální pás okolo 1651  $\text{cm}^{-1}$  se liší jak svou intenzitou, tak polohou. U kravského a kozího uzeného sýru je pozorován posun tohoto pásu o cca 10  $\text{cm}^{-1}$  (1643  $\text{cm}^{-1}$ ) a intenzita tohoto pásu je vyšší než u neuzených sýrů. U ovčího uzeného sýru nebyl tento posun pozorován. Další spektrální oblast 1600 – 1400  $\text{cm}^{-1}$  prezentují dva spektrální pásy (1537  $\text{cm}^{-1}$  a 1459  $\text{cm}^{-1}$ ), které se vyskytují u neuzených i uzených sýrů. U kravského a kozího uzeného sýru je pozorován navíc spektrální pás okolo 1409  $\text{cm}^{-1}$ . Výjimku tvoří opět ovčí sýr, u kterého se vyskytuje pouze pás při 1460  $\text{cm}^{-1}$ . Následující spektrální oblast 1400 – 1000  $\text{cm}^{-1}$  prezentuje několik spektrálních pásů.

U kravského a kozího neuzeného sýru jsou pozorovány intenzivnější spektrální pásy okolo  $1315\text{ cm}^{-1}$  a  $1243\text{ cm}^{-1}$  a u uzených sýrů je naopak pozorován intenzivnější pás okolo  $1154\text{ cm}^{-1}$ . U uzeného ovčího sýru je vedle spektrálního pásu okolo  $1158\text{ cm}^{-1}$ , pozorován pás při  $1110\text{ cm}^{-1}$ , který se ve spektru neuzeného sýru nevyskytuje a navíc pás  $1158\text{ cm}^{-1}$  je posunut o cca  $10\text{ cm}^{-1}$  ( $1147\text{ cm}^{-1}$ ). Ve spektrální oblasti  $1000 - 600\text{ cm}^{-1}$  se vyskytuje pás okolo  $922\text{ cm}^{-1}$ , pouze u uzeného kravského a kozího sýru. U ovčího uzeného sýru se tento pás nevyskytuje. Všechny výše popsané změny v intenzitách spektrálních pásů mohly být způsobeny jak přítomnými biogenními aminy, tak látkami, které se do sýrů dostávají během udicího procesu.

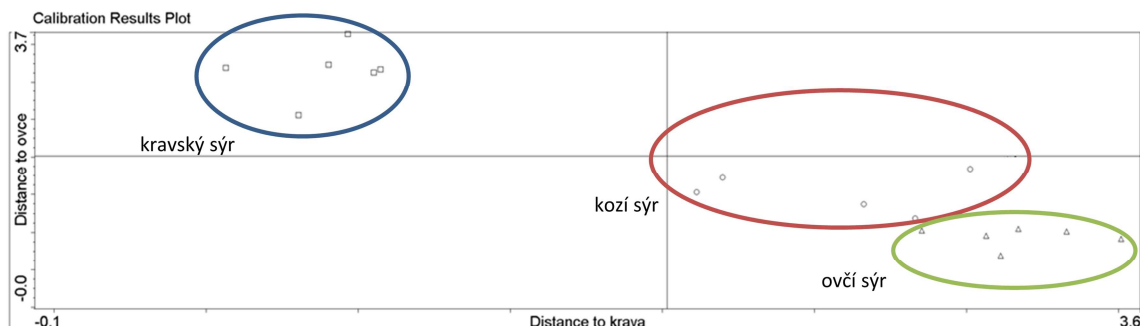
Diskriminační analýza v infračervené oblasti  $1800 - 1500\text{ cm}^{-1}$  byla použita ke klasifikaci dvou typů tvrdých sýrů, uzených a neuzených, na základě extrakce biogenních aminů. Oba typy tvrdých sýrů byly reprezentovány třemi druhy těchto sýrů, z nichž příslušné diethyletherové extrakty byly měřeny třikrát. Na obrázku 13 je uvedena výsledná klasifikace dvou typů tvrdých sýrů, ke které bylo použito 9 hlavních komponent pro vývoj kalibračního modelu. Z tohoto obrázku je patrné, že oba druhy tvrdých sýrů, uzené a neuzené, tvoří samostatné shluky, které mají průměrnou meziklastrovou Mahalanobisovu vzdálenost 2,42.



**Obrázek 13** Klasifikace uzených a neuzených tvrdých sýrů podle DA.

FTIR spektra extraktů jednotlivých vzorků sýrů byla použita také ke klasifikaci těchto sýrů podle druhu mléka použitého k jejich výrobě. Infračervená oblast  $1800 - 1500\text{ cm}^{-1}$  byla použita k rozdělení kravského, kozího a ovčího sýru pomocí diskriminační analýzy. Na obrázku 14 je zobrazena výsledná klasifikace vzorků sýru, kde bylo použito 10 hlavních komponent pro vývoj kalibračního modelu. Z výsledků DA vyplývá, že jednotlivé druhy sýrů

(kravský, kozí a ovčí) lze rozlišit na základě jejich FTIR spekter po provedené extrakci. Největší rozdíl hodnot Mahalanobisových vzdáleností byl mezi kravským a kozím, kravským a ovčím sýrem, naopak nejmenší rozdíl byl mezi kozím a ovčím sýrem (Tab. 8)



**Obrázek 14** Klasifikace kravského, kozího a ovčího sýru podle DA.

**Tabulka 8** Mahalanobisovy vzdálenosti jednotlivých druhů mlék tvrdých sýrů podle DA

Druh mléka	kravské	kozí	ovčí
kravské		2,63 <sup>a</sup>	3,18 <sup>a</sup>
kozí	2,54 <sup>b</sup>		1,36 <sup>a</sup>
ovčí	3,13 <sup>b</sup>	1,68 <sup>b</sup>	

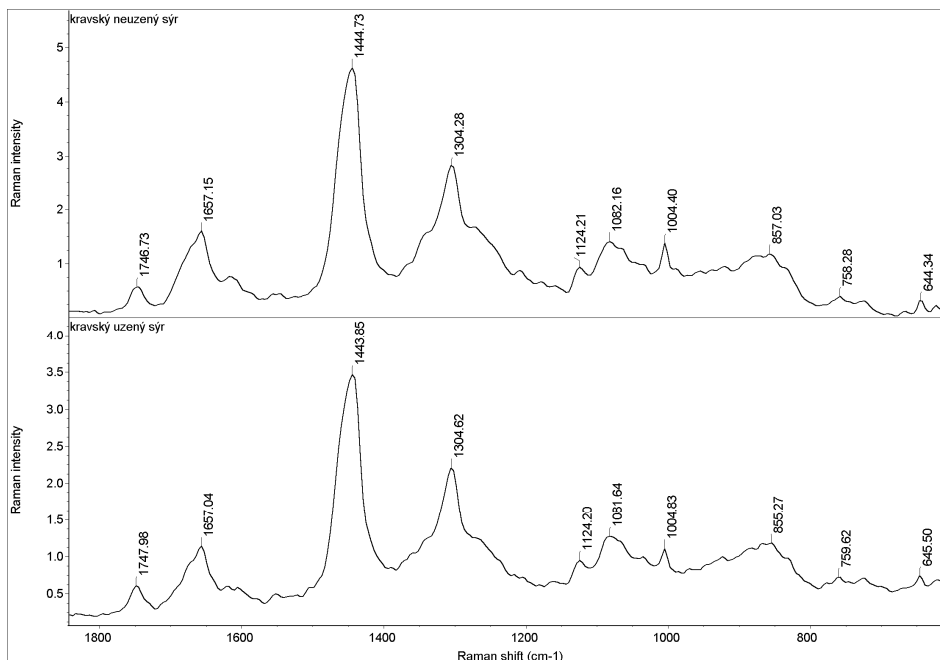
<sup>a</sup> neuzené sýry

<sup>b</sup> uzené sýry

### Studium tvrdých sýrů Ramanovou spektroskopií

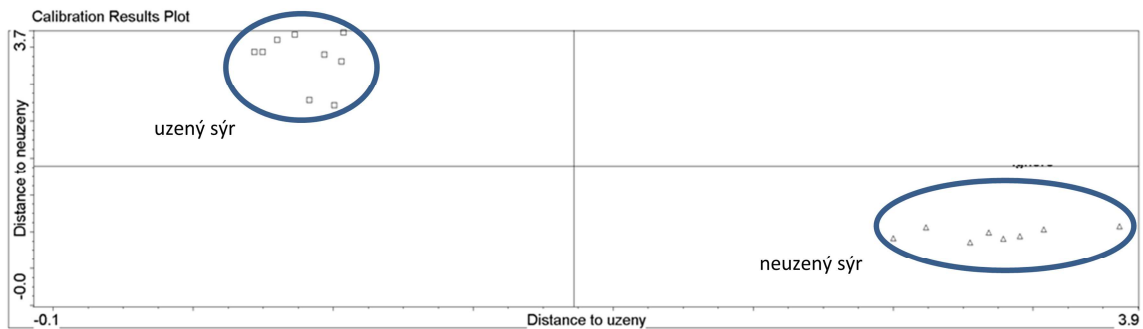
Ramanova spektroskopie byla využita k charakterizaci tvrdých sýrů v závislosti na způsobu jejich konečné úpravy - neuzený a uzený sýr. Ramanova spektra všech vzorků sýrů byla měřena po jejich předchozí úpravě lyofilizací. Na obrázku 15 je zobrazeno Ramanovo spektrum kravského uzeného a neuzeného sýru. V porovnání s infračervenými spektry, Ramanova spektra uzených a neuzených sýrů jsou jednodušší a nejsou v nich nalezeny výrazné spektrální odlišnosti. Nejintenzivnější spektrální pás se vyskytoval při 1444 cm<sup>-1</sup>, který odpovídá CH<sub>2</sub> skupinám alifatických řetězců mastných kyselin. Široký spektrální pás se nacházel okolo 1304 cm<sup>-1</sup>, pravděpodobně odpovídající esterům mastných kyselin.

Deformační vibrace  $\text{NH}_2$  skupiny se nacházely okolo  $1656 \text{ cm}^{-1}$ . Ve spektrální oblasti  $1200 - 400 \text{ cm}^{-1}$  se nacházely méně intenzivní pásy skupin C-H, C-O, O-H.



**Obrázek 15** Ramanova spektra neuzeného a uzeného kravského sýru v rozsahu  $1800 - 600 \text{ cm}^{-1}$

Ramanova spektra lyofilizovaných tvrdých sýrů byla použita k rozdělení (klasifikaci) těchto sýrů na základě jejich konečné úpravy pomocí diskriminační analýzy. Oblast  $1800 - 600 \text{ cm}^{-1}$  byla použita ke klasifikaci tvrdých sýrů, které byly rozděleny do 2 skupin – neuzené a uzené sýry, stejně jako u infračervené spektroskopie. Na obrázku 16 je uvedeno výsledné rozdělení tvrdých sýrů, ke kterému bylo použito 10 hlavních komponent pro vývoj kalibračního modelu. Z výsledků DA vyplývá, že obě skupiny, neuzených a uzených tvrdých sýrů, tvoří samostatné shluky s průměrnou meziklastrovou Mahalanobisovou vzdáleností 3,36.



**Obrázek 16** Klasifikace tvrdých sýrů na základě jejich konečné úpravy podle DA.

Tato kapitola se zabývala možností studia různých tvrdých sýrů pomocí metod vibrační spektroskopie. Infračervená spektroskopie byla použita ke studiu extraktů tvrdých sýrů a Ramanova spektroskopie ke studiu lyofilizovaných tvrdých sýrů. Na základě získaných výsledků můžeme usoudit, že obě metody jsou vhodné k charakterizaci těchto sýrů podle jejich konečné úpravy i druhu mléka, které bylo použito k jejich výrobě. Při porovnání těchto metod, Ramanova spektroskopie poskytla lepší výsledky klasifikace tvrdých sýrů podle jejich konečné úpravy než infračervená spektroskopie.

## 5.2 Analýza vína

### 5.2.1 Analýza vín v různých technologických fázích výroby

Tato kapitola se zabývá analýzou vybraných druhů moravských vín (červeného, růžového a bílého), odebíraných v různých technologických fázích výroby. Vína jsou obecně zdrojem mnoha fenolických látek, které mají silný vliv na jejich výslednou kvalitu. I když tvoří méně než 5 % složek nacházejících se ve víně, jsou důležité, neboť se výrazně podílejí na celkových organoleptických vlastnostech daného vína, které jsou například barva, chuť a adstringentní vlastnosti. Fenolické látky mají též příznivý vliv na lidské zdraví, který je doložen například tzv. „Francouzským paradoxem“. Některé fenolické sloučeniny vykazují také mimořádný antioxidační účinek. Obsah těchto sloučenin je ovlivněn jednak samotným surovým materiálem, tj. hroznem, tak technologií výroby vína, která je charakteristická pro různé druhy vín a vinařství. Záměrem této práce bylo kvantitativní stanovení celkových

fenolických látek a celkové antioxidační aktivity v jednotlivých fázích výroby a dále diskriminace (klasifikace, rozdělení) vín na základě hlavních technologických operací výroby.

Cílem této práce bylo použití FTIR spektroskopie pro analýzu vína v různých technologických fázích výroby. ATR technika byla použita k měření infračervených spekter jednotlivých vzorků vín (Tab. 4, kap 4.3). Kvantitativní vyhodnocení predikce (stanovení) TPC a TAA bylo provedeno pomocí chemometrické metody PLS, využívající k vytvoření kalibračního modelu infračervených spekter a referenčních hodnot TPC a TAA. Obsah TPC a TAA byl analyzován pomocí příslušných spektrometrických referenčních metod (viz kap 4.3). Dále byl studován také vliv jednotlivých technologických postupů na obsah TPC a TAA u všech druhů vín. Kvalitativní vyhodnocení infračervených spekter bylo provedeno pomocí diskriminační analýzy, která byla využita k rozdělení vín podle základních výrobních operací.

## **PLS modely**

Hlavním krokem predikce (stanovení) celkových fenolických látek a celkové antioxidační aktivity vín metodou FTIR spektroskopie je vytvoření vhodného kalibračního modelu. Tři kalibrační modely byly vytvořeny pomocí algoritmu PLS pro každý druh vína, na základě získaných spektrálních dat (neupravená, 1. a 2. derivace spekter) a referenčních hodnot TPC a TAA. Vyhodnocení kalibračního modelu bylo provedeno na základě chyby kalibrace (RMSEC) a validace (RMSECV), chyby predikce (RMSEP) a korelačních koeficientů (R). Statistické parametry kalibračního modelu by měly mít co nejmenší hodnoty RMSEC a RMSECV a co největší hodnoty korelačního koeficientů.

Jedním z důležitých kroků při vytváření kalibračního modelu je výběr spektrálního regionu. Pro vytvoření PLS modelů byly zvažovány tyto vybrané infračervené oblasti: 3000 – 2435  $\text{cm}^{-1}$ , 2280 – 1717  $\text{cm}^{-1}$  a 1570 – 966  $\text{cm}^{-1}$ <sup>144</sup>. Výběr spektrálního regionu fenolických sloučenin není jednoduchý, protože tento region je maskován jak hlavními složkami vína<sup>153</sup> tak interferujícími sloučeninami, zejména vodou, která absorbuje v oblasti 1750 – 1590  $\text{cm}^{-1}$  a 3700 – 3000  $\text{cm}^{-1}$ . V této práci byl výběr spektrálních regionů proveden na základě dostupné literatury<sup>122,140</sup> a výsledných parametrů PLS modelů. Výsledné spektrální regiony, které byly použity pro vyhodnocení TPC a TAA, jsou uvedeny v tabulce 9.



**Tabulka 9** Vybrané spektrální regiony PLS modelů pro všechny druhy vín

Druh vína	Infračervená oblast (cm <sup>-1</sup> )	
	TPC	TAA
Červené víno	3000 – 2960, 1457 – 966	2973 – 2434, 2280 – 1717, 1445 – 966
Růžové víno	1457 – 966	3730 – 1034, 1032 – 627, 626 – 614
Bílé víno	3000 – 2960, 1543 – 966	2971 – 2435, 2280 – 1717, 1543 – 966

Výsledné statistické parametry PLS modelů pro predikci TPC červeného, růžového a bílého vína jsou uvedeny v tabulce 10. Pro každý druh vína byly vytvořeny tři kalibrační modely v závislosti na různých úpravách infračervených spekter. První PLS model pro červené víno (pro neupravená spektra) dosáhl podobných hodnot korelačních koeficientů a nejmenších hodnot RMSEC, RMSECV a RMSEP v porovnání s ostatními modely. Druhý (1. derivace) a třetí (2. derivace) PLS model měl vysokou hodnotu korelačního koeficientu kalibrace ( $R_{cal}$ ), ale velmi nízkou hodnotu korelačního koeficientu validace ( $R_{cv}$ ) a navíc hodnoty RMSEC, RMSECV a RMSEP byly vysoké. Statistické parametry PLS modelů, pro růžové víno, měly vysoké hodnoty  $R_{cal}$  a  $R_{cv}$  pro první PLS model a rozdílné hodnoty pro druhý a třetí model. Nejmenší hodnoty RMSEC dosáhl první model oproti dalším dvěma modelům. PLS modely bílého vína měly horší statistické parametry vzhledem k červenému a růžovému vínu. Všechny PLS modely měly vysoké hodnoty  $R_{cal}$ , ale také velmi nízké hodnoty  $R_{cv}$ . Nejmenší hodnoty RMSEC a RMSECV byly získány pro druhý PLS model (1. derivaci).

Na základě výsledků metody PLS bylo zjištěno, že všech devět modelů poskytuje dobrou kalibraci ( $R_{cal} > 0,9$ ), ale pouze první PLS modely (neupravená spektra) poskytovaly nejlepší výsledky pro predikce hodnot TPC. Výjimku tvořilo pouze bílé víno, u kterého bylo dosaženo lepšího výsledku predikce pro druhý model než pro první. Z výsledků je patrné, že spektra upravená derivací mohla vést ke ztrátě spektrálních informací a ke zhoršení kalibračních modelů. Při porovnání hodnot RMSEC a RMSECV bylo zjištěno, že větší hodnoty měla chyba validace než chyba kalibrace. Lepší statistické parametry vhodných PLS modelů byly získány pro červené víno než pro růžové a bílé víno. Tento poznatek by mohl souviset s různým obsahem fenolických sloučenin ve vínech. Červené víno obecně obsahuje více fenolických sloučenin než růžové a bílé víno a získané výsledky tento fakt potvrzují.

**Tabulka 10** Statistické parametry PLS modelů pro predikci TPC

Druh vína	Úprava spekter	Počet faktorů	RMSEC	$R_{\text{cal}}$	RMSEP	RMSECV	$R_{\text{cv}}$
Červené víno	neupravené	5	27,8	0,9856	7,16	59,1	0,9392
	1. derivace	1	1090	0,9021	139	2950	0,1426
	2. derivace	4	32,3	0,9794	64,5	193	0,2752
Růžové víno	neupravené	3	9,69	0,9155	8,70	16,7	0,7245
	1. derivace	7	0,58	0,9997	0,17	23,6	0,2549
	2. derivace	4	4,82	0,9798	5,63	29,5	0,1787
Bílé víno	neupravené	5	8,26	0,9462	10,7	34,0	0,0908
	1. derivace	5	4,04	0,9868	20,9	24,5	0,3956
	2. derivace	3	8,96	0,9330	26,5	24,6	0,3726

$_{\text{cal}}$  kalibrace,  $_{\text{cv}}$  křížová validace

Statistické parametry výsledných PLS modelů pro predikci TAA červeného, růžového a bílého vína jsou uvedeny v tabulce 11. Stejně jako u predikce TPC byly i zde vytvořeny tři kalibrační modely v závislosti na různých úpravách infračervených spekter. První PLS model červeného vína měl vysoké a srovnatelné hodnoty korelačních koeficientů ( $R_{\text{cal}}$ ,  $R_{\text{cv}}$ ), naopak rozdílné hodnoty měl druhý a třetí model. Hodnoty RMSEC a RMSECV byly nejmenší pro druhý PLS model. Podobné výsledky korelačních koeficientů byly získány také pro PLS modely růžového vína. Nejmenší hodnoty RMSEC a RMSECV byly získány pro první a třetí PLS model růžového vína. Nejméně srovnatelné hodnoty korelačních koeficientů měl první PLS model bílého vína a naopak nejméně rozdílné hodnoty  $R_{\text{cal}}$  a  $R_{\text{cv}}$  u druhého a třetího modelu, v porovnání s červeným a bílým vínem. Nejmenší hodnotu RMSEC měl třetí PLS model, nejmenší hodnota RMSECV byla u prvního PLS modelu.

Na základně výsledků metody PLS bylo získáno sedm kalibračních modelů poskytujících dobrou kalibraci. Nejlepší výsledky pro predikci TAA poskytly opět první PLS modely, k jejichž vytvoření byla použita surová infračervená spektra, a stejně jako u predikce TPC i zde derivovaná spektra nepřinesla zlepšení. Rovněž hodnoty RMSECV byly vyšší než hodnoty RMSEC. Tento rozdíl mohl být způsobený buď nedostatečnou specifičností referenční metody FRAP nebo příspěvkem jiných látek (např. polysacharidů) k (měřené) antioxidační aktivitě. Při porovnání PLS modelů jednotlivých druhů vín na základě korelačních koeficientů kalibrace a validace, lepší statistické parametry mělo růžové víno než červené a bílé víno.

**Tabulka 11** Statistické parametry PLS modelů pro predikci TAA

Druh vína	Úprava spekter	Počet faktorů	RMSEC	R <sub>cal</sub>	RMSEP	RMSECV	R <sub>cv</sub>
Červené víno	neupravené	3	0,27	0,9770	0,03	0,62	0,8813
	1. derivace	4	0,08	0,9983	0,43	0,22	0,3770
	2. derivace	1	0,68	0,8532	0,44	1,86	0,5154
Růžové víno	neupravené	4	0,12	0,9879	0,007	0,36	0,9259
	1. derivace	1	0,40	0,8625	0,90	0,80	0,2478
	2. derivace	5	0,04	0,9990	0,70	0,80	0,2594
Bílé víno	neupravené	2	0,24	0,9206	0,02	0,38	0,7988
	1. derivace	1	0,26	0,9063	0,16	0,48	0,6486
	2. derivace	3	0,12	0,9812	0,21	0,49	0,6430

cal kalibrace, cv křížová validace

Na základě vyhodnocených výsledků metody PLS byly vybrány nejlepší kalibrační modely k predikci TPC a TAA červeného, růžového a bílého vína. Téměř ve všech případech byly k predikci vybrány PLS modely, které byly vytvořeny pomocí neupravených FTIR spekter. Pouze v jednom případě byl k predikci vybrán PLS model, který byl vytvořen pomocí spekter upravených 1. derivací. Výsledné PLS modely jsou v tabulce 10 a 11 zvýrazněny.

### Vyhodnocení celkového obsahu fenolických látek ve vínech

Metoda PLS byla použita pro vyhodnocení celkového obsahu fenolických látek vzorků vín odebíraných v různých technologických fázích výroby na základě jejich infračervených spekter. Výsledné průměrné hodnoty TPC pro vzorky červeného, růžového a bílého vína jsou uvedeny na obrázku 17. Významně vyšší obsah celkových fenolických látek má červené víno v porovnání s růžovým a bílým vínem. Tyto výsledky potvrzují obecný fakt, že červená vína obsahují vyšší obsah TPC v rozsahu od 800 do 4000 mg l<sup>-1</sup> a bílá vína menší obsah TPC v rozsahu od 200 do 500 mg l<sup>-1</sup>. Obsah fenolických látek ve vínech se liší v závislosti na druhu vína, odrůdě a výrobním procesu. Podobné výsledky byly též publikovány v práci Paixão a kol.<sup>154</sup>, Frankel a kol.<sup>155</sup> a Sato a kol.<sup>156</sup>.

V této práci byly sledovány změny obsahu TPC v jednotlivých fázích výrobního procesu. Kromě surového materiálu hraje také důležitou roli samotný výrobní proces, zejména co se týče extrakce fenolických látek a jejich pozdější stability ve víně. Z výsledků je patrné (Obr. 17), že obsah TPC roste v průběhu výrobního procesu červeného vína (od 668,5 do

1208,2 mg l<sup>-1</sup> GAE) a bílého vína (od 190,8 do 193,7 mg l<sup>-1</sup> GAE). Avšak opačný trend byl pozorován u růžového vína, u kterého se obsah TPC pohyboval od 286,7 do 238,0 mg l<sup>-1</sup> GAE. Změny v obsahu TPC byly pravděpodobně způsobeny různými výrobními procesy (technologickými fázemi výroby).

U červeného vína hodnoty obsahu TPC rostou v průběhu výrobního procesu, od rmutu po hotové víno. Na začátku výrobního procesu obsahoval čerstvý rmut 668 mg l<sup>-1</sup> TPC a téměř dvojnásobné množství TPC obsahovalo hotové víno. V průběhu macerace (C1-C2) byl pozorován rychlý nárůst obsahu TPC. Macerace představuje technologickou fázi výroby vína, během které dochází k extrakci látek ze slupek hroznů. Extrakce těchto látek je ovlivněna maceračními podmínkami (teplota, doba) a vznikajícím ethanolem, který zvyšuje jejich rozpustnost. Další mírný růst obsahu TPC byl pozorován na začátku alkoholové fermentace po přidání kvasnic (C3). V důsledku této fermentace se produkuje ethanol, který podporuje extrakci fenolických látek z rmutu<sup>157</sup>. V průběhu fermentace se obsah TPC významně neměnil (C4-C5). Mírný pokles obsahu TPC byl pozorován u vzorku C6, který mohl být způsobený oxidačními ději, ke kterým může docházet při zrání vína v dubových sudech v důsledku jejich pórovitosti. Fenolické látky, zejména anthokyaniny, podléhají různým oxidačním, kondenzačním a polymerizačním reakcím<sup>158</sup>. Tyto reakce vedou ke snížení množství fenolických látek, zejména v důsledku přeměny jednoduchých anthokyaninů na polymerní anthokyaniny nebo vzniku antokyanových pigmentů<sup>159</sup>. U vzorku C7 bylo dosaženo zřetelného zvýšení obsahu TPC, které je přisuzováno zrání vína v lahvi. I když je popsáno, že během zrání vína dochází k poklesu fenolických látek<sup>160</sup>, v našem případě byl pozorován opačný jev. Vzhledem k tomu, že toto studium nebylo opakováno, nejsme schopni tento jev vysvětlit. Nicméně podobné zvýšení celkových fenolů u červeného vína bylo publikováno v práci Ginjom a kol.<sup>157</sup>.

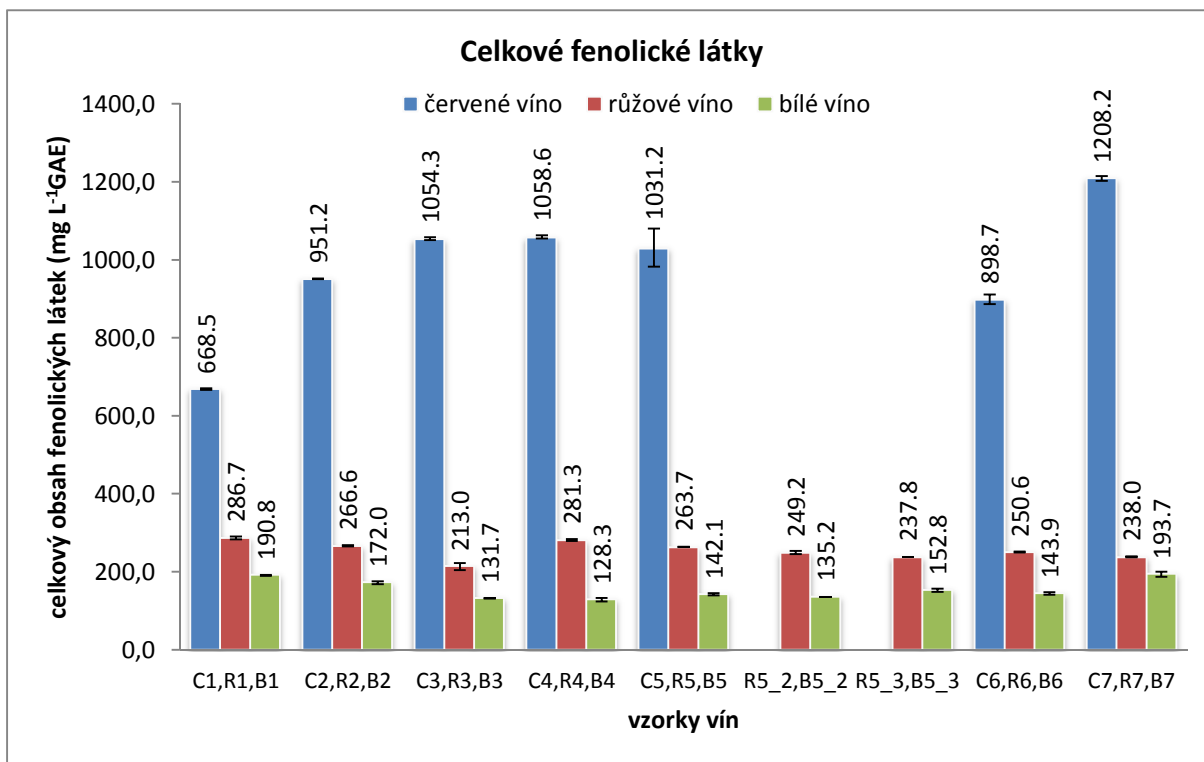
U růžového vína hodnoty obsahu TPC klesají během jednotlivých technologických fází výroby. Na začátku tohoto výrobního procesu měl čerstvý rmut menší obsah TPC než rmut červeného vína, ale vyšší obsah než rmut bílého vína. Z výsledků je patrné, že v průběhu macerace byl pozorován mírný pokles obsahu TPC (R2), tudíž macerace nevedla k jeho zvýšení, jako tomu bylo u červeného vína, které bylo vyráběno ze stejné odrůdy. Je to především dáno jinými výrobními procesy např. dobou macerace. Následoval další významný pokles obsahu TPC (R3), způsobený pravděpodobně odkalením vinného moštu a přidavkem

bentonitu. Obecně se bentonit přidává k vínům hlavně z důvodu snížení obsahu termolabilních bílkovin<sup>161</sup>. Nicméně, bentonit mohl způsobit také navázání fenolických látek a tím došlo ke snížení jejich obsahu, což se sekundárně projevilo i v hodnotách TPC. Následoval rychlý nárůst obsahu TPC v průběhu fermentačního procesu. Desková filtrace a cross-flow filtrace jsou jednou z technologických fází výroby tohoto vína. Po těchto technologických operacích byl pozorován mírný pokles obsahu TPC, který mohl být způsobený zachycením fenolických látek na membráně filtru. Bylo popsáno, že polysacharidy a polyfenoly jsou zachycovány materiálem membrány a tím jsou také zodpovědné za membránové znečištění<sup>162</sup>. Následné minimální zvýšení obsahu TPC (R6, R7) je přisuzováno zrání vína.

Bílé víno obsahovalo nejméně fenolických látek v porovnání s červeným a růžovým vínem a změny obsahu TPC do jisté míry neodpovídaly jednotlivým technologickým fázím výroby. V průběhu výroby tohoto vína byl sledován mírný pokles obsahu TPC, od rmutu po hotové víno. Z výsledků je zřejmé, že významný pokles obsahu TPC byl pozorován po maceraci rmutu, nicméně i podle literatury by macerace měla vést k jeho zvýšení<sup>163</sup>. Mírný pokles obsahu TPC (B3) byl pozorován opět po přidavku bentonitu. K nárůstu obsahu TPC nedošlo ani v průběhu fermentační fáze a byl opět pozorován opačný jev. Víno je předmětem neustálých změn v jeho složení v důsledku různých oxidačních reakcí, a právě polyfenolické látky patří mezi snadno oxidující složky vína<sup>164</sup>. Z pohledu senzorických vlastností může mít řízená oxidace prospěšný účinek, například u červených vín pro zesílení jejich barvy, ale u bílých vín dochází k opačnému účinku. U bílých vín způsobuje oxidace fenolů jejich nežádoucí hnědnutí, které obvykle začíná už na začátku výrobního procesu v důsledku enzymatických oxidačních reakcí<sup>165,166</sup>. Výše uvedené změny mohou mít vliv na obsah TPC stejně jako odrůda a výrobní proces. Síření (přídavek SO<sub>2</sub>) mohlo způsobit mírný nárůst obsahu TPC u vzorků B5, B5\_2, B5\_3. Oxid siřičitý se používá k ochraně před oxidačními reakcemi. Mírný pokles obsahu TPC u vzorku B6 je pravděpodobně v důsledku dalšího přidavku bentonitu. V průběhu zrání vína došlo k prudkému nárůstu obsahu TPC (B7), které však neumíme vysvětlit. Bílé víno, které bylo použito k této studii, je směsí tří různých odrůd (Cuveé) a tudíž změny ve složení tohoto vína mohou být jiné než u samostatných odrůd.

Na základně výsledných hodnot TPC, získaných metodou PLS, byly zjištěny významné rozdíly obsahů TPC jak mezi jednotlivými druhy vín, tak mezi jednotlivými

technologickými fázemi výroby. K podobným závěrům dospěl i Burns a kol., který stanovoval obsah fenolických látek ve vinných extraktech v průběhu výroby vína pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie<sup>167</sup>.



**Obrázek 17** Hodnoty TPC pro všechny druhy vín podle PLS. Chybové úsečky vyjadřují směrodatnou odchylku.

### Vyhodnocení celkové antioxidační aktivity vín

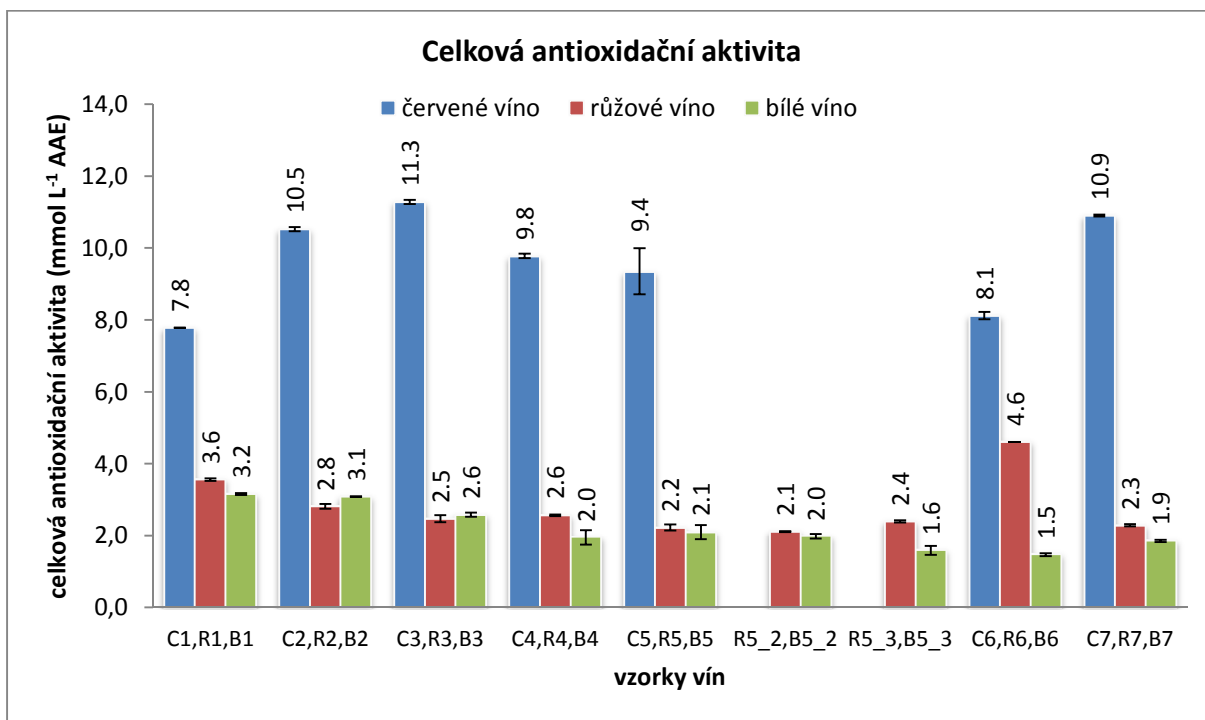
Víno je obecně bohatým zdrojem polyfenolických látek (flavonoidních a neflavonoidních) a mnoho z těchto látek (např. resveratrol, quercetin, rutin, katechin, atd.) vykazuje několik biologických účinků, které jsou přisuzovány jejich antioxidační a antiradikálové aktivitě<sup>168</sup>. Červené a bílé víno se zásadně odlišují svým polyfenolickým obsahem, na který má vliv jak odrůda hroznu, tak technologie výroby<sup>169</sup>. Na základě infračervených spekter a PLS metody bylo provedeno vyhodnocení antioxidační aktivity vín odebíraných v různých technologických fázích výroby. Výsledné průměrné hodnoty TAA

červeného, růžového a bílého vína jsou prezentovány na obrázku 18. Z výsledků je patrné že, červené víno má zřetelně vyšší hodnoty TAA než růžové a bílé víno. V některých případech má červené víno až 5x vyšší hodnoty TAA, v porovnání s ostatními druhy vín. Podobné výsledky byly publikovány v práci Paixão a kol.<sup>154</sup>.

Stejně jako u fenolických látek, byly i zde studovány změny obsahu TAA v jednotlivých technologických fázích výroby. V průběhu výroby červeného vína hodnoty TAA rostly od 7,8 do 10,9 mmol l<sup>-1</sup> AAE. Opačný trend byl sledován v průběhu výroby růžového (od 3,6 do 2,3 mmol l<sup>-1</sup> AAE) a bílého vína (od 3,2 do 1,9 mmol l<sup>-1</sup> AAE). U červeného vína je pozorován zřetelný růst hodnot TAA v průběhu macerace a alkoholové fermentace, nasledovaný mírným poklesem v průběhu fermentace a zrání v dubových sudech. Další růst hodnoty TAA byl zaznamenán u posledního vzorku (hotové víno). V průběhu výroby růžového a bílého vína byl pozorován postupný pokles hodnot TAA. Stejný trend změn byl pozorován při porovnání průběhu hodnot TAA a TPC u všech druhů vín v jednotlivých technologických fázích výroby. Výjimku tvořil pouze jeden vzorek růžového vína (R6), jehož hodnota TAA byla dvojnásobná, ale v porovnání s obsahem TPC to nekorespondovalo. Na zmíněné skokové zvýšení měl pravděpodobně vliv přídavek oxidu siřičitého, který byl při výrobě tohoto vína přidán<sup>170</sup>. V práci Lachmana a kol. byl také popsán vliv oxidu siřičitého na celkový antioxidační potenciál<sup>171</sup>.

Antioxidační aktivita vín je dána díky obsahu polyfenolických látek<sup>172</sup>. V literatuře se ovšem objevují rozporuplné názory ohledně korelace mezi antioxidační aktivitou a obsahem polyfenolických sloučenin<sup>173</sup>. Jedna skupina autorů se přiklání k tomu, že existuje pozitivní korelace mezi antioxidační aktivitou<sup>174</sup> a TPC, jiní tvrdí, že statistická korelace je významná mezi celkovými fenoly a flavonoidní frakcí<sup>175</sup> a další autor hájí názor, že antiradikálová aktivita je v důsledku flavan-3-olové frakce a ne v důsledku anthokyaninů<sup>176</sup>. Na druhou stranu se někteří autoři ve svých pokusech také zabývali vlivem vinařských praktik nebo uchovávání vín v lahvi na koncentraci polyfenolických sloučenin a celkové antioxidační kapacity<sup>177,178</sup>. V této práci byla provedena korelační analýza hodnot TAA a TPC. Výsledky korelační analýzy ukázaly silnou korelaci u červeného vína (R = 0,7911) a slabou korelaci u růžového (R = 0,2564) a bílého vína (R = 0,3983). Z výsledků korelační analýzy je patrné, že antioxidační aktivita vín je ovlivněna obsahem fenolických látek. Tuto teorii potvrdil také Fernández-Pachón a kol. ve své studii<sup>179</sup>.

Na základě výsledků hodnot TAA, získaných pomocí metody PLS, byly zjištěny významné rozdíly jak mezi jednotlivými druhy vín, tak technologickými fázemi jejich výroby. Dále byl pozorován stejný trend změn hodnot TAA a TPC v průběhu celého výrobního procesu.



**Obrázek 18** Hodnoty TAA pro všechny druhy vín podle PLS. Chybové úsečky vyjadřují směrodatnou odchylku.

### Diskriminační analýza

DA byla použita pro klasifikaci jednotlivých druhů vín (červené, růžové, bílé) v různých technologických fázích jejich výroby. Ke klasifikaci jednotlivých druhů vín byly vybrány různé infračervené oblasti spektra, které jsou uvedené v tabulce 12. V původním (celém) spektru každého vzorku vína ( $4000 - 600 \text{ cm}^{-1}$ ) byly též přítomny absorpční pásy náležící interferujícím sloučeninám, zejména molekulám vody, která absorbuje v infračervených oblastech  $1750 - 1590 \text{ cm}^{-1}$  a  $3700 - 3000 \text{ cm}^{-1}$ .



**Tabulka 12** Vybrané infračervené regiony použité ke klasifikaci vín

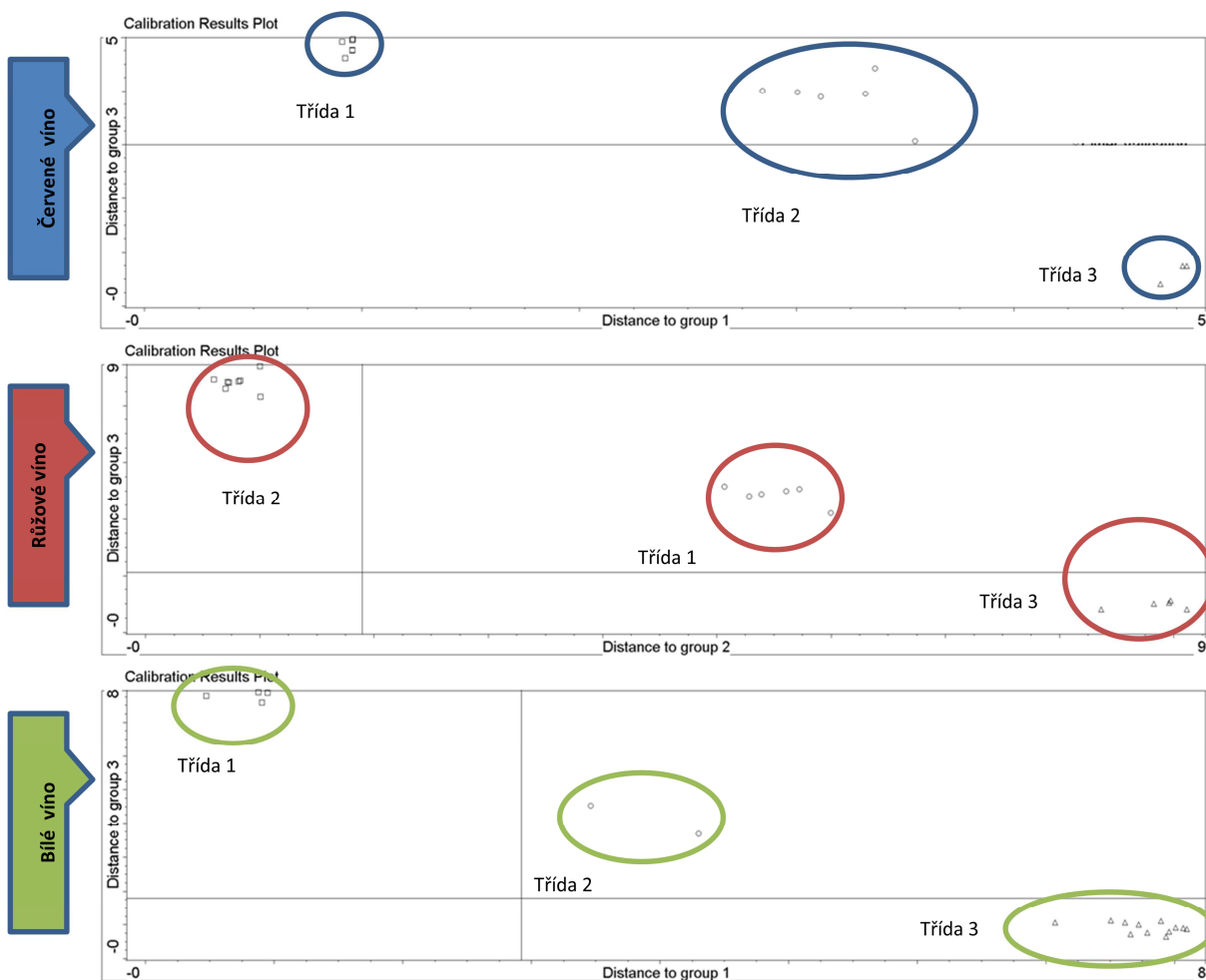
<b>Druh vína</b>	<b>Infračervená oblast spektra</b>
Červené víno	3000 – 2900 cm <sup>-1</sup> , 1570 – 966 cm <sup>-1</sup>
Růžové víno	1470 – 966 cm <sup>-1</sup>
Bílé víno	1200 – 966 cm <sup>-1</sup>

Vzorky jednotlivých druhů vín byly rozděleny do 3 skupin podle základních technologických operací výrobního procesu a jsou uvedeny v tabulce 13. Jednotlivé skupiny představují individuální třídy, které byly pomocí DA rozlišeny. Výsledkem DA je grafické znázornění Mahalanobisovy vzdálenosti, která je indikátorem rozdílnosti mezi jednotlivými třídami.

**Tabulka 13** Rozdělení vzorků vín do jednotlivých tříd

<b>Druh vína</b>	<b>Počet vzorků</b>	<b>Třídy</b>		
		<b>třída 1</b>	<b>třída 2</b>	<b>třída 3</b>
Červené víno	7	C1, C2, C3	C4, C5, C6	C7
Růžové víno	9	R1, R2, R3	R4, R5_1,2,3	R6, R7
Bílé víno	9	B1, B2	B3	B4, B5:1,2,3, B6,B7

Na obrázku 19 je zobrazena klasifikace červeného, růžového a bílého vína používající 10 hlavních komponent (faktorů) pro vývoj kalibračního modelu. Z obrázku je patrné, že jednotlivé skupiny (třídy) tvoří individuální shluky, které mají různé meziklastrové Mahalanobisovy vzdálenosti, jejichž průměrné hodnoty jsou prezentovány v tabulce 14.



**Obrázek 19** Graf klasifikace červeného, růžového a bílého vína podle DA

**Tabulka 14** Mahalanobisovy vzdálenosti mezi třídami červeného, růžového a bílého vína

Třídy	Červené víno	Růžové víno	Bílé víno
třída 1 – třída 2	3,20	5,51	3,92
třída 2 – třída 3	3,87	8,85	4,06
třída 1 – třída 3	4,75	4,84	7,70

Výroba vína obecně zahrnuje několik technologických fází, mezi které patří sklizeň hroznů, drcení hroznů, lisování, fermentace, zrání, školení vína a lahvování. Každý z těchto výrobních kroků je charakteristický pro každý druh vína (červené, růžové, bílé víno), odrůdu a vinařství. V této práci byly použity vzorky vín, které byly sbírány během jejich výroby a byly rozděleny do 3 skupin podle základních technologických operací (macerace, fermentace

a hotové víno). První skupina zahrnuje proces lisování a macerace slupek, druhá skupina fázi fermentace a třetí skupina zahrnuje školení vína a lahvování. Na základě výsledků DA, můžeme konstatovat, že jednotlivé technologické operace mohou být rozlišeny podle infračervených spekter vín.

Jednou z nejdůležitějších operací při výrobě vína je fermentace neboli kvašení vína, během kterého se vytváří alkohol a mošt vinné révy se pomalu mění na víno. Hlavní vliv na výsledek fermentačního procesu mají přidané kvasinky, které jsou typické pro každý druh vína, dále cukerný obsah hroznů a teplota. Při porovnání Mahalanobisových vzdáleností procesu fermentace (třída 2 - třída 3) a macerace (třída 1 - třída 2), větší hodnoty vzdáleností byly pozorovány pro fermentační proces (Tab. 14). Během tohoto procesu se složení vína mění více než při procesu macerace. Významnější rozdíl ve vzdálenosti v procesu fermentace, při porovnání jednotlivých druhů vín, mělo růžové víno než červené a bílé víno. Pravděpodobně je to způsobeno rozdílnými výrobními postupy.

Významné rozdíly ve vzdálenostech byly nalezeny mezi třídou 1 a třídou 3, tj. mezi fází macerace a hotovým vínem. Významné hodnoty vzdáleností byly pozorovány u červeného a bílého vína. Tyto rozdíly, mající také největší hodnoty Mahalanobisových vzdáleností, indikují změny složení vín během jejich výrobního procesu. Naproti tomu, růžové víno vykazovalo opačný trend.

## 6 ZÁVĚR

Cílem této práce byla aplikace infračervené a Ramanovy spektroskopie při analýze biologicky aktivních látek ve vybraných potravinách. Velký důraz byl kladen na použití těchto metod pro kontrolu kvality.

Práce představuje možné využití infračervené spektroskopie pro kontrolu kvality a pravosti sýrů typu Tvarůžek a Romadúr. Tato metoda byla založena na měření a vyhodnocení spekter plynné fáze jednotlivých druhů zrajících sýrů po jejich kontrolovaném zahřívání. V první řadě byly studovány dva parametry zahřívání vzorků (teplota a doba zahřívání) a byly porovnány dvě různé přípravy vzorků (sušení v exsikátoru a lyofilizace). Teplota zahřívání 120 °C a doba zahřívání 90 minut byly vybrány jako vhodné experimentální podmínky pro zahřívání vzorků. Následovalo statistické vyhodnocení spekter jednotlivých druhů sýrů pomocí diskriminační analýzy. Tato klasifikační statistická metoda pomohla odhalit významné rozdíly mezi jednotlivými druhy sýrů typu Tvarůžek resp. mezi originálními Olomouckými tvarůžky a jejich napodobeninami a mezi jednotlivými druhy sýrů typu Romadúr.

Pro analýzu biogenních aminů v tvrdých sýrech byla použita jak infračervená tak i Ramanova spektroskopie. Analýze bylo podrobena šest druhů tvrdých sýrů (uzených a neuzených), které byly vyrobeny z kravského, kozího a ovčího mléka. Metoda infračervené spektroskopie byla založena na měření příslušných extraktů jednotlivých tvrdých sýrů pomocí techniky ATR. Metoda Ramanovy spektroskopie byla založena na měření lyofilizovaných tvrdých sýrů. Ke statistickému vyhodnocení infračervených resp. Ramanových spekter byla opět použita diskriminační analýza. Obě metody jsou vhodné k charakterizaci tvrdých sýrů podle jejich konečné úpravy (uzený a neuzený sýr), navíc metoda infračervené spektroskopie je také vhodná k charakterizaci těchto sýrů podle druhu mléka použitého k jejich výrobě.

Infračervená spektroskopie byla dále použita k analýze vín v různých technologických fázích výroby. Analýze byly podrobeny tři druhy vybraných moravských vín (červené Frankovka, růžové Frankovka, bílé Cuveé) odebíraných v různých fázích jejich výroby. V první řadě byly vytvořeny PLS modely na základě příslušných infračervených spekter, které byly různě upraveny, a referenčních hodnot TPC a TAA získaných nezávislými spektrofotometrickými měřeními. Následně byl u jednotlivých vzorků vín stanoven

(predikován) obsah celkových fenolických látek a celkové antioxidační aktivity. Bylo potvrzeno, že červené víno dosahuje vyšších hodnot TPC než růžové a bílé víno a stejné výsledky byly získány i pro TAA. V průběhu výroby červeného a bílého vína byl pozorován nárůst hodnot TPC, zatímco opačný trend byl pozorován u růžového vína. Změny hodnot TAA v průběhu výroby jednotlivých druhů vín naznačovaly podobný trend jako u TPC. Byla nalezena pozitivní korelace mezi hodnotami TPC a TAA. Infračervená spektra jednotlivých druhů vín byla dále použita k rozdělení těchto vín podle základních technologických operací (macerace, fermentace a hotové víno). Statistické vyhodnocení bylo provedeno pomocí diskriminační analýzy, pomocí které se podařilo charakterizovat vzorky vín na základě jednotlivých výrobních operací.

Metody vibrační spektroskopie ve spojení s vícerozměrnými statistickými metodami jsou hojně používané v potravinářském průmyslu. Kromě stanovení hlavních složek potravin nabízí tyto metody využití také v analýze biologicky aktivních látek, které mohou být využity jak pro kontrolu kvality, tak jako indikátory kvality potravin, ať už v průběhu jejich výroby nebo u hotových výrobků.

## 7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

<b>AAE</b>	ekvivalent askorbové kyseliny
<b>AOAC</b>	asociace analytických chemiků (Association of Official Analytical Chemists)
<b>ATR</b>	technika zeslabeného úplného odrazu (Attenuated total reflectance)
<b>BA</b>	biogenní aminy
<b>CARS</b>	koherentní anti-Stokesova Ramanova spektroskopie (Coherent anti-Stokes Raman spectroscopy)
<b>CCD</b>	charge-coupled device detektor
<b>DA</b>	diskriminační analýza (Discriminant analysis)
<b>DRIFTS</b>	difúzní reflektance (Diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy)
<b>DTGS</b>	deuterovaný triglycinsulfát
<b>FAR</b>	vzdálená infračervená oblast
<b>FRAP</b>	ferric reducing-antioxidant potencial
<b>FT</b>	Fourierova transformace
<b>FTIR</b>	infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (ve střední infračervené oblasti)
<b>GAE</b>	ekvivalent gallové kyseliny
<b>IR</b>	infračervená
<b>MIR</b>	infračervená spektroskopie ve střední infračervené oblasti
<b>NIR</b>	blízká infračervená oblast infračervená spektroskopie v blízké infračervené oblasti
<b>PAS</b>	fotoakustická spektroskopie (Photoacoustic spectroscopy)
<b>PGI</b>	chráněné zeměpisné označení (Protected Geographical Indication)
<b>PLS</b>	metoda částečných nejmenších čtverců (Partial Least Squares)
<b>R<sub>cal</sub></b>	korelační koeficient kalibrace
<b>R<sub>cv</sub></b>	korelační koeficient křížové validace
<b>RMSEC</b>	chyba kalibrace (Root Mean Square Error of Calibration)
<b>RMSECV</b>	chyba křížové validace (Root Mean Square Error of Cross validation)
<b>RMSEP</b>	chyba predikce (Root Mean Square Error of Prediction)
<b>RRS</b>	rezonanční Ramanova spektroskopie (Resonance Raman spectroscopy)

<b>SERS</b>	povrchem zesílená Ramanova spektroskopie (Surface enhanced Raman spectroscopy)
<b>TAA</b>	celková antioxidační aktivita (Total Antioxidant activity)
<b>TPC</b>	celkové fenolické látky (Total phenolic compounds)
<b>UV</b>	ultrafialová oblast
<b>UV/VIS</b>	spektroskopie v ultrafialové a viditelné oblasti
<b>VIS</b>	viditelná oblast

## 8 LITERATURA

1. Sheppard N.: The Historical Development of Experimental Techniques in Vibrational Spectroscopy. v knize: *Handbook of Vibrational spectroscopy* (Chalmers J. M., Griffiths P. R., ed), sv. I, John Wiley & Sons, Chichester, 2002.
2. Gilbert A. S.: Vibrational, Rotational and Raman Spectroscopy, Historical Perspective, v knize: *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry* (Lindon J. C., Tranter G. E., Holmes J. L., ed), sv. I-III, Elsevier, Amsterdam, 2000.
3. Schrader B.: Early history of vibrational spectroscopy, v knize: *Infrared and Raman Spectroscopy: Method and Applications* (Schrader B, ed), VCH, Weinheim, 1995.
4. Abney W., Festing R. E.: *On the Influence of the Atomic Grouping in the Molecules of Organic Bodies on Their Absorption in the Infra-Red Region of the Spectrum*. Philos. Trans. R. Soc. London 172, 887-918 (1881).
5. Coblentz W. W.: *Investigations of Infrared Spectra*, Carnegie Institution of Washington, Washington D. C., 1905.
6. Perkins W. P.: *Fourier transform infrared spectroscopy. Part II Advantages of FT-IR*. J. Chem. Educ. 64 (11), A269-A271 (1987).
7. Bradley M.: Advantages of a Fourier Transform Spectrometer. Thermo Fisher Scientific, Madison, 2008. <http://www.unicam.hu/index.php/alkalmazastechnikai-anyagokm/category/26-ftir-spektrometerek-es-mikroszkopok?download=179:ftir-spektrometerek-es-mikroszkopok-anyagai>, staženo 17.3.2014
8. Thermo Scientific: Advantages of Fourier-Transform Near-Infrared Spectroscopy. Thermo Electron Corporation, Madison, 2004. <http://www.thermoscientific.com/content/dam/tfs/ATG/CAD/CAD%20Documents/Application%20&%20Technical%20Notes/Molecular%20Spectroscopy/NIR/FTNIR%20Instruments/D14181~.pdf>, staženo 17.3.2014
9. Raman C. V., Krishnan K. S.: *A New Type of Secondary Radiation*. Nature 121 (3048), 501-502 (1928).
10. Smekal J.: *Zur Quantentheorie der Dispersion*, Naturwissenschaften 11, 873-875 (1923).



11. Strauch B.: *O Československé Spektroskopické Společnosti a Spektroskopické společnosti Jana Marka Marci*, Buletin Spektroskopické společnosti Jana Marka Marci 161, 1-10 (2013).
12. Griffiths P. R., Chalmers J. M., Pivonka D. E.: History, Trends and Prognostications, v knize: *Applications of Vibrational Spectroscopy in Pharmaceutical Research and Development* (Pivonka D. E., Chalmers J. M., Griffiths P. R., ed), John Wiley & Sons, Chichester, 2007.
13. Griffiths P. R.: The Introduction of Vibrational Spectroscopy. v knize: *Handbook of Vibrational spectroscopy* (Chalmers J. M., Griffiths P. R., ed), sv. I, kap. 2, John Wiley & Sons, Chichester, 2002.
14. Skoog D. A., Holler F. J., Crouch S. R.: *Principles of Instrumental Analysis*. (6th Edition), Brooks/Cole, Belmont, 2007.
15. Okáč A.: *Výklad k základním operacím v chemické analýze*. JČMF, Praha, 1948.
16. Košťál P.: *Diplomová práce*. Západočeská Univerzita v Plzni, Plzeň 2012.
17. Stuart, B. H.: *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*. John Wiley and Sons, Chichester 2004.
18. Sherman Hsu C.-P.: Infrared spectroscopy. v knize: *Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry* (Settle F.A., ed), Prentice Hall PTR, New Jersey, 1997.
19. Matějka P.: *Techniky měření a interpretace IR a Ramanových spekter*. VŠCHT, Praha, 2012 <http://www.vscht.cz/anl/matejka/molekuly-01.pdf>, staženo 29.11.2012
20. Trchová M.: Jak vibrují atomy v molekulách. <http://archiv.otevrenaveda.cz/users/Image/default/C1Kurzy/NH2006pdf/15.pdf>, staženo 12.2.2014
21. Harris D. C., Bertolucci M. D.: *Symmetry and Spectroscopy*. An Introduction to Vibrational and Electronic Spectroscopy. Dover Publications, New York, 1978.
22. Horák M., Papoušek D.: *Infračervená spektra a struktura molekul*. Academia, Praha, 1976.
23. Milata V., Segľa P., Brezová V., Gatial A., Kaváčík V., Miglierini M., Stankovský Š., Šíma J.: *Aplikovaná molekulová spektroskopie*. STU, Bratislava, 2008.
24. Pivonka D. E., Chalmers J. M., Griffiths P. R. (Eds): *Applications of Vibrational Spectroscopy in Pharmaceutical Research and Development*. Wiley & Sons, Chichester, 2007.

25. Stuart B.: *Biological Applications of Infrared Spectroscopy*. Wiley & Sons, Chichester, 1997.
26. Chalmers J. M., Edwards H. G. M., Hargreaves M. D. (Eds): *Infrared and Raman Spectroscopy in Forensic Science*. Wiley & Sons, Chichester, 2012.
27. Kania P: Infračervená spektroskopie. návod do cvičení *Laboratoř analytické chemie I*, VŠCHT, Praha, 2010 [http://www.vscht.cz/anl/lach1/7\\_IC.pdf](http://www.vscht.cz/anl/lach1/7_IC.pdf) , staženo 23.4.2010
28. Thermo Nicolet: Introduction to Fourier Transform Infrared Spectrometry. Thermo Nicolet Corporation, 2001. <http://mmrc.caltech.edu/FTIR/FTIRintro.pdf>, staženo 12.2.2014
29. Keresztury G.: Raman Spectroscopy: Theory. v knize: *Handbook of Vibrational spectroscopy* (Chalmers J. M., Griffiths P. R., ed), sv. I, John Wiley & Sons, Chichester, 2002.
30. Ferraro J. R., Nakamoto K, Brown C. W.: *Introductory Raman Spectroscopy*.(2nd Edition), Elsevier, 2003.
31. Schrader B. (Ed.): *Infrared and Raman Spectroscopy: Method and Applications*. VCH, Weinheim, 1995.
32. Matějka P. a kol.: *Návody pro laboratorní cvičení z analytické chemie III*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 2002.
33. Socrates G.: *Infrared nad Raman Characteristic Group Frequencies*.(3rd Edition), John Wiley & Sons, Chichester, 2001.
34. Champion A, Kambhampati P.: Surface-enhanced Raman scattering, *Chem. Soc. Rew.* 27, 241-244 (1998).
35. Kneipp K., Moskovits M., Kneipp H.(Eds): *Surface-Enhanced Raman scattering*. Springer, Berlin, 2010.
36. McNay, G., Eustace, D., Smith, W. E., Faulds, K., Graham, D.: *Surface-enhanced Raman scattering (SERS) and surface-enhanced resonance Raman scattering (SERRS): a review of applications*. *Appl. Spectrosc.* 65(8), 825–837 (2011).
37. Ranc V., Hruzikova J., Maitner K., Pucek R., Milde D., Kvítek L.: *Quantification of purine basis in their mixtures at femto-molar concentration levels using FT-SERS*. *J. Raman Spectrosc.* 43(8), 971–976 (2012).

38. Ozaki Y., McClure W. F., Christy A. A. (Eds): *Near-Infrared Spectroscopy in Food Science and Technology*. John Wiley & Sons, Hoboken, 2007.
39. Li-Chan E. C. Y.: Introduction to Vibrational Spectroscopy in Food Science. v knize: *Applications of Vibrational Spectroscopy in Food Science* (Li.Chan E. C. Y., Griffiths P. R., Chalmers J. M., ed) sv.I, Wiley & Sons, Chichester, 2010.
40. Prieto N., Roehe R, Lavín P., Batten G., Andrés S.: *Application of near infrared reflectance spectroscopy to predict meat and meat products quality: A review*. Meat Sci. 83, 175–186 (2009).
41. Papadopoulou O., Panagou E. Z., Tassou C. C., Nychas G.-J. E.: *Contribution of Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy data on the quantitative determination of minced pork meat spoilage*. Food Res. Int. 44, 3264–3271 (2011).
42. Zajac A., Hanuza J., Dymińska L.: *Raman spectroscopy in determination of horse meat kontent in the mixture with other mens*. Food Chem. 156, 333–338 (2014).
43. Anthoula A. Argyri A. A., Jarvis R. M., Wedge D., Xu Y., Panagou E. Z., Goodacre R., Nychas G.-J- E.: *A comparison of Raman and FT-IR spectroscopy for the prediction of meat spoilage*. Food Control 29, 461–470 (2013).
44. Galvis-Sánchez A. C., Tóth I. V., Portela A., Delgadillo I., Rangel A. O. S. S.: *Monitoring sodium chloride during cod fish desalting process by flow injection spectrometry and infrared spectroscopy*. Food Control 22, 277–282 (2011).
45. Hernández-Martínez M., Gallardo-Velázquez T., Osorio-Revilla G., Almaraz-Abarca N., Ponce-Mendoza A., Vásquez-Murrieta M. S.: *Prediction of total fat, fatty acid composition and nutritional parameters in fish fillets using MID-FTIR spectroscopy and chemometrics*. LWT - Food Sci. Technol. 52, 12–20 (2013).
46. Zhang Y., Huang Y., Zhai F., Du R., Liu Y., Lai K.: *Analyses of enrofloxacin, furazolidone and malachite green in fish products with surface-enhanced Raman spectroscopy*. Food Chem. 135, 845–850 (2012).
47. Marquardt B. J., Wold J. P.: *Raman analysis of fish: a potential method for rapid quality screening*. Lebensm.-Wiss. u.-Technol. 37, 1–8 (2004).
48. Coppa M., Revello-Chion A., Giaccone D., Ferlay A., Tabacco E., Borreani G.: *Comparison of near and medium infrared spectroscopy to predict fatty acid composition on fresh and thawed milk*. Food Chem. 150, 49–57 (2014).

49. Lei Y., Zhou O., Zhang Y.-L., Chen J.-B., Sun S.-Q., Noda I.: *Analysis of crystallized lactose in milk powder by Fourier-transform infrared spectroscopy combined with two-dimensional correlation infrared spectroscopy*. J. Mol. Struct. 974, 88–93 (2010).
50. Giovannozzi A. M., Rolle F., Segà M., Abete M. C., Marchis D., Rossi A. M.: *Rapid and sensitive detection of melamine in milk with gold nanoparticles by Surface Enhanced Raman Scattering*. Food Chem. 159, 250–256 (2014).
51. El-Abassy R. M., Eravuchira P. J., Donfack P., von der Kammer B., Materny A.: *Fast determination of milk fat content using Raman spectroscopy*. Vib. Spectrosc 56, 3–8 (2011).
52. Cozzolino D.: *An overview of the use of infrared spectroscopy and chemometrics in authenticity and traceability of cereals*. Food Res. Int. 60, 262–265 (2014).
53. Brito A. L. B., Brito L. R., Honorato F. A., Pontes M. J. C., Pontes L. F. B. L.: *Classification of cereal bars using near infrared spectroscopy and linear discriminant analysis*. Food Res. Int. 51, 924–928 (2013).
54. Łabanowska M., Weselucha-Birczyńska A., Kurdziel M., Puch P.: *Thermal effects on the structure of cereal starches. EPR and Raman spectroscopy Studies*. Carbohydr. Polym. 92, 842–848 (2013).
55. Lee K.-M., Herrman T. J., Yun U.: *Application of Raman spectroscopy for qualitative and quantitative analysis of aflatoxins in ground maize samples*. J. Cereal Sci. 59, 70–78 (2014).
56. Scibisz I., Reich M., Bureau S., Gouble B., Causse M., Bertrand D., Renard C. M. G.C.: *Mid-infrared spectroscopy as a tool for rapid determination of internal quality parameters in tomato*. Food Chem. 125, 1390–1397 (2011).
57. Chen X., Wub J., Zhou S., Yang Y. Ni X., Yang J., Zhu Z., Shi C.: *Application of near-infrared reflectance spectroscopy to evaluate the lutein and b-carotene in Chinese kale*. J. Food Compos. Anal. 22, 148–153 (2009).
58. Müller C., David L., Chis V., Pînzaru C. S.: *Detection of thiabendazole applied on citrus fruits and bananas using surface enhanced Raman scattering*. Food Chem. 145, 814–820 (2014).
59. Trebolazabala J., Maguregui M., Morillas H., de Diego A., Madariaga J. M.: *Use of portable devices and confocal Raman spectrometers at different wavelengths to obtain*

- the spectral information of the main organic components in tomato (Solanum lycopersicum) fruits. Spectrochim. Acta, Part A 105, 391–399 (2013).*
60. Camps C., Robic R., Bruneau M., Laurens F.: *Rapid determination of soluble solids content and acidity of Black currant (Ribes nigrum L.) juice by mid-infrared spectroscopy performed in series. LWT - Food Sci. Technol. 43, 1164–1167 (2010).*
  61. Vardin H., Tay A., Ozen B., Mauer L.: *Authentication of pomegranate juice concentrate using FTIR spectroscopy and chemometrics. Food Chem. 108, 742–748 (2008).*
  62. Iñón F. A., Garrigues S., de la Guardia M.: *Combination of mid- and near-infrared spectroscopy for the determination of the quality properties of beers. Anal. Chim. Acta 571, 167–174 (2006).*
  63. Pierna J. A. F., Duponchel L., Ruckebusch C., Bertrand D., Baeten V., Dardenne P.: *Trappist beer identification by vibrational spectroscopy: A chemometric challenge posed at the 'Chimiométrie 2010' congress. Chemom. Intell. Lab. Syst. 113, 2–9 (2012).*
  64. Ferrari E., Focab G., Vignalic M., Tassia L., Ulrici A.: *Adulteration of the anthocyanin content of red wines: Perspectives for authentication by Fourier Transform-Near InfraRed and 1H NMR spectroscopies. Anal. Chim. Acta 701, 139–151 (2011).*
  65. Garde-Cerdán T., Lorenzo C., Zalacain A., Alonso G. L., Salinas M. R.: *Using near infrared spectroscopy to determine haloanisoles and halophenols in barrel aged red wines. LWT - Food Sci. Technol. 46, 401–405 (2012).*
  66. Bevilacqua M., Bucci R., Materazzi S., Marini F.: *Application of near infrared (NIR) spectroscopy coupled to chemometrics for dried egg-pasta characterization and egg content quantification. Food Chem. 140, 726–734 (2013).*
  67. Lin H., Zhao J., Sun L., Chen Q., Zhou F.: *Freshness measurement of eggs using near infrared (NIR) spectroscopy and multivariate data analysis. Innov. Food Sci. Emerg. 12, 182–186 (2011).*
  68. Ngarizea S., Adamsb A., Howell N. K.: *Studies on egg albumen and whey protein interactions by FT-Raman spectroscopy and rheology. Food Hydrocolloids 18, 49–59 (2004).*

69. Fodor M., Woller A., Turza S., Szigedi T.: *Development of a rapid, non-destructive method for egg content determinativ in dry pasta using FT-NIR technique*. J. Food Eng. 107, 195–199 (2011).
70. Norris K.: *Instrumentation of infrared radiation*. Trans. Am. Soc. Agric. Eng. 5, 12–20 (1962).
71. Williams P. C.: *Screening Wheat of Protein and Hardness by Near Infrared Reflectance Spectroscopy*. Cereal. Chem. 56, 169–172 (1979).
72. Davies A. M. C., Grant A.: *Review: Near infra-red analysis of food*. Int. J. Food Sci. Technol. 22(3), 191–207 (1987).
73. Pasquini C.: *Near infrared spectroscopy: Fundamentals, practical aspects and analytical applications*. J. Braz. Chem. Soc. 14 (2), 198–219 (2003).
74. Li-Chan E. C. Y., Ismail A. A., Sedman J., van de Voort F. R.: *Vibrational Spectroscopy of Food and Food Products*. v knize: *Handbook of Vibrational spectroscopy* (Chalmers J. M., Griffiths P. R., ed), sv. V., John Wiley & Sons, Chichester, 2002.
75. Workman Jr J. J.: *Review of Process and Non-invasive Near-Infrared and Infrared Spectroscopy: 1993–1999*. Appl. Spectrosc. Rev. 34(1-2), 1–89 (1999).
76. Benito M. T. J., Ojeda C. B., Rojas F. S.: *Process Analytical Chemistry: Applications of Near Infrared Spectrometry in Environmental and Food Analysis: An Overview*. Appl. Spectrosc. Rev. 43, 452–484 (2008).
77. Amir R. M., Anjum F. M., Khan M. R., Imran M.: *Application of Fourier Transform Infrared (FTIT) Spectroscopy in Foods*. Internet J. Food Sav. 13, 310–314 (2011).
78. Wilson R. H., Tapp H. S.: *Mid-infrared spectroscopy for food analysis: recent new applications and relevant developments in sample presentation methods*. Trends Anal. Chem. 18 (2), 85–93 (1999).
79. Ramba F. J., Garrigues S., Ferrer N., de la Guardia M.: *Simple partial least squares–attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectrometric method for the determination of sugars in fruit juices and soft drinks using aqueous standards*. Analyst 123, 277–281 (1998).
80. Barth A.: *Infrared spectroscopy of proteins*. Biochim. Biophys. Acta 1767, 1073–1101 (2007).

81. Downey G.: *Food and food ingredient authentication by mid-infrared spectroscopy and chemometrics*. Trends Anal. Chem. 17 (7), 418–424 (1998).
82. Li-Chan E. C. Y.: *The applications of Raman spectroscopy in food science*. Trends Food Sci. Technol. 7, 361–365 (1996).
83. Christensen J., NØgaard L., Bro R., Engelsen S. B.: *Multivariate Autofluorescence of Intact Food Systems*. Chem. Rev. 2006, 1979–1994 (2006).
84. Biggs D. A.: *Precision and accuracy of infrared milk analysis*. J. Assoc. Offic. Anal. Chem. 55, 488–497 (1972).
85. Fagan C. C., O'Donnell C. P.: *Applications of Vibrational Spectroscopy to the Study of Cheese and Other Fermented, Solid and Semi-solid Dairy Products*. v knize: *Applications of Vibrational Spectroscopy in Food Science* (Li-Chan E. C. Y., Griffiths P. R., Chalmers J. M., ed) sv.II, Wiley & Sons, Chichester, 2010.
86. McQueen D. H., Wilson R., Kinnunen A., Jensen E. P.: *Comparison of two infrared spectroscopic methods for cheese analysis*. Talanta 42, 2007–2015 (1995).
87. Chen M., Irudayaraj J., McMahon D. J.: *Examination of Full Fat and Reduced Fat Cheddar Cheese During Ripening by Fourier Transform Infrared Spectroscopy*. J Dairy Sci 81, 2791–2797 (1998).
88. Rodriguez-Saona L. E., Koca N., Harper W. J., Alvarez V. B.: *Rapid Determination of Swiss Cheese Composition by Fourier Transform Infrared/Attenuated Total Reflectance Spectroscopy*. J. Dairy Sci. 89,1407–1412 (2006).
89. Karoui R., Dufour E., Pillonel L., Picque D., Cattenoz T., Bosset J.-O.: *Fluorescence and infrared spectroscopies: a tool for the determination of the geographic origin of Emmental cheeses manufactured during summer*. Lait 84, 359–374 (2004).
90. Karoui R., de Baerdemaeker J.: *A review of the analytical methods coupled with chemometric tools for the determinativ of the quality and identity of diary products*. Food Chem. 102, 621–640 (2007).
91. Karoui R., Dufour E., Pillonel L., Picque D., Cattenoz T., Bosset J.-O.: *Determining the geographic origin of Emmental cheeses produced during winter and summer using a technique based on the concatenation of MIR and fluorescence spectroscopic data*. Eur. Food Res. Technol. 219, 184–189 (2004).

92. Karoui R., Mazerolles G., Bosset J.-O., de Baerdemaeker J., Dufour E.: *Utilisation of mid-infrared spectroscopy for determination of the geographic origin of Gruyère PDO and L'Etivaz PDO Swiss cheeses*. Food Chem. 105, 847–854 (2007).
93. Pillonel L., Luginbuhl W., Picque D., Schaller E., Tabacchi R., Bosset J.-O.: *Analytical methods for the determination of the geographic origin of Emmental cheese. Mid and near-infrared spectroscopy*. Eur. Food Res. Technol. 216, 174–178 (2003).
94. Hruzikova J., Milde D., Krajancova P., Ranc V.: *Discrimination of Cheese Products for Authenticity Control by Infrared Spectroscopy*. J. Agric. Food Chem. 60, 1845–1849 (2012).
95. Martín-del-Campo S.T., Picquea D., Cosío-Ramírez R., Corrieu G.: *Middle infrared spectroscopy characterization of ripening stages of Camembert-type cheeses*. Int. Dairy J. 17, 835–845 (2007).
96. Mazerolles G., Devaux M.-F., Duboz G., Duployer M.-H., Riou N. M., Dufour E.: *Infrared and fluorescence spectroscopy for monitoring protein structure and interaction changes during cheese ripening*. Lait 81, 509–527 (2001).
97. Dufour E., Mazerolles G., Devaux M. F., Duboz G., Duployer M. H. Riou N. M.: *Phase transition of triglycerides during semi-hard cheese ripening*. Int. Dairy J. 10, 81–93 (2000).
98. Karoui R., Mouazen A. M., Dufour E., Pillonel L., Picque D., Bosset J.-O., de Baerdemaeker J.: *Mid-infrared spectrometry: A tool for the determination of chemical parameters in Emmental cheeses produced during winter*. Lait 86, 83–97 (2006).
99. Downey G., Sheehan E., Delahunty C., O'Callaghan D., Guinee T., Howard V.: *Prediction of maturity and sensory attributes of Cheddar cheese using near-infrared spectroscopy*. Int. Dairy J. 15, 701–709 (2005).
100. Subramanian A., Harper W. J., Rodriguez-Saona L. E.: *Cheddar cheese classification based on flavor quality using a novel extraction method and Fourier transform infrared spectroscopy*. J. Dairy Sci. 92, 87–94 (2009).
101. Lefier D., Lamprell H., Mazerolles G.: *Evolution of Lactococcus strains during ripening in Brie cheese using Fourier transform infrared spectroscopy*. Lait 80, 247–254 (2000).



102. Lucia V., Daniela B., Rosalba L.: *Use of Fourier transform infrared spectroscopy to evaluate the proteolytic activity of Yarrowia lipolytica and its contribution to cheese ripening*. Int. J. Food Microbiol. 69, 113–123 (2001).
103. Chen G., Kocaoglu –Vurma N.A., Harper W. J., Rodrigues-Saona L.E.: *Application of infrared microspectroscopy and multivariate analysis for monitoring the effect of adjunct cultures during Swiss cheese ripening*. J. Dairy Sci. 92, 3575–3584 (2009).
104. Oberreuter H., Brodbeck A., Stetten S., Goerges S., Scherer S.: *Fourier-transform infrared (FT-IR) spectroscopy is a promising tool for monitoring the population dynamics of microorganisms in food stuff*. Eur. Food Res. Technol. 216, 434–439 (2003).
105. Pillonel L., Dufour E., Schaller E., Bosset J.-O., de Baerdemaeker J., Karoui R.: *Prediction of colour of European Emmental cheeses by using Near infrared spectroscopy: a feasibility study*. Eur. Food Res. Technol. 226, 63–69 (2007).
106. Skeie S., Feten G., AlmØy T., Østlie H., Isaksson T.: *The use of near infrared spectroscopy to predict selected free amino acids during cheese ripening*. Int. Dairy J. 16, 236–242 (2006).
107. Fontecha J., Bellanato J., Juarez M.: *Infrared and Raman Spectroscopic Study of Casein in Cheese: Effect of Freezing and Frozen Storage*. J. Dairy Sci. 76, 3303–3309 (1993).
108. Mossoba M. M., Kramer J. K. G., Fritsche J., Yurawecz M. P., Eulitz K. D., Ku Y., Rader J. I.: *Application of Standard Addition to Eliminate Conjugated Linoleic Acid and Other Interferences in the Determination of Total Trans Fatty Acids in Selected Food Products by Infrared Spectroscopy*. JAOCS 78, 631–634 (2001).
109. Koca N., Rodriguez-Saona L.E., Harper W.J., Alvarez V.B.: *Application of Fourier Transform Infrared Spectroscopy for Monitoring Short-Chain Free Fatty Acids in Swiss Cheese*. J. Dairy Sci. 90, 3596–3606 (2007).
110. Upreti P., Metzger L.E.: *Utilization of Fourier transform infrared spectroscopy for measurement of organic phosphorus and bound calcium in Cheddar cheese*. J. Dairy Sci. 89, 1926–1937 (2006).

111. Martín-del-Campo S.T., Picque D., Cosío-Ramírez R., Corrieu G.: *Evaluation of chemical parameters in soft mold-ripened cheese during ripening by mid-infrared spectroscopy*. J. Dairy Sci. 90, 3018-3027 (2006).
112. Lee S.J., Jeon I.J., Harbers L.H.: *Near-infrared reflectance spectroscopy for rapid analysis of curds during cheddar cheese making*. J. Food Sci. 62, 53-56 (1997).
113. Cattaneo T.M.P., Giardina C., Sinelli N., Riva M., Giangiacomo R.: *Application of FT-NIR and FT-IR spectroscopy to study the shelf-life of Crescenza cheese*. Int. Dairy J. 15, 693-700 (2005).
114. <http://www.tvaruzky.cz/O-tvaruzkach.aspx>, staženo 14.3.2014.
115. Jelínková M.: *Disertační práce*. Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc 2011.
116. Innocente N., Biasutti M., Padovese M., Moret S.: *Determination of biogenic amines in cheese using HPLC technique and direct derivatization of acid extract*. Food Chem. 101, 1285–1289 (2007).
117. Flasarová R.: *Bakalařská práce*. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Zlín 2009.
118. Önal A.: *A review: Current analytical methods for the determinativ of biogenic amines in foods*. Food Chem. 103, 1475–1486 (2007).
119. Dračková M., Jandová T., Standarová E., Kordiovská P., Borkovcová I., Janštová B., Navrátilová P., Vorlová L.: *Stanovení obsahu polyaminů v tvarůžcích pomocí blízké infračervené reflektanční spektrometrie*. Acta fytotechnica et zootechnica 12, 127 – 132 (2009).
120. <http://www.prumyslovaautomatizace.com/cesi-z-alkoholu-holduji-hlavne-pivu-a-take-vinu-koralka-je-tak-nelaka>, staženo 19.3.2014.
121. <http://www.winehouse.cz/clanky-o-vine/trendy-vinarske-sezony-2013>, staženo 19.3.2014.
122. Romera-Fernández M., Berrueta L. A., Garmón-Lobato S., Gallo B., Vicente F., Moreda J. M.: *Feasibility study of FT-MIR spectroscopy and PLS-R for the fast determinativ of anthocyanins in wine*. Talanta 88, 303–310 (2012).
123. Gishen M., Cozzolino D., Damberg R. G.: *The analysis of Grapes, Wine, and Other Alcoholic Beverages by Infrared Spectroscopy*. v knize *Applications of Vibrational Spectroscopy in Food Science* (Li-Chan E. C. Y., Griffiths P. R., Chalmers J. M., ed) sv.II, Wiley & Sons, Chichester, 2010.

124. Cozzolino D., Cynkar W., Janik L., Damberg R. G., Gishen M.: *Review: Analysis of grapes and wine by near infrared spectroscopy*. J. Near Infrared Spectrosc. 14, 279–289 (2006).
125. Patz C.-D., David A., Thente K., Kürbel P., Dietrich H.: *Wine analysis with FT-IR spectroscopy*. Vitic. Enol. Sci. 54, 80–87 (1999).
126. Urbano-Cuadrado M., Leque de Castro M. D., Perez Juan P. M., Gómez-Nieto M. A.: *Comparison and joint use of near infrared spectroscopy and Fourier transform mid infrared spectroscopy for the determination of wine parameters*. Talanta 66, 218–224 (2005).
127. Urbano-Cuadrado M., Leque de Castro M. D., Perez Juan P. M., Garcia-Olmo J. Gómez-Nieto M. A.: *Near infrared reflectance spectroscopy and multivariate analysis in enology. Determination or screening of fifteen parameters in different types of wines*. Anal. Chim. Acta 527, 81–88 (2004).
128. Shen F., Ying Y., Li B., Zheng Y., Hu J.: *Prediction of sugars and acids in Chinese rice wine by mid-infrared spectroscopy*. Food Res. Int. 44, 1521–1527 (2011).
129. Di Egidio V., Sinelli N., Giovanelli G., Moles A., Casiraghi E.: *NIR and MIR spectroscopy as rapid methods to monitor red wine fermentation*. Eur. Food Res. Technol. 230, 947–955 (2010).
130. Urtubia A., Pérez-correa J. R., Pizarro F., Agosin E.: *Exploring the applicability of MIR spectroscopy to detect early indications of wine fermentation problems*. Food Control 19, 382–388 (2008).
131. Cozzolino D., Kwiatkowski M. J., Parker M., Cynkar W. U., Damberg R. G., Gishen M., Herderich M. J.: *Prediction of phenolic compounds in red wine fermentations by visible and near infrared spectroscopy*. Anal. Chim. Acta 513, 73–80 (2004).
132. Tarantilis P. A., Troianou V. E., Pappas C. S., Kotseridis Y. S., Polissiou M. G.: *Differentiation of Greek red wines on the basis of grape variety using attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy*. Food Chem. 111, 192–196 (2008).
133. Zhang Y.-l., Chen J.-b., Lei Y., Zhou Q., Sun S.-q., Noda I.: *Discrimination of different red wine by Fourier-transform infrared and two-dimensional infrared correlation spectroscopy*. J. Mol. Struct. 974, 144–150 (2010).

134. Edelmann A., Diewok J., Schuster K. Ch., Lendl B.: *Rapid Method for the Discrimination of Red Wine Cultivars Based on Mid-Infrared Spectroscopy of Phenolic Wine Extracts*. J. Agric. Food Chem. 49, 1139–1145 (2001).
135. Cozzolino D., Holdstock M., Damberg R. G., Cynkar W. U., Smith P. A.: *Mid infrared spectroscopy and multivariate analysis: A tool to discriminate between organic and non-organic wines grown in Australia*. Food Chem. 116, 761–765 (2009).
136. Cozzolino D., Cynkar W. U., Shah N., P. A. S.: *Can spectroscopy geographically classify Sauvignon Blanc wines from Australia and New Zealand?* Food Chem. 126, 673–678 (2011).
137. Bevin C. J., Damberg R. G., Fergusson A. J., Cozzolino D.: *Development of a rapid „fingerprinting“ system for wine authenticity by Mid-Infrared spectroscopy*. J. Agric. Food Chem. 54(26), 9713–9718 (2006).
138. Tao S., Li J., Tang J., Mi J., Zhao L.: *Discriminant analysis of red wines from different aging ways by information fusion of NIR and MIR spectra*. v Computer and Computing Technologies in Agriculture V (Li D., Chen Y., ed), vol. 369, str. 478–483, Springer, Berlin Heidelberg (2012).
139. Fragoso S., Aceña L., Guasch J., Mestres M., Busto O.: *Quantification of Phenolic Compounds during Red Winemaking Using FT-MIR Spectroscopy and PLS-Regression*. J. Agric Food Chem. 59, 10795–10802 (2011).
140. Fragoso S., Aceña L., Guasch J., Busto O., Mestres M.: *Application of FT-MIR Spectroscopy for Fast Control of Red Grape Phenolic Ripening*. J. Agric. Food Chem. 59, 2175–2183 (2011).
141. Martelo-Vidal M. J., Vázquez M.: *Determination of polyphenolic compounds of red wines by UV–VIS–NIR spectroscopy and chemometrics tools*. Food Chem. 158, 28–34 (2014).
142. Ferrer-Gallego R., Hernández-Hierro J. M., Rivas-Gonzalo J. C., Escribano-Bailón M. T.: *Determination of phenolic compounds of grape skins during ripening by NIR Spectroscopy*. LWT - Food Sci. Technol. 44, 847–853 (2011).
143. Silva S. D., Feliciano R. P., Boas L. V., Bronze M. R.: *Application of FTIR-ATR to Moscatel dessert wines for prediction of total phenolic and flavonoid contents and antioxidant capacity*. Food Chem. 150, 489–493 (2014).

144. Versari A., Parpinello G. P., Scazzina F., Del Rio D.: *Prediction of total antioxidant capacity of red wine by Fourier transform infrared spectroscopy*. Food Control 21, 786–789 (2010).
145. Kohler A., Afseth N. K., Martens H.: Chemometrics in Biospectroscopy. v knize *Applications of Vibrational Spectroscopy in Food Science* (Li-Chan E. C. Y., Griffiths P. R., Chalmers J. M., ed) sv.I, Wiley & Sons, Chichester, 2010.
146. Wold S., Sjöström M., Eriksson L.: *PLS-regression: a basic tool of chemometrics*. Chemom. Intell. Lab. Syst. 58, 109–130 (2001).
147. Nicolet CZ: *Spektroskopický software TQ Analyst*. Nicolet CZ, Praha 2007.
148. Waterhouse A.I.: Determination of Total Phenolics. v knize: *Current protocols in Food Analytical Chemistry*. (Wrolstad R. E. a kol., ed), str. I1.1.1-I1.1.8, John Wiley & Sons, Inc., Chichester, 2002.
149. Paulová H., Bochořáková H., Táborská E.: *Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek in vitro*. Chem. Listy 98, 174 – 179 (2004).
150. Benzie I. F. F., Strain J. J.: *The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay*. Anal. Biochem. 239, 70–76 (1996).
151. Buňková L., Hudcová K., Budinský P., Lorencová E., Velichová H., Buňka F.: Sledování kvality farmářských sýrů. Mlékařské listy 133, 1–4 (2012).
152. Krajancová P.: *Diplomová práce*. Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc 2011.
153. Moreira J. L., Santos L.: *Spectroscopic interferences in Fourier transform infrared wine analysis*. Anal. Chim. Acta 513, 263-268 (2004).
154. Paixão N., Perestrelo R., Marques J. C., Câmara J. S.: *Relationship between antioxidant capacity and total phenolic content of red, rosé and white wines*. Food Chem. 105, 204-214 (2007).
155. Frankel E. N., Waterhouse A. L., Teissedre P. L.: *Principal phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low-density lipoproteins*. J. Agric. Food Chem. 43, 890-894 (1995).
156. Sato M., Ramarathnam N., Suzuki Y., Ohkubo T., Takeuchi M., Ochi H.: *Varietal differences in the phenolic content and superoxide radical scavenging potential of wines from different sources*. J. Agric. Food Chem. 44(1), 37–41 (1996).

157. Ginjom I. R., D'Arcy B. R., Caffin N. A., Gidley M.: *Phenolic contents and antioxidant activities of major Australian red wines throughout the winemaking process*. J. Agric. Food Chem. 58, 10133–10142 (2010).
158. Gómez-Cordovés C., González-SanJosé M. L.: *Interpretation of colour variables during the aging of red wines: Relationship with families of phenolic compounds*. J. Agric. Food Chem. 43(3), 557-561 (1995).
159. Blanco-Vega D., Gómez-Alonso S., Hermosín-Gutiérrez I.: *Identification, content and distribution of anthocyanins and low molecular weight anthocyanin-derived pigments in Spanish commercial red wines*. Food Chem. 158, 449-458 (2014).
160. Lomolino G., Zocca F., Spettoli P., Zanin G., Lante A.: *A preliminary study in changes on phenolic content during Bianchetta Trevigiana winemaking*. J. Food Compos. Anal. 23, 575–579 (2010).
161. Sauvage S.-X., Bach B., Moutounet M., Vernhet A.: *Proteins in white wines: Thermo-sensitivity and differential adsorption by bentonite*. Food Chem. 118, 26-34 (2010).
162. Vernhet A., Moutounet M.: *Fouling of organic microfiltration membranes by wine constituents: Importance, relative impact of wine polysaccharides and polyphenols and incidence of membrane properties*. J. Membr. Sci. 201(1–2), 103–122 (2002).
163. Hernanz D., Recamales A. F., González-Miret M.L., Gómez-Míguez M.J., Vicario I.M., Heredia F. J.: *Phenolic composition of white wines with a prefermentative maceration at experimental and industrial scale*. J. Food Eng. 80, 327–335(2007).
164. Oliveira C.M., Ferreira A. C. S., De Freitas V., Silva A. M. S.: *Oxidation mechanisms occurring in wines*. Food Res. Int. 44, 1115–1126 (2011).
165. Recamales A.F., Sayago A., González-Miret M. L., Hernanz D.: *The effect of time and storage conditions on the phenolic composition and colour of white wine*. Food Res. Int. 39, 220-229 (2006).
166. Cheynier V., Rigaud J., Souquet J. M., Barillére J.M., Moutounet M.: *Must browning in relation to the behaviour of phenolic compounds during oxidation*. Am. J. Enol. Viticult. 41, 346–349 (1990).
167. Burns J., Gardner P. T., Matthews D., Duthie G. G., Lean M. E. J., Crozier A.: *Extraction of phenolic and changes in antioxidant activity of red wines during vinification*. J. Agric. Food Chem. 49, 5797–5808 (2001).

168. Baroni M. V., Di Paola Naranjo R. D., García-Ferreira C., Otaiza S., Wunderlin D. A.: *How good antioxidant is the red wine? Comparison of some in vitro and in vivo methods to assess the antioxidant capacity of Argentinean red wines*. LWT- Food Sci. Technol. 47, 1-7 (2012).
169. Alén-Ruiz F., García-Falcón M. S., Pérez-Lamela M. C., Martínez-Carballo E., Simal-Gándara J.: *Influence of major polyphenols on antioxidant activity in Mencía and Brancellao red wines*. Food Chem. 113, 53-60 (2009).
170. Kubišťová V.: *Diplomová práce*. Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc 2012.
171. Lachman J., Šulc M., Schilla M.: *Comparison of the total antioxidant status of Bohemian wines during the wine-making process*. Food Chem. 103, 802-807 (2007).
172. Zafrilla P., Morillas J., Mulero J., Cayuela J. M., Martínez-Cachá A., Pardo F., López Nicolás J. M.: *Changes during storage in conventional and ecological wine: Phenolic content and antioxidant activity*. J. Agric. Food Chem. 51, 4694-4700 (2003).
173. Di Majo D., La Guardia M., Giammanco S., La Neve L., Giammanco M.: *The antioxidant capacity of red wine in relationship with its polyphenolic constituents*. Food Chem. 111, 45-49 (2008).
174. Ghiselli A., Nardini M., Baldi A., Scaccini C.: *Antioxidant activity of different phenolic fractions separated from an Italian red wine*. J. Agric. Food Chem. 46(2), 361-367 (1998).
175. Katalinić V., Milos M., Modun D., Musić I., Boban M.: *Antioxidant effectiveness of selected wines in comparison with (+)-catechin*. Food Chem. 86, 593-600 (2004).
176. Arnous A. Makris D. P., Kefalas P.: *Correlation of pigment and flavanol content wine antioxidant properties in selected aged regional wines from Greece*. J. Food Compos. Anal. 15, 655-665 (2002).
177. Coletta A., Berto S., Crupi P., Cravero M. C., Tamborra P., Antonacci D., Daniele P. G., Prenesti E.: *Effect of viticulture practices on concentration of polyphenolic compounds and total antioxidant capacity of Southern Italy red wines*. Food Chem. 152, 467-474 (2014).
178. Kallithraka S., Salacha M. I., Tzourou I.: *Changes in phenolic composition and antioxidant activity of white wine during bottle storage: Accelerated browning test versus bottle storage*. Food Chem. 113, 500-505 (2009).

179. Fernández-Pachón M. S., Villaño D., Troncoso A. M., García-Parrilla M. C.: *Determination of the phenolic composition of sherry and table white wines by liquid chromatography and their relation with antioxidant activity*. Anal. Chim. Acta 563, 101-108 (2006).



## CURRICULUM VITAE

### *Mgr. Jana Prešerová*

Datum a místo narození: 5. února 1985 v Opavě, ČR  
Bydliště: Lesní 370, 747 66 Dolní Lhota, ČR  
E-mail: j.hruzikova@seznam.cz

#### **Pracovní zkušenosti:**

*1.10.2014 - doposud* TEVA Czech Industries s.r.o., Opava – Specialista pro laboratoře, oddělení kontroly kvality  
*1.9.2012- 31.8.2014* Univerzita Palackého v Olomouci, přírodovědecká fakulta – asistent manažerů projektu „Rozvoj vzdělání a výzkumu v oblasti chemie a medicíny popáleninových stavů“  
*1.9.2011 – 31.8.2012* Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta – vědecký pracovník

#### **Vzdělání:**

*2009 – doposud* postgraduální studium, obor analytická chemie, UP Olomouc  
*2007 – 2009* Mgr., obhájení diplomové práce „Studium vybraných dithiokarbamátových komplexů pomocí atomové absorpční spektrometrie“, obor analytická chemie, UP Olomouc  
*2004 – 2007* Bc., obhájení bakalářské práce „Chemiluminiscenční stanovení celkové antioxidační kapacity paprik“, obor aplikovaná chemie, UP Olomouc  
*2000 – 2004* farmaceutický laborant, Střední zdravotnická a vyšší zdravotnická škola Ostrava

#### **Odborné vědecké zaměření:**

Analytická chemie, infračervená a Ramanova spektroskopie, atomová absorpční spektrometrie, Analýza biologických systémů

#### **Jazykové znalosti:**

Anglický jazyk – středně pokročilý

#### **Pedagogická činnost:**

Laboratorní cvičení (Chemická instrumentace, Cvičení z instrumentálních metod, Cvičení z aplikované analytické chemie)

Základy chemie léčiv

### ***Odborná praxe a stáž:***

3.9. – 30.11.2012	Instituto de Estructura de la Materia, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Madrid, Španělsko
Červen 2012	TEVA Czech Industries s.r.o., Opava (Výzkum a vývoj, HLPC)
Srpen 2011	TEVA Czech Industries s.r.o., Opava (Výzkum a vývoj, solid state)
Červenec 2010	TEVA Czech Industries s.r.o., Opava (Výzkum a vývoj, solid state)
Červenec 2008	IVAX Pharmaceuticals s.r.o., Opava (Výzkum a vývoj, plynová chromatografie)

### ***Popularizace vědy a výzkumu:***

2013	Veletrh vědy a výzkumu
2010, 2011	Jarmark chemie, fyziky a matematiky

### ***Řešené projekty:***

2013	Projekt FRUP, Modernizace cvičení z instrumentálních metod (okruh 2); řešitel David Milde, interní spolupracovnice
2013	Projekt IGA, Úprava vzorku při analýze složitých matric, hlavní řešitel: doc. Petr Barták, Ph.D., člen týmu
2012-2014	Projekt OP VK, Rozvoj vzdělávání a výzkumu v oblasti chemie a medicíny popáleninových stavů, OP VK prioritní osa 2.4 CZ.1.07/2.4.00/31.0006); hlavní řešitel: doc. Jan Petr, člen týmu
2012	Projekt FRVŠ č. 2495/2012/G6, Inovace úloh a opora výstupů pro předmět Cvičení z chemické instrumentace; spoluředitelka
2011	Projekt OP VK, Rozvoj lidských zdrojů pro excelenci ve výzkumu v oblasti nanotechnologií v analytické chemii (OP VK prioritní osa 2.3 CZ.1.07/2.3.00/20.0018); hlavní řešitel Juraj Ševčík, členem týmu do září 2012
2011	Projekt IGA, Analýza izomerů biologicky aktivních látek; hlavní řešitel: prof. Karel Lemr, člen týmu
2011	Projekt FRVŠ č. 1546/2011/G6, Modernizace a rozšíření úloh do cvičení Chemická instrumentace; řešitelka

### ***Prezentace na odborných setkáních:***

3 plakátové sdělení

- Jana Prešerová, David Milde, Jan Stávek: Studium vybraných moravských vín pomocí FT-IR spektroskopie, 13. Konference ACP Analytická Chémie v Praxi 2014, Bratislava, Slovensko, 2.6.-4.6.2014
- Hruzíková J., Milde D., Ranc V., Krajancová P.: Study of Olomouc smear-cheese by infrared spectrometry, 7<sup>th</sup> Aegean Analytical Chemistry Days, Lesvos, Greece, 28.9.-3.10.2010, Book of abstract P1-16, str. 96

- Hruzíková J., Milde D., Ranc V., Krajancová P.: Studium plynné fáze tvarůžků pomocí infračervené spektrometrie, 14. česko-slovenská spektroskopická konference, Litomyšl 31.5.-3.6.2010

***Publikační činnost:***

- Jana Preserova, Vaclav Ranc, David Milde, Vladimíra Kubištová and Jan Stávek; Study of phenolic profile and antioxidant activity in selected Moravian wines during winemaking process by FT-IR spectroscopy, *J. Food Sci. Technol.* doi: 10.1007/s13197-014-1644-8 (2014).
- Jana Hruzíková, David Milde, Pavla Krajancova and Vaclav Ranc; Discrimination of cheese products for an authenticity control by infrared spectroscopy, *J.Agric.Food Chem.*, **2012**, 60, 1845 -1849.
- Vaclav Ranc, Jana Hruzikova, Kamil Maitner, Robert Pucek, David Milde, Libor Kvitek; Quantification of purine basis in their matures at femto-molar concentration levels using FT-SERS J. Raman Spectrosc. *43(8)*, 971–976 (2012).

## PŘÍLOHY

- Příloha č. 1: Hruzikova J., Milde D., Krajancova P., Ranc V.: *Discrimination of cheese products for an authenticity control by infrared spectroscopy*. J. Agric. Food Chem. *60*, 1845–1849 (2012)

## Discrimination of Cheese Products for Authenticity Control by Infrared Spectroscopy

Jana Hruzikova,<sup>†</sup> David Milde,<sup>†</sup> Pavla Krajancova,<sup>†</sup> and Vaclav Ranc\*<sup>\*,†,§</sup>

<sup>†</sup>Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Palacky University Olomouc, 17 listopadu 12, Olomouc CZ77146, Czech Republic

<sup>§</sup>Department of Physiology, Faculty of Medicine, University of Fribourg, Chemin du Musee 5, 1700 Fribourg, Switzerland

**ABSTRACT:** Quality and authenticity control serve as the customers' and manufacturers' insurance, and thus the development of analytical tools providing these tasks represents an important step of each product development. The control of authenticity in food manufacturing is even more important due to the direct influence of its products on the health of the population. This study sought to develop an easy to use and robust method for the authenticity control of cheese products. The method is based on the measurement of infrared spectra of the gas phase obtained by heating of selected cheese under controlled conditions. Two different procedures, that is, treatment of samples in a desiccator and their freeze-drying, were compared, and also various temperatures and heating times were studied. It was found that suitable fingerprint infrared spectra can be obtained by both techniques; however, freeze-drying offered faster analysis times. The sample heating temperature and time were evaluated using advanced statistical approaches, and it was found that suitable results could be obtained using 120 °C heating for 90 min. This method was tested for the authenticity control of two cheese families, Tvaruzky and Romadur, for which four cheese products were evaluated and successfully discriminated for each family. This method can be potentially used as a cheap and easy to use alternative to other commercially available options.

**KEYWORDS:** infrared spectrometry, gas phase, cheese, Olomouc curd cheese

### INTRODUCTION

The control of quality and authenticity presents an important task in all product development with an essential influence on the final consumer's satisfaction.<sup>1–5</sup> Both tasks serve as monitoring indicators of levels of product quality and could serve as customers' and manufacturers' insurance.<sup>6</sup>

Authenticity and quality control in a food production process could be seen as a task with a high importance, mainly due to its effects on the quality of life of customers as well as its effect on the manufacturer's prosperity.<sup>7–9</sup>

This study covers the development of pilot protocols for an evaluation of the authenticity of cheese products, that is, Olomoucké Tvaruzky<sup>10</sup> and Romadur.<sup>11</sup> Both products have a strong aroma flavor, which was used as a discrimination marker in this study. Tvaruzek presents a model example of a regional product (Region Hana, Czech Republic) with a registered trademark, and thus the authenticity control of such a product is highly demanding. On the other hand, Romadur presents an ideal model of cheese, for which a simple quality control could meaningfully increase consumers' satisfaction.<sup>12</sup>

From an analytical point of view, the analysis of milk products is usually performed using chromatographic approaches, with well-developed protocols and routine platforms, summarized, for example, in refs 13–17 and with more in-detail insights in the works by Chung et al.<sup>18</sup> or others.<sup>19,20</sup> On the other hand, infrared spectroscopy is a main technique in the quality control of milk products at the manufacturer's levels, especially regarding the control of intermediate products throughout all production steps.<sup>21</sup> Nonetheless, infrared spectroscopy was also used for a testing of cheese quality, for example, for fats,<sup>22</sup> control of the ripening process,<sup>23</sup> total

cheese constitution control,<sup>24</sup> control of milk quality,<sup>25</sup> or testing for free amino acids contaminations.<sup>23</sup>

Control of authenticity of cheese products represents an analytical question, and a fast and robust method for an initial screening in this field is still in great demand. Some pilot works have been conducted, mostly on Cheddar cheese,<sup>26,27</sup> Swiss cheese,<sup>28</sup> and general cheese products<sup>29</sup> with considerable advantages and disadvantages of demonstrated protocols.

In contrast to previously used techniques, our discrimination method is based on an evaluation of the gas phase of respective products, in which the main differences are expected.<sup>30–34</sup> According to our best knowledge, the total composition of cheese products and their nonoriginal, mostly illegal replications does not considerably differ on the general level, on one hand, and, on the other, the usually employed chromatographic approaches could detect even nonimportant variability between measured samples, which dramatically complicates the decision among relevant markers and random composition changes without any importance. Here the presented study sought to discriminate milk products (cheese) on a more fundamental level defined by a presence of volatile compounds as results of differences in the production and postproduction processes (e.g., different ingredients, diversity in ripening). This evaluation was accomplished by an evaluation of gas phase (flavor).

Received: October 27, 2011

Revised: January 24, 2012

Accepted: January 26, 2012

Published: January 26, 2012

## MATERIALS AND METHODS

**Cheese Sample Preparation.** Eight kinds of ripening cheeses were purchased from different local supermarkets and are described in

**Table 1. Samples of Ripening Cheeses**

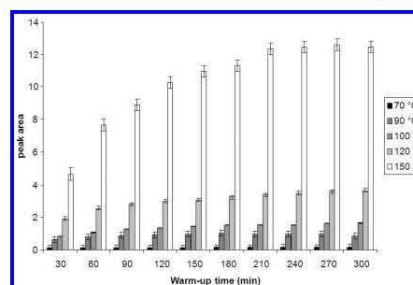
original name	country of origin	class name
Olomoucké tvarůžky	Czech Republic	Olomouc curd cheese (A1)
Jemné tvarůžky Loose	Germany	soft curd cheese 1 (A2)
Jemné tvarůžky	Germany	soft curd cheese 2 (A3)
Quargel natur	Austria	Austrian curd cheese (A4)
Romadur	Czech Republic	Romadur 1 (B1)
Original Rahm-Romadur (St. Mang)	Germany	Romadur 2 (B2)
Jarošůvský dezertní pivní sýr	Czech Republic	dessert cheese (B3)
Sedlečanský Romadůžek	Czech Republic	Romadůžek (B4)

Table 1. Cut up cheese pieces (size approximately 0.5 cm) were dried in a desiccator, under laboratory temperature, for 6 days. Freeze-drying was used as an alternative drying method and was carried out for 24 h by two steps with different conditions in the freeze-dryer (Christ, ALFA 1-2 LD plus, SciQuip Ltd.). The first step was main drying under conditions of  $-42\text{ }^{\circ}\text{C}$  and 0.097 mbar, and the second step was final drying under conditions of  $-55\text{ }^{\circ}\text{C}$  and 0.0049 mbar. These two procedures were tested as methods of choice to eliminate water from the sample, which could dramatically influence the resulting infrared spectra and thus interfere in the discrimination process.

A short path EC gas cell (PIKE Technologies) was used for the measurement.

**FT-IR Analysis.** The measurement of each sample was carried out on an FT-IR spectrometer (Nicolet 6700, Thermo) with an ETC EverGlo radiation source, a deuterated triglycine sulfate detector, and a potassium bromide beam splitter. The infrared spectra were obtained in the range of  $4000\text{--}650\text{ cm}^{-1}$  with a spectral resolution of  $4\text{ cm}^{-1}$ . Each evaluated spectrum is a mean of 64 scans. Dried cheese (2.00 g) was heated in an infrared gas cell made of glass with an effective length of 10 cm and a diameter of 2.5 cm equipped with ZnSe windows ( $2.5\text{ cm} \times 3\text{ mm}$ ). The two most intense spectral bands interpreted as carboxylic groups vibrations ( $966$  and  $930\text{ cm}^{-1}$ ) were selected as monitoring indicators of the heating process. Infrared spectra of corresponding gaseous phases were measured at temperatures from  $70$  to  $150\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;  $120\text{ }^{\circ}\text{C}$  was selected for all subsequent measurements. The time of the heating process presents another essential parameter and was studied from 30 to 300 min for each temperature; an interval of 90 min was selected. The histogram showing mean intensities of these two bands at different experimental conditions is shown in Figure 1 (see also Table 2). The background was measured using an empty infrared gas cell with ZnSe windows before measurement of samples. From each ripening cheese three samples were taken and were measured six times if not stated otherwise.

**Multivariate Analysis.** Discriminant analysis was applied for an evaluation of spectral data of gaseous phases of samples using spectroscopic software TQ Analyst 8 (Thermo Scientific). Discriminant analysis was used to statistically evaluate the differences among objects from different groups (various cheese samples) and to find similarities among objects inside one group (several measurements of one cheese sample). The indicator of such difference/similarity was a Mahalanobis distance.



**Figure 1.** Dependence of peak area on warm-up time. Error bars indicate standard deviations.

**Table 2. Value of Peak Area and RSD for Each Temperature**

temperature ( $^{\circ}\text{C}$ )	average peak area	RSD (%)
70	0.16	14.42
90	0.91	17.93
100	1.39	2.85
120	3.08	10.87
150	10.37	35.89

## RESULTS

**Protocol Development.** The gaseous phase of each sample was measured by FT-IR spectrometry under defined heating conditions in a glass cuvette (for details see Materials and Methods and Figure 1). Representative mid-infrared spectra of the gaseous phase of Olomouc curd cheese and Romadur are shown in Figure 2, top and bottom panels, respectively. The regions from  $4000$  to  $3500\text{ cm}^{-1}$  and from  $2000$  to  $1300\text{ cm}^{-1}$  consist of vibrational bands of O–H groups, which could belong to the water vapor present. The spectral range from  $1300$  to  $650\text{ cm}^{-1}$  contains two major bands at  $966$  and  $930\text{ cm}^{-1}$  that have been ascribed as C–H bending vibrations of fatty acids and O–H out-of-plane bending vibration of carboxylic acids. Both low molecular weight fatty acids and carboxylic acids are key factors of the resulting flavor of curd cheese. In contrast to Tvaruzky, spectra of ripening cheese type Romadur contain C–H stretching vibrations of  $-\text{CH}_3$  and  $>\text{CH}_2$  groups of fatty acids in the region from  $3000$  to  $2800\text{ cm}^{-1}$  (for details see Figure 3).

Two methods of sample drying were tested and compared, and the influence of further statistical evaluation was evaluated. Sample drying was found as an essential step in the sample preparation process due to the considerable influence of the water vapor present on the resulting infrared spectra. First, drying in a desiccator was tested. On the basis of observed infrared spectra (data not shown), it was found that the minimum time for a suitable sample drying is several days; an interval of 6 days was selected as a compromise between time consumption and obtained results. Second, freeze-drying was evaluated. This type of sample processing allowed shortening the sample preprocessing times to several hours, and this process also offers easy to use automation. Spectra obtained by both drying techniques showed moderate bands of water vapor (for details see Figure 2); however, they did not interfere with further statistical evaluation.

**Discriminant Analysis (DA).** DA was applied to classify two groups of ripening cheeses, Tvaruzky and Romadur, in the

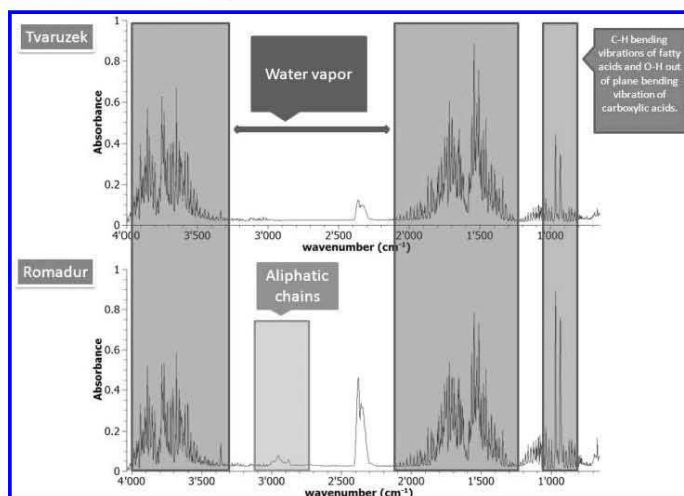


Figure 2. FT-IR spectrum of gaseous phase of Olomouc curd cheese and Romadur 1 measured after 90 min of heating at 120 °C.

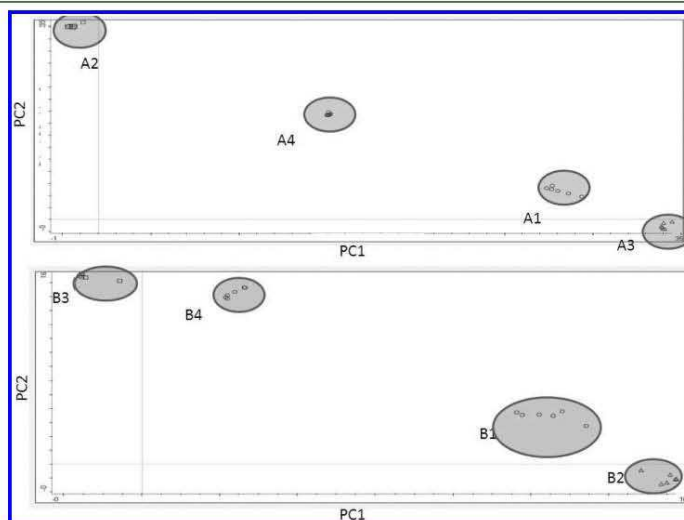


Figure 3. Plot of classification of ripening curd type cheese obtained by a statistical analysis. A1, Olomouc curd cheese; A2, soft curd cheese 1; A3, soft curd cheese 2; A4, Austrian curd cheese; B1, Romadur 1; B2, Romadur 2; B3, dessert cheese; B4, Romadůžek.

infrared region from 4000 to 700  $\text{cm}^{-1}$ . Both groups were represented by four samples of cheeses (with six measurements of each sample). DA is the differentiation of individual classes of samples, and it can be graphically expressed in a two-dimensional space by the Mahalanobis distance describing the space between centroids of two classes. Figure 3 shows the classification of Tvaruzky curd cheese using six principal components for the classification. The  $x$ -axis shows the Mahalanobis distance to the soft curd cheese 1, whereas the  $y$ -axis shows the distance to the soft curd cheese 2. There, it can

be seen that individual samples of curd cheeses make separate clusters, which have different interclass Mahalanobis distances (Table 3). Resulting interclass distances are presented in Table 3. Significant differences in distances were found for classes Olomouc curd cheese (A1)–soft curd cheese 1 (A2) and soft curd cheese 2 (A3)–soft curd cheese 1 (A2).

Similarly, the classification of ripening Romadur type cheese was performed, and the resulting Mahalanobis distances are summarized in Table 3. Figure 3 also shows a graphical expression of classification of ripening Romadur type cheeses

**Table 3. Mahalanobis Distances between Classes of Ripening Curd Type Cheese (A1, Olomouc Curd Cheese; A2, Soft Curd Cheese 1; A3, Soft Curd Cheese 2; A4, Austrian Curd Cheese) and Romadur Type Cheese (B1, Romadur 1; B2, Romadur 2; B3, Dessert Cheese; B4, Romadůžek) from Discriminant Analysis**

type of curd cheese	A1	A2	A3	A4
A1		1.98 <sup>b</sup>	7.03 <sup>b</sup>	17.73 <sup>b</sup>
A2	28.13 <sup>a</sup>		5.27 <sup>b</sup>	16.75 <sup>b</sup>
A3	6.77 <sup>a</sup>	34.07 <sup>a</sup>		13.65 <sup>b</sup>
A4	13.70 <sup>a</sup>	15.06 <sup>a</sup>	19.46 <sup>a</sup>	
type of Romadur cheese	B1	B2	B3	B4
B1		5.49 <sup>b</sup>	12.40 <sup>b</sup>	11.93 <sup>b</sup>
B2	10.32 <sup>a</sup>		15.44 <sup>b</sup>	14.26 <sup>b</sup>
B3	15.00 <sup>a</sup>	16.26 <sup>a</sup>		4.38 <sup>b</sup>
B4	60.78 <sup>a</sup>	68.65 <sup>a</sup>	54.73 <sup>a</sup>	

<sup>a</sup>Samples dried in the desiccator. <sup>b</sup>Samples dried in the freeze-dryer.

using six principal components. Significant differences in Mahalanobis distances were found for classes Romadur 1 (B1)–Romadůžek (B4), Romadur 2 (B2)–Romadůžek (B4), and Romadůžek (B4)–dessert cheese (B3) when sample pretreatments were compared.

## DISCUSSION

On the basis of the conducted comprehensive characterization of infrared spectra of Tvaruzky and Romadur cheeses, it could be stated that the general compositions of these two milk products from our point of view are similar, but with considerable differences especially in the region of 2500–3500 cm<sup>-1</sup>, where the aliphatic groups of fatty acids could be observed and are distinctive especially for products with high content of fats (for details, see Figure 2). Romadur cheese can contain up to 40% fat, and thus the bands at these regions are observed with higher intensities; on the other hand, Tvaruzky contains no more than 2% fat, and these bands are missing in the spectra.

With regard to the results of a comparison between freeze-drying and drying in a desiccator, it could be stated that both techniques provide suitable results of DA expressed by respective space distances. Nonetheless, the freeze-drying process could be performed overnight in contrast to desiccator drying, which takes up to 6 days (depending on cheese amount, type, and initial conditions), and also additional ripening and chemical decomposition processes could be expected. These processes could be then a reason for the different Mahalanobis distances observed for both drying processes. In summary, both groups of ripening cheeses (Tvaruzky and Romadur) can be distinguished using a desiccator or freeze-dryer; however, the Mahalanobis distances are higher when a desiccator is used, at the price of longer sample pretreatment times.

DA of Tvaruzky cheese uncovered significant differences (expressed by space distances) among original Tvaruzky cheese and its nonoriginal variants labeled as A2–A4 samples. These changes could be a result of the different ingredients used, variations in the ripening process, or changes in product postproduction. Similar results were obtained also for Romadur cheese, for which statistically relevant differences were observed among four types of selected Romadur cheese.

The development of suitable tools that provide a control of authenticity of food products presents an important task usually performed by analytical or food chemists. The study presented

here sought to develop a protocol for an authenticity control of selected cheeses, that is, Tvaruzky and Romadur, based on the utilization of infrared spectroscopy. The developed protocol uses an evaluation of cheese flavor measured as a gas phase after a sample heating process performed in a glass cuvette. The performed DA allowed us to statistically distinguish among original Tvaruzky cheese and its nonoriginal copies. The differences among samples are expressed using Mahalanobis distances in corresponding graphical expressions (Figure 3). The protocol development was based on the comparison of two drying procedures: desiccator drying and freeze-drying. Both approaches afford suitable results; however, freeze-drying represents a faster approach for the prize of slightly lower space distances among sample clusters in a DA. Similar results were obtained for the Romadur cheese analysis, where the protocol allows four different types of this particular type of cheese to be distinguished and thus the control of the authenticity of such products.

This protocol could be potentially used in food manufacturing processes or by authenticity control institutions, where it could serve as a cheap and relatively easy to automate process of screening. Nonetheless, more detailed cheese characteristics could be provided by chromatographic approaches when needed.

## AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Author

\*E-mail: vaclav.ranc@unifr.ch

### Funding

This research was supported by a grant from the Ministry of Education (MSM6198959216), Czech Republic, and by the student project PrF\_2011\_025 of Palacky University.

### Notes

The authors declare no competing financial interest.

## REFERENCES

- (1) Romano, J. Advanced technologies for food and beverage quality control. *Agro Food Ind. Hi-Tech* 2011, 22 (3), 2–2.
- (2) News related to foreign food quality control events. *Élelmiszerbiztonsági Kozl.* 2010, 56 (3), 194–200.
- (3) Hron, J.; Macak, T. Control of food products' quality. *Agric. Econ. (Zemedska Ekonomika)* 2009, 55 (5), 221–228.
- (4) Mannino, S.; Scampicchio, M. Nanotechnology and food quality control. *Vet. Res. Commun.* 2007, 31, 149–151.
- (5) Robinson, R. K. *Modern Dairy Technology*; Elsevier Applied Science Publishers: London, U.K., 1986.
- (6) Ma, X. Study on quality and safety supervision control system for food supply chain. *2009 IEEE 16th International Conference on Industrial Engineering and Engineering Management, Vol. 1 and 2, Proceedings*; Piscataway, NJ, 2009; pp 1141–1144.
- (7) Hardin, R. S.; Kunder, M. M.; Woodward, C. L.; Donalson, M.; Golbach, J. L.; Ricke, S. C. Development of a quality control laboratory design project for poultry science undergraduate students enrolled in an advanced food microbiology course. *J. Dairy Sci.* 2004, 87, 76–76.
- (8) Duran, L. Measurement of sensory attributes in food quality control. *Acta Aliment.* 2004, 33 (2), 97–100.
- (9) Alli, I. Food quality assurance – process-control. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* 1990, 23 (4–5), 156–159.
- (10) Standarova, E.; Vorlova, L.; Kordiovska, P.; Janstova, B.; Drackova, M.; Borkovcova, I. Biogenic amine production in Olomouc curd cheese (Olomoucke tvaruzky) at various storage conditions. *Acta Vet. Brno* 2010, 79 (1), 147–156.
- (11) Foster, R. D. *Cheese: Types, Nutrition, and Consumption*; Nova Science Publishers: Hauppauge, NY, 2011.



- (12) Behnke, U.; Lieske, B. [Studies on the incidence of volatile sulfur compounds during the ripening of Camembert, Romadur, Tollen and Edam cheeses. 2. Chemical and organoleptic studies]. *Nahrung* **1973**, *17* (4), 479–498.
- (13) Styrelsen för internationell utveckling. Manual of food quality control. In *FAO Food and Nutrition Paper 14*; Food and Agriculture Organization of the United Nations: Rome, Italy, 1979; p v.
- (14) *Validation of Analytical Methods for Food Control*; report of a Joint FAO/IAEA Expert Consultation, Vienna, Austria, Dec 2–4, 1997; Food and Agriculture Organization of the United Nations: Rome, Italy, 1998; p 19
- (15) TACIS Technical Dissemination Project. European Commission. DG IA–External Political Relations. *Setting up a Food Control Laboratory: The Example of Puschino*; European Commission; UNIPUB Distributor: Brussels, Belgium, 1996; p 60.
- (16) Wilson, S.; Weir, G. *Food and Drink Laboratory Accreditation: A Practical Approach*; Chapman and Hall: London, U.K., 1995; p xxiv, 262 pp.
- (17) Chiaradia-Bousquet, J.-P. *Legislation Governing Food Control and Quality Certification: Authorities and Producers*; Food and Agriculture Organization of the United Nations: Rome, Italy, 1995; p x, 125 pp.
- (18) Chung, S. W. C.; Chan, B. T. P. Validation and use of a fast sample preparation method and liquid chromatography-tandem mass spectrometry in analysis of ultra-trace levels of 98 organophosphorus pesticide and carbamate residues in a total diet study involving diversified food types. *J. Chromatogr., A* **2010**, *1217* (29), 4815–4824.
- (19) Di Corcia, A.; Bogjalli, S.; Coradazzi, C.; Lagana, A.; Sergi, M. A rapid method based on hot water extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry for analyzing tetracycline antibiotic residues in cheese. *J. AOAC Int.* **2007**, *90* (3), 864–871.
- (20) Leonil, J.; Gagnaire, V.; Molle, D.; Pezennec, S.; Bouhallab, S. Application of chromatography and mass spectrometry to the characterization of food proteins and derived peptides. *J. Chromatogr., A* **2000**, *881* (1–2), 1–21.
- (21) Zheng, L. M.; Wang, T. Z.; Tian, L. J.; Wu, P.; Zhu, H.; Ren, F. Z. Analysis of milk and dairy products by near-infrared spectroscopy: a review. *Spectrosc. Spectral Anal.* **2010**, *30* (12), 3208–3212.
- (22) Wehling, R. L.; Pierce, M. M. Application of near-infrared reflectance spectroscopy to determination of fat in Cheddar cheese. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **1989**, *72* (1), 56–58.
- (23) Skeie, S.; Feten, G.; Almoy, T.; Ostlie, H.; Isaksson, T. The use of near infrared spectroscopy to predict selected free amino acids during cheese ripening. *Int. Dairy J.* **2006**, *16* (3), 236–242.
- (24) Rohm, H.; Sultaneh, A. Using near infrared spectroscopy for the determination of total solids and protein content in cheese curd. *Int. J. Dairy Technol.* **2007**, *60* (4), 241–244.
- (25) Vukasinovic, Z.; Antunac, N.; Mikulec, N.; Mioc, B.; Barac, Z. Production and milk quality of Pag sheep. *Mljekarstvo* **2008**, *58* (1), 5–20.
- (26) Subramanian, A.; Harper, J. W.; Rodriguez-Saona, L. E. Classification of cheddar cheese based on flavor quality using Fourier transform infrared spectroscopy. *J. Dairy Sci.* **2007**, *90*, 146–146.
- (27) Rodriguez-Saona, L. E.; Subramanian, A.; Harper, W. J. Cheddar cheese classification based on flavor quality using a novel extraction method and Fourier transform infrared spectroscopy. *J. Dairy Sci.* **2009**, *92* (1), 87–94.
- (28) Rodriguez-Saona, L. E.; Kocaoglu-Vurma, N. A.; Eliardi, A.; Drake, M. A.; Harper, W. J. Rapid profiling of Swiss cheese by attenuated total reflectance (ATR) infrared spectroscopy and descriptive sensory analysis. *J. Food Sci.* **2009**, *74* (6), S232–S239.
- (29) Xu, H. R.; Sun, T.; Ying, Y. B. Progress in application of near infrared spectroscopy to nondestructive on-line detection of products/food quality. *Spectrosc. Spectral Anal.* **2009**, *29* (1), 122–126.
- (30) Drake, M. A.; Miracle, R. E.; McMahon, D. J. Impact of fat reduction on flavor and flavor chemistry of Cheddar cheeses. *J. Dairy Sci.* **2010**, *93* (11), S069–S081.
- (31) Evans, J.; Zulewska, J.; Newbold, M.; Drake, M. A.; Barbano, D. M. Comparison of composition, sensory, and volatile components of thirty-four percent whey protein and milk serum protein concentrates. *J. Dairy Sci.* **2009**, *92* (10), 4773–4791.
- (32) Januszkiewicz, J.; Sabik, H.; Azarnia, S.; Lee, B. Optimization of headspace solid-phase microextraction for the analysis of specific flavors in enzyme modified and natural Cheddar cheese using factorial design and response surface methodology. *J. Chromatogr., A* **2008**, *1195* (1–2), 16–24.
- (33) Hayaloglu, A. A.; Cakmakci, S.; Brechany, E. Y.; Deegan, K. C.; McSweeney, P. L. Microbiology, biochemistry, and volatile composition of Tulum cheese ripened in goat's skin or plastic bags. *J. Dairy Sci.* **2007**, *90* (3), 1102–1121.
- (34) Carpino, S.; Mallia, S.; La Terra, S.; Mellilli, C.; Licitra, G.; Acree, T. E.; Barbano, D. M.; Van Soest, P. J. Composition and aroma compounds of Ragusano cheese: native pasture and total mixed rations. *J. Dairy Sci.* **2004**, *87* (4), 816–830.